

Cardiomiopatías químicas: Repercusión funcional de la cloroquina en corazón aislado

Carlos Costa¹, Hugo Torres¹, Hector Hartmann¹, Javier Dutra¹, y Gonzalo Ferreira^{1*}

Resumen

La cloroquina, es un fármaco utilizado en tratamiento y profilaxis de enfermedades producidas por plasmodios como malaria. También es usada en el tratamiento de algunas neoplasias, artritis reumatoide y lupus eritematoso crónico. La intoxicación por cloroquina puede resultar en cuadros clínicos de extrema gravedad, pudiendo ocasionar la muerte de los pacientes. Entre los órganos de impacto de toxicidad de la cloroquina se encuentra el corazón. Las características fisiopatológicas de las fallas cardíacas que origina la exposición aguda a cloroquina están pobremente caracterizadas.

Este trabajo estudia los efectos de exposición aguda a cloroquina en corazón, identificando algunas funciones y moléculas afectadas en dicho órgano. Nuestros hallazgos indican que cloroquina produce inotropismo negativo (dosis de efecto medio, IC₅₀ ~ 5 µM), siendo totalmente reversible a bajas dosis. Las cinéticas de promoción y de lavado del efecto, son sumamente rápidas (segundos). Cloroquina es también cronotrópica negativa y arritmogénica, con IC₅₀ levemente mayor. Dosis superiores a 100 µM eliminan contracciones con persistencia de actividad eléctrica. Canales de Ca²⁺ tipo L se bloquean a partir de estas concentraciones.

Los resultados sugieren que la exposición extracelular aguda a cloroquina en el rango µM, en corazones aislados, afectan la función cardíaca contráctil y eléctrica, con diferente sensibilidad para ambas. El bloqueo a canales de Ca²⁺ tipo L, sugiere que éstos pueden estar involucrados en el desacople excito-contráctil que produce la droga, mediante inhibición de la liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺, pudiendo relacionarse con su capacidad de producir cardiomiopatías químicas.

Palabras Claves: Cloroquina, antimaláricos, corazón aislado, cardiomiopatías químicas, canales de Ca²⁺ tipo L, calcio intracelular cardíaco.

Title: Chemical cardiomyopathies: Functional consequences of the application of chloroquine to guinea-pig isolated hearts.

Abstract

Chloroquine, is a drug used in the treatment and prophylaxis of plasmodium related diseases, such as malaria. It is also used in the treatment of rheumatoid arthritis, chronic lupus erythematosus or neoplasms. It has a toxic collateral effect and deaths have been reported in patients who have used it. One of the targets of CQ toxicity is the heart. The pathophysiological features of heart failure caused by acute exposure to chloroquine are poorly characterized.

This paper characterizes the effects of acute exposure to chloroquine at the cardiac level, trying to understand how this drug may impair heart function. Our findings indicate that chloroquine has a negative inotropic effect (mean effect dose, IC₅₀ ~ 5 µM), being reversible at low concentrations. The kinetics of promotion and wash-out are extremely fast (seconds). Chloroquine has also an arrhythmogenic and a

¹ Laboratorio de Canales Iónicos. Departamento de Biofísica. Facultad de Medicina. Gral Flores 2125. CP 11800, Montevideo. Uruguay

* Contacto: Ferreira, Gonzalo. Laboratorio de Canales Iónicos. Departamento de Biofísica. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Gral Flores 2125. CP 11800, Montevideo. Uruguay. Tel.: 29243414 ext 3203; E- mail: ferreira@fmed.edu.uy

negative chronotropic effect, with a slightly higher IC50. Doses exceeding 100 μM , almost fully impair contractile activity, though electrical activity can still be observed. These doses also block L-type Ca^{2+} currents, partially explaining the negative inotropic effect of the drug inhibiting calcium induced calcium release.

The results indicate that acute exposure to chloroquine in the μM range, impair heart function at the contractile and electrical levels, with a different sensitivity for both, suggesting multiple mechanisms of action of this drug, presumably related to its ability to cause chemical cardiomyopathy, from among which, L-type Ca^{2+} channels might be implicated.

Key words: Chloroquine, antimalarial drug; isolated heart; chemical cardiomyopathies, L-type Ca^{2+} channels, intracellular Ca^{2+} cardiomyocytes.

Introducción

La cloroquina (CQ), es un fármaco utilizado en el tratamiento y profilaxis de la enfermedad conocida como malaria, aunque es utilizada ocasionalmente en el tratamiento de la artritis reumatoide y el lupus eritematoso crónico, ambas enfermedades autoinmunes [2]. Es un fármaco del grupo de las 4-aminoquinolonas que posee acción sobre la mayor parte de los plasmodios. Es un fármaco que comprende varios anillos aromáticos unidos a una cadena de hidrocarburos, siendo permeable a las membranas. Esta característica hace que pueda interactuar con proteínas de la membrana plasmática (canales, transportadores, receptores), así como también proteínas intracelulares. La estructura de la CQ se muestra en la figura 1.

Esta droga actúa principalmente sobre los plasmodios que ocasionan malaria, localizados en los eritrocitos. La CQ se acumula en vacuolas digestivas de los eritrocitos, elevando su pH, lo que afecta la supervivencia del plasmodio. Aún no está del todo claro como es que el fármaco destruye a los plasmodios, pero existen hipótesis acerca de que lo hacen mediante la inhibición de la degradación de la hemoglobina [3-5].

La forma en que se administra el fármaco es como fosfato de CQ. Esta droga, cuando es administrada por vía oral, alcanza su mayor concentración plasmática luego de 1 a 2 horas, con un porcentaje de unión a proteínas plasmáticas de un 50-65%. Tiene una vida media inicial de una semana para tratamientos agudos (menor a 4 semanas), de 17 días después de 4 semanas de tratamiento y de meses a medida que la terapéutica se prolonga. Su distribución se da en todos los tejidos y órganos. El 70% del fármaco puede ser excretado como CQ sin alterar [3-5].

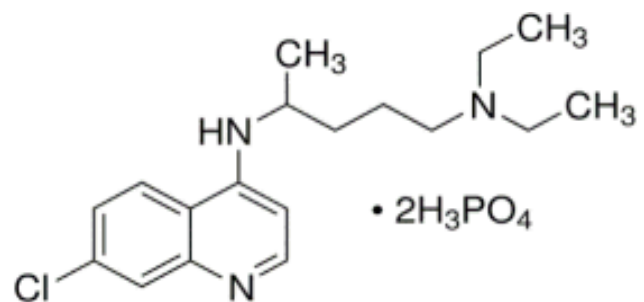


Figura 1. Estructura química de la cloroquina. La CQ es derivada de las aminoquinolonas, quienes a su vez derivan de las quinolinas y anilinas colorantes. Dada su estructura de anillos aromáticos, son fármacos liposolubles capaces de permear las membranas celulares. Su solubilidad en medios acuosos depende de las características químicas de compuestos asociados y temperatura de las soluciones.

La CQ es un fármaco de alta toxicidad. Se han registrado muertes en pacientes que la utilizan como antimalárico, pero también en pacientes tratados por artritis reumatoide y lupus [6]. Una intoxicación aguda o crónica agudizada, puede resultar de extrema gravedad con fallo multiorgánico con necesidad de internar al paciente en Centro de Cuidado Intensivo. La falla cardíaca que origina la CQ es detectada recién en estadios tardíos, pudiendo asemejarse a la enfermedad de Fabry [7].

El miocardio presenta dos variedades celulares conocidas como miocardio específico (de conducción) e inespecífico (contráctil). El primero es responsable directo de la actividad rítmica que lo caracteriza en condiciones normales. Su alteración deriva en arritmias y en su mayoría resultan de la afectación de los canales iónicos responsables de la génesis de la actividad eléctrica. Estos canales,

presentes en la membrana de los cardiomiocitos son selectivos para distintos tipos de iones. Asimismo un ion dado puede tener varios tipos diferentes de canales, tal es el caso de los canales de Ca^{2+} tipo L y T. Estas corrientes iónicas no solo permiten la contracción ordenada de los miocitos sino que además intervienen en la despolarización espontánea que caracteriza la actividad de marcapaso eléctrico. La afectación del miocardio contráctil origina fallas en la contractilidad cardíaca (inotropismo).

Distintas investigaciones sugieren que el alargamiento del potencial de acción que se encuentra en numerosas cardiomiopatías químicas, es debido a alteraciones de canales iónicos presentes en cardiomiocitos.

Este trabajo tiene como objetivo caracterizar los efectos de la exposición aguda a CQ a nivel cardíaco, procurando comprender las funciones y moléculas de impacto afectadas en dicho órgano. Nuestros hallazgos indican que la CQ tiene un marcado efecto inotrópico negativo con un IC 50 de 4 a 5 μM , siendo este efecto reversible en su casi totalidad. Tanto la cinética de promoción, como el lavado del efecto son sumamente rápidas, estando limitada mayoritariamente por la perfusión. La actividad eléctrica se modifica en concordancia con la respuesta contráctil, aunque no disminuye ni desaparece. La CQ también tiene efecto cronotrópico negativo y efecto arritmogénico, aunque con un IC50 mayor. Dosis superiores a 100 μM originan ausencia de contracción con actividad eléctrica. Los resultados sugieren que la exposición extracelular aguda a CQ en el rango μM , en corazones aislados, afectan la función cardíaca contráctil y eléctrica, con diferente sensibilidad para ambas, sugiriendo múltiples mecanismos de acción de esta droga que se relacionan con su capacidad de producir cardiomiopatías químicas.

Normas éticas

El protocolo de experimentación fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA), (Exp. N° 071140-001464-12). Para el sacrificio de los animales se siguieron normas establecidas por CHEA (Comisión Honoraria de Experimentación Animal), para el manejo de animales de experimentación.

Materiales y métodos

1. Soluciones empleadas en aislamiento cardíaco y cardiomiocitos

1.a - Tyrode.

La composición de la solución Tyrode 1.8 mM Ca^{2+} extracelular ("Tyr 1.8 Ca^{2+} "), usada en los experimentos de corazón aislado o en el inicio de aislamiento de células se indica en la tabla 1.

En dicha tabla se indica también la composición de las soluciones de Tyrode sin Ca^{2+} extracelular ("Tyr 0 Ca^{2+} ") y Tyrode 0.2 mM Ca^{2+} extracelular, ("Tyr 0.2 Ca^{2+} ") empleadas en el aislamiento de células. Para la digestión enzimática del corazón se utilizaron Colagenasa (tipo Ia) y Proteasas (tipo XIV y XXIV) (Sigma C-9891, P5147 y P-8038), de acuerdo a Ferreira, 1992 [1].

Solución	NaCl	KCl	MgCl ₂	HEPES	NaH ₂ PO ₄
"Tyr 1.8, 0 ó 0.2 Ca^{2+} "	135	5.4	1	10	0.33

Tabla 1. Composición de Soluciones Tyrode (en mM). 1.8, 0 y 0.2 se refieren a las concentraciones de CaCl_2 extracelular agregado a cada una de dichas soluciones en mM. A todas las soluciones se le agregó Glucosa 10 mM, ajustándose el pH a 7.4 y la Osmolaridad a 310 mOsm.

1.b - Cloroquina

La Cloroquina (N4-(7-Cloro-4-quinolinil)-N1, sal difosfato, 4-pentanodiamina-dimetil-N1), $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{ClN}_3\text{H}_3\text{SO}_4$, peso molecular de 515.86 g/mol, fue adquirida de Sigma Aldrich (codigo C6628) como sal de difosfato de cloroquina, (sólido, $\geq 98\%$). Inicialmente se preparó un stock de CQ 250 mM, diluyendo 1.9 grs de CQ en 15 ml de H_2O .

2. Preparación de Langendorff

Los procedimientos descritos se realizaron en cobayos de aproximadamente 300 g de peso, los cuales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se evitó anestesiarse el animal para impedir una depresión cardiorrespiratoria artificial por estos procedimientos. A los animales sacrificados de acuerdo a las normas éticas descritas anteriormente y aceptadas por CHEA a nivel nacional e internacional,

se les extrajo rápidamente el corazón, colocándose el mismo en un dispositivo de Langendorff, luego de identificada la aorta. La preparación de Langendorff es una técnica experimental de corazón aislado con retroperfusión por las arterias coronarias. Durante todo el procedimiento el corazón se mantuvo en condiciones fisiológicas a 37 °C, con burbujeo constante de O₂ a una presión constante entre 50-100 kPa. La solución empleada para la perfusión cardíaca fue “Tyr 1.8 Ca²⁺” (ver tabla 1), en condiciones standard (pH aprox 7.4, Osmolaridad 310 mOsm). La presión de perfusión de dicha solución se controló por la altura de los reservorios de soluciones, siendo esta presión de aproximadamente 50 a 80 mmHg. Al corazón aislado se le hizo una pequeña incisión en la pared del ventrículo izquierdo para acceder a los músculos

papilares. Dicha incisión no daña coronarias o sus ramas, implantando además por la misma, electrodos de Ag⁺/Ag⁺ clorada (Ag⁺/AgCl) a nivel del músculo papilar para poder registrar potenciales eléctricos monofásicos. Simultáneamente se colocó un dispositivo de sujeción en la base del músculo papilar, conectado a un transducción de tensión permitiendo el registro simultáneo de tensión y respuesta eléctrica cardíaca (ver figura 2).

3. Métodos de registro

Para el registro de tensión, el dispositivo rígido implantado en la base del músculo papilar se conectó mediante un hilo inextensible, tirante, con un transductor de tensión/presión (Grass FT-03). Esta señal se amplificó (x100) y filtró (1-10 KHz), mediante un amplificador (Itel 601), para ser adquirida mediante un conversor analógico digital de 16 bits (MiniDigi-1 A, Axon Instruments) controlada por software de adquisición Axoscope 9.2 (Axon Instruments).

Para los registros eléctricos, simultáneos al registro de tensión, se colocaron sobre la superficie del corazón (o dentro de cavidad para permitir acceso al músculo papilar), electrodos no polarizables de Ag⁺/AgCl. La tierra de estos electrodos se colocó próxima al ápex cardíaco. Estas señales se amplificaron (x100) y filtraron (1-10 KHz), mediante un amplificador (Itel 601), siendo adquirida posteriormente vía otro canal de la tarjeta conversora Mini-Digi 1A, según se ha descrito anteriormente para la tensión. Los registros de potencial de acción se adquirieron en configuración bifásica (con ambos electrodos activos, figura 2); o monofásicos (con un electrodo activo, figura 8, control). En este último caso se siguieron las clásicas y conocidas descripciones experimentales que datan de 1880 a 1935, en donde hay un electrodo activo, fijándose

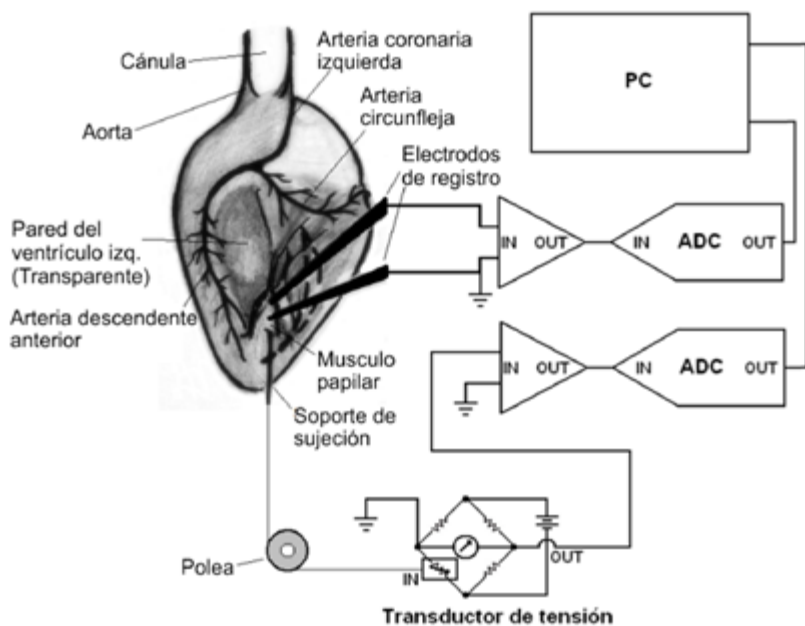


Figura 2. Esquema del dispositivo experimental. Se muestra un corazón aislado, mantenido por retroperfusión coronaria según el método de Langendorff y los dispositivos de registro asociados. Los electrodos de registro de señales eléctricas se colocan sobre el músculo papilar, a través de una pequeña incisión que no compromete las coronarias (línea punteada). Las señales eléctricas superficiales que se pueden registrar con los electrodos, pueden ser registros bifásicos o monofásicos de acuerdo a ubicación y disposición de electrodos. Bifásicos, en caso de tener ambos electrodos sensibles a la diferencia de potencial o monofásicos al colocar un electrodo en ápex o extremo dañado o depolarizado de músculo papilar. La tensión se registra por un transductor de tensión unido por un soporte de sujeción a la base del músculo papilar, introduciéndose el mismo por la incisión mencionada antes. Para la direccionalidad de los cambios, se utiliza una polea de rozamiento interno despreciable. Ambas señales son amplificadas y posteriormente digitalizadas para su procesamiento por computadora (PC).

el otro en una zona dañada en regiones de propagación cilíndrica paralela como ser el músculo papilar [8,9]. Interesantemente, recientemente se ha asistido a una revaloración de estos métodos clásicos de obtención de información de actividad eléctrica cardíaca [10,11].

4. Procedimiento experimental

4.a – Corazón aislado.

Previo a la colocación del corazón en el dispositivo Langendorff, se cebaron las tubuladuras y se midió el flujo (aprox 12 ml/min). Posteriormente, se fijó el corazón a la cánula y se le perfundió. Luego de estabilizada la actividad eléctrica y mecánica del mismo, monitoreada según los dispositivos ya descritos, se suspendió el flujo de Tyrode hacia el corazón y mediante llave de paso, ubicada en las tubuladuras, se habilitó el pasaje de 50 ml de Tyrode con CQ agregada a distintas concentraciones de acuerdo con el experimento realizado. Se registraron los cambios en la actividad cardíaca y luego de vaciado el reservorio de la droga, se procedió al lavado del corazón. Durante estas intervenciones, se evaluó el tiempo y la calidad de recuperación de la actividad eléctrico-mecánica. El procedimiento descrito se realizó para dosis sucesivas y crecientes de CQ hasta dosis que exhibieron saturación de los efectos mecánicos y eléctricos para la CQ.

4.b - Aislamiento de células

El aislamiento de miocitos de corazón de cobayo, se realizó siguiendo la técnica de digestión enzimática de corazón de Mitrad y Morad con algunas modificaciones, desarrolladas y descritas en Ferreira, 1992 [1,12].

Repasamos brevemente lo ya descrito en estos trabajos, que se trata de métodos bastante usados y estándares en eletrofisiología cardíaca. Inicialmente se procedió al aislamiento y perfusión del corazón en “Tyr 1.8 Ca²⁺”, hasta la estabilización de las condiciones de registro. Luego se procedió a la perfusión con “Tyr 0 Ca²⁺” hasta la detención de las contracciones cardíacas. Seguidamente, se procedió a aplicar las enzimas (Colagenasa y Proteasas), para su digestión, hasta que el corazón adquirió una consistencia menor que la observada en condiciones basales. Luego de ser empleadas las enzimas, se eliminaron las mismas, perfundiendo el corazón con “Tyr 0.2 Ca²⁺”. Una vez lavadas las

enzimas, se cortó el corazón digerido en trozos y se dispersaron los miocitos en la solución “Tyr 0.2 Ca²⁺” mediante agitación mecánica. Finalmente esta suspensión de células se filtró a través de un filtro de 200 micras para limpiar el preparado de restos sin digerir.

Los miocitos aislados se colocaron en una cámara experimental que contenía “Tyr 1,8 Ca²⁺”, montada en un microscopio invertido. Luego de 15 a 20 minutos en dicha solución, se determinó el rendimiento de la aislación de acuerdo al porcentaje de células morfológicamente aceptables (células alargadas con estriaciones regulares bien marcadas) en dos a tres campos.

5. ‘Patch Clamp’ en miocitos aislados

Los cardiomiocitos aislados se sometieron a la técnica del parche (en inglés “*patch clamp*”), en configuración de célula entera (en inglés “*whole cell*”), de acuerdo a lo descrito por Hammill *et al.* [13] y descrito en detalle en el libro de Bert Sakmann y Erwin Neher [14]. La resistencia de las pipetas de Patch, medidas entre la solución intracelular y extracelular de registro, indicadas en la tabla 2, osciló entre 1 a 3 mOhm. Las pipetas se estiraron con estiradores de pipeta convencionales (Sutter y Narishige), puliéndose las mismas en microforja construída en nuestro laboratorio. La constante de tiempo con compensación de resistencia, teniendo en cuenta la capacitancia y resistencia serie, fue de alrededor de 0.8 ms. Estos registros se amplificaron con *headstages* de 500 mOhm unidos a un amplificador de patch (AM Systems2400). Los registros analógicos se

Solución	CsCl ₂	ATPMg	HEPES	EGTA	MgCl ₂
Intra-celular (pipeta)	140	5	10	10	2

Tabla 2. Composición de Soluciones Patch (en mM)

digitalizaron con una tarjeta convertora Digidata 1322A (Molecular Devices-Axon Instruments), unida en configuración SCSI a una computadora en ambiente Windows. La adquisición se realizó mediante pClamp 9 (Molecular Devices-Axon Instruments). Los pulsos se aplicaron también mediante dicho programa en configuración digital-analógica A-Out convencional.

La solución extracelular fue “Tyr 1.8 Ca²⁺” descrita en la Tabla 1, con el agregado de Glucosa 10 mM y Ca²⁺. Para anular el componente de Na⁺, se aplicó un prepulso de 50 ms a -40 mV. La corriente de Ca²⁺ se obtuvo como es de costumbre, tomando controles de acuerdo a P/4 desde un potencial de mantenimiento de -100 mV.

6. Análisis de los datos y estadística

El análisis de datos se realizó mediante el uso de rutinas Clampfit (Molecular Devices-Axon Instruments) y Sigmaplot 11 (SYSTAT Software). Los resultados correspondientes a varios datos de un mismo tipo de experimento se muestran como media +/- s.e.m (siendo s.e.m el desvío estándar de la media). Para el análisis de las curvas dosis-respuesta de efecto inotrópico cardíaco ante exposiciones crecientes de CQ, se le ajustó una ecuación de Hill: $f = \min + (\max - \min)/(1+10^{-(\log EC_{50}-x)})$, escrita en formato semilog en ambiente de programación Sigmaplot.

La medición de velocidades de contracción y relajación (dT/dt), se realizó por programación de software que permite obtener estos valores mediante cálculo de la derivada primera a partir de los registros T = f(t), aplicando el algoritmo de

cálculo $f'(x) = \lim_{h \rightarrow 0} [f(x+h)-f(x)]/h$. La Fuerza por área normalizada o Tensión (T), se midió en gramos fuerza (gf). Para expresarlo en el dominio de las frecuencias, se dividió por la máxima variación de Tensión. También se computaron los tiempos medios de activación y relajación de la contracción (tiempo medio de amplitud pico de relajación a contracción o viceversa).

Resultados

1. La Cloroquina produce efectos inotrópicos negativos sobre el corazón

Los registros de tensión, muestran que ante dosis con concentraciones crecientes de CQ, se ve disminuida la amplitud de las contracciones cardíacas. En la figura 3, se muestran los registros de tensión realizados en corazón aislado ante concentraciones crecientes de CQ extracelular.

Ante la aplicación de CQ con una concentración 5 μ M, la fuerza de contracción se ve disminuida en un 50% aproximadamente con respecto a la situación control, según se observa en la figura 3. Por lo tanto con estos resultados podemos observar que la CQ ejerce efectos que alteran la función cardíaca contráctil, a concentraciones en el rango μ M. Así, cambios de concentración

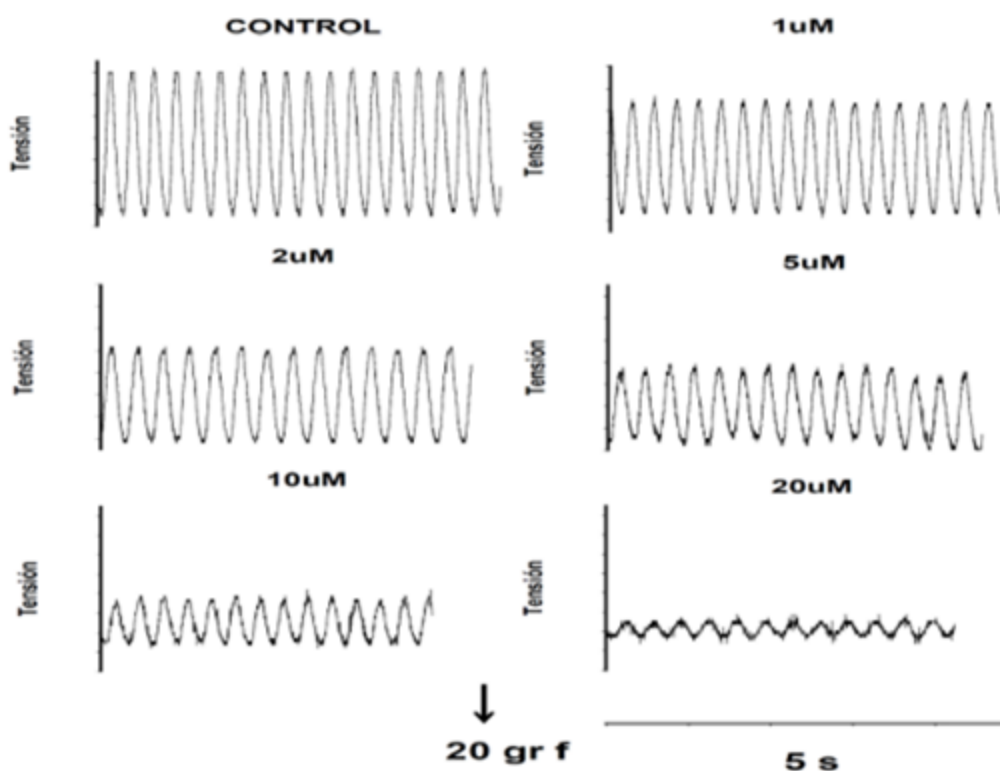


Figura 3. Las concentraciones crecientes de cloroquina disminuyen la amplitud de los registros de tensión.

En la figura se observan tramos de un mismo registro de tensión de un corazón aislado sometido a dosis crecientes de CQ.

Se observa un marcado efecto inotrópico negativo además de un efecto cronotrópico negativo más sutil.

Lavados realizados entre las aplicaciones de las distintas dosis muestran la reversibilidad total del efecto.

en el orden micromolar pueden generar fuertes efectos inotrópicos negativos. La comparación entre control y CQ 20 μM , enlentece también los tiempos medios de contracción y relajación, de 6 y 7 \pm 1 ms respectivamente a 10 y 11 \pm 1 ms en CQ. La derivada primera no normalizada (dT/dt), cambia de 300 \pm 10 gf/s a 50 \pm 5 gf/s con CQ, tanto para contracción como para relajación. En el dominio de frecuencias ($dT/(dt \cdot T_{\text{max}})$), se observó que los picos de derivada primera normalizados a la variación máxima de tensión, disminuyen de 12 \pm 1 Hz a 8 \pm 1 Hz en ambos procesos contráctiles. Los cambios en la relajación fueron aproximadamente 20% más pronunciados que los de la contracción.

Una vez que determinamos el efecto inotrópico negativo de la CQ, obtuvimos la curva dosis-respuesta para este efecto. A los puntos promedio se le ajustó una ecuación de Hill según se indica en la figura 4 ($n=5$). La figura 4 muestra la curva dosis respuesta promedio, en la cual se grafican los registros de tensión promedio obtenidos para cada una de las concentraciones crecientes de CQ. Al observar esta curva dosis respuesta, es muy claro el efecto inotrópico negativo en relación con el aumento de concentración de CQ. La línea sólida representa la curva de mejor ajuste de una ecuación de Hill, $f = \text{min} + (\text{max} - \text{min}) / (1 + 10^{(\log EC_{50} - x)})$. Los parámetros obtenidos fueron n próximo a -1, e IC_{50} de alrededor de 5 μM .

Los valores anteriores implican los valores

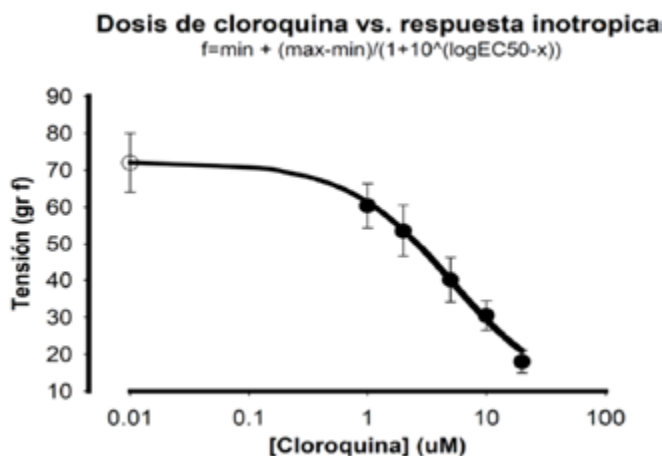


Figura 4. Curva Dosis-Respuesta del efecto inotrópico negativo de CQ extracelular. En el gráfico están representados los datos promedio de tensión en función de dosis de CQ en formato semilog. La ecuación de Hill de mejor ajuste (línea llena) se superpone a los valores promedio. Los parámetros obtenidos mediante el ajuste fueron n próximo a -1 e IC_{50} de alrededor de 5 μM .

obtenidos en estado estacionario (ante tiempos de exposición a distintas concentraciones de CQ extracelular de decenas de minutos). En la figura 5, se puede observar la cinética de acción de la aplicación y lavado de 400 μM de CQ extracelular. Las contracciones cardíacas se observan con un muy bajo grado de resolución temporal (como espigas). Se observa que el efecto inotrópico negativo aparece inmediatamente al aplicarle al corazón la dosis mencionada. Esto implica un mecanismo de acción inmediato de la CQ, estando

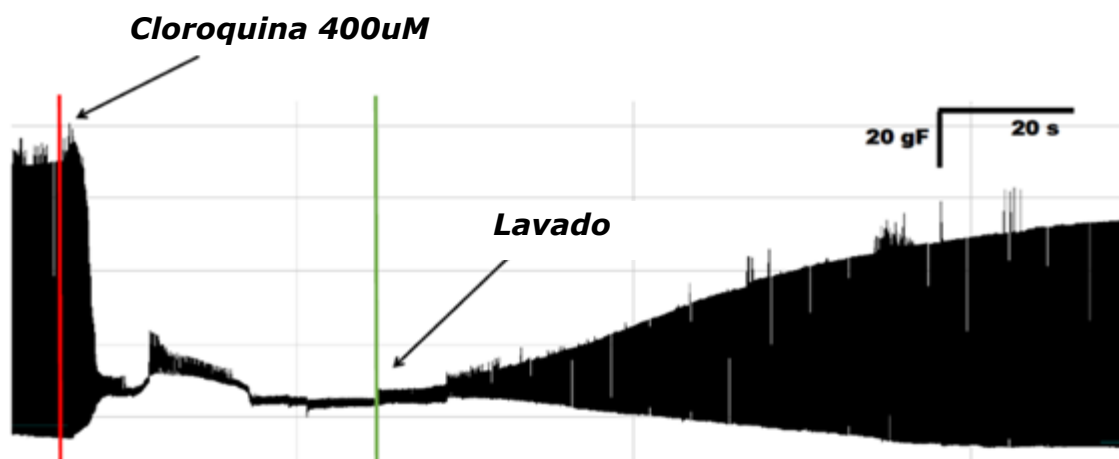


Figura 5. La cinética de promoción del efecto inotrópico negativo de la cloroquina se establece rápidamente en comparación con su cinética de lavado. En la figura se observa un registro de tensión con escala temporal de muy baja resolución. En el registro se encuentran señalados los puntos de aplicación de 400 μM de CQ y del lavado de la misma. Se observa claramente que la velocidad de acción del fármaco es casi instantánea mientras que la recuperación de la amplitud de la contracción se da más lentamente, demorando hasta 10 minutos.

limitada la cinética de acción únicamente por la perfusión. En contraste, la recuperación es más lenta tomando aproximadamente 10 minutos. Ello sugiere la existencia de efectos debidos a acumulaciones intracelulares de CQ, las que son difíciles de eliminar por lavado.

2. La Cloroquina tiene efecto cronotrópico negativo sobre el corazón

Además de la disminución de la tensión generada por las contracciones cardíacas (efecto inotrópico negativo), se observa en los registros de la figura 3, se muestra que la frecuencia con la cual se producen las contracciones cardíacas también disminuye. Este efecto cronotrópico negativo es mayor cuanto más alta es la concentración de CQ aplicada en el corazón. Ante una dosis de CQ, con concentración 20 μM , las contracciones cardíacas se ven disminuidas a 12 en 5 segundos aproximadamente, en comparación con el control que presenta 18 contracciones espontáneas en 5 segundos aproximadamente (ver figura 3).

Una curva dosis respuesta del efecto de CQ extracelular sobre la frecuencia cardíaca

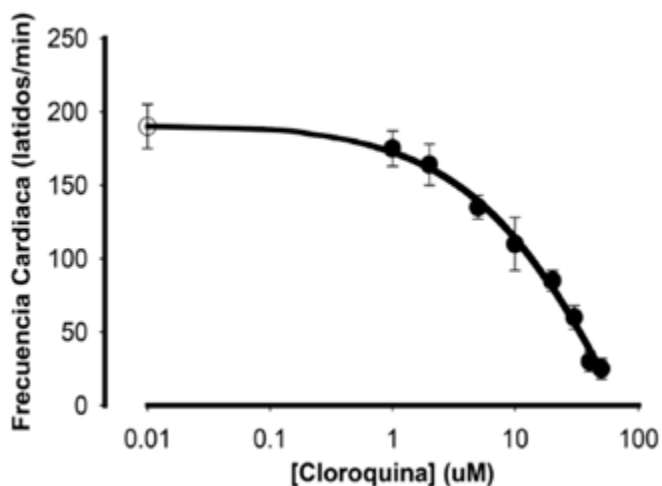


Figura 6. Curva Dosis-Respuesta del efecto cronotrópico negativo de la CQ extracelular. En el gráfico están representados los promedios de frecuencias para distintas dosis de CQ (n=5). La línea llena representa la ecuación de Hill $[f = \text{min} + (\text{max} - \text{min}) / (1 + 10^{(\log \text{EC}_{50} - x)})]$ de mejor ajuste en formato semilog. Los parámetros obtenidos para la ecuación de Hill fueron $n = -0.66$ y un IC_{50} de alrededor 13 μM . Los valores obtenidos son similares y ligeramente superiores a aquellos relacionados con su efecto inotrópico negativo.

(cronotropismo), se muestra en la figura 6 (n=5). Es muy claro el efecto cronotrópico negativo de CQ, aumentando con concentraciones crecientes de dicho fármaco. La línea sólida representa el mejor ajuste de una ecuación de Hill a los valores promedio de frecuencia cardíaca que se obtuvieron para las distintas concentraciones de CQ. Los parámetros de la línea de mejor ajuste fueron los siguientes: n aprox -0.66 e IC_{50} aprox 13 μM . Dichos valores son similares, aunque levemente superiores, a los que se obtuvieron al caracterizar el efecto de CQ extracelular sobre la contractilidad (sección 4.1). Esto sugiere que los efectos en generación de impulsos eléctricos son menos afectados por CQ, que los efectos en contractilidad cardíaca.

3. La cloroquina es arritmogénica

El efecto arritmogénico de CQ se muestra en la figura 7. Dicha figura representa una curva dosis respuesta de arritmias medidas como número de extrasístoles por minuto (contracciones fuera de tiempo y amplitud respecto al ritmo de contracciones regulares), en función de diferentes concentraciones de CQ (n = 4). Esta medida es habitual como una aproximación inicial al estudio de arritmias, usándose frecuentemente en compañías de seguros por la prognosis asociada [15]. Mayores dosis de CQ incrementan la ocurrencia de las contracciones

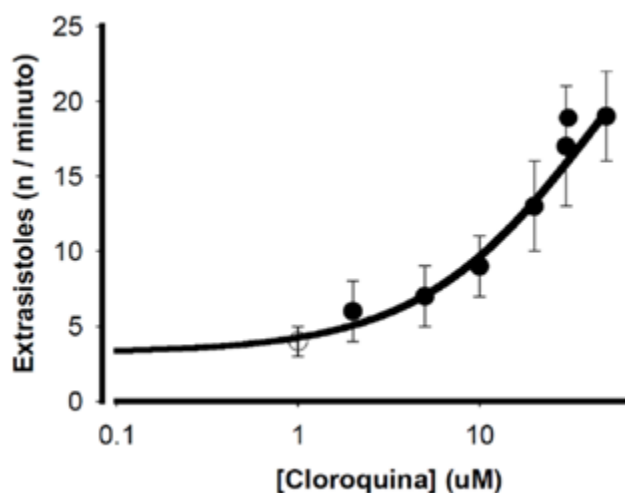


Figura 7. Cloroquina aumenta la ocurrencia de extrasístoles en función de la dosis. El gráfico de la figura muestra el promedio de extrasístoles observadas en función de la dosis de CQ (n=4). La ecuación de Hill de mejor ajuste al promedio de los datos (línea llena) presenta un n aproximado de 0,89 y un IC_{50} cercano a 20 μM .

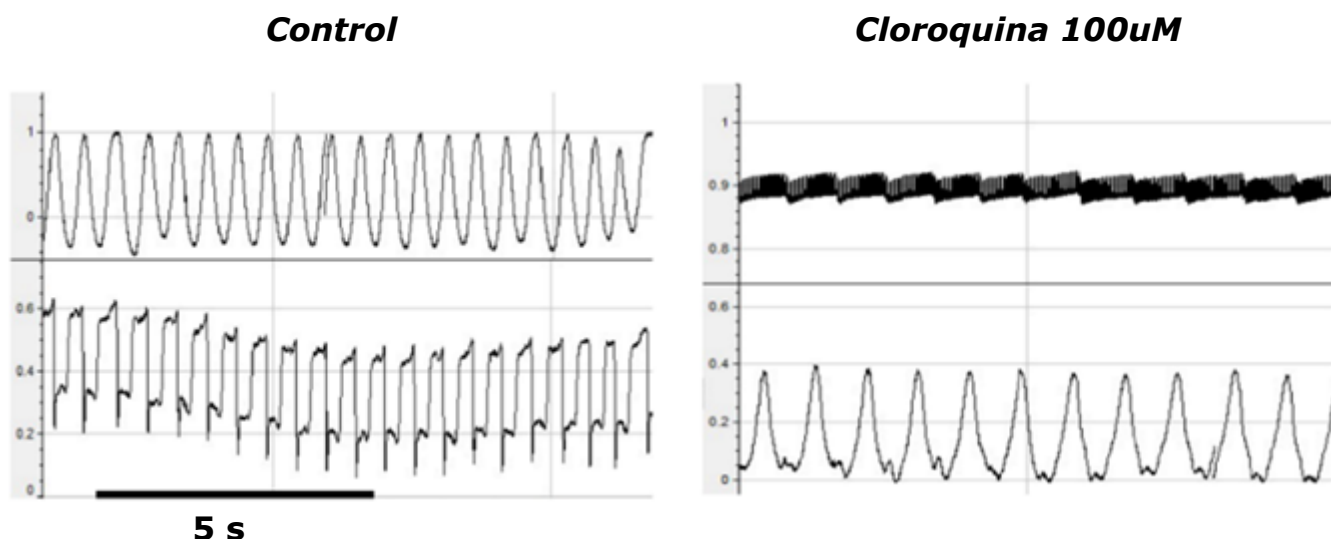


Figura 8. La cloroquina extracelular a dosis mayores a 100 μM (dosis elevadas), produce desacople electro-mecánico. La parte superior de los registros mostrados en la figura corresponde a la actividad mecánica, las contracciones se registran hacia abajo. En los registros inferiores se observa el electrograma de superficie en configuración de potencial de acción monofásico compuesto, estando los registros eléctricos invertidos por la disposición de los electrodos de registro. La figura muestra datos directos de adquisición, tal cual ocurriría mediante un osciloscopio, a efectos de ser lo más fieles posibles respecto a lo obtenido. En situación de control, las despolarizaciones presentan una frecuencia de 144 lat/min y son seguidas por contracciones de aproximadamente 80 gf (gramo fuerza). En presencia de 100 μM de CQ, la amplitud de las contracciones disminuye hasta desaparecer y la frecuencia desciende a alrededor de 100 latidos/min. Desaparece la fase de despolarización rápida del potencial de acción compuesto, prolongándose a su vez el mismo.

desfasadas en el tiempo, con amplitud variable por minuto (o sea extrasístoles por minuto), resultando en el gráfico promedio mostrado en la figura 7. En dicha gráfica, la línea llena representa una ecuación de Hill de mejor ajuste con n de aproximadamente 0,89 e IC 50 de aproximadamente 20 μM .

4. La cloroquina provoca desacoplamiento eletro-mecánico

En la figura 8 se muestran registros simultáneos de tensión y de potenciales monofásicos; medidos en una situación control (izquierda) y ante exposición a CQ 100 μM (derecha). Como se aprecia en el registro de tensión que corresponde al control, apreciamos una contracción con una amplitud que equivale aproximadamente a 80 gf (arriba/izquierda) acompañada de una respuesta eléctrica de potencial de acción monofásico compuesto (abajo/izquierda-invertido). La frecuencia de las contracciones varían aproximadamente entre 140 y 155 latidos/min, siendo levemente inferior a la frecuencia cardíaca in vivo del animal. Con la exposición a CQ se advierte que la amplitud de la respuesta contráctil se reduce significativamente o anula (ver arriba/derecha en figura 8). Los

experimentos efectuados también sugieren que la CQ a las concentraciones mencionadas, aumenta la tensión basal. La respuesta eléctrica de potencial de acción monofásico se mantiene a una frecuencia de aproximadamente 100 latidos/minuto (ver abajo/derecha en figura 8). Comparando ambos potenciales de acción compuestos monofásicos se observa que en presencia de CQ, aparte de disminuir la frecuencia cardíaca disminuye la fase de despolarización rápida. La fase de repolarización del mismo en CQ, es también más prolongada que en situación control. Se altera también el estado estacionario de la meseta del potencial de acción cardíaco, correspondiendo al estado estacionario entre canales de Ca^{2+} L y canales de K^+ .

Estos resultados se interpretan como desacople excito-contráctil por CQ que puede ocurrir a múltiples niveles (Canales de Ca^{2+} tipo L, RyR 2, SERCA e interacciones actina-miosina), aparte de problemas de la conducción que pueden deberse a bloqueo de canales de Na^+ , según se observa en la fase 0 y o/a bloqueo de canales de K^+ , según se observa en la prolongación de la meseta a expensas de una repolarización más prolongada.

5. La cloroquina disminuye las corrientes de Ca en células aisladas

Dado que en los resultados hemos descripto antes en 3 y 4, es posible observar alteraciones de la capacidad contráctil del corazón, así como de la meseta del potencial de acción monofásico, decidimos explorar si la CQ es capaz de afectar las corrientes de Ca^{2+} L en cardiomiocitos aislados. Se usaron las soluciones de la tabla 2, con la técnica de patch clamp en configuración de célula entera, aplicando los protocolos de registro de I_{Ca}, descritos en material y métodos. Los resultados de dichos experimentos se observan en la figura 9 para una dosis de CQ extracelular de aproximadamente 100 μM . El trazo negro fino representa la situación control, en tanto el grueso representa la corriente de Ca^{2+} ante exposición a CQ 100 μM . El trazo rojo representa el trazo expuesto a CQ escalado/normalizado, respecto al pico control para comparar los cursos temporales de las corrientes control y bloqueada por CQ 100 μM . De acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo la CQ a esta concentración disminuye la corriente de

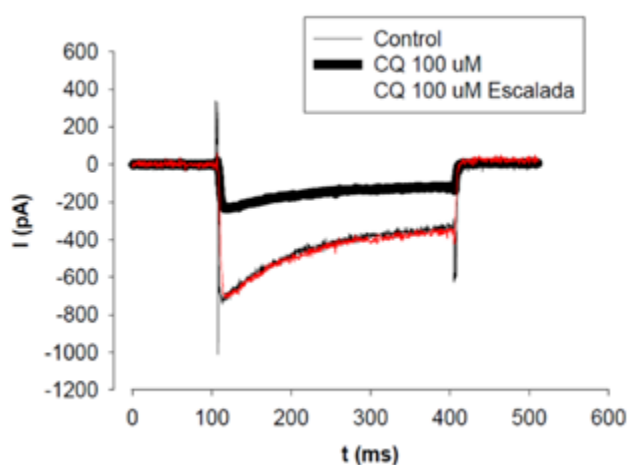


Figura 9. La cloroquina extracelular bloquea las corrientes por el canal de Ca^{2+} tipo L en cardiomiocitos aislados de corazón ventricular de cobayo.

Las corrientes de Calcio se registran entre -40 mV y +20 mV, luego de pre-pulsos de 50 ms de duración a -40 mV con el objetivo de eliminar las corrientes de Na^{+} . Los trazos finos negros corresponden a la situación control, en tanto el trazo negro lleno corresponde a la corriente de Calcio obtenida en presencia de CQ 100 μM . Para saber si el fármaco altera las características generales de gating del canal el trazo bloqueado se escaló y superpuso a la situación control (trazo escalado en rojo). Se muestra un registro típico de n=4 experimentos.

Calcio L (ICaL), lo cual explicaría parcialmente el efecto inotrópico negativo observado por CQ. Al disminuir I_{Ca}, disminuye la capacidad de liberación de Ca^{2+} por receptores de ryanodina (RyR 2), hecho que estamos estudiando actualmente.

Es interesante notar que la CQ no altera la cinética de la corriente de Ca^{2+} mediante el bloqueo de dichos canales, según se observa en el trazo rojo escalado. Esto sugiere que disminuye la disponibilidad de dichos canales a la apertura, sin interferir drásticamente en los mecanismos de modulación básica de *gating* (“compuerta”) de los mismos.

Discusión

La CQ es un fármaco liposoluble que pertenece al grupo de las aminoquinolinas (quininas) [2]. La CQ y sus derivados, en virtud de su alta permeabilidad a la membrana plasmática y su posterior acumulación en vacuolas y lisosomas, son usados en el tratamiento de la malaria, enfermedades autoinmunes, habiéndose empleado también experimentalmente como antineoplásico y en el tratamiento del SIDA [2]. Como antimalárico, ha experimentado en los últimos años la descripción de casos de *Plasmodium falciparum* resistentes a dicho fármaco. Esta resistencia en algunos casos es bloqueada por la droga bloqueante de canales de Ca^{2+} verapamil, aunque parece estar relacionada a tipo de cepa de *Plasmodium* en estudio [16, 17]. En los últimos años se han diseñado algunos fármacos derivados para evitar este problema. Algunos derivados de la CQ se han diseñado con este fin, aunque el problema de toxicidad es aún un problema a resolver para la CQ y todos sus derivados [18,19].

Al ser la CQ altamente permeable a membranas lipídicas, es capaz de distribuirse en varios organelos y en el núcleo celular originando cambios a varios niveles (DNA, RNA, RedOx, acidificación, impacto directo en moléculas de membrana) [20,21]. En virtud de esta acumulación no específica en organelos intracelulares, provoca la liberación de especies reactivas, algunas como grupos Hemo en glóbulos rojos con lisis celular y muerte de los plasmodios infectantes. Sin embargo este efecto no se circunscribe a los glóbulos rojos afectando virtualmente con distinta sensibilidad todas las células del organismo. Por ello, la CQ tiene

efectos tóxicos en variadas células del organismo, que deben controlarse y monitorearse cuando se administra la droga, siendo las complicaciones más frecuentes en la visión y audición, así como cardiomiopatías en corazón [22-25].

El propósito de este trabajo fue caracterizar funcionalmente las alteraciones que se producen a nivel de la función cardíaca, ante exposición aguda a la droga, caracterizando así parte de los mecanismos funcionales por los que se llega a la cardiomiopatía química por CQ en sus estadios finales en los que habitualmente consulta el paciente.

1. Efecto de la cloroquina en la contractilidad cardíaca

Nuestro trabajo muestra claramente que la exposición aguda a CQ en el orden μM provoca un efecto dramático en el inotropismo cardíaco, con IC_{50} de aproximadamente $5 \mu\text{M}$ y n de aproximadamente -1 , indicando el carácter negativo de impacto del fármaco sobre esta propiedad cardíaca. Este valor es ligeramente inferior al reportado por Tona *et al.* [26]. En nuestro caso los reportes obtenidos fueron con *Cavia porcellus*. Si bien también se trabajó con *Rattus porvegicus*, a efectos de lograr estudios comparativos entre especies, dichos resultados no se reportan en este trabajo. Los resultados obtenidos con *Rattus norvegicus* fueron cualitativamente idénticos a los obtenidos con cobayo aunque las dosis de ajuste dosis-respuesta arrojaron IC_{50} levemente inferiores. Las curvas dosis-respuesta obtenidas por Tona *et al.* [26], muestran descensos de tensión al aplicarse CQ en concentraciones de 10 a $100 \mu\text{M}$. Estos efectos al igual que en nuestro trabajo fueron reversibles luego del correcto lavado, sobre todo a bajas concentraciones. Las leves discrepancias observadas aún con la misma especie animal (*Cavia porcellus*), es probable que se deban a las condiciones de realización experimentales a flujo más lento que en nuestros experimentos (de 15 a 5 ml/min) y posiblemente por la distinta pureza del fármaco empleado por estos investigadores y nuestro laboratorio (Sigma c6628 99.5% puro en nuestro caso). Finalmente en el caso de Tona *et al.*, las aurículas fueron removidas sin tener en cuenta el latido sinusal. Esto no se hizo así en nuestros experimentos, que intentan simular lo más adecuadamente posible las condiciones

de corazón aislado completo. Finalmente, los trabajos mencionados de Tona *et al.*, también fueron realizados con otras concentraciones de Ca^{2+} extracelular que influyen sobre el efecto inotrópico negativo observado con CQ. A mayores concentraciones extracelulares de Ca^{2+} , menos impacto de la CQ en el inotropismo negativo.

En nuestro trabajo, utilizamos concentraciones menores para evaluar el efecto inotrópico negativo de la CQ sobre el corazón aislado de cobayo, observándose descensos de tensión con dosis de $1 \mu\text{M}$, menores a las reportadas por Tona *et al.* En dicho trabajo, solamente se reportaron los promedios de ino y cronotropismo negativo, sin un análisis detallado de los registros obtenidos como intentamos realizar en este reporte. Por lo tanto el efecto cardiotóxico de la CQ en nuestro caso, apareció con pequeñas concentraciones del fármaco, dado el menor Ca^{2+} extracelular puede causar que pequeños cambios de las dosis utilizadas generen cambios de la contracción cardíaca con efecto inotrópico negativo negativo.

Como conclusión de estos hallazgos, es interesante tener en cuenta que ambos trabajos coinciden en lo sustancial respecto al efecto agudo de la CQ extracelular, o sea el ino y cronotropismo negativo. Como hemos mencionado previamente, en Tona *et al.*, solo se muestran las gráficas de curvas obtenidas y no se analizan mecanismos posibles. En este trabajo agregamos los registros obtenidos ante la exposición de CQ en el rango micromolar. Si bien la CQ afecta algo la fase de contracción inicial, afecta más aún la relajación, prolongando los estados contráctiles de baja amplitud. Esto se observa en los reportes de tiempo medio de activación y relajación de la contracción, así como por análisis de la derivada primera dT/dt efectuados durante la contracción y su relajación o el análisis relativo de frecuencias de contracción/relajación, cuando se normaliza la derivada primera en relación a la máxima variación de tensión.

Una explicación de estos efectos podría deberse a interferencia parcial con la liberación de Ca^{2+} del Retículo Sarcoplasmático (RS), por efecto directo de la CQ (en canales de Ca^{2+} L o en receptores de Ryanodina, RyR 2) o indirecto (en relación a su modulación citoplasmática o intracelular). Finalmente, los efectos observados en el enlentecimiento de la relajación, podrían deberse a

una interferencia de la CQ con la recaptación de Ca^{2+} intracelular por la bomba de Ca^{2+} del RS (SERCA) o por interferencia de la CQ con actina-miosina o su regulación por Ca^{2+} . Futuros experimentos realizados por nuestro grupo intentarán explicar en qué porcentaje puede intervenir cada uno de estos procesos hipotéticos.

Al igual que en Tona *et al.*, en el presente reporte la CQ mostró tener una rápida cinética de promoción, al igual que de su lavado. Los tiempos usados para asegurar un estado estacionario fueron significativamente mayores dado que el flujo de perfusión fue también significativamente menor. El lavado de CQ se observa a dosis relativamente menores, inferiores a decenas de μM , donde se observa una reversibilidad casi total de sus efectos. Sin embargo, es presumible que este lavado sea incompleto a dosis mayores, cercanas a cientos de μM , dado que la reversión de los efectos de la CQ no es total en estos casos.

El hecho del reporte de Tona *et al.*, acerca de que el inotropismo negativo es fuertemente alterado por modificaciones de las concentraciones de Ca^{2+} extracelular, sugiere que una participación importante de la liberación de Ca^{2+} del RS vía canales de Ca^{2+} tipo L, como un mecanismo por el cual la CQ interfiere tan rápidamente con una disminución del inotropismo cardíaco.

2. Efecto de la cloroquina en la conducción y ritmo cardíacos

El efecto cronotrópico negativo de la CQ observado en nuestro trabajo es similar en IC_{50} y n del mejor ajuste de ecuación de Hill, a los obtenidos para inotropismo. Los valores observados fueron $13 \mu\text{M}$ y $n = -0.66$.

Tona *et al.* [26], no observaron en detalle el efecto de la CQ extracelular en el cronotropismo sinusal cardíaco en corazón entero aunque sí en tiras aisladas de músculo auricular. Sus datos son consistentes con los nuestros, reportando un cronotropismo negativo promedio para dosis entre 10 a $100 \mu\text{M}$, al igual que en nuestro caso. Tampoco muestran los registros mecánicos ni eléctricos logrados.

El efecto cronotrópico negativo observado puede deberse no sólo a efectos a nivel del nodo sinusal sino que a disturbios en la conducción eléctrica cardíaca, que también han sido reportados en presencia de CQ [27].

Estas alteraciones en la conducción cardíaca pueden explicar la aparición mayor de trastornos de pérdida del ritmo cardíaco regular, según reportamos en nuestro trabajo (ver figura 7).

Un reporte reciente en corazones de conejo aislados o en animales anestesiados, es consistente con lo reportado en nuestro trabajo al respecto, indicando que la CQ tiene actividad proarrítmica [28]. El mecanismo descrito en este reporte se debe a un incremento de la aparición de *torsade de points* (TdP) en tanto alargan el intervalo QT (prolongación de la meseta consistente con afectación del equilibrio entre corrientes salientes por canales de K^+ y entrantes por canales de Ca^{2+} L) [28]. El incremento en TdP también puede observarse ante un incremento de las extrasístoles ventriculares por minuto, como reportamos en nuestro trabajo, aunque las dosis usadas fueron superiores a las nuestras (aproximadamente $300 \mu\text{M}$ CQ). Así entonces, de acuerdo a este reporte, la CQ es capaz de producir síndrome adquirido de QT largo y aparición de TdP de manera consistente con nuestros hallazgos.

3. Efecto de la cloroquina en acoplamiento excitación-contracción y corrientes de Calcio L

Nuestros resultados muestran claramente que ante exposición a $100 \mu\text{M}$ de CQ, la capacidad contráctil cardíaca es eliminada virtualmente, en tanto continúan registrándose potenciales de acción monofásicos de características diferentes a la situación control. Se observa un enlentecimiento de la fase 0, alteraciones de la meseta en fase 2 y enlentecimiento de la repolarización en fase 3. Estos fenómenos podrían explicarse por múltiples puntos de impacto en diferentes canales de iones de cardiomiocitos como ser canal de Na^+ durante la fase 0, así como canales de K^+ en la repolarización y meseta y canales de Ca^{2+} tipo L en la meseta de menor amplitud (ver figura 8). Estas observaciones producidas en los potenciales de acción monofásicos, sumados a otros experimentos de nuestro grupo, nos permiten especular que la CQ es capaz de bloquear con distinta sensibilidad a canales de Na^+ y K^+ , involucrados en las distintas fases del potencial de acción cardíaco, alteradas por CQ. Estos resultados concuerdan con algunos reportes que existen en la literatura sobre otras

especies (gato) [29]. Las dosis exploradas en estos reportes estuvieron en el rango de 10 μM .

Así entonces, en nuestro trabajo mostramos que la CQ tiene múltiples puntos de impacto en su toxicidad aguda, aunque un sitio central para explicar el inotropismo negativo lo constituyen los canales de Ca^{2+} de tipo L. La corriente de Ca^{2+} de tipo L, a través de dichos canales, es el nexa primario en el acoplamiento excito-contráctil cardíaco. El ingreso de iones Ca^{2+} a través de canales tipo L estimula la liberación de Ca^{2+} intracelular, reponen los depósitos de Ca^{2+} intracelular y participa en la activación de las proteínas contráctiles. Esto explica al menos parcialmente, porque la CQ produce importantes efectos sobre el inotropismo cardíaco y enlentece la contracción cardíaca.

Es sumamente interesante que las características de *gating* de los canales remanentes se parecen a la de los canales no bloqueados, sugiriendo quizás una sensibilidad diferencial al fármaco para dichos canales lo cual podría estar ligado a distintas proteínas o sistemas regulatorios que modulan la función de la diversidad de los canales de Ca^{2+} L cardíacos.

Conclusiones

Los hallazgos más relevantes de esta investigación tienen que ver con la caracterización de daño molecular de una droga mundialmente usada para tratamiento de malaria, enfermedades autoinmunes y el tratamiento de algunas neoplasias, como ser la CQ y derivados.

i- La exposición aguda a CQ en concentraciones del orden μM es cardiopélica. Esto es algo a tener en cuenta en el ajuste de las dosis preventivas y/o terapéuticas de este fármaco.

ii- Los niveles de manifestación de esta toxicidad en la función cardíaca se observan en diversos niveles con distinta sensibilidad en sus curvas dosis-respuesta aunque son bastante similares en líneas generales. Los trastornos del inotropismo cardíaco son los primeros en aparecer y lo más sensibles a esta droga. Le siguen en sensibilidad el cronotropismo negativo y aparición de arritmias.

iii- La cinética de comienzo de acción de la droga (ONSET) es significativamente más acelerada que su lavado (OFFSET). Este hallazgo sugiere alta permeabilidad de entrada de la droga a un compartimento de captura o almacenamiento con

difícil lavado de la misma probablemente por recaptación con afinidad/modificaciones más difíciles de revertir (¿entrada a compartimentos intracelulares?).

iv- Dosis altas de CQ superiores a 100 μM inhiben casi completamente la actividad contráctil, modificando pero no eliminando la actividad eléctrica. Estos hallazgos sugieren que la CQ provoca desacoplamiento excito-contráctil en músculo cardíaco, siendo este uno de los mecanismos centrales de acción de la misma (impactos canal Ca L, Ryr 2, interacción actomiosina).

v- La acción de CQ 100 μM sobre las corrientes de Ca^{2+} L, sugiere que al menos parte de la explicación de la conclusión anterior se debe a bloqueo de dichos canales con disrupción de la liberación de Ca^{2+} del RS por los canales RyR 2. La cinética similar sugiere que no interactúa dramáticamente con mecanismos de *gating* o que es capaz de interactuar con una población con determinantes moleculares o de modulación de canales de Ca^{2+} , especialmente sensible a la CQ. La afectación de la relajación, sugiere que se alteran mecanismos de recaptación de Ca^{2+} , presumiblemente SERCA.

Agradecimientos

Agradecemos al programa CSIC I+D (GF), CSIC PAIE (HH, GF) por apoyo financiero, el apoyo de ANII (GF), a la Facultad de Medicina y muy especialmente a los compañeros de Bioterio, Contaduría y Compras.

Contribución de cada uno de los autores

CC: realización y análisis de los experimentos, algunas figuras, HH: realización de algunos experimentos, escritura, JD: realización de algunos experimentos, escritura, HT: participación en algunos experimentos, GF: ideación del proyecto, escritura del proyecto, análisis, realización de experimentos, dirección del trabajo.

Referencias

1. Ferreira G. Registro y caracterización del movimiento de carga intramembrana en miocitos aislados de miocardio ventricular de cobayo. [Tesis no publicada]. Montevideo; 1992.
2. Brunton L, Chabner B, Knollman B, editores. Goodman and Gilman's The pharmacological

- basis of therapeutics. Nueva York: McGraw-Hill Education; 2010.
3. Gennaro AR, director. Remington Farmacia. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2003
 4. Dawson JS, Taylor MNF, Reide PJW. Pharmacology. Londres: Mosby; 2002.
 5. Morera LMT. Tratado de cuidados críticos y emergencias. Madrid: Arán Ediciones; 2002
 6. Figueredo VM. Chemical cardiomyopathies: the negative effects of medications and nonprescribed drugs on the heart. *Am J Med.* 2011 Jun;124(6):480-8.
 7. Roos JM, Aubry MC, Edwards WD. Chloroquine cardiotoxicity: clinicopathologic features in three patients and comparison with three patients with Fabry disease. *Cardiovasc Pathol.* 2002 Sep-Oct;11(5):277-83
 8. Burdon-Sanderson J. On the time-relations of the excitatory process in the ventricle of the heart of the frog. *J Physiol.* 1880 Jul;2(5-6):384-435.
 9. Jochim K, Katz LN, Mayne W. The monophasic electrogram obtained from the mammalian heart. *Am. J. Physiol.* 1935;111:177-86
 10. Franz MR. Current status of monophasic action potential recording: theories, measurements and interpretations. *Cardiovasc Res.* 1999;41(1): 25-40.
 11. Yang SG, Kittnar O. New insights into application of cardiac monophasic action potential. *Physiol Res.* 2010;59(5):645-50.
 12. Mitra R, Morad M. A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. *Am J Physiol.* 1985 Nov;249(5 Pt 2):H1056-60.
 13. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 1981;391:85-100.
 14. Sakmann B, Neher E, editores. Single-channel recording. 2a ed. New York: Springer; 2009.
 15. Rodstein M, Wolloch L, Gubner RS. Mortality study of the significance of extrasystoles in an insured population. *Circulation.* 1971;44: 617-25.
 16. Martin SK, Oduola AM, Milhous WK. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science.* 1987 Feb 20;235(4791):899-901.
 17. Martiney JA, Cerami A, Slater AF. Verapamil reversal of chloroquine resistance in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is specific for resistant parasites and independent of the weak base effect. *J Biol Chem.* 1995 Sep 22;270(38):22393-8.
 18. Thomsen TT, Madsen LB, Hansson HH, Tomás EV, Charlwood D, Bygbjerg IC, et al. Rapid selection of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene and multidrug resistance gene-1 haplotypes associated with past chloroquine and present artemether-lumefantrine use in Inhambane District, southern Mozambique. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Mar;88(3):536-41
 19. Summers RL, Martin RE. Functional characteristics of the malaria parasite's "chloroquine resistance transporter": implications for chemotherapy. *Virulence.* 2010;1:304-8.
 20. Ciak J, Hahn FE. Chloroquine: mode of action. *Science.* 1966 Jan 21;151(3708):347-9.
 21. Thome R, Lopes SC, Costa FT, Verinaud L. Chloroquine: modes of action of an undervalued drug. *Immunol Lett.* 2013 Jun;153(1-2):50-7.
 22. Hickley NM, Al-Maskari A, McKibbin M. Chloroquine and hydroxychloroquine toxicity. *Arch Ophthalmol.* 2011 Nov;129(11):1506-7.
 23. Michaelides M, Stover NB, Francis PJ, Weleber RG. Retinal toxicity associated with hydroxychloroquine and chloroquine: risk factors, screening, and progression despite cessation of therapy. *Arch Ophthalmol.* 2011 Jan;129(1):30-9.
 24. Burnett HK, Somani R. Clinically evident chloroquine toxicity undetected by multifocal electroretinogram. *Can J Ophthalmol.* 2012 Oct;47(5):e31-3
 25. Tonnesmann E, Kandolf R, Lewalter T. Chloroquine cardiomyopathy - a review of the literature. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2013 Jun;35(3):434-42.
 26. Tona L, Ng YC, Akera T, Brody TM. Depressant effects of chloroquine on the isolated guinea-pig heart. *Eur J Pharmacol.* 1990 Mar 27;178(3):293-301.
 27. Baguet JP, Tremel F, Fabre M. Chloroquine cardiomyopathy with conduction disorders.

- Heart. 1999 Feb;81(2):221-3.
28. Khobragade SB, Gupta P, Gurav P, Chaudhari G, Gatne MM, Shingatgeri VM. Assessment of proarrhythmic activity of chloroquine in in vivo and ex vivo rabbit models. *J Pharmacol Pharmacother* 2013;4:116-24
29. Sanchez-Chapula JA, Salinas-Stefanon E, Torres-Jacome J, Benavides-Haro DE, Navarro-Polanco RA. Blockade of currents by the antimalarial drug chloroquine in feline ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Apr;297(1):437-45