

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**ARRITMOGÉNESIS EN RATONES ALIMENTADOS  
CON DIETA RICA EN GRASAS SATURADAS**

FELIPE ARANEDA RIOS

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAGISTER EN FISIOPATOLOGIA

Directora de Tesis: Prof. Dra. Paulina Donoso Laurent

2017





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**ARRITMOGÉNESIS EN RATONES ALIMENTADOS  
CON DIETA RICA EN GRASAS SATURADAS**

FELIPE ARANEDA RIOS

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAGISTER EN FISIOPATOLOGIA

Directora de Tesis: Prof. Dra. Paulina Donoso Laurent

2017

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER**

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato**

**FELIPE ARANEDA RIOS**

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Fisiopatología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 12 de Octubre de 2017.**

---

**Prof. Dra. Paulina Donoso Laurent  
Directora de Tesis  
Programa de Fisiología y Biofísica,  
Instituto de Ciencias Biomédicas**

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

---

**Prof. Dr. Ricardo Bull S.**

---

**Prof. Dr. Victor Parra M.**

---

**Prof. Dr. Juan Carlos Prieto D.**

---

**Prof. Dr. Ramon Rodrigo S.  
Presidente Comisión**

## **DEDICATORIA**

A Camila, mi esposa, confidente y amiga. Por la paciencia, el amor y la compañía. Por las noches en vela trabajando al lado mío. Por mantener encendida mi pasión por la ciencia, y recordarme lo maravilloso de este mundo, que se expande infinito con nuestras ideas, y la dedicación par llevarlas a cabo.

A Maya, por su pasión por los roedores pequeños, y las siestas en mitad de la tarde.

## **AGRADECIMIENTO**

A mis profesoras, Paulina Donoso y Gina Sánchez, por todo su trabajo y sus enseñanzas, sin las cuales no habría podido realizar mi Tesis de Magister. Lo aprendido perdurará por el resto de mi ejercicio profesional.

A los integrantes de la comisión evaluadora, cuyas críticas constructivas me permitieron avanzar y cumplir los objetivos del programa.

A los Doctores Anibal Llanos y Emilio Herrera, por darme un punto de partida en el campo de la investigación in vivo.

## INDICE

RESUMEN 9

ABSTRACT 10

INTRODUCCIÓN 11

- *Mecanismos moleculares de la señalización de Calcio y Receptor de Ryanodina 12*
- *Potencial de acción ventricular y Electrocardiograma 13*
- *Alteraciones del funcionamiento de RyR y rol proarritmogénico 14*
- *Modificaciones de la actividad de RyR. Modificaciones covalentes y efecto de dieta rica en grasas saturadas 16*
- *Estrés oxidativo y dieta alta en grasas saturadas 16*

HIPOTESIS 19

OBJETIVO 19

MATERIALES Y METODOS 20

- *Modelo experimental: Animales 20*
- *Sedación y Registro de Electrocardiograma en Reposo 21*
- *Registro ECG basal y Stress farmacológico inducido 23*
- *Registro de Variables Electrocardiográficas y Análisis 23*

RESULTADOS 24

- *Efecto arritmogénico de dieta rica en grasas saturadas en condición de reposo 24*
- *Efecto arritmogénico de dieta rica en grasas saturadas en condición de stress farmacológico 27*

DISCUSION 28

BIBLIOGRAFIA 30



## RESUMEN

La obesidad es un problema de salud pública. Se ha demostrado el desarrollo directo de falla cardíaca secundaria, con manifestaciones clínicas precoces y sutiles, como por ejemplo una mayor frecuencia de episodios de arritmia en sujetos obesos.

En modelos de ratones alimentados con una dieta rica en ácidos grasos saturados (HFD), que se hacen obesos a las 8 semanas, se produce alteraciones del equilibrio redox en el corazón lo que aumenta la actividad de los Receptores de Ryanodina (RyR) *in vitro*, pero no se ha estudiado su correlación con la actividad eléctrica del corazón *in vivo*.

En este estudio, registramos el electrocardiograma de ratones alimentados con dieta rica en ácidos grasos saturados en reposo y luego de un estrés con cafeína y epinefrina para estudiar la tendencia a producir arritmias de estos animales. También estudiamos el efecto de apocinina, un inhibidor de la NADPH oxidasa (NOX) que normaliza la actividad de los RyR *in vitro*, sobre la frecuencia de arritmias en estos animales.

Se utilizaron ratones alimentados con dieta rica en grasas saturadas (HFD, 60% de las calorías proviene de grasas saturadas), desde las 3 semanas de vida, por 8 semanas, versus un grupo control alimentado con dieta normal (C, 10% de calorías proviene de grasas saturadas). Algunos animales HFD y algunos controles recibieron apocinina (0.5 mg /ml) en el agua de bebida desde el inicio de la quinta semana, (grupo HFD+APO y C+APO respectivamente). Se realizaron mediciones basales de segmentos del ECG (Onda P, PR, RR, QRS, QT) y se registraron de arritmias ventriculares, en condición de reposo y frente a stress farmacológico proarritmogénico (Cafeína + Epinefrina).

Encontramos que el grupo HFD presentó un aumento de fenómenos arritmogénicos malignos durante el periodo de registro en reposo comparados con el grupo control. La adición de apocinina al agua de bebida disminuyó estos eventos en forma significativa; sin embargo, no logro evitar el desarrollo de arritmias durante la prueba de stress farmacológico. Registramos un acortamiento del QRS en ratones HFD, sin modificación del segmento Qt.

Consideramos que los presentes resultados son muy sugerentes de la asociación entre disfunción de RyR2, dieta alta en grasas, y desarrollo de arritmias malignas.

## ABSTRACT

Obesity is a public health issue. Secondary heart failure has been proven, with early and subtle clinical manifestations such as a higher frequency of arrhythmias in obese subjects.

In a model of mice fed with a high fat diet (HFD), they become obese after 8 weeks, developing redox imbalance and increased activity of Ryanodine Receptors (RyR) *in vitro*; but their correlation with the heart electric activity *in vivo* hasn't been studied.

In this study, we registered electrocardiogram of mice fed with a diet rich in saturated fat during rest, and during stress using caffeine and epinephrine, to analyze the risk of arrhythmia in these animals. We also studied the effect of Apocynin, a NADPH oxidase (NOX) inhibitor which normalizes RyR2 activity *in vitro*, over the arrhythmia frequency in these animals.

We used mice fed with a diet enriched in saturated fat (HFD, 60% calories from saturated fat), from week 3, for 8 weeks, versus a control group fed with control diet (C, 10% calories from saturated fat). A subgroup of UFD and control animals received apocynin (0.5 mg/ml) in their drinking water, from week 5 (Groups HFD+APO and C+APO respectively). Basal measurements of ECG segments (P wave, PR, RR; QRS, Qt), and ventricular arrhythmias during rest and pharmacological stress condition (caffeine + epinephrine) were registered.

We found that the HFD group presented an increase of malignant arrhythmias during rest, compared with control group. Addition of apocynin in the drinking water diminished these event significantly; however, it could not prevent these arrhythmias during pharmacological stress. A shortening of the QRS segment, without changes in segment Qt was registered.

The results are suggestive of association between RyR2 dysfunction, a high fat diet, and development of malignant arrhythmias.

## INTRODUCCION

La muerte súbita cardiaca (SCD) representa un treinta por ciento de todas las muertes (1). Las arritmias ventriculares, como taquicardia ventricular y fibrilación ventricular, que previenen la actividad normal de bombeo de sangre del corazón, son causas prevalentes de SCD y los sujetos obesos tienen un mayor riesgo de muerte súbita que los sujetos no obesos (2-4). La obesidad se asocia con frecuencia a dislipidemia, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2, y todas estas condiciones aumentan aún más el riesgo de presentar arritmias (5). Las arritmias se producen por defectos de la apertura y/o cierre de alguno(s) de los canales iónicos que contribuyen a la actividad eléctrica del corazón.

Los receptores de la Ryanodina (RyR2) son los canales de liberación de calcio del retículo sarcoplasmático (SR), y en el corazón su apertura está estrechamente controlada por la corriente de calcio de tipo L que entra en la célula durante el potencial de acción que recorre los túbulos transversales. La apertura de los RyR2 en respuesta a la corriente de entrada de calcio por los canales L constituye lo que se conoce como liberación de calcio inducida por calcio, que es como ocurre el acoplamiento entre la excitación y la contracción del músculo cardiaco. Para que ocurra la relajación, los RyR2 se deben cerrar para permitir que la bomba de calcio del SR recapte el calcio y su concentración vuelva a los niveles de reposo. Los RyR2 deben permanecer cerrados hasta el próximo potencial de acción. Si el cierre no ocurre adecuadamente, la liberación de calcio a través de RyR2 durante la diástole activa al intercambiador Na/Ca de la membrana de la célula, lo cual genera una corriente de entrada de sodio que puede provocar la despolarización de la membrana e iniciar un potencial de acción que no sigue el ritmo sinusal normal, generando arritmias.

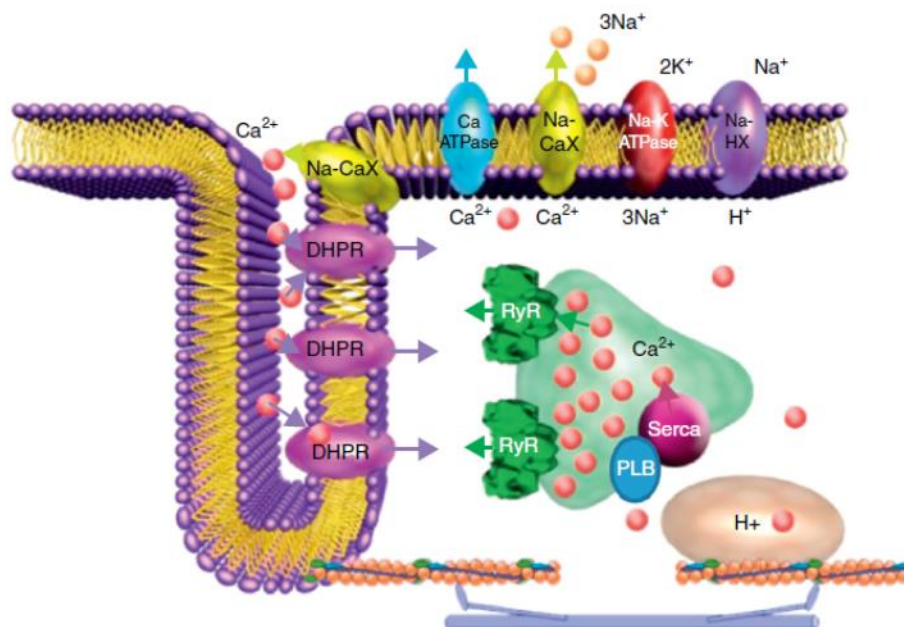
Los RyR2 contienen cisteínas hiperreactivas que sufren modificaciones oxidativas por especies reactivas de oxígeno (ROS). Numerosos estudios demuestran que la oxidación de RyR2 favorece la liberación de calcio y genera arritmias en cardiomiocitos aislados (6, 7) y en modelos de insuficiencia cardiaca en los que se produce un aumento del estrés oxidativo (8,9).

La obesidad se caracteriza por un aumento del estrés oxidativo (10,11), y los RyR2 aislados de corazones de ratones obesos presentan una mayor activación por calcio que los controles.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si la mayor activación de los RyR2 aislados de corazones de ratones obesos se correlaciona con una mayor predisposición a generar arritmias in vivo en condiciones basales y/o stress farmacológico.

### ***Mecanismos moleculares de la señalización de Calcio y Receptor de Ryanodina***

El acoplamiento entre la excitación y la contracción en el músculo cardíaco (EAC) ocurre por un proceso llamado liberación de calcio inducida por calcio (12-15). La activación de Canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje en el cardiomiocito desencadena la fase 0 del potencial de acción, que a su vez abre los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  dependientes de voltaje tipo L o receptores a dihidropiridinas (DHPR) localizados en el túbulo T (Figura 1) (16), que genera una corriente entrante de  $\text{Ca}^{+2}$  ( $\text{I}_{\text{Ca}}$ ), que activa al Canal/Receptor de Ryanodina (RyR) (17), el canal liberador de  $\text{Ca}^{+2}$  del retículo sarcoplásmico (RS). El  $\text{Ca}^{+2}$  liberado a través del RyR se une a la troponina C de los miofilamentos, lo que genera un cambio conformacional en el complejo de troponinas/tropomiosina, activando la contracción. Por otro lado, la relajación requiere que la concentración de calcio citosólico ( $[\text{Ca}^{+2}]_i$ ) disminuya a su nivel de reposo, vía la  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA), mientras que una cantidad equivalente al  $\text{Ca}^{+2}$  que entró como  $\text{I}_{\text{Ca}}$  debe ser extruido por el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  de la membrana plasmática. Este aumento y posterior disminución de la concentración de calcio intracelular es lo que conocemos como “señal transitoria de Calcio” (18).

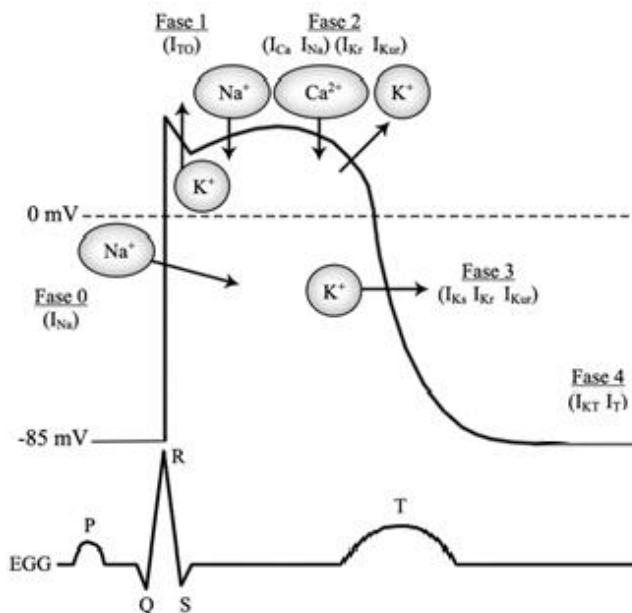


**FIGURA 1:** Acoplamiento E-C en el Músculo Cardíaco. La corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  que entra vía los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L o receptores a dihidropiridinas (DHPR) de túbulos T, activa a los receptores de ryanodina (RyR) localizados en el RS, lo que induce la liberación de cantidades mayores de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares, aumentando rápidamente la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto permite que se active la maquinaria contráctil. Luego del cierre de los RyR ocurre la relajación. La remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  se lleva a cabo principalmente por la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del RS (SERCA), cuya función está regulada por fosfolambano (PLB) y que se encarga de recuperar los reservorios para el siguiente ciclo del EAC; el intercambiador  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  (Na-CaX) transporta parte del  $\text{Ca}^{2+}$  hacia al exterior de la célula. La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa ayuda a la mantención de la concentración de calcio durante el reposo. Las flechas indican la dirección de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  vía los canales iónicos (DHPR, RyR), intercambiadores (Na-CaX, este último genera una corriente de entrada al inicio de la contracción y de salida al final de la contracción) y bombas (SERCA, Ca-ATPasa). (16)

### ***Potencial de acción ventricular y Electrocardiograma***

El nodo sinoauricular determina la generación cíclica de potenciales de acción los que se conducen al sincicio miocárdico auricular y ventricular, depolarizándolo en forma secuencial, generando la contracción de las aurículas y ventrículos cardíacos (19).

El potencial de acción ventricular se compone de 5 fases, cada una de ellas caracterizada por corrientes de entrada y salida, que a su vez dependen de canales específicos, y se corresponden con segmentos específicos del ECG (Figura 2). La entrada de calcio ( $\text{I}_{\text{Ca}}$ ) ocurre durante la fase 2, segmento que coincide con la liberación de calcio de calcio desde el RS, y por ende con la contracción muscular en condiciones fisiológicas.



**FIGURA 2.** Potencial de acción miocárdico, corrientes asociadas a cada fase, y correlación con ECG.

**Fase 0:** Fase de rápida despolarización, mediada por  $\text{Na}^+$ .

**Fase 1:** Repolarización rápida, por corriente Ito ( $\text{K}^+$ ).

**Fase 2:** Meseta de equilibrio, mediada por a) una corriente lenta de entrada de  $\text{Na}^+$  por canales no inactivados ( $\text{I}_{NaL}$ ), b) Una de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales tipo-L que genera la corriente  $\text{I}_{Ca}$  (que libera  $\text{Ca}$  del RS vía  $\text{RyR2}$ , activando la contracción miocárdica); y 3 corrientes rectificadoras tardías de salida de  $\text{K}^+$  de activación ultrarrápida- $\text{I}_{Kur}$ , rápida- $\text{I}_{Ks}$  y lenta- $\text{I}_{Ks}$ .

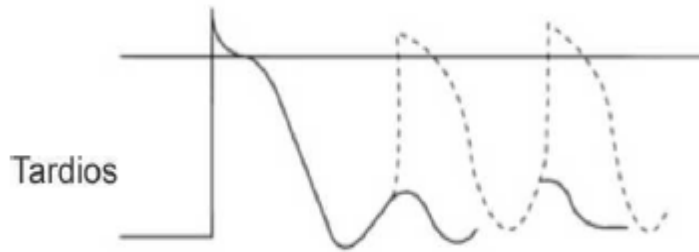
**Fase 3:** Inactivación de la corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , predominio de corrientes repolarizantes de  $\text{K}^+$ , activación de otras dos corrientes de  $\text{K}^+$ :  $\text{I}_{K1}$  e  $\text{I}_{KATP}$ .

**Fase 4:** Repolarización, corresponde a diástole.

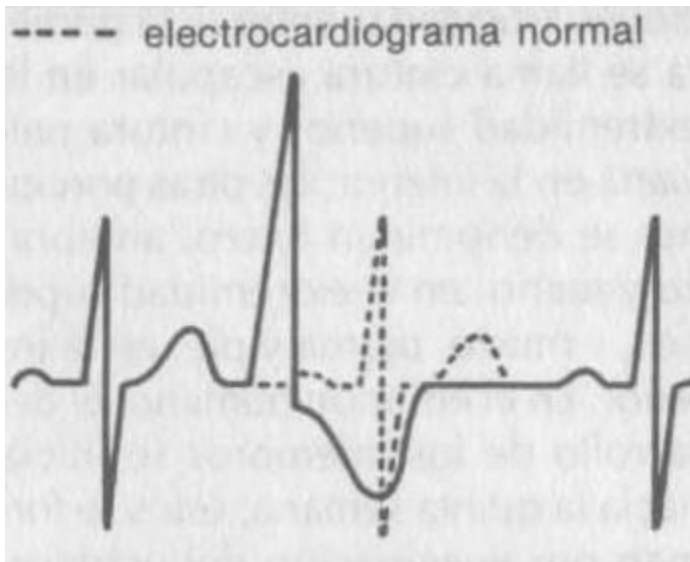
La actividad eléctrica registrada durante la activación secuencial del sincicio auricular y ventricular se puede registrar, en forma no invasiva, a través del Electrocardiograma (ECG) (Figura 2), donde la onda P representa la despolarización auricular, el segmento QRS la despolarización ventricular (enmascarando la repolarización auricular), y la onda T que representa la repolarización ventricular.

### ***Alteraciones del funcionamiento de RyR y rol proarritmogénico***

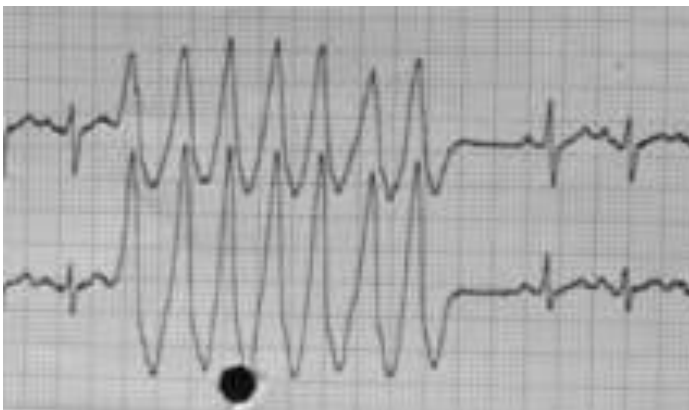
Ante una falla de los mecanismos que producen el cierre de  $\text{RyR2}$ , se puede producir salida de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la diástole (*Fuga de Calcio*), lo cual puede generar ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  que activan al intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática, generando una corriente de entrada neta de  $\text{Na}^+$ , que produce una despolarización (20-24). Si se alcanza el umbral de activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L, se desarrollan postpotenciales de acción tardíos (DAD) (Figura 3) (25-27). Los DAD son capaces de generar actividad gatillada, durante la fase 4 del potencial de acción, traducándose en alteraciones del ritmo ventricular, tales como Extrasístoles Ventriculares y Taquicardia Ventricular (Figuras 4 y 5) (28). Este es el mecanismo de generación de arritmias en la Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica (TVPC) (29-31), donde una falla genética de  $\text{RyR}$  produce una mayor actividad durante el ejercicio o stress emocional, gatillando los eventos moleculares antes descritos.



**Figura 3.** Post Potenciales Tardíos (DAD), en potencial de acción miocárdico, determinados por alteraciones de corrientes durante fase 4 del potencial de acción.



**Figura 4.** Extrasístole Ventricular (ESV), con comparación de ECG normal. Se puede observar la presencia de un complejo adicional, no precedido de onda P, y en relación temporal a la onda T precedente. Generalmente el complejo QRS tiene una amplitud mayor en la ESV que en los complejos normales, y posee un vector de repolarización distinto al de un complejo normal.



**Figura 5.** Taquicardia Ventricular, donde se genera un ritmo determinado por al menos 4 ESV seriados. Arritmia maligna, potencialmente mortal.

### ***Modificaciones de la actividad de RyR. Modificaciones covalentes y efecto de dieta rica en grasas saturadas.***

Diversas modificaciones posttraduccionales, tales como la fosforilación o la oxidación del RyR2 (32-34) generan canales más sensibles a la activación por calcio produciendo liberación espontánea de “*sparks*” en diástole (35-38).

Estos mecanismos también se asocian a falla cardiaca, a través de remodelamiento cardiaco patológico (39-41). Algunos de vías más estudiados son:

Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina (CaM) – Factor nuclear de células T Activadas (NFAT)(42);

Kinasa II dependiente de Ca-CaM (CaMKII)(43); esta kinasa se ha demostrado que es responsable de la fosforilación y aumento de la actividad arritmogénica del RyR2 en varios modelos experimentales (34,44), y también participa en el desarrollo de hipertrofia, regulando factores transcripcionales como MEF2, CREB y NFAT (45,46).

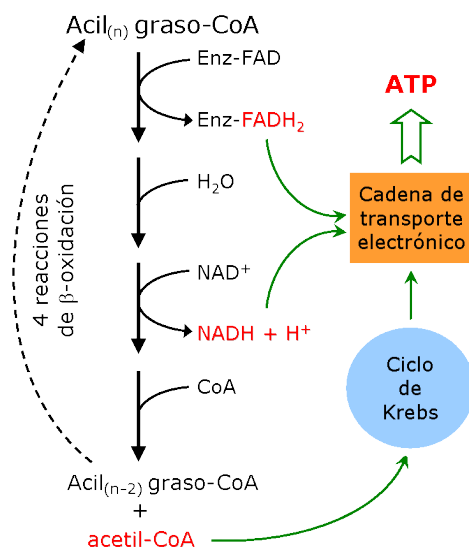
Dado el rol central de oxidación del RyR en la regulación de su actividad es importante conocer si esta se modifica en situaciones en las que se observa un estrés oxidativo como por ejemplo en los modelos de dieta rica en grasas saturadas (dieta alta en grasas, HFD).

### ***Estrés oxidativo y dieta alta en grasas saturadas.***

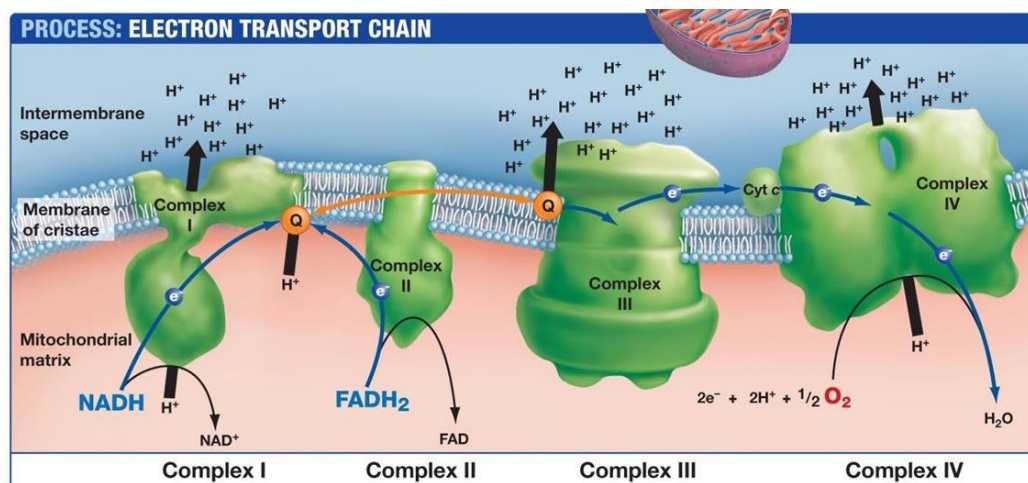
Al aumentar el contenido de ácidos grasos en la dieta, la oxidación de ácido grasos (RCOOH) también aumenta, pudiendo producir hasta el 95% del ATP a partir de ellos (47). Esto se traduciría en un aumento del stress oxidativo, ya que los RCOOH se metabolizan en peroxisomas y mitocondrias. Los peroxisomas oxidan ácidos grasos de cadena larga y generan peróxido de hidrógeno en su primera reacción de oxidación. La vía mitocondrial no genera peróxido de hidrógeno directamente, pero las mitocondrias producen 25% más de peróxido de hidrogeno cuando metabolizan palmitato en lugar de piruvato (48). El peróxido de hidrógeno aumenta en la mitocondria durante la oxidación de los AGL debido a las altas concentraciones de FADH<sub>2</sub> y NADH que entran a la Cadena Transportadora de Electrones (CTE, Figura 6), lo que incrementa la reducción de la Coenzima Q, lo que a su vez lleva a un aumento de la generación de anión superóxido (que es rápidamente dismutado a peróxido de hidrogeno) por el complejo I de la CTE debido a un incremento en la vida media de sus compuestos reducidos



(Figura 7). Por ende, el estrés oxidativo es una consecuencia normal de la oxidación de los ácidos grasos.



**Figura 6.** β-oxidación de ácidos grasos, resultando en generación de FADH<sub>2</sub> y NADH<sub>2</sub>, que entran en la cadena transportadora de electrones.

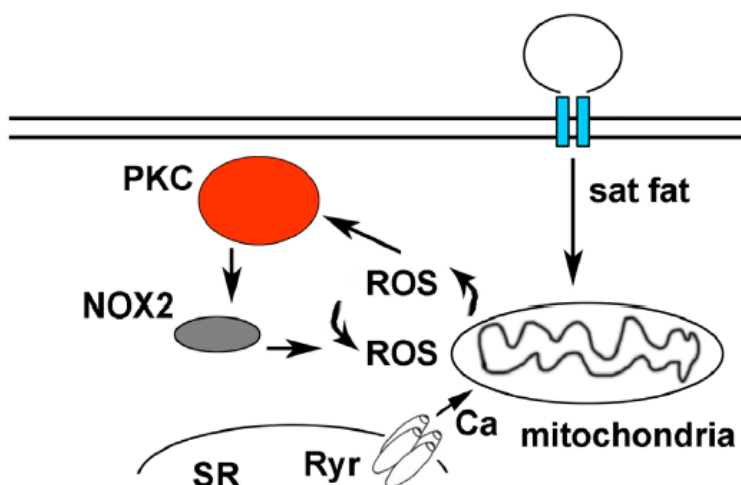


**Figura 7.** El ingreso de NADH<sub>2</sub> y FADH<sub>2</sub> a la cadena transportadora de electrones, lleva a la reducción de Coenzima Q (Q), sistema que, al saturarse, lleva a un aumento de anión superóxido, por un incremento en la vida media de sus compuestos reducidos. Anión superóxido es dismutado rápidamente a peróxido de hidrógeno.

Ratones alimentados con una dieta con 60% grasas saturadas tienen incrementada la actividad de la catalasa mitocondrial (que indica incremento de la producción de peróxido de

hidrogeno), que es evidente después de sólo 2 semanas tras iniciar la dieta (48). Aún más, animales obesos son generalmente insulino-resistentes, lo cual se asocia a un incremento de ROS mitocondrial y disfunción mitocondrial (49,50).

También hay evidencia que la dieta rica en grasas activa la NADPH Oxidasa (NOX), una familia de enzimas especialmente dedicadas a la generación de anión superóxido (51,52). Pese a que los mecanismos de aumento de la expresión de la NOX aún no están totalmente esclarecidos, tanto NOX2 como NOX4, ha demostrado estar aumentadas en músculo esquelético, tejido vascular y riñones de ratas HFD vía Protein Kinasa C (PKC) (51-54) (Figura 8).



**Figura 8.** Vía propuesta para actividad directa de ácidos grasos saturados en activación de NOX2 en músculo cardíaco. La generación de ROS en las mitocondrias, derivado de la  $\beta$ -oxidación de AG, generaría activación de PKC, activación de NOX2 y un consiguiente aumento exponencial de ROS. (54)

Recientemente, se ha determinado que una actividad aumentada de NOX, se traduce en oxidación de RyR (55-58), lo que aumenta de su actividad de canal. También se ha demostrado que el uso de un inhibidor de la actividad de NOX (Apocinina), revierte el aumento de actividad de RyR (55). Hasta el momento, no se ha establecido si el aumento de actividad de RyR2 observada *in vitro* se correlaciona con un aumento de la actividad del RyR2 *in vivo*.

El propósito de esta tesis fue investigar si ratones alimentados con dieta alta en grasa presentan *in vivo* una mayor actividad de RyR2, la que se evidenciará como una mayor propensión a generar arritmias.

## **HIPÓTESIS**

Una dieta rica en grasas saturadas, con la consecuente modificación de RyR, se traducirá en un aumento de la presencia de eventos arritmogénicos, como manifestación de falla cardíaca. La presencia de apocinina, un inhibidor de una de las vías de oxidación de RyR2 (NOX), reducirá o normalizará la probabilidad de arritmogénesis en esta situación patológica.

## **OBJETIVOS**

### **1. Objetivos Generales**

Determinar y cuantificar fenómenos arritmogénicos en 4 grupos de ratones: Dieta control, Dieta control + Apocinina, HFD, HFD + Apocinina.

### **2. Objetivos Específicos Realizados**



- Establecer un protocolo para medición de electrocardiografía en ratones
- Establecer un protocolo de sedación y monitorización acorde
- Medir variables electrocardiográficas en ratones alimentados con dieta rica en AGS y controles
- Realizar mediciones electrocardiográficas en los 4 grupos, bajo estímulos proarritmogénicos farmacológicos (cafeína y epinefrina).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Modelo experimental: Animales

Utilizamos ratones C57BL/6, una cepa especialmente susceptible a desarrollar obesidad al ser alimentados con una dieta rica en grasas. Los ratones fueron mantenidos a 23°C, en un ciclo día-noche de 12 horas, y alimentados a libre demanda, con una dieta control (Calorías de 10% grasa, 20% proteínas, carbohidratos 70%), y una dieta rica en grasas saturadas (Calorías de Grasa Saturadas 60%, 20% proteína, 20% Hidratos de Carbono) (HFD) por 8 semanas.

Se utilizó el modelo animal de ratón, dado su extenso uso en protocolos experimentales proarritmogénicos, y que pese a poseer características propias, en términos electrofisiológicos es muy similar a la humana. Se adjunta tabla de valores normales electrofisiológicos en ratones (59), en comparación a valores humanos (Tabla 1).

	Humano	Ratón
Morfología ECG		
FC basal reposo	56-101 lpm	500-724 lpm
Intervalo PR	120-200 mseg	0-56 mseg
Segmento QRS	84-110 mseg	9-30 mseg
Segmento QT	385 mseg	29-109 mseg
Qt corregido	398-430 mseg	30-124 mseg

**Tabla 1:** Características ECG (Morfología ECG, FC basal, duración de segmentos del ECG) en reposo, en humano y ratón.

Todos los manejos animales y experimentos propuestos en este estudio fueron aprobados por el Comité de Bioética sobre Investigación en Animales, CBA#0398 FMUCH, de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile y por el Comité asesor de Bioética de FONDECYT N°018/FONDECYT/Medicina/0097.

Los experimentos recibiendo financiamiento de Proyecto Fondecyt N° 1160704.

### **Cálculo de Tamaño Muestral**

La literatura describe una amplia variedad de modelos similares, dado por grupos experimentales con ratones mutantes, con alta prevalencia de arritmias. También amplia variabilidad de tamaños muestrales (Entre 5 y 20 por grupo, según el caso).

Finalmente, se consideró como referencia un artículo con un modelo similar (intervención dietaria, test de stress, intervención farmacológica protectora) (60), por lo que consideramos 6 animales por grupo, para un estudio inicial (Con un poder de 90% y un  $\alpha$  de 0.05). A medida que progresamos con los registros, observamos diferencias entre grupos en el periodo en reposo, pero no significativas, por lo que decidimos aumentar el tamaño muestral inicial, incluyendo finalmente 10 ratones controles, 13 ratones HFD, 7 ratones Control + Apocinina, 9 ratones HFD + Apocinina.

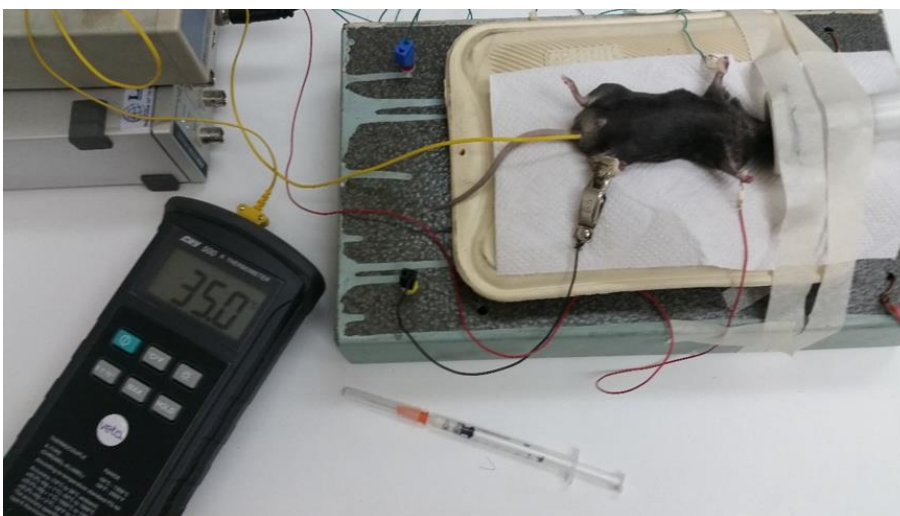
### **Sedación y Registro de Electrocardiograma en Reposo**

Se realizó sedación con Isoflurano (Inducción con Isoflurano 4% en Caja de inducción, 1-1.5% Mantención) (Figura 9) (61-63), manteniendo ventilación espontánea del animal (Hocico descubierto, conexión de gases a narina a través de mascarilla y sistema de no recirculación). Flujo de gases frescos desde concentrador de oxígeno, a 0.5-1 lt/min.



**Figura 9.** Montaje de equipo de Anestesia. Vaporizador de Sevoflurano, caja de inducción y circuito para mantención de sedación.

Tras obtener sedoanalgesia completa (Verificación vía estímulo táctil y punzante en cola), se instalaron electrodos de registro electrocardiográfico en extremidad anterior derecha (Polo negativo) y extremidad anterior izquierda (Polo positivo), de manera de obtener una derivación de ECG DI, según lo descrito en trabajos similares (64). Se realizó monitorización continua de temperatura vía rectal (Figura 10). La profundidad de la sedación fue evaluada por parámetros clínicos subjetivos (Movimiento espontaneo, patrón respiratorio). Se mantuvo temperatura constante ( $35\text{-}37^{\circ}\text{C}$ ), a través del uso de calefactores.



**Figura 10.** Animal en placa de registro, con mascarilla de circuito de anestesia, electrodos en extremidad cefálica derecha e izquierda (tierra en extremidad caudal izquierda). Termómetro rectal con medición digital continua de temperatura.

### **Registro ECG basal y Stress farmacológico inducido**

Se realizó registro basal por 5 minutos tras obtener sedación completa y mantención de parámetros fisiológicos. Tras completar el periodo de registro basal, se administró vía I.P. Epinefrina (1.6 Mg/kg) y Cafeína (120 mg/kg) según descritos (64), en un volumen de dilución máximo de 0.2 ml., y se realizó registro ECG por 15 minutos.

### **Registro de Variables Electrocardiográficas y Análisis**

Se realizó registro de ondas ECG con LabChart 7.0, con una frecuencia de muestreo de 10 kHz, utilizando filtro Notch con frecuencia central 50 Hz (Filtro Bajo a 40 Hz y Filtro Alto a 60 Hz).

Se realizó análisis estadísticos de las ondas de ECG y segmentos significativos (Segmento QRS, Segmento Qt). Dado dificultades de observar onda T en ratones, se determinó segmento Qt desde la primera inflexión negativa que precede al QRS hasta el regreso a la línea isoeleétrica de base, según lo descrito en modelos experimentales similares (61).

Se registró presencia y frecuencia de eventos arritmogénicos en periodo de reposo basal de 5 minutos, y en stress farmacológico. Los eventos registrados fueron: Extrasístole Ventricular (ESV), Taquicardia Ventricular (TV), Fibrilación Ventricular (FV).

## RESULTADOS

### *Efecto arritmogénico de dieta rica en grasas saturadas en condición de reposo*

En la tabla 2, se presenta el peso y las características electrocardiográficas de los 4 grupos en estudio. Los animales alimentados con dieta rica en grasas saturadas aumentaron significativamente de peso comparado con los controles. La administración de apocinina no afectó el peso de los ratones. En las variables electrocardiográficas, se encontró acortamiento del QRS y una menor frecuencia cardiaca basal en animales alimentados con dieta rica en grasas saturadas respecto al resto de los grupos.

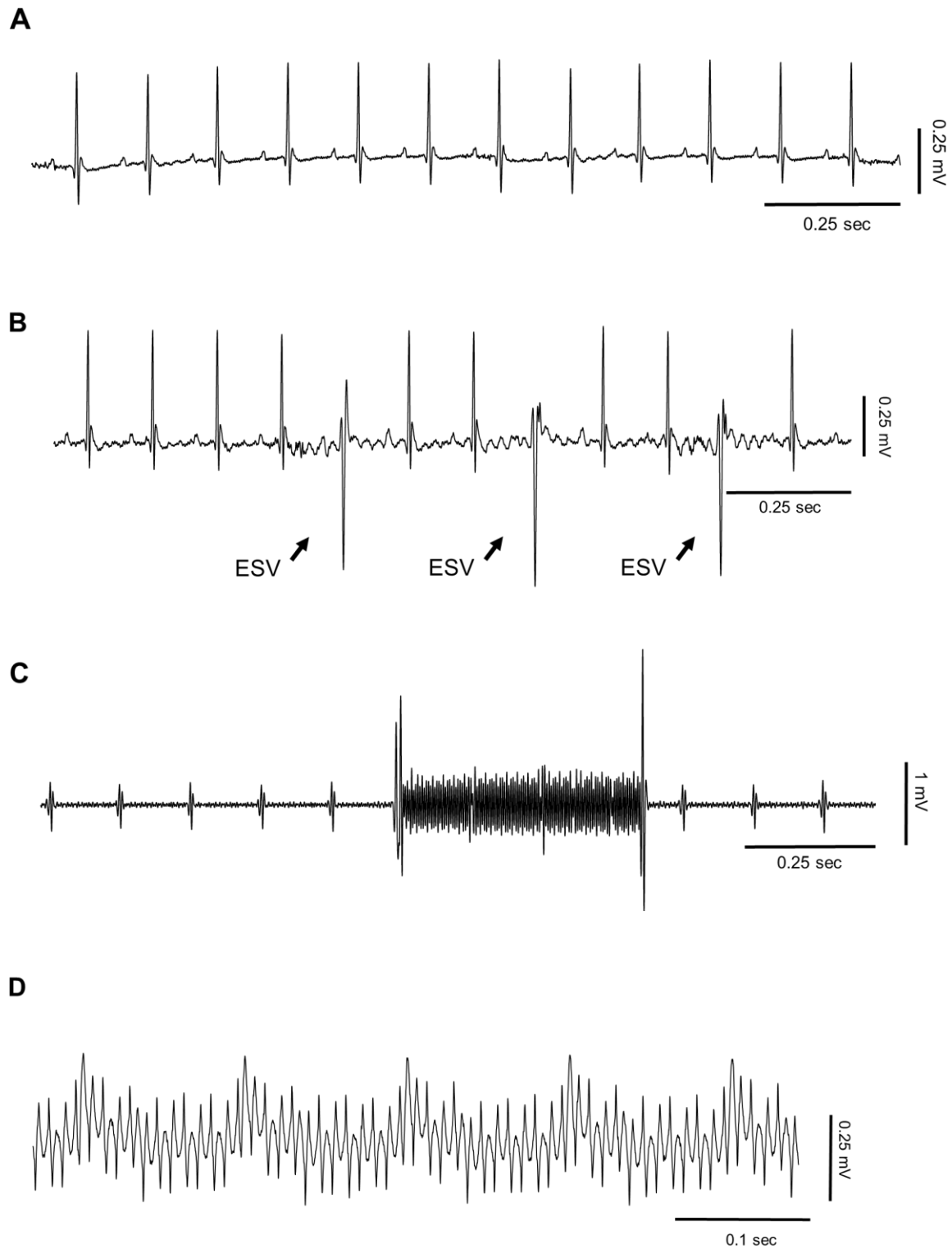
**Tabla 2. Efecto de la dieta sobre el peso y variables electrocardiográficas en reposo**

	Control (n=10)	HFD (n=13)	Control+APO (n=7)	HFD+APO (n=9)
<b>Peso (gr)</b>	27,8±0,48	37,41±1,3*	28,27±0,6	40,26±1,91*
<b>Onda p (ms)</b>	10.89±0.78	10.92±0.57	10.29±0.80	11.44±0.70
<b>Segmento PQ (ms)</b>	40.56±1.64	42.58±0.95	41.43±1.06	40.67±1.55
<b>Intervalo QRS (ms)</b>	17.1±0.82	13±0.53*	14.57±1.13	13.22±0.46*
<b>Intervalo QT (ms)</b>	54.67±3.25	52.83±1.68	46.86±3.75	46.67±3.28
<b>FC (lpm)</b>	455±9.52	412.6±13.3*	452.9±20.06	437.8±12

Valores expresados como promedios, con desviación media standard (DMS). FC: frecuencia cardiaca, lpm: latidos por minuto. \*p < 0.01 versus control.

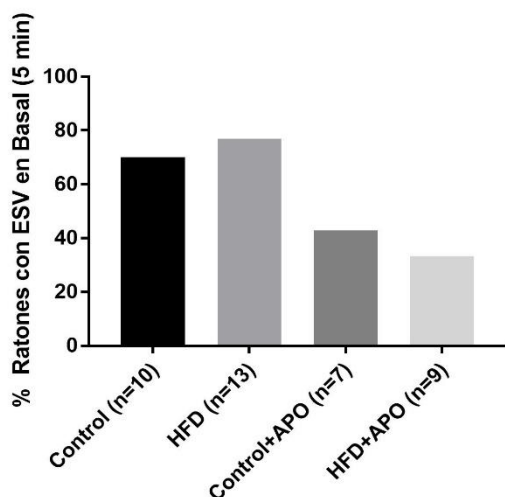
En condiciones basales, los ratones controles presentaron mayoritariamente ritmo sinusal, con algunas extrasístoles ventriculares. Los ratones alimentados con dieta alta en grasa saturada presentaron arritmias tales como Extrasístoles Ventriculares, Taquicardia Ventricular. Registros representativos se muestran en la Figura 11.



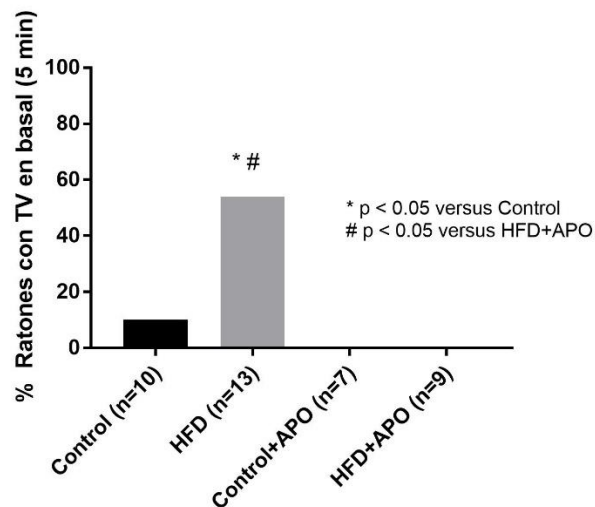


**Figura 11: Registros ECG basales:** **(A)** Ritmo sinusal en ratón control; **(B)** Extrasístoles Ventriculares (ESV), que determinan ritmo de trigeminismo ventricular, en ratón HFD **(C)** Taquicardia Ventricular (TV) No sostenida, en ratón HFD. **(D)** Taquicardia Ventricular Bidireccional en ratón HFD.

La administración de Apocinina en el agua bebida de los animales HFD no disminuyó el porcentaje de ratones con extrasístoles ventriculares (Figura 12). En tanto, previno la aparición de taquicardia ventricular, tanto en ratones HFD como en controles (Figura 13).

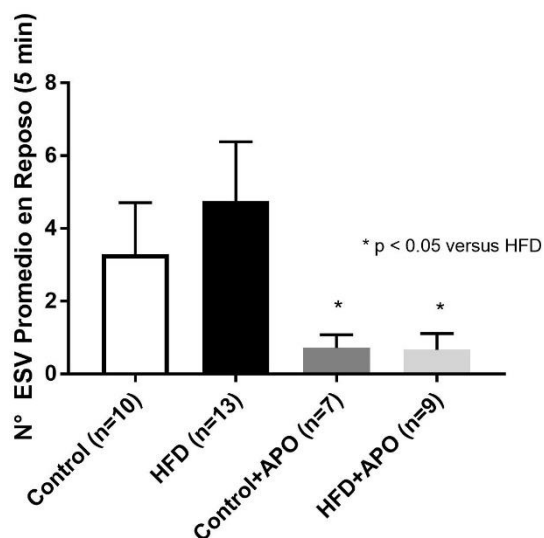


**Figura 12:** Porcentaje de ratones que presentaron al menos una ESV durante reposo. Sin diferencias

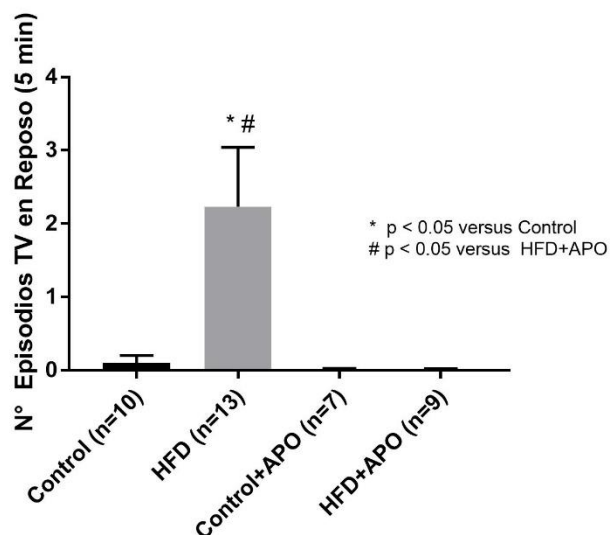


**Figura 13:** Porcentaje de ratones que presentaron al menos una TV durante reposo. 46% de ratones HFD presentaron al menos un episodio de TV en reposo, en comparación a 10% de ratones control. Grupo HFD+APO sin eventos de TV.

Además de disminuir el porcentaje de animales que presentaron eventos arrítmicos, la apocinina también disminuyó el número de eventos de extrasístoles ventriculares (Figura 14) y Taquicardia ventricular (Figura 15) en comparación a los que no la recibieron.



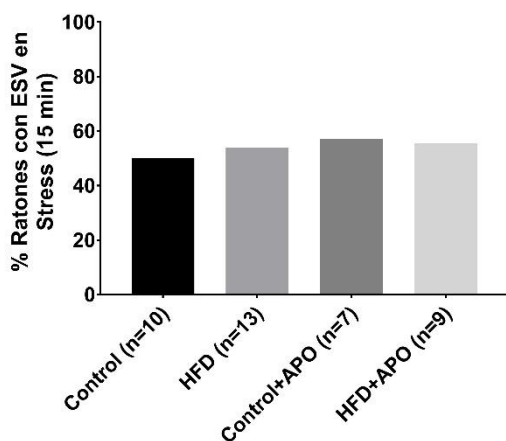
**Figura 14:** Número de ESV promedio por grupo. Sin diferencias



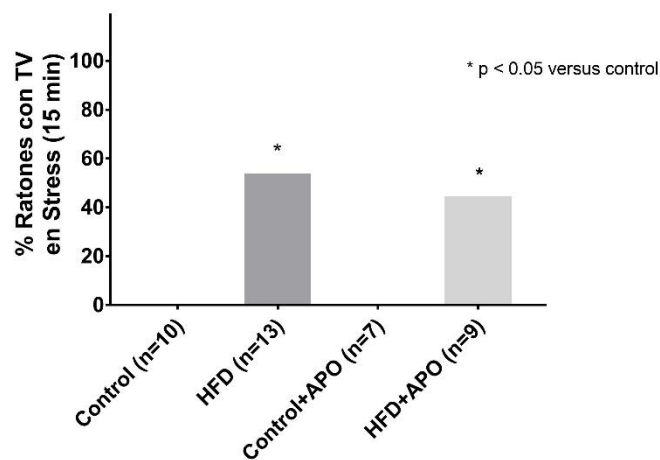
**Figura 15:** Número de episodios de TV promedio por grupo. Grupo HFD presentó un número significativamente mayor de TV en comparación a los otros grupos.

### *Efecto arritmogénico de dieta rica en grasas saturadas en condición de stress Farmacológico*

Durante una prueba de stress inducido farmacológicamente con cafeína más epinefrina, el porcentaje de ratones que presentó extrasístoles ventriculares es similar en los cuatro grupos estudiados (Figura 16). En tanto, los animales alimentados con dieta alta en grasas saturadas presentaron taquicardia ventricular, que no fue prevenida por el tratamiento con apocinina. Ninguno de los animales alimentados con dieta control presentó eventos de taquicardia ventricular. (Figura 17).



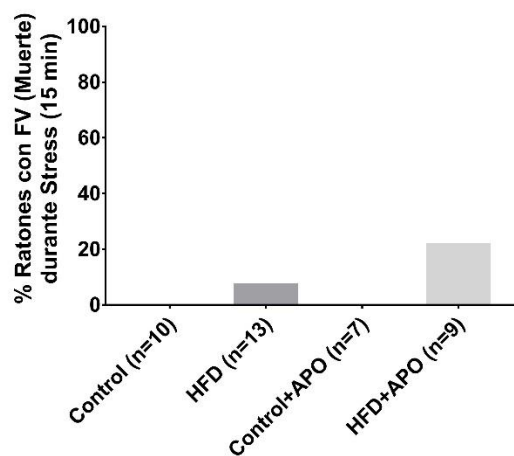
**Figura 16:** Porcentaje de ratones que presentaron ESV durante stress farmacológico. Sin diferencias.



**Figura 17:** Porcentaje de ratones que presentaron TV durante stress farmacológico. Diferencias significativas de animales HFD y HFD+APO versus controles. \* p < 0.05 versus control

Los animales alimentados con dieta alta en grasas, con y sin apocinina, también presentaron eventos de fibrilación ventricular, la cual no ocurrió en animales con dieta control. Los eventos de fibrilación ventricular (Muerte) no alcanzaron a ser estadísticamente significativos, probablemente debido al bajo número de animales (1 en dieta HFD, 2 en dieta HFD+APO) (figura 18).

**Figura 18:** Porcentaje de ratones que presentaron FV y muerte durante stress farmacológico. Sin diferencias significativas.



## DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la incidencia de eventos arritmogénicos en ratones alimentados con una dieta rica en grasas saturadas y evaluar el rol de Apocinina, un inhibidor del NOX2 que además tiene propiedades antioxidantes y anti inflamatorias, en la generación de estos eventos.

Numerosos trabajos en la literatura demuestran que la desregulación del proceso de apertura y cierre de los RyR2 juega un rol central en la iniciación y/o mantenimiento de arritmias ventriculares en humanos y animales (31, 64-67). La desregulación de la apertura y cierre de RyR2 predispone a una liberación espontánea, no sincronizada, de  $Ca^{2+}$  desde el SR que activa al intercambiador sodio-calcio, generando una corriente de entrada al alcanzar el umbral, y gatilla un potencial de acción llamado despolarización tardía (delayed after depolarization - DAD) (68).

La posibilidad de generar DAD se incrementa por aumentos de la fosforilación de RyR2 dependiente de la CAMKII (34, 60,69). También se ha descrito que la oxidación de RyR2 dependiente de NOX2 aumenta su actividad (55), por lo que la activación de esta enzima también podría contribuir a la generación de arritmias.

Los RyR2 aislados de corazones de ratones alimentados con dieta alta en grasas saturadas, presentan una mayor activación por calcio cuando se estudia su actividad in vitro. La actividad se normaliza cuando los ratones reciben apocinina en el agua de bebida, lo que sugiere que el aumento de actividad se debe a una modificación oxidativa de los RyR2. La normalización de las arritmias en estos mismos animales, en la presente tesis, es altamente sugerente que el mismo mecanismo, es decir, una mayor actividad de RyR2 producida por una modificación oxidativa, es responsable de las arritmias.

La apocinina es un compuesto que se ha usado ampliamente en la literatura para inhibir NOX2 porque impide el reclutamiento de sus subunidades regulatorias a la membrana. Sin embargo, más recientemente se ha demostrado que Apocinina también es un *scavenger* de radicales libres, por lo tanto, el efecto inhibitorio observado no necesariamente se debe a su efecto sobre NOX2, sino que puede existir otra fuente de radicales libres de oxígeno que

modifique al RyR2. En un modelo de isquemia-reperusión (con la consiguiente generación de radicales libres), se ha demostrado el efecto beneficioso de apocinina (70).

La respuesta a un estímulo proarritmogénico consistente en un bolo de cafeína y epinefrina fue mayor en los animales alimentados con la dieta alta en grasas. Apocinina no logró disminuir las arritmias generadas durante stress farmacológico, al carecer de influencia sobre la activación adrenérgica en el miocardiocito. La estimulación beta adrenérgica por epinefrina activa a la fosfoquinasa A (PKA), que fosforila a una serie de proteínas tales como RyR2; en tanto, cafeína aumenta la probabilidad de apertura de RyR2. Al sumarse ambos mecanismos, se genera una sobreestimulación de RyR2, el cual ya se encontraría en un grado de actividad por oxidación.

En el caso de los ratones HFD, encontramos una disminución de la frecuencia cardiaca promedio, en comparación al resto de los grupos. Se ha descrito en la literatura el rol de RyR2 dentro de la regulación del ritmo cardiaco, dado por liberación y secuestro de calcio regulado por tiempo, en un fenómeno llamado “reloj de calcio” (71). Es así como se plantea que RyR2 también tendría un rol en el desarrollo de arritmias supraventriculares como la fibrilación auricular (72,73).

También encontramos en los ratones HFD un acortamiento del QRS, que fue significativo respecto de los demás grupos estudiados. El segmento QRS del electrocardiograma corresponde a la despolarización secuencial y organizada del sincicio contráctil ventricular. En este caso, un aumento de la corriente depolarizante de Na<sup>+</sup> (aumento de afinidad de canal, aumento de número de canales), o una mayor velocidad de propagación de la corriente depolarizante a través del sincicio (mayor cantidad de *gap junction*) podría explicar este fenómeno. Es poco probable que la dieta alta en grasas saturadas afecte en forma aislada a RyR2; el stress oxidativo podría afectar a otras proteínas dentro de la célula cardiaca, tales como otros canales y receptores involucrados en la despolarización.

**BIBLIOGRAFIA**

- 1) Katriotis D, Gersh B, Camm A (2016). **A Clinical Perspective on Sudden Cardiac Death.** *Arrhythm Electrophysiol Rev*, 5(3):177-182.
- 2) Messerli F, Nunez B, Ventura H, Snyder D (1987). **Overweight and Sudden Death Increased Ventricular Ectopy in Cardiopathy of Obesity.** *Arch Intern Med*, 147(10):1725–1728.
- 3) Adabag S, Huxley R, Lopez FL, Chen L, Sotoodehnia N, Siscovick D, Deo R, Konety S, Alonso A, Folsom A (2015). **Obesity related risk of sudden cardiac death in the atherosclerosis risk in communities study.** *Heart*, 101(3):215-221.
- 4) Narayanan K, Zhang L, Kim C, Uy-Evanado A, Teodorescu C, Reinier K, Zheng Z, Gunson K, Jui J, Chugh S (2015) **QRS Fragmentation and Sudden Cardiac Death in the Obese and Overweight.** *J Am Heart Assoc*, Mar 11:4(3).
- 5) Wilson P, D'Agostino R, Sullivan L, Parise H, Kannel W (2002). **Overweight and Obesity as Determinants of Cardiovascular Risk. The Framingham Experience.** *Arch Intern Med*, 162(16):1867–1872.
- 6) Gonzalez D, Beigi F, Treuer A, Hare J (2007). **Deficient ryanodine receptor S-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium leak and arrhythmogenesis in cardiomyocytes.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (51):20612-20617.
- 7) Oda T, Yang Y, Uchinoumi H, Uchinoumi H, Chen Izy Y, Kato T, Yamamoto T, Yano M, Cornea RL, Bers DM (2015) **Oxidation of Ryanodine Receptor (RyR) and Calmodulin enhance Ca release and pathologically alter RyR structure and Calmodulin affinity.** *J Mol Cell Cardiol*, 85:240-248.
- 8) Gonzalez DR, Treuer AV, Castellanos J, Dulce RA, Hare JM (2010). **Impaired S-Nitrosylation of the Ryanodine Receptor Caused by Xanthine Oxidase Activity Contributes to Calcium Leak in Heart Failure.** *J Biol Chem*, 285(37):28938-28945.
- 9) Wang Q, Wang W, Wang G, Rodney G, Wehrens XHT (2015). **Crosstalk between RyR2 Oxidation and Phosphorylation Contributes to Cardiac dysfunction in Mice with Duchenne Muscular Dystrophy.** *J Mol Cell Cardiol*, 89(0 0):177-184.
- 10) Keaney J, Larson M, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ (2003). **Obesity and systemic oxidative stress:**

- clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Mar 1;23(3):434-9.
- 11) Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I (2004). **Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome.** *J Clin Invest*, 114(12):1752-1761.
  - 12) Ringer S (1883). **A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart.** *J Physiol*, 4:29-42.
  - 13) Brady AJ (1964). **Excitation and excitation-contraction coupling in cardiac muscle.** *Annu Rev Physiol*, 26:341-56.
  - 14) Fabiato A, Fabiato F (1979). **Calcium and cardiac excitation-contraction coupling.** *Annu Rev Physiol*, 41:473-84.
  - 15) Fabiato A (1983). **Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum.** *Am J Physiol*, 245 (C):1-14.
  - 16) Rueda A, de Alba-Aguayo DR, Valdivia HH (2014). **Ryanodine receptor, calcium leak and arrhythmias.** *Arch Cardiol Mex*, 84(3):191-201.
  - 17) Inui M, Saito A, Fleischer S (1987). **Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures.** *J Biol Chem*, 262:15637-42.
  - 18) Bers D (2002) **Cardiac excitation-contraction coupling.** *Nature*, 415:198-205.
  - 19) Rudy Y (2008). **Molecular basis of cardiac action potential repolarization.** *Ann N Y Acad Sci*, Mar 1123:113-8.
  - 20) Sobie EA, Guatimosim S, Gomez-Viquez L, Song LS, Hartmann H, Saleet Jafri M, Lederer WJ (2006). **The Ca<sup>2+</sup> leak paradox and ryanodine receptors: SR Ca<sup>2+</sup> efflux theory and practice.** *Prog Biophys Mol Biol*, 90:172-85.
  - 21) Belevych AE, Radwanski PB, Carnes CA, Györke S (2013). **'Ryanopathy': Causes and manifestations of RyR2 dysfunction in heart failure.** *Cardiovasc Res*, 98:240-7.
  - 22) Matteo E, Nargeot J (2008). **Genesis and regulation of the heart automaticity.** *Physiol Rev*, 88:919–82.
  - 23) Issa ZF, Miller JM, Zipes DP (2009). **Electrophysiological mechanisms of cardiac arrhythmias: clinical arrhythmology and electrophysiology, a companion to Braunwald's heart disease.** *Filadelfia: Saunders*. Pp 1–26.

- 24) Jalife J, Delmar M, Davidenko, Anumonwo J, Berenfeld O, Anumonwo KJ. (2009) **Basic cardiac electrophysiology for the clinician. 2<sup>a</sup> Ed New Jersey, Wiley-Blackwell,** p. 152–96.
- 25) Kunitomo Y, Terentyev D (2011). **How to stop the fire? Control of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in cardiac muscle.** *J Physiol.* 589:5899-900.
- 26) Bovo E, Mazurek SR, Blatter LA, Zima AV (2011). **Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2<sup>+</sup>) leak by cytosolic Ca(2<sup>+</sup>) in rabbit ventricular myocytes.** *J Physiol.* 589:6039-50.
- 27) Jiang D, Wang R, Xiao B, Kong H, Hunt DJ, Choi P (2005). **Enhanced store overload-induced Ca<sup>2+</sup> release and channel sensitivity to luminal Ca<sup>2+</sup> activation are common defects of RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death.** *Circ Res.* 97:1173-81.
- 28) Eisner DA, Kashimura T, Venetucci LA, Trafford AW (2009). **From the ryanodine receptor to cardiac arrhythmias.** *Circ J,* 73:1561-7.
- 29) Leenhardt A, Lucet V, Denjoy I, Grau F, Ngoc DD, Coumel P (1995). **Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children. A 7-year follow-up of 21 patients.** *Circulation,* 91:1512–1519.
- 30) Cerrone M, Napolitano C, Priori SG (2009). **Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: a paradigm to understand mechanisms of arrhythmias associated to impaired Ca<sup>2+</sup> regulation.** *Heart Rhythm,* 6:1652–1659.
- 31) Zhao YT1, Valdivia CR, Gurrola GB, Hernández JJ, Valdivia HH (2015). **Arrhythmogenic mechanisms in ryanodine receptor channelopathies.** *Sci China Life Sci,* 58(1):54-8.
- 32) Marx SO, Marks AR (2013). **Dysfunctional ryanodine receptors in the heart: new insights into complex cardiovascular diseases.** *J Mol Cell Cardiol,* 58:225-31.
- 33) Grimm M, Ling H, Willeford A, Pereira L, Gray CB, Erickson JR (2015). **CaMKII $\delta$  mediates beta-adrenergic effects on RyR2 phosphorylation and SR Ca(2<sup>+</sup>) leak and the pathophysiological response to chronic beta-adrenergic stimulation.** *J Mol Cell Cardiol,* 85:282-91.



- 34) Mattiazzi A, Bassani RA, Escobar AL, Palomeque J, Valverde CA, Vila Petroff M, Bers DM (2015). **Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 308 (H):1177-91.
- 35) Donoso P, Sanchez G, Bull R, Hidalgo C (2011). **Modulation of cardiac ryanodine receptor activity by ROS and RNS.** *Front Biosci*, 16:553-67.
- 36) Terentyev D, Gyorke I, Belevych AE, Terentyeva R, Sridhar A, Nishijima Y, de Blanco EC, Khanna S, Sen CK, Cardounel AJ, Carnes CA, Györke S (2008). **Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in chronic heart failure.** *Circ Res*, 103:1466-72.
- 37) Belevych AE, Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Terentyeva R, Sridhar A, Nishijima Y (2009). **Redox modification of ryanodine receptors underlies calcium alternans in a canine model of sudden cardiac death.** *Cardiovasc Res*, 84:387-95.
- 38) Gonzalez DR, Treuer AV, Castellanos J, Dulce RA, Hare JM (2010). **Impaired S-nitrosylation of the ryanodine receptor caused by xanthine oxidase activity contributes to calcium leak in heart failure.** *J Biol Chem*, 285:28938-45.
- 39) Belevych AE, Radwanski PB, Carnes CA, Gyorke S (2013). **'Ryanopathy': causes and manifestations of RyR2 dysfunction in heart failure.** *Cardiovasc Res*, 98:240-7.
- 40) Bers DM (2008). **Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes.** *Annu Rev Physiol*, 70:23-49.
- 41) Berridge MJ (2006). **Remodelling Ca<sup>2+</sup> signalling systems and cardiac hypertrophy.** *Biochem Soc Trans*, 34:228-31.
- 42) Molkenin JD (2004). **Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs.** *Cardiovasc Res*, 63:467-75.
- 43) Ling H, Zhang T, Pereira L, Means CK, Cheng H, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Chen J, Bers D, Brown JH (2009). **Requirement for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II in the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure in mice.** *J Clin Invest*, 119:1230-40.
- 44) Mazzocchi, G., Sommesse, L., Palomeque, J., Felice, J. I., Di Carlo, M. N., Fainstein, D., Mattiazzi, A (2016). **Phospholamban ablation rescues the enhanced propensity to**

- arrhythmias of mice with CaMKII-constitutive phosphorylation of RyR2 at site S2814.** *J Physiol*, 594(11):3005–3030.
- 45) Kreusser MM, Backs J (2014). **Integrated mechanisms of CaMKII-dependent ventricular remodeling.** *Front Pharmacol*, 12(5):36.
- 46) Palomeque J, Rueda OV, Sapia L, Valverde CA, Salas M, Petroff MV, Mattiazzi A (2009). **Angiotensin II-induced oxidative stress resets the Ca<sup>2+</sup> dependence of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin protein kinase II and promotes a death pathway conserved across different species.** *Circ Res*, 105:1204-12.
- 47) Palomer X, Salvado L, Barroso E, Vazquez-Carrera M. (2013). **An overview of the crosstalk between inflammatory processes and metabolic dysregulation during diabetic cardiomyopathy.** *Int J Cardiol*, 168:3160-72.
- 48) Rindler PM, Plafker SM, Szveda LI, Kinter M (2013). **High dietary fat selectively increases catalase expression within cardiac mitochondria.** *J Biol Chem*, 288(3):1979-90.
- 49) Boudina S, Sena S, O'Neill BT, Tathireddy P, Young ME, Abel ED (2005). **Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity.** *Circulation*, 112 (17):2686-95.
- 50) Ilkun O, Wilde N, Tuinei J, Pires KM, Zhu Y, Bugger H, Soto J, Wayment B, Olsen C, Litwin SE, Abel ED (2015). **Antioxidant treatment normalizes mitochondrial energetics and myocardial insulin sensitivity independently of changes in systemic metabolic homeostasis in a mouse model of the metabolic syndrome.** *J Mol Cell Cardiol*, 85:104-16.
- 51) Jiang F, Lim HK, Morris MJ, Prior L, Velkoska E, Wu X, Dusting GJ (2011). **Systemic upregulation of NADPH oxidase in diet-induced obesity in rats.** *Redox Rep*, 16(6):223-9.
- 52) Du J, Fan LM, Mai A, Li JM. (2013). **Crucial roles of Nox2-derived oxidative stress in deteriorating the function of insulin receptors and endothelium in dietary obesity of middle-aged mice.** *Br J Pharmacol*, 170 (5):1064-77.
- 53) Espinosa A, Campos C, Diaz-Vegas A, Galgani JE, Juretic N, Osorio-Fuentealba C, Bucarey JL, Tapia G, Valenzuela R, Contreras-Ferrat A, Llanos P, Jaimovich E (2013).

- Insulin-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production is higher in muscle fibers of mice fed with a high-fat diet.** *Int J Mol Sci*, 14(8):15740-54.
- 54) Joseph LC, Barca E, Subramanyam P, Komrowski M, Pajvani U, Colecraft HM, Hirano M, Morrow JP (2016). **Inhibition of NADPH oxidase 2 (NOX2) prevents oxidative stress and mitochondrial abnormalities caused by saturated fat in cardiomyocytes.** *PLOS ONE*, 11(1): e0145750.
- 55) Donoso P, Finkelstein JP, Montecinos L, Said M, Sanchez G, Vittone L, Bull R (2014). **Stimulation of NOX2 in isolated hearts reversibly sensitizes RyR2 channels to activation by cytoplasmic calcium.** *J Mol Cell Cardiol*, 68:38-46.
- 56) Domenech RJ, Sanchez G, Donoso P, Parra V, Macho P (2003). **Effect of tachycardia on myocardial sarcoplasmic reticulum and Ca<sup>2+</sup> dynamics: a mechanism for preconditioning?** *J Mol Cell Cardiol*, 35:1429-37.
- 57) Sanchez G, Escobar M, Pedrozo Z, Macho P, Domenech R, Hartel S, Hidalgo C, Donoso P (2008). **Exercise and tachycardia increase NADPH oxidase and ryanodine receptor-2 activity: possible role in cardioprotection.** *Cardiovasc Res*, 77:380-6.
- 58) Sun QA, Hess DT, Nogueira L, Yong S, Bowles DE, Eu J, Laurita KR, Meissner G, Stamler JS (2011). **Oxygen-coupled redox regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor-Ca<sup>2+</sup> release channel by NADPH oxidase 4.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(38):16098-103.
- 59) Kaese S, Verheule S (2012). **Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size.** *Front Physiol*. 3:345.
- 60) L Sommese, CA Valverde, P Blanco, MC Castro, O Velez Rueda, M Kaetzel, J Dedman, ME Anderson, A Mattiazzi, J Palomeque (2016). **Ryanodine receptor phosphorylation by CaMKII promotes spontaneous Ca<sup>2+</sup> release events in a rodent model of early stage diabetes: The arrhythmogenic substrate.** *Int J Cardiol*, 202:394-406.
- 61) Appleton GO, Li Y, Taffet GE, Hartley CJ, Michael LH, Entman ML, Roberts R, Khoury DS (2004). **Determinants of cardiac electrophysiological properties in mice.** *J Interv Card Electrophysiol*, 11(1):5-14.
- 62) Chaves AA, Dech SJ, Nakayama T, Hamlin RL, Bauer JA, Carnes CA (2003). **Age and anesthetic effects on murine electrocardiography.** *Life Sci.*, 72(21):2401-12.

- 63) Shintaku et al (2015). **Effects of Isoflurane Inhalation anesthesia on mouse ECG.** *Hirosaki Med J*, 66:1-7.
- 64) Liu Y, Wang R, Sun B, Mi T, Zhang J, Mu Y, Chen J, Bround MJ, Johnson JD, Gillis AM, Chen SR (2014). **Generation and Characterization of a Mouse Model Harboring the Exon-3 Deletion in the Cardiac Ryanodine Receptor.** *PLoS One*, 9(4), e95615.
- 65) M Said, R Becerra, CA Valverde, MA Kaetzel, JR Dedman, C Mundina-Weilenmann, XH Wehrens, L Vittoni, A Mattiazzi (2011). **Calcium–calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII): a main signal responsible for early reperfusion arrhythmias.** *J Mol Cell Cardiol*, 51:936–944.
- 66) Galati F, Galati A, Massari S (2016). **RyR2 QQ2958 Genotype and Risk of Malignant Ventricular Arrhythmias.** *Cardiol Res Pract*, 2868604.
- 67) Cerrone M, Colombi B, Santoro M, di Barletta MR, Scelsi M, Villani L, Napolitano C, Priori SG (2005). **Bidirectional ventricular tachycardia and fibrillation elicited in a knock-in mouse model carrier of a mutation in the cardiac ryanodine receptor.** *Circ Res*, 96:e77–e82.
- 68) Yano M, Yamamoto T, Kobayashi S, Matsuzaki M (2009). **Role of ryanodine receptor as a Ca<sup>2+</sup> regulatory center in normal and failing hearts.** *J Cardiol*, 53 (1):1 – 7.
- 69) PT Foteinou, JL Greenstein, RL Winslow (2015). **Mechanistic Investigation of the Arrhythmogenic Roles of Oxidized CAMKII in the Heart.** *Bioph J*. 109:838-849.
- 70) Becerra R, Román B, Di Carlo M, Mariangelo JI, Salas M, Sanchez G, Donoso P, Schinella GR (2016). **Reversible redox modifications of ryanodine receptor ameliorate ventricular arrhythmias in the ischemic-reperfused heart.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 311:713–724.
- 71) Maltsev VA, Lakatta EG (2007). **Normal heart rhythm is initiated and regulated by an intracellular Calcium clock within pacemaker cells.** *Heart Lung Circ*, 16(5):335–348.
- 72) MG Chelu, Sarma S, Sood S, Wang S, Van Oort JR, Skapura DG, Li N, Santonastasi M, Muller FU, Schmitz W, Schotten U, Anderson ME (2009). **Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak promotes atrial fibrillation in mice.** *J Clin Invest*, 119:1940–1951.

- 73) Vest JA, Wehrens XH, Reiken SR, Lehnart SE, Dobrev D, Chandra P, Danilo P, Ravens U, Rosen MR, Marks AR (2005). **Defective cardiac ryanodine during atrial fibrillation**, *Circulation*, *111*:2025–2032.