
Istaroxime como terapia inotrópica emergente. Evaluación de su perfil de toxicidad directa sobre miocitos cardíacos y de su eficacia inotrópica en un modelo de insuficiencia cardíaca séptica.

Presentado en pedido de subsidio tipo B (Jóvenes)

OBJETIVOS GENERALES

La insuficiencia cardíaca (IC) es un síndrome caracterizado por la incapacidad del corazón para mantener un volumen minuto adecuado a las necesidades del organismo y constituye la evolución final de distintas patologías cardiovasculares. Su impacto en la salud de los individuos es grave y es una de las principales causas de morbi-mortalidad tanto a nivel local como internacional. En nuestro país el impacto de la IC se incrementa por ser región endémica para enfermedad de Chagas ^{1, 2}.

El tratamiento actual de la IC ha demostrado reducir la incidencia de muerte súbita en pacientes con IC, aunque cada vez más pacientes mueren por fallo de bomba ³, por lo cual es necesario evaluar nuevas terapias que apunten a mejorar la función contráctil. La utilización de inotrópicos, incluidos los digitálicos como digoxina y otros como dobutamina, milrinona o levosimendan, genera beneficios hemodinámicos de corto plazo pero son ineficaces para mejorar la evolución clínica e incluso pueden ser deletéreos. ^{4, 5, 6}. Entre las limitaciones al uso de inotrópicos se encuentra la aparición de arritmias y daño miocárdico asociado a incremento en el consumo de oxígeno o a toxicidad directa sobre los cardiomiocitos ⁷. Actualmente, un nuevo inotrópico que cuenta con una interesante combinación de efectos intracelulares, el istaroxime, se encuentra en fase dos de ensayo clínico y es propuesto para el soporte inotrópico de pacientes con IC aguda ⁸.

El Istaroxime es un compuesto esteroideo no relacionado estructuralmente con los glucósidos cardiotónicos o digitálicos, pero comparte con estos su capacidad para inhibir la Na⁺/K⁺ ATPasa. Lo que despierta un interés particular es que cuenta con la capacidad adicional de incrementar la tasa de retoma de Ca²⁺ hacia el retículo sarcoplasmático (RS) mediada por la bomba de Ca²⁺ del RS (SERCA) ⁹ y de este modo combina su efecto inotrópico positivo con un efecto lusitrópico que, según se especula, lo volvería menos arritmogénico que los digitálicos clásicos ^{9,10}. Sin embargo, aunque la mayor atención se enfoca sobre la relación entre eficacia inotrópica y potencial arritmogénico, existe otro efecto deletéreo asociado a la inhibición de la Na⁺/K⁺ ATPasa que consiste en la pérdida de cardiomiocitos por apoptosis ^{11,12}.

Desde hace varios años se ha reconocido que la pérdida de miocitos producida por apoptosis juega un importante papel en la progresión de la insuficiencia cardíaca (IC) y en el deterioro de la función contráctil observada en curso de esta entidad patológica ¹³. Entre los mecanismos propuestos como iniciadores de la apoptosis de cardiomiocitos están las alteraciones en el manejo del Ca²⁺ intracelular ¹⁴ y la activación de la quinasa dependiente de calcio y calmodulina tipo II (CaMKII), conformando ambos un círculo vicioso involucrado en la apoptosis inducida por estimulación crónica con isoproterenol ¹⁵, por isquemia/reperfusión ¹⁶ y, de particular interés para este proyecto, en la apoptosis inducida por digitálicos ¹². En cuanto al potencial mecanismo por el cual la disrupción en

el manejo de Ca^{2+} y la activación de CaMKII pueden llevar a la muerte de cardiomiocitos hay que considerar que ambos fenómenos aumentan la liberación de Ca^{2+} desde el RS. A su vez, ha sido demostrado que la interacción RS-mitocondria lleva a la apoptosis mediante un mecanismo que implica la liberación de Ca^{2+} desde el RS y su captación por parte de las mitocondrias ^{17; 18}. De este modo se llega a un estado de exceso de Ca^{2+} en las mitocondrias, lo que induce apoptosis al abrir los poros de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) ¹⁹. Es justamente a este nivel donde el istaroxime, al acelerar la retoma de Ca^{2+} hacia el RS podría interferir con el proceso que conduce a la muerte apoptótica de cardiomiocitos. Considerando los conceptos presentados, el objetivo de este proyecto será dilucidar cuál es el impacto que el tratamiento con istaroxime tiene sobre la sobrevivencia de los miocitos cardiacos y la actividad de CaMKII. Paralelamente, y dado que no existe evidencia experimental al respecto, nos proponemos expandir el conocimiento acerca de la eficacia del istaroxime para mejorar la función cardíaca en un modelo de IC séptica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Hipótesis de trabajo 1: El tratamiento de cardiomiocitos con istaroxime tendrá un menor impacto en la viabilidad celular/apoptosis que el tratamiento con otros inhibidores de la NKA como ouabaina y digoxina. Esto podría ocurrir por una reducción en la pérdida espontánea de Ca^{2+} asociada a menor actividad de CaMKII o por una menor transferencia de Ca^{2+} hacia las mitocondrias provocada por la retoma rápida del mismo hacia el RS.

Hipótesis de trabajo 2: El tratamiento con istaroxime será una estrategia eficaz y segura para sostener la función cardíaca en un modelo murino de sepsis inducida por peritonitis.

Para poner a prueba estas hipótesis se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1- Evaluar si el tratamiento crónico con dosis terapéuticas de istaroxime es capaz de promover muerte celular en cultivos primarios de cardiomiocitos de ratón y en cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes humanas (IPSC), comparando en ambos casos contra el efecto obtenido con inhibidores de la Na^+/K^+ ATPasa a dosis equi-inotrópicas.
- 2- Medir la actividad de CaMKII, no solo por su importancia en apoptosis sino como evento independiente capaz de activar otras rutas fisiopatológicas.
- 3- Profundizar el conocimiento mecanístico en relación al impacto que el istaroxime tiene sobre el manejo del Ca^{2+} intracelular mediante el estudio de las chispas y ondas de calcio. Apuntando a explicar como el istaroxime reduce la propensión a arritmias en comparación a otros inhibidores de la Na^+/K^+ ATPasa y comprender si esto afecta también el perfil de toxicidad sobre los cardiomiocitos.
- 4- Evaluar la eficacia terapéutica y el margen de seguridad del istaroxime en un modelo de insuficiencia cardíaca aguda inducida por sepsis, lo que no ha sido aún explorado.

RELEVANCIA DEL PROBLEMA

En base a su evolución se puede considerar a la IC crónica, de comienzo insidioso y deterioro funcional progresivo, y a la IC aguda de inicio súbito tal como puede ocurrir tras un infarto o durante el shock séptico. Adicionalmente, la combinación es posible en los casos de IC crónica descompensada, cuya situación clínica y urgencia terapéutica se asemeja a la IC aguda. Por otro lado pueden distinguirse dos tipos de IC en cuanto al tipo de disfunción del músculo cardíaco, que en forma sencilla puede dividirse en disfunción sistólica, diastólica o una combinación de ambos patrones.

La figura 1 esquematiza el ciclado de Ca^{2+} en las células cardíacas, responsable del ciclo acortamiento-relajación y compuesto por una fase de aumento sistólico ocurrido ante la llegada de un potencial de acción que activa el ingreso de Ca^{2+} a través de los canales de tipo L capaz de mediar la liberación del calcio contenido en el RS a través de los receptores de rianodina cardíacos (RyR2) en un proceso conocido como liberación de calcio inducida por calcio²⁰. Posteriormente ocurre la relajación diastólica debido al descenso en la concentración de Ca^{2+} citosólico, que depende en un 70 % de su retorno al RS mediado por SERCA y en un 30 % a su extrusión mediada por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)²¹. Durante el periodo diastólico, los RyR2 no están completamente inactivos sino que permiten que una cierta cantidad de Ca^{2+} del RS pase espontáneamente hacia el citosol. Esta liberación espontánea denominada pérdida de Ca^{2+} del RS, en inglés “calcium leak”, se manifiesta como liberaciones de Ca^{2+} delimitadas espacialmente denominadas chispas de Ca^{2+} del inglés “calcium sparks” o si son mayores en magnitud, como liberaciones que se propagan espacialmente, denominadas ondas de Ca^{2+} del inglés “calcium waves”. El Ca^{2+} liberado al citosol durante una onda de Ca^{2+} es extruido por el NCX que, al ser electrogénico, genera una corriente despolarizante denominada corriente despolarizante transitoria hacia adentro (depolarizing transient inward current (Iti)). En situaciones patológicas asociadas con la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular, las ondas de Ca^{2+} se multiplican y activan esta corriente, generando posdespolarizaciones tardías (DADs) que si alcanzan el umbral de excitabilidad pueden gatillar potenciales de acción espontáneos y arritmias^{22 23}. Las ondas de Ca^{2+} , también pueden alterar la duración del potencial de acción y promover una heterogeneidad en la distribución del potencial de acción que constituye otro sustrato proarritmogénico²⁴. Además, el exceso de ondas de Ca^{2+} ha sido asociado con la inducción de apoptosis a través de diversos mecanismos entre ellos, la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial o la activación de quinasas dependientes de Ca^{2+} que promueven la muerte celular^{25 26 27 28}.

La proteína quinasa Ca^{2+} /calmodulina-dependiente II (CaMKII) es una quinasa ubicua que puede ser activada por diversos estímulos, entre ellos oxidación, nitrosilación, glicosilación e incrementos de Ca^{2+} intracelular^{29 30} y su isoforma δ es la que predomina en el corazón. Dos variantes de corte (splicing variants) de la CaMKII δ han sido identificadas, CaMKII δC y CaMKII δB localizadas en el citoplasma y en el núcleo, respectivamente. La CaMKII es una serina/treonina quinasa que fosforila una amplia gama de proteínas en respuesta a un aumento del Ca^{2+} intracelular y entre sus funciones más estudiadas se encuentran la regulación del acoplamiento éxcito-contráctil (AEC)³¹ y la regulación de la expresión génica³². Por otra parte, la expresión de la CaMKII se halla aumentada en la IC³³. Por su destacado efecto sobre el manejo del Ca^{2+} intracelular, la mayoría de los autores han sugerido que la variante citosólica (CaMKII δC) y no la nuclear (CaMKII δB) sería la isoforma involucrada en los procesos apoptóticos.

La actividad de SERCA es tónicamente inhibida por su interacción con la proteína Fosfolamban (PLB), la cual se separa de SERCA al ser fosforilada por quinasas intracelulares tales como la proteína quinasa A (PKA) o la CaMKII. En un trabajo reciente ha sido demostrado que istaroxime interfiere con la interacción SERCA-Fosfolamban ³⁴, aunque no está demostrado que esta disociación sea el único mecanismo por el cual aumenta la recaptación de Ca^{2+} .

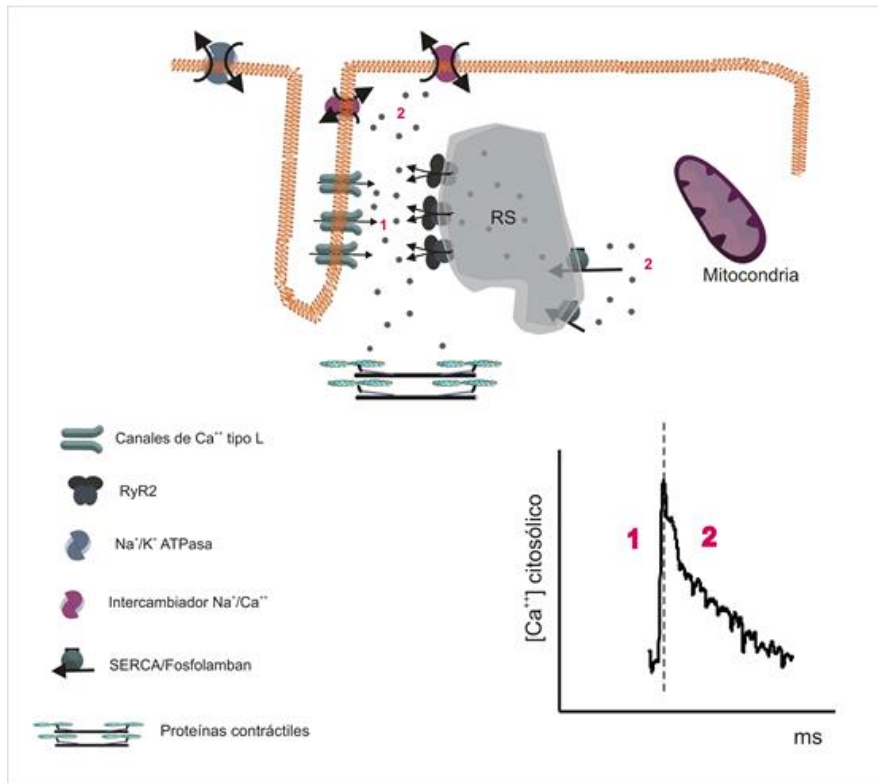


Figura 1: Esquema que incluye a las principales proteínas involucradas en el flujo intracelular de Ca^{2+} durante el AEC (1), y aquellas necesarias para la posterior reducción en la concentración citosólica de Ca^{2+} que permita la relajación mecánica (2).

En cuanto a la forma en que los digitálicos afectan el manejo de Ca^{2+} intracelular, ha sido ampliamente demostrado que provocan una acumulación de este ión dentro de las células en forma secundaria al incremento citosólico de Na^+ producido por la inhibición de la Na^+/K^+ ATPasa y esto conlleva tanto a un aumento en la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} , que explica su efecto inotrópico, como a un aumento en la liberación diastólica arritmogénica de Ca^{2+} . Interesantemente, un estudio comparativo en miocitos de ratón utilizando concentraciones equi-inotrópicas de digoxina e istaroxime mostró que istaroxime no solo provoca menor incidencia de ondas de calcio sino que lleva a un menor incremento en la concentración diastólica de calcio ⁹.

La utilización de Istaroxime ya cuenta con evidencia clínica, que es aportada por los resultados obtenidos en el ensayo clínico Horizon-HF. Este es un estudio randomizado en fase dos, que evalúa pacientes hospitalizados con insuficiencia cardíaca aguda ^{8; 35}. También estudios previos en humanos han evaluado su eficacia en pacientes con IC crónica ³⁶, en ambos casos mejora tanto la función sistólica como diastólica, y reduce la frecuencia cardíaca. Sin embargo, no hay registros aún de tratamiento crónico

administrado en forma ambulatoria, siendo lo más cercano el tratamiento crónico en hámsters con cardiomiopatía en los que mejoró la función cardíaca ³⁷.

Paralelamente, el istaroxime ha demostrado también tener actividad anti-tumoral in vitro en múltiples líneas celulares. Un hecho interesante tiene que ver con la potencia demostrada para este efecto, ya que tanto la concentración capaz de inhibir el crecimiento en un 50% como la dosis letal al 50% se encuentran en el rango micromolar bajo en todas las líneas celulares y aunque cierta capacidad antiproliferativa fue observada en fibroblastos normales, tanto la concentración inhibitoria como la dosis letal fueron significativamente mayores a las registradas en células tumorales ³⁸.

Tanto para poder comprender cuán viable sería su utilización en el tratamiento de IC crónica, como teniendo en cuenta que la IC aguda se considera un estado que debería tratarse durante 48 horas ^{39; 40} sería valioso conocer cuál es el efecto que el tratamiento con istaroxime tiene sobre las células cardíacas en modelos de tratamiento crónico. Esto aplica incluso dado que este fármaco tiene un probado efecto antitumoral que lo ubica como potencial terapia contra el cáncer de próstata ⁴¹.

RESULTADOS PRELIMINARES Y APORTES DEL GRUPO AL ESTUDIO DEL PROBLEMA EN CUESTIÓN

Desde hace varios años tanto el investigador responsable como parte del grupo colaborador está abocado al estudio de los mecanismos básicos responsables de la disfunción contráctil y las arritmias que ocurren en distintas situaciones fisiopatológicas. En particular, nuestro grupo ha demostrado que la exposición crónica de los miocitos cardíacos a concentraciones sub-arritmogénicas de digitálicos (ouabaína, digoxina) en un modelo de exposición crónica (cultivo 24 hs) es capaz de activar a CaMKII y de este modo inducir muerte celular por apoptosis. Por otro lado, hemos mostrado que el tratamiento agudo con dosis tóxicas de ouabaína o digoxina desencadena un aumento en la liberación espontánea de Ca^{2+} del RS que depende de la fosforilación de los RyR2 por CaMKII y de este modo es capaz de disparar la aparición de arritmias en ratones tratados con digitálicos ⁴². Más recientemente, logramos reducir la incidencia de ondas arritmogénicas de Ca^{2+} y prevenir apoptosis de cardiomiocitos inducida por digitálicos mediante la estabilización farmacológica de los RyR2 ⁴³.

Ha sido ampliamente demostrada la interacción fisiopatológica entre el RS y las mitocondrias ⁴⁴. En esta interacción las mitocondrias incorporan parte del Ca^{2+} liberado por el RS, con la consecuente sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} que es capaz de gatillar apoptosis celular en condiciones en las que la pérdida espontánea desde el RS está aumentada. Nuestro grupo ha confirmado que los digitálicos son capaces de inducir la pérdida de cardiomiocitos por apoptosis aún en concentraciones sub-arritmogénicas ¹². Los RyR2 fosforilados tienden a liberar calcio en diástole, lo que constituye un mecanismo proarrítmico y proapoptótico que puede ser contrarrestado por la activación de SERCA a dos niveles: 1-interfiriendo en la generación y propagación de las ondas de Ca^{2+} , lo que bajaría su incidencia o haría de ellas un evento menos arrítmogénico al reducir su amplitud. 2-previniendo la sobrecarga de Ca^{2+} en las mitocondrias al aumentar la fracción del Ca^{2+} que tras cada liberación vuelve al RS en lugar de ser incorporado a las mitocondrias.

Por otro lado, dado el potencial carácter traslacional que pueden tener los resultados de este proyecto, proponemos realizar experimentos en células humanas IPS (induced Pluripotent Stem) diferenciadas a cardiomiocitos (hPSc-CMs) con el objetivo de verificar si los resultados obtenidos en modelos animales se pueden reproducir en un modelo celular humano. Con este propósito, colaboraremos con el Dr. Santiago Miriuka, especialista en cultivos de células pluripotentes y mesenquimales diferenciadas a distintos tipos celulares, quien forma parte del grupo colaborador del presente proyecto. De hecho, recientemente hemos trabajado con estas células siguiendo un protocolo de medición de actividad espontánea e inotropismo en respuesta a ouabaina. En estos experimentos pudimos detectar que la ouabaina genera múltiples alteraciones en el manejo del Ca^{2+} y el patrón de acortamiento de estas células ⁴³, consistentemente con resultados publicados por otros previamente ⁴⁵. De este modo, la propuesta de utilizar dichas células en el presente proyecto cuenta con antecedentes que indican que en nuestro laboratorio somos capaces de obtener resultados experimentales en este modelo celular que reproduce los efectos farmacológicos clásicos de los digitálicos, restando evaluar el impacto sobre la viabilidad celular promovido por ouabaína, digoxina e istaroxime a diferentes concentraciones.

En cuanto a resultados preliminares directamente obtenidos en el marco de este proyecto, comenzamos con el estudio del efecto inotrópico alcanzado en cardiomiocitos de ratón con diferentes dosis de ouabaína e istaroxime cercanas a las concentraciones terapéuticas y determinamos que 2 μM de ouabaína y 10 μM de istaroxime son equi-inotrópicas. De este modo, utilizamos estas dosis para comparar el impacto que ambos compuestos tienen en la viabilidad de cardiomiocitos adultos en cultivo y medimos la actividad de CaMKII, lo cual se presenta en las figuras 2 y 3. En base a estos resultados podemos considerar que istaroxime tendría una menor capacidad para inducir muerte celular en cardiomiocitos adultos y para activar a CaMKII si se lo compara con dosis equi-inotrópicas de ouabaína.

Considerando el efecto que ambas drogas promueven sobre la liberación espontánea de Ca^{2+} desde el RS, resultados preliminares presentados en la figura 4 muestran que a diferencia de ouabaína, no hay un incremento en la frecuencia de chispas ni ondas de Ca^{2+} en cardiomiocitos incubados con istaroxime. A su vez, se evidencia un efecto en la recaptura de Ca^{2+} ya que hay una mayor proporción de miniondas (ondas abortadas durante su propagación a lo largo de la célula) en el grupo tratado con istaroxime.

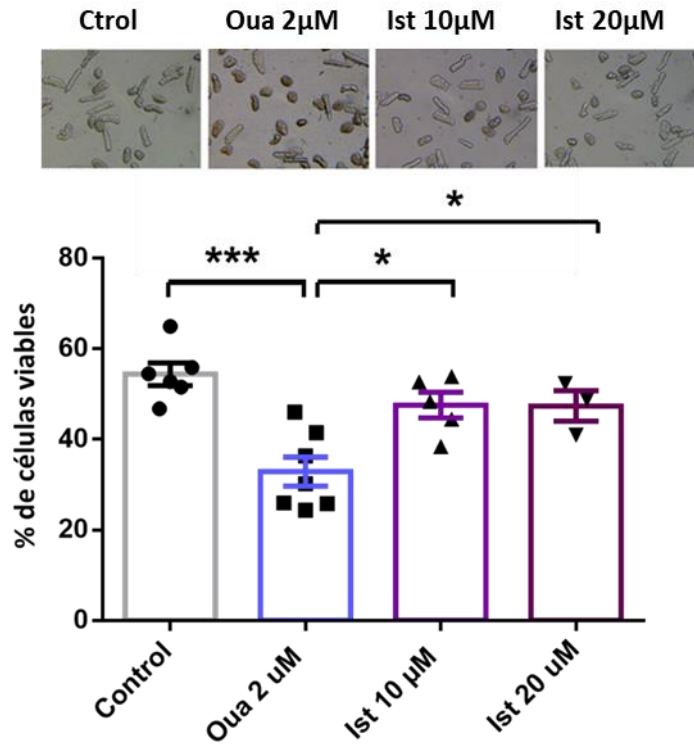


Figura 2: Impacto del tratamiento con istaroxime sobre la viabilidad celular. Los cardiomiocitos son considerados viables cuando luego de 24 horas de cultivo su largo supera 3 veces a su ancho. Los resultados promedio sugieren que el istaroxime podría tener menor impacto deletéreo que 2 μM de Ouabaína, tanto a una concentración equivalente (10 μM) como mayor (20 μM). Análisis estadístico por ANOVA seguido de test de Tukey * $p \leq 0,05$.

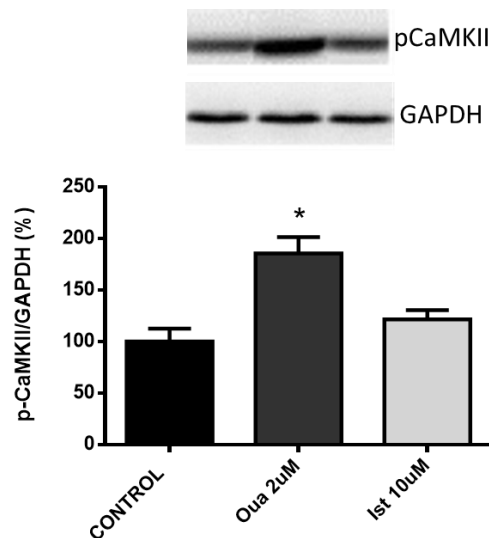


Figura 3: Experimentos preliminares sugieren que la activación de CaMKII inducida por ouabaína no se reproduce en cardiomiocitos incubados con istaroxime. Se cuantificó el nivel de CaMKII fosforilada en el sitio Thr286 que indica activación de esta quinasa, encontrando un aumento estadísticamente significativo (ANOVA. $P < 0,05$) solo en aquellas muestras de cardiomiocitos incubados durante una hora en presencia de ouabaína 2 μM (N=3 por grupo).

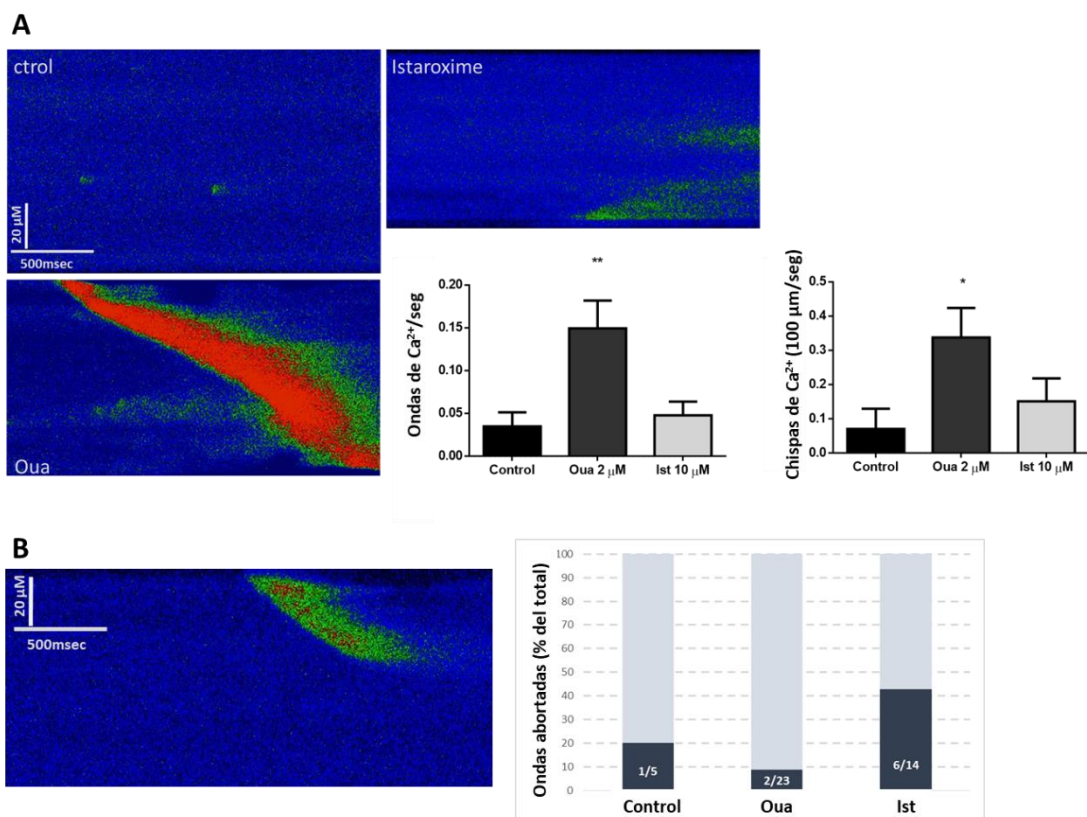


Figura 4: A. Incidencia de ondas y chispas de Ca²⁺, * = p<0,05 ** = p<0,01 ANOVA, n=13-19 células por grupo; B. Porcentaje de ondas abortadas (miniondas) por grupo.

Adicionalmente, nuestro grupo ha demostrado que en la fisiopatología de la disfunción cardíaca séptica ocupa un rol preponderante la activación de CaMKII, que aumenta la pérdida espontánea de Ca²⁺ del RS al fosforilar a los RyR2⁴⁶. Esto lleva a una reducción en el contenido de Ca²⁺ dentro del RS, de modo que en cada sístole ocurre una liberación de menor magnitud. De este modo, resulta válido preguntarse si un fármaco inotrópico que incremente la tasa de recaptura de Ca²⁺ hacia el RS (el istaroxime) será capaz de proveer soporte contráctil en un modelo de disfunción cardíaca séptica.

CONSTRUCCIÓN DE LA HIPÓTESIS y JUSTIFICACIÓN GENERAL DE LA METODOLOGÍA DE TRABAJO.

La hipótesis de trabajo consiste en que la novedosa combinación de mecanismos activados por el istaroxime, incluyendo no solo inhibición de la bomba de Na⁺/K⁺ sino también el aumento en la tasa de retoma de Ca²⁺ mediada por SERCA lo transforma en un agente farmacológico capaz de promover un patrón de efectos diferente a los digitálicos clásicos y diferente también a las intervenciones genéticas o farmacológicas que aumentan la actividad de SERCA en forma aislada, las cuales han sido planteadas como una potencial estrategia terapéutica contra la IC^{47;48}. En particular, hipotetizamos que el istaroxime tendrá menor efecto tóxico directo sobre los cardiomiocitos comparado contra otros inhibidores de la Na⁺/K⁺ ATPasa. Un dato clave por el que hipotetizamos esto se relaciona con el grado de pérdida espontánea de Ca²⁺ a través de los RyR2.

Interesantemente, Zaza y colaboradores han mostrado que istaroxime no afecta la relación pérdida espontánea/carga de Ca^{2+} dentro del RS ⁹. Esto sugiere que esta pérdida de Ca^{2+} es solo proporcional al contenido de Ca^{2+} dentro del RS y no hay una alteración funcional intrínseca en los RyR2, la cual nosotros hemos demostrado previamente y adjudicado a la fosforilación de los RyR2 por CaMKII durante la administración de digitálicos ⁴⁹. En conclusión, este antecedente sugiere que a diferencia de otros inhibidores de la Na^+/K^+ ATPasa, istaroxime podría no activar a CaMKII ni promover la fosforilación de los RyR2 en Ser2814 y esto explicaría no solo la menor tasa de apoptosis que esperamos encontrar en cardiomiocitos tratados con istaroxime sino también su menor efecto arritmogénico.

En cuanto a la utilización de células IPS, hay antecedentes que demuestran que se pueden estudiar como modelo de muerte celular inducida por disturbios en el manejo del Ca^{2+} ⁵⁰ y tanto nuestro grupo (fig. 5) como otros hemos reportado que ouabaina induce alteraciones en el manejo del calcio en estas células ⁴⁵. De este modo, primero caracterizaremos el efecto promovido por el tratamiento con ouabaina y con digoxina, para luego comparar con istaroxime.

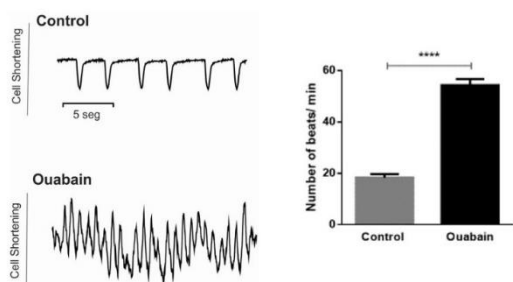


Figura 5: Se puede observar el efecto producido por la exposición de IPSc a 50 μM de ouabaína durante 15 minutos, el cual está asociado a un incremento del número de contracciones espontáneas y heterogeneidad en la amplitud de las mismas. (Gonano et al. Circulation Journal 2018).

TIPO DE DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y MÉTODOS.

De acuerdo a lo solicitado por FONCYT, el presente proyecto de investigación ha sido presentado ante las autoridades de la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de La Plata (UNLP), encontrándose actualmente bajo análisis (se adjunta Certificado emitido por dicha Comisión).

Dividiremos las actividades a desarrollar en 2 etapas, una primera que estará centrada en el estudio de:

1- Activación de CaMKII, toxicidad sobre cardiomiocitos y aspectos de interés mecanístico.

-Se buscará determinar si el tratamiento de los miocitos cardíacos con istaroxime, tanto en el modelo de tratamiento agudo a dosis tóxicas como de 24 horas a dosis terapéutica, es capaz de activar a CaMKII. Para ello se medirá el estado de fosforilación de esta quinasa en el residuo Thr 287, ya que la autofosforilación de sus monómeros, es un índice del estado de activación en los complejos hexaméricos que forma esta proteína.

A su vez se evaluará el estado de fosforilación de proteínas blanco de CaMKII expresadas en el RS, tanto los RyR2 en Ser2814 como PLB en Thr17, lo cual podría mejorar la comprensión actual acerca del impacto funcional que istaroxime tiene sobre el manejo de Ca^{2+} intracelular y sobre la sobrevivencia de cardiomiocitos.

- Determinar si el tratamiento crónico a dosis que se encuentren dentro del rango terapéutico de istaroxime, ouabaína y digoxina produce muerte de cardiomiocitos en magnitud similar o si istaroxime puede considerarse menos tóxico para las células cardíacas. La medición de índices apoptóticos y de porcentajes de viabilidad celular registrado luego de 24 horas de cultivo serán comparados contra un grupo control sin drogas y entre cada tratamiento a concentraciones equivalentes. Para determinar la equivalencia de dosis nos basamos en aquellas equi-inotrópicas, lo cual se refiere a que promueven un mismo grado de efecto inotrópico positivo, y esto último se apoyará no solo en resultados publicados por otros grupos sino también en resultados propios obtenidos mediante video-detección de bordes con registro simultáneo de Ca^{2+} citosólico.

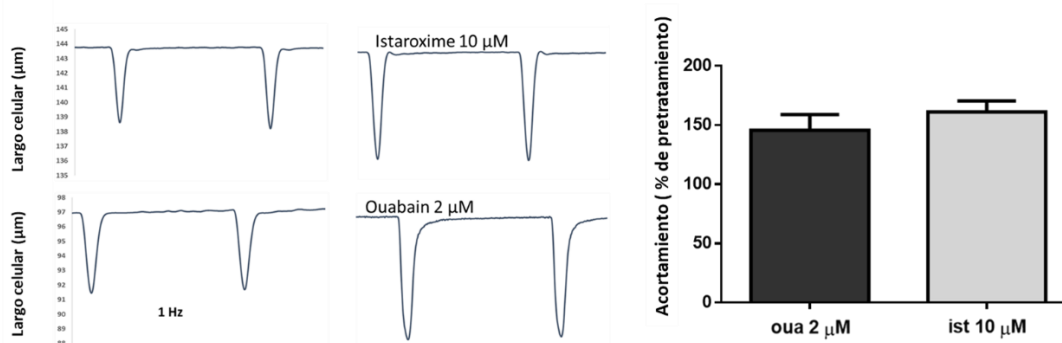


Figura 6: Respuesta inotrópica al tratamiento. 14 y 20 cardiomiocitos ventriculares de ratón fueron tratados con ouabaína e istaroxime respectivamente y se muestra el efecto inotrópico cuando la respuesta se estabiliza entre los 10 y 15 minutos.

Por otro lado, un enfoque que se intentará abordar es la comparación del grado de efecto proapoptótico en cardiomiocitos versus potencia antineoplásica, comparando contra dosis usadas en modelos de cáncer y evaluando si las mismas dosis pueden afectar la viabilidad de células cardíacas humanas (IPSC), lo que nos permitiría hacer una primer aproximación al grado de cardio-toxicidad potencial que el tratamiento antineoplásico con istaroxime pudiera tener en humanos.

- Para profundizar el conocimiento acerca del mecanismo por el cual istaroxime ejerce un efecto potenciador de la recaptura de Ca^{2+} hacia el RS y poder confirmar o desafiar el concepto actual que propone que istaroxime ejerce este efecto interfiriendo en la interacción SERCA-PLB pondremos a prueba la capacidad del istaroxime de acelerar la retoma de Ca^{2+} en ratones que no expresan la proteína PLB (PLB-KO, con los que contamos en el centro de investigaciones cardiovasculares donde trabajo), usando como control ratones C57 que constituyen la cepa original. Espero que si efectivamente el istaroxime ejerce su efecto lusitrópico mediante la disociación de SERCA-PLB, el

mismo no esté conservado en ratones PLB-KO, de lo contrario nos habilitaría a formular hipótesis alternativas que motiven trabajo futuro en esta línea de investigación.

Siguiendo con la búsqueda de respuestas que expliquen el mecanismo lusitrópico y el menor riesgo de arritmias reportado para istaroxime, nos proponemos evaluar las características de las ondas de Ca^{2+} que aparecen en cardiomiocitos tratados con istaroxime en comparación con las ondas de Ca^{2+} inducidas por ouabaina y digoxina. El proceso de liberación espontánea de Ca^{2+} que somos capaces de monitorear mediante técnicas de fluorescencia en tiempo real se manifiesta con dos fenómenos ampliamente estudiados: chispas de Ca^{2+} que constituyen liberaciones locales y transitorias desde un pequeño grupo de RyR2; y ondas de Ca^{2+} que representan la propagación del proceso de liberación por activación de los RyR2 que responden al aumento de Ca^{2+} liberado por RyR2 vecinos. Su principal correlato fisiopatológico son las arritmias por actividad gatillada, ya que las ondas de Ca^{2+} generan oscilaciones en el potencial de membrana al activar al NCX, que genera una corriente despolarizante o post-despolarización tardía, capaz de iniciar un potencial de acción desde un foco ectópico de descarga.

Esperamos encontrar diferencias a nivel de la cinética de propagación de dichas ondas y el pico de fluorescencia registrado durante las mismas. Particularmente, se espera que ambos parámetros sean menores en células tratadas con istaroxime con respecto a células tratadas con ouabaina o digoxina. El hecho de encontrar o no diferencias en la magnitud y velocidad de propagación de ondas de Ca^{2+} entre istaroxime y digitálicos clásicos podría confirmar si el menor riesgo de arritmias asociado a la utilización de istaroxime se da porque reduce la capacidad de las ondas de Ca^{2+} para generar DADs al ser de menor magnitud que las ondas ocurridas en células tratadas con ouabaina o digoxina. En los mismos experimentos se obtendrá otro indicador de interés como es la frecuencia y caracterización morfológica de las chispas de Ca^{2+} , lo que complementará la interpretación del mecanismo antiarritmogénico ligado al efecto que istaroxime tiene sobre la recaptura de Ca^{2+} y en paralelo nos aportará información que permita interpretar los datos de viabilidad celular y apoptosis desde un enfoque que tome en cuenta la transferencia de Ca^{2+} desde el RS a las mitocondrias. En cuanto a la relación entre chispas de Ca^{2+} y arritmias, esperamos que al comparar el efecto de istaroxime con el de digitálicos clásicos a concentraciones equivalentes, el primero provoque una menor frecuencia y/o duración de las chispas de Ca^{2+} , lo que terminaría por dificultar la generación de ondas de Ca^{2+} .

En suma, las hipótesis relacionadas a resultados que esperamos obtener estudiando la liberación espontánea de Ca^{2+} aplican a dos cuestiones de interés. La primera es que la retoma acelerada de Ca^{2+} provocada con istaroxime desfavorece la generación de arritmias porque reduce la probabilidad de formación de chispas de Ca^{2+} o su magnitud, haciendo de este modo menos probable la propagación del proceso de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} que genera ondas de Ca^{2+} , y finalmente si estas ocurren dificulta su propagación llevando a que alcancen un menor pico de Ca^{2+} citosólico capaz de inducir despolarización. La segunda hipótesis tiene que ver con que los mismos procesos explicarían una menor transferencia de Ca^{2+} desde el RS hacia las mitocondrias, lo que podría ser la base de una menor capacidad del istaroxime para inducir apoptosis en cardiomiocitos en comparación a ouabaina y digoxina. La evaluación de esta última hipótesis se complementará con el registro de Ca^{2+} intra-mitocondrial a modo de prueba de concepto.

Descripción de las técnicas asociadas:

Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos de ratón (C57 de entre 3 y 4 meses de edad): Los cardiomiocitos serán aislados por digestión enzimática con colagenasa de acuerdo a lo descrito previamente ^{16; 51; 25}. Inmediatamente luego de ser obtenida la suspensión de cardiomiocitos, estos se mantienen en buffer HEPES a temperatura ambiente (22-24 °C) hasta ser sembrados. Los cardiomiocitos serán sembrados a una densidad de aproximadamente 2×10^4 células/ml en placas individuales de 35x10 mm a 37 °C en medio M199 (M0393 Sigma). En estas técnicas contaremos con el apoyo de Mónica Rando quien se especializa en aislamiento de cardiomiocitos y María Carolina Ciancio quien tiene a su cargo tareas relacionadas al cultivo primario de cardiomiocitos y mantenimiento de líneas celulares.

Cultivo de Células humanas pluripotentes diferenciadas a cardiomiocitos (hIPSc-CMs): Realizaremos experimentos en hIPSc-CMs, en las que tanto en ausencia de tratamientos como en presencia de digoxina o istaroxime mediremos amplitud de acortamiento e índices apoptóticos. Elegimos utilizar estas células porque es cada vez más reconocido como su valor para el modelado de enfermedades cardiovasculares en seres humanos, especialmente síndromes que cursan con arritmias ⁵² y toxicidad inducida por fármacos ⁵³. Para ello, contamos con una colaboración con el Laboratorio de Investigación Aplicada a las Neurociencias (LIAN) en el Instituto Fleni dirigido por el Dr. Santiago Miriuka, en la que participará la becaria Agustina Scarafia. Su grupo de trabajo es especialista en cultivos de células pluripotentes y mesenquimales diferenciadas a distintos tipos celulares. A fin de cumplir con el objetivo 1b nos proveerán células IPS humanas diferenciadas a cardiomiocitos según el protocolo de diferenciación propuesto por Paul W. Burridge y colaboradores ⁵⁴.

Esperamos encontrar que estas células humanas respondan de modo similar a lo observado en miocitos de ratón es decir, con un aumento en la amplitud de acortamiento cuya magnitud nos permitirá establecer equivalencia de dosis entre las drogas utilizadas y a su vez registrar el porcentaje de células vivas luego de 24 horas en cultivo.

Si bien el proyecto propone la utilización de hIPSc-CMs, estas, así como líneas celulares disponibles comercialmente no reproducen todas las características del manejo de Ca^{2+} intracelular de los cardiomiocitos adultos. Esto sustenta el uso de animales, siendo ambos modelos complementarios.

Registros de fluorescencia por microscopía confocal:

- **Ca^{2+} citosólico:** Para obtener imágenes confocales de Ca^{2+} citosólico, las células serán cargadas con el indicador fluo-3-AM durante 10 min (concentración final 10 μ M) de acuerdo a la técnica previamente utilizada por el investigador responsable y puesta a punto en el microscopio confocal ZEIS 410 del Centro de Investigaciones Cardiovasculares ^{42; 25; 51}. Los miocitos serán visualizados en el microscopio confocal, montado sobre un microscopio invertido. El fluo-3 será excitado a 488 nm utilizando un láser de argón y la fluorescencia será recolectada por un fotomultiplicador, a 515-565 nm. Las imágenes de los transitorios de Ca^{2+} y de los eventos de liberación espontánea de Ca^{2+} por los RyR2 denominadas chispas de Ca^{2+} y ondas de Ca^{2+} , serán obtenidas escaneando una línea orientada sobre el eje mayor del miocito. Las imágenes serán procesadas usando el software Image J.

- **Ca²⁺ mitocondrial:** Para las mediciones de Ca²⁺ mitocondrial, usaremos el indicador fluorescente Rhod-2/AM que se compartimentaliza en las mitocondrias ⁵⁵. Las mitocondrias serán identificadas marcando las células durante 60 minutos con el marcador de mitocondrias, Mito Tracker Green (MTG) a una concentración final de 200 nM. El MTG será excitado con el láser de argón a 488 nm y la fluorescencia emitida recolectada a 525-550 nm. Una vez identificadas las mitocondrias serán escaneadas nuevamente y la fluorescencia roja emitida a 565 nM será considerada como una medida del Ca²⁺ mitocondrial.

Medidas de contractilidad y Ca²⁺_i en miocitos aislados: El Ca²⁺_i será determinado por epifluorescencia, técnica que se realiza diariamente en nuestro laboratorio ^{16;12;49}. Con el propósito de monitorear en tiempo real las características del ciclado de Ca²⁺ citosólico, se realizarán experimentos funcionales en cardiomiocitos aislados. Las células serán incubadas durante 12 minutos a temperatura ambiente con el indicador sensible a Ca²⁺ Fura-2, en una concentración de 10 μM. Este fluoróforo se utiliza en su forma éster de acetoximetilo (AM), comportándose como una molécula hidrofóbica capaz de atravesar con facilidad la membrana plasmática. Una vez dentro del citosol, las esterases intracelulares hidrolizan la unión éster liberando la porción AM y la forma ácida activa del fluoróforo, que queda retenida en el interior celular. Por esta razón, las células no serán utilizadas hasta luego de transcurridos 30 minutos posteriores a la incubación con el indicador, permitiendo la desesterificación intracelular del mismo y trabajar con células que contengan una concentración intracelular estable de Fura-2. Las células ya cargadas serán colocadas sobre la platina de un microscopio invertido Nikon Diaphot 200 adaptado para la técnica de epifluorescencia. Las mismas serán perfundidas a un flujo constante de 1 ml/minuto y estimuladas eléctricamente a 0.5 Hz. Para obtener una señal fluorescente sensible a Ca²⁺ citosólico, la muestra será iluminada mediante una lámpara de Xenón, filtrando el haz de luz para excitar a dos longitudes de onda (340 nm y 380 nm) en forma alternada. La fluorescencia emitida por las células se registrará a >510 nm y amplificará por un fotomultiplicador. La excitación alternada con dos longitudes de onda permite calcular un cociente entre la señal emitida por el indicador cuando es excitado con luz de 340 nm de longitud de onda (en estas condiciones la emisión varía según se encuentre o no interactuando con moléculas de Ca²⁺) y la señal emitida cuando es excitado con luz de 380 nm de longitud de onda (en esta condición la intensidad de señal emitida es independiente de la interacción entre moléculas de fluoróforo y Ca²⁺). La obtención de este cociente permite normalizar la señal fluorescente adquirida por la cantidad de moléculas de fluoróforo que se encuentran en condiciones de emitir señal fluorescente a lo largo del experimento, evitando artefactos derivados del foto-apagado del fluoróforo, de su salida de la célula así como también de un cambio de foco de la muestra.

Con el propósito de medir el acortamiento celular, se generará contraste óptico entre los bordes celulares y el fondo de la cámara de perfusión. La célula a estudiar será iluminada con luz roja (640-750 nm) a través de un sistema óptico para luz visible. De esta forma se logra la videodetección de bordes celulares permitiendo registrar la longitud y monitorear el acortamiento de los cardiomiocitos. Los datos adquiridos serán almacenados en un software adecuado (ION Optix análisis) para su posterior análisis. La becaria Doctoral Florencia Racioppi, que forma parte del grupo colaborador y en los últimos meses ha sido entrenada en esta técnica, realizará los experimentos que requieren

la medición de acortamiento y Ca^{2+} intracelular en cardiomiocitos con la asistencia permanente del investigador responsable del proyecto.

Preparación de muestras para Western blot: corazones tratados con ouabaina, digoxina o istaroxime a diferentes concentraciones serán lavados y congelados en nitrógeno líquido obteniéndose luego homogenatos como se ha descrito previamente⁵⁶. Se determinará la concentración de proteínas por medio del método de Bradford usando albúmina bovina como estándar. Las muestras se analizarán por Western blot. Estos experimentos en los que se medirá expresión y estado de fosforilación de proteínas y quinasas vinculadas con el manejo de Ca^{2+} intracelular serán ejecutados por el responsable del proyecto en conjunto con la becaria Florencia Racioppi que integra el grupo colaborador.

Medida del grado de apoptosis: Se realizará inmunodetección de la proteína pro-apoptótica Bax, y de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 con anticuerpos específicos. El grado de apoptosis se evaluará en cultivos celulares de miocitos aislados tanto de grupo control sin drogas como con istaroxime, ouabaina y digoxina, utilizando la tinción de TUNEL y usando un indicador fluorescente de caspasa-3 activada (Phyphilux). Tanto el ensayo de TUNEL como la detección de señales involucradas en la cascada de la apoptosis, son técnicas actualmente utilizadas en nuestro laboratorio^{25; 57; 12}. La becaria doctoral Florencia Racioppi realizará estos experimentos guiada por el investigador responsable Luis Gonano, quien ya tiene experiencia comprobable en la medición de índices apoptóticos²⁵.

La segunda etapa del proyecto estará centrada en la:

2- Evaluación de la eficacia inotrópica del istaroxime en modelo de disfunción contráctil séptica.

-Se realizará el tratamiento inotrópico en miocitos cardíacos obtenidos de ratones control y sépticos con istaroxime, seguido por evaluación de acortamiento, Ca^{2+} y estimación de la carga de Ca^{2+} dentro del RS estimada mediante la aplicación de un pulso de cafeína, consistente en el agregado de cafeína 15 mM, capaz de inducir la apertura masiva de los RyR2 permitiendo liberar todo el Ca^{2+} contenido dentro del RS al ser aplicada a la solución de perfusión basada en buffer HEPES. La realización de estos experimentos nos permitirá obtener datos que constituyan la primera evidencia acerca de la eficacia del istaroxime para mejorar la función contráctil y la velocidad de relajación de cardiomiocitos afectados por el cuadro séptico. En paralelo, buscaremos encontrar las condiciones necesarias en cuanto a dosis, ventana terapéutica y modo de administración en los animales sépticos. Si bien no se plantea completar un estudio *in vivo* durante el presente proyecto tenemos en nuestro instituto la posibilidad de realizar ecocardiograma en ratones y caracterizar la evolución de la disfunción cardíaca en nuestro modelo, de modo que vemos factible el tratamiento *in vivo* de ratones sépticos con istaroxime y evaluación ecocardiográfica de su función contráctil además de su sobrevida, como continuidad natural del presente proyecto.

Técnica asociada: Modelo experimental murino de sepsis. Para inducir la sepsis en ratones C57 se llevará a cabo la cirugía inductora de peritonitis por implantación de cánula en el colon ascendente (CASP) puesta a punto en nuestro laboratorio⁴⁶. Esta técnica consiste en la perforación del colon ascendente con una cánula por la cual fluyen

heces hacia el peritoneo induciendo peritonitis. La cirugía simulada (Sham) se llevará a cabo usando el mismo procedimiento quirúrgico, pero sin implantación de la cánula.

Análisis estadístico: Los datos serán expresados como la Media \pm Error Standard de la Media. Para comparaciones estadísticas se utilizará el Test de Student para datos apareados o desapareados o ANOVA, según corresponda. Las diferencias serán consideradas significativas a $p < 0.05$.

Tomados en conjunto, los experimentos propuestos nos permitirán definir la eficacia inotrópica del istaroxime en un modelo de insuficiencia cardíaca séptica, determinar el potencial proapoptótico sobre cardiomiocitos y profundizar el conocimiento sobre sus efectos a nivel del manejo de Ca^{2+} en estas células. Los resultados obtenidos nos permitirán además definir las ventajas y desventajas del uso de esta nueva clase de inotrópicos en el tratamiento de la IC y como antineoplásico.

CRONOGRAMA DE TRABAJO

Cronograma de actividades propuestas	
Primer año	Segundo año
Primer semestre: realización de experimentos en cardiomiocitos de ratón pertenecientes a objetivos 1, 2 y 3.	Primer semestre: realización de experimentos relacionados al objetivo 4.
Segundo semestre: realización de experimentos en IPSc pertenecientes a objetivos 1 y 2.	Segundo semestre: finalización de experimentos relacionados al objetivo 4 y escritura general de resultados.
Desde el primer año se analizarán y discutirán resultados parciales.	

Referencias bibliograficas

1. Nadruz, W., Jr., *et al.* Temporal trends in the contribution of Chagas cardiomyopathy to mortality among patients with heart failure. in *Heart* (2018).
2. Shen, L., *et al.* Contemporary Characteristics and Outcomes in Chagasic Heart Failure Compared With Other Nonischemic and Ischemic Cardiomyopathy. *Circ Heart Fail* **10**(2017).
3. Pereira-Barretto, A.C., Bacal, F. & de Albuquerque, D.C. Most Heart Failure Patients Die from Pump Failure: Implications for Therapy. *Am J Cardiovasc Drugs* **15**, 387-393 (2015).
4. Klein, L., *et al.* Admission or changes in renal function during hospitalization for worsening heart failure predict postdischarge survival: results from the Outcomes of a Prospective Trial of Intravenous Milrinone for Exacerbations of Chronic Heart Failure (OPTIME-CHF). *Circ Heart Fail* **1**, 25-33 (2008).
5. Kivikko, M., *et al.* Effect of baseline characteristics on mortality in the SURVIVE trial on the effect of levosimendan vs dobutamine in acute heart failure: Sub-analysis of the Finnish patients. *Int J Cardiol* **215**, 26-31 (2016).
6. Schumann, J., *et al.* Inotropic agents and vasodilator strategies for the treatment of cardiogenic shock or low cardiac output syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* **1**, CD009669 (2018).
7. Teerlink, J.R., *et al.* Agents with inotropic properties for the management of acute heart failure syndromes. Traditional agents and beyond. *Heart Fail Rev* **14**, 243-253 (2009).
8. Shah, S.J., *et al.* Effects of istaroxime on diastolic stiffness in acute heart failure syndromes: results from the Hemodynamic, Echocardiographic, and Neurohormonal Effects of Istaroxime, a Novel Intravenous Inotropic and Lusitropic Agent: a Randomized Controlled Trial in Patients Hospitalized with Heart Failure (HORIZON-HF) trial. *Am Heart J* **157**, 1035-1041 (2009).
9. Alemanni, M., Rocchetti, M., Re, D. & Zaza, A. Role and mechanism of subcellular Ca²⁺ distribution in the action of two inotropic agents with different toxicity. *J Mol Cell Cardiol* **50**, 910-918 (2011).
10. Micheletti, R., *et al.* Pharmacological profile of the novel inotropic agent (E,Z)-3-((2-aminoethoxy)imino)androstane-6,17-dione hydrochloride (PST2744). *J Pharmacol Exp Ther* **303**, 592-600 (2002).
11. Ramirez-Ortega, M., *et al.* Is digitalis compound-induced cardiotoxicity, mediated through guinea-pig cardiomyocytes apoptosis? *Eur J Pharmacol* **566**, 34-42 (2007).
12. Sapia, L., Palomeque, J., Mattiazzi, A. & Petroff, M.V. Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by ouabain induces CaMKII-dependent apoptosis in adult rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **49**, 459-468 (2010).
13. Gill, C., Mestril, R. & Samali, A. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease--a novel therapeutic target? *FASEB J* **16**, 135-146 (2002).
14. Orrenius, S., Zhivotovsky, B. & Nicotera, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 552-565 (2003).
15. Zhu, W.Z., *et al.* Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II. *J Clin Invest* **111**, 617-625 (2003).
16. Vila-Petroff, M., *et al.* CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **73**, 689-698 (2007).
17. Szabadkai, G. & Rizzuto, R. Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Lett* **567**, 111-115 (2004).

18. Chen, X., *et al.* Ca²⁺ influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes. *Circ Res* **97**, 1009-1017 (2005).
19. Crow, M.T., Mani, K., Nam, Y.J. & Kitsis, R.N. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* **95**, 957-970 (2004).
20. Bers, D.M. & Guo, T. Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci* **1047**, 86-98 (2005).
21. Bers, D.M. *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*, (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht ; Boston, 2001).
22. Ferrier, G.R. Digitalis arrhythmias: role of oscillatory afterpotentials. *Prog Cardiovasc Dis* **19**, 459-474 (1977).
23. Eisner, D.A., Kashimura, T., Venetucci, L.A. & Trafford, A.W. From the ryanodine receptor to cardiac arrhythmias. *Circ J* **73**, 1561-1567 (2009).
24. Xie, L.H. & Weiss, J.N. Arrhythmogenic consequences of intracellular calcium waves. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**, H997-H1002 (2009).
25. Sepulveda, M., Gonano, L.A., Back, T.G., Chen, S.R. & Vila Petroff, M. Role of CaMKII and ROS in rapid pacing-induced apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* **63**, 135-145 (2013).
26. Koval, O.M., *et al.* CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4996-5000 (2010).
27. Di Carlo, M.N., *et al.* CaMKII-dependent phosphorylation of cardiac ryanodine receptors regulates cell death in cardiac ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* **74**, 274-283 (2014).
28. Ruiz-Meana, M., Fernandez-Sanz, C. & Garcia-Dorado, D. The SR-mitochondria interaction: a new player in cardiac pathophysiology. *Cardiovasc Res* **88**, 30-39 (2010).
29. De Koninck, P. & Schulman, H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science* **279**, 227-230 (1998).
30. Erickson, J.R. Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. *Front Pharmacol* **5**, 59 (2014).
31. Maier, L.S. & Bers, D.M. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res* **73**, 631-640 (2007).
32. Wu, X., *et al.* Local InsP3-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest* **116**, 675-682 (2006).
33. Hoch, B., Meyer, R., Hetzer, R., Krause, E.G. & Karczewski, P. Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* **84**, 713-721 (1999).
34. Ferrandi, M., *et al.* Istaroxime stimulates SERCA2a and accelerates calcium cycling in heart failure by relieving phospholamban inhibition. *Br J Pharmacol* **169**, 1849-1861 (2013).
35. Gheorghiade, M., *et al.* Hemodynamic, echocardiographic, and neurohormonal effects of istaroxime, a novel intravenous inotropic and lusitropic agent: a randomized controlled trial in patients hospitalized with heart failure. *J Am Coll Cardiol* **51**, 2276-2285 (2008).
36. Ghali, J.K., *et al.* A phase 1-2 dose-escalating study evaluating the safety and tolerability of istaroxime and specific effects on electrocardiographic and hemodynamic parameters in patients with chronic heart failure with reduced systolic function. *Am J Cardiol* **99**, 47A-56A (2007).
37. Lo Giudice, P., Mattera, G.G., Gagnol, J.P. & Borsini, F. Chronic istaroxime improves cardiac function and heart rate variability in cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc Drugs Ther* **25**, 133-138 (2011).
38. Alevizopoulos, K., *et al.* Functional characterization and anti-cancer action of the clinical phase II cardiac Na⁺/K⁺ ATPase inhibitor istaroxime: in vitro and in vivo properties and cross talk with the membrane androgen receptor. *Oncotarget* **7**, 24415-24428 (2016).

39. Packer, M., *et al.* Effect of Ularitide on Cardiovascular Mortality in Acute Heart Failure. *N Engl J Med* **376**, 1956-1964 (2017).
40. McCullough, P.A. How Trialists and Pharmaceutical Sponsors Have Failed Us by Thinking That Acute Heart Failure Is a 48-Hour Illness. *Am J Cardiol* **120**, 505-508 (2017).
41. Stagno, M.J., *et al.* Istaroxime Inhibits Motility and Down-Regulates Orai1 Expression, SOCE and FAK Phosphorylation in Prostate Cancer Cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **42**, 1366-1376 (2017).
42. Gonano, L.A., *et al.* Calcium-calmodulin kinase II mediates digitalis-induced arrhythmias. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **4**, 947-957 (2011).
43. Gonano, L.A., *et al.* Non-beta-Blocking Carvedilol Analog, VK-II-86, Prevents Ouabain-Induced Cardiotoxicity. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **83**, 41-51 (2018).
44. Lopez-Crisosto, C., *et al.* Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology. *Nat Rev Cardiol* **14**, 342-360 (2017).
45. Guo, L., *et al.* Estimating the risk of drug-induced proarrhythmia using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Toxicol Sci* **123**, 281-289 (2011).
46. Sepulveda, M., *et al.* Calcium/Calmodulin Protein Kinase II-Dependent Ryanodine Receptor Phosphorylation Mediates Cardiac Contractile Dysfunction Associated With Sepsis. *Critical care medicine* **45**, e399-e408 (2017).
47. Kaneko, M., *et al.* A pyridone derivative activates SERCA2a by attenuating the inhibitory effect of phospholamban. *Eur J Pharmacol* **814**, 1-8 (2017).
48. Kawase, Y. & Hajjar, R.J. The cardiac sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase: a potent target for cardiovascular diseases. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **5**, 554-565 (2008).
49. Gonano, L.A. & Petroff, M.V. Subcellular mechanisms underlying digitalis-induced arrhythmias: role of calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) in the transition from an inotropic to an arrhythmogenic effect. *Heart Lung Circ* **23**, 1118-1124 (2014).
50. Geng, L., *et al.* Rapid Electrical Stimulation Increased Cardiac Apoptosis Through Disturbance of Calcium Homeostasis and Mitochondrial Dysfunction in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **47**, 1167-1180 (2018).
51. Gonano, L.A., *et al.* Hypotonic swelling promotes nitric oxide release in cardiac ventricular myocytes: impact on swelling-induced negative inotropic effect. *Cardiovasc Res* **104**, 456-466 (2014).
52. Ikeda, K., *et al.* The respiratory control mechanisms in the brainstem and spinal cord: integrative views of the neuroanatomy and neurophysiology. *J Physiol Sci* **67**, 45-62 (2017).
53. Yang, B. & Papoian, T. Preclinical approaches to assess potential kinase inhibitor-induced cardiac toxicity: Past, present and future. *J Appl Toxicol* **38**, 790-800 (2018).
54. Burridge, P.W., *et al.* Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods* **11**, 855-860 (2014).
55. Collins, T.J., Lipp, P., Berridge, M.J. & Bootman, M.D. Mitochondrial Ca(2+) uptake depends on the spatial and temporal profile of cytosolic Ca(2+) signals. *J Biol Chem* **276**, 26411-26420 (2001).
56. Venetucci, L.A., Trafford, A.W., Diaz, M.E., O'Neill, S.C. & Eisner, D.A. Reducing ryanodine receptor open probability as a means to abolish spontaneous Ca²⁺ release and increase Ca²⁺ transient amplitude in adult ventricular myocytes. *Circ Res* **98**, 1299-1305 (2006).
57. Palomeque, J., *et al.* Angiotensin II-induced oxidative stress resets the Ca²⁺ dependence of Ca²⁺-calmodulin protein kinase II and promotes a death pathway conserved across different species. *Circ Res* **105**, 1204-1212 (2009).

