



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

CD38: rol en la electrofisiología cardíaca normal y en arritmias por isquemia y reperfusión

Tesis de Maestría en Ciencias Médicas

AUTORES/AS: Dr. Gonzalo Peluso

DIRECTOR/A: Prof. Adj. Dra. Paola Contreras

Montevideo, Marzo 2023.

2023

CD38: rol en la electrofisiología cardíaca normal y en arritmias por isquemia y reperfusión

TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
DR. GONZALO PELUSO
MONTEVIDEO, URUGUAY

DR. GONZALO PELUSO

CD38: rol en la electrofisiología cardíaca normal y en arritmias por isquemia y reperfusión.

DIRECTORA ACADÉMICA:
Paola Contreras, PhD.
Profesora Adjunta,
Departamento de Fisiología,
Facultad de Medicina, UdelaR

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es el resultado de más de 6 años de trabajo de investigación en ciencias básicas con el esfuerzo que eso conlleva. Fueron 6 años de mucho aprendizaje, no solo de fisiología cardiovascular, sino también de temas inherentes al desarrollo de un proyecto de investigación básica en nuestro medio. Antes de embarcarme en este viaje no conocía la cantidad de dificultades a las que me podía enfrentar, vinculadas fundamentalmente a factores técnicos y escasez de recursos. En efecto, en el transcurso del proyecto y durante el intercambio cultural en EEUU pude entender las enormes diferencias que nos separan de un sistema que está a la vanguardia en ciencias básicas. A pesar de tantas frustraciones fui logrando solucionar los problemas y hoy creo que todo esto le proporciona un enorme valor agregado al trabajo. Claro que en esto le debo mucho a un montón de gente que estuvo extendiendo una mano, un abrazo, un aliento, o simplemente una oreja para escuchar.

En primer lugar tengo que nombrar a Pao que además de su orientación académica y su confianza, estuvo siempre brindándome ánimo con su inalterable visión positiva de cada evento, aun cuando las cosas no salían nada bien. A Edith que con amor ocupó el papel de ayudante, compañera y abuela de todos los que compartíamos el laboratorio inspirándonos entre las memorias de sus años de lucha. A Pilar que me bancó la cabeza en los peores momentos y creyó en mí probablemente más de lo que yo creía. Y a los amigos que con cada cerveza y cada cargada íbamos compartiendo los pobres avances.

En el proceso de instalación y puesta a punto del nuevo set up en el laboratorio recibimos el apoyo del Prof. Michel Borde que nos prestó el estirador de micropipetas, y del Prof. Eduardo Migliaro que además de prestarnos instrumentos nos dio una mano enorme con la corrección del ruido de radiofrecuencia en los registros, un tema que no dejó de generarnos dolores de cabeza. La mención especial es al Dr. Ariel Escobar que nos ayudó en todas las etapas desde la instalación hasta el entrenamiento de la técnica y el uso de los softwares, nos cedió los dispositivos electrónicos que fueron necesarios y nos ilustró largamente en el área de la fisiología celular miocárdica.

Los experimentos con la cepa de ratones CD38KO fueron posible gracias a la donación de los mismos por el Dr. Carlos Escande, de quien además recibí sugerencias y recomendaciones en el proyecto.

El respaldo de la Comisión Académica del Posgrado, que me otorgó una beca para la realización de la maestría y otra para la finalización luego de justificada la extensión de la misma, fue fundamental. Creo que se trata de un apoyo económico de enorme valor para fomentar la ciencia de calidad en nuestro país.

Finalmente el agradecimiento al tribunal por el tiempo dedicado y las correcciones realizadas.

A todos ellos, y a los que me acompañaron en este camino muchas gracias!

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE	3
ABREVIATURAS	6
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	10
MARCO TEÓRICO	14
Anatomía cardíaca y sistema de conducción	14
Electrofisiología de las células miocárdicas	16
Corrientes iónicas de membrana	16
Uniones GAP	19
Morfología del PA	19
Miocardio de trabajo	20
Células nodales.	22
Diferencias entre el potencial de acción humano y murino	24
El electrocardiograma (ECG)	25
Componentes de un trazado normal del ECG	26
El calcio en la fisiología miocárdica.	27
Retículo sarcoplásmico	28
Receptor de Rianodina	28
Liberación de calcio inducida por calcio	28
Chispas y ondas de calcio	29
Proteínas reguladoras del RyR2	29
Bomba SERCA	30
Regulación por el sistema nervioso autónomo	31
Sistema nervioso simpático.	31
Enfermedad Cardiovascular	33
Muerte Súbita Cardíaca (MSC)	33
Cardiopatía isquémica	33
Isquemia aguda y arritmias	33
Mecanismo de las arritmias.	34
Insuficiencia cardíaca y arritmias	35
CD38	36
Estructura de CD38	37

Función de CD38	38
ADP ribosil cíclico como producto de CD38	39
Antecedentes de CD38 y ADPRc	40
Antecedentes sobre el papel de CD38/ADPRc fuera del sistema cardiovascular	41
Antecedentes del papel de CD38/ADPRc en el sistema cardiovascular	42
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	45
OBJETIVOS	47
Objetivo general	47
Objetivos específicos	47
MATERIALES Y MÉTODOS	49
Modelo biológico.	49
Registro de la actividad eléctrica cardíaca in vitro.	49
Eutanasia y disección	49
Técnica de Langendorff	49
Sistema de registro	51
Registro del electromiograma del corazón aislado	51
Registro de potencial de acción en corazón entero.	52
Dispositivo experimental	52
Sistema de estimulación	53
Blebistatina	53
Registro de la actividad eléctrica cardíaca in vivo.	54
Registro de ratones anestesiados.	54
SOBRE EL ROL DE CD38 EN EL POTENCIAL DE ACCIÓN	57
Objetivos (a y b)	58
Hipótesis	58
Experimento	58
Procesamiento de los datos	59
Resultados y discusión	60
Objetivos (c)	66
Hipótesis	66
Experimento	66
Procesamiento de los datos	67
Resultados y discusión	67
SOBRE EL ROL DE CD38 EN LA FRECUENCIA CARDÍACA Y LA SUCEPTIBILIDAD A ARRÍTMIAS POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN IN VITRO.	72
Objetivos	73

Hipótesis	73
Experimento 1	73
Procesamiento de los datos	74
Resultados y discusión	74
Experimento 2	78
Procesamiento de los datos	79
Resultados y discusión	79
SOBRE LA MANIFESTACIÓN ELECTROCARDIOGRÁFICA DE CD38 Y SU ROL EN MODELOS DE ARRITMIAS POR ISQUEMIA <i>IN VIVO</i>	85
Objetivos	86
Hipótesis	86
Experimento	86
Procesamiento de los datos	87
Resultados y discusión	88
CONCLUSIONES	99
BIBLOGRAFÍA	102

ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina

ADP: difosfato de adenosina

ADPR: ADP ribosa

ADPRc: ADP ribosil cíclico

AMPc: monofosfato de adenosina cíclico

APD: duración del potencial de acción (por su sigla en inglés: Action Potential Duration)

APD30: APD al 30% de la repolarización

APD90: APD al 90% de la repolarización

ATP: trifosfato de adenosina

CaM: calmodulina

CaMKII: calcio/calmodulina proteína quinasa II

[Ca⁺⁺]_i: concentración de calcio en el citosol

[Ca⁺⁺]_{RS}: concentración de calcio en el retículo sarcoplásmico

CCL: canales de calcio tipo L

CICR: liberación de calcio inducida por calcio (del inglés: calcium induced calcium release)

Cx: conexinas

ECG: electrocardiograma

FC: frecuencia cardíaca

FV: fibrilación ventricular

IP3: inositol trifosfato

KO: knock-out

NA: noradrenalina

NAADP: ácido nicotínico-adenina dinucleótido fosfato

NAD⁺: dinucleótido de nicotinamida-adenina

NAV: nódulo aurículo-ventricular

NCX: intercambiador sodio-calcio

PA: potencial de acción

PDM: potencial diastólico máximo

PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc

PKC: proteína quinasa dependiente de calcio

PLB: fosfolamban

RS: retículo sarcoplásmico

RyR2: receptor de rianodina tipo 2

SERCA: bomba de Ca⁺⁺ del retículo sarco-endoplásmico (por su sigla en inglés)

SNA: Sistema Nervioso Autónomo

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Parasimpático

SNS: Sistema Nervioso Simpático

TVM: Taquicardia Ventricular Monomórfica

TVP: Taquicardia Ventricular Polimórfica

WT: wild type (salvaje o silvestre)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Patrones de expresión de conexinas y velocidades de conducción en las diferentes regiones del corazón.
- Figura 2.** Actividad eléctrica en las distintas regiones del corazón.
- Figura 3.** Esquema de un potencial de acción con las corrientes iónicas subyacentes en un miocito ventricular humano adulto.
- Figura 4.** Esquema de un potencial de acción con las corrientes iónicas subyacentes en un miocito de nodo sinoauricular de conejo.
- Figura 5.** Diferencias en la actividad eléctrica del corazón humano y murino.
- Figura 6.** Vías de señalización de la estimulación adrenérgica
- Figura 7.** Función de NCX y manejo del calcio en la insuficiencia cardíaca.
- Figura 8.** Diferentes topologías de CD38 a nivel celular.
- Figura 9.** Esquema de las diferentes actividades catalíticas de CD38.
- Figura 10.** Fotografía de un corazón aislado de ratón.
- Figura11.** Registro de temperatura y electromiograma de corazón aislado de ratón.
- Figura12.** Dispositivos para realizar los experimentos de corazón aislado.
- Figura13.** Potencial de acción de corazón aislado.
- Figura 14.** Valores de duración del potencial de acción.
- Figura 15.** Cambios del potencial de acción ante el estímulo adrenérgico.
- Figura 16.** Duración del potencial de acción en el grupo WT y CD38KO en situación control y ante el estímulo adrenérgico.
- Figura 17.** Esquema que muestra una posible explicación para la respuesta diferente al isoproterenol de los corazones aislados de ratones CD38KO.
- Figura 18.** Cambios del potencial de acción dependientes de la frecuencia cardíaca.
- Figura 19.** Modificación del potencial de acción ante la inhibición aguda de CD38.
- Figura 20.** Aumento de la duración del potencial de acción por inhibición aguda de CD38.
- Figura 21.** Cambio de la frecuencia cardíaca del corazón aislado por isquemia.
- Figura 22.** Cambio de la frecuencia cardíaca al modificar la composición de la solución de perfusión.
- Figura 23.** Proporción de arritmias inducidas en corazones aislados de ratones WT y CD38KO.
- Figura 24.** Registros electrocardiográficos que muestran ejemplos de las arritmias inducidas en corazones aislados de ratones.
- Figura 25.** Registro electrocardiográfico promedio de un ratón para ejemplificar el procedimiento para cuantificar duración de ondas e intervalos.

Figura 26. Frecuencia cardíaca en función del tiempo en ratones anestesiados WT y CD38KO

Figura 27. Duración del complejo QRS en ratones anestesiados WT y CD38KO.

Figura 28. Incidencia de pausas sinusales en ratones WT y CD38KO.

Figura 29. Incidencia de extrasístoles ventriculares en ratones WT y CD38KO.

Figura 30. Mortalidad en ratones WT y CD38KO ante un estímulo adrenérgico suprafisiológico.

RESUMEN

Introducción: CD38 es una glicoproteína transmembrana de 300 aminoácidos y 45 kDa expresada de forma ubicua en el organismo que cumple importantes funciones en el metabolismo del cofactor NAD^+ y en la regulación del movimiento del calcio celular. Uno de los productos enzimáticos de CD38 es el adenosín difosfato ribosa cíclico o ADP-ribosil cíclico (ADPRc), que actúa como segundo mensajero sensibilizando la liberación de calcio inducida por calcio (CICR por su sigla en inglés). En las últimas 3 décadas se han hecho esfuerzos en la investigación del papel de esta enzima en el sistema cardiovascular, sin embargo aún resta mucho por saber.

Antecedentes: Los primeros estudios sobre el papel de CD38/ADPRc a nivel miocárdico mostraron un efecto potenciador del transitorio del calcio por parte del ADPRc. Además se ha descrito un papel arritmogénico utilizando distintas técnicas tanto en modelos reduccionistas como en organismos de mamíferos *in vivo*. Entre ellos se encuentran modelos de ratones *Knock Out* para CD38 (CD38KO). La enzima forma parte de la vía de señalización adrenérgica a través de la producción de ADPRc, y se ha vinculado también a procesos patológicos relacionados con hipertrofia ventricular e isquemia miocárdica. Por ejemplo, la inhibición de la actividad de CD38 protegería al corazón contra la injuria por isquemia y reperfusión (I-R) *in vivo* e *in vitro*, disminuyendo el área de infarto. Nuestro grupo ha estado estudiando el rol de CD38 en la actividad cardíaca. Hemos reportado alteraciones en el manejo del Ca^{++} en miocitos ventriculares aislados de ratones CD38KO, y, en ratones CD38KO *in vivo*, menor frecuencia cardíaca (FC), marcada variabilidad de la FC, así como menor incidencia de arritmias ventriculares ante un estímulo suprafisiológico de cafeína/adrenalina. No obstante, no se ha investigado su papel en las arritmias por isquemia y reperfusión (I-R) teniendo en cuenta la conocida sobrecarga celular de calcio en este contexto y sabiendo que es la principal causa de muerte súbita en la población general. Tampoco sabemos cómo contribuye a la electrofisiología miocárdica en condiciones fisiológicas, específicamente a la morfología del potencial de acción miocárdico (PA) o a la morfología del trazado electrocardiográfico (ECG).

Objetivo: Analizar el papel de CD38 en la actividad eléctrica miocárdica estudiando desde el PA celular hasta el ECG de superficie y su posible impacto en arritmias ventriculares producidas por isquemia y reperfusión.

Estrategia: Para el desarrollo de la tesis trabajé con modelos de ratones salvajes (*wild type*, WT) y CD38KO tanto *in vivo* como *in vitro*. Estudié el corazón aislado y perfundido mediante el sistema Langendorff realizando registro extracelular (EMG) e intracelular (potencial de acción, PA). Realicé una caracterización de la morfología del PA midiendo la duración al 30% (APD_{30}) y al 90% (APD_{90}) de la repolarización. Comparé entre las cepas WT y CD38KO con y sin estímulo adrenérgico y en la cepa WT

entre estado control y ante la inhibición de CD38 con 78c, un fármaco inhibidor de la actividad enzimática de CD38. Para comparar el potencial arritmogénico de los corazones de ambas cepas a la injuria provocada por I-R registré la actividad eléctrica espontánea mediante EMG, en condiciones basales, durante isquemia global y reperfusión. En el modelo *in vivo* analicé el ECG de ratones WT y CD38KO anestesiados y comparé la actividad basal y la respuesta arrítmica ante un modelo de infarto de miocardio por sobrecarga adrenérgica con isoproterenol.

Resultados y discusión: Describí por primera vez la morfología del PA en la cepa CD38KO y no fue distinta a la de los ratones salvajes en condiciones basales. Esta falta de diferencias podría deberse a compensaciones fisiológicas que ocurren ante la carencia de la enzima como el aumento en la expresión de la bomba SERCA2a. Por lo contrario, cuando sometí el preparado a un desequilibrio homeostático estimulando con un agonista beta adrenérgico, la APD₉₀ de los corazones CD38KO no disminuyó como la de los WT. En concordancia, la inhibición aguda de CD38 en el PA miocárdico de corazones WT perfundidos con 78c aumentó la APD₉₀ significativamente sin cambios en el APD₃₀. Cuando sometí a los corazones CD38KO aislados a un medio arritmogénico con alto contenido de calcio y bajo en potasio, la FC en estos no aumentó a diferencia de lo que ocurrió marcadamente en los WT. La respuesta arrítmica ante la isquemia global en el corazón aislado no fue menor en la cepa CD38KO a diferencia de lo esperado, mostrando una incidencia de 57 % en los WT y 75 % en los CD38KO (valor $p = 0.61$). En el modelo *in vivo* describí por primera vez el trazado electrocardiográfico (DII) de animales carentes de CD38. No hubo diferencias en la FC, intervalo PR, intervalo QT, amplitud de onda S, ni amplitud de onda T. Sin embargo la duración del QRS fue menor, mientras que la amplitud de la onda R fue mayor en los ratones CD38KO, probablemente secundario a una mayor velocidad de conducción. Estas diferencias se perdieron en la etapa aguda de la isquemia por sobrecarga adrenérgica. En la cepa CD38KO como era esperado vi mayor proporción de pausas sinusales, que se hicieron más evidentes ante la injuria por isoproterenol, lo que podría estar evidenciando una mayor refractariedad del CICR por disminución del contenido de calcio reticular. No se demostró la protección ante arritmias generadas por isquemia en la cepa CD38KO ya que el incremento de la carga arrítmica fue similar en ambas cepas. No hubo diferencias significativas en la proporción de ratones afectados ni en la suma total de extrasístoles ventriculares registradas pero la mortalidad que generó la sobrecarga adrenérgica en el grupo WT fue de 1/3 mientras que la totalidad de los ratones CD38KO sobrevivieron.

Conclusiones: En esta tesis presento una caracterización electrofisiológica de CD38 desde el PA en corazón entero hasta la manifestación electrocardiográfica de superficie, con una evaluación especial de su papel en arritmias por I-R y desarrollando técnicas innovadoras a nivel nacional. Las principales conclusiones son:

- CD38 contribuye a la repolarización tardía disminuyendo el APD₉₀.
- La ausencia de la enzima evita el aumento de la FC en un medio arritmogénico con sobrecarga de Ca⁺⁺.
- CD38 contribuye con un enlentecimiento en la velocidad de conducción miocárdica manifiesta en un descenso de la duración y aumento del voltaje del QRS en los corazones de ratones que no expresan CD38. La delección de CD38 genera un aumento marcado de pausas sinusales ante la isquemia.
- No hay evidencia de una protección ante arritmias malignas por I-R *in vitro* mediante la delección de CD38.
- No se vio una contribución de CD38 a arritmias malignas por isquemia *in vivo* aunque la ausencia de la enzima parece mejorar el perfil de supervivencia.

INTRODUCCIÓN

MARCO TEÓRICO

Anatomía cardíaca y sistema de conducción

El corazón es un órgano ubicado en la cavidad torácica envuelto en su mayor parte por una serosa denominada pericardio. En los mamíferos se pueden distinguir 4 cavidades (aurículas derecha e izquierda y ventrículos derecho e izquierdo), conectadas en dos circuitos en paralelo; el pulmonar y el sistémico. Estructuralmente se distinguen 3 capas; el endocardio, el miocardio y el epicardio. El miocardio, es la estructura que conlleva el trabajo más importante del órgano. Está compuesto esencialmente por músculo cardíaco lo que permite la función de bomba. A su vez al miocardio se lo puede dividir en dos tipos de acuerdo a sus propiedades fisiológicas. El miocardio específico, encargado de la génesis de la actividad eléctrica marcapaso y de la conducción y distribución de los impulsos eléctricos a altas velocidades, y el miocardio inespecífico o miocardio de trabajo cuya propiedad fundamental es la contracción o trabajo mecánico. Las células de ambos tipos de miocardio están fuertemente acopladas de forma mecánica, eléctrica y química mediante las uniones en hendidura (o uniones GAP) formadas por conexinas (Cx), lo que le permite actuar como un sincitio funcional.

La irrigación de todas las estructuras se logra a través de las arterias coronarias que se originan en los senos de Valsalva de la raíz aórtica. Desde allí parten la arteria coronaria izquierda y la arteria coronaria derecha que mediante sus ramificaciones se distribuyen a lo largo de todas las caras del corazón. La sangre venosa coronaria drena finalmente en la aurícula derecha a través del seno coronario.

El miocardio específico tiene como propiedad fundamental el automatismo, o capacidad de generar potenciales de acción en ausencia de estímulos externos. Se lo puede dividir en 3 grandes estructuras: el nodo sinusal (NS), el nodo aurículo-ventricular (NAV) y el sistema His-Purkinje.

El NS es una estructura compleja, descrita por primera vez en 1907 por Keith y Flack en pequeños mamíferos, ubicada en el techo de la aurícula derecha en su unión con la vena cava superior, y como se verá más adelante, es el encargado de la actividad marcapaso de todo el corazón. Esta estructura está compuesta por células marcapaso inmersas en una matriz fibrosa de tejido conectivo, capilares sanguíneos y terminaciones nerviosas. La conducción intranodal es lenta debido al tipo de Cx que presentan sus células, las que a la vez le da una tinción inmunohistoquímica particular⁽¹⁾.

La inervación autonómica del NS es la más abundante del corazón y regula la frecuencia de descarga a este nivel y por tanto la frecuencia cardíaca (FC). La división simpática genera aumento del cronotropismo actuando mediante la liberación de noradrenalina (NA) mientras que la división

parasimpática genera disminución del cronotropismo actuando mediante la liberación de acetilcolina (ACh). Los mecanismos de acción involucrados en estos fenómenos se detallarán más adelante.

El NS conecta con el miocardio auricular y el impulso eléctrico se desplaza hacia el NAV a alta velocidad a través de los haces internodales. El NAV, ubicado en el septum basal de la aurícula derecha, por detrás del anillo tricuspídeo y delimitado por el triángulo de Koch, presenta una zona compacta central cuyas características electrofisiológicas son similares a las del NS. Es decir, como se describe más abajo, la capacidad de automatismo, una morfología particular del potencial de acción (PA) de sus células y la conducción intranodal lenta. Esto genera un retraso en la conducción del impulso eléctrico a los ventrículos, lo que permite una activación y contracción secuencial de las cámaras auriculares y ventriculares y así un correcto llenado diastólico tardío ventricular.

El impulso eléctrico es finalmente transmitido a alta velocidad (aproximadamente 2 m/s) al resto del miocardio ventricular a través del sistema His-Purkinje desde el subendocardio (la porción más interna del espesor miocárdico) conectando con el miocardio de trabajo (figura 1). Vale destacar que el acople eléctrico, químico y mecánico entre los miocardiocitos por medio de las uniones GAP, formadas mayormente por Cx43, establecen un sincitio funcional que permite, entre otras cosas, la activación sincrónica de ambos ventrículos⁽¹⁾.

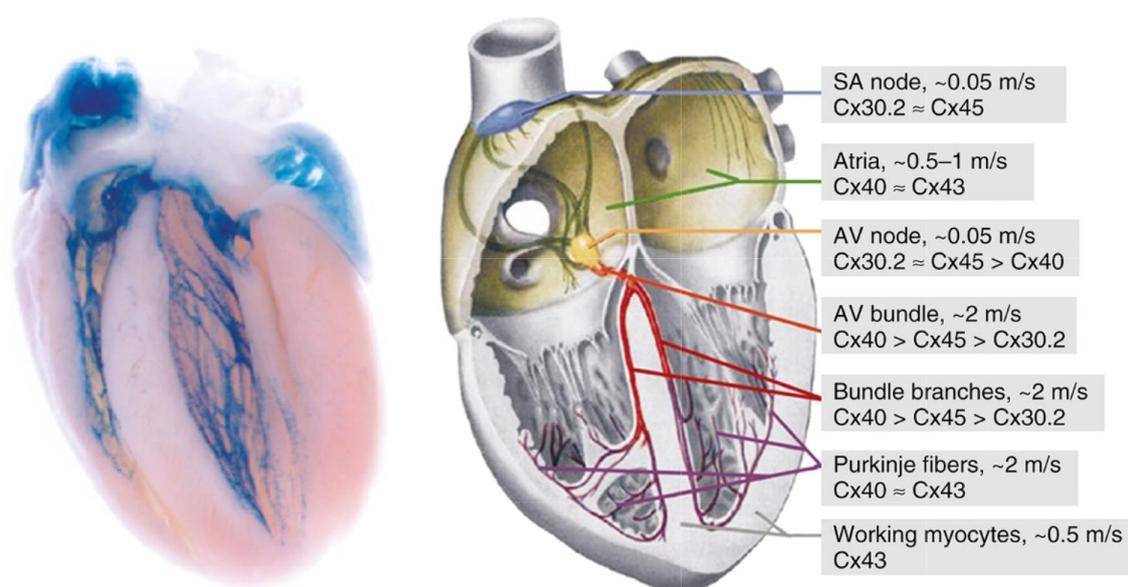


Figura 1. Patrones de expresión de conexinas y velocidades de conducción en las diferentes regiones del corazón. A la izquierda, corazón de ratón con tinción del sistema de conducción cardíaco. A la derecha, una representación del corazón humano mostrando los patrones de expresión de conexinas y velocidades de conducción en las diferentes regiones. Modificado de ⁽¹⁾

Electrofisiología de las células miocárdicas

Dado que todo el miocardio específico tiene la propiedad de automatismo, el impulso eléctrico puede potencialmente originarse en cualquier sector del mismo y transmitirse al resto del tejido miocárdico. De esta manera, el grupo celular que presente mayor frecuencia de descarga será el que comande toda la actividad eléctrica. En condiciones normales la estructura que toma este papel es el NS, encabezando un sistema jerárquico en el que la frecuencia de descarga disminuye conforme progresa distalmente el sistema de conducción, por lo que las estructuras con menor frecuencia de descarga espontánea son las fibras de Purkinje.

La fisiología celular en cada una de las estructuras no es exactamente la misma, al punto que cambia la morfología del PA en los distintos sectores del miocardio.

Corrientes iónicas de membrana

En la actividad eléctrica de todo tejido excitable subyace la capacidad de generar corrientes iónicas y capacitivas a través de la membrana celular. Las células miocárdicas no escapan a este principio y cuentan con una serie de proteínas transmembrana entre las que se encuentran canales iónicos y proteínas transportadoras que conforman un complejo mecanismo para la formación del PA.

- If

La corriente *funny* (If) adquiere su nombre por la particularidad o “rareza” de ser una corriente iónica que se activa ante la hiperpolarización celular. Es así que la conductancia aumenta cuando el potencial de membrana se negativiza a valores entre -50 y -65 mV. Se trata de una corriente entrante catiónica no selectiva que involucra la movilización de Na⁺ y K⁺ a través de los canales HCN. Inicialmente se consideraba que el rol de If era de protección ante la bradicardia generada por hiperpolarización extrema. Posteriormente el paradigma cambió y pasó a considerarse la “corriente marcapaso” responsable totalmente del automatismo normal. Actualmente el paradigma vuelve a sus orígenes y se la considera una más de las corrientes involucradas en el automatismo, sabiendo que su rol es tanto más importante cuanto más bradicárdicas estén las células nodales⁽¹⁾.

- INa

Se trata de una corriente que inicia el potencial de acción en miocardiocitos, nervios y otros tejidos excitables. La velocidad de conducción está directamente relacionada con la densidad de los canales correspondientes. Sin embargo, no está presente en las células nodales (zona compacta del NS ni NAV). En el resto del tejido cardíaco la corriente se establece a través de los canales Nav 1.5 constituyendo los canales iónicos de mayor densidad. La apertura dependiente de voltaje permite una conductancia amplia pero de corta duración ya que presentan una rápida inactivación dependiente de voltaje (IDV)⁽¹⁾.

- I_{CaL}

La corriente de calcio tipo L o “*long lasting*” (I_{CaL}) es una corriente presente de forma ubicua en todo el miocardio. En las células marcapaso nodales, que no presentan I_{Na}, es responsable casi enteramente de la fase 0 del PA. Su activación es dependiente del potencial, con un umbral de -40 mV y con una cinética de activación e inactivación lenta (de ahí su nombre). En el tejido miocárdico genera una corriente entrante de Ca⁺⁺ a través de los canales CaV 1.2 (la más abundante en el tejido miocárdico) y CaV 1.3 (limitada a las células del NS y NAV), también conocidos como canales de calcio tipo L (CCL). Luego de la activación, esta corriente sufre IDV afectada por fosforilación de proteína quinasa A (PKA, por ser dependiente de AMPc, es decir del monofosfato de adenosina cíclico) e inactivación dependiente de Ca⁺⁺ (IDC) vía unión del Ca⁺⁺ a la Calmodulina (CaM). La importancia de la IDC radica en la protección que le confiere al miocito ante la sobrecarga de calcio, que puede provocar arritmias gatilladas por posdespolarizaciones tempranas y tardías (EAD y DAD respectivamente, por sus siglas en inglés). Cabe resaltar la importancia fisiológica de los canales CaV 1.2 en base a la observación de que la delección de esta proteína en ratones es letal en la vida embrionaria⁽¹⁾.

- I_{CaT}

La corriente de calcio tipo T o “*transient*” presenta cinéticas de activación e inactivación más rápidas o transitorias que la de tipo L, de ahí su nombre. Los canales principales responsables de esta corriente en adultos son los CaV 3.1 y estos se encuentran mayoritariamente en el sistema de conducción. La activación de esta corriente se da a potenciales relativamente hiperpolarizados (-70 mV) por lo que contribuye en mayor medida a la despolarización diastólica temprana. La magnitud de la corriente es relativamente menor a la de I_{CaL} y no presenta IDC⁽¹⁾.

- I_K (*delayed rectifiers*)

Existe una amplia variedad de corrientes de potasio, con una distribución heterogénea de acuerdo al sector de miocardio analizado. En general, las corrientes de K⁺ son salientes, por lo que la apertura de los canales involucrados tenderá a la repolarización o hiperpolarización mientras que el cierre generará despolarización.

A las corrientes I_K también se las denomina rectificadoras tardías y la activación y apertura es gatillada por voltaje. En el miocardio humano se encuentran 3 subtipos que son I_{Kur} (ultra rapid), I_{Kr} (rapid), e I_{Ks} (slow) denominadas así de acuerdo a la velocidad de activación. La I_{Kur} se encuentra en mayor medida en miocardiocitos auriculares lo que está asociado a la relativa corta duración del PA (APD, por su sigla en inglés). Tanto I_{Kr} como I_{Ks} juegan un rol clave en las fases 2 y 3 del PA y la lenta desactivación mantiene elevada la conductancia al potasio en la fase 3 tardía y contribuye a la refractariedad efectiva que minimiza los sustratos arritmogénicos como las posdespolarizaciones⁽¹⁾ (véase más abajo *Mecanismo de las arritmias*).

- Ito

Esta corriente de potasio también denominada transient outward (transitoria saliente) se trata de una corriente de activación rápida dependiente de voltaje y contribuye ampliamente a la repolarización temprana observada en la fase 1 del PA por lo que no está involucrada en los potenciales de acción de las células nodales. La estimulación alfa adrenérgica causa reducción de Ito por vías dependientes e independientes de PKC (proteína quinasa C)⁽¹⁾.

- IKir

Se trata de corrientes de K⁺ denominadas inward rectifiers (rectificadoras hacia adentro a pesar que las corrientes son de salida), de manera que la conductancia de los canales de K⁺ involucrados aumenta cuando la membrana se hiperpolariza pero disminuye cuando se despolariza. Este fenómeno evita la pérdida excesiva de K⁺ durante la fase de meseta del PA al tiempo que brinda estabilidad al potencial de membrana en reposo. Existen asimismo 3 subtipos bien establecidos de estas corrientes; la clásica (IK1), la activada por ACh (IKACH) y la sensible a ATP (IKATP).

IK1 mediada por los canales Kir2 es particularmente predominante en los miocardiocitos ventriculares y las fibras de Purkinje, mientras que es escasa en las células del NS. El Ca⁺⁺ intracelular durante el PA bloquea esta corriente. La corriente IKACH mediada por los canales Kir3 es activada por ACh y adenosina que se unen a los receptores acoplados a proteína G colinérgicos muscarínicos (M2) y purinérgicos (P1) respectivamente. Esto permite la apertura de los canales con la corriente saliente e hiperpolarización consecuente de la membrana celular. Se encuentran expresados con gran densidad en las células nodales. La IKATP es mediada por los canales Kir6. Son inhibidos por ATP intracelular por unión directa. Por el contrario, en presencia de Mg⁺⁺ el ADP estimula la apertura, de manera que en la isquemia contribuye al acortamiento del PA dada la relación ATP/ADP. El mecanismo de rectificación hacia adentro es el mismo en todos los canales e implica la oclusión del poro por la movilización dependiente de voltaje de cationes como el Mg⁺⁺ y poliaminas⁽¹⁾.

- INCX

Esta corriente es generada por el intercambiador Na⁺/Ca⁺⁺ (NCX) y es el principal mecanismo de extrusión del calcio citoplasmático al exterior celular. Se trata de una proteína transmembrana dependiente de voltaje que intercambia Na⁺ por Ca⁺⁺ y la dirección del mismo depende tanto del potencial de membrana como de la concentración relativa de los iones dentro y fuera de la célula. Dado que la relación de intercambio es de 1 ion Ca⁺⁺ por cada 3 iones Na⁺, es evidentemente una proteína electrogénica que genera una importante corriente de entrada cuando funciona en el modo habitual. Como se verá más adelante, tiene un papel fundamental en la interacción entre los relojes de membrana y de calcio en las células marcapasos⁽¹⁾.

- Bomba Na⁺/K⁺

La bomba Na^+/K^+ , presente de forma ubicua en el organismo, genera una corriente saliente al movilizar hacia el interior celular 2 iones K^+ por cada 3 iones Na^+ hacia el exterior.

Es evidente el importante papel que juega en la homeostasis celular en las células excitables, ya que permite el restablecimiento tanto del potencial de membrana en reposo como de la composición iónica en el compartimiento intra y extracelular en cada PA⁽¹⁾.

Uniones GAP

La propagación del PA a lo largo del miocardio de trabajo es posible tanto por la presencia de los canales iónicos activados por voltaje como por la conexión celular mediante las uniones GAP, que son vías de baja resistencia del sincitio funcional además de dar soporte estructural.

Las uniones GAP conforman canales en la membrana celular predominantemente en los discos intercalares. Cada una está constituida por dos hemicanales, uno en cada célula interconectada. Los hemicanales (o conexones) a su vez están conformados por seis Cx. Cada unión GAP permite no solo el pasaje de iones de una célula a otra, sino también de pequeños solutos como el AMPc por lo que están involucradas tanto en la resistencia intercelular y la velocidad de conducción del PA como en la comunicación metabólica del sincitio.

El corazón expresa diversos tipos de conexinas, la Cx43, Cx40, Cx45, Cx46 y Cx37. La distribución de las mismas no es uniforme en todo el miocardio. Por ejemplo, la Cx43 es la predominante a nivel ventricular mientras que apenas se expresa en las células nodales. A nivel nodal predominan la Cx45 y en menor medida la Cx40 (figura 1).

No todos los canales están simultáneamente activos y la conductancia a través de ellos puede cambiar en distintas situaciones fisiológicas lo que puede acelerar, enlentecer o incluso bloquear la propagación del PA. Es conocido que el pH celular y la $[\text{Ca}^{++}]_i$ pueden afectar la conductancia a través de las uniones GAP. El pH ácido, que se ve por ejemplo en la isquemia, reduce la conductancia mientras que la $[\text{Ca}^{++}]_i$ elevada (500 nM- 1 μ M) reduce el número de Cx43 funcionantes. Esto último no ocurre con la Cx40. Además, la conductancia también está influenciada por el voltaje transunional y por la fosforilación de las Cx⁽¹⁾.

Morfología del PA

Como se ve en la figura 2 el potencial de acción celular no es exactamente igual en todas las células miocárdicas y su heterogeneidad radica en la diversidad de corrientes iónicas y otras propiedades electrofisiológicas a lo largo de toda su estructura. Sin embargo, una característica común es su representación en 4 fases. Dado que la mayor divergencia electrofisiológica se da entre las células nodales y el resto de los miocitos, la descripción de tales potenciales se hará por separado.

Miocardio de trabajo

La **fase 4** del PA de miocardiocito inespecífico exhibe un potencial de membrana en reposo estable (figura 3), y este es más negativo (≈ -85 mV) que el potencial diastólico máximo (PDM) de las células nodales. Esta diferencia se establece por la presencia de la corriente IKir, (especialmente IK1) y la ausencia de If.

La **fase 0**, de ascenso rápido del potencial, está dominada por INa, siendo una corriente entrante masiva de mayor magnitud que ICaL lo que le confiere la mayor velocidad de despolarización respecto a las células nodales.

A la fase 0 le sigue la **fase 1** que no está presente en las células nodales. Es una fase de repolarización rápida en la que existe una corriente saliente de K⁺ (Ito) de breve duración.

Al igual que la **fase 2** de las células nodales, en las células ventriculares, la fase 2, llamada fase de meseta, está determinada por el balance entre corrientes entrantes a través de NCX y CCL y salientes como son las corrientes IK. Sin embargo, la duración de esta fase es algo mayor en las células ventriculares.

Finalmente, en la **fase 3** se establece el predominio de la corriente saliente a través de los canales de K⁺ (IK, *delayed rectifiers* e IK1, *inward rectifiers*) facilitados por la disminución de Ca⁺⁺ citosólico recapturado hacia el retículo sarcoplásmico (RS), disminución de la INCX y desactivación de ICaL. Todo esto genera la repolarización a potenciales de membrana en reposo (figura 3).

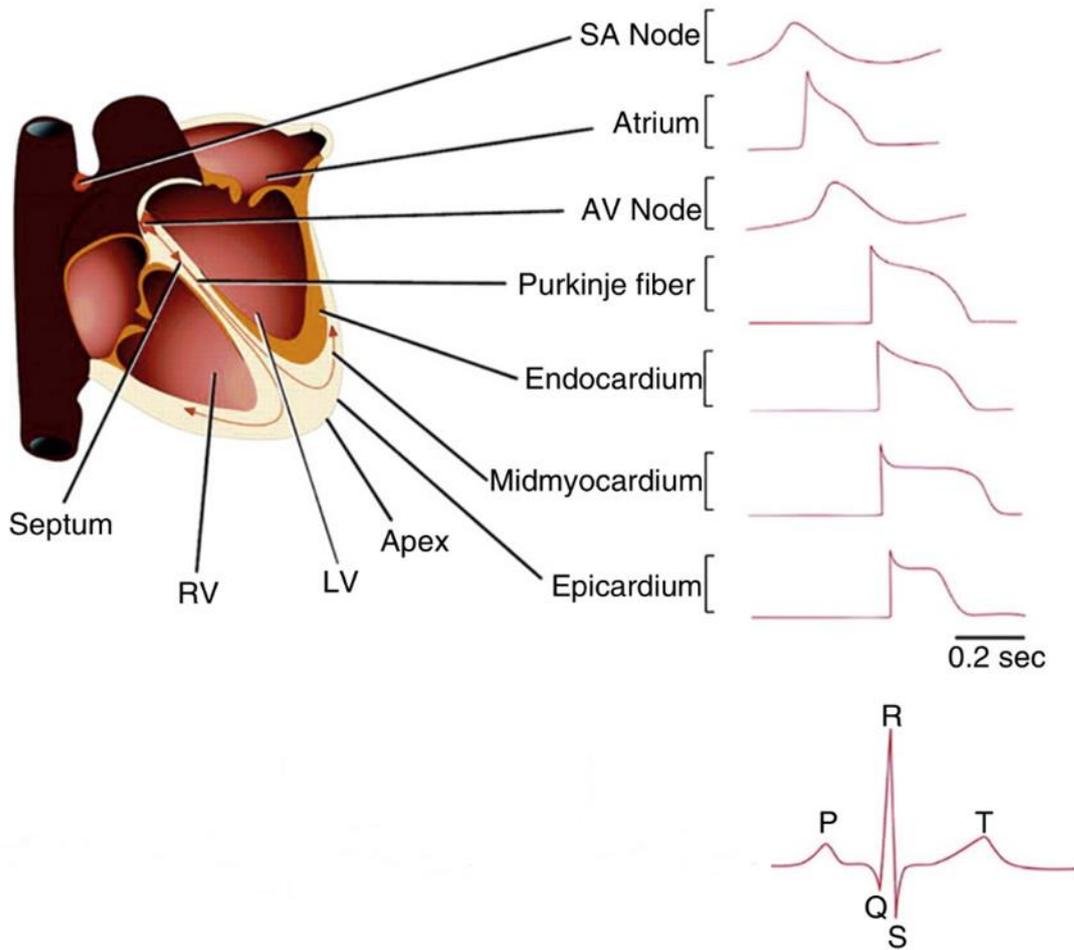


Figura 2. Actividad eléctrica en las distintas regiones del corazón. Se esquematiza un corazón humano con las diferentes regiones y los potenciales de acción representativos de cada una de ellas. En el panel inferior se esquematiza un registro de electrocardiograma de superficie con las ondas P, Q, R, S y T indicadas en correlación temporal con los potenciales de acción. RV: ventrículo derecho (right ventricle), LV: ventrículo izquierdo (left ventricle). Modificado de ⁽¹⁾

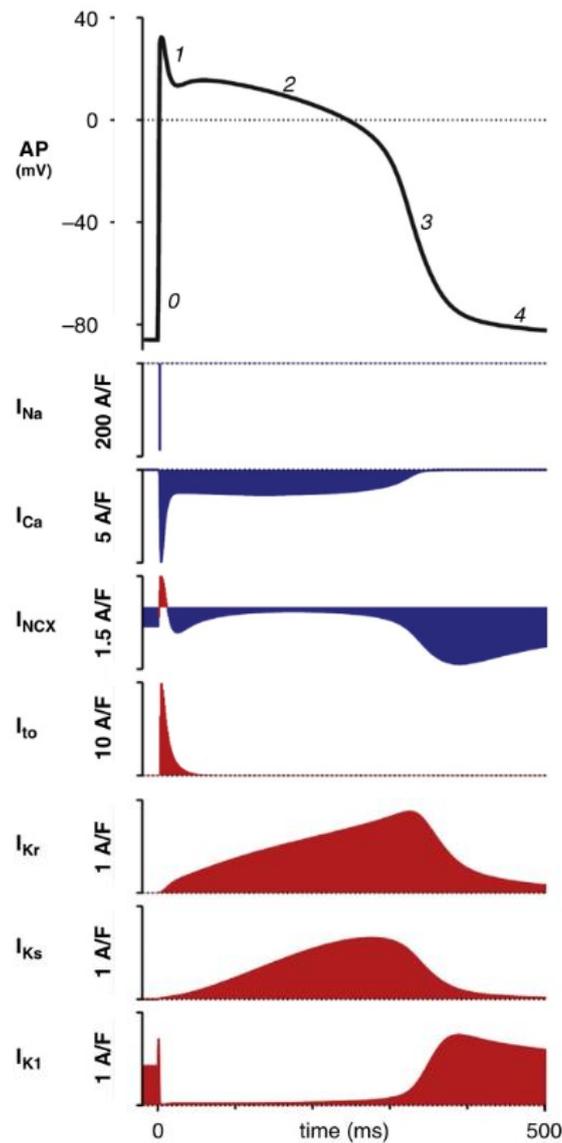


Figura 3. Esquema de un potencial de acción con las corrientes iónicas subyacentes en un miocito ventricular humano adulto. Modificado de ⁽¹⁾

Células nodales.

La **fase 4** del PA nodal (también llamado potencial marcapaso) presenta quizás la característica más importante de estas células. Se trata de la ausencia de un potencial de membrana en reposo, sino que por el contrario presentan un PDM (aproximadamente -60 mV) a partir del cual se instala una despolarización espontánea (figura 4). En esta fase radica la génesis de la actividad marcapaso que se describe más adelante.

La **fase 0** se inicia en el momento en que se abren los CCL (-40 mV), lo que determina una corriente entrante masiva y como consecuencia una marcada y rápida elevación del PA (figura 4). Como las células nodales no cuentan con INa, la fase 0 es algo más lenta en estas células.

La repolarización comienza en la **fase 2** ya que las células nodales no presentan la fase 1 de repolarización rápida. Esta fase es breve, y se caracteriza por el equilibrio entre corrientes entrantes representadas por I_{CaL} e INCX y corrientes salientes representadas por las corrientes de K rectificadoras tardías.

A continuación, la **fase 3** evidencia una repolarización marcada producto del cese de las corrientes entrantes dada la desactivación de los CCL y la extrusión del Ca²⁺ hacia el exterior celular. Esto establece una predominancia de las corrientes salientes de K⁺ cuyos canales, de lenta desactivación, aún permanecen permeables.

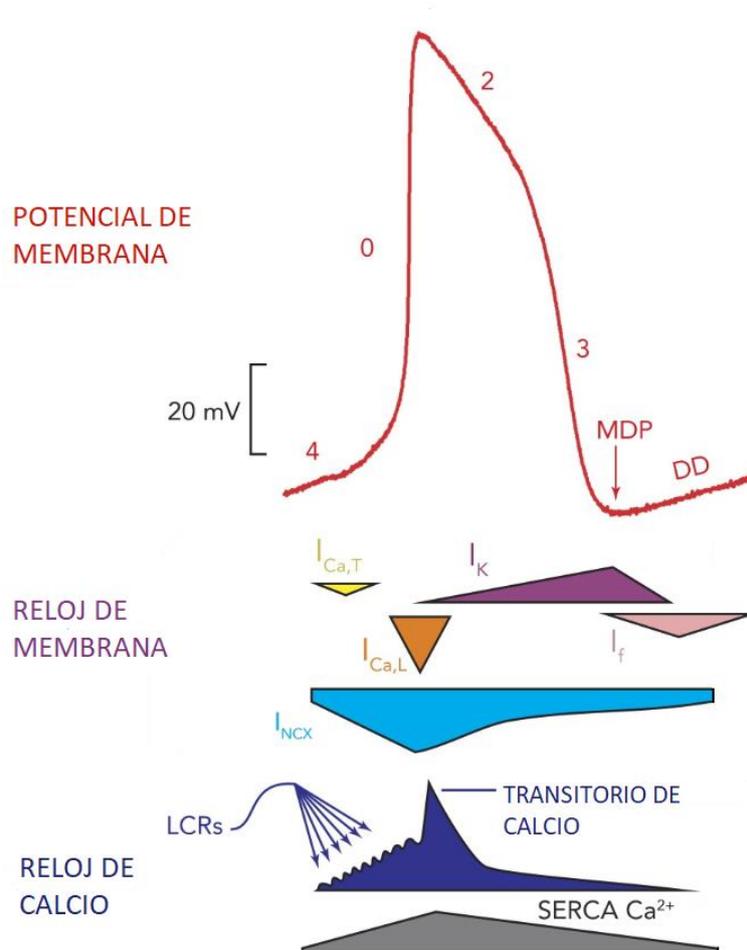


Figura 4. Esquema de un potencial de acción con las corrientes iónicas subyacentes en un miocito de nodo sinoauricular de conejo. MDP: potencial diastólico máximo, DD, despolarización diastólica, LCR: liberación local de calcio. Modificado de ⁽⁷⁶⁾

Diferencias entre el potencial de acción humano y murino

Si bien los fenómenos eléctricos y mecánicos son en gran medida similares en todos los mamíferos de experimentación, existen pequeñas diferencias entre el humano y el ratón que merecen ser destacadas (figura 5).

En primer lugar, debe mencionarse que la FC del ratón es aproximadamente 10 veces superior a la del ser humano. Es decir, la duración del ciclo cardíaco es 10 veces más corto en el ratón lo que afecta directamente a cada uno de sus componentes. Así, por ejemplo, en el PA murino, el tiempo que el miocardiocito permanece despolarizado (entre el inicio de la fase 0 y el final de la fase 3) es de aproximadamente unos 100-120 ms y en el ser humano es de aproximadamente unos 300-400 ms dependiendo de la zona ventricular que se esté estudiando.

Por otro lado, la fase 1 es mucho más pronunciada en el PA murino que en el del humano. Esto determina que la fase 2 y 3 transcurran a potenciales menos despolarizados en el ratón. La causa de esto es una corriente I_{Kur} marcada en ratones mientras que está ausente en miocardiocitos ventriculares del humano. Además, la I_{to} también es más grande en el ratón. Por el contrario, I_{K1} contribuye menos a la repolarización en los murinos que en el humano⁽²⁾ (figura 5).

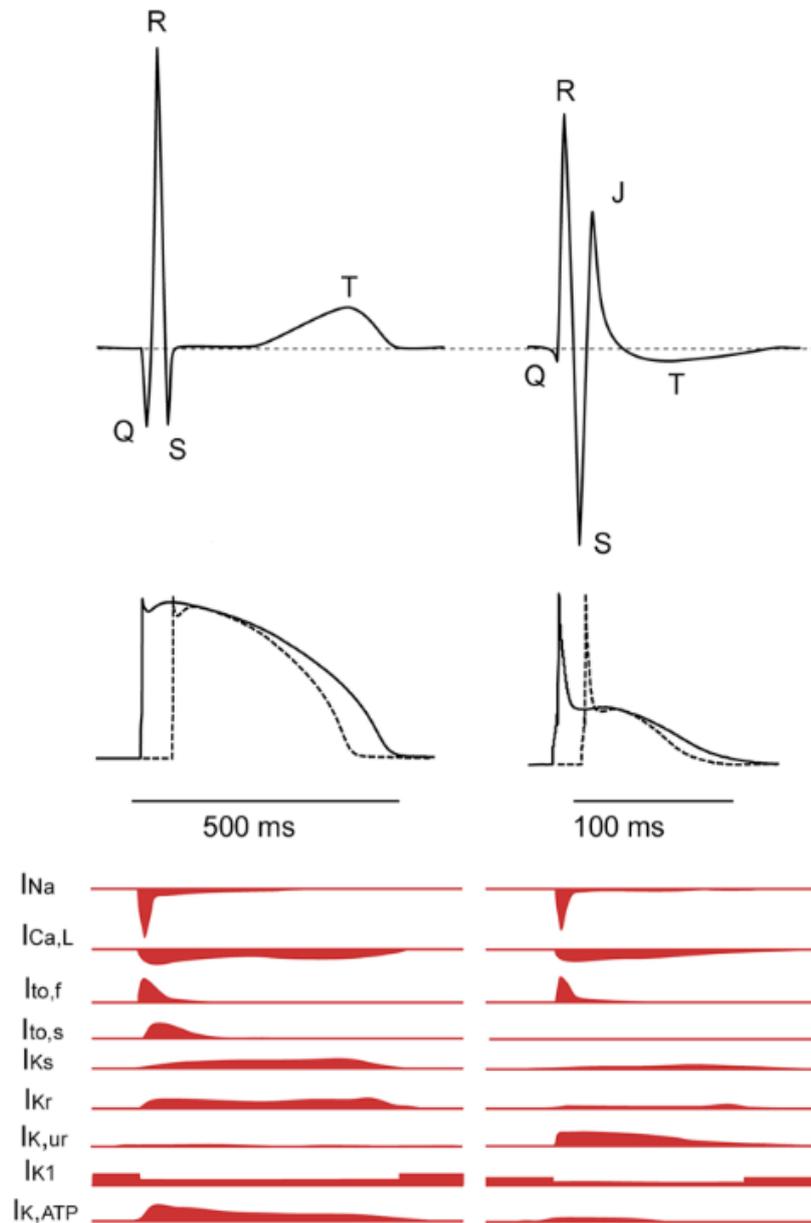


Figura 5. Diferencias en la actividad eléctrica del corazón humano y murino. En todos los casos lo que se muestra a la izquierda corresponde al ser humano y a la derecha, al ratón. Arriba: Representación esquemática del ECG humano y murino. Medio: Potenciales de acción esquemáticos representativos del miocardio activado más tempranamente (línea continua) y más tardíamente (línea punteada) en ambas especies. Abajo: Representación esquemática de las diferentes corrientes subyacentes al potencial de acción en humanos y ratones. Modificado de ⁽²⁾

El electrocardiograma (ECG)

La actividad eléctrica cardíaca es posible de ser registrada de distintas formas. Por lo general se hace mediante electrodos conectados a sistemas de amplificación, aunque también se puede realizar mediante sistemas ópticos con colorantes sensibles a los cambios de voltaje. Dentro de los métodos

más habituales en la práctica clínica se encuentran los registros endocavitarios con electrodos monopolares o multipolares, registros con electrodos intraesofágicos y registros desde la superficie corporal. Un ejemplo de este último tipo es el electrocardiograma (ECG) que se define como un registro organizado y sistematizado de la actividad eléctrica cardíaca mediante 12 derivaciones colocadas en la superficie corporal. Al día de hoy no existe herramienta paraclínica que sea tan usada en la asistencia sanitaria intra y extrahospitalaria como el ECG, permitiendo el diagnóstico y manejo de una amplia variedad de enfermedades cardíacas y no cardíacas, así como también otorgando un aporte sustancial en el ámbito de la investigación tanto básica como clínica.

La historia del ECG se remonta a principios del siglo XX cuando Willem Einthoven desarrolló un sistema de registro de actividad eléctrica desde la superficie corporal mediante derivaciones bipolares conformadas por electrodos colocados en los miembros del paciente, aporte que le valió un Premio Nobel. Esas 3 derivaciones conocidas como DI, DII y DIII conforman un triángulo equilátero conocido como triángulo de Einthoven. Posteriormente se agregaron 3 derivaciones monopolares en el plano frontal, conocidas como aVL, aVR y aVF y 6 derivaciones monopolares en el plano transversal (V1-V6) que conformaron finalmente el ECG estándar de 12 derivaciones. De esta manera, usando al tórax como conductor volumétrico y a los miembros superiores e inferiores como conductores lineales, es posible medir desde la superficie corporal la actividad eléctrica cardíaca en las 3 dimensiones.

Componentes de un trazado normal del ECG

El ciclo cardíaco (o ciclo de Lewis) comprende una serie de fenómenos eléctricos, mecánicos y hemodinámicos necesarios para el correcto bombeo de sangre al sistema circulatorio. La actividad eléctrica del corazón es parte de ello y típicamente en el trazado electrocardiográfico se describen una serie de ondas y segmentos que van desde el origen del impulso eléctrico desde el NS hasta la repolarización ventricular para finalizar el ciclo. Estos componentes están presentes tanto en el ser humano como en la mayoría de los mamíferos de experimentación comúnmente usados en el laboratorio. Cada uno de ellos se corresponde perfectamente con la actividad eléctrica en distintos sectores y células del miocardio como se ve en la figura 2.

El primer componente del trazado es la **onda P** que representa la despolarización auricular. Dado que el origen de la despolarización normal es el NS, el vector promedio de la actividad eléctrica se dirige desde arriba hacia abajo, desde atrás hacia adelante y de derecha a izquierda. Por tanto, la primera aurícula en despolarizarse es la derecha, seguida por la aurícula izquierda. Esto inscribe de forma característica una onda positiva y de bajo voltaje en las derivaciones DI, DII y aVF, y negativa en aVR. Incluyendo la onda P se encuentra el **intervalo PR** que representa el tiempo que transcurre entre el inicio de la actividad eléctrica auricular y el inicio de la actividad eléctrica ventricular. Por tanto, este

intervalo incluye el tiempo de despolarización auricular y el tiempo de retraso que existe entre la actividad auricular y ventricular. Este tiempo es necesario en la mecánica del ciclo cardíaco ya que garantiza el correcto llenado diastólico final gracias a la contracción auricular. La mayor parte del retraso se encuentra en el NAV, producto de la conducción lenta en ausencia de Cx43, aunque también está incluido el tiempo de conducción a través del sistema His-Purkinje. Debe notarse que en el humano el intervalo PR ocupa una proporción de tiempo del ciclo cardíaco menor que en el ratón.

El segmento PR termina cuando comienza el **complejo QRS**. Este complejo comprende un conjunto de deflexiones positivas y negativas que representan los distintos vectores instantáneos de despolarización ventricular que, como se ve en la figura 2, están formados por la diferencia de voltaje entre los distintos sectores de miocardio ventricular mientras transcurren la fase 0 y la fase 1 del PA. Por convención se denomina onda Q a la primera deflexión negativa, onda R a la primera deflexión positiva y onda S a la segunda deflexión negativa. El complejo QRS es el que presenta las mayores diferencias entre el humano y el ratón. La particularidad más notoria en el trazado murino es la presencia de una **onda J** que sigue a la onda S (figura 5). Cuando comienza la onda J ya todo el miocardio ventricular se ha despolarizado de modo que ésta forma parte de los vectores generados por el proceso de repolarización.

El **segmento ST** procede luego del complejo QRS y representa un estado de equilibrio eléctrico donde la mayor parte de la masa miocárdica ventricular está despolarizada en fase 2 o 3. Dado que casi no existen diferencias de voltaje transmurales la representación electrocardiográfica es una línea mayormente isoeletrica a la misma altura que la línea de base. En los ratones no existe un segmento ST isoeletrico, sino que hay una transición entre la onda J que forma parte de la repolarización, y una onda T negativa.

Finalmente, la **onda T**, una onda de baja frecuencia y amplitud, es un componente electrocardiográfico que representa los vectores transmurales de repolarización. Dado que la APD es mayor a nivel endocárdico que epicárdico, existe un desfase en la repolarización celular entre estos sectores. Esto provoca una corriente transmural por la diferencia de voltaje instantáneo antes que todo el miocardio llegue a la fase 4. Como se ve en la figura 5, la onda T murina es de menor amplitud que la del humano quizás como consecuencia de que gran parte de la repolarización (fase 1 del PA) ya está representada en la onda J y por tanto hay *plateau* menos despolarizado en estos.

El calcio en la fisiología miocárdica.

El calcio es un catión divalente que se encuentra de forma abundante y altamente regulado en el organismo. En la mayoría de los tejidos la concentración citosólica es baja y la mayor parte del ion se encuentra guardado dentro del RS como se verá a continuación. A nivel miocárdico el calcio tiene una

función esencial en el proceso de contracción y relajación. Además, forma parte de las corrientes de membrana que permiten su excitabilidad y contribuye en otros procesos fisiológicos como la muerte celular programada.

Retículo sarcoplásmico

El RS es un organelo intracelular responsable del almacenamiento de la mayor parte del calcio celular. Estructuralmente conforma una red que rodea a los miofilamentos y presenta una estrecha relación con la membrana plasmática, especialmente en las cercanías de los túbulos T con los cuales forman las denominadas diadas, que son importantes en la comunicación sarcolema-RS. La principal función es proveer de calcio iónico al citosol para la generación del PA y el acoplamiento éxito-contráctil, así como resecuestrarlo para permitir la relajación. El contenido total de calcio en el RS es la suma de la forma iónica ($[Ca^{++}]_{RS}$) más una cantidad sustancialmente mayor unida a la calsequestrina (CSQ), una proteína que oficia de buffer dentro del organelo⁽¹⁾.

Receptor de Rianodina

El receptor de rianodina es un gran complejo tetramérico transmembrana de 2200 kDa ubicado en el RS de una gran variedad de organismos y tipos celulares. En los mamíferos, el tipo 2 (RyR2) es el que se encuentra en las células cardíacas y neuronas, mientras que el tipo 1 predomina en el músculo esquelético. Funciona como canal iónico permitiendo la salida de Ca^{++} del interior reticular en cada ciclo cardíaco.

El calcio, luminal y citosólico, es el principal regulador de la conductancia de los RyR2. En estado estacionario (sin fluctuación cíclica de la concentración de Ca^{++}) los RyR2 presentan una probabilidad de apertura gaussiana en función de la concentración de Ca^{++} citosólico ($[Ca^{++}]_i$). Valores de $[Ca^{++}]_i$ de 0.1 a 10 μ M activan el canal aumentando la conductancia al ion, mientras que valores de $[Ca^{++}]_i$ entre 100 μ M y 3 mM lo inactivan. Por su parte, la concentración de Ca^{++} luminal dentro del RS también afecta la probabilidad de apertura del canal, incrementando cuando la $[Ca^{++}]_{RS}$ se eleva en el rango de micromolar a milimolar.

De tal manera, a medida que aumenta la $[Ca^{++}]_{RS}$ una apertura breve permite el escape o *leak* de Ca^{++} hacia el citosol. Este fenómeno forma parte del llamado reloj de calcio de las células marcapaso y contribuye en parte a la despolarización diastólica de la fase 4 (figura 4).

Liberación de calcio inducida por calcio

La liberación de calcio inducida por calcio (CICR por su sigla en inglés) es un mecanismo de retroalimentación positiva por el que el calcio citosólico induce la liberación de calcio reticular. Este mecanismo permite la amplificación de una pequeña señal de calcio, logrando, si es lo suficientemente

grande, la regeneración del fenómeno y la propagación en toda la célula y a células adyacentes. Este hecho fisiológico cobra importancia si se tiene en cuenta la alta capacidad de amortiguación de calcio o “buffering” que presenta el citosol.

La principal fuente de calcio para la CICR es el Ca^{++} extracelular que ingresa mediante la apertura de los CCL. En este sentido, la despolarización de la membrana celular en cada ciclo permite el ingreso de Ca^{++} extracelular para activar la CICR y generar en conjunto el denominado *transitorio de calcio*, necesario tanto para potenciar la despolarización celular (recuérdese el papel de la INCX dependiente de Ca^{++}) como para fortalecer el acoplamiento éxito-contráctil.

Hasta la fecha se han descrito 3 moléculas que cumplen los criterios de segundos mensajeros capaces de modular este fenómeno fisiológico. El primero descrito fue el inositol trifosfato (IP_3), y luego el ADP ribosil cíclico (ADPRc) y dinucleótido de adenina y ácido nicotínico fosfato (NAADP), este último actuando a nivel de otros organelos como los endosomas⁽³⁾⁽⁴⁾.

Por su parte, es ampliamente conocido que la cafeína actúa sensibilizando el RyR2 al Ca^{++} , por lo que incluso valores basales de calcio pueden desencadenar la apertura masiva de RyR2.

Chispas y ondas de calcio

Además de los transitorios de calcio, existe una finita probabilidad de pequeñas liberaciones de calcio debido a la apertura de forma estocástica de los RyR2. Como se mencionó, a estas liberaciones se las denomina chispas de calcio o “leaks”. En condiciones de reposo normales la probabilidad de que el RyR2 se abra de esta forma es de aproximadamente 10^{-4} lo que determina que en un momento dado puedan existir una o dos chispas de Ca^{++} por miocito⁽⁵⁾. Sin embargo, esta probabilidad aumenta cuando los RyR2 están sensibilizados por distintos mecanismos como la fosforilación y otros que se verán a continuación. Si la chispa de calcio es lo suficientemente grande, o existe acumulación de chispas en un sitio determinado, el Ca^{++} citosólico puede difundir hacia RyR2 vecinos (aproximadamente a 1 - 2 μM de distancia) y estimular su apertura, lo que puede devenir en ondas de calcio propagadas por gran parte del miocito. Este fenómeno tiene un gran potencial arritmogénico si se tiene en cuenta la capacidad de activar el NCX capaz de despolarizar el potencial de membrana y generar posdespolarizaciones (*véase más abajo Mecanismo de las arritmias*).

Proteínas reguladoras del RyR2

Conociendo la importancia del papel del Ca^{++} en la fisiología celular, no sorprende que exista una compleja maquinaria capaz de regular con precisión la liberación del calcio a través de los RyR2. Existe un conjunto de moléculas bien estudiadas que son capaces de unirse al RyR2 y modular su apertura y cierre, tanto de una forma estacionaria como de forma dependiente del calcio y del tiempo.

Entre ellas se destaca la CaM, que inhibe de forma tónica la apertura de los RyR2, pero su acción se potencia de forma dependiente de la concentración de calcio cuando ésta aumenta en el lado citosólico (un efecto similar al que presenta sobre la ICaL). Este mecanismo puede jugar un rol importante en la terminación de la señal. Otra proteína inhibitoria largamente estudiada es FKBP12.6 que juega su papel estabilizando el RyR2 en su estado cerrado.

Por otro lado, el RyR2 también es regulado por fosforilación. Dos de las proteínas que se destacan en este papel son la PKA y la Ca/CaM proteína-quinasa II (CaMKII) que aumentan la probabilidad de apertura del canal fosforilando distintos sitios. Estas vías son dependientes de AMPc por lo que juegan su papel con la activación adrenérgica⁽¹⁾.

Bomba SERCA

Existe una familia de bombas de membrana transportadoras de calcio a partir de la hidrólisis de ATP (ATPasas). A nivel del RS se encuentra la *bomba de Ca⁺⁺ del retículo sarco-endoplásmico* (bomba SERCA por su sigla en inglés) y es un eslabón clave en la homeostasis del Ca⁺⁺ por el que presenta alta afinidad. A nivel cardíaco se expresa en mayor medida la isoforma 2a aunque también se encuentran las isoformas 2b y la 3. La SERCA2a es la proteína más abundante en la membrana del RS. Transporta 2 iones Ca⁺⁺ al lumen reticular por cada ATP hidrolizado. Se trata de la principal proteína involucrada en la relajación muscular recapturando el calcio liberado durante la sístole. En humanos contribuye en un 70 % a la remoción de Ca⁺⁺ citosólico, quedando un 28 % en manos del NCX y un restante 2 % para la Ca-ATPasa de la membrana plasmática y la recaptación mitocondrial. En ratones en tanto, la bomba SERCA2a tiene aún más relevancia en la remoción del Ca⁺⁺ contribuyendo en un 92 %, mientras que el NCX lo hace en un 7 %⁽¹⁾.

Nuevamente, dada la importancia de su rol en la homeostasis del calcio, no sorprende la presencia de diferentes mecanismos regulatorios. El principal es el mediado por *fosfolamban* (PLB), una proteína insertada en la membrana reticular que contiene sitios de fosforilación hacia el citosol. PLB desfosforilado inhibe SERCA2a y disminuye su afinidad por el Ca⁺⁺, mientras que la fosforilación por PKA y posiblemente por CaMKII libera la inhibición y aumenta su afinidad, aumentando así el transporte de Ca⁺⁺. Otra pequeña proteína transmembrana reguladora es sarcolipina (SLN) que inhibe la actividad de SERCA, probablemente disminuyendo la afinidad por el Ca⁺⁺ como PLB.

A nivel experimental también existe una molécula capaz de inhibir de forma irreversible y con alta selectividad a SERCA, la tapsigarguina.

Regulación por el sistema nervioso autónomo

El gasto cardíaco debe adecuarse a las necesidades cambiantes de oxígeno y nutrientes en el organismo. El sistema nervioso autónomo (SNA) es la principal vía de comunicación entre el sistema nervioso y el corazón y es responsable en enorme medida de regular este cambio del gasto. Sus dos divisiones principales, sistema nervioso simpático (SNS) y sistema nervioso parasimpático (SNP) actúan de forma antagónica no solo en el sistema cardiovascular, sino en la mayoría de los sistemas del organismo. Además, a nivel cardíaco, existe una división intrínseca del SNA que constituye una compleja trama ganglionar distribuida por distintas estructuras relevantes del corazón. Este sistema intrínseco está compuesto por neuronas aferentes, interneuronas y fibras eferentes tanto adrenérgicas como colinérgicas que median reflejos locales y responden a influencias del sistema nervioso central (SNC) y catecolaminas circulantes.

A nivel cardiovascular, el SNA es capaz de generar una serie de fenómenos que, mediante la modificación del inotropismo (fuerza de contracción), lusitropismo (velocidad de relajación), cronotropismo (FC), precarga y poscarga, terminan regulando los dos componentes del gasto cardíaco; la FC y el volumen sistólico.

Sistema nervioso simpático.

El SNS establece conexión con el corazón a través de la cadena ganglionar paravertebral. Desde esta estación de relevo, las fibras posganglionares forman los nervios cardíacos e ingresan por la base cardíaca formando el plexo cardíaco. El neurotransmisor que media su actividad es la noradrenalina (NA) que se une y activa a los receptores β -adrenérgicos del miocardio que están acoplados a proteína G. Además, esta acción también es mediada por las catecolaminas circulantes como la adrenalina que aumentan en situaciones de estrés para activar el denominado estado de *“lucha o huida”*.

El estímulo β -adrenérgico activa la proteína de unión a la GTP (Gs) que estimula a la adenilato ciclasa para producir AMPc, que a su vez activa la PKA (figura 6). La PKA fosforila una variedad de proteínas relacionadas con la excitación y contracción del miocardiocito. Algunos ejemplos son los CCL produciendo un aumento de la ICaL, los RyR2 que se disocian de FKBP12.6 aumentando la probabilidad de apertura, PLB liberando SERCA2a, y los canales HCN4 para aumentar If. Todas estas acciones generan un aumento del transitorio de calcio y por tanto del inotropismo, así como efectos lusitrópicos y cronotrópicos positivos. Estos efectos además son amplificados por CaMKII.

En condiciones patológicas con sobrecarga de calcio, por ejemplo en la falla cardíaca, la hiperfosforilación del RyR2 puede causar pérdidas diastólicas de Ca^{++} reticular que favorece la arritmogénesis⁽¹⁾.

Enfermedad Cardiovascular

Muerte Súbita Cardíaca (MSC)

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) conforman la principal causa de morbi-mortalidad en el mundo, e insumen a los sistemas de salud enormes costos. La muerte súbita es una de las manifestaciones de las ECV y muchas veces la primera, configurando un importante problema sanitario. Se define como un fallecimiento inesperado de causa cardíaca manifestado por una abrupta pérdida de conocimiento con menos de 1 hora de duración del cambio del status cardiovascular. La incidencia mundial es difícil de calcular pero se estima que representa el 10–20% de los fallecimientos en Europa y la mitad de todas las muertes cardiovasculares⁽⁶⁾.

Entre las causas de MSC se destaca ampliamente la cardiopatía isquémica llevándose el 80% de los casos en países occidentales. El resto se reparten en enfermedades congénitas o adquiridas que causan miocardiopatías no isquémicas, canalopatías, etc.

Dado el alto impacto sanitario, la MSC y sus causas han sido fruto de investigación en los últimos años, tanto para elucidar los mecanismos biológicos, como para fortalecer la prevención y el tratamiento farmacológico y no farmacológico.

Cardiopatía isquémica

La cardiopatía isquémica es la primera causa de mortalidad a nivel mundial, sobre todo en poblaciones adultas. Engloba un conjunto de entidades que tienen como desenlace común el insuficiente aporte sanguíneo para satisfacer las necesidades metabólicas (definido como isquemia) del miocardio o un sector de éste, pudiendo ocasionar infarto de miocardio. Se puede manifestar de forma aguda (síndrome coronario agudo) o crónica (angina estable) y las consecuencias pueden ir desde pequeñas disfunciones subclínicas del sistema cardiovascular hasta la MSC.

Una de las manifestaciones más importantes es el infarto agudo de miocardio (IAM) que se produce como consecuencia de la obstrucción total y aguda de una arteria epicárdica. Muchos de estos pacientes mueren de forma súbita en su domicilio sin llegar a la atención sanitaria producto de arritmias ventriculares malignas, siendo los primeros 30 minutos los de mayor riesgo.

Isquemia aguda y arritmias

El comienzo de la isquemia aguda produce una disfunción eléctrica, mecánica y bioquímica inmediata en el miocardio. Además, el efecto de la reperfusión, sea terapéutica o espontánea, también puede causar arritmias y empeoramiento de la función sistólica.

El miocito isquémico sufre una serie de procesos fisiopatológicos como consecuencia de la pérdida del metabolismo aeróbico y disminución del ATP. Algunos de ellos son:

- Salida de K^+ masiva a través de canales $IKir$ y $IKATP$ con la consiguiente acumulación en el espacio extracelular que contribuye a una disminución del potencial de membrana y a la reducción de la APD.
- Aumento de la actividad del intercambiador Na^+/H^+ dado por la acidosis lo cual contribuye a la acumulación de Na^+ intracelular.
- Tanto la despolarización de membrana con la activación de $ICaL$ como la actividad en la forma inversa de NCX por el aumento de Na^+ , contribuyen a la entrada masiva de Ca^{++} .
- A nivel intracelular existe una pérdida de calcio reticular liberado hacia el citosol que junto con la entrada desde el medio extracelular determina una importante sobrecarga de calcio.
- Alteración de la distribución y funcionalidad de la $Cx43$ que genera un desacople eléctrico y químico entre los miocitos con la consecuente alteración de la excitabilidad y conductibilidad.
- Generación de radicales superóxido.

Todo esto, junto con la hiperestimulación adrenérgica, desencadena fenómenos arrítmicos como posdespolarizaciones y reentradas en sectores vulnerables del miocardio que se describirán más adelante.

Mecanismo de las arritmias.

Existen 3 posibles mecanismos que subyacen el origen de distintas arritmias. Ellos son el automatismo anormal, la actividad desencadenada y las reentradas. A veces actúan individualmente y otras veces lo hacen de forma combinada.

El automatismo anormal es el inicio de un PA de forma prematura que surge de un miocardiocito con un potencial de membrana reducido (menos negativo). La falla en alcanzar el potencial de membrana en reposo puede estar en la disminución de la conductancia de K^+ o una ganancia aumentada de las corrientes entrantes. El automatismo anormal se ha descrito en las fibras de Purkinje o el tejido miocárdico isquémico.

La actividad desencadenada se puede dividir en las posdespolarizaciones tempranas y tardías (EADs y DADs respectivamente). Las primeras ocurren cuando el miocardiocito falla en completar la repolarización y la despolarización prolongada puede estimular la reactivación de corrientes entrantes inactivas generando otro PA que se inicia habitualmente sobre la fase 2 del previo. Estos fenómenos están muy asociados a ritmos lentos. Por su parte, las DADs se originan en la fase 3 del PA cuando el potencial de membrana se encuentra ya casi completamente repolarizado o incluso en el potencial de membrana en reposo normal. El mecanismo de las DADs puede ser variado pero en general involucra el mal manejo del calcio. Tanto pérdidas de calcio reticular como alteraciones del NCX pueden estar involucradas. Las catecolaminas y la $[Ca^{++}]$ celular aumentadas incrementan estos fenómenos.

La reentrada implica que un impulso eléctrico circule por una vía determinada y retorne por otra (habitualmente de conducción más lenta) hacia el punto de origen, y vuelva a despolarizarlo para generar un nuevo impulso y cerrar el circuito. Para ello es necesario que existan dos vías anatómica y fisiológicamente distintas con conexión proximal y distal. Característicamente la refractariedad de una de las vías es mayor por lo que el impulso circula inicialmente por la otra. La conducción de esta última es lo suficientemente lenta para que el frente de onda pueda regresar por la primera vía, ahora ya fuera del período refractario. Este es el sustrato arrítmico que se encuentra en mayor medida en los infartos de miocardio dado que el tejido isquémico o el tejido cicatricial propicia estas alteraciones de conducción del impulso eléctrico.

Insuficiencia cardíaca y arritmias

Desde la perspectiva clínica la insuficiencia cardíaca es un síndrome complejo consecuencia de un deterioro estructural y funcional del corazón. Representa un importante problema sanitario siendo una de las mayores causas de ingreso hospitalario⁽⁵⁾. Se trata de un cuadro clínico precipitado por la incapacidad de mantener el gasto cardíaco de acuerdo a las necesidades metabólicas del organismo. Como tal, es el desenlace común de varias patologías cardiovasculares, entre ellas la cardiopatía isquémica.

En la base de este fenómeno se encuentran una serie de remodelaciones estructurales y fisiológicas que predisponen a arritmias cardíacas. Tal es así, que muchas de las muertes en estos pacientes son debidas a arritmias malignas, y el uso de cardiodesfibriladores implantables está mundialmente establecido en un grupo de ellos⁽⁵⁾.

Uno de los hechos más importantes a nivel celular en la insuficiencia cardíaca es la desregulación del manejo del Ca^{++} . Existe una sobrecarga de calcio citosólico al tiempo que los transitorios de calcio disminuyen su amplitud (figura 7). La hiperactivación adrenérgica mantenida es uno de los gatillos principales para que esto ocurra. Por ello, el bloqueo de receptores adrenérgicos, ha sido uno de los blancos terapéuticos que ha logrado bajar la mortalidad en estos pacientes. Algunas de las alteraciones involucradas son las siguientes:

- La $[\text{Na}^+]_i$ elevada lleva al NCX a actuar en modo inverso, es decir, extrayendo Na^+ e incorporando Ca^{++} durante la mayor parte del PA. Además, hay un aumento en la expresión de esta proteína que potencia el fenómeno.
- Existe una regulación a la baja de SERCA2A tanto en cantidad como en función, lo que disminuye la recaptación de Ca^{++} reticular y aumenta su concentración citosólica.
- Pérdidas diastólicas de Ca^{++} reticular a través del RyR2 en forma de chispas u ondas. Varios fenómenos contribuyen a esto entre los que se encuentran la hiperfosforilación de RyR2⁽¹⁾. Recuérdese que la apertura de los RyR2 es un fenómeno estocástico y es influenciado tanto

por la $[Ca^{2+}]_{RS}$ como por la $[Ca^{2+}]_i$ además de su modulación por fosforilación. También existe una depleción celular de FKBP12.6 dado por una hiperfosforilación crónica mediada por PKA.

- La hiperactivación de CaMKII puede llevar a la activación de los CCL y además contribuye a incrementar la actividad del NCX llevando a un aumento mayor del $[Ca^{2+}]_i$.

Todo esto precipita la génesis de DADs que junto con un sustrato anatómico dado por un miocardio fibrosado pueden generar arritmias malignas. De esto se desprende entonces la importancia del manejo del calcio celular, incluso como objetivo terapéutico.

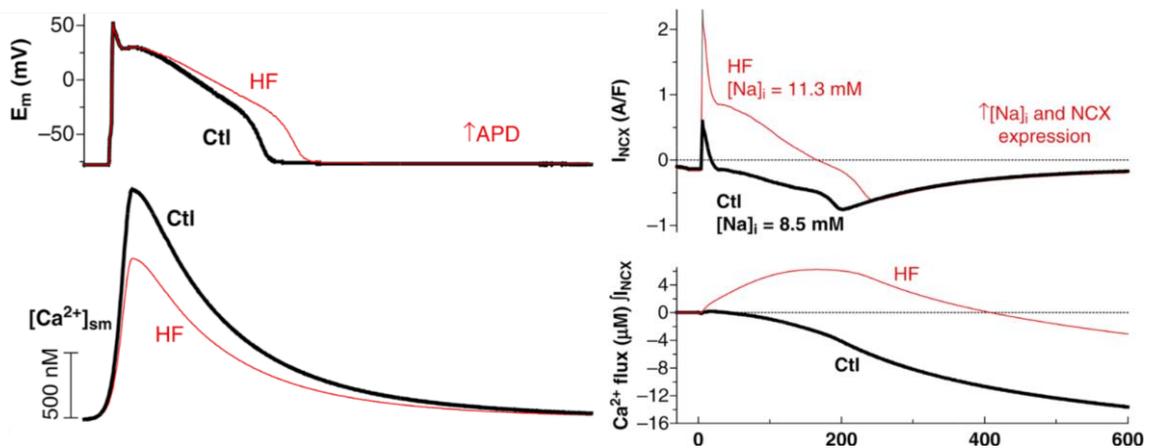


Figura 7. Función de NCX y manejo del calcio en la insuficiencia cardíaca. Ctl: control, HF: insuficiencia cardíaca (heart failure). Modificado de ⁽¹⁾

CD38

CD38 (*cluster of differentiation 38*) es una glicoproteína transmembrana de 300 aminoácidos (AA) y 45 kDa originalmente descrita en el sistema inmune a principio de los años 80 como un antígeno de superficie linfocitario. En el comienzo se le adjudicaba un rol en la activación, adhesión y migración en estas células. Sin embargo, con el paso de los años se fue observando que su expresión y actividad no se limitaba únicamente al sistema inmune, sino que, por el contrario, CD38 se expresaba de forma ubicua en todo el organismo y hoy se sabe que como consecuencia de su función enzimática, participa en un eslabón clave de la fisiología celular; la regulación del movimiento del calcio.

Los primeros hallazgos de esta novel función se remontan a principios de los años 90 cuando H.C. Lee trabajando en huevos de erizo de mar y huevos de *Aplysia* encontró una similitud de la secuencia aminoacídica de CD38 con una enzima capaz de generar ADP ribosil cíclico (ADPRc) a partir del cofactor NAD^+ (dinucleótido de nicotinamida-adenina). Esta capacidad enzimática la denominaron como ADP ribosil ciclase e inmediatamente se evidenció que era también una propiedad de la CD38 del humano,

como se describe más abajo. Este hallazgo entonces muestra una conservación filogenética de la enzima de más de 700 millones de años, lo que marca su importancia funcional⁽⁴⁾.

Estructura de CD38

Como se mencionó, CD38 es una glicoproteína transmembrana. Durante mucho tiempo se la consideró una proteína transmembrana tipo II lo que implica que su sitio catalítico carboxilo terminal (C terminal) se encuentra orientado hacia el exterior celular. Específicamente en esta orientación presenta un gran dominio extracelular de 256 AA, un dominio transmembrana de 23 AA y una corta cola citoplasmática de 21 AA. Sin embargo, esta orientación topológica no parecía explicar la utilización de sustratos citosólicos como el NAD⁺ para producir mensajeros que actúan también de forma intracelular. Este hecho ha configurado durante los últimos años la denominada “paradoja de la topografía”, que ha sido resuelta recientemente por los trabajos de Lee y Zhao⁽⁷⁾. En este sentido, describen también la expresión de CD38 con su sitio catalítico orientado hacia el lado citoplasmático, es decir, una configuración tipo III⁽⁸⁾. Esta conformación se trata de la misma estructura con orientación opuesta y parece encontrarse en menores cantidades que la tipo II. Además, se ha visto que también puede funcionar como transportador de modo que durante el proceso enzimático es capaz de tomar NAD⁺ del lado extracelular (o desde la luz vesicular) y liberar su producto catalítico hacia el citosol⁽⁴⁾, aunque este transporte también se lo ha adjudicado a estructuras accesorias como los hemicanales de Cx43⁽⁹⁾. Por su parte, como proteína transmembrana no solo está presente en la membrana celular, sino que también se encuentra activa en vesículas de endocitosis así como en la membrana nuclear, la membrana mitocondrial, la membrana lisosomal, y trabajos recientes también han confirmado su presencia en la membrana del RS de miocardiocitos o en sus proximidades, hecho vinculado a su papel en la movilización del calcio en estas células⁽¹⁰⁾. Además, existe una pequeña porción soluble a nivel citoplasmático (figura 8).

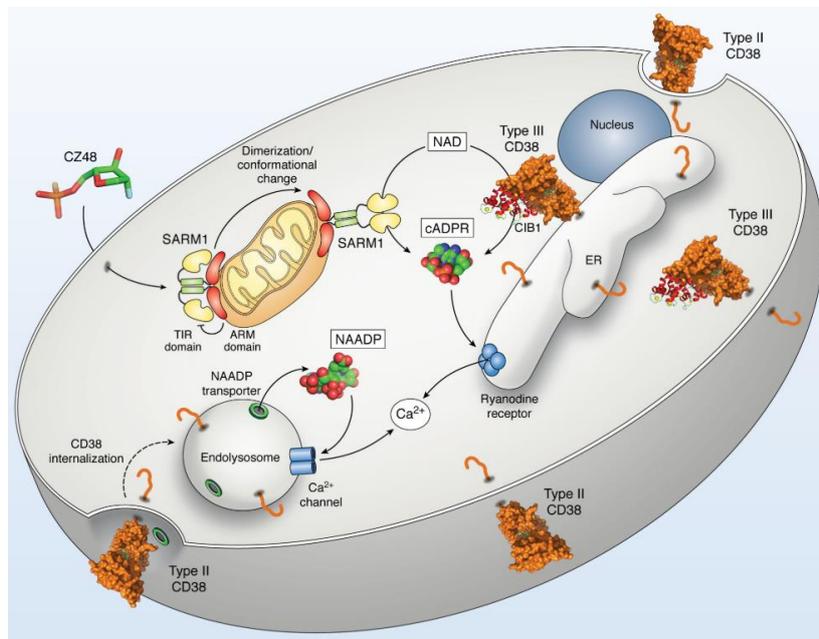


Figura 8. Diferentes topologías de CD38 a nivel celular. CD38 tipo III está presente en la membrana plasmática y del retículo sarcoplasmático (ER) con el sitio catalítico citosólico. CD38 tipo II se expresa en la superficie celular y puede ser internalizada por endocitosis a endolisosomas. Tomado de (7).

Función de CD38

Como fue mencionado, en sus orígenes se describió a CD38 como un marcador celular usado para identificar linfocitos T. Sin embargo, hoy sabemos que se trata de una enzima multifuncional que juega un rol esencial en múltiples procesos fisiológicos.

A pesar de que las descripciones originales fueron en el sistema inmune, el papel primordial en el resto del organismo está vinculado a su función enzimática. Se trata de la principal NADasa del organismo⁽¹¹⁾, por su capacidad de degradar el cofactor NAD⁺, y la principal ADP ribosil ciclasa⁽¹⁰⁾ actuando en una gran variedad de tejidos como el cerebro, hígado, glóbulos rojos, retina, páncreas, riñones, corazón, entre otros, y tiene, por lo tanto, implicancias no sólo en la respuesta inmune sino también en otras diversas funciones como se verá más adelante.

CD38 no solo es capaz de generar ADPRc a partir de NAD⁺ sino también de hidrolizar el ADPRc formado para generar ADP ribosa (ADPR). Dado que la reacción de hidrólisis muestra una mayor afinidad por el sustrato, el producto final más abundante es el ADPR dejando una pequeña proporción de este como ADPRc.

Por otro lado, CD38 también cataliza una reacción de intercambio de bases cuando se encuentran en un medio ácido, permitiendo la incorporación de una molécula de ácido nicotínico a NADP⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), para la producción de NAADP (ácido nicotínico-adenina

dinucleótido fosfato). Este producto es también una molécula que actúa como mediador de la movilización de calcio, al igual que el ADPRc; sin embargo, tanto las condiciones de pH como los compartimientos sobre los que actúa parecen ser diferentes⁽⁴⁾ (figura 9).

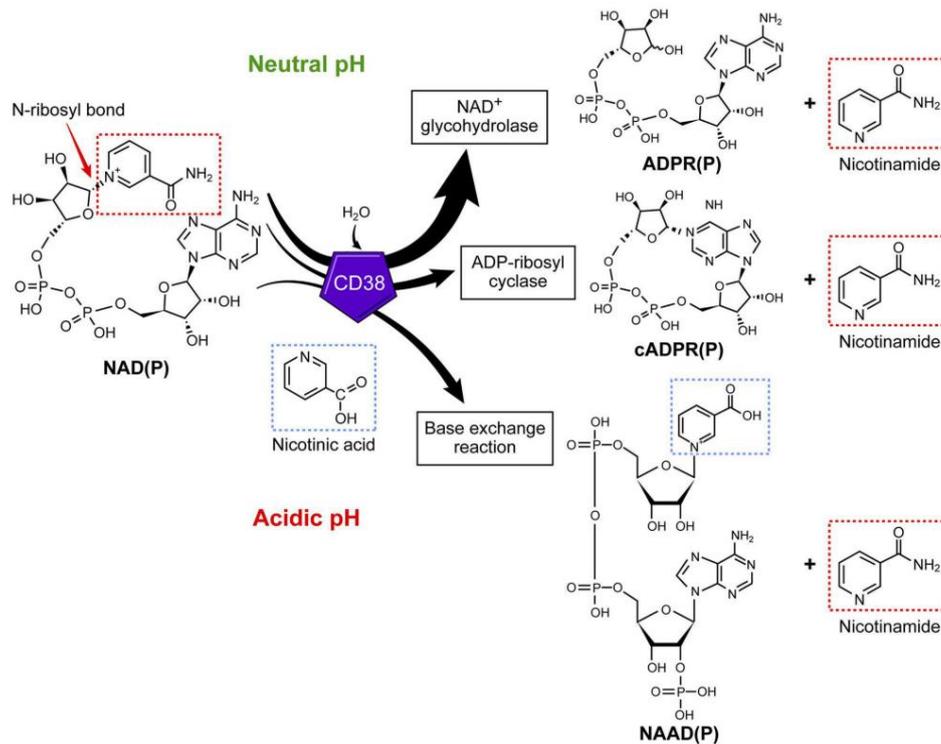


Figura 9. Esquema de las diferentes actividades catalíticas de CD38. Tal como se representa con el espesor de la flecha, CD38 es principalmente una enzima glicohidrolasa de NAD⁺. Tomado de⁽¹¹⁾.

A pesar de que la actividad ADP ribosil ciclasa en mamíferos es patrimonio mayoritariamente de CD38, también ha sido descrita otra proteína que puede cumplir esta función, aunque en una proporción menor. Se trata de CD157. Tanto CD38 como CD157, son NADasas capaces no solo de sintetizar ADPRc a partir de NAD⁺, sino también de hidrolizarlo para generar ADPR.

ADP ribosil cíclico como producto de CD38

Adenosín difosfato ribosa cíclico o ADP-ribosil cíclico (ADPRc) es una molécula de 0.54 kDa, cuya primera descripción se remonta a principios de los años 90 gracias a los trabajos realizados por H.C. Lee⁽⁴⁾ en huevos de erizos de mar y huevos de *Aplysia*. Se trata de una molécula estable formada por el ciclado enzimático del cofactor NAD⁺ (figura 9). El ADPRc está ampliamente distribuido en todos los tejidos de mamíferos y su principal función consiste en actuar como segundo mensajero en la movilización de calcio reticular.

La enzima encargada de su síntesis (ciclasa o NADasa) es también responsable de su degradación a ADPR, permitiendo un control estricto del contenido celular tanto de ADPRc como de NAD^+ . A pesar de que ADPR y ADPRc son moléculas distintas, tienen carga y masa similares, presentando ADPRc una molécula de agua menos que ADPR.

Como se mencionó previamente, el ADPRc cumple las características de segundo mensajero, actuando en una vía distinta al IP_3 en la liberación de calcio reticular mediante el RyR. Si bien existe controversia en relación a si el sitio de acción es el mismo RyR o si actúa en alguna proteína accesoria, está claro que el efecto es activar la movilización de calcio sensibilizando el mecanismo de CICR⁽¹²⁾⁽¹³⁾.

Por su parte, el NAADP, producto de la acción de CD38 en condiciones ácidas, también cumple su función en la movilización del calcio, pero esta parece ser independiente de los mecanismos activados tanto por IP_3 como por ADPRc así como también de los RyR. Sin embargo, la vía de acción del NAADP permanece aún más oscura⁽⁴⁾.

Como ya se mencionó, el citosol no es el único compartimiento en el que es relevante la cantidad de calcio. La concentración de calcio reticular también afecta la probabilidad de apertura de los RyR y por tanto es un factor más que importante en la CICR, tanto por su efecto en la cinética de estos canales como por el hecho de que con una mayor carga de calcio reticular, la liberación en cada ciclo de apertura será mayor. Autores como Macgregor y Cui⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾ sugieren que el mecanismo principal por el que actúa ADPRc es aumentando la carga reticular de Ca^{++} por aumento de la recaptación.

Como sugiere Lukyanenko⁽¹⁶⁾, el efecto sostenido de ADPRc se puede ver una vez transcurrido cierto tiempo necesario para la sobrecarga de calcio reticular y este efecto está determinado por la estimulación de SERCA en presencia de ADPRc. En el mismo sentido, Park⁽¹⁷⁾ demostró la importancia de este metabolito en el mantenimiento de la cantidad del calcio reticular de células de músculo esquelético mediante la vía de SERCA, y que la concentración necesaria de ADPRc para estimular SERCA es mucho menor a la reportada para estimular la liberación del ion divalente mediante los RyRs. Szentesi⁽¹⁸⁾ propuso una disminución de la refractariedad de CICR mediada por el efecto de la estimulación adrenérgica sobre SERCA sugiriendo la importancia de la indemnidad del llenado reticular sobre este sistema.

Antecedentes de CD38 y ADPRc

Si bien CD38 y su producto metabólico ADPRc no son moléculas vitales en mamíferos, la modificación de las mismas tanto en más como en menos generan cambios sustanciales en la fisiología del organismo en condiciones basales y frente a alteraciones del medio. Su papel ha sido largamente estudiado por diferentes grupos en los últimos años, siendo quizás los dos más importantes el grupo de H.C. Lee y el de E. Chini.

Para el estudio de estas moléculas y la comprensión de su implicancia fisiológica en mamíferos se han utilizado diferentes estrategias desde modelos *in vivo* hasta preparados de membrana celular. Entre ellas encontramos por ejemplo el uso de ratones *Knock Out* (KO) para el gen de CD38, ratones “catalytically inactive” (CI) que expresan CD38 pero sin capacidad catalítica, anticuerpos monoclonales que neutralizan la actividad enzimática de CD38, como *Ab68*, o el agregado de ADPRc exógeno. Además, también se han desarrollado una serie de fármacos que inhiben la actividad enzimática de CD38 que no solo permiten el estudio de esta enzima sino que también podrían tener un potencial terapéutico. Entre ellos se encuentra 78c, una thiazoloquinazolinona que ha comenzado a utilizarse recientemente como un potente inhibidor reversible de CD38. Se trata de un compuesto que es permeable a la célula y posee excelentes propiedades farmacológicas que permiten su uso aún en modelos *in vivo* elevando las concentraciones celulares de NAD^{+} ⁽¹⁹⁾. También existen inhibidores de otras familias como la luteolinidina, el 8-Br-ADPRc y el 8-amino-ADPR que se han usado previamente en experimentos de investigación básica⁽²⁰⁾⁽²¹⁾⁽¹⁵⁾.

Antecedentes sobre el papel de CD38/ADPRc fuera del sistema cardiovascular

Dado que no entra dentro de los objetivos de la tesis, a continuación, se destacarán solo algunas de las acciones más estudiadas de CD38/ADPRc fuera de la fisiología cardíaca.

A nivel del sistema inmunológico CD38 actúa como un antígeno, de manera que la unión con distintos ligandos puede desencadenar una amplia variedad de respuestas desde la proliferación celular hasta la apoptosis⁽⁴⁾. En los linfocitos T y linfocitos B contribuye a la activación y producción de citoquinas, fenómeno que es independiente de la actividad enzimática. En la práctica clínica además, se lo ha usado como un marcador celular para clasificar neoplasias como el mieloma múltiple o la leucemia mieloide crónica. Por su parte, en el sistema inmune innato, CD38 es un factor importante en la migración de los neutrófilos en respuesta a las citoquinas inflamatorias (quimiotaxis). Este efecto sí es dependiente de la movilización del calcio desde reservorios intracelulares gracias a la producción de ADPRc⁽²²⁾.

A nivel pancreático CD38/ADPRc tiene un importante rol en la secreción de insulina. Las células β de los islotes de Langerhans responden al aumento de la concentración de glucosa con la secreción de insulina. El incremento de $[\text{Ca}^{++}]_i$ es necesario en este proceso y la movilización desde depósitos endógenos es estimulada por ADPRc más que por IP_3 . También en el páncreas se plantea un papel similar en la secreción exócrina de las células acinares en respuesta a la colecistoquinina⁽⁴⁾.

En el músculo liso, CD38/ADPRc están implicados tanto en el tono muscular como en las contracciones fásicas. Un ejemplo largamente estudiado es la participación de esta vía en la movilización del Ca^{++} del RS en el músculo liso vascular inducida por la acción la ACh sobre sus receptores muscarínicos⁽⁴⁾. Otro ejemplo es el músculo liso de la vía aérea, en el que además CD38 parece jugar un papel importante

en patología. En el asma, el TNF α induce la expresión de CD38 que por vía del ADPRc contribuye a la hiperreactividad bronquial⁽²³⁾.

Se ha vinculado a CD38 como un efector directo en el proceso de envejecimiento y disfunción mitocondrial desde su papel como principal enzima hidrolítica de NAD⁺. NAD⁺ es un cofactor clave en las reacciones de óxido-reducción y es usado por enzimas reparadoras del ADN. En este sentido, también es sabido que los niveles de NAD⁺ decrecen con el envejecimiento y este fenómeno se lo ha vinculado, al menos en parte, al aumento de la expresión y actividad de CD38 a lo largo de la vida⁽¹¹⁾⁽²⁴⁾. Más recientemente se ha comenzado a investigar el papel de CD38 en la biología tumoral y su rol en nuevas estrategias terapéuticas. En este caso también depende de su papel como regulador de NAD⁺, y por tanto de la actividad de enzimas desacetiladoras dependientes de NAD⁺ como las sirtuinas (SIRT) que inducen la activación de cofactores antitumorales. En este sentido, la inhibición de CD38 podría aumentar la respuesta inmune de células T antitumorales⁽¹¹⁾.

Antecedentes del papel de CD38/ADPRc en el sistema cardiovascular

Desde las observaciones de Ringer en 1883 que el Ca⁺⁺ es un catión esencial en la fisiología cardíaca, el estudio de su regulación ha suscitado un particular interés, y CD38/ADPRc por su papel en la fisiología del Ca⁺⁺ no es ajeno a ello. A nivel cardiovascular el conocimiento del rol de estas moléculas es todavía escaso, sin embargo, se destacan algunos antecedentes importantes.

La primera evidencia en miocardiocitos fue descrita por Rakovic en 1996, quien mostró los efectos inhibitorios en el transitorio de calcio y el acoplamiento éxito-contráctil de 8-amino-cADPR, un antagonista competitivo de ADPRc, en células de cobayos⁽²⁵⁾.

En 1999 Cui y Galione mostraron que el ADPRc en miocitos ventriculares de estos mamíferos aumentaba la amplitud de los transitorios de calcio al tiempo que también aumentaba la frecuencia de las chispas cuando era administrado de forma exógena, con lo que comienza a postularse un posible papel arritmogénico. El mecanismo planteado era una sensibilización de CIRC⁽¹⁵⁾. Además, ese mismo año, este grupo de investigadores demostró una supresión mediada por el antagonista competitivo de ADPRc, 8-amino-cADPR, de las ondas de Ca⁺⁺ espontáneas bajo condiciones de sobrecarga inducidas por isoproterenol⁽²⁶⁾. Por su parte, Higashida y col. muestran un aumento de la actividad ADPRc de 1,7 veces mediante la estimulación con 1 μ M de isoproterenol en preparados de membrana de células ventriculares, evidenciando una vía de señalización a través de los receptores β -adrenérgicos⁽²⁷⁾.

De ahí en adelante, se publicaron una innumerable cantidad de trabajos científicos de distintos grupos acerca del efecto de ADPRc en el manejo del calcio reticular (se citarán sólo algunos de ellos). No existe un completo acuerdo en relación a si se trata de un efecto directo sobre el RyR2 o indirecto a través de moléculas reguladoras del mismo como FKBP12.6, calmodulina y CaMKII⁽¹⁵⁾. Incluso se plantea que

ADPRc puede actuar en una vía independiente del RyR2, como por ejemplo, potenciando la incorporación de Ca^{++} reticular a través de la bomba SERCA2a⁽¹⁶⁾. No obstante, todos confluyen en una afirmación en común; el ADPRc potencia la liberación del Ca^{++} reticular en los miocardiocitos⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾⁽¹²⁾⁽³⁰⁾.

Más adelante, en el 2003, Jun Takahashi hizo interesantes contribuciones. Estudiando modelos murinos *KO* para el gen CD38 (CD38KO) in vitro observó que el contenido de ADPRc en los miocardiocitos de estos ratones era 85% menor que en el tejido de ratones *Wild Type (WT)*⁽³¹⁾. Además, evidenció un comportamiento diferente del transitorio de calcio de músculo papilar aislado de ambos ratones y que éste era dependiente de la temperatura, hallazgo que ya había hecho lino previamente⁽²⁹⁾. Por otra parte, mostró que la expresión de SERCA era mayor en los corazones aislados de ratones CD38KO, y que la expresión de RyR2 también era mayor pero esto ocurría solo en las hembras.

Chini demostró el papel de CD38 en la regulación del NAD^+ y la producción de ADPRc en distintos tejidos, destacándola como la principal NADasa y la principal ADPRciclase. Respecto al NAD^+ detectaron niveles 10 a 20 veces mayores en ratones CD38KO en distintos tejidos incluido el corazón, mientras que los niveles de ADPRc en el miocardio de estos ratones era indetectable⁽³²⁾.

Una mención especial merece el vínculo de CD38 con el SNS. Como se dijo previamente, la adrenalina y NA desencadenan una cascada de segundos mensajeros cuando se activa la adenilato ciclase para producir AMPc. Este se trata quizás del mecanismo de mayor jerarquía, pero sabemos que no es la única molécula responsable de los cambios fisiológicos generados por la estimulación β -adrenérgica. En este sentido, se ha descrito un aumento sostenido de la concentración de ADPRc⁽²⁷⁾, permitiendo de esta forma un incremento del transitorio de calcio, y por lo tanto del inotropismo, pero formando a su vez, parte de procesos patológicos relacionados con arritmias e hipertrofia ventricular. Gul y col. demostraron que el aumento sostenido (pero no el pico inicial) de $[\text{Ca}^{++}]_i$ con la estimulación β -adrenérgica mediante isoproterenol en cardiomiocitos podía ser suprimido con un bloqueante específico de ADPRc, un efecto similar al producido por tapsigarguina, lo que en concordancia con lo descrito por Park y cols. sugiere que el papel de esta vía podría ser relevante en la recaptación de Ca^{++} reticular⁽²¹⁾⁽¹⁷⁾. El mismo patrón de la movilización del calcio lo evidenciaron en cardiomiocitos de ratones CD38KO ante el estímulo β -adrenérgico⁽²¹⁾. Además, también demostraron la inducción de la actividad ADPR ciclase con isoproterenol, cosa que no se logró en las células de CD38KO. Por otro lado, en el plano de la patología, los ratones CD38KO estaban protegidos de los efectos deletéreos tanto estructurales (hipertrofia y fibrosis) como funcionales (fracción de eyección) que produce el aumento sostenido de estimulación β -adrenérgica como se ve en la insuficiencia cardíaca y la hipertensión arterial. El mismo efecto en la producción de ADPRc de forma sostenida y NAADP de forma transitoria

fue visto por Lewis y por Lin Wee, con su correlación en FC y la fuerza de contracción en corazones aislados⁽³³⁾⁽¹⁰⁾⁽²¹⁾.

Al tiempo comenzaron a publicarse estudios relacionados a los efectos de CD38 en procesos patológicos como las arritmias cardíacas, la hipertrofia y la isquemia miocárdica. En 2012 Kannt y col. mostraron como la inhibición de ADPRc previno despolarizaciones espontáneas inducidas por sobrecarga de calcio *in vitro*, y un retardo en la generación de fibrilación ventricular mediada por ouabaína *in vivo* en cobayos⁽³⁴⁾. Xie y col. evidenciaron un incremento de la concentración de ADPRc en los miocardiocitos sometidos a isquemia y reperfusión, con el consecuente aumento de la concentración de calcio citosólico y daño celular⁽³⁵⁾. Lin Wee estudiando el efecto de la estimulación β -adrenérgica evidenció una protección ante la inducción de arritmias en los ratones CD38KO⁽¹⁰⁾. Xiao-Hui Guan observó *in vivo* e *in vitro* que los ratones CD38KO estaban protegidos ante la hipertrofia inducida por angiotensina 2 y para ello planteó dos mecanismos; la disminución del calcio citosólico que lleva a la regulación a la baja de la vía de Ca-NFAT y la activación de una vía antihipertrófica activada por la mayor actividad de la sirtuina 3 (SIRT3)⁽³⁶⁾.

Trabajos recientes han demostrado que la deficiencia de la actividad de CD38 podría proteger al corazón contra la injuria por isquemia y reperfusión *in vivo* e *in vitro* disminuyendo el área de infarto. Tal es el caso del grupo de Boslett, que le adjudica a CD38 un papel crucial en la disminución de la síntesis de óxido nítrico en situación de isquemia-reperfusión en modelo tanto en ratas como en ratones⁽²⁰⁾⁽³⁷⁾. Dado que la actividad enzimática de CD38 aumenta en esta situación, la depleción de NADPH, un cofactor para la Óxido Nítrico Sintasa epitelial (eNOS) determina una disminución de óxido nítrico en las células endoteliales de los vasos coronarios, y con ello, una peor perfusión miocárdica y mayor área de infarto. Además, estos autores, describen cómo la luteolidina, un inhibidor de CD38, protege el miocardio en estas condiciones, y mejora la recuperación de la contractilidad miocárdica, quedando por responder si se trata de un efecto directo sobre el flujo sanguíneo o por menor área de infarto⁽²⁰⁾⁽³⁸⁾. En la misma línea van los trabajos de Guan et al. que en modelos *in vivo* demostraron una injuria por isquemia y reperfusión reducida en ratones CD38KO producto de la disminución de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), al tiempo que disminuye la sobrecarga de Ca⁺⁺ celular inducida por la hipoxia/reoxigenación⁽³⁹⁾. La disminución de las ERO sería producto de la activación de la vía de la Sirtuina 1 (SIRT1), una proteína deacetiladora dependiente de NAD⁺.

Nuestro equipo de trabajo ha estado estudiando el rol de CD38 desde hace varios años y hemos logrado resultados novedosos al respecto. En los trabajos publicados por Agorrody et al. por ejemplo, se ha demostrado una menor FC en estado basal de los ratones CD38KO *in vivo*, hecho que no se vio en el modelo *in vitro* y una marcada variabilidad de la FC respecto a los ratones WT, posiblemente por la presencia de pausas sinusales⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾. De igual forma, la FC máxima alcanzada con la inyección de

isoproterenol *in vivo* fue menor en los ratones con la deficiencia genética. Desde el punto de vista del manejo del Ca^{++} se comprobó que la frecuencia de las miniondas de Ca^{++} eran menores en miocitos ventriculares aislados de ratones CD38KO y que la velocidad de propagación de las ondas de Ca^{++} era mayor. Además, la carga de arritmias ventriculares *in vivo* cuando se lo sometía a un estímulo de cafeína/adrenalina era también menor.

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Los esfuerzos realizados en los últimos 30 años han arrojado mucha información sobre la relevancia fisiológica de una enzima poco conocida y su actividad a nivel miocárdico. Sin embargo, aún resta mucho por investigar. A nivel fisiológico, si bien se han estudiado las probables vías de señalización intracelular y su papel en la movilización del Ca^{++} y en diferentes corrientes de membrana, no se ha descrito si CD38 tiene un rol en la morfología del PA miocárdico y en tal caso cómo esta modifica la activación eléctrica global en todo el miocardio. A nivel fisiopatológico se la ha vinculado en la inducción de arritmias ventriculares en protocolos de estimulación eléctrica o mediante el uso de sustancias arritmogénicas pero no se han realizado estudios y por tanto no existe información respecto a si CD38 está vinculada a las arritmias ventriculares malignas en el contexto de isquemia y reperfusión, siendo esta la principal causa de muerte súbita a nivel mundial.

En base a esto me propuse analizar el papel de CD38 en la actividad eléctrica miocárdica estudiando desde el PA celular hasta el ECG de superficie y su posible impacto en arritmias ventriculares producidas por isquemia y reperfusión. Por lo tanto, este trabajo, además de desarrollar y poner a punto una nueva técnica de experimentación a nivel nacional, como lo es el registro del potencial de acción de corazones aislados de ratones, aporta información novedosa acerca de procesos fisiológicos y fisiopatológicos vinculados a un tema de impacto en la salud como es la cardiopatía isquémica y muerte súbita.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el papel de CD38 en la actividad eléctrica miocárdica y su rol en la susceptibilidad arrítmica.

Objetivos específicos

- 1. Determinar si CD38 contribuye a la morfología del potencial de acción (PA) murino registrando la actividad eléctrica a nivel celular de corazones aislados enteros:
 - 1.a. Comparar el PA de corazones aislados de ratones WT y CD38KO.
 - 1.b. Comparar el efecto del estímulo adrenérgico en el PA de corazones aislados de ratones WT y CD38KO.
 - 1.c. Analizar el efecto de la inhibición aguda de CD38 en el PA miocárdico de ratones WT en condiciones basales.

- 2. Evaluar el rol de CD38 en la frecuencia cardíaca y la susceptibilidad a arritmias por isquemia y reperfusión *in vitro*:
 - 2.a. Comparar la frecuencia cardíaca espontánea de corazones aislados de ratones WT y CD38KO.
 - 2.b. Comparar la respuesta de los corazones aislados de ambas cepas ante la injuria provocada por isquemia global y reperfusión, con especial búsqueda y comparación de arritmias malignas.

- 3. Evaluar la manifestación electrocardiográfica de CD38 y su rol en modelos de arritmias por isquemia *in vivo*.
 - 3.a. Estudiar la actividad eléctrica cardíaca *in vivo* de ratones WT y CD38 KO mediante ECG de superficie, analizando y comparando la FC y los distintos componentes del trazado.
 - 3.b. Comparar la respuesta arrítmica ante un modelo de infarto por sobrecarga adrenérgica *in vivo* mediante ECG de superficie de ratones WT y CD38KO.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron de acuerdo a los protocolos de experimentación aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de la República (n° 70153-001069-15, 70153-000388-17 y 70153-000673-18).

Modelo biológico.

Se utilizaron ratones adultos, machos de la cepa C57BL/6 salvajes (wild type, WT) y que no expresan CD38 (CD38 knock out, CD38KO). Los ratones fueron criados en el bioterio del Instituto Pasteur Montevideo (UATE) y trasladados al bioterio de Facultad de Medicina (URBE) donde permanecieron alojados hasta el momento del experimento.

Registro de la actividad eléctrica cardíaca in vitro.

Eutanasia y disección

Quince minutos previos a la eutanasia se inyectaba heparina sódica subcutánea en una concentración de 8000 UI/kg (0.1 ml de una solución de dilución de 2500 UI/ml) con el fin de evitar la formación de trombos durante el procedimiento. El método de eutanasia en todos los casos fue la dislocación cervical que provoca un paro cardiorrespiratorio inmediato. Seguidamente se procedía a fijar el animal por sus cuatro miembros. Luego se comenzaba la disección con una incisión subxifoidea y dos grandes incisiones en las líneas axilares anteriores en sentido caudo-craneal para retirar la cara precordial de la parrilla costal y exponer el corazón y los vasos principales. Se tomaba el corazón desde la base con una pinza y con extremo cuidado para no dañarlo se cortaba la aorta y la arteria pulmonar aproximadamente 1,5 mm por encima del origen visible. Finalmente se cortaban las venas cavas y se colocaba el corazón en un recipiente con solución Tyrode a 4°C durante 10 s previo a la canulación de la aorta. Una vez canulado, comenzaba la perfusión (por bomba peristáltica o por gravedad), corroborando visualmente el cambio de color en los vasos coronarios que aseguraba el correcto posicionamiento de la cánula. Inmediatamente se procedía a fijarla atando un hilo alrededor de la aorta canulada (véase *“Técnica de Langendorff”* a continuación).

Técnica de Langendorff

El sistema de perfusión retrógrada de Langendorff fue desarrollado a fines del siglo XIX por el fisiólogo alemán Oskar Langendorff⁽⁴²⁾. Se trata de un método para mantener vivo un corazón de mamífero una vez extraído del animal sacrificado. Esto se logra canulando y ligando la aorta a un sistema de perfusión

(en nuestro caso, por ser corazón de ratón, a través de una aguja calibre 18 G) mediante el cual se perfunde de manera constante con una solución fisiológica haciendo que ésta cierre la válvula aórtica por diferencia de presión y circule en su totalidad a través del árbol coronario. Esto permite el aporte constante de oxígeno y nutrientes a todo el tejido miocárdico de forma similar a la que presenta dentro del organismo. La solución utilizada para la perfusión basal fue Tyrode, cuya composición es (mmol/L): NaCl (140); KCl (5,4); MgCl₂ (1); CaCl₂ (2); NaH₂PO₄ (0,33); glucosa (10) y como buffer HEPES (10).

La perfusión puede hacerse por bombeo activo a través de una bomba peristáltica (método con flujo controlado) o por gravedad (método con presión controlada) colocando el recipiente con la solución a una cierta altura respecto al corazón en función a la presión hidrostática requerida.

En la descripción original el control de la temperatura se logra calentando la solución de perfusión en baño maría a 37°C y colocando el corazón rodeado por un recipiente de vidrio templado. En nuestro caso, se colocó el corazón en un recipiente con una celda termoeléctrica (placa Peltier) en la base. Una vez colocado el corazón, el recipiente era llenado con solución fisiológica que se calentaba a través de la placa Peltier y por consiguiente también lo hacía el corazón. En la figura 10 se muestra uno de los corazones durante la perfusión.

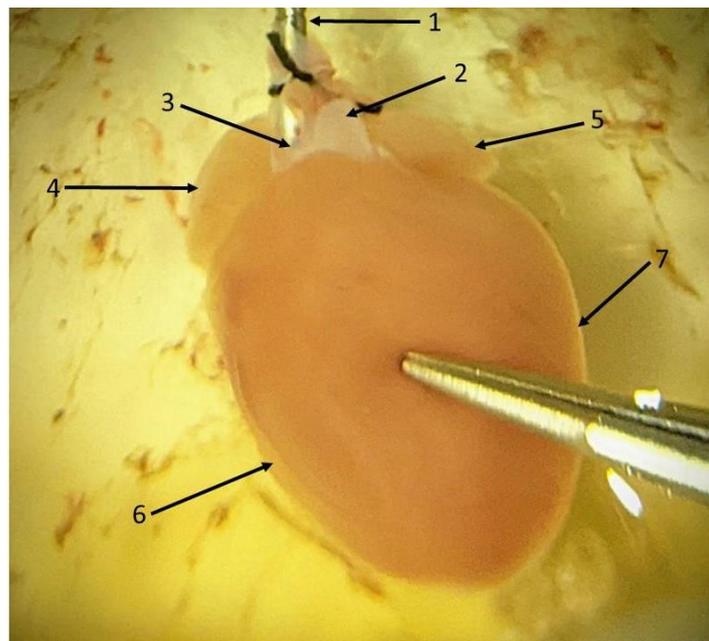


Figura 10. Fotografía de un corazón aislado de ratón. 1. cánula de perfusión, 2. arteria pulmonar, 3. aorta atada con hilo a la cánula, 4. aurícula derecha, 5. aurícula izquierda, 6. ventrículo derecho, 7. ventrículo izquierdo.

El recipiente contaba con un sensor de temperatura que se conectaba a un termostato para mantener la temperatura cercana a los 37°C durante todo el experimento. La temperatura fue registrada de forma constante mediante un termómetro digital para corroborar que las oscilaciones se mantenían dentro del rango establecido como aceptable para nuestro sistema (36.5°C - 37.5°C). En la figura 11 se puede ver un trazado del registro de temperatura.

Sistema de registro

Registro del electromiograma del corazón aislado

La actividad eléctrica cardíaca del corazón aislado se evaluó realizando electromiogramas bitópicos en corazones perfundidos con flujo controlado (3 ml/min). Para ello se confeccionaron dos electrodos de plata de menos de 1 mm de diámetro. Uno de ellos se introducía dentro de la cavidad ventricular izquierda mediante una incisión en la aurícula izquierda y el otro permanecía dentro del baño que contenía el corazón. Los electrodos soldados a un cable se conectaban a un amplificador FLA01, el amplificador a una tarjeta convertora análogo-digital (A/D) National Instrument USB-6008 y ésta a un ordenador. El software utilizado para la adquisición de los datos fue desarrollado en DasyLab. La frecuencia de muestreo fue de 1 KHz. En ninguno de estos experimentos se utilizó estimulación eléctrica, sino que se registró la actividad espontánea del corazón aislado.

Para disminuir el ruido por corriente alterna y radiofrecuencia se colocó un tercer electrodo dentro del baño conectado a tierra. En la figura 11 se puede ver un ejemplo del trazado del electromiograma.

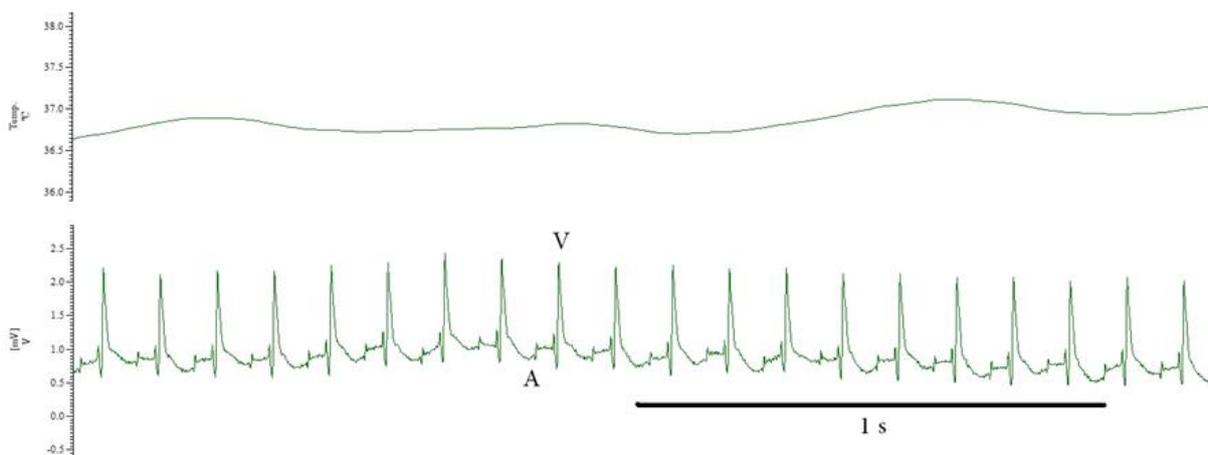


Figura 11. Registro en simultáneo de temperatura (superior) y electromiograma intracavitario (inferior) de corazón aislado de ratón. Registro obtenido de un ratón WT. A: electrograma auricular V: electrograma ventricular.

Registro de potencial de acción en corazón entero.

Dispositivo experimental

Para el registro de potencial de acción (PA) miocárdico en corazón entero fue necesario desarrollar y montar un nuevo setup en el laboratorio de Fisiología Cardiovascular de la Facultad de Medicina, UdelaR (figura 12). Para entrenarme tanto en la instalación del dispositivo como en el uso de la técnica y el análisis de los datos, realicé una pasantía en el laboratorio del Dr. Escobar en la Universidad de California (UC Merced). Los registros fueron hechos in vitro mediante el sistema de perfusión Langendorff mencionado anteriormente. Sin embargo, se adoptó un sistema de soporte, registro y estimulación distinto con las mismas características al usado en la pasantía.

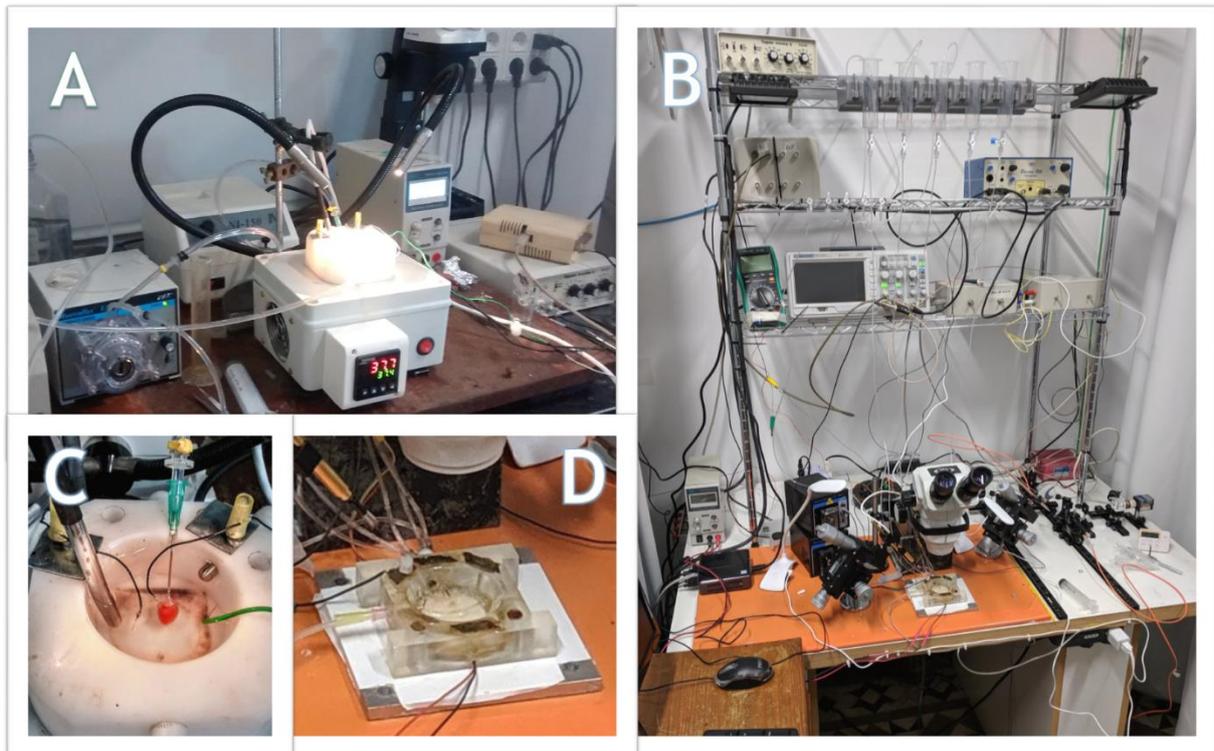


Figura 12. Dispositivos para realizar los experimentos de corazón aislado. A: Setup usado para registro del electromiograma. B: setup confeccionado para registro intracelular. C y D: Ampliación de la cámara donde se coloca el corazón en A y B respectivamente.

Uno de los cambios necesarios fue el sistema de perfusión, pasando de ser perfusión por flujo controlado a ser perfusión por presión controlada. Para ello en lugar de una bomba peristáltica se utilizaron jeringas de 50 ml fijadas a una altura de aproximadamente 80 cm del corazón para permitir el flujo por gravedad. Así se ubicaron 5 de estas jeringas en paralelo para permitir la perfusión con distintas soluciones en un mismo experimento. Las jeringas estaban conectadas mediante llaves de triple vía a tubuladuras por las cuales bajaba la solución. Estas tubuladuras a su vez estaban

conectadas a través de un "manifold" (colector de túbulos múltiples) en su extremo distal a la aguja con la que se canulaba la aorta. Previo a cada experimento se procedía a cebar con la solución correspondiente cada una de las tubuladuras de manera que se obtenía una perfusión inmediata cada vez que se abría la llave de triple vía requerida.

El registro se logró a través de microelectrodos de vidrio confeccionados en el laboratorio con un estirador de micropipeta (modelo 753, Campden Instruments Limited,), configurado para lograr una resistencia interna de 10-20 M Ω a partir de tubos de vidrios de 70 mm de largo, 1 mm de diámetro externo y 0.75 mm de diámetro interno (TW100F-3, World Precision Instruments). Los microelectrodos eran llenados completamente con solución KCl 3 M y conectados mediante un "holder" o soporte a un amplificador de alta impedancia de entrada (Electro 705, World Precision Instruments). Antes de comenzar con el experimento los microelectrodos eran testeados en el sistema para corroborar la resistencia interna necesaria. El microelectrodo se sujetaba a un micromanipulador adherido a la mesada de trabajo con el que se logran movimientos extremadamente finos en todas las direcciones.

El amplificador se conectaba a una tarjeta convertora (A/D) diseñada y fabricada en conjunto con el Dr. Ariel Escobar y posteriormente a un osciloscopio digital (SDS 1052DL+, Siglent,) en el que logramos ver el PA de forma continua. Previo a cada introducción del microelectrodo en la célula se calibraba el osciloscopio para obtener una línea de base de valor cero. El osciloscopio finalmente se conectaba a la computadora para la adquisición de los registros. El software utilizado para la adquisición fue diseñado en una plataforma en base LabVIEW; National Instruments. Para el registro de PA se utilizó una frecuencia de muestreo de 25 KHz y un filtro pasa bajo de acuerdo a la necesidad. La actividad eléctrica era registrada durante los intervalos de interés de forma continua en ventanas consecutivas de 1 segundo de duración.

Sistema de estimulación

La estimulación eléctrica se logró mediante un estimulador (S44, Grass). Este era conectado mediante dos electrodos de aguja confeccionados en el laboratorio con los que se pinchaba el vértice cardíaco separados por 1 mm. Se aplicaron pulsos cuadrados no superiores a 10 V de amplitud y 2 ms de duración a frecuencias determinadas en cada maniobra.

Blebistatina

El registro celular del PA miocárdico requirió el agregado de blebistatina en la perfusión. La blebistatina es un fármaco que permite la disociación electromecánica de los miocardiocitos, lo que facilita el registro eléctrico transmembrana a nivel celular dado que evita el movimiento del preparado en cada latido permitiendo la fijación del electrodo a la célula. Específicamente, la blebistatina inhibe

la miosina II uniéndose al dominio motor estabilizándola en un estado desconectado de la actina y evitando la generación de fuerza motora.⁽⁴³⁾

Una vez canulado el corazón, se comenzó la perfusión con Tyrode convencional y se inició el calentamiento mediante el Peltier hasta lograr una temperatura de 28°C, momento en el cual se comenzó la perfusión con blebistatina diluida en el Tyrode a una concentración de 10 µM.

Una vez que se constataba visualmente la ausencia de actividad mecánica y se alcanzaba la temperatura de 37°C, se procedía al registro del PA mediante el sistema de registro mencionado. Para ello se aproximaba e introducía el microelectrodo a la cara anterior del ventrículo izquierdo (VI) con el micromanipulador hasta que se lograba ver un descenso de la línea de base en el osciloscopio y oscilaciones de potencial que representan los PA. Pequeños movimientos posteriores eran necesarios para lograr una línea de base de -90 a -80 mV (potencial de membrana en reposo) que nos aseguraba un adecuado posicionamiento intracelular del microelectrodo.

Para disminuir el ruido por frecuencia alterna y radiofrecuencia se confeccionó una jaula de Faraday que se colocaba alrededor de la cámara de baño y era conectada a tierra.

Antes de proceder a la estimulación y marcapaseo se realizaron registros de potenciales de acción espontáneos y se permitió un período de estabilización a 37° C. La adquisición de datos se realizó en ventanas de 1 segundo y durante 20 a 60 segundos según conveniencia en cada una de las maniobras.

Registro de la actividad eléctrica cardíaca *in vivo*.

El registro de la actividad eléctrica cardíaca *in vivo* se hizo mediante un registro bitópico similar derivación DII del ECG de superficie. Así, se puede realizar un análisis global de la función eléctrica cardíaca desde la superficie corporal, usando todo el cuerpo del animal como conductor eléctrico. Esta forma de registro presenta algunas virtudes como permitir la evaluación de la electrofisiología cardíaca en un contexto fisiológico con la interacción del corazón con el resto del organismo, y la de generar datos que pueden ser comparados con los obtenidos de forma habitual en la práctica clínica. Además, el hecho de que sea *in vivo* facilita el no tener que emular de forma artificial las características del medio interno mediante soluciones y estímulos externos.

Registro de ratones anestesiados.

Para la evaluación de la actividad eléctrica cardíaca *in vivo* se procedió en primera instancia a realizar un registro en ratones anestesiados. Esto permite la obtención de datos de forma rápida y poco invasiva, evitando la posible fuente de ruido de campo lejano producto del movimiento del animal. El fármaco utilizado tanto para la inducción anestésica como para el mantenimiento, fue el isoflurano. El registro eléctrico fue bitópico, colocando un electrodo de aguja en el tejido subcutáneo a nivel de

la axila derecha y otro a nivel de pliegue inguinal izquierdo para conformar una derivación símil DII electrocardiográfica.

La inducción anestésica se hizo colocando a los ratones dentro de una caja hermética adecuada a su tamaño, la cual tenía una serie de conexiones por donde se suministraban gases de composición conocida al tiempo que permitía su evacuación a un sistema de filtros. Una vez cerrada la caja comenzaba la perfusión con un solución gaseosa de 97 % O₂ y 3 % de isoflurano (Terrel® Laboratorio Libra), con un flujo de 1 L/min, que se mantenía durante 3 minutos. Posteriormente, constatando que el ratón estaba completamente anestesiado se lo colocaba en decúbito dorsal sobre una plancha de plástico donde se realizaba el registro eléctrico, fijándolo desde sus extremidades y colocando el hocio dentro de una tabuladora adaptada a su tamaño por donde se continuaba suministrando el anestésico de mantenimiento. En este caso el flujo para el mantenimiento anestésico es de 0.5 L/min a una concentración de 98 % de O₂ y 2 % de isoflurano, durante todo el registro. Inmediatamente se procedía a la colocación de los electrodos de aguja a nivel subcutáneo.

Los electrodos estaban conectados a un amplificador, tarjeta A/D y ordenador tal como fue descrito para el electromiograma de corazón aislado y el registro se hizo de la misma forma.

Una vez finalizado el registro se cortaba el suministro de isoflurano y se colocaba el ratón nuevamente en su caja de transporte que se encontraba sobre un dispositivo de calentamiento externo mientras se esperaba que el animal recuperara completamente la vigilia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SOBRE EL ROL DE CD38 EN EL POTENCIAL DE ACCIÓN

Objetivos (a y b)

- 1 a. Comparar el PA de corazones enteros aislados de ratones WT y CD38KO.
- 1 b. Determinar el efecto del estímulo adrenérgico en la morfología y duración del PA en función de la presencia o ausencia de CD38 (WT vs CD38KO).

Hipótesis

CD38 es una enzima involucrada en el manejo de Ca^{++} celular y como tal podría modificar las corrientes iónicas celulares durante el ciclo cardíaco. En este sentido pensamos que su efecto en la recaptación de Ca^{++} reticular contribuye a la reducción de la APD_{90} . Sin embargo, como se ha descrito que existen mecanismos compensadores en los ratones KO para CD38 que tienden a restaurar la homeostasis, no esperamos encontrar diferencias significativas en la morfología de los PA en condiciones basales. Por el contrario, cuando se ejerce un estímulo adrenérgico como desequilibrio homeostático, la respuesta de ambos tipos celulares será distinta. Nuestra hipótesis plantea que los cambios esperados por la estimulación adrenérgica (como la disminución de la APD_{90}) serán más pronunciados en el PA del corazón WT que en los del corazón CD38KO.

Experimento

Registro del PA miocárdico de VI en corazón aislado en condiciones basales y luego del estímulo adrenérgico.

Animales:

Se usaron 5 ratones WT y 6 ratones CD38KO, todos machos de 1 año de edad. Se tomó como criterio de exclusión de los corazones un tiempo de isquemia previo a la canulación mayor o igual a 5 minutos, o descanulación durante el experimento. Por este motivo, se excluyeron de los resultados finales 1 corazón WT y 1 corazón KO, quedando un N total de 4 WT y 5 KO.

Protocolo:

Se realizaron de a dos experimentos por día; 1 WT y 1 KO. Los animales eran transportados desde el bioterio de la facultad minutos antes del experimento, manteniendo la temperatura ambiente en 24°C. La eutanasia, disección, canulación y perfusión fueron realizadas como se describió previamente. Luego de ver que la blebistatina ejerce su efecto y cesan las contracciones se procedió a colocar los electrodos de estimulación en la punta del VI mientras se calentaba la solución que baña el corazón. Una vez se alcanzaron los 37° C se introdujo el microelectrodo de vidrio hasta obtener registro como fue descrito en la sección de Materiales y métodos. El sitio de registro fue el mismo durante todo el experimento.

Primero se registró la actividad eléctrica espontánea. Dado que la APD depende en gran medida de la FC, como se mostrará más abajo, fue necesario “marcapasear” el corazón para homogeneizar esta variable. La estimulación eléctrica se realizó con pulsos cuadrados de voltaje de 2 ms de duración y una amplitud del doble del umbral de captura previamente determinado (máxima amplitud 10 V). Luego se realizaron las siguientes maniobras:

- Registro del PA en estado basal “marcapaseando” a una FC de 8 Hz. Se corrobora el 100% de captura.
- Inicio de estimulación con isoproterenol a una concentración de 3×10^{-7} M. Registros sucesivos durante 10 minutos manteniendo el marcapaseo a 8 Hz y corroborando el 100% de captura.
- Incrementos sucesivos de la frecuencia de estimulación y registro a 9, 10, 12, 14, 16 y 18 Hz durante 20 segundos a cada frecuencia.

El tiempo total de cada experimento no superó los 90 minutos. Luego de finalizar, los corazones eran pesados y descartados.

Procesamiento de los datos

Una vez adquiridos los datos se procesaron en el programa Trace Watcher, escrito en LabVIEW. Primero se seleccionan los registros de interés, luego se eliminan las ventanas con PA alterados por movimiento del electrodo y se normalizan todos los PA para que el voltaje mínimo y el máximo de todos los potenciales correspondan a 0 y 1 respectivamente. Una vez logrado esto, se midió la APD al 30 y 90 % de la repolarización (APD_{30} y APD_{90}), de cada uno de los PA dentro del registro seleccionado. Por último, se promediaban estos PA con lo que se eliminaba el ruido de la corriente alterna y de radiofrecuencia.

El procesamiento estadístico de los valores fue hecho en Graph Pad Prism 6 y las gráficas en Origin 8. Para obtener las imágenes de los PA se promediaron los registros obtenidos durante 20 segundos mientras que para cuantificar y comparar los PA se tomaron los valores de APD_{30} y APD_{90} de los primeros 20 PA de cada uno de los 4 corazones WT y 5 KO, como se ha hecho en otros trabajos publicados con la misma técnica⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾⁽⁴⁶⁾. Esto se hizo tanto en estado basal como con el estímulo adrenérgico.

Los test estadísticos utilizados fueron Test de T para la masa del corazón y el peso de los ratones, el test no paramétrico de Mann-Whitney para la comparación de la APD_{90} y APD_{30} entre ambas cepas y test de Wilcoxon pareado cuando se compararon estas variables antes y después del estímulo adrenérgico. Se expresan los resultados en valores de media \pm DE para las variables relacionadas con masa y valores de media \pm EE para las APD.

Resultados y discusión

El peso promedio de los animales fue de 35.2 ± 5.8 g para los ratones WT y de 33.0 ± 2.3 g para los KO sin diferencia significativa entre ambos grupos. El peso promedio de los corazones aislados fue de 270 ± 44 mg para los ratones WT y 260 ± 23 mg para los KO, mientras que la relación peso corazón/peso corporal fue en promedio 7.7 ± 1.4 mg/g para los WT y 7.9 ± 0.8 mg/g para los KO. Ninguna de estas variables presentó diferencias significativas entre ambas cepas. Dos autores han expresado esta relación con valores un tanto menores, como Takahashi⁽³¹⁾ con 4.24 mg/g para WT y 4.88 mg/g para los KO y Lu Gan⁽⁴⁷⁾ con 4.44 y 4.56 para WT y KO respectivamente. Una posible explicación para relaciones más altas en nuestro caso puede ser por tiempos de perfusión más prolongados con mayor edema tisular en nuestros experimentos. Por su parte, la edad de los animales usados por estos autores era de 3 a 9 meses para uno y de 5 a 6 meses para el otro, a diferencia de los usados por nosotros de 12 meses. Otro hecho a destacar al respecto es que los valores de relación expresados por Takahashi presentan diferencias estadísticamente significativas entre WT y KO pero no se discuten posibles explicaciones de las mismas. Por el contrario, para Lu Gan no existe tal diferencia al igual que en nuestros resultados.

En la figura 13 se puede ver un PA miocárdico de VI de un ratón WT (negro) superpuesto a uno de un ratón CD38KO (rojo) del mismo sector de miocardio a una FC de 8 Hz. Se trata del primer registro de PA miocárdico de esta cepa murina. Otros autores que han trabajado con ratones CD38KO, han estudiado tanto aspectos del metabolismo celular y el manejo del $Ca^{++(39)(36)(10)}$ como las consecuencias mecánicas del infarto⁽²⁰⁾⁽³⁸⁾⁽³⁷⁾⁽⁴⁸⁾. Sin embargo, no se encuentran datos publicados acerca de la electrofisiología celular en estos ratones. Además, nuestro registro de PA tiene la virtud de haberse realizado en corazón entero, sin las alteraciones de la arquitectura y fisiología que provocan los registros en células aisladas habituales para medir PA. Los datos obtenidos se muestran en la figura 14 y en la tabla 1. Se destaca que los valores se encuentran dentro del rango publicado por otros autores que utilizaron la misma técnica en corazones aislados de ratones C57Bl6.

CONDICIÓN	N/n	APD ₃₀ (ms) [Media ± EE]	APD ₉₀ (ms) [Media ± EE]
WT control	4/80	6.04 ± 0.12	75.77 ± 0.93
WT ISO	4/80	11.11 ± 0.27	67.94 ± 0.91
CD38KO control	5/100	5.13 ± 0.20	75.64 ± 0.95
CD38KO ISO	5/100	7.69 ± 0.36	73.76 ± 0.74

Tabla 1. Duración del potencial de acción al 30% y 90% de la repolarización (APD₃₀ y APD₉₀ respectivamente) en corazones aislados de ratones WT y CD38KO en condiciones control y durante la estimulación adrenérgica con isoproterenol (ISO). N: número de ratones por grupo, n: número de potenciales de acción considerados por grupo. Las diferencias significativas se muestran en las figuras 14 y 16.

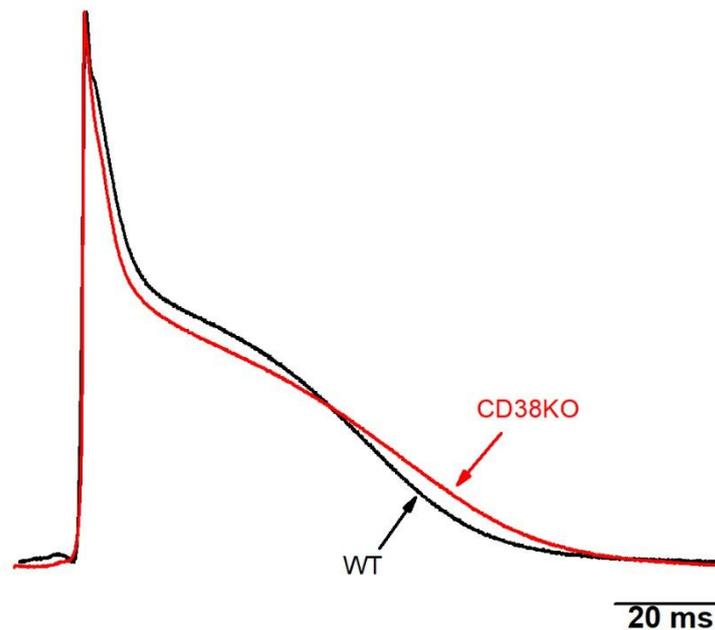


Figura 13. Potencial de acción de corazón aislado. Se superponen 2 potenciales de acción normalizados (para voltaje) representativos de los obtenidos en corazones aislados de ratones control (WT, negro) y modificados genéticamente (CD38KO, rojo).

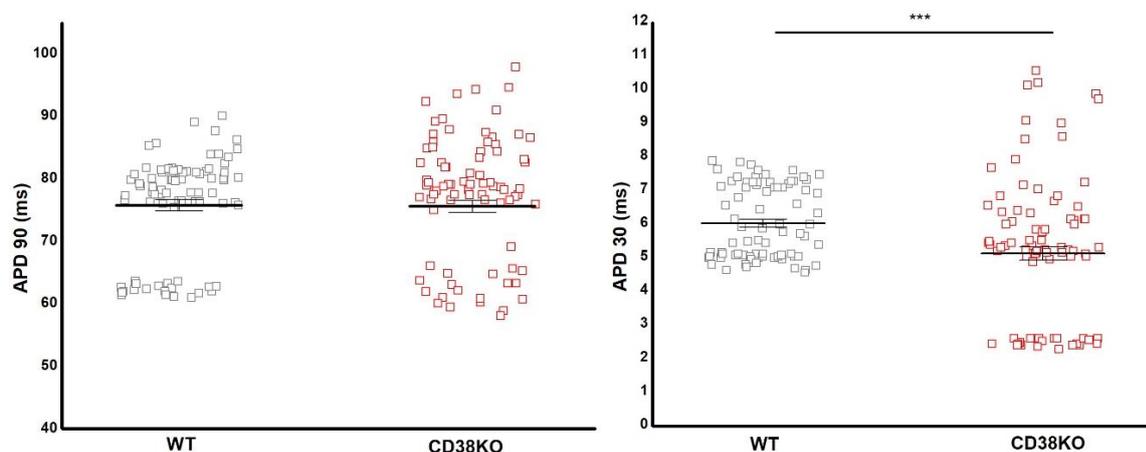


Figura 14. Valores de duración del potencial de acción. Se grafican las duraciones del potencial de acción al 30% (APD_{30}) y 90% (APD_{90}) de la repolarización (izquierda y derecha respectivamente). En cada gráfica, los puntos muestran los valores absolutos control de 20 PA consecutivos en cada corazón obtenidos en el grupo WT (negro) y en el grupo CD38KO (rojo). La dispersión entre los puntos refleja la variación entre los distintos corazones (ver texto). Se muestra la media y el EE para cada nube de puntos (ver tabla 1 para más datos).

A simple vista se aprecian diferencias morfológicas entre ambos potenciales con una APD_{30} menor para los corazones CD38KO y una APD_{90} mayor. Sin embargo, cuando se toman en conjunto los datos de todos los ratones, no es distinta estadísticamente la APD_{90} de los salvajes comparado con los que no expresan CD38 (75.77 ± 0.93 ms vs 75.64 ± 0.95 ms [valor $p = 0.79$]). En cuanto a la APD_{30} , resulta menor para los ratones CD38KO que para los WT con una diferencia que, aunque es sutil, representa significancia estadística (6.04 ± 0.12 ms para WT vs 5.13 ± 0.20 ms para KO con un valor $p = 0.0002$). No obstante, se nos plantea la interrogante sobre la significancia fisiológica de estas diferencias en base a dos hechos. Por un lado, la distribución de la nube de puntos parece demasiado amplia, lo que evidencia una amplia variabilidad dentro de cada grupo en especial para los ratones CD38KO como se aprecia en la figura 14. Por otro, se han descrito diferencias marcadas entre la APD_{30} de miocardiocitos subepicárdicos y subendocárdicos de un mismo corazón⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁴⁾, así como entre distintas regiones del subepicardio⁽⁴⁹⁾⁽⁵⁰⁾. Dado que por las características de nuestra forma de registro no es posible saber con exactitud si estamos registrando una célula subendocárdica o una subepicárdica podríamos estar ante una fuente de error producida por esta variabilidad más que un efecto mediado por CD38. Sin embargo, también existe una amplia literatura (aunque en ningún caso para CD38KO) en donde se describen y comparan PA registrados tanto en preparados de corazón entero con la misma técnica como de células aisladas, y que expresan sus resultados sin reparar en las posibles diferencias regionales⁽⁵¹⁾⁽⁵²⁾⁽⁵³⁾.

Un hecho a tener en cuenta cuando se trabaja con cepas de ratones con delección genética de una proteína es la compensación fisiológica que puedan generar para contrarrestar su déficit. En el caso

de la proteína CD38, se ha demostrado la mayor expresión de SERCA2a y la mayor relación SERCA/PLB⁽³¹⁾⁽⁴⁷⁾ hecho reproducido por nuestro grupo de trabajo y descrito también para corazones de ratones que expresan CD38 sin actividad catalítica⁽⁴¹⁾. De esta manera, considero que el efecto final es una compensación ante la reducción de la actividad de SERCA generada por la ausencia de ADPRc en condiciones basales. Así lo demuestran Takahashi et al, trabajando in vitro con músculo papilar⁽³¹⁾. En referencia a los músculos aislados de ratones machos, estos autores muestran que a temperatura fisiológica no existe diferencia en la amplitud del transitorio de calcio ni de su constante de caída. Sin embargo, a temperatura ambiente, donde ADPRc no actúa⁽²⁹⁾, la compensación mediante aumento en la expresión de SERCA2a de los KO queda manifiesta en la mayor amplitud del transitorio del calcio y mayor velocidad de declive respecto a los WT. Estos mismos cambios en el transitorio de calcio pudimos reproducir en nuestro grupo de trabajo en células aisladas⁽⁴¹⁾. De esta manera, una explicación plausible para la ausencia de diferencias en la APD₉₀ entre ambas cepas es que como se trabajó a temperatura fisiológica, los mecanismos compensadores contrarrestan el efecto de la disminución de ADPRc en los corazones de ratones CD38KO.

Para continuar con la investigación del efecto de CD38 en la fisiología celular miocárdica, se sometió el preparado a un desequilibrio homeostático mediado por un estímulo adrenérgico con isoproterenol. Como fue descrito, de acuerdo a distintos autores, CD38/ADPRc forman parte de la vía de señalización adrenérgica generando una potenciación de la CICR⁽²¹⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁰⁾⁽²⁷⁾⁽³³⁾. En este caso, para poder comparar el efecto del estímulo en ambas cepas, se normalizó el valor de las variables a medir por las medias en la situación control (perfusión con solución Tyrode) en cada corazón. Con ello se evita la variabilidad entre los corazones producto del registro en distintos sectores del miocardio como fue mencionado previamente.

Como se ve en la figura 15, el isoproterenol modifica la morfología del PA mediante un aumento de la APD₃₀ y una disminución de la APD₉₀ de forma independiente a los cambios de la FC (ver tabla 1 y figura 16). Este efecto ha sido reportado previamente en la literatura⁽⁴⁴⁾⁽⁵⁴⁾ y fue reproducido en este caso en los roedores salvajes. Sin embargo, el comportamiento de los ratones CD38KO fue algo distinto. Como se ve en la tabla 1 la APD₃₀ en respuesta a isoproterenol aumentó para los corazones aislados de ratones KO, pero lo hizo en menor medida que en los corazones de ratones WT. Para estos últimos, el aumento fue de un 86 % (comparado con un 54 % para los KO). En cuanto a la APD₉₀, el descenso para los WT fue de un 10 %, similar a lo expresado por otros autores⁽⁴⁴⁾⁽⁵⁴⁾, mientras que para los KO no hubo diferencias. Con estos resultados se rechaza la hipótesis nula de que el efecto de la estimulación adrenérgica en el PA es igual en los corazones que expresan CD38 y en los que no. Como era esperable de acuerdo a lo que se planteó en la hipótesis alternativa, el efecto de la estimulación adrenérgica fue menor en los corazones CD38KO.

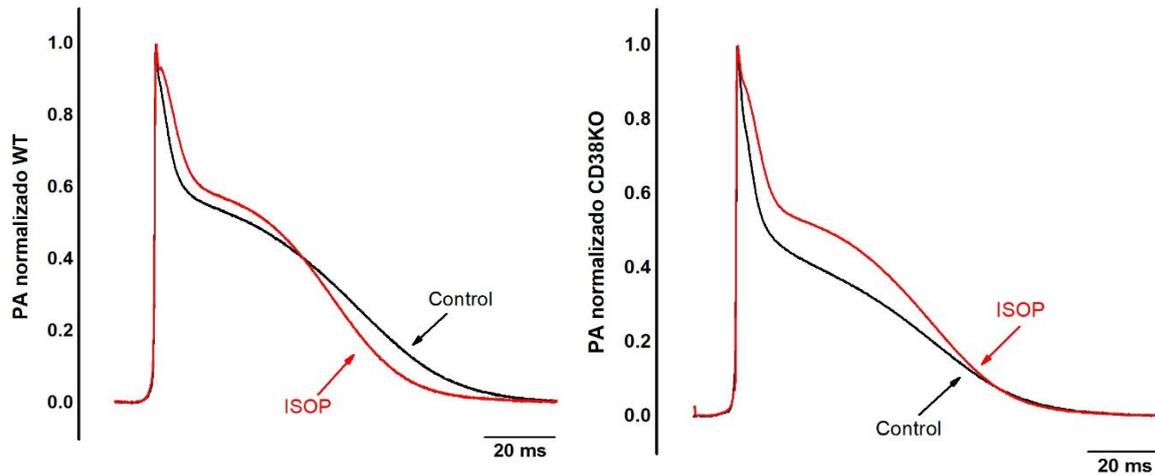


Figura 15. Cambios del potencial de acción ante el estímulo adrenérgico. Se muestran los potenciales de acción representativos marcaperas con valores de amplitud normalizados en corazones el grupo WT (izquierda) y CD38KO (derecha) en situación control (trazado de color negro) y en respuesta a isoproterenol (trazado rojo).

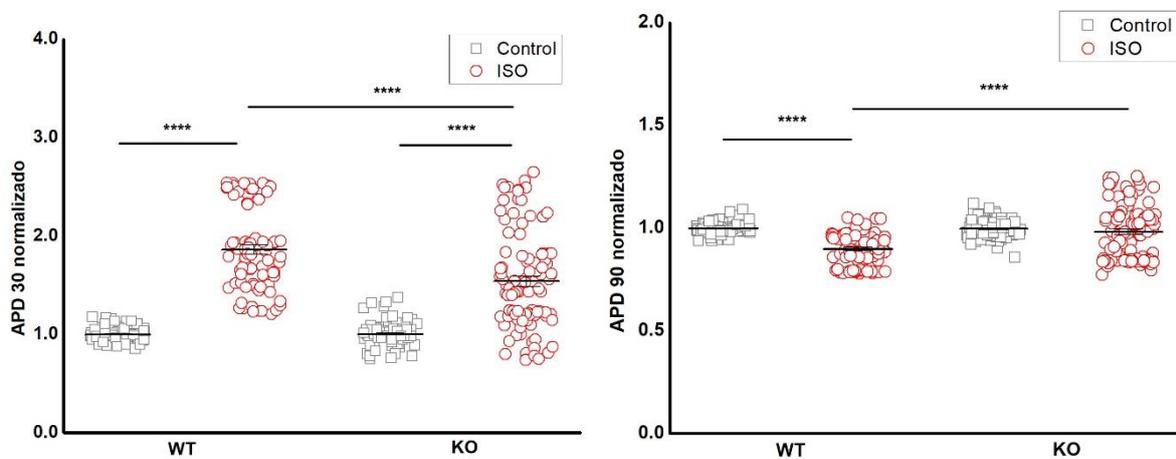


Figura 16. Duración del potencial de acción en el grupo WT y CD38KO en situación control y ante el estímulo adrenérgico. Se grafica los valores normalizados de duración del potencial de acción al 30% (APD₃₀) y 90% (APD₉₀) de la repolarización (derecha e izquierda respectivamente). En cada gráfica, los puntos negros muestran los valores obtenidos en la situación control y los rojos ante el agregado de isoproterenol. Se muestra la media y el EE para cada nube de puntos (ver tabla 1 para más datos). ****: $p < 0.0001$ para el test de Mann-Whitney (comparación entre grupos con isoproterenol) y para el test de Wilcoxon (dentro de cada grupo, control vs isoproterenol). ISO = isoproterenol.

El aumento en el APD₃₀ se ha atribuido al incremento en la corriente de I_{CaL} generado por la estimulación adrenérgica que según trabajos recientes ya está activa en la fase 1 del PA⁽⁴⁶⁾. Según estos autores el enlentecimiento de la pendiente de descenso de la fase 1 generada por isoproterenol se reduce en presencia de bloqueadores específicos de los CCL. Existe menos evidencia reportada en cuanto al efecto del isoproterenol en la fase 2 y 3 del PA. Un mecanismo planteado por algunos

autores⁽⁵⁵⁾⁽⁵⁴⁾ es el aumento de la corriente IKs lo que contribuye a un retorno al potencial de membrana en reposo más precoz que en condiciones basales. Por su parte, Aguilar-Sanchez et al.⁽⁴⁴⁾, plantean que la fase de meseta murina es dependiente de la corriente entrante de Na⁺ a través del NCX, por lo que a mayor [Ca⁺⁺]_i, mayor será la amplitud de la misma. Lo mismo afirman Marcela Ferreiro y col.⁽⁴⁹⁾, demostrando que es un fenómeno influenciado por la temperatura. Si bien es ampliamente conocido que la estimulación adrenérgica aumenta la amplitud del transitorio de calcio (lo que explica su efecto inotrópico positivo) también aumenta la actividad de SERCA2a, enzima que compete por el calcio disponible con el NCX a nivel citosólico. Esta activación de SERCA2a acelera la constante de caída de calcio citosólico dado que es recapturado hacia el RS con mayor eficiencia⁽¹⁸⁾. SERCA2a es potenciada por la presencia de ADPRc como lo describen Park⁽¹⁷⁾, Lukyanenko⁽¹⁶⁾ y Takahashi⁽³¹⁾, y la concentración de ADPRc aumenta con el estímulo adrenérgico, un fenómeno que está abolido en corazones CD38KO⁽³³⁾⁽²⁷⁾⁽²¹⁾. De este modo, la duración del transitorio de Ca⁺⁺ sería mayor en los corazones KO producto de una menor actividad relativa de SERCA2a en presencia de isoproterenol. Teniendo en cuenta estos fenómenos planteamos que la ausencia de la vía CD38/ADPRc no permite el aumento esperable de la tasa de recaptación de Ca⁺⁺ reticular a través de SERCA bajo un estado de estimulación adrenérgica lo que determina una mayor activación de la corriente de Na⁺ entrante a través del NCX (figura 17). Este aumento de la corriente entrante contrarrestaría la disminución de la APD₉₀ generado por IKs durante la estimulación adrenérgica.

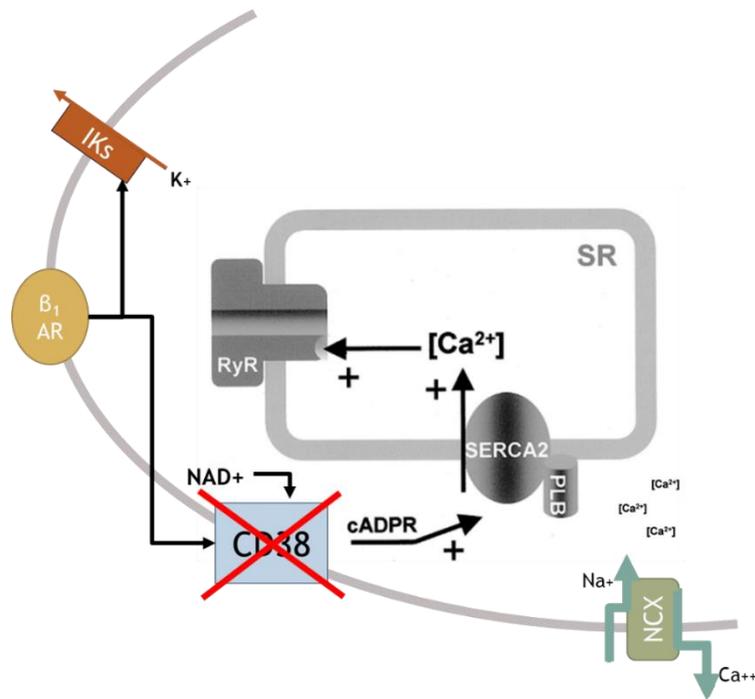


Figura 17. Esquema que muestra una posible explicación para la respuesta diferente al isoproterenol de los corazones aislados de ratones CD38KO. Creado en base a imagen tomada de ⁽⁴⁾.

Objetivos (c)

1.c. Analizar el efecto de la inhibición aguda de CD38 en el PA miocárdico de ratones WT en condiciones basales.

Hipótesis

Como se ha reportado que el producto enzimático de CD38, ADPRc, aumenta la recaptación de calcio a nivel reticular, la inhibición aguda de esta proteína en ausencia de mecanismos compensadores crónicos disminuirá la tasa de recaptación y determinará un alargamiento del PA en las fases 2 y 3. Esto lo veremos como un aumento en la APD₉₀, sin cambios en la APD₃₀, en la que no está involucrado el manejo del Ca reticular.

Experimento

Registro del PA miocárdico de VI en corazones enteros de ratones WT en estado basal y luego de 10 minutos de perfusión con 78c.

Animales:

Se usaron 5 ratones WT, todos machos de 3 meses de edad. Se tomaron los mismos criterios de exclusión que en el experimento anterior quedando un N total de 3 corazones.

Protocolo:

Se realizó 1 experimento por día. La canulación del corazón, la perfusión con blebistatina, el calentamiento y la introducción del electrodo fueron realizados tal como se describió en el experimento anterior. El sitio de registro fue el mismo durante todo el experimento. La estimulación eléctrica se realizó con pulsos cuadrados de voltaje de 2 ms de duración y una amplitud del doble del umbral de captura previamente determinado (máxima amplitud 10 V). Luego se realizaron las siguientes maniobras:

- Registro basal: el primer registro era el basal “marcapaseando” el corazón a 6 Hz. Se corroboraba la captura del 100 % de los estímulos en cada experimento.
- Incrementos de FC o “steady state restitution”: se realizaron maniobras sucesivas con frecuencias de estimulación crecientes de 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 Hz, cada una de las cuales se mantuvo durante 20 segundos. Este ciclo era repetido 2 veces para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Los resultados fueron tomados como control para la comparación luego de la inhibición de CD38.
- Perfusión con 78c: La perfusión con 78c se realizó a una concentración de 15,5 μM diluido en Tyrode durante 10 minutos mediante el sistema Langendorff sin “marcapasear” el corazón. Transcurrido este tiempo se volvieron a realizar las maniobras descritas anteriormente mientras se perfundía con 78c.

Una vez finalizadas las maniobras los corazones eran descartados.

Procesamiento de los datos

Una vez adquiridos los datos según se describe en la sección Materiales y métodos, se procesaron en el programa Trace Watcher, escrito en LabVIEW. Para la cuantificación de la APD_{30} y APD_{90} se siguieron los mismos pasos que el experimento anterior. Esto se hizo tanto para los registros control como para los registros con 78c. También se realizaron promedios de los PA adquiridos.

El procesamiento estadístico de los valores fue hecho en Graph Pad Prism 7 y las gráficas en Origin 8. Para obtener las imágenes de los PA se promediaron los registros obtenidos durante 20 segundos mientras que para cuantificar y comparar los PA se tomaron los valores de APD_{30} y APD_{90} de los primeros 20 PA de cada uno de los corazones. El contraste de hipótesis se hizo mediante el test no paramétrico pareado de Wilcoxon. Los resultados se expresan en valores de media \pm EE.

Resultados y discusión

La primera maniobra realizada consistió en una curva de restitución eléctrica. Esto permite estudiar la relación de la morfología del PA con el intervalo diastólico, graficando la APD vs la duración del ciclo.

En este caso se realizó una curva en estado estacionario o “steady state restitution curve” dado que se estimuló de forma continua con trenes de frecuencia creciente, cada uno de 20 segundos de duración. Como se observa en la figura 18, se obtuvo el resultado esperado con un aumento de la APD₃₀ y disminución de la APD₉₀ conforme disminuye el intervalo diastólico (aumento de FC) como ha sido descrito en la literatura⁽⁵⁶⁾. A partir de los 14 Hz de frecuencia de estimulación no se logró el 100 % de captura, por lo que el análisis se hizo hasta los 12 Hz.

La reproducción de estos resultados que muestran un comportamiento de la electrofisiología de membrana igual a la descrita en modelos matemáticos y empíricos, le otorgan validez tanto a la técnica como al preparado utilizado.

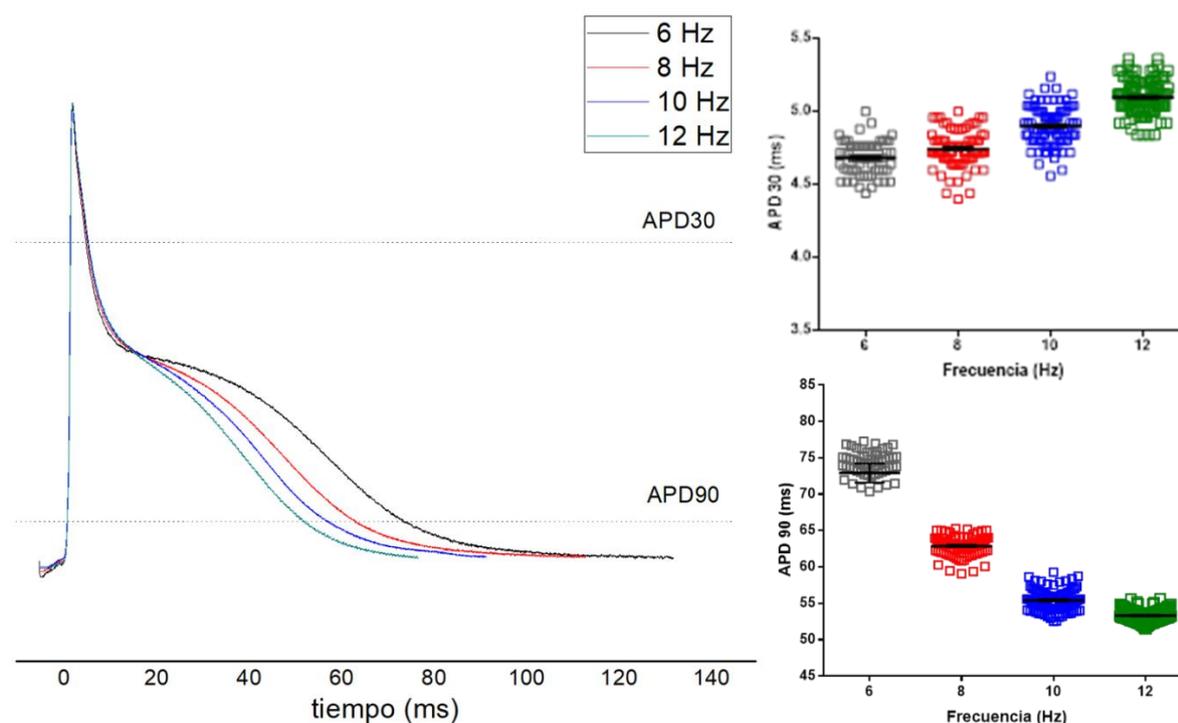


Figura 18. Cambios del potencial de acción dependientes de la frecuencia cardíaca. A la izquierda se muestran los diferentes potenciales de acción normalizados de un corazón aislado ante diferentes frecuencias de estimulación (negro, rojo, azul y verde para 6, 8, 10 y 12 Hz respectivamente). A la derecha se grafica la duración del potencial de acción al 30% (arriba) y 90% (abajo) de la repolarización en función de la frecuencia de estimulación para todos los corazones analizados.

En la figura 19 se puede ver la morfología del PA promedio de un corazón en situación control (negro) y luego de la perfusión con 78c (rojo) estimulado a 6 Hz. En ella se aprecia una modificación del trazado del PA con un aumento de la duración como consecuencia de la perfusión con 78c. En este caso el efecto observado es producto de la inhibición aguda de la actividad enzimática de CD38 y esta maniobra presenta dos ventajas fundamentales. Una es que se puede observar el efecto inmediato de la inhibición de CD38 sin la superposición de mecanismos compensadores que involucren la

transcripción génica. La otra ventaja es que solo se ve afectada la actividad enzimática, sin alterar su concentración, ni afectar otras posibles funciones en la homeostasis celular. Estamos mostrando por primera vez el efecto de esta thiazoloquinazolinona sobre el PA miocárdico.

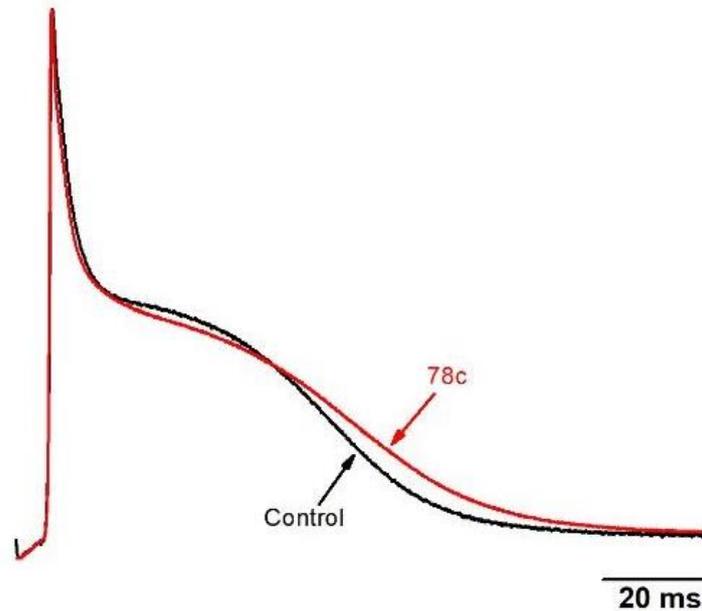


Figura 19. Modificación del potencial de acción ante la inhibición aguda de CD38. Se muestra el potencial de acción normalizado de un corazón aislado de un ratón WT en condición control (negro) y ante el agregado de 78c (rojo).

Analizando todos los datos en su conjunto vemos que la inhibición de CD38 generó un aumento en la APD₉₀ pasando de un valor control de 81.1 ± 0.7 ms a 88.2 ± 0.5 ms (valor $p < 0.0001$). Si bien solo se muestran los resultados con una frecuencia de estimulación de 6 Hz, el aumento de la APD₉₀ se vio de forma sistemática en todas las frecuencias de marcapaseo. Si se toman las APD₉₀ normalizadas por el valor control, la inhibición de CD38 generó un aumento del 11 % en esta variable (figura 20). Por su parte, lo que se vio en la repolarización temprana fue algo distinto sin existir un cambio predecible ante la inhibición aguda de la ciclasa. En efecto, los valores de la APD₃₀ control y bajo perfusión de 78c fueron 5.0 ± 0.1 ms vs 5.1 ± 0.1 ms respectivamente y no mostraron diferencia significativa (valor $p = 0.51$).

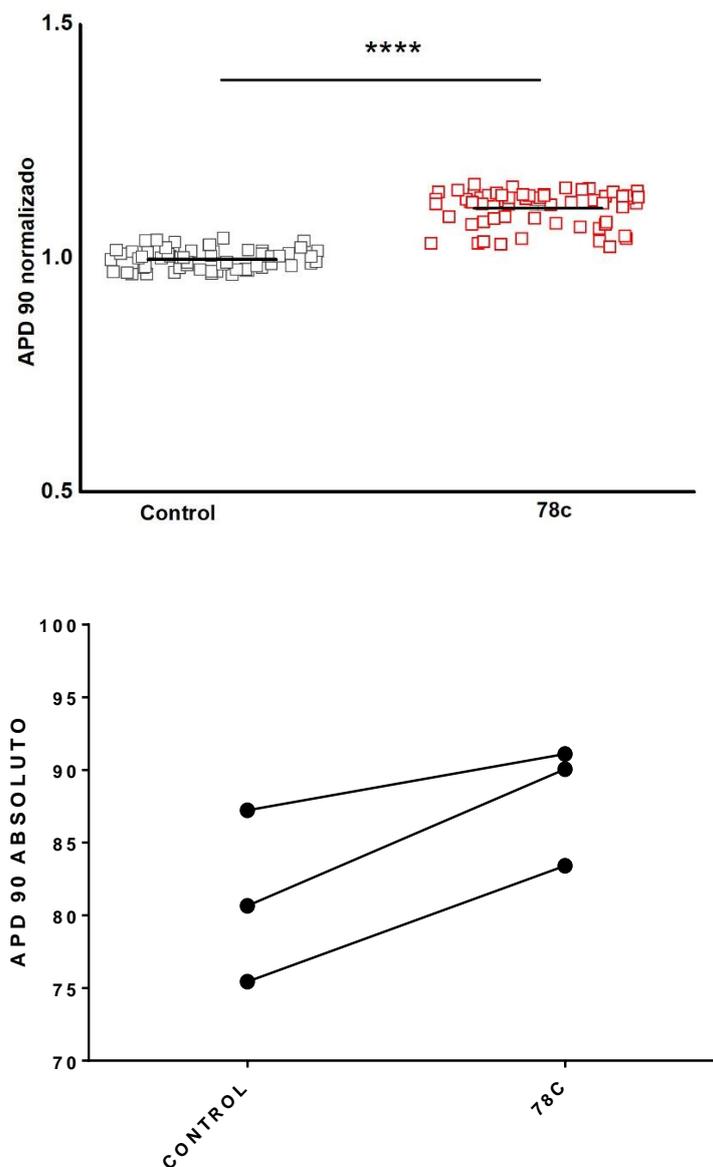


Figura 20. Aumento de la duración del potencial de acción por inhibición aguda de CD38. El gráfico superior muestra los valores (normalizados) de duración del potencial de acción al 90% de la repolarización (APD90) en corazones aislados en situación control (negro) y luego de la perfusión con 78c (rojo). Se muestra la media y el EE para cada nube de puntos constituida por 20 PA de cada corazón. El gráfico inferior muestra el cambio de los valores absolutos de APD90 promediados para cada uno de los 3 corazones WT utilizados en situación control y con 78c.

Los resultados obtenidos son entonces acordes a la hipótesis de trabajo propuesta que plantea un alargamiento del PA por retraso en la repolarización tardía. Como se mencionó previamente, el mecanismo propuesto es una depleción en los niveles de ADPRc con una consecuente regulación en menos de la actividad de la bomba SERCA2a y mayor corriente entrante a través del NCX en las fases 2 y 3 del PA, por aumento en la disponibilidad de Ca^{++} citosólico. Además, la no modificación de la

repolarización temprana sugiere que la I_{CaL} (que contribuye a la fase 1) no estaría afectada y en consecuencia no se alteraría la CICR por esta vía⁽⁴⁶⁾. El efecto demostrado de la inhibición de CD38 junto con el papel de ADPRc en el manejo del calcio reticular (y la interrelación entre las corrientes de membrana y del RS) apoyan la idea de que la depleción de ADPRc es la principal responsable de los cambios vistos en la electrofisiología celular miocárdica en nuestros experimentos.

No obstante, no se puede excluir la participación de otros mecanismos involucrados en los cambios del PA miocárdicos. Por ejemplo, el sustrato de CD38, NAD⁺, se ha visto elevado en corazón, cerebro, pulmones, riñones, hígado, testículos, intestino, y bazo tanto en los roedores CD38KO como ante la inhibición aguda⁽³²⁾. En este sentido, se ha descrito que un aumento en la relación NAD⁺/NADH tiene el potencial de incrementar la función de NCX y por tanto la corriente entrante en las fases 2 y 3 del PA⁽⁵⁷⁾. Sin embargo, todavía es controvertida la evidencia que existe del papel de NAD⁺ en la regulación de la electrofisiología celular y otros trabajos apuntan a que el efecto neto de este podría ser una reducción y no un aumento en la APD⁽⁵⁸⁾⁽⁵⁹⁾, posiblemente mediante la supresión de la I_{CaL} y/o el aumento de las corrientes de K salientes según plantea ese grupo.

Considerando los resultados del experimento anterior en los que no se puede demostrar diferencia del APD₉₀ entre corazones WT y CD38KO, el comportamiento visto ante la inhibición aguda de CD38 sugiere que los ratones que no expresan esta proteína desarrollan algún tipo de compensación fisiológica. Por lo tanto, la alteración en el PA solo se hace evidente ante desequilibrios homeostáticos como la estimulación adrenérgica o la inhibición aguda de la ciclasa.

Hace falta mayor investigación para demostrar el mecanismo que subyace a estos fenómenos. Un camino factible es el estudio de la dinámica de los transitorios de calcio y su vínculo directo con el PA. Esta es una meta planteada por nuestro equipo de trabajo para lo que estamos montando un sistema de registro óptico que permita medir el transitorio de calcio en simultáneo con el PA en corazón entero. Se trata de una novel técnica denominada Pulsed local-field fluorescence microscopy (PLFFM)⁽⁶⁰⁾ para la que me capacitó en el laboratorio en la Universidad de California en Merced.

SOBRE EL ROL DE CD38 EN LA FRECUENCIA
CARDÍACA Y LA SUCEPTIBILIDAD A
ARRÍTMIAS POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN
IN VITRO.

Objetivos

- 2.a. Comparar la FC espontánea de corazones aislados de ratones con y sin expresión de CD38.
- 2.b. Evaluar la respuesta de los corazones de ambas cepas a la injuria provocada por isquemia global y reperfusión con especial búsqueda y descripción de arritmias malignas.

Hipótesis

De acuerdo a los antecedentes⁽³⁷⁾⁽⁴⁰⁾ no esperamos encontrar diferencias en la FC entre ambas cepas cuando se estudian los corazones aislados en estado basal y sin la modulación del SNA.

Durante la injuria isquémica existe un importante influjo de calcio al interior celular a través de los CCL y el NCX que actúa de forma inversa, así como liberación masiva desde el RS por medio de los RyR. Teniendo en cuenta el efecto planteado de CD38/ADPRc en la liberación de Ca^{++} (sea por menor $[Ca^{++}]_{RS}$ y/o por menor flujo a través de RyR), y el papel del NAD^+ en el estrés oxidativo, se plantea que los corazones CD38KO están protegidos al menos en parte contra la sobrecarga de calcio generada por isquemia y reperfusión, con lo que esperamos encontrar una menor incidencia de arritmias en este contexto.

Experimento 1

Registro de actividad eléctrica espontánea, en condiciones basales y durante isquemia-reperfusión, de corazones aislados mediante electrograma intracavitario.

Animales

Se utilizaron 7 ratones WT y 4 CD38KO adultos, todos ellos machos. Como criterio de exclusión se consideró un tiempo desde la eutanasia hasta la perfusión mayor a 5 minutos. También se excluyeron los corazones que presentaron daños en la pared producto de la manipulación del electrodo intracavitario o la presencia de bloqueo auriculoventricular completo (BAVC) evidente que no revirtiera durante la estabilización del preparado. Por tales motivos el análisis final se realizó sobre 4 corazones WT y 4 CD38KO, uno de 6 meses y tres de 1 año de edad en cada grupo.

Protocolo

Los experimentos se realizaron de forma intercalada entre ratones WT y KO en días sucesivos. Eran transportados desde el bioterio de la Facultad de Medicina hasta el laboratorio y pesados previo a la eutanasia. En todo momento permanecieron con alimentación e hidratación *ad libitum*, ciclo de luz oscuridad 12/12 horas y temperatura ambiente controlada en 24°C. El proceso de eutanasia, disección, canulación, perfusión, control de temperatura, así como la forma de registro fueron descritos en la sección de Materiales y Métodos.

Luego de iniciada la perfusión y mientras se calentaba la solución que bañaba al órgano se procedió a la colocación del electrodo intracavitario manteniendo el otro inmerso en el baño. Una vez logrado se comenzó con el registro de la actividad eléctrica espontánea con el siguiente protocolo:

- 15 minutos de estabilización.
- 5 minutos de registro basal.
- 20 minutos de isquemia global
- 30 minutos de reperfusión.

La isquemia se efectuó cortando el flujo de perfusión y controlando la temperatura mediante el Peltier de manera que sea una isquemia normotérmica. Luego de finalizado el experimento los corazones fueron pesados y descartados.

Procesamiento de los datos

Todos los registros fueron procesados y analizados en diferido. El programa utilizado para la visualización y procesamiento fue Spike 2. Los sectores de registro con ruido que impedía el correcto análisis no fueron tenidos en cuenta. La cuantificación de la FC basal se hizo contando el número de ciclos durante 1 minuto en el registro basal, corroborando previamente que no hubiera extrasístoles u otras irregularidades. Además, se cuantificó durante 30 segundos inmediatamente antes y a los 30, 120 y 300 segundos de iniciada la isquemia. La búsqueda de arritmias se hizo de forma manual durante todo el registro considerando la convención de Lambeth II para la investigación en modelos experimentales de arritmias producidas por infarto, isquemia y reperfusión⁽⁶¹⁾.

Tanto el análisis estadístico como la confección de las gráficas se hicieron con el programa Graph Pad Prism 6. Para comparar los valores tanto de masa como de FC se hizo un contraste de hipótesis mediante Test de T con un error alfa de 0.05. Los resultados se expresan en valores de media \pm DE para las variables relacionadas con masa y valores de media \pm EE para la FC.

Resultados y discusión

Teniendo en cuenta los 4 ratones analizados en cada grupo, encontramos una diferencia estadísticamente significativa en la masa corporal entre WT y CD38KO (40.4 ± 6.9 g vs 29.6 ± 1.3 g, valor $p = 0.02$). Esta diferencia podría ser explicada, al menos en parte, por el mejor perfil metabólico y menor tendencia a desarrollar obesidad que presentan los ratones CD38KO de mayor edad⁽⁶²⁾⁽²⁴⁾. En este aspecto, la gran dispersión presente en el grupo de ratones WT se debe a que los de mayor edad (1 año) presentaron un promedio de 43.6 g, mientras que para el de menor edad (6 meses) el peso fue de 30.7 g. Por su parte en el grupo KO tanto los ratones de 1 año como los de 6 meses presentaron un peso similar. Sin embargo, la masa de los corazones aislados no varió significativamente entre las

cepas, siendo 206 ± 9.6 mg y 187 ± 6.3 mg para WT y CD38KO respectivamente, valor $p = 0.15$. La relación de masa del corazón/masa corporal tampoco fue diferente estadísticamente entre los grupos WT y CD38KO aunque hubo una tendencia a una relación mayor para los KO con valores 5.3 ± 1.2 mg/g para la cepa WT y 6.3 ± 0.9 mg/g para los CD38KO (valor $p = 0.24$). Esta diferencia fue descrita por Takahashi et al.⁽³¹⁾. Quizás la limitante para no encontrar diferencia estadísticamente significativa en nuestro caso se deba al pequeño tamaño muestral.

En la figura 11 se muestra el trazado de un sector del electromiograma en simultáneo con el registro continuo de temperatura de uno de los corazones WT a modo de ejemplo.

El valor promedio de FC en estado basal fue sustancialmente menor a la FC que presentan los ratones *in vivo*⁽⁴¹⁾, lo que es esperable debido a que en los ratones predomina el tono simpático (a diferencia de lo que ocurre en los seres humanos) y éste se pierde al aislarlo. Valores similares de FC en corazón perfundido mediante sistema Langendorff fueron reportados por A. M Lewis⁽³³⁾.

La FC de los corazones aislados no fue significativamente diferente entre ambas cepas como se puede ver en la tabla 2. Estos resultados sugieren que la delección del gen CD38 no ejerce un efecto relevante en la génesis del automatismo cardíaco *per se*, sino que pueden estar modificándolo a través de mecanismos reguladores como el sistema nervioso simpático. Como fue mencionado, se ha demostrado por múltiples autores que CD38/ADPRc está involucrado en la vía de señalización adrenérgica⁽²¹⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁰⁾⁽²⁷⁾⁽³³⁾.

En los primeros segundos luego del cese de perfusión se observa un aumento marcado de la FC, para luego disminuir paulatinamente hasta llegar a la asistolía completa. Este patrón tampoco fue distinto entre las dos cepas como se aprecia en la figura 21. No encontramos otros trabajos publicados que describan este comportamiento en registros de corazón entero. Sin embargo, una posible explicación es que responda a cambios del estiramiento del tejido miocárdico como consecuencia del cese brusco de la perfusión. En este aspecto Seyma y cols.⁽⁶³⁾ en un reciente trabajo muestran que existe un aumento transitorio de la frecuencia de disparo tanto en el estiramiento axial de los miocardiocitos como en su liberación. En nuestro caso el cese del flujo a través de la bomba peristáltica podría estar generando secundariamente una disminución de la precarga y por tanto un aumento transitorio de la frecuencia de disparo del tejido marcapaso. Por otro lado, no podemos descartar que el aumento transitorio de la FC responda a circunstancias experimentales como un cambio brusco de temperatura. Debe tenerse en cuenta que, aunque la solución que baña al corazón (y el propio tejido) se mantenía controlada a 37°C , la solución de perfusión ingresa a la arteria aorta probablemente esté algo más fría y se logre el equilibrio térmico en el propio tejido. Por lo tanto, es posible que en los primeros segundos luego de interrumpir de forma brusca el flujo exista una elevación transitoria de la temperatura en el tejido cardíaco y consecuentemente una elevación de la FC.

CONDICIÓN	FC (lpm) WT	FC (lpm) CD38KO	Valor p
Basal	178 ± 15	197 ± 28	0.66
+ 30s isquemia	235 ± 17	267 ± 26	0.40
+ 120s isquemia	142 ± 40	150 ± 33	0.83
+ 300s isquemia	64 ± 49	42 ± 13	0.66

Tabla 2. Cambio de la frecuencia cardíaca por isquemia en corazones aislados. La tabla muestra valores promedio ± EE para los 4 corazones de cada grupo (WT y CD38KO) en estado basal y a medida que transcurrió el tiempo de isquemia (30, 120 y 300 s). La FC no se diferenció en ningún caso entre los grupos.

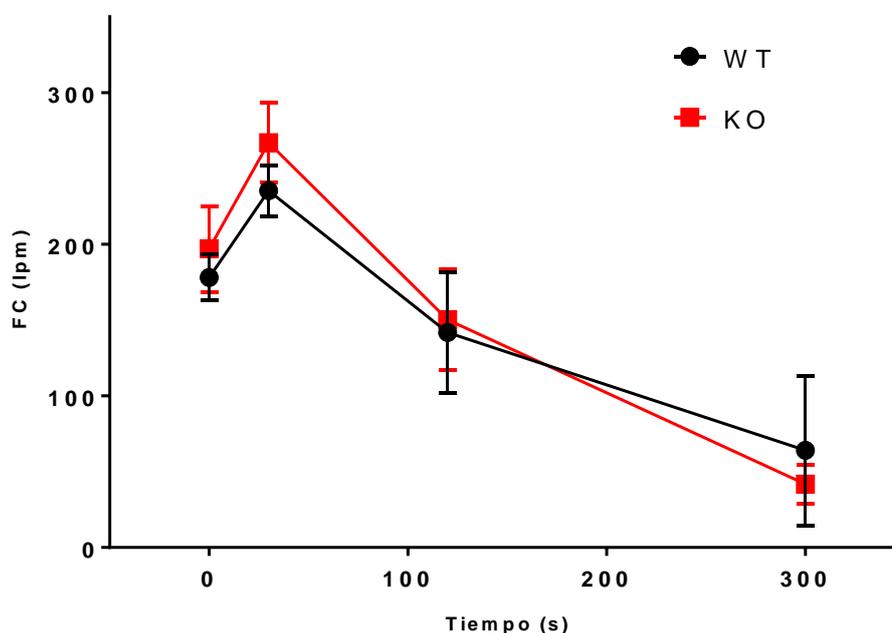


Figura 21. Cambio de la frecuencia cardíaca del corazón aislado por isquemia. Se muestra el valor promedio y el EE de los 4 corazones aislados de ratones WT (negro) y CD38KO (rojo) en situación basal (tiempo 0) y luego de transcurridos 30, 120 y 300 segundos desde que se detuvo la perfusión (ver valores en tabla 2).

Lamentablemente, no logramos inducir taquiarritmias ventriculares con este protocolo de isquemia global y reperfusión en ninguno de los 8 corazones estudiados. Existen distintos aspectos relacionados con el modelo utilizado que pueden explicar esto. Por un lado, la generación de arritmias sostenidas

necesita de una masa de miocardio crítica para desarrollarse. Esta hipótesis de la masa crítica implica que la susceptibilidad arrítmica dependa directamente de la relación entre la longitud de onda (duración) y el tamaño del tejido necesario para la acomodación espacial de los rotores⁽⁶⁴⁾⁽⁶⁵⁾. Por lo tanto, el corazón de mamíferos pequeños como el ratón, presentaría menor susceptibilidad arrítmica e incluso se ha planteado que estos no son capaces de generar arritmias ventriculares sostenidas en absoluto. Sin embargo, esta teoría ha sido desafiada por distintos trabajos donde se ha demostrado FV en corazones tan pequeños como el corazón murino mediante protocolos específicos de estimulación⁽⁶⁶⁾. Además, parece existir cierta predisposición genética al desarrollo de arritmias ventriculares como fue estudiado por M. Jelinek⁽⁶⁷⁾. Estos autores demostraron que la cepa de ratones más propensos a generar arritmias ventriculares fue la Balb/c y esta fue la única en la que se logró inducir FV mediante el protocolo de estimulación adrenérgica. Mientras tanto, la cepa C57BL/6 que es la usada por nosotros ocupó un lugar intermedio en cuanto a la arritmogénesis, logrando un 50% en la inducción de TV, pero fracasando completamente en la inducción de FV mediante el protocolo de estimulación adrenérgica.

También, en otros trabajos publicados se ha visto una gran dificultad en la inducción de arritmias por isquemia y reperfusión en modelos murinos, especialmente en la inducción de FV⁽⁶⁸⁾.

El interés en el estudio de las arritmias producidas por isquemia y reperfusión radica en el impacto de la cardiopatía isquémica en la mortalidad a nivel mundial. Como fue mencionado, la mayor parte de las muertes que se producen en la etapa aguda del infarto del miocardio se deben a taquicardia ventricular polimórfica (TVP) / fibrilación ventricular (FV). Uno de los fenómenos subyacentes es la sobrecarga de calcio citosólico durante la isquemia y la reperfusión por mecanismos ya expuestos, que genera eventos arrítmicos a nivel celular como aumento de las chispas y ondas de calcio⁽⁴⁵⁾. De tal manera, resulta de sumo interés estudiar la vía de CD38/ADPRc que está involucrada en la incorporación y liberación de calcio reticular bajo la hipótesis de que en su ausencia la cantidad de calcio celular (tanto a nivel reticular como citosólico) será menor y por ende también será menor la incidencia de arritmias malignas cuando se somete al corazón a la injuria provocada por isquemia y reperfusión. Se trata de un estudio que no se había hecho previamente en corazones CD38KO.

Al respecto, el modelo experimental que mejor representa la fisiopatología que ocurre en el IAM en el humano es el de ligadura de la arteria descendente anterior (ADA)⁽⁶⁹⁾. Sin embargo, este modelo ha sido desarrollado fundamentalmente *in vivo* e implica una complejidad técnica que no nos fue posible desarrollar de forma óptima en el corazón aislado, entre otras cosas porque el movimiento del preparado por la ligadura y desligadura de una arteria coronaria, hacía imposible la interpretación electrocardiográfica. En su lugar se optó por el modelo de isquemia global deteniendo el flujo de perfusión y luego reinstalándolo para la reperfusión. La desventaja es que de esta forma no se puede

generar el sustrato arritmico provocado por la interface eléctrica y química entre el miocardio isquémico y el sano como se ve en el IAM. Además, la isquemia global también involucra al nodo sinusal, lo que explica la caída de la FC. Esta depresión de la actividad eléctrica puede contribuir a la menor susceptibilidad a las arritmias malignas como lo han mostrado otros autores⁽⁷⁰⁾.

Además, no debe despreciarse que en el modelo *in vitro* se pierde la influencia del sistema nervioso autónomo y de mediadores inflamatorios humorales que están presentes en el modelo *in vivo* y contribuyen a la arritmogénesis. En los ratones, a diferencia del ser humano, la estimulación adrenérgica tónica por el sistema nervioso simpático *in vivo* es predominante y tiene un gran potencial arritmogénico.

Pensamos que por todos estos motivos no logramos generar arritmias malignas por isquemia-reperfusión y por lo tanto cumplir con uno de los objetivos propuestos que era estudiar si los corazones CD38KO estaban protegidos. Por lo tanto, debimos buscar nuevos protocolos para la inducción arritmica.

Experimento 2

Registro de actividad eléctrica espontánea mediante electrograma intracavitario de corazones aislados durante la perfusión con Tyrode modificado, en condiciones basales, con estímulo adrenérgico y durante isquemia-reperfusión. El Tyrode arritmogénico fue desarrollado y probado por C. L. Stables y M. J. Curtis⁽⁶⁸⁾ en búsqueda de un modelo de FV en corazones aislados murinos sometidos a isquemia y reperfusión.

Animales

Se utilizaron 9 ratones WT y 9 CD38 KO machos de entre 4 y 6 meses de edad. Los criterios de exclusión del análisis final fueron un tiempo desde la eutanasia hasta la perfusión mayor a 5 minutos, daño de la pared ventricular durante la manipulación del preparado y la presencia de BAVC que no revirtiera durante la estabilización. Por este último motivo se excluyó 1 corazón WT, y el análisis final fue hecho sobre 8 WT y 9 CD38KO.

Solución Tyrode modificada

La modificación del Tyrode consistió en una disminución de la $[K^+]$ de 5.4 a 3 mmol/L y un aumento de la $[Ca^{++}]$ de 2 a 2.4 mmol/L.

Protocolo

Una vez lograda la canulación y perfusión con el Tyrode modificado se registró la actividad eléctrica espontánea bajo el siguiente protocolo:

- 15 minutos de estabilización.
- 5 minutos de registro basal.
- Perfusión con solución de isoproterenol 1×10^{-5} M y registro durante 10 minutos.

- 20 minutos de isquemia global.
- 20 minutos de reperfusión con Tyrode modificado + isoproterenol.

Procesamiento de los datos

Los datos se procesaron de igual forma que el experimento previo. También se analizaron las arritmias siguiendo la convención de Lambeth II⁽⁶¹⁾. Para la comparación, las arritmias se clasificaron en tres categorías de severidad creciente; taquicardia ventricular monomórfica (TVM), taquicardia ventricular polimórfica (TVP) y fibrilación ventricular (FV). Para cada corazón se tuvo en cuenta la arritmia de mayor severidad (FV > TVP > TVM) hallada, independientemente si en el mismo registro coexistía un tramo de otra arritmia de menor severidad. Los test estadísticos utilizados también fueron test de T para las variables continuas de distribución normal y test exacto de Fisher para comparar la proporción de arritmias en cada cepa. Cuando se analizó el tiempo hasta la inducción de arritmias se usó el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los resultados se expresan en valores de media \pm DE para las variables relacionadas con masa y valores de media \pm EE para FC y tiempo.

Resultados y discusión

El peso promedio de los ratones WT fue de 30.5 ± 1.9 g y el de los CD38KO de 29.7 ± 1.8 g, sin diferencia significativa entre ellos (valor $p = 0.45$).

La FC con el Tyrode modificado fue más elevada en ambas cepas en comparación con el Tyrode normal, aunque en los WT la respuesta al cambio fue mayor como se ve en la tabla 3 y figura 22. De hecho, la FC basal de la cepa WT fue significativamente mayor (valor $p < 0.0001$) con la solución modificada que con la convencional, mientras que para la cepa KO no hubo significancia estadística (valor $p = 0.23$). Al respecto, la FC basal de los corazones WT en perfusión con bajo $[K^+]$ y alto $[Ca^{++}]$ fue de 336 ± 13 cpm y la de los CD38KO 254 ± 27 cpm. Esto evidencia una FC significativamente menor de los corazones KO en estas condiciones comparado con los corazones WT (valor $p = 0.02$). En suma, estos datos muestran que el efecto de la solución arritmogénica sobre la FC de los corazones que no expresan CD38 es menor que sobre los corazones WT.

Por su parte, la estimulación β adrenérgica produjo un aumento de la FC como era esperable, a valores de 370 ± 23 para los corazones WT y 358 ± 35 para los KO (tabla 3).

CONDICIÓN	N (WT/KO)	FC (lpm) WT	FC (lpm) CD38KO	Valor p
basal Tyrode N	4/4	178 ± 15	197 ± 28	0.57
basal Tyrode M	8/9	336 ± 13	254 ± 27	0.02
Tyrode M + ISOP	8/9	370 ± 23	358 ± 35	0.79

Tabla 3. Cambios de la frecuencia cardíaca de corazones aislados según la solución de perfusión y el agregado de isoproterenol. Se muestran los valores promedio y el EE de los corazones aislados de ratones WT y CD38KO (ver el número de corazones incluidos en cada caso). La FC basal se analiza con Tyrode normal (N) en unos corazones y con Tyrode modificado (M) en otros. A los mismos corazones perfundidos con Tyrode M se los perfunde con isoproterenol. La única diferencia estadísticamente significativa se encuentra en la FC con Tyrode M.

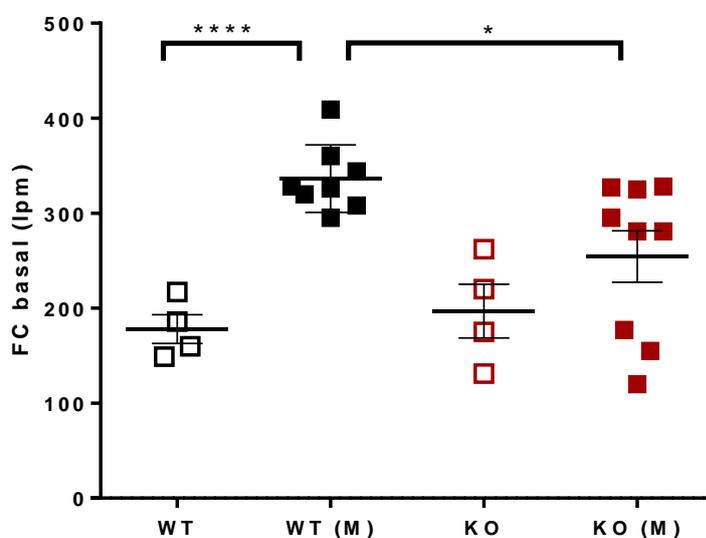


Figura 22. Cambio de la frecuencia cardíaca al modificar la composición de la solución de perfusión. Se muestra el valor promedio de FC y el EE de los corazones aislados de ratones WT y CD38KO al perfundirlos con Tyrode normal o con Tyrode modificado (MT, ver texto). Ver los valores en la tabla 3. El Tyrode modificado produjo incremento estadísticamente significativo de la FC sólo en el grupo WT. ****: $p < 0.0001$ para el test de T-student. *: $p < 0.05$ para el test de T-student

La FC basal con el Tyrode modificado fue comparable a la obtenida por Stables y Curtis⁽⁶⁸⁾. En base a estos datos, pensamos que el aumento en la $[Ca^{++}]$ en el medio, además de ser arritmogénico, podría estar acelerando el reloj de calcio en las células del NS por medio de las chispas de Ca^{++} . Diversos autores como MacGregor⁽¹⁴⁾, Cui⁽¹⁵⁾ y Lukyanenko⁽¹⁶⁾ demuestran que el estímulo de ADPRc aumenta

la frecuencia de chispas de Ca^{++} . Como sabemos, la liberación espontánea de Ca^{++} en forma de chispas es un componente clave en el reloj de calcio y la despolarización espontánea de fase 4 del PA en las células marcapaso (figura 4). En nuestro grupo de trabajo ya habíamos demostrado una menor frecuencia tanto de chispas de Ca^{++} como de ondas y miniondas en células CD38KO. Por lo tanto, la ausencia de la vía CD38/ADPRc redundaría en una menor frecuencia relativa de descarga del marcapaso fisiológico cuando se somete a un desequilibrio homeostático como es el aumento de $[Ca^{++}]$. Además, tanto Rakovik⁽²⁶⁾ como Kannt⁽³⁴⁾ también mostraron que la inhibición de ADPRc previene despolarizaciones espontáneas inducidas por sobrecarga de Ca^{++} .

No podemos comparar la FC obtenida luego del estímulo adrenérgico con la de Stables y Curtis ya que ellos usaron una combinación de adrenalina y noradrenalina, mientras que nosotros usamos isoproterenol. Sin embargo, podemos afirmar que el estímulo β adrenérgico hizo que la diferencia de FC entre ambas cepas se acortara (tabla 3). Esto se explica porque la proporción de cambio fue mayor en los corazones KO aumentando en promedio un 41% vs el 10% para los WT, pero sin significancia estadística por la elevada dispersión de los resultados.

El protocolo completo de isquemia y reperfusión se realizó en 7 de los 8 corazones WT y 8 de los 9 CD38KO luego de 10 minutos de perfusión con isoproterenol. Con este protocolo sí se logró la inducción de arritmias malignas. Como se ve en la figura 23 entre los 7 corazones WT, 2 presentaron FV, 1 TVP y 1 TVM como arritmia de mayor severidad. Fueron 3 los corazones WT que no tuvieron arritmias malignas. Entre los 8 CD38KO, la FV se vio en 2 corazones, 3 presentaron TVP como arritmia de mayor severidad y 1 TVM, mientras que 2 de los 8 no presentaron ninguna arritmia maligna. En la figura 24 se muestran a modo de ejemplo el inicio de evento de cada arritmia mencionada.

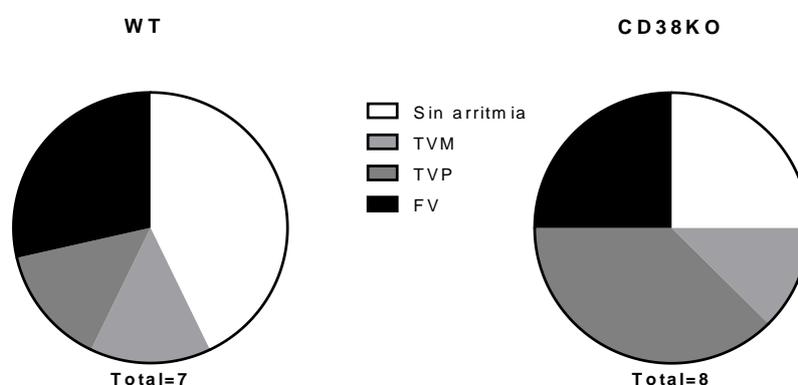


Figura 23. Proporción de arritmias inducidas en corazones aislados de ratones WT y CD38KO. Se muestra la proporción de los distintos tipos de arritmias en el grupo WT (izquierda) y CD38KO (derecha). TVM: taquicardia ventricular monomórfica, TVP: taquicardia ventricular polimórfica, FV: fibrilación ventricular.

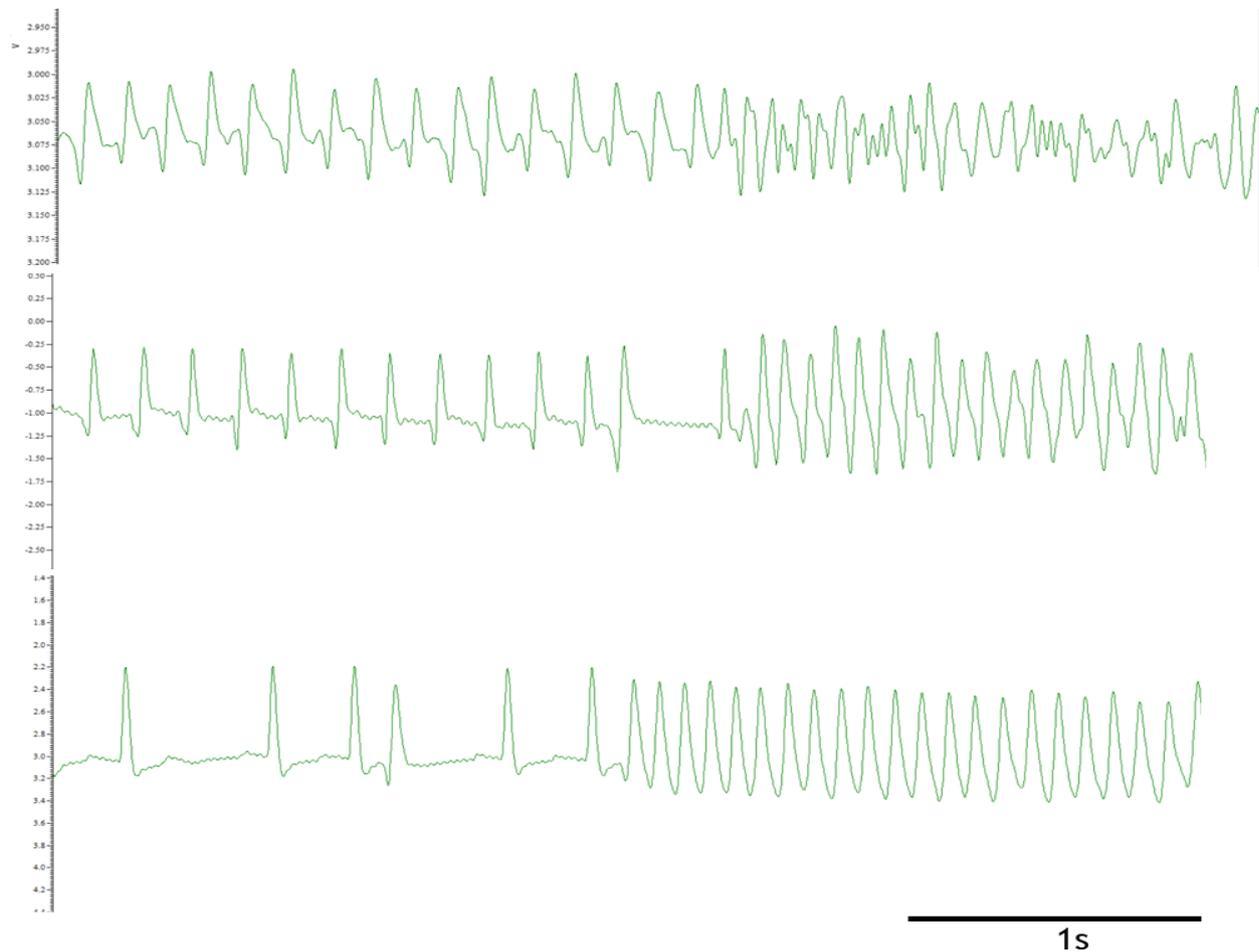


Figura 24. Registros electrográficos representativos de las arritmias inducidas en corazones aislados de ratones. Arriba FV, al medio TVP, abajo TVM.

En el análisis global se obtuvo una inducción de arritmias en el 57 % de los WT y un 75 % de los CD38KO sin diferencia significativa por test exacto de Fisher (valor $p = 0.61$), de manera que no logramos rechazar la hipótesis nula de igual incidencia de arritmias.

Para investigar la susceptibilidad arritmica con mayor profundidad se cuantificó el tiempo hasta que apareció el primer evento, pero éste tampoco fue diferente entre las dos cepas, aunque pareció ser algo menor en CD38KO con un valor medio de 143 ± 42 s para WT y 89 ± 37 s para KO (valor $p = 0.25$). La virtud de este modelo es reproducir en mamíferos la causa más frecuente de arritmias malignas y muerte súbita en humanos como es la cardiopatía isquémica, bajo el conocimiento de la sobrecarga celular de Ca^{++} mencionada en estas condiciones. Kannt et al.⁽³⁴⁾ ya había demostrado la inducción de FV *in vivo* en cobayos mediante la infusión de ouabaína, un inhibidor de la Na^+/K^+ ATPasa, que de forma secundaria genera una sobrecarga de Ca^{++} celular. En los animales pretratados con SAN4825, un inhibidor de ADPRciclase, el tiempo hasta el comienzo de la FV fue mayor. Respecto a la isquemia

Valverde et al.⁽⁷¹⁾ mostraron por primera vez la dinámica de calcio entre el RS y el citosol celular en corazones de ratones sometidos a isquemia global. La isquemia incrementó la $[Ca^{++}]_{\text{citosólico}}$ junto con un decremento de la $[Ca^{++}]_{\text{RS}}$ y una depresión de la cinética de movilización del Ca^{++} reticular. La reperfusión generó una mayor liberación de calcio reticular transitoria hacia el citosol previo a la recaptación del calcio perdido. También se ha visto que tanto el estímulo adrenérgico⁽²¹⁾⁽³³⁾⁽¹⁰⁾, como la isquemia⁽³⁵⁾ elevan la producción de ADPRc por parte de CD38. En base a esto se podría suponer que un RS de células con menor contenido de calcio (por disminución de la actividad ADPR ciclase) conduciría a menor sobrecarga del catión en isquemia-reperfusión. Esto fue demostrado por X. Guan et al.⁽³⁹⁾ en células aisladas con expresión reducida de CD38 (*CD38 Knockdown*). Por lo tanto, las células con menor $[Ca^{++}]$ en términos relativos generarían menos eventos como chispas u ondas de calcio y posdespolarizaciones de membrana que pueden iniciar arritmias en todo el miocardio. Como fue mencionado, el agregado de ADPRc en miocitos aislados genera aumento de la cantidad de las chispas de calcio y de la magnitud de los transitorios de calcio. Al principio estos efectos son independientes de la carga reticular de calcio sugiriendo que el efecto es mediado por la liberación de calcio posiblemente a través de RyR. Sin embargo, a los 10 minutos existe un aumento de la carga reticular de calcio sugiriendo que puede haber un efecto en el sistema de captación de calcio reticular⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾.

Rakovik et al.⁽²⁶⁾ describieron una menor incidencia de ondas de calcio (propuesto como sustrato arritmogénico) en miocardiocitos tratados con un antagonista de ADPRc. Sin embargo, el estímulo arritmico no fue la hipoxia, sino estimulación adrenérgica y ouabaína. W Lin⁽¹⁰⁾ estudió las arritmias en corazones aislados de ratones CD38KO y vio una menor incidencia respecto a los corazones WT; sin embargo, no lo hizo en modelos de isquemia y reperfusión sino mediante protocolos de estimulación eléctrica específicos y bajo estimulación adrenérgica.

En base a nuestros resultados, a pesar de lograr un modelo de arritmia en corazón aislado entero, no podemos afirmar que los corazones deficientes en CD38KO estén protegidos contra arritmias malignas generadas por isquemia y reperfusión *per se*. En otras palabras, no pudimos demostrar que los fenómenos arrítmicos mostrados por otros autores en modelos más reduccionistas, se puedan transpolar a la generación de arritmias malignas por isquemia en el corazón entero de mamífero.

Una limitación de nuestro trabajo es que no medimos la concentración de ADPRc en nuestros preparados. Sin embargo, contamos con evidencia aportada por distintos grupos de investigadores que muestran una marcada reducción del contenido de ADPRc en corazones carentes de CD38. Son ejemplos de ello el primer reporte hecho por H.C. Lee⁽⁴⁾ que muestra una reducción de ADPRc en todos los tejidos estudiados incluido el corazón de los ratones transgénicos, el de Takahashi⁽³¹⁾ que mostró una reducción del 85 % del contenido de ADPRc en el miocardio de ratones CD38KO, el de Pinar Aksoy⁽³²⁾ que reportó niveles indetectables de ADPRc también en corazones CD38KO y el de W. Lin⁽¹⁰⁾

que muestra la incapacidad en la producción del mensajero por las membranas de miocardiocitos carentes de CD38.

Será necesario plantear nuevos modelos en la búsqueda de protección arrítmica en este escenario, que pueden ir desde el estudio de sustratos arrítmicos a nivel celular hasta la inducción de arritmias en modelos *in vivo*.

SOBRE LA MANIFESTACIÓN
ELECTROCARDIOGRÁFICA DE CD38 Y SU ROL
EN MODELOS DE ARRITMIAS POR ISQUEMIA
IN VIVO

Objetivos

3.a Estudiar la actividad eléctrica cardíaca *in vivo* mediante ECG de superficie, analizando y comparando los distintos componentes del trazado en ratones WT y CD38KO.

3.b. Comparar la respuesta arrítmica ante un modelo de infarto por sobrecarga adrenérgica *in vivo* mediante ECG de superficie de ratones WT y CD38KO.

Hipótesis

Como ya fue analizado por nuestro grupo de trabajo, esperamos encontrar una menor FC en el grupo de ratones KO en estado basal. Sin embargo, en la misma línea que los resultados expuestos previamente, esperamos que las mayores diferencias entre ambas cepas queden expuestas ante los cambios homeostáticos. En este sentido este modelo de infarto inducido por sobrecarga adrenérgica generará aumento de la FC, trastornos de la conducción intraventricular, alargamiento del QTc, y arritmias ventriculares como extrasistolía ventricular (EV), TV y FV. La tasa de arritmias ventriculares será menor en los ratones CD38KO.

Experimento

Registro de la actividad eléctrica cardíaca *in vivo* del ratón anestesiado (WT y CD38KO), en condiciones basales y durante la estimulación adrenérgica con isoproterenol a altas dosis como modelo alternativo de infarto de miocardio⁽⁷²⁾, comparando el trazado electrocardiográfico y cuantificando las arritmias.

Animales

Se utilizaron 6 ratones WT y 6 CD38KO, machos de 3-4 meses de edad. Se planteó como criterio de exclusión para el análisis la presencia de ruido en el registro que impidiera la correcta interpretación del ventriculograma. No se descartó ningún registro por este motivo.

Protocolo

Los ratones eran transportados desde el bioterio de la Facultad de Medicina una hora antes del experimento, separados en cajas individuales y manteniendo el agua y la alimentación *ad libitum* y la temperatura en 24°C. Previo a cada registro se procedía a la anestesia y colocación de electrodos como fue descrito en la sección Materiales y métodos. Cada ratón se estudió en 3 días consecutivos como se detalla a continuación:

Día 1

- Registro de la actividad eléctrica basal durante 5 minutos.
- Inyección de suero fisiológico (SF), 5 ml/Kg intraperitoneal.
- Registro de la actividad eléctrica por 30 minutos adicionales.

Día 2

- Registro de la actividad eléctrica basal durante 5 minutos.
- Inyección de solución de 4 mg/ml de Isoproterenol a una dosis de 20 mg/kg (5 ml/Kg) intraperitoneal.
- Registro de la actividad eléctrica por 30 minutos adicionales

Día 3

- Registro de la actividad eléctrica cardíaca durante 5 minutos.

La inyección de SF se realizó para tener un control en cada ratón e independizar el efecto del isoproterenol del que pudiera existir por el estrés de la inyección a pesar de que los animales estuvieran anestesiados.

Cada día se estudió en conjunto a 1 ratón WT y 1 CD38KO. Luego de finalizar los registros se constataba la correcta recuperación anestésica y se transportaban a un ambiente tranquilo donde permanecían con alimentación *ad libitum*, temperatura controlada y un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 hasta los nuevos procedimientos.

Procesamiento de los datos

Todos los registros fueron procesados y analizados en diferido. El programa utilizado para la visualización y procesamiento fue LabChart 7. Este programa permite la detección y cuantificación automática de los componentes del trazado electrocardiográfico (P, QRS, onda T, así como los intervalos correspondientes) y permite promediar el trazado de una cantidad de latidos seleccionados con lo que se logra reducir el efecto de las señales espurias (figura 25).

Se analizó tanto la FC como la amplitud y duración de los distintos componentes del trazado (intervalo PR, complejo QRS, onda R, intervalo QTc). Para ello se seleccionaron 6 momentos distintos. A saber; minuto 0 (inmediatamente previo a la inyección de la solución), minutos 1, 5, 15 y 30 luego de la inyección de SF e isoproterenol respectivamente y nuevamente a las 24 horas de estas maniobras. La FC se cuantificó durante 1 minuto en los tiempos seleccionados. Para el resto de las medidas se hizo un promedio de 100 trazados consecutivos como se ve en la figura 25. En cada trazado promedio se chequeó manualmente el sitio del cursor para la detección automática de los distintos componentes y se corrigió si no era correcta. El criterio para medir el final del QRS fue la intersección de la onda S con la línea isoeletrica previo al comienzo de la onda J como ha sido definido por otros autores⁽²⁾. De

igual manera la duración del intervalo QT fue medida hasta que la onda T negativa retorna a la línea isoeleétrica⁽²⁾.

La cuantificación de las arritmias se hizo de forma manual mirando todo el registro. Se buscó la presencia de pausas definidas como un intervalo R-R mayor a 150% del intervalo R-R normal precedente así como la presencia de complejos ventriculares prematuros, TVM, TVP y FV de acuerdo a lo establecido por la Convención de Lambeth II⁽⁶¹⁾.

El procesamiento estadístico y la confección de gráficas se realizó en GraphPad Prism 6. Se usó un Test de T con un error alfa de 0.05 para contraste de hipótesis de variables continuas. Los resultados se expresan en valores de media \pm EE.

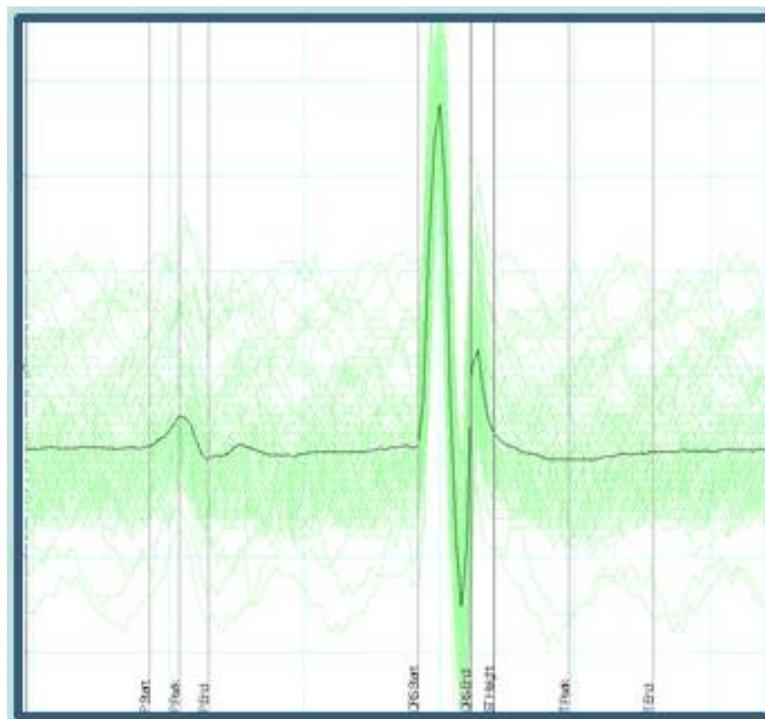


Figura 25. Registro electrocardiográfico promedio de un ratón para ejemplificar el procedimiento para medir duración de ondas e intervalos. Los electrodos se colocaban de forma tal de obtener una derivación similar a DII.

Resultados y discusión

El análisis final se hizo sobre 6 ratones WT y 6 CD38KO. La masa corporal no varió significativamente entre ambos grupos. En la tabla 4 se resumen las principales características electrocardiográficas identificadas en ambas cepas en estado basal. Vemos que la morfología del trazado electrocardiográfico es similar en ambas cepas, a excepción de la duración del QRS y la amplitud de la onda R.

VARIABLE	WT (N=6)	CD38KO (N=6)	Valor p
FC (cpm)	419 ± 15	411 ± 15	ns
Intervalo PR (ms)	46,2 ± 1,2	47,2 ± 1,3	ns
Duración QRS (ms)	10,6 ± 0,4	9,6 ± 0,3	ns (0,086)
QTc (ms)	0,13 ± 0,0034	0,12 ± 0,0042	ns
Amplitud onda R (mV)	36,8 ± 1,4	52,7 ± 4,9	* 0,011
Amplitud onda S (mV)	-0,21 ± 0,02	-0,27 ± 0,06	ns
Amplitud onda T (mV)	-1,1 ± 0,4	-0,8 ± 0,3	ns

Tabla 4. Comparaciones de los valores obtenidos del electrocardiograma de ratones anestesiados. Se muestran los promedios ± EE para los 6 ratones incluidos en cada grupo, WT y CD38KO.

La FC no fue distinta entre ambas cepas, con un valor promedio control de 419 ± 15 ms para los ratones WT y 411 ± 15 ms para los KO. Este valor es algo menor a los reportados previamente por nuestro grupo de trabajo⁽⁴¹⁾ probablemente debido al efecto de la anestesia. En este sentido, se corrobora que la FC disminuye conforme transcurre el tiempo de mantenimiento anestésico con isoflurano (figura 26) por lo que resulta difícil comparar estos valores con los de otros trabajos. Por ejemplo, Thai et al.⁽⁷³⁾ reporta valores sustancialmente menores de FC en animales anestesiados respecto a los registros del animal consiente, aunque el anestésico usado no fue isoflurano sino pentobarbital. Aun así, a diferencia de nuestros resultados mantienen una diferencia de FC entre las cepas WT y CD38KO, pero no describen si esa variable fue medida en un solo ciclo cardíaco, durante un minuto, o durante mayores períodos de registro.

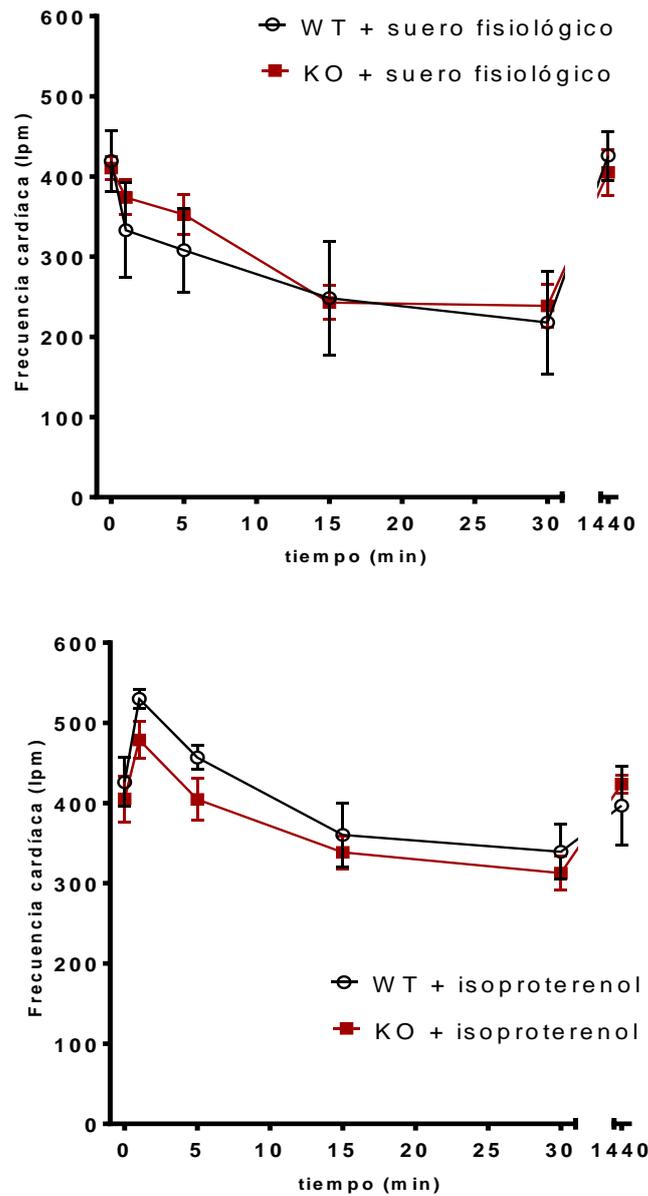


Figura 26. Frecuencia cardíaca en función del tiempo en ratones anestesiados WT y CD38KO. Los gráficos muestran la frecuencia cardíaca promedio y el EE en el grupo de ratones WT (negro, N=6) y CD38KO (rojo, N=6). Los ratones están anestesiados con isoflurano mientras se registran. En el gráfico superior se muestra la respuesta a la inyección de suero fisiológico (control) y en el inferior a isoproterenol. No hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (test de t no pareados con corrección para múltiples comparaciones).

El patrón de despolarización ventricular fue el que tuvo mayor diferencia entre los WT y CD38KO. La duración de QRS representa el tiempo que tarda el frente de despolarización en recorrer la totalidad del miocardio ventricular, de modo que al finalizar la onda S todo el miocardio se encuentra despolarizado. Aunque en estado basal no llegó a la significación estadística, la tendencia de la

duración del QRS medido en milisegundos fue menor en los ratones CD38KO respecto a los WT, visto consistentemente en todas las mediciones del registro control. Este fenómeno solo puede explicarse de dos maneras; que exista una menor masa de tejido a despolarizarse en los corazones CD38KO o que estos presenten una mayor velocidad de conducción del impulso eléctrico⁽²⁾. Respecto al primer punto no tenemos evidencia con nuestros datos de que exista una diferencia entre ambas cepas. Recuérdese que en los experimentos donde se pesó el corazón, la diferencia no fue significativa. Por el contrario, Takahashi et al. reporta mayor masa cardíaca en los ratones CD38KO⁽³¹⁾ lo que va en contra de esta hipótesis. Respecto al segundo punto podría existir una diferencia vinculada a la proporción de uniones GAP por Cx43 activas entre los miocitos. Este hecho es en parte producto de un mecanismo de retroalimentación negativo vinculado al transporte de NAD⁺ a través de las uniones GAP por Cx43. Bruzzone et al.⁽⁷⁴⁾ describen que el sustrato de CD38 emerge a la luz vesicular a través de estos hemicanales para ser utilizado por la CD38 ectópica, y sus productos metabólicos (tanto el ADPRc como el ADPR) transportados nuevamente al citosol. El consecuente aumento del [Ca⁺⁺]_i por parte del ADPRc resulta en un desacople entre las uniones GAP mediado por la fosforilación de la Cx43 dependiente de PKA, lo que disminuye el transporte y comunicación intercelular. Estos autores también demostraron que las células carentes de CD38 tenían la misma cantidad de Cx43 pero en menor proporción fosforiladas. En suma, si tenemos presente que las Cx43 es la principal proteína de acople intercelular del miocardio de trabajo, no sorprende que exista una mayor velocidad de conducción en ratones CD38KO producto de una menor fosforilación de las mismas. Por su parte otros autores han demostrado que el incremento de NAD⁺ (como se ve en ratones CD38KO) contribuye al aumento de la velocidad de conducción del PA en preparados de corazón de rata⁽⁵⁹⁾ y de humano⁽⁵⁷⁾. Por lo tanto, podría haber más de una vía involucrada en este hecho.

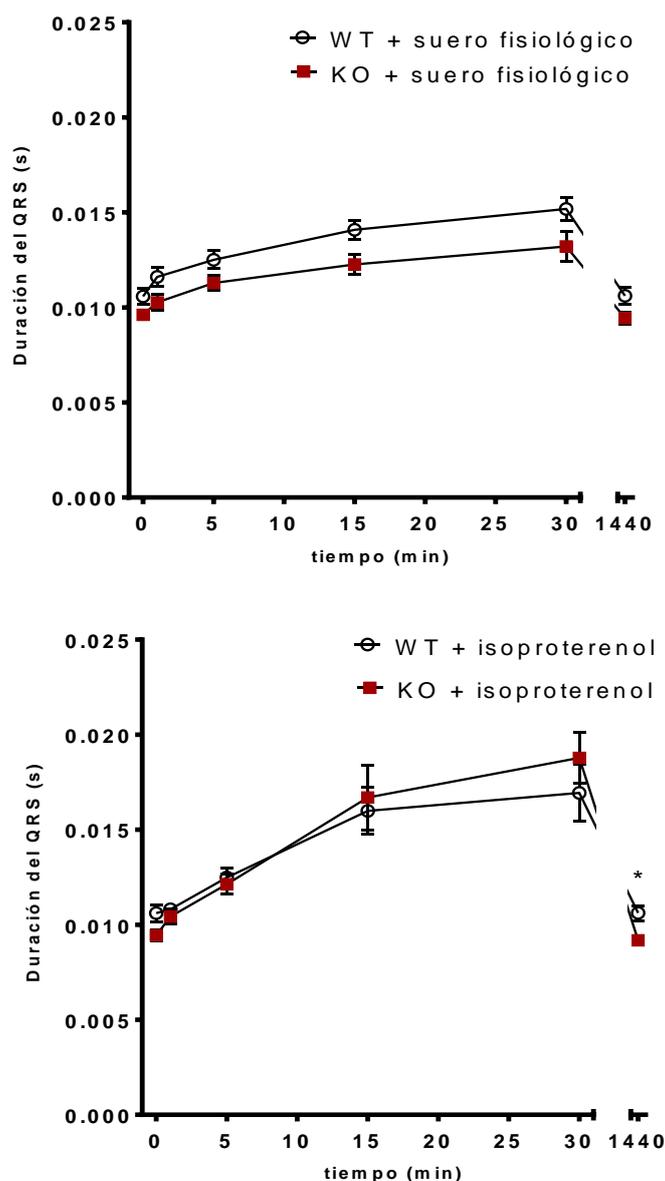


Figura 27. Duración del complejo QRS en función del tiempo en ratones anestesiados WT y CD38KO. Los gráficos muestran la duración del complejo QRS promedio y el EE en el grupo de ratones WT (negro, N=6) y CD38KO (rojo, N=6). Los ratones están anestesiados con isoflurano mientras se registran. En el gráfico superior se muestra la respuesta a la inyección de suero fisiológico (control) y en el inferior a isoproterenol. * $p < 0.05$ entre ambos grupos (test de t no pareados con corrección para múltiples comparaciones).

Otra evidencia que apoya la mayor velocidad de conducción es el mayor voltaje de la onda R en ausencia de diferencias de la onda S en la cepa CD38KO. Como fue descrito, la amplitud del QRS (entendido como la sumatoria vectorial de cada uno de sus componentes) implica la sumatoria de voltaje de todos los PA en fase 0 y 1 en un momento determinado. Por lo tanto, al existir mayor velocidad de conducción existirá mayor sumatoria de voltaje por unidad de tiempo y mayor amplitud

en el complejo QRS como se vio de forma sistemática en los ratones CD38KO. Si bien la velocidad de conducción del tejido miocárdico no fue medida de forma directa, estos hallazgos en conjunto (duración del QRS y amplitud de onda R) sugieren fuertemente que es mayor en la cepa CD38KO.

El modelo de infarto inducida por isoproterenol a altas dosis ha sido usado y validado como alternativa del modelo de ligadura coronaria, por su mayor simplicidad, menor necesidad de maniobras invasivas como toracotomía y ventilación mecánica, y menor tasa de complicaciones⁽⁷²⁾. Entre los principales mecanismos se describe la habilidad para generar radicales libres que devienen en estrés oxidativo y daño mitocondrial que sumado a la deficiencia de suplemento de O₂ generan injuria celular y muerte tanto por apoptosis como por necrosis con posterior fibrosis⁽⁷⁵⁾.

En la figura 26 (gráfico inferior) vemos cómo es el cambio de la FC a lo largo de los 30 minutos posteriores a la inyección de isoproterenol a altas dosis. Se produjo un aumento de la FC al minuto, que es rápidamente contrarrestada por el efecto cronotrópico negativo del isoflurano. En ambas cepas el comportamiento fue similar.

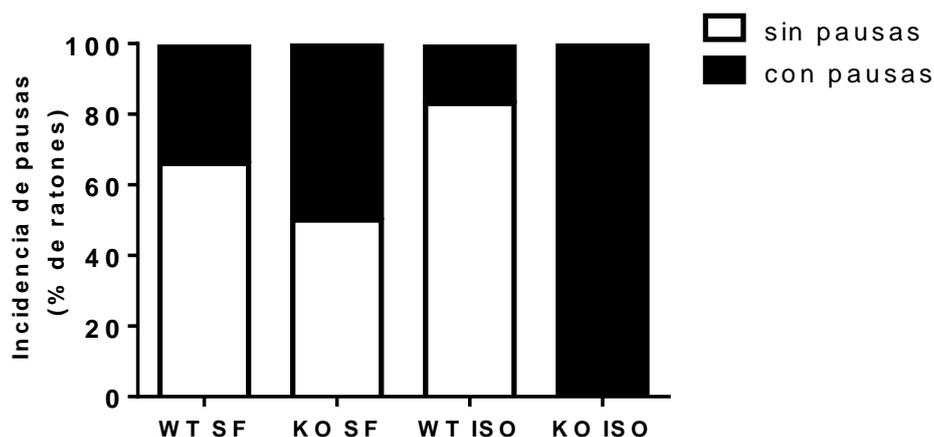
En cuanto al intervalo PR también vemos un comportamiento similar en ambas cepas. Se evidencia un aumento progresivo del intervalo como efecto de la anestesia, lo que junto con la disminución de la FC podría interpretarse como una respuesta símil vagal. Sin embargo, el isoproterenol no contrarrestó esta respuesta, sino que por el contrario la potenció. Hay que mencionar que ya a los 30 minutos de la inyección del agente inotrópico, la prolongación del intervalo PR fue tanta que se perdieron los valores en varios ratones porque la onda P quedaba oculta detrás del QRS previo.

El QT corregido para la FC (QTc) tampoco mostró diferencias significativas entre ambas cepas en estado basal. Con el agregado del agente adrenérgico se evidenció un marcado aumento en este parámetro que fue de igual magnitud en los ratones WT y CD38KO.

Las diferencias vistas en la duración del QRS y la amplitud de la onda R se perdieron en la etapa aguda de la sobrecarga adrenérgica por mayor aumento del QRS y mayor disminución de la onda R en la cepa CD38KO, retomando las diferencias a las 24 hs de la injuria (figura 27).

La respuesta arrítmica se clasificó en 3 categorías: Pausas, latidos ventriculares (EV) prematuros simples o arritmias ventriculares complejas que incluía duplas, tripletas o TV. Esperábamos encontrar una protección en ratones CD38KO en función de una menor producción de ERO, y mejor función de NCX generada por la menor depleción de NAD⁺ ⁽⁵⁷⁾ que junto con la ausencia de ADPRc generarían un mejor perfil del manejo del Ca⁺⁺.

El hallazgo principal consistió en una marcada tendencia de la cepa CD38KO a presentar pausas que fue más evidente cuando se sometió el organismo a la sobrecarga adrenérgica. Como se ve en la figura 28, este efecto se vio tanto en la proporción de ratones afectados como en la cantidad de eventos por ratón.



Nº de ratones	Suero fisiológico (SF)		Isoproterenol (ISO)	
	WT	CD38KO	WT	CD38KO
Sin pausas	4	3	5	0
Con pausas	2	3	1	6

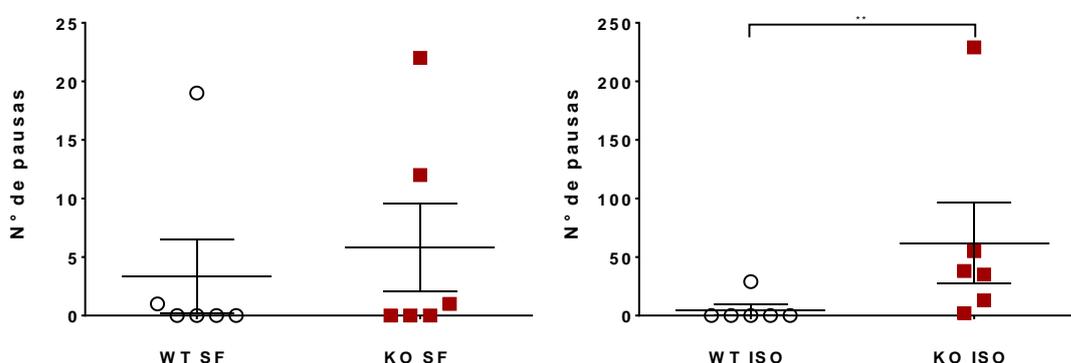


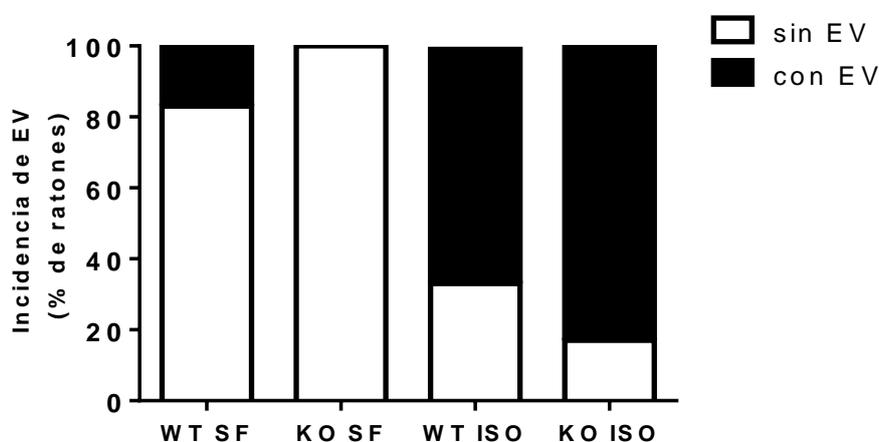
Figura 28. Incidencia de pausas sinusales en ratones WT y CD38KO. El gráfico superior muestra la incidencia (%) de pausas sinusales en los ratones anestesiados del grupo WT y CD38KO (N=6 en cada grupo) en situación control (inyección de suero fisiológico, SF) y con sobrecarga beta-adrenérgica (inyección de isoproterenol). Los gráficos inferiores muestran el número de pausas en cada uno de los ratones de cada grupo en las dos situaciones (suero fisiológico e isoproterenol en el gráfico de la izquierda y derecha respectivamente). Nótese que las escalas de ambos gráficos inferiores son diferentes.

Este era un resultado esperado en base a los datos previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo⁽⁴⁰⁾. Si bien en los registros que se lograba visualizar la onda P se pudo corroborar que las pausas eran efectivamente pausas sinusales, no podemos adjudicarlo a todos los registros dado que en varios de ellos no se lograba ver la onda P. En este escenario no podemos asegurar que se trate de una pausa sinusal, un bloqueo sinoatrial o un bloqueo AV.

Hace falta más investigación a nivel molecular para explicar este fenómeno, pero una hipótesis explicativa puede ser la afectación en el sistema de recaptación de Ca⁺⁺ que presenta la cepa KO. Como

fue mencionado, el contenido de calcio reticular es un determinante muy importante para el reloj de calcio y el automatismo. Una menor tasa de recaptación podría generar una depleción de calcio reticular y una incapacidad de recuperación de la refractariedad del CICR⁽¹⁸⁾. Esto afectaría directamente la comunicación entre el reloj de calcio y reloj de membrana para el siguiente ciclo con una supresión transitoria en la generación del PA en las células nodales. Szentesei y cols.⁽¹⁸⁾ demuestran que la recuperación de la refractariedad del CICR depende de la tasa de recaptación de Ca⁺⁺ mediante la bomba SERCA y que el isoproterenol actúa acelerando esta recuperación mediante el aumento de recaptación de Ca⁺⁺ vía estimulación de SERCA. Por tanto, no sorprende que la alteración del automatismo se haga más evidente cuando hay aumento en la liberación del Ca⁺⁺ reticular mediada por estimulación adrenérgica que no es acompañada por una correspondiente potenciación en la recaptación de Ca⁺⁺ en ratones carentes de CD38. Otro mecanismo que puede estar contribuyendo a la presencia de pausas en los CD38KO, es la disminución de la pendiente de despolarización generada por el boosting de NAD⁺ en células del NS que describe Pustovit y cols.⁽⁵⁹⁾. Sin embargo, este hecho no explica la diferencia vista bajo estimulación adrenérgica.

Por otro lado, no se logra demostrar de forma clara la protección ante arritmias generadas por sobrecarga adrenérgica en la cepa CD38KO. En la figura 29 se ve un marcado aumento de carga extrasistólica ante la inyección de altas dosis de isoproterenol que fue similar en ambas cepas. No hubo diferencias significativas ni en la proporción de ratones afectados ni en la suma total de EV registradas durante los 30 minutos de registro. Hay que destacar que si bien la proporción de ratones que presentaron arritmias complejas ante la sobrecarga adrenérgica fueron 2/6 WT y 2/6 KO, solo en 1 WT se registró una TVP autolimitada.



Nº de ratones	Suero fisiológico (SF)		Isoproterenol (ISO)	
	WT	CD38KO	WT	CD38KO
Sin EV	5	6	2	1
Con EV	1	0	4	5

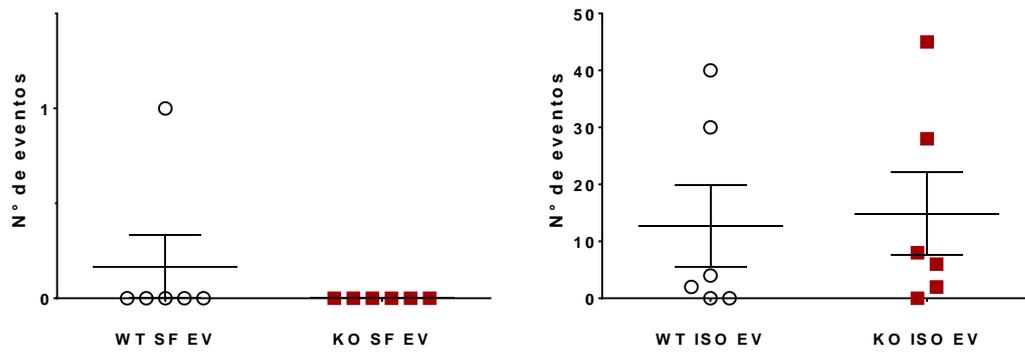


Figura 29. Incidencia de extrasístoles ventriculares en ratones WT y CD38KO. El gráfico superior muestra la incidencia (%) de extrasístoles ventriculares (EV) en los ratones anestesiados del grupo WT y CD38KO (N=6 en cada grupo) en situación control (inyección de suero fisiológico, SF) y con sobrecarga beta-adrenérgica (inyección de isoproterenol). Los gráficos inferiores muestran el número de EV en cada uno de los ratones de cada grupo en las dos situaciones (suero fisiológico e isoproterenol en el gráfico de la izquierda y derecha respectivamente). Nótese que las escalas de estos dos gráficos son diferentes.

Una explicación del fracaso en la demostración de diferencias puede ser el corto tiempo de registro luego del estímulo adrenérgico. Quizás un registro telemétrico de eventos que incluya horas o días de grabación (aún un modelo de isquemia crónica) pueda mostrar diferencias en el componente arrítmico.

Un dato que apoya esto es la diferencia en la mortalidad que generó la sobrecarga adrenérgica. Entre los ratones WT la mortalidad fue de 33 %, mientras que ninguno falleció en el grupo CD38KO (figura 30). En comparación, el trabajo de Filho y cols.⁽⁷²⁾ mostró una mortalidad del 25 % en ratas usando un modelo de infarto por sobrecarga de isoproterenol. Dado que nuestros datos fueron obtenidos solo de 5 ratones en cada grupo y el experimento no fue diseñado para valorar mortalidad no podemos hacer inferencias sobre este hecho, pero es un dato a tener en cuenta para futuros experimentos.

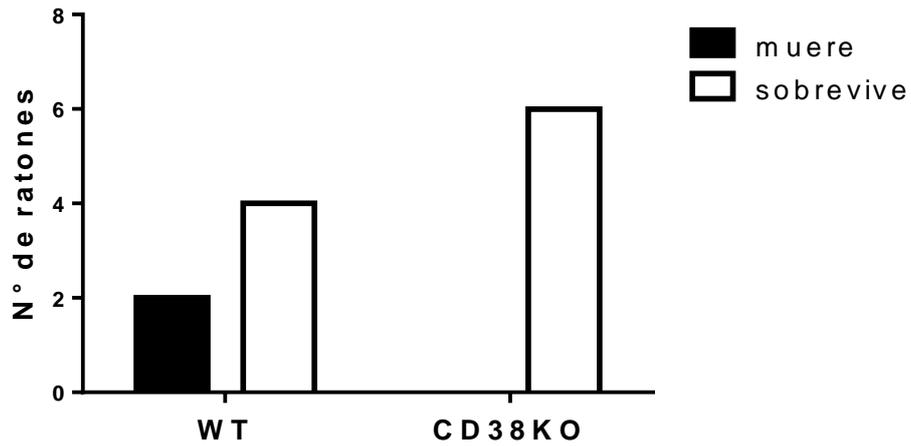


Figura 30. Mortalidad en ratones WT y CD38KO ante un estímulo adrenérgico suprafisiológico. Se grafica el número de ratones que muere (negro) y sobrevive (blanco) en el grupo WT y CD38KO luego de la inyección de una dosis suprafisiológica de isoproterenol.

Tampoco se logró registrar el ritmo cardíaco de muerte por lo que no sabemos si esta diferencia en la mortalidad se debió a taquiarritmias ventriculares, bradiarritmias, o como consecuencia de una falla de bomba por el daño miocárdico generado por el estrés oxidativo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La presente tesis de maestría es producto del trabajo que llevé a cabo durante varios años en el marco de una línea de investigación acerca de la proteína CD38. En ella se reúne y se discute un amplio cuerpo de información publicada por distintos autores en todo el mundo desde su descubrimiento. Además, se aportan nuevos conocimientos sobre la enzima, que ayudan a comprender su papel en la fisiología y fisiopatología cardiovascular.

Durante el proceso he logrado desarrollar diferentes técnicas de experimentación enmarcadas en el método científico. Me enfrenté a innumerables inconvenientes inherentes a la investigación en ciencias básicas y aprendí a resolverlos. Además, logramos instalar y poner a punto una nueva técnica de experimentación a nivel nacional, similar a las usadas en laboratorios de países a la vanguardia en investigación básica. Esto permitió no solo obtener datos sumamente novedosos, sino que a futuro brindará la posibilidad de desarrollar nuevos experimentos para responder otras interrogantes en cuanto a la electrofisiología celular.

En el trabajo se trató de realizar un estudio integrado del papel de CD38 a nivel de la electrofisiología cardíaca abarcando desde la célula hasta el organismo entero. En base a los datos obtenidos se desprenden las siguientes conclusiones:

- Se muestra por primera vez en la literatura científica la morfología del PA de ratones CD38KO, con el agregado de haberse registrado en corazón entero, en un contexto más fisiológico que los registros de célula aislada. Además, también se muestra el efecto del estímulo adrenérgico sobre el PA de corazones aislados de ratones CD38KO.
- CD38 contribuye a una aceleración de la repolarización tardía (disminución de APD_{90}), sin efecto sobre la repolarización temprana (APD_{30}). Esto es manifiesto tanto en estado basal mediante la inhibición aguda de la actividad enzimática como situación de estímulo adrenérgico en modelos de delección genética.
- CD38 y su actividad enzimática no afecta la frecuencia cardíaca en el corazón aislado, pero su delección es capaz de evitar un aumento de la FC cuando el órgano se encuentra en un medio arritmogénico con alto contenido de Ca^{++} . Este efecto en la FC se pierde cuando se agrega a un segundo estímulo arritmogénico dado por sobrecarga catecolaminérgica.
- No se logró demostrar una protección ante arritmias por isquemia global mediante la delección de CD38.
- Por primera vez se hace un análisis detallado de la contribución de CD38 a los distintos componentes del trazado electrocardiográfico (PR, QRS, QTc) mediante la derivación DII.

- De los componentes mencionados se vio un aumento de la amplitud junto con una tendencia a la disminución del QRS ante la ausencia de CD38, posiblemente vinculado a un aumento en la velocidad de conducción.
- Cuando se somete el organismo a un modelo de infarto por sobrecarga adrenérgica, la delección de CD38 genera un aumento marcado de pausas. En ningún caso fue letal.
- No logramos demostrar una contribución de CD38 a taquiarritmias malignas en un modelo de infarto in vivo, aunque los ratones que no tienen la enzima parecen tener un mejor perfil de supervivencia en este escenario.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLOGRAFÍA

1. Zipes DP, Jalife J, Stevenson W. Cardiac electrophysiology: From Cell To Bedside. Seventh Ed. Philadelphia: ELSEVIER; 2018. 1–1389 p.
2. Boukens BJ, Rivaud MR, Rentschler S, Coronel R. Misinterpretation of the mouse ECG: ‘musing the waves of *Mus musculus*.’ *J Physiol* [Internet]. 2014 Nov 1;592(21):4613–26. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2014.279380>
3. Morgan AJ, Bampali K, Ruas M, Factor C, Back TG, Chen SRW, et al. Carvedilol Inhibits cADPR- and IP₃-Induced Ca²⁺ Release. *Messenger* [Internet]. 2016 Jun 1;5(1):92–9. Available from: <http://www.ingentaconnect.com/content/10.1166/msr.2016.1050>
4. Lee HC. Cyclic ADP-Ribose and NAADP: Structures, Metabolism and Functions [Internet]. 2002. 460 p. Available from: <https://books.google.com/books?id=ij30BwAAQBAJ&pgis=1>
5. Braunwald E, Mann DL, Zipes DP, Libby P, Bonow RO. Braunwald’s Heart Disease. 10th ed. Braunwald E, Mann DL, Zipes DP, Libby P, Bonow RO, editors. Philadelphia, PA: Elsevier; 2015.
6. Zeppenfeld K, Tfelt-Hansen J, de Riva M, et al. 2022 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death Developed by the task force for the management of patients with death of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by the. *Eur Heart J*. 2022;1–130.
7. Lee HC, Zhao YJ. Resolving the topological enigma in Ca²⁺ signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *J Biol Chem*. 2019;294(52):19831–43.
8. Liu J, Zhao YJ, Li WH, Hou YN, Li T, Zhao ZY, et al. Cytosolic interaction of type III human CD38 with CIB1 modulates cellular cyclic ADP-ribose levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(31):8283–8.
9. Song EK, Rah SY, Lee YR, Yoo CH, Kim YR, Yeom JH, et al. Connexin-43 hemichannels mediate cyclic ADP-ribose generation and its Ca²⁺-mobilizing activity by NAD⁺/cyclic ADP-ribose transport. *J Biol Chem* [Internet]. 2011;286(52):44480–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.307645>
10. Lin WK, Bolton EL, Cortopassi WA, Wang Y, O’Brien F, Maciejewska M, et al. Synthesis of the Ca²⁺-mobilizing messengers NAADP and cADPR by intracellular CD38 enzyme in the mouse heart: Role in α -adrenoceptor signaling. *J Biol Chem*. 2017;292(32):13243–57.
11. Hogan KA, Chini CCS, Chini EN. The Multi-faceted Ecto-enzyme CD38: Roles in immunomodulation, cancer, aging, and metabolic diseases. *Front Immunol*. 2019;10(MAY):1–12.
12. Mészáros. © 1993 Nature Publishing Group. *Lett to Nat*. 1993;366(2 December 1993):461–4.

13. Galione A, Cui Y, Empson R, Iino S, Wilson H, Terrar D. Cyclic ADP-Ribose and the Regulation of Calcium-Induced Calcium Release in Eggs and Cardiac Myocytes. *Cell Biochem Biophys*. 1998;28(1):19–30.
14. Macgregor AT, Rakovic S, Galione A, Terrar DA. Dual effects of cyclic ADP-ribose on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release and storage in cardiac myocytes isolated from guinea-pig and rat ventricle. *Cell Calcium*. 2007;41(6):537–46.
15. Cui Y, Galione a, Terrar D a. Effects of photoreleased cADP-ribose on calcium transients and calcium sparks in myocytes isolated from guinea-pig and rat ventricle. *Biochem J*. 1999;342 (Pt 2):269–73.
16. Lukyanenko V, Györke I, Wiesner TF, Györke S. Potentiation of Ca(2+) release by cADP-ribose in the heart is mediated by enhanced SR Ca(2+) uptake into the sarcoplasmic reticulum. *Circ Res*. 2001;89:614–22.
17. Park DR, Nam TS, Kim YW, Lee SH, Kim UH. CD38-cADPR-SERCA Signaling Axis Determines Skeletal Muscle Contractile Force in Response to β -Adrenergic Stimulation. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(5):2017–30.
18. Szentesi P, Pignier C, Egger M, Kranias EG, Niggli E. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ refilling controls recovery from Ca²⁺-induced Ca²⁺ release refractoriness in heart muscle. *Circ Res*. 2004;95(8):807–13.
19. Haffner CD, Becherer JD, Boros EE, Cadilla R, Carpenter T, Cowan D, et al. Discovery, synthesis, and biological evaluation of thiazoloquin(az)olin(on)es as potent CD38 inhibitors. *J Med Chem*. 2015;58(8):3548–71.
20. Boslett J, Hemann C, Zhao YJ, Lee H-C, Zweier JL. Luteolinidin Protects the Postischemic Heart through CD38 Inhibition with Preservation of NAD(P)(H). *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2017;361(1):99–108. Available from: <http://jpet.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/jpet.116.239459>
21. Gul R, Park D-R, Shawl AI, Im S-Y, Nam T-S, Lee S-H, et al. Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) and Cyclic ADP-Ribose (cADPR) Mediate Ca²⁺ Signaling in Cardiac Hypertrophy Induced by β -Adrenergic Stimulation. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(3):e0149125. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0149125>
22. Partida-Sánchez S, Cockayne D a, Monard S, Jacobson EL, Oppenheimer N, Garvy B, et al. Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat Med*. 2001;7(11):1209–16.

23. Deshpande DA, Guedes AGP, Graeff R, Dogan S, Subramanian S, Walseth TF, et al. CD38/cADPR Signaling Pathway in Airway Disease: Regulatory Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2018;2018.
24. Camacho-Pereira J, Tarragó MG, Chini CCS, Nin V, Escande C, Warner GM, et al. CD38 Dictates Age-Related NAD Decline and Mitochondrial Dysfunction through an SIRT3-Dependent Mechanism. *Cell Metab.* 2016;23(6):1127–39.
25. Rakovic S, Galione a, Ashamu G a, Potter B V, Terrar D a. A specific cyclic ADP-ribose antagonist inhibits cardiac excitation-contraction coupling. *Curr Biol.* 1996;6:989–96.
26. Rakovic S, Cui Y, Iino S, Galione A, Ashamu GA, Potter BVL, et al. An antagonist of cADP-ribose inhibits arrhythmogenic oscillations of intracellular Ca²⁺ in heart cells. *J Biol Chem.* 1999;274(25):17820–7.
27. Higashida H, Egorova A, Higashida C, Zhong ZG, Yokoyama S, Noda M, et al. Sympathetic potentiation of cyclic ADP-ribose formation in rat cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1999;274(47):33348–54.
28. Prakash YS, Kannan MS, Walseth TF, Sieck GC. cADP ribose and [Ca²⁺]_i regulation in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2000;279(4 48-4):1482–9.
29. Iino S, Cui Y, Galione A, Terrar DA. Actions of cADP-ribose and its antagonists on contraction in guinea pig isolated ventricular myocytes: Influence of temperature. *Circ Res.* 1997;81(5):879–84.
30. Zhang X, Tallini YN, Chen Z, Gan L, Wei B, Doran R, et al. Dissociation of FKBP12.6 from ryanodine receptor type 2 is regulated by cyclic ADP-ribose but not β-adrenergic stimulation in mouse cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2009;84(2):253–62.
31. Takahashi J, Kagaya Y, Kato I, Ohta J, Ioyama S, Miura M, et al. Deficit of CD38/cyclic ADP-ribose is differentially compensated in hearts by gender. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312(2):434–40.
32. Aksoy P, White TA, Thompson M, Chini EN. Regulation of intracellular levels of NAD: A novel role for CD38. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;345(4):1386–92.
33. Lewis AM, Aley PK, Roomi A, Thomas JM, Masgrau R, Garnham C, et al. β-Adrenergic receptor signaling increases NAADP and cADPR levels in the heart. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2012;427(2):326–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.09.054>
34. Kannt A, Sicka K, Kroll K, Kadereit D, Gögelein H. Selective inhibitors of cardiac ADPR cyclase as novel anti-arrhythmic compounds. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2012;385(7):717–27.
35. Xie GH, Rah SY, Yi KS, Han MK, Chae SW, Im MJ, et al. Increase of intracellular Ca²⁺ during

- ischemia/reperfusion injury of heart is mediated by cyclic ADP-ribose. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;307(3):713–8.
36. Guan X-H, Hong X, Zhao N, Liu X-H, Xiao Y-F, Chen T-T, et al. CD38 promotes angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *J Cell Mol Med [Internet].* 2017;XX(X):1–11. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jcmm.13076>
 37. Boslett J, Helal M, Chini E, Zweier JL. Genetic deletion of CD38 confers post-ischemic myocardial protection through preserved pyridine nucleotides. *J Mol Cell Cardiol [Internet].* 2018;118:81–94. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.02.015>
 38. Reyes LA, Boslett J, Varadharaj S, De Pascali F, Hemann C, Druhan LJ, et al. Depletion of NADP(H) due to CD38 activation triggers endothelial dysfunction in the postischemic heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(37):11648–53.
 39. Guan X, Liu X, Hong X, Zhao N, Xiao Y, Wang L, et al. CD38 Deficiency Protects the Heart from Ischemia / Reperfusion Injury through Activating SIRT1 / FOXOs-Mediated Antioxidative Stress Pathway. 2016;2016.
 40. Agorrody G. Rol de CD38 en la actividad eléctrica cardíaca. [Tesis de maestría]. Montevideo, Uruguay: PROINBIO, UdelaR; 2019.
 41. Agorrody G, Peclat TR, Peluso G, Gonano LA, Santos L, van Schooten W, et al. Benefits in cardiac function by CD38 suppression: Improvement in NAD⁺ levels, exercise capacity, heart rate variability and protection against catecholamine-induced ventricular arrhythmias. *J Mol Cell Cardiol [Internet].* 2022;166(January):11–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2022.01.008>
 42. Riascos Bernal D, Baltaxe E, Pascual A G. La preparación de Langendorff: corazón de mamífero aislado perfundido. *Univ med.* 2004;(June):111–7.
 43. Rauscher A, Gyimesi M, Kovács M, Málnási-Csizmadia A. Targeting Myosin by Blebbistatin Derivatives: Optimization and Pharmacological Potential. *Trends Biochem Sci [Internet].* 2018;43(9):700–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.06.006>
 44. Aguilar-Sanchez Y, Rodríguez de Yurre A, Argenziano M, Escobar AL, Ramos-Franco J. Transmural Autonomic Regulation of Cardiac Contractility at the Intact Heart Level. *Front Physiol.* 2019;10(June):1–19.
 45. Mattiazzi A, Argenziano M, Aguilar-Sanchez Y, Mazzocchi G, Escobar AL. Ca²⁺ Sparks and Ca²⁺ waves are the subcellular events underlying Ca²⁺ overload during ischemia and reperfusion in perfused intact hearts. *J Mol Cell Cardiol [Internet].* 2015 Feb;79:69–78. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022282814003320>
 46. López Alarcón MM, Rodríguez de Yurre A, Felice JI, Medei E, Escobar AL. Phase 1

- repolarization rate defines Ca²⁺ dynamics and contractility on intact mouse hearts. *J Gen Physiol*. 2019;151(6):771–85.
47. Gan L, Jiang W, Xiao YF, Deng L, Gu L Da, Guo ZY, et al. Disruption of CD38 gene enhances cardiac functions by elevating serum testosterone in the male null mice. *Life Sci [Internet]*. 2011;89(13–14):491–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.07.020>
 48. Boslett J, Reddy N, Alzarie YA, Zweier JL. Inhibition of CD38 with the thiazoloquin(az)olin(on)e 78c protects the heart against post-ischemic injury. *J Pharmacol Exp Ther [Internet]*. 2019;jpet.118.254557. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30635470><http://jpet.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/jpet.118.254557>
 49. Ferreiro M, Petrosky AD, Escobar AL. Intracellular Ca²⁺ release underlies the development of phase 2 in mouse ventricular action potentials. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2012;302(5).
 50. KNOLLMANN BC, KATCHMAN AN, FRANZ MR. Monophasic Action Potential Recordings from Intact Mouse Heart: Validation, Regional Heterogeneity, and Relation to Refractoriness. *J Cardiovasc Electrophysiol [Internet]*. 2001 Nov;12(11):1286–94. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11761418&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/F5251F66-210A-4B2D-9B62-EBBA441B601B>
 51. Ying S, Cao H, Hu H, Wang X, Tang Y, Huang C. Alk7 Depleted Mice Exhibit Prolonged Cardiac Repolarization and Are Predisposed to Ventricular Arrhythmia. *PLoS One*. 2016;11(2):1–14.
 52. Guinamard R, Bouvagnet P, Hof T, Liu H, Simard C, Sallé L. TRPM4 in cardiac electrical activity. *Cardiovasc Res*. 2015;108(1):21–30.
 53. King JH, Zhang Y, Lei M, Grace AA, Huang CLH, Fraser JA. Atrial arrhythmia, triggering events and conduction abnormalities in isolated murine RyR2-P2328S hearts. *Acta Physiol*. 2013;207(2):308–23.
 54. Szentandrassy N, Farkas V, Bárándi L, Hegyi B, Ruzsnavszky F, Horváth B, et al. Role of action potential configuration and the contribution of Ca²⁺ and K⁺ currents to isoprenaline-induced changes in canine ventricular cells. *Br J Pharmacol*. 2012;167(3):599–611.
 55. Grandi E, Vecchiotti S, Severi S, Giordano E, Cavalcanti S. Effects of β -adrenergic stimulation on the ventricular action potential: a simulation study. *Model Med Biol VI*. 2005;1:87–94.
 56. Knollmann BC, Schober T, Petersen AO, Sirenko SG, Franz MR. Action potential characterization in intact mouse heart: Steady-state cycle length dependence and electrical restitution. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2007;292(1):614–21.
 57. Matasic DS, Brenner C, London B. Emerging potential benefits of modulating NAD⁺

- metabolism in cardiovascular disease. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2018;314(4):H839–52.
58. Kuzmin VS, Pustovit KB, Abramochkin D V. Effects of exogenous nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) in the rat heart are mediated by P2 purine receptors. *J Biomed Sci* [Internet]. 2016;23(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12929-016-0267-y>
 59. Pustovit KB, Kuz'Min VS, Sukhova GS. Effect of exogenous extracellular nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) on bioelectric activity of the pacemaker and conduction system of the heart. *Bull Exp Biol Med*. 2015;159(2):188–91.
 60. Mejía-Alvarez R, Manno C, Villalba-Galea C a, del Valle Fernández L, Costa R, Fill M, et al. Pulsed local-field fluorescence microscopy: a new approach for measuring cellular signals in the beating heart. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* [Internet]. 2003 Mar;445(6):747–58. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00424-002-0963-1>
 61. Curtis MJ, Hancox JC, Farkas A, Wainwright CL, Stables CL, Saint DA, et al. The lambeth conventions (II): Guidelines for the study of animal and human ventricular and supraventricular arrhythmias. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2013;139(2):213–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.04.008>
 62. Barbosa MTP, Soares SM, Novak CM, Sinclair D, Levine JA, Aksoy P, et al. The enzyme CD38 (a NAD glycohydrolase, EC 3.2.2.5) is necessary for the development of diet-induced obesity. *FASEB J*. 2007;21(13):3629–39.
 63. Nayir S, Lacour SP, Kucera JP. Active force generation contributes to the complexity of spontaneous activity and to the response to stretch of murine cardiomyocyte cultures. *J Physiol*. 2022;600(14):3287–312.
 64. Qu Z. Critical mass hypothesis revisited: role of dynamical wave stability in spontaneous termination of cardiac fibrillation. *Am J Physiol Circ Physiol* [Internet]. 2006 Jan;290(1):H255–63. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 65. Huang CLH. Murine electrophysiological models of cardiac arrhythmogenesis. *Physiol Rev*. 2017;97(1):283–409.
 66. Vaidya D, Morley GE, Samie FH, Jalife J. Reentry and fibrillation in the mouse heart: A challenge to the critical mass hypothesis. *Circ Res*. 1999;85(2):174–81.
 67. Jelinek M, Wallach C, Ehmke H, Schworer AP. Genetic background dominates the susceptibility to ventricular arrhythmias in a murine model of β -adrenergic stimulation. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):2–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-20792-5>
 68. Stables CL, Curtis MJ. Development and characterization of a mouse in vitro model of

- ischaemia-induced ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2009;83(2):397–404.
69. Scofield SLC, Singh K. Confirmation of Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury in Mice Using Surface Pad Electrocardiography. *J Vis Exp.* 2016;(117):1–9.
 70. Curtis MJ, Hearse DJ. Reperfusion-induced arrhythmias are critically dependent upon occluded zone size: Relevance to the mechanism of arrhythmogenesis. *J Mol Cell Cardiol.* 1989;21(6):625–37.
 71. Valverde CA, Korniyev D, Ferreiro M, Petrosky AD, Mattiazzi A, Escobar AL. Transient Ca²⁺ depletion of the sarcoplasmic reticulum at the onset of reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2010;85(4):671–80.
 72. Lobo Filho HG, Ferreira NL, Sousa RB de, Carvalho ER de, Lobo PLD, Lobo Filho JG. Experimental model of myocardial infarction induced by isoproterenol in rats. *Rev Bras Cir Cardiovasc [Internet].* 2011;26(3):469–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22086586>
 73. Thai TL, Arendshorst WJ. Mice lacking the ADP ribosyl cyclase CD38 exhibit attenuated renal vasoconstriction to angiotensin II, endothelin-1, and norepinephrine. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2009;297(1):169–76.
 74. Bruzzone S, Franco L, Guida L, Zocchi E, Contini P, Bisso A, et al. A Self-restricted CD38-connexin 43 Cross-talk Affects NAD⁺ and Cyclic ADP-ribose Metabolism and Regulates Intracellular Calcium in 3T3 Fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001;276(51):48300–8.
 75. Allawadhi P, Khurana A, Sayed N, Kumari P, Godugu C. Isoproterenol-induced cardiac ischemia and fibrosis: Plant-based approaches for intervention. *Phyther Res.* 2018;32(10):1908–32.