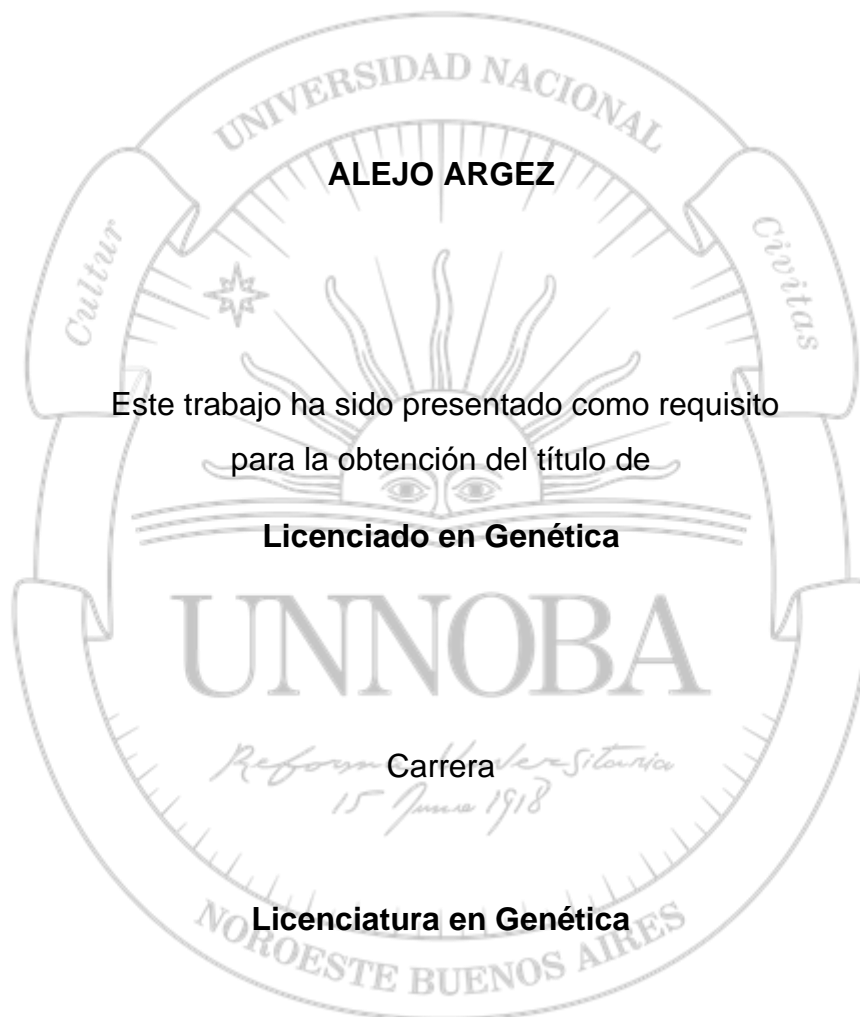


**EXPRESIÓN DEL SENSOR DE CALCIO INTRASARCOPLASMÁTICO (R-
CEPIA-ER) EN MIOCITOS CARDÍACOS**

Trabajo Final de Grado

del alumno



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 16 de noviembre de 2023

**EXPRESIÓN DEL SENSOR DE CALCIO INTRASARCOPLASMÁTICO (R-
CEPIA-ER) EN MIOCITOS CARDÍACOS**

Trabajo Final de Grado

del alumno

ALEJO ARGEZ

Aprobada por el Tribunal Evaluador

| | | |
|---------------------|---------------------|---------------------|
| (Nombre y Apellido) | (Nombre y Apellido) | (Nombre y Apellido) |
| Evaluador | Evaluador | Evaluador |

(Luis Alberto Gonano) (Alejandro Orlowski)

Co-Director

Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 16 de noviembre de 2023

Agradecimientos

Junto con la realización de esta tesis concluye una etapa de muchos años de aprendizajes, tanto académicos como personales, que abren lugar a una carrera profesional que recién comienza, la cual solo hubiera sido posible con la gran ayuda y apoyo de varias personas que recorrieron junto a mi este camino. Es por eso que debo agradecerles y reconocerlos por esto:

A mi director, Alejandro, por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme realizar la tesis junto a él, que con su paciencia y dedicación logro transmitirme todos sus conocimientos. A Luis, mi codirector, por su apoyo y colaboración durante todo el proceso y también a todos mis compañeros del laboratorio por su gran predisposición y compañía.

A la UNNOBA, que como institución abrió sus puertas año tras año y me otorgó la posibilidad de formarme como profesional, junto con sus docentes y una educación de gran calidad.

A mis compañeros de la facultad, que lograron hacer de este camino algo fácil de transitar, de momentos compartidos y experiencias increíbles. Agradezco tenerlos como amigos: Mai, Aldi, Ori, Valen, Mati, Miri, Male y Facu.

A mi familia, por brindarme las herramientas que permitieron mis años de estudios. Gracias por su apoyo incondicional y compañía en todo momento.

Personalmente a mis amigos, Lina, Celi y Alfon, quienes representan un sostén emocional y una parte esencial en mi vida.

Y especialmente a mi compañera y amiga Luli, quien atravesó junto a mi cada momento de esta carrera y motivó, con su ayuda y apoyo, tantos años de estudio.

| | |
|---|-----------|
| 1. Virus adenoasociados (AAV) | 6 |
| 1.1. Organización del genoma de AAV..... | 6 |
| 1.2. Ciclo de infección | 7 |
| 1.2.1 Unión al receptor | 7 |
| 1.2.2 Tráfico endosómico | 8 |
| 1.2.3 Translocación al núcleo y replicación | 9 |
| 1.3. Uso de vectores virales en el contexto de terapias génicas | 9 |
| 2. Dinámica de Ca²⁺ en miocitos cardíacos y acoplamiento-excitación contracción | 11 |
| 2.1. Flujo de Ca ²⁺ durante la contracción sistólica | 12 |
| 2.2. Flujo de Ca ²⁺ durante la relajación diastólica | 13 |
| 2.3. Alteraciones en el manejo del calcio intracelular | 13 |
| 2.4. Disfunción de los receptores de rianodina tipo II (RyR2) | 14 |
| 3. Generación del CEPIA (Calcium-measuring organelle-entrapped protein indicators) | 15 |
| 4. Objetivos | 17 |
| 4.1. Objetivo general | 17 |
| 4.2. Objetivos específicos | 17 |
| 5. Materiales y métodos | 18 |
| 5.1. Obtención de pCMV-rCEPIAer y pDG9 | 18 |
| 5.2. Electroforesis | 19 |
| 5.3. Producción de vectores virales adenoasociados con tropismo cardíaco para inducir la expresión de rCEPIAer | 19 |
| 5.4. Titulación del genoma viral por PCR cuantitativa (qPCR) | 21 |
| 5.5. Titulación del genoma viral por gel de agarosa alcalino | 22 |
| 5.6. Cuantificación y calidad de las partículas virales obtenidas por SDS-PAGE .. | 22 |
| 5.7. Obtención de miocitos aislados | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 5.8. Microscopía confocal | 23 |
| 5.9. Fluorimetría | 23 |
| 6. Resultados | 24 |
| 6.1. Obtención de plásmidos y evaluación de calidad | 24 |
| 6.2. Transfección de células HEK293T con rCEPIAer | 25 |
| 6.3. Registro de dinámica de calcio en células HEK293T con fluorómetro | 26 |
| 6.4. Producción de AAV-CMV-rCEPIAer | 28 |
| 6.5. Análisis del genoma viral con gel de agarosa alcalino | 29 |
| 6.6. Cuantificación y evaluación de calidad de las partículas virales obtenidas por SDS-PAGE | 30 |
| 6.7. PCR cuantitativa (qPCR) | 32 |
| 6.8. Microscopía confocal | 33 |
| 7. Discusión y conclusiones | 36 |
| 8. Referencias | 40 |

Abreviaturas

AAV: virus adenoasociado.

rAAV: virus adenoasociado recombinante.

wtAAV: virus adenoasociado *wild tipe*.

ITR: secuencias de repetición terminal invertida.

VP: proteína viral.

RS: retículo sarcoplasmático.

dsADN: ADN doble cadena.

ssADN: ADN simple cadena.

LCIC: liberación de calcio inducida por calcio.

DHPR: canales de calcio dependientes de voltaje tipo L.

RyR2: receptores de Rianodina tipo II o cardíaco.

NCX: intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

SERCa: ATPasa de calcio del retículo sarcoplasmático.

AEC: acoplamiento excitación-contracción o éxcito-contráctil.

PLB: fosfolamban.

PKA: proteína quinasa A.

GECIs: indicadores codificados genéticamente.

Virus adenoasociado (AAV)

El virus adenoasociado (AAV) se descubrió por primera vez en la década de 1960 como pequeñas partículas que contaminan la preparación de adenovirus de simio tipo 15 (SV15) (Atchison et al., 1965). Se clasifican como dependovirus, género que pertenece a la familia de *Parvoviridae* (Brown, 2010). Como lo indica el nombre del género, la replicación del AAV y la producción de partículas virales infectivas depende de la coinfección con virus auxiliares como el virus del herpes, el adenovirus o el virus del papiloma (Meier et al., 2020). En ausencia de estos virus auxiliares, la infección permanece latente por integración de AAV en el genoma del huésped en el locus AAVS1 en la posición cromosómica 19q13 o persisten de forma episomal como moléculas de genoma bicatenario circular (Kotin et al., 1990; Wang et al., 2019).

Organización del genoma de AAV

El genoma corresponde a una molécula de ADN monocatenario (ssADN) de aproximadamente 4,7 kb. Las hebras positivas y negativas se empaquetan en partículas virales separadas con la misma eficacia (Wagner et al., 2021). El genoma está compuesto por cuatro marcos abiertos de lecturas (ORF) diferentes. El primer ORF codifica cuatro genes necesarios para la replicación viral (*rep*), los cuales reciben el nombre según su peso molecular: Rep 78, Rep68, Rep52 y Rep40. Estas proteínas no estructurales se producen a partir de dos ARNm empalmados alternativamente los cuales se encuentran bajo el control de dos promotores p5 y p19 (los números de los promotores indican la ubicación en el genoma viral en unidades de mapa). El gen *cap*, que está controlado por el promotor p40, pertenece al segundo ORF y codifica las tres subunidades que conforman la cápside a través de corte y empalme alternativo y traducido desde diferentes codones de inicio, estas son VP1 (proteína viral 1; 87kDa), VP2 (72 kDa) y VP3 (62 kDa). Estas proteínas se producen en una proporción de 1:1:10 (VP1:VP2:VP3) y se ensamblan en una cápside icosaédrica conformada por 60 VP (Linden & Berns, 2000). El tercer y cuarto ORF se encuentran dentro de la secuencia de codificación de los genes *Cap* y corresponden a ARN subgenómicos. Uno de ellos codifica a la proteína activadora de ensamblaje (AAP), la cual interviene en el ensamblaje de la cápside en el nucleolo (Sonntag et al., 2010); Y la proteína accesoria asociada a la membrana (MAAP), cuya función no se encuentra definida (Ogden et al., n.d.).

El genoma de AAV está flanqueado por dos secuencias no codificantes, las secuencias de repetición terminal invertida (ITR) (Lusby, 1980). Son secuencias que tienen la capacidad de autoensamblarse en estructuras de doble horquilla en forma de T y proporcionar los elementos necesarios para la replicación viral y la señal de empaquetamiento (Samulski et al., 1983). Los ITR son los únicos elementos que actúan en cis durante el empaquetamiento del genoma y, por esta razón, necesariamente deben incluirse en los vectores de AAV recombinante (rAAV).

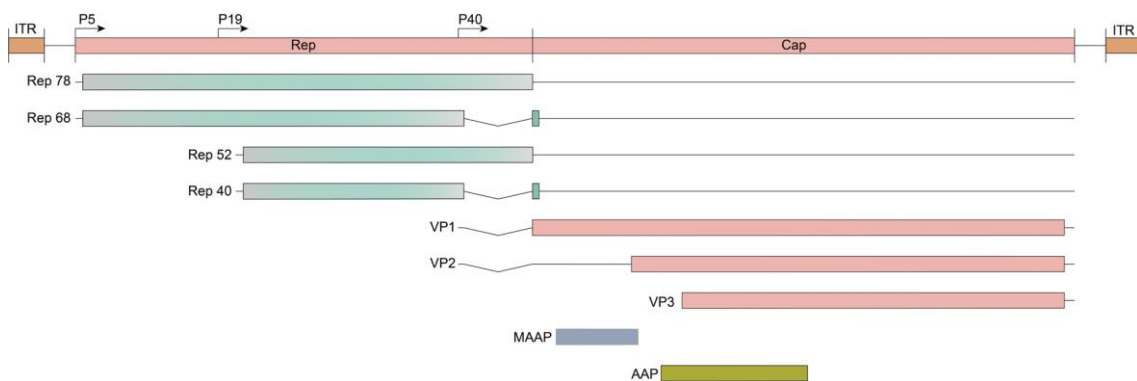


Figura 1 – Estructura del genoma de AAV: Se conoce que el genoma de AAV contiene cuatro marcos abiertos de lectura flanqueados por secuencias de repetición terminal invertida (ITR): Rep, Cap, MAAP y AAP. El ORF Rep codifica cuatro isoformas bajo la regulación del promotor p5 y p19. La transcripción impulsada por el promotor p40 del ORF Cap codifica tres isoformas de proteínas virales (VP). Imagen: (Bulcha et al., 2021).

Se han aislado más de diez serotipos de AAV de tejidos de primates humanos y no humanos. Los diferentes serotipos muestran un amplio tropismo y preferencia por diferentes células y tejidos, esta característica puede aprovecharse para el desarrollo de vectores en terapias génicas (Davidoff et al., 2005).

Ciclo de infección

Unión al receptor

Las diferencias en el tropismo son causadas por variaciones en la superficie de la cápside, esto hace que existan preferencias por distintos receptores celulares. En un principio, AAV se une a receptores primarios, los cuales son glicoproteínas que se expresan en la superficie de varios tipos celulares y receptores secundarios (Mietzsch et al., 2014). AAV2, AAV3 y AAV6 se unen a sulfato de heparán (HSPG), AAV1, AAV3, AAV4 y AAV6 a los ácidos siálicos y AAV9 a la galactosa ligada a N (M Nonnenmacher & T Weber, 2012).

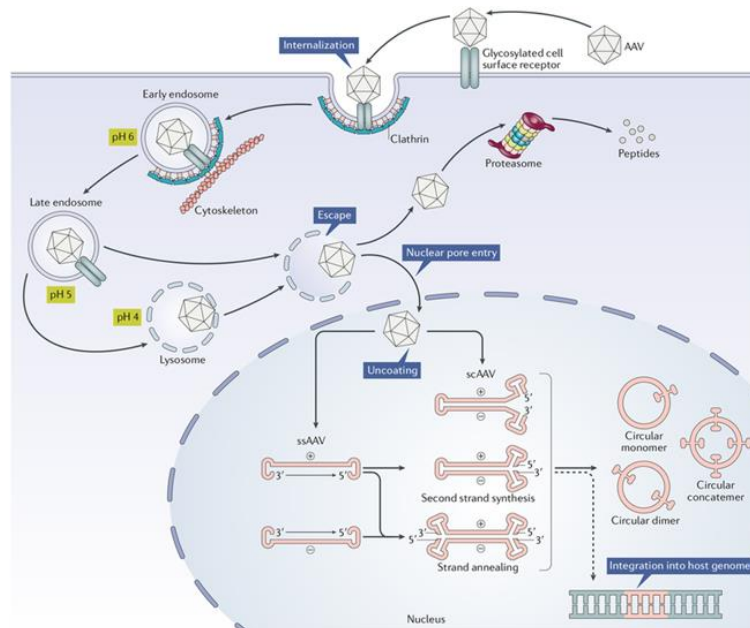


Figura 2 – Vía de transducción de rAAV: Al unirse a receptores celulares, AAV ingresa a la célula mediante endocitosis. El entorno de pH bajo del compartimento endosomal produce cambios conformacionales en la cápside viral, lo que desencadena el escape al citosol. El AAV puede sufrir proteólisis por parte de los proteosomas. El ingreso al núcleo se da a través del complejo de poro nuclear. Una vez allí, el genoma prescinde de la cápside y convierte su genoma en dsADN. Esto se puede lograr mediante la síntesis de la segunda cadena a través de la ADN polimerasa del huésped o mediante hibridación de la cadena sentido y antisentido que coexisten en el núcleo. En ausencia de virus auxiliares, el dsADN puede integrarse en el genoma de la célula huésped, aunque esto sucede en frecuencias muy bajas. Las ITR presentes en el genoma de rAAV pueden formar estructuras episomales circularizando el genoma o formando concatémeros de alto peso molecular mediante la recombinación intramolecular o intermolecular, manteniendo una expresión transgénica a largo plazo. Imagen: (D. Wang et al., 2019).

Tráfico endosómico

Una vez que AAV es reconocido por los receptores celulares se desencadena la internalización del virus a través de la endocitosis mediada por clatrina (Wang et al., 2019). Una vez internalizado, AAV se encuentra dentro de endosomas y es transportado por los microtúbulos a la región perinuclear (Xiao et al., 2016). El pH bajo de los compartimentos endosomales tardíos provoca un cambio conformacional en la cápside de AAV, lo que provoca que quede expuesto el dominio N-terminal de VP1 (VP1u). Esta región contiene un dominio de fosfolipasa A2 (PLA2) y una señal de localización nuclear, lo que permite que el virus escape al citoplasma y se produzca la importación nuclear (Kronenberg et al., 2005; Venkatakrishnan et al., 2013). Además, el entorno de pH bajo en los endosomas está relacionado con la auto escisión de la cápside (Salganik et al., 2012).

Translocación al núcleo y replicación

Luego del transporte retrógrado al aparato de Golgi y del escape al citoplasma, los viriones de AAV ingresan al núcleo a través de los complejos de poro nuclear (CPN), para posteriormente prescindir del revestimiento genómico (Kelich et al., 2016; Nonnenmacher et al., 2015).

En presencia de un virus auxiliar se induce la transcripción y replicación del genoma de AAV dentro de la célula huésped (fase lítica). Como consecuencia, se detiene la fase de síntesis de la célula evitando la entrada en la mitosis, se inhibe la apoptosis y se reduce la expresión génica del huésped (Samulski & Muzyczka, 2014).

Dentro de p5 existe una secuencia conocida como elemento de unión a REP (RBE), la unión de Rep78 y Rep68 a esta región, suprime la transcripción durante la latencia de AAV. Esta misma secuencia RBE está presente en las ITR, lo que hace que se active la transcripción una vez que se unen a ella las proteínas Rep (D J Pereira, 1997). El AAV se replica a través de un mecanismo de desplazamiento de cadena el cual utiliza la ITR como cebador 3' OH libre para iniciar con la síntesis de la segunda hebra y así formar la estructura de dsADN, para esto se hace uso de la polimerasa δ (Wagner et al., 2021). Para los rAAV que son deficientes en la replicación por no contar con REP y CAP en su genoma codificante, su material genético se circulariza y forman concatémeros por recombinación intermolecular (Duan et al., 1999; Yang et al., 1999).

Una vez sintetizado el genoma del AAV se empaqueta en cápsides preensambladas a través de un poro de 8,5 Å de diámetro con la ayuda de proteínas Rep (Rep 40 y Rep 52) que, con su actividad helicasa, cargan el genoma ssADN en la cápside (Bleker et al., 2005).

Uso de vectores virales en el contexto de terapias génicas

Como se mencionó anteriormente, AAV tiene la capacidad de infectar diferentes células y tejidos según el serotipo, característica que se aprovecha al momento de diseñar las terapias génicas hacia un objetivo en particular. Hasta la fecha se han aislado más de 10 serotipos naturales en humanos y en primates no humanos. AAV posee una seroepidemiología muy extendida, encontrándose en el 50-80% de la población humana, dependiendo de la región geográfica (Calcedo et al., 2009; Gao et al., 2004). Existen diferentes estrategias para crear serotipos que contengan modificaciones en secuencias proteicas de la cápside y así lograr un tropismo diferencial. El diseño racional es un medio útil para el desarrollo de nuevas cápsides con propiedades específicas. Este método requiere que se conozca cuáles son las

secuencias de péptidos que interactúan específicamente con residuos del tipo celular objetivo. A su vez, el injerto de un péptido sintético puede afectar el empaquetamiento del virus o el tráfico celular. En cambio, la evolución dirigida, es una estrategia que supera los inconvenientes mencionados anteriormente. Este enfoque busca simular la evolución natural, exponiendo las cápsides de AAV bajo una presión de selección para descubrir variantes de interés, las cuales pueden presentar características deseadas: evasión de la respuesta inmune, especificidad celular, expresión transgénica sostenida y producción de altos títulos virales (Wang et al., 2019).

La cápside de rAAV está compuesta por la misma secuencia y estructura que la del virus de tipo salvaje (wtAAV), la diferencia está en que el genoma encapsulado en rAAV carece de todas las secuencias codificantes del virus wt. En su lugar, se coloca el cassette de expresión que se diseña para un objetivo en particular. Las únicas secuencias de origen viral son las ITR, las cuales se conservan por su papel relevante en la replicación y el empaquetamiento viral. Un método muy utilizado en la producción de rAAV consta de cotransfectar tres plásmidos diferentes en células HEK293, las cuales expresan constitutivamente genes de Adenovirus (E1a y E1b). El plásmido cis lleva la secuencia ITR flanqueando el gen de interés, el plásmido trans que expresa los genes Rep y Cap y el plásmido Helper que contiene los elementos auxiliares como los genes E2A, E4 y VA (Clément & Grieger, 2016).

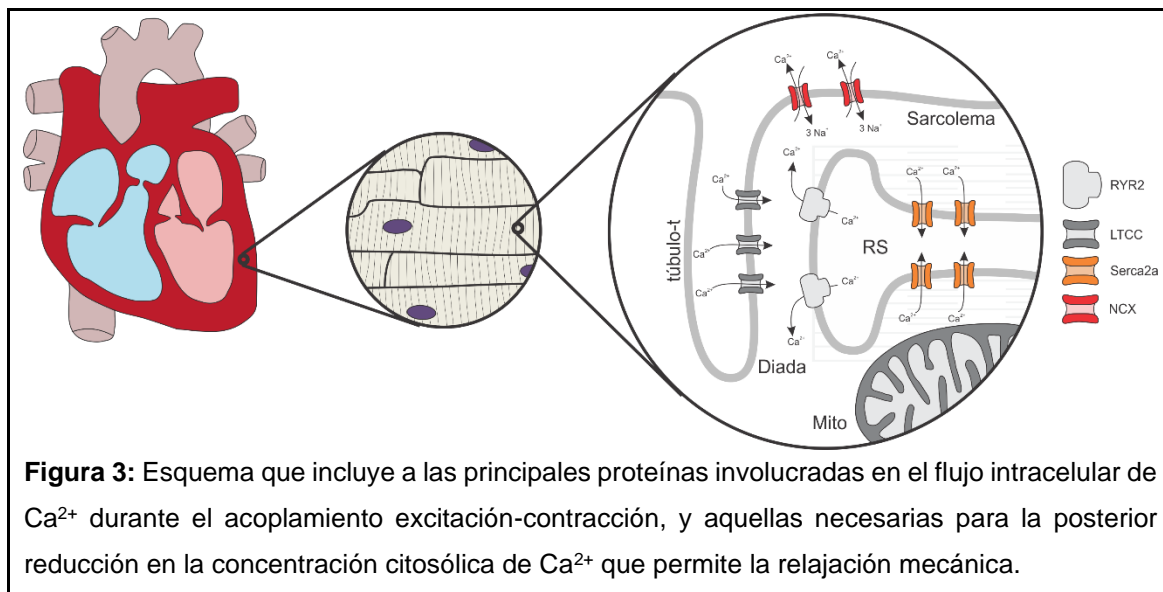
Se han aprobado tres productos para la terapia de enfermedades metabólicas, oftalmológicas y neurológicas las cuales hacen uso de AAV como vector para la entrega de genes terapéuticos. Una de las características más relevantes, que apoyan el uso de este virus en diferentes ensayos clínicos y preclínicos, es que AAV no se considera un virus patógeno, no genera una respuesta inmune exacerbada y, por lo general, presenta una expresión génica duradera (Zhao et al., 2022).

En el 2012, la EMA aprobó la primera terapia génica para tratar una enfermedad monogénica (Glybera). Esta se enfoca en tratar la deficiencia de lipoproteína lipasa (LPL), un trastorno genético metabólico en el que la persona tiene una copia defectuosa del gen de LPL. La terapia utiliza AAV1 como vector génico para la entrega de la copia intacta del gen humano a células musculares mediante inyección intramuscular (Scott, 2015; Ylä-Herttuala, 2012). LUXTURNA es la primera terapia génica aprobada por la FDA de los EE. UU en el año 2017 para tratar enfermedades monogénicas. Se basa en un vector AAV2 y se utiliza para la distrofia retiniana asociada a una mutación bialélica RPE65 (Russell et al., 2017). En el año 2020 también fue aprobada en Canadá y Australia. En el año 2019, la FDA de los EE. UU aprobó la primera terapia génica viral

para trastornos neurológicos (ZOLGENSMA), se aplica a pacientes pediátricos menores de 2 años para el tratamiento de la atrofia muscular espinal con mutaciones bialélicas en el gen humano de supervivencia de la motoneurona. A diferencia de los otros dos productos aprobados, ZOLGENSMA se inyecta por vía intravenosa. Esto se basa principalmente en el tropismo intrínseco del vector AAV9 hacia órganos del sistema nervioso central (SNC) (Hoy, 2019).

Dinámica de Ca^{2+} en miocitos cardíacos y acoplamiento excitación – contracción

Las patologías cardiovasculares son las principales causas de muerte en el mundo (Mensah et al., 2019) y en Argentina (Bardach et al., 2018). Entre estas, tanto la insuficiencia cardíaca como las arritmias pueden encontrar su origen o su progresión en alteraciones en el manejo del calcio (Ca^{2+}) a nivel de los cardiomiocitos (Denniss et al., 2020; Hamilton & Terentyev, 2019; Njegic et al., 2020). En las células cardíacas, la liberación y posterior recaptación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplasmático lleva al ciclado de las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} y es responsable del ciclo de acortamiento-relajación que permite el bombeo de sangre. La liberación sistólica de Ca^{2+} ocurre como resultado de la conversión de un estímulo eléctrico (potencial de acción) en contracción mecánica. En este proceso llamado “acoplamiento excitación-contracción”, el potencial de acción despolariza la membrana plasmática del cardiomiocito, permitiendo la entrada de una cantidad relativamente baja de Ca^{2+} desde el espacio extracelular, lo que provoca que el Ca^{2+} presente en el retículo sarcoplasmático (RS) se libera al citosol, en un proceso conocido como “liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ” (LCIC) (Donald M. Bers, 2002). La liberación de Ca^{2+} del RS ocurre en microdominios subcelulares llamados “díadas”. En esta región, los canales de Ca^{2+} de tipo L (conocidos como receptores de dihidropiridina, DHPR) en la membrana de los túbulos T entran en contacto directo y cercano con un grupo de aproximadamente 20-100 receptores de rianodina (RyR) presentes en la membrana del RS (Zima et al., 2014)(Figura 3).



Flujo de Ca^{2+} durante la contracción sistólica

Como se mencionó anteriormente, el flujo de Ca^{2+} hacia el citosol comienza con la entrada de una cantidad pequeña de Ca^{2+} extracelular. Estos eventos desencadenan la liberación local de Ca^{2+} desde el RS conocida como “chispa de calcio”, la cual refleja la activación de un grupo de aproximadamente 6 a 20 canales de Ca^{2+} presentes en el RS (Gambardella et al., 2018). Durante el potencial de acción se produce la suma espacio-temporal de miles de chispas de Ca^{2+} produciendo el transitorio global de Ca^{2+} que inicia la contracción (Louch et al., 2013).

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L (DHPR) se activan por despolarización, permitiendo así la entrada del Ca^{2+} al citosol capaz de activar a los RyR2 (LCIC). Estos canales pueden ser inhibidos por el propio Ca^{2+} , lo que demuestra un mecanismo de autorregulación (Shiferaw et al., 2003). Los RyR son canales de liberación intracelular, encargados de liberar el calcio presente en RS, la isoforma RyR2 es la más abundante en los cardiomiocitos (Tunwell et al., 1996). Estos canales tienen una estructura tetramérica, en la cual se pueden identificar por los menos dos dominios funcionales. El extremo C terminal que representa el poro por el cual son transportados los iones a través de la membrana plasmática, y el extremo N terminal en el cual se encuentran diferentes sitios moduladores (Gao et al., 1997).

Flujo de Ca^{2+} durante la relajación diastólica

La concentración de Ca^{2+} libre en el lumen del RS es de aproximadamente 1mM. En cambio, es posible que la $[\text{Ca}^{2+}]$ dentro del RS sea de 20 mM, esto se debe a que los iones dentro del lumen del retículo se unen a la proteína Calcecuestrina (Beard et al., 2004). El flujo de Ca^{2+} por mecanismos de recaptación asegura que se produzca la relajación muscular durante la fase diastólica. Este proceso es llevado a cabo por el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (SERCa) (**Figura 3**). El primero es un transportador de membrana que se encuentra preferentemente en los túbulos T (Yang et al., 2002) y al ser electrogénico, media el cotransporte de Na^+ y Ca^{2+} . NCX puede transportar tres iones de Na^+ por cada ion de Ca^{2+} que se libera al espacio extracelular (modo directo). Por otro lado, en el modo reverso se liberan tres iones de Na^+ por cada ion de Ca^{2+} que ingresa a la célula. Generalmente el modo directo participa en la salida de Ca^{2+} hacia el espacio extracelular durante la relajación diastólica (Goldhaber & Philipson, 2013), mientras que el modo indirecto se produce en la fase temprana del potencial de acción generando el ingreso de Ca^{2+} a la célula (Bers, 2006).

SERCa ATPasa es una bomba de Ca^{2+} presente en la membrana del RS que se encarga de la recaptación de Ca^{2+} hacia el lumen del RS durante la fase diastólica. Como resultado, finaliza el ciclo de acoplamiento EC y se restauran los niveles de Ca^{2+} en el RS, que son necesario para el próximo ciclo de contracción (Frank et al., 2003). La actividad de SERCa ATPasa está regulada por una proteína llamada Fosfolamban (PLB), este es un inhibidor de SERCa que reduce la afinidad de la bomba al Ca^{2+} . La fosforilación en el residuo Ser16 de PLB, por parte de la proteína quinasa A (PKA), inhibe a PLB activando nuevamente a SERCa. CaMKII es capaz de fosforilar a PLB en residuo Thr17, lo que provoca que se reactive el ingreso de Ca^{2+} al RS (Simmerman et al., 1986).

Alteraciones en el manejo del calcio intracelular

Durante el periodo diastólico, los RyR2 no están completamente inactivos, sino que permiten una cierta liberación de Ca^{2+} del RS hacia el citosol. Esta liberación espontánea denominada “pérdida diastólica de Ca^{2+} ”, se manifiesta como liberaciones delimitadas espacialmente denominadas “chispas de Ca^{2+} ” o como liberaciones que se propagan espacialmente, denominadas “ondas de Ca^{2+} ”. El Ca^{2+} liberado al citosol durante una onda de Ca^{2+} es extruido por el NCX que, siendo electrogénico, genera una corriente despolarizante. En situaciones de sobrecarga de Ca^{2+} intracelular y alteración funcional de los RyR2, las ondas de Ca^{2+} se multiplican y activan esta corriente,

generando posdespolarizaciones tardías que si alcanzan el umbral gatillan potenciales de acción ectópicos y arritmias (Eisner et al., 2009).

La liberación diastólica espontánea de Ca^{2+} induce arritmias que pueden llevar a la muerte súbita (Van Oort et al., 2010; Wehrens et al., 2009) en el marco de síndromes genéticos como la taquicardia ventricular polimorfa inducida por catecolaminas (Baltogiannis et al., 2019) y en formas adquiridas de enfermedad cardíaca que abarcan desde la fibrilación auricular (Liu et al., 2020) hasta la insuficiencia cardíaca (Dridi et al., 2020). En situaciones en las que predominan las chispas de Ca^{2+} ocurre una descarga parcial del contenido de Ca^{2+} del RS, derivando en una caída de la contractilidad cardíaca. Este mecanismo fisiopatológico explica, al menos parcialmente, la disfunción contráctil observada en la insuficiencia cardíaca y en la sepsis (Sepúlveda et al., 2017; Zima et al., 2010).

Disfunción de los receptores de rianodina tipo II (RyR2)

Existen fenómenos arritmogénicos que pueden ser mediados por alteraciones en la función de los RyR2 y que se describen como alternancias de Ca^{2+} . En las alternancias ocurre sucesivamente una liberación sistólica de Ca^{2+} , seguida de una de menor magnitud. Esto se traduce no sólo en alternancia contráctil, sino que afecta corrientes de membrana, generando alternancias en la duración del potencial de acción (Edwards & Blatter, 2014; Eisner et al., 2006), de modo que surgen gradientes de repolarización que provocan arritmias tanto ventriculares como auriculares (Liu et al., 2020; Weiss et al., 2011). En años recientes, ha sido demostrado que tanto una mutación asociada con pérdida de función de los RyR2 como la inhibición con carvedilol generan alternancias de Ca^{2+} (Leif et al., 2016; Sun et al., 2018). Más recientemente, se ha descrito en humanos un “síndrome de liberación deficiente de Ca^{2+} por los receptores de rianodina” el cuál es provocado por mutaciones que reducen su probabilidad de apertura y conlleva a una propensión al desarrollo de alternancias (Sun et al., 2021).

No solo la alteración funcional de los RyR2 ha sido involucrada en el desarrollo de alternancias, sino que estas son favorecidas por todos aquellos factores que aumenten la refractariedad en la liberación de Ca^{2+} (tiempo que transcurre hasta que se normaliza la amplitud de un transitorio de Ca^{2+} que ocurra temporalmente cercano a un primer transitorio de referencia). Entre los factores que afectan la refractariedad de la liberación de Ca^{2+} se encuentran: la refractariedad intrínseca de los RyR2, el contenido de Ca^{2+} dentro del RS y la velocidad de recaptura del Ca^{2+} citosólico hacia el RS (Cely-Ortiz et al., 2020). Al respecto, diferentes trabajos proponen una preponderancia de los

RyR2 como determinantes de alternancias y otros sugieren que la función de SERCa es el principal factor (Díaz et al., 2002; Millet et al., 2021; Rosenbaum et al., 2009; Sun et al., 2018). En cuanto al contenido de Ca^{2+} del RS se considera que debe ser alto para que las alternancias ocurran, pero existe controversia acerca de la oscilación de los niveles de Ca^{2+} de fin de diástole dentro del RS cuando ocurren alternancias (Díaz et al., 2004; L. Wang et al., 2014).

Junto a otras proteínas implicadas en el manejo de Ca^{2+} intracelular, los receptores de rianodina cardíacos (RyR2) juegan un papel clave en la función cardíaca, ya que como se mencionó anteriormente, su apertura permite la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático (RS) hacia el citosol provocando la contracción sistólica. A su vez, la disfunción de los RyR2 produce tanto disfunción contráctil como arritmias (Belevych et al., 2013; Blayney & Lai, 2009). Los RyR2 son modulados fisiológicamente por proteínas regulatorias y mediante modificaciones postraduccionales como la nitrosilación, oxidación o fosforilación de residuos aminoacídicos específicos. Dicha modulación puede afectar tanto su probabilidad de apertura como su disposición espacial en el retículo sarcoplasmático (Gonano & Jones, 2017; Jones et al., 2018).

La posibilidad de monitorear experimentalmente la dinámica de Ca^{2+} dentro del retículo sarcoplasmático permitirá evaluar diversos procesos que cursan con alteración del ciclado de Ca^{2+} de forma mucho más completa que la aportada por la sola medición de Ca^{2+} citosólico. En particular, permitirá comprender lo que ocurre durante las alternancias de Ca^{2+} , ya que al monitorear simultáneamente Ca^{2+} citosólico y Ca^{2+} intra-RS se puede concluir respecto del factor limitante para la liberación de Ca^{2+} .

Generación del CEPIA (*Calcium-measuring organelle-entrapped protein indicators*)

El uso de sensores de calcio intracelular brinda información relevante sobre la dinámica de la señalización del Ca^{2+} en las células. Dentro de estas herramientas se encuentran los indicadores codificados genéticamente (GECIs) como GCaMP2. Dicho sensor está conformado por una proteína central EGFP permutada circularmente, la cual está franqueada por un péptido de unión a miosina (M13) en el extremo N terminal y calmodulina (CaM) en el extremo C terminal que determina la afinidad de GCaMP2 al Ca^{2+} . Es posible dirigir la expresión de GECIs a diferentes compartimentos subcelulares

con la adición de etiquetas adecuadas como SEKDEL (secuencia señal de retención en RS) (Suzuki et al., 2014; Q. Wang et al., 2008)

Estudios de sustitución de aminoácidos por mutagénesis dirigida en CaM y GFP encontraron diferentes variantes de GCaMP2 con variabilidad en el rango dinámico y afinidad por Ca^{2+} . De 58 diferentes variantes generadas a través de ingeniería genética los autores eligieron aquella que poseía las sustituciones en E31D/F92W/E104D/D133E, la cual se le adicionó una señal de direccionamiento y retención en retículo. Este nuevo sensor se lo bautizó como rCEPIAer, el cual posee propiedades ideales para medir la dinámica de calcio en el retículo ya que se describió que posee una intensidad de fluorescencia dentro del rango de concentración de calcio en el RS y, además, un K_d aproximado de 600 μM (Suzuki et al., 2014).

Objetivos

Objetivo general

Generar una plataforma experimental que permita registrar los niveles de Ca^{2+} dentro del retículo sarcoplasmático en cardiomiocitos a través de la transferencia génica mediante vectores virales adenoasociados.

Objetivos específicos

- 1- Desarrollar y producir un vector adenoasociado con tropismo cardíaco (AAV9) para la expresión de un sensor de Ca^{2+} genéticamente codificado dirigido a retículo sarcoplásmico (rCEPIAer).
- 2- Realizar los controles de calidad del vector viral producido a través de geles de agarosa, geles de poliacrilamida y qPCR.
- 3- Transfectar células HEK293T con el plásmido que codifica para el rCEPIAer y registrar la dinámica de calcio con fluorómetro.
- 4- Transducción *in vivo* en ratones c57bl/6.
- 5- Evaluación de los niveles de Ca^{2+} del retículo en miocitos aislados mediante microscopía confocal.

Hipótesis

La expresión transgénica del sensor de calcio dirigido a retículo (r-CEPIA-er) permite el registro y el estudio de las fluctuaciones de Ca^{2+} intrasarcoplasmático en cardiomiocitos.

Obtención de pCMV-rCEPIAer y pDG9

Los plásmidos necesarios para la producción de los vectores virales fueron amplificados con anterioridad en cepa DH5alfa (para pDG9) y la cepa ultra estable SURE (Agilent) para pCMV-rCEPIAer. Una vez obtenidas colonias positivas en un medio sólido en presencia de selección Amp (ampicilina) se seleccionaron colonias para obtener cultivos líquidos en un medio LB (en presencia de ampicilina). Se utilizó el kit comercial PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit para la recuperación de los plásmidos.

Composición y preparación de medio LB

Para el crecimiento de las bacterias transformadas se preparó medio LB (caldo de lisogenia, por sus siglas en inglés), este es un medio rico en nutrientes y utilizado principalmente para el cultivo de bacterias.

Para la preparación del medio se pesaron: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, y se agregó un litro de agua bidestilada. Se agregó un agitador magnético de teflón y se mezcló hasta homogeneizar completamente la solución. El medio de cultivo se distribuyó equitativamente en dos Erlenmeyer, cada uno con 250 ml y se los esterilizó en autoclave a 121 °C y 1 atm por 25 min. Luego se los dejó enfriar y se los inoculó con las bacterias transformadas con los plásmidos necesarios.

Para proceder con el lisado celular se tomaron aproximadamente 200 ml del medio LB con las bacterias transformadas y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Una vez que las células precipitaron, se eliminó el medio y se añadió 10 ml del buffer de resuspensión R3 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA) el cual contiene RNasa A para eliminar cualquier contaminante de RNA presente en la muestra. Posteriormente, se utilizó 10 ml del buffer de lisis L7 (0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) y se invirtió el tubo hasta homogeneizar el lisado celular, asegurándose de no agitar. Luego de 5 minutos a temperatura ambiente se añadió 10 ml del buffer de precipitación N3 (3.1 M Acetato de potasio, pH 5.5) y se procedió a centrifugar por 10 minutos a 12000 rpm. El lisado celular se recolectó en otro tubo para separar el pellet que contiene los restos celulares que no son de interés. El sobrenadante obtenido se cargó en una columna para lavar el DNA, dejando que la solución drene por gravedad (se utilizó el buffer de lavado W8: 0.1 M acetato de sodio, pH 5.0, 825 mM NaCl).

Para eluir y precipitar el DNA que está retenido en la columna se colocó un tubo de centrifuga (tubo de elución) de 30 ml debajo de la misma y se agregó 15 ml del buffer de elución E4 (100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 1.25 M NaCl). El DNA purificado está presente en el tubo de elución, aquí se añadió 10,5 ml de isopropanol para centrifugar a 12000 rpm durante 30 minutos y precipitar el DNA. Luego, se resuspendió el pellet con etanol al 70% y se centrifugó por 5 minutos, nuevamente a 12000 rpm. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 500 μ l de buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA).

Electroforesis

Para determinar la presencia y calidad de los plásmidos se preparó un gel de agarosa 0,8%. Para esto, se pesó 0,4 gramos de agarosa y se agregó 50 ml de buffer TAE (Tris, ácido acético y EDTA). Luego, se calentó la solución hasta homogeneizar completamente y se dejó solidificar. Por último, se prepararon las muestras a sembrar. En la primera calle se sembró 5 μ l del marcador de peso molecular (1 Kb) más 1 μ l de gel red. En la segunda calle se sembró 1,5 μ l de pAAV-CMV-rCEPIAer (750 ng/ μ l), 7 μ l de agua bidestilada, 1 μ l de gel red y 1 μ l de loading buffer. En la calle 3 se sembró 1,5 μ l de pDG9 (1,6 μ g/ μ l), 7 μ l de agua bidestilada, 1 μ l de gel red y 1 μ l de loading buffer.

Producción de vectores virales adenoasociados con tropismo cardíaco para inducir la expresión de rCEPIAer:

Células HEK293T se cultivaron en placas de 15cm (cinco placas en total) y fueron cotransfectadas cuando se encontraban con un 80-90% de confluencia con los plásmidos pDG9 (1,9 μ g/ μ l) y con el cis-plásmidos pAAV-CMV-rCEPIAer (375 ng/ μ l).

| Mix de transfección | | |
|---------------------|------------|------------------------|
| DMEM s/SFB | 1 - 2 ml | Relación 3:1 |
| pDG9 | 45 μ g | |
| cis-plásmido | 15 μ g | |
| Mezclar por pipeteo | | |
| PEI | 90 μ l | Relación 1,5:1 con DNA |
| Vórtex | | |
| Incubar 15' a TA | | |

Tabla 1. Volúmenes para Mix de transfección en placa de 15 cm.

Se agregó la Mix de transfección en las placas (un volumen de 1,5 ml por placa) y se movió para distribuir uniformemente por toda la superficie. Se mantuvieron en cultivo por 72 horas a 37°C.

Al sexto día se recolectaron las células junto con el medio DMEM 2% SFB. Se centrifugó a 4000 rpm para bajar las células (pellet) y en otra mamadera se apartó el sobrenadante, para que posteriormente se le de otro tratamiento.

Pellet

Se agregó 3 ml de AAV lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 2 mM MgCl₂) y, para liberar el contenido celular, se procedió a congelar a -80°C y descongelar a 37°C. Este paso se hizo un total de tres veces seguidas, vortexeando la muestra en medio de cada paso.

Sobrenadante

Se añadió 31,3 gr de NH₄(SO₄)₂ (un agente caotrópico) por cada 100 ml de medio de cultivo, asegurándose de que se disuelva bien la sal. Es necesario dejar la muestra en hielo por una hora como mínimo.

Posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 30' y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 3 ml de AAV lysis buffer. A partir de ahí se mezcló todo en un mismo tubo (6 ml) para continuar con el proceso.

Se agregó 0,5 µl de nucleasa para eliminar el ADN que esté contaminando la muestra del virus, incubando unos 45' y vortexeando cada 10'. Luego, se centrifugó 30' a 3000 rpm conservando ahora el sobrenadante que es donde se encuentran las partículas virales.

Para el proceso de purificación y filtrado del virus, se utilizó un gradiente de Iodixanol en tubos de 11,5 ml (ULTRACRIMP, PKG 50 03987, ThermoFischer). Para preparar el gradiente se trabajó en flujo laminar, y se colocó primero la solución de menor porcentaje siguiendo en orden ascendente. Se utilizó una jeringa con aguja para agregar directamente al fondo del tubo las diferentes soluciones, asegurándose de agregar despacio y de forma continua para no romper el gradiente.

| Preparación de cada solución | | | | | |
|------------------------------|----------|---------|--------|------------------|-----------|
| | Optiprep | NaCl 5M | ODB 5X | H ₂ O | Vol final |
| 15% | 16,1 ml | 12,8 | 12,8 | 22,5 | 64,2 ml |
| 25% | 18,0 ml | - | 8,6 | 16,5 | 43,1 ml |
| 40% | 23,5 ml | - | 7,0 | 4,7 | 35,2 ml |
| 60% | 35,2 ml | - | - | - | 35,2 ml |

| Gradiente en tubo de 11,5 ml | |
|------------------------------|--------|
| 15% | 3 ml |
| 25% | 2 ml |
| 40% | 1,5 ml |
| 60% | 1,5 ml |

Tabla 2. Composición de las soluciones utilizadas en el gradiente de Iodixanol y volúmenes utilizados en cada tubo.

El sobrenadante con el virus se agregó en la parte de arriba del tubo de 11,5 ml que tenía la solución de 15%. El líquido se agregó de a poco inclinando el tubo para que la presión no rompa el gradiente con una jeringa apoyada en la interfase solución 15%-aire. En los tubos donde no se completó el volumen final se agregó AAV lysis buffer. Una vez sellados, se ultracentrifugo a 70000 rpm durante 1,30 hs (rotor 70Ti, 18 °C). Al finalizar, el virus se encontraba en la interfase entre la solución de Iodixanol 40% y la solución 60%. Para recolectar las partículas virales se pinchó con una aguja el tubo en la parte superior de manera que se libere las presiones y en la parte inferior para que comience a gotear. Se recolectó en un tubo eppendorf 1 ml del medio (fracción de descarte) y en otro tubo, 1,5 ml de la fracción 40-60% que contenía el virus (fracción de interés).

Finalmente, se utilizó una columna de microfiltrado vivaspin20 (GE Healthcare) para concentrar las partículas virales. Se fue centrifugando en intervalos de tiempo diferentes para ir eliminando los restos de Iodixanol, agregando buffer lactato para ir completando el volumen.

Titulación del genoma viral por PCR cuantitativa (qPCR)

El número de copias del genoma viral se determinó por PCR cuantitativa utilizando cebadores complementarios a la región ITR del virus (fwd: 5'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT; rev: 5'-CGGCCTCAGTGAGCGA), dichos primers fueron diseñados en trabajos previos (Aurnhammer et al., 2012). La curva de calibración se construyó a través de diluciones seriadas del cis-plásmido (1×10^8 copias/ μ l a 1×10^4 copias/ μ l). La muestra AAV (5 μ l) se diluyó (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000) en agua

ultrapura libre de nucleasas. La qPCR se llevó a cabo utilizando iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) en un termociclador para PCR en tiempo real (Bio-Rad CFX opus Dx) con los siguientes parámetros de ciclado: El genoma viral se liberó de la cápside en 1 ciclo de 95°C por 5 min seguido por 40 ciclos de 95°C por 10 s, 58°C por 10 s, y 72°C por 45 s.

Titulación del genoma viral por gel de agarosa alcalino

Para el análisis del genoma viral (cantidad y calidad del genoma) se realizó un gel de agarosa al 0,8% en buffer 0,05M de NaOH y 1 mM de EDTA. Para preparar el gel se añadió 1 g de agarosa en 98 ml de agua bidestilada y se calentó en el microondas hasta disolver. Se dejó enfriar la solución hasta que fue posible manipular el Erlenmeyer sin guantes, evitando que se enfríe por completo para que no gelifique. Luego se agregó 1 ml del buffer alcalino de electroforesis 50 X y se agregó a la cama (con el peine incluido) para que se gelifique. Una vez que se agregó el gel en la cuba, se cubrió por completo con buffer alcalino 1X. Las muestras virales se sembraron en presencia del buffer de siembra (1,2% SDS, 20% Glicerol, 0,01% Xylene Cyanol, 0,1M NaOH y 4 mM de EDTA) y la muestra se calentó a 95°C por 2 min para provocar la ruptura de la envoltura viral. Se separó electroforéticamente a 18 V toda la noche. Al día siguiente el gel se lavó por 1 hora en 100 ml de buffer Tris 0,1 M; pH=8. Para la tinción se agregó 100 ml de NaCl 0,1 M (2 ml stock 5 M; 50X) y SYBR Safe (10 µl stock 10000X) agitando por 2 horas en ausencia de luz. Finalmente, se reveló mediante un transiluminador UV.

Cuantificación y calidad de las partículas virales obtenidas por SDS-PAGE

Las muestras de AAV fueron resueltas en un gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS. Se utilizó como patrones de siembra 4 diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina, BSA (2000 ng, 1000 ng, 500 ng y 250 ng), se tomó 10 µl de cada solución de BSA y se lo mezcló con 20 µl de agua bidestilada y 6 µl de tampón de carga 6X SDS-PAGE. Para la muestra de AAV, se agregó 30 µl del virus y 6 µl del tampón de carga 6X SDS-PAGE. Luego, se calentó por 5 minutos a 95°C la muestra viral para favorecer la ruptura de la cápside y los estándares de BSA se calentaron por 3 minutos a la misma temperatura. Luego de la separación electroforética a 125 V, el gel se desmontó e incubó durante toda la noche en agitación con una solución de Coomassie Blue (50% metanol, 10% ácido acético glacial y 0,3 p/v de Coomassie Blue R-250). Al día siguiente se destiñó con una solución (40% de metanol y 8% de acético). Se cuantificó la intensidad relativa de las bandas mediante el programa ImageJ. A través de la curva de calibración (Densitometría de BSA vs ng de BSA) se calculó los ng de la

proteína viral VP3 y el número de partículas virales. El título total de partículas virales (vp) puede calcularse con la siguiente fórmula: $pv/\mu l = ng\ VP3/4,987 \times 10^{-9} /\mu l$ de muestra de AAV cargada por carril.

Cepa de ratones y vía de inoculación.

Ocho ratones C57BL/6 de 90 días fueron inoculados con 3×10^{11} pv / ratón. La inyección de AAV-CMV-rCEPIAer se realizó mediante administración intravascular en el seno retro-orbital.

Obtención de miocitos aislados.

Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal para realizar la toracotomía. Los corazones fueron removidos y colgados en un sistema de Langendorff para comenzar la perfusión retrógrada con una solución HEPES 1mM $CaCl_2$. Se prosiguió por 5 minutos con otra solución nominalmente libre de calcio con 0.1 mM de EGTA. Luego se recirculó por 14 minutos una solución que contiene 0.5 mM $CaCl_2$, 0.18 mg/ml de colagenasa tipo II (300U/ml), 0.01mg/ml de proteasa y albúmina bovina 0.5 mg/ml. Se restituyó progresivamente el calcio hasta 1mM.

Microscopía confocal

Los miocitos aislados fueron colocados en una cámara de perfusión adaptada para la platina de un microscopio confocal invertido Zeiss 410 equipado con un objetivo de inmersión en aceite 63X, 1.4 NA. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (24°C). Los cardiomiocitos fueron estimulados a través de dos electrodos de platino con pulsos cuadrados de 10 ms. La fluorescencia fue registrada a 600 nm luego de la excitación con un láser 543 nm. Para obtener una resolución temporal de la fluorescencia, se utilizó el modo escaneo lineal, en el cual una línea de 512 pixeles fue registrada a lo largo de la célula cada 4.3 ms, obteniendo registros de fluorescencia en el espacio vs tiempo.

Fluorimetría

Células HEK293T fueron cultivadas en placas de cultivo de 100 mm en un medio DMEM + 10% SFB + Estreptomicina/penicilina. Una vez alcanzado una confluencia de aproximadamente 80% se transfectó con 10 μ g del plásmido que codifica para el rCEPIAer utilizando PEI_{max}. Al día siguiente se corroboró la eficiencia de transfección a través de la presencia de células fluorescentes mediante la utilización de un microscopio de fluorescencia. Las células fueron despegadas de las placas a través del tratamiento con tripsina y resuspendidas en una solución cero Ca^{2+} (en mM): 133 NaCl,

5 KCl, 1.2 MgSO₄, 0.8 MgCl₂, 10 glucosa, y 10 HEPES, pH 7.35. Se utilizó un fluorómetro (Photon Technologies International RCR fluorometer) con el objetivo de registrar la fluorescencia emitida a 600 nm luego de la excitación con un haz de luz de 543 nm. La sensibilidad del rCEPIAer por el calcio fue evidenciado con los consecutivos agregados de 10 µl de CaCl₂ 1 mM al medio extracelular.

Resultados

Obtención de plásmidos y evaluación de calidad

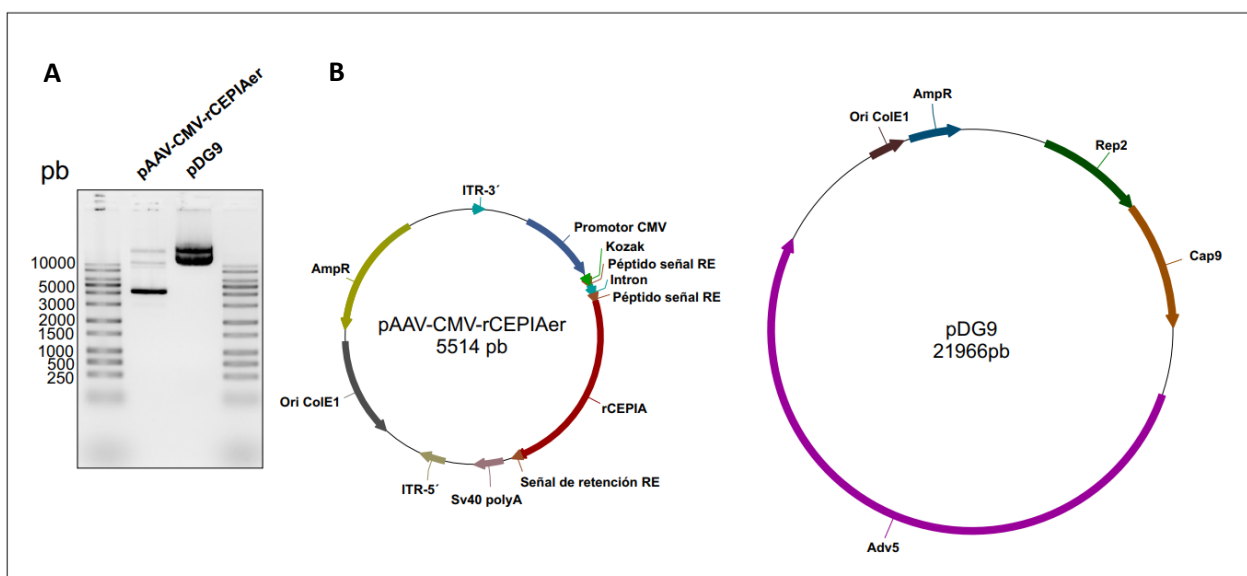


Figura 4. A - Gel de agarosa donde se evidencia la presencia y calidad de los plásmidos. **B** - Mapas del vector plasmídico pAAV-CMV-rCEPIAer y pDG9 utilizado para pseudotipar AAV9.

El gen del rCEPIAer fue obtenido a través del repositorio de plásmidos Addgene. El mismo fue clonado previamente en un vector adenoasociado para ser empaquetado en el vector viral resultando en un plásmido de aproximadamente 5 Kb (cis-plásmido, plásmido de transferencia o simplemente plásmido adenoasociado). Los genes de la replicación (REP) y de la cápside (CAP) se encuentran en un plásmido separado denominado pDG9 (el 9 hace referencia a CAP del serotipo 9, sin embargo, REP siempre es del serotipo 2). Además, en este plásmido se encuentran los genes necesarios del Adenovirus tipo 5 para la eficiente replicación viral. Este plásmido fue obtenido de la empresa Plasmid Factory®.

Ambos plásmidos fueron transformados en bacterias químicamente competentes, en el caso del plásmido pAAV-CMV-rCEPIAer fue transformado en la cepa ultra estable SURE (Agilent) ya que debido a las secuencias de los ITRs generan rearrreglos que pueden provocar una disminución significativa en los títulos virales obtenidos. En el caso del plásmido pDG9 se transformó la cepa DH5alfa.

Una vez obtenidas colonias positivas en un medio sólido en presencia de la presión de selección Amp (Ampicilina) se seleccionaron colonias para obtener cultivos líquidos en un medio LB siempre en presencia de Amp. De este cultivo líquido se realizó

un stock de glicerol para futuros usos, el resto del cultivo se utilizó para la purificación del plásmido a través de kits comerciales de maxiprep (Thermo Fisher).

Los mapas de vectores plasmídicos presentes en la **figura 4** muestran los elementos necesarios para la producción viral. Los plásmidos usados para pseudotipar el AAV9 fueron pAAV-CMV-rCEPIAer y pDG9. El primero contiene los elementos cis necesarios para la obtención viral, dentro de ellos se destacan las ITR las cuales franquean al sensor de Ca^{2+} rCEPIAer; y los elementos regulatorios como el promotor de expresión eucariota CMV (citomegalovirus). Además, pDG9 aporta los elementos en trans para la expresión de las proteínas estructurales y de replicación (Cap9 y Rep2).

La presencia y la calidad de los plásmidos se detectó mediante un gel de agarosa 0.8% en buffer TAE (Tris, Acético y EDTA). Se sembró el patrón de peso molecular en la calle número 1. El plásmido pAAV-CMV-rCEPIAer sembrado en la calle 2 muestra una banda de aproximadamente 4000 pb, esto es esperado ya que el material genético se corrió sin ser tratado con enzimas de restricción que linealicen el plásmido. pDG9 se sembró en la calle 3, la banda de mayor intensidad se ubica por encima de los 10000 pb, lo que indica que el material genético recorrió una distancia menor en el gel, debido a que es un plásmido de mayor tamaño.

Como se puede ver en la **figura 4**, las bandas están bien marcadas por lo que el material genético no se encuentre contaminado con otro tipo de ácido nucleico, destacando la ausencia de ARN el cual es un contaminante muy común en las maxipreps. Estos resultados nos permitieron obtener plásmidos de una calidad óptima para la transfección de células.

Transfección de células HEK293T con rCEPIAer

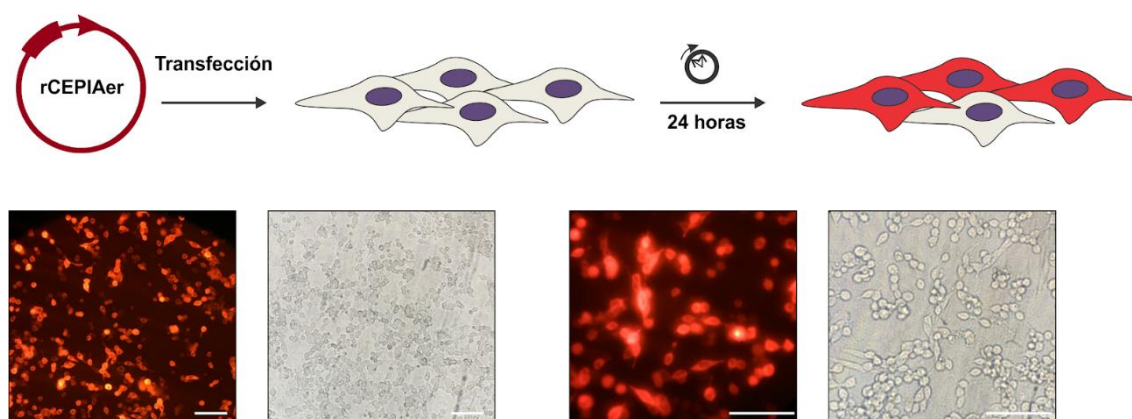


Figura 5. Esquema de transfección de células HEK293T con imágenes de microscopía de fluorescencia. Las barras blancas corresponden a 100 µm.

Células HEK293T fueron transfectadas con el plásmido rCEPIAer obtenido anteriormente con el objetivo de evidenciar el correcto funcionamiento del mismo. En la **figura 5** se muestra el esquema de transfección en el cual se partió de una placa de 10 cm con células HEK293T a un 90% de confluencia. Para la transfección se utilizó el reactivo de transfección PEI max (Polysciences, Inc.) el cual nos permite obtener un alto porcentaje de células positivas. En las imágenes del microscopio de fluorescencia muestran la expresión del sensor de Ca^{2+} rCEPIAer en células HEK293T, las cuales fueron excitadas con una luz de una longitud de onda 543 ± 20 nm (verde) para obtener registro de la emisión en rojo (600 nm). Como podemos observar en las imágenes de microscopía fluorescencia las células fueron transfectadas exitosamente, además el patrón de fluorescencia obtenido sugiere que la ubicación del sensor fluorescente se encuentra en el retículo de las células ya que no se evidencia una fluorescencia homogénea en toda la célula como se espera habitualmente para una proteína citosólica.

Registros de dinámica de calcio en células HEK293T con fluorómetro:

La capacidad de sensar el calcio por el indicador rCEPIAer fue probado en un sistema heterólogo (HEK293T). Para ello las células fueron transfectadas con el plásmido que codifica para el rCEPIAer y su fluorescencia fue detectada con un fluorómetro. Las células partieron de una concentración de Ca^{2+} extracelular nula y se fue aumentando la concentración con el agregado de Ca^{2+} , simultáneamente se registró la fluorescencia emitida con respecto al tiempo del experimento. En la **figura 6** podemos observar un registro típico de fluorescencia, en cada agregado de Ca^{2+} extracelular podemos evidenciar un aumento de la intensidad de la emisión en función del agregado de Ca^{2+} extracelular. Estos resultados demuestran que somos capaces de reproducir los experimentos descritos en bibliografía y nos permite continuar con la producción del virus para la expresión de rCEPIAer *in vivo*.

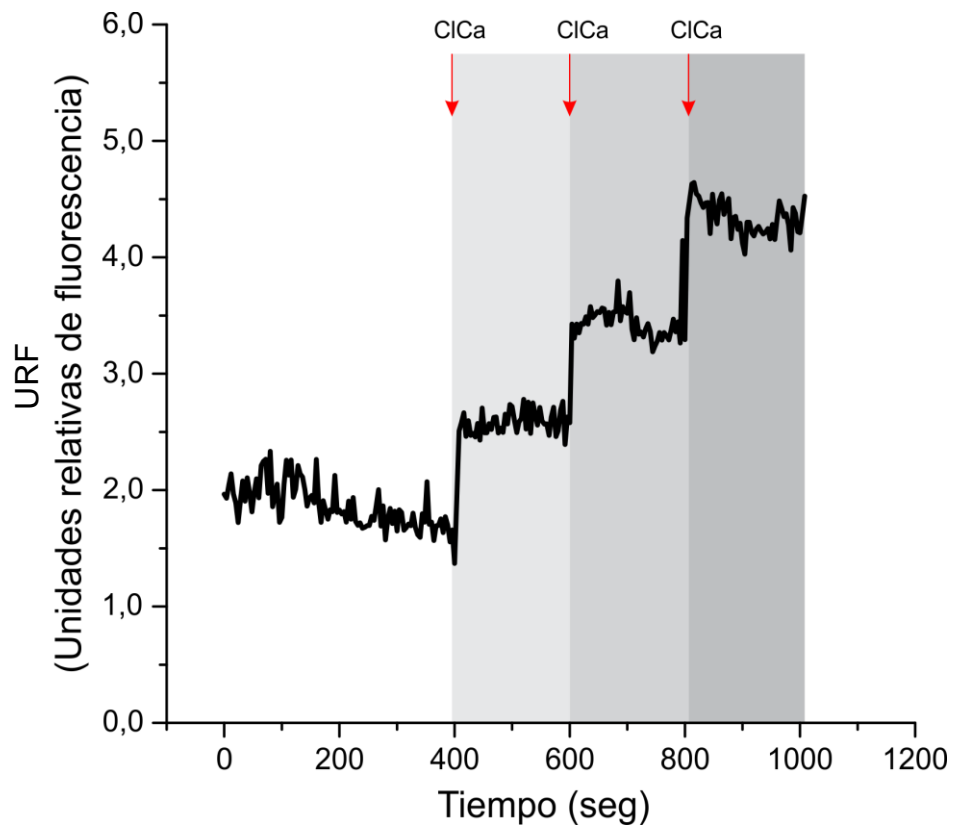


Figura 6. Registro de fluorescencia en células HEK293T transfectadas con el plásmido rCEPIAer. Las flechas rojas indican el agregado secuencial de 10 μ l de una solución 1 mM de CaCl₂.

Producción de AAV-CMV-rCEPIAer

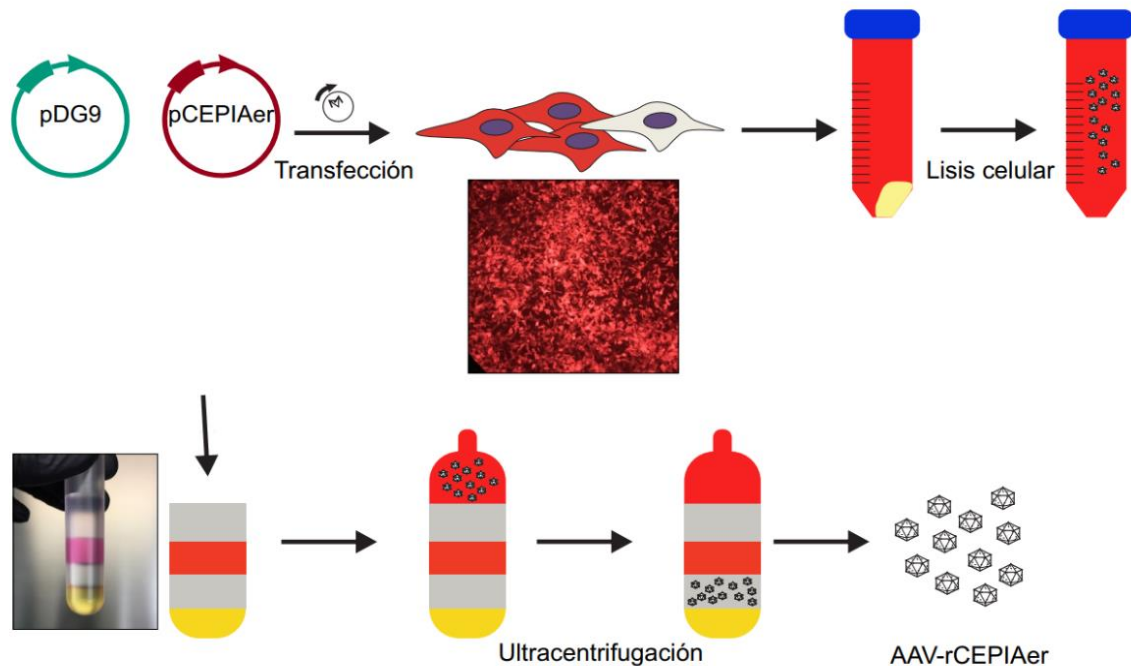


Figura 7. Esquema simplificado del flujo de trabajo para la generación de vector viral adenoasociado.

Una vez demostrado que los plásmidos obtenidos poseen una calidad óptima y su funcionamiento es correcto en un sistema heterólogo se avanzó con la producción de un vector viral adenoasociado. Para esto se utilizaron 6 placas de 15 cm con una confluencia del 80-90% las cuales fueron cotransfectadas con los plásmidos pDG9 y pAAV-CMV-rCEPIAer. Luego de 72 horas de transfección las células y el medio extracelular son recolectados y separados por centrifugación. Dependiendo del serotipo los AAV pueden encontrarse en el interior celular o en el medio. En el caso del serotipo 9 se estima que el virus se encuentra dividido en partes iguales entre el interior celular y en el medio de cultivo, es por eso que se utiliza ambos para proceder a su purificación.

Una vez lisadas las células por repetidas congeladas a -80°C y descongeladas a 37°C se le agrega una nucleasa para eliminar ARN, ADN genómico, ADN plasmídico y cualquier otro tipo de ADN no empaquetado. En el caso del medio de cultivo se procede a la precipitación del virus a través del agregado de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. Tanto el lisado celular como el precipitado son combinados para ser sometidos a una ultracentrifugación en un gradiente discontinuo de Iodixanol.

Las partículas virales puras son retenidas en la interface de 40% y 60% del gradiente de Iodixanol. Esta fracción es obtenida a través de la punción con una aguja

y jeringa, la solución obtenida es microfiltrada y el buffer intercambiado para poder ser utilizado *in vivo*.

Análisis del genoma viral con gel de agarosa alcalino

Una vez formado el virus en su interior se encuentra un genoma de ADN simple hebra, este genoma empaquetado proviene de la amplificación del cis-plásmidos utilizado para su replicación en HEK293T. Las cápsides de AAV empaquetan todo el ADN simple hebra que se encuentra flanqueado por las secuencias de ITRs, en nuestro caso el tamaño de ADN calculado es de 3119 pb.

Para evaluar la presencia e integridad del genoma viral se realizó una electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante. Como material de partida se tomó una alícuota de la fracción viral ultrapurificada y se la desnaturalizó al calentarla a 95°C por 5 min. Este material fue el que se sembró en el gel de agarosa. En la **figura 8** podemos observar una fotografía de un gel representativo en el cual el genoma viral corresponde al tamaño de lo esperado (~3000pb). Además, concluimos que la muestra no posee contaminación con otros ácidos nucleicos. Lo interesante de esta técnica es que no solo brinda información sobre la integridad y la pureza de la muestra, sino que es posible determinar cantidad y de esta manera obtener un título viral aproximado. Sabiendo el tamaño y composición del genoma se establece el peso molecular del mismo. Por otro lado, se conoce la cantidad (en nanogramos) que se corresponde a la intensidad de la banda de 3kb del marcador. Midiendo por densitometría (ImageJ) la intensidad de las bandas se puede obtener los nanogramos de ADN viral y conociendo su peso molecular se establece el número de moles del genoma viral que será el mismo que el número de partículas virales.

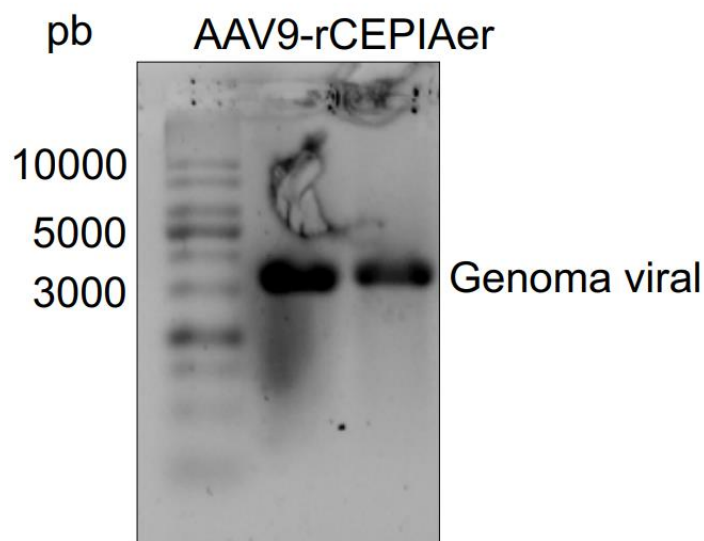


Figura 8. Gel de agarosa desnaturalizante para evidenciar calidad y cantidad aproximada del genoma de AAV9-rCEPIAer.

Estos resultados demuestran que nuestra preparación fue exitosa con un título viral aproximado $5,2 \times 10^{12}$ gv (genomas del vector) y un genoma viral intacto, correspondiente a un peso molecular esperado y no se encuentra contaminado con otros ácidos nucleicos.

Cuantificación y evaluación de calidad de las partículas virales obtenidas por SDS-PAGE

Uno de los mayores inconvenientes a la hora de purificar vectores AAV es la contaminación con proteínas provenientes del sistema de purificación (restos celulares, medio de cultivo, suero, etc). Si bien en los resultados anteriores demostramos que la preparación se encuentra sin contaminantes, esto solo se refiere a la contaminación de otros ácidos nucleicos ya que se utilizó un intercalante específico, dejando de lado las posibles contaminaciones con proteínas.

Con el objetivo de estudiar la pureza de nuestra muestra se realizó un gel de poliacrilamida con SDS seguido por una tinción con azul de Coomassie. Como podemos observar en el gel representativo mostrado en la **figura 9.A** se sembró diferentes concentraciones de albúmina y en la última calle se sembró nuestra preparación viral. Claramente, en nuestra preparación se observa tres bandas correspondientes a las proteínas de la cápside del AAV: VP1, VP2 y VP3.

Las diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (250, 500, 1000 y 2000 ng) se ubicaron en las calles 2, 3, 4 y 5 respectivamente. En la calle 6 se sembró el genoma de AAV9-rCEPIAer.

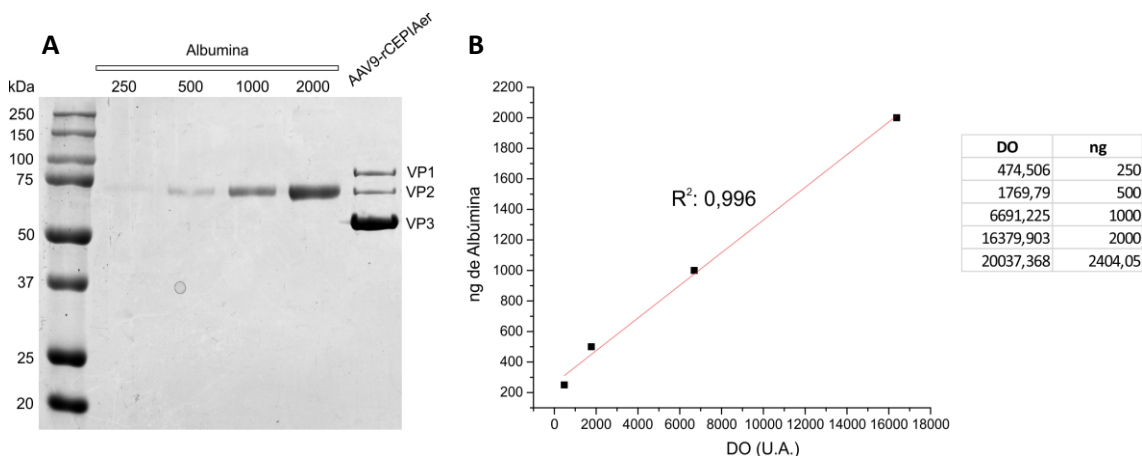


Figura 9. A- Gel de poliacrilamida con SDS para determinar la calidad y cuantificar el número de partículas virales. Las diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (250, 500, 1000 y 2000 ng) se ubicaron en las calles 2, 3, 4 y 5 respectivamente. En la calle 6 se sembró el genoma de AAV9-rCEPIAer. **B-** Curva de calibración (Densitometría de BSA vs ng de BSA).

Al igual que en el caso del gel de agarosa, un SDS-PAGE nos aporta más información que solo la correspondiente a la pureza de la muestra. Con este tipo de geles es posible cuantificar la intensidad relativa de las bandas mediante el programa ImageJ para obtener la curva de calibración (Densitometría de BSA vs ng de BSA) que se utilizó para calcular los ng de la proteína viral VP3 y el número de partículas virales (**Figura 9.B**). La DO de la banda incógnita es de 20037,368 (U.A), este valor se utilizó para interpolar en la curva de calibración y así obtener los ng de VP3 que se sembró en el gel. El cálculo del número de partículas virales se basó en el peso molecular de VP3 (60063 Da). Se sabe que por cada cápside de AAV hay un total de 50 VP3, por lo que el peso molecular de una sola cápside es de 3 MDa ($50 \times 60063 = 3003150 \approx 3 \text{ MDa}$) y cada cápside contiene $4,9868 \times 10^{-18} \text{ g}$ de VP3. El número de partículas virales sembradas en el gel de poliacrilamida se calcula dividiendo la cantidad de VP3 en ng por $4,9868 \times 10^{-18} \text{ g}$ o $4,9868 \times 10^{-9} \text{ ng}$, lo que da un valor de $4,82083 \times 10^{11} \text{ pv}/20 \text{ ul}$ (volumen final que se sembró en cada calle). El título viral es de $2,41 \times 10^{10} \text{ pv}/\text{ul}$ o $2,41 \times 10^{13} \text{ pv}/\text{ml}$.

PCR cuantitativa (qPCR)

La técnica más comúnmente utilizada para la obtención de títulos virales es la PCR cuantitativa en la que se utilizan cebadores específicos para la región ITR del genoma viral. Como curva de calibración se utilizan diluciones seriadas del plásmido utilizado para la producción viral. Si bien esta cuantificación es relativa, nos permite obtener resultados rápidos del título viral.

En la **figura 10** se muestra una curva de calibración típica que se generó con la dilución seriada del plásmido de concentración conocida. Podemos observar que los puntos obtenidos se ajustan a la regresión lineal con un R^2 de 0,99. A partir de esta curva se interpola el valor Ct del AAV incógnita (15,13) y se calcula el número de copias por mililitro teniendo en cuenta el factor de dilución de la muestra y el volumen total cargado, arrojando un valor de 1.25×10^{12} copias/ml.

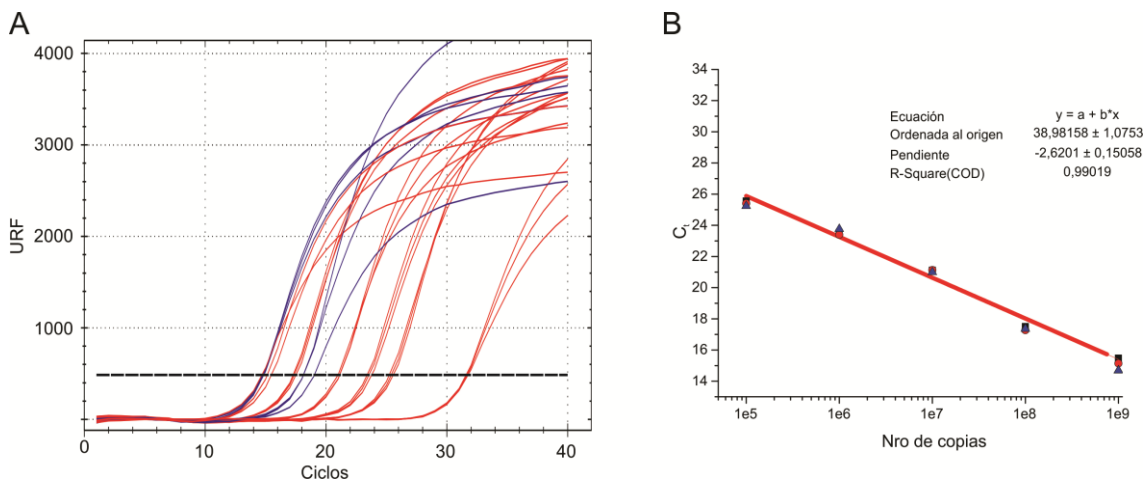


Figura 10. A- se observa los ciclos de amplificación correspondiente a la curva de calibración (rojo) y las diferentes concentraciones de AAV9-rCEPIAer (azul). La línea discontinua negra indica el umbral de amplificación utilizado para el cálculo del Ct. **B-** regresión lineal de la curva de calibración utilizada para el cálculo del título viral.

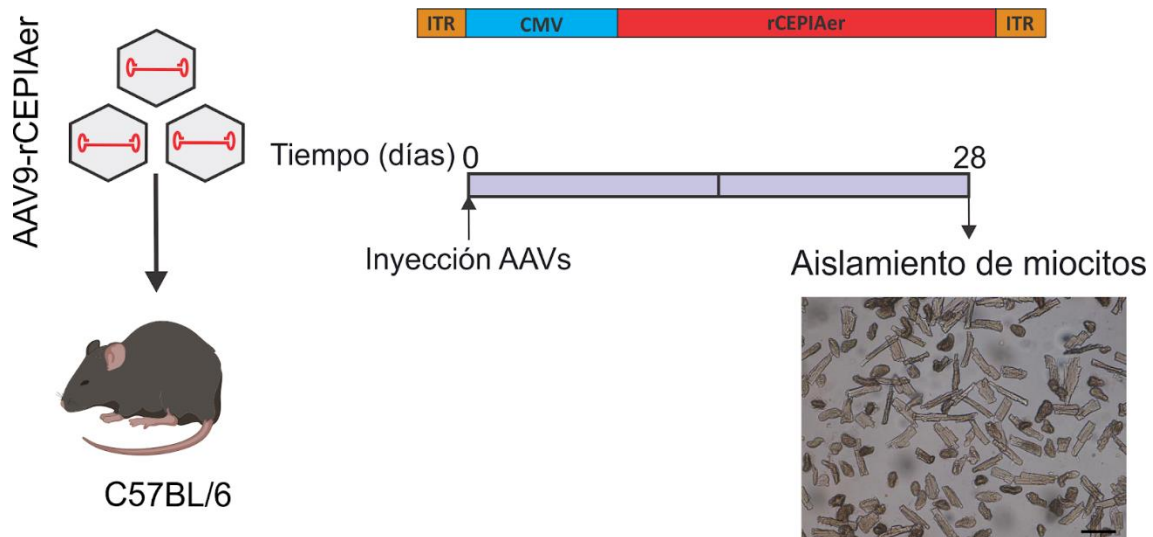


Figura 11. Esquema de inoculación del virus en ratones C57BL/6. Ratones de 3 meses de edad fueron inyectados con AAV9-rCEPIAer. Luego de 28 días los miocitos fueron aislados para su utilización en el microscopio confocal. La barra negra corresponde a 50 µm.

Microscopía confocal

Un total de 8 ratones de 3 meses de edad fueron inyectados retro orbitalmente con 3×10^{11} pv ratón. Luego de 28 días post inyección, los ratones fueron sacrificados, el corazón se removió y se aislaron células cardíacas a través del sistema langendorff. A través de esta técnica obtenemos cardiomiocitos aislados de otro tipo celular presentes en el corazón. En la **figura 11** se muestra el esquema experimental utilizado y una micrografía de las células cardíacas. Estas células aisladas son la mínima unidad contráctil del corazón, es decir poseen todos los mecanismos de ciclado de calcio y acortamiento celular.

En la **figura 12** se muestra un esquema que representa los resultados esperados. Cuando los miocitos son transducidos expresan el sensor de Ca^{2+} en el lumen del retículo mostrando una intensidad de fluorescencia máxima en diástole (retículo sarcoplásmico lleno). Esperamos que la liberación del Ca^{2+} durante la sístole provoque que la intensidad de fluorescencia disminuya, proporcional a la disminución de la concentración de Ca^{2+} . Se evidenció la transducción viral a través de la fluorescencia de los cardiomiocitos utilizando un microscopio confocal. La fluorescencia emitida corresponde a la fluorescencia basal de la proteína rCEPIAer. En la **figura 13.A** podemos observar en la imagen de microscopía confocal un patrón de fluorescencia reticular correspondiente a la ubicación subcelular de la proteína. Este patrón coincide con el reportado en la bibliografía.

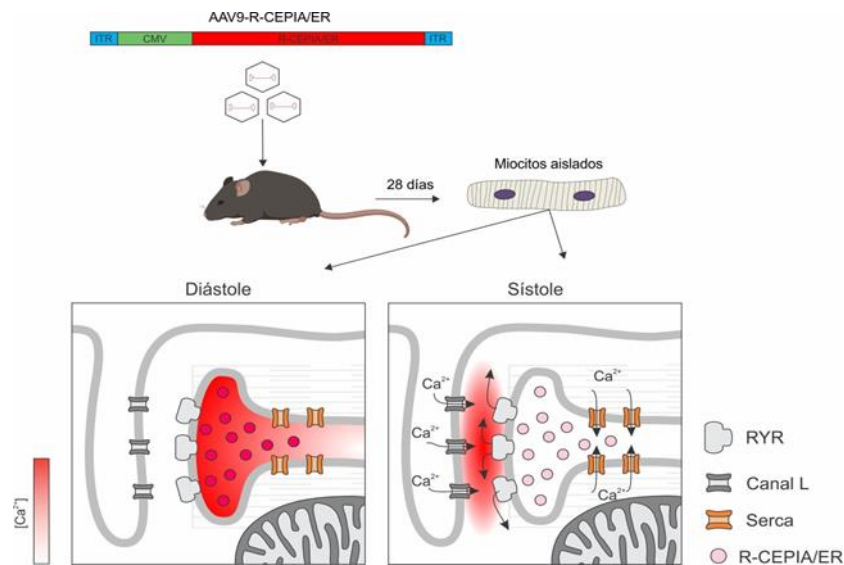


Figura 12. Esquema representativo de los resultados esperados. Los miocitos transducidos que expresan el sensor de Ca^{2+} intraluminal poseen una intensidad de fluorescencia máxima en diástole. Esperamos que, al liberar el Ca^{2+} durante la sístole, esta intensidad de fluorescencia disminuya proporcional a la disminución de la concentración de Ca^{2+} .

Los cardiomiocitos fueron perfundidos con una solución HEPES (En mM: NaCl 146.2, KCl 4.7, CaCl_2 1, HEPES 10, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.35, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.05 y Glucosa 10 (pH 7.4 con NaOH).) y estimulados eléctricamente a través de dos electrodos de platino a 0.5 hz. De esta manera se despolariza la membrana del cardiomiocito dando lugar a la liberación de calcio inducida por calcio y el subsecuente acortamiento celular. La liberación del calcio del retículo sarcoplásmico antecede a la contracción generando una disminución de los niveles de este ion en el lumen del retículo en cada evento contráctil. Con el objetivo de registrar esta disminución de Ca^{2+} en el retículo se utilizó el escaneo láser lineal de un microscopio confocal. Se realiza un escaneo lineal a lo largo del cardiomiocito (**figura 13.A.** línea blanca) con respecto al tiempo. La resolución temporal de esta técnica nos permite registrar eventos rápidos que corresponden a la liberación de Ca^{2+} . En la **figura 13.B.** podemos observar un registro típico donde se observa una disminución de la fluorescencia en cada estímulo eléctrico. Esta disminución de la fluorescencia corresponde a una disminución del Ca^{2+} del retículo. En la **figura 13.C.** tenemos la integral de la señal mostrando nuevamente la caída de la fluorescencia.

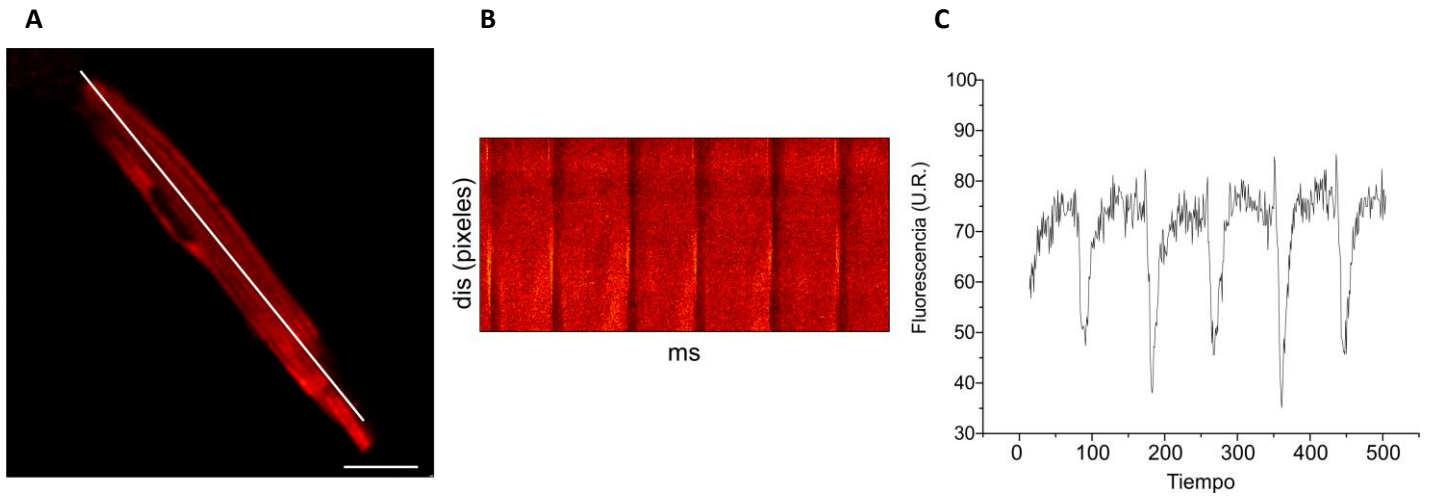


Figura 13. Resultados representativos del sensor rCEPIAer en cardiomiocitos. Se pueden observar una imagen representativa de un cardiomiocito transducido con el sensor de calcio. Además, el escaneo lineal de una porción del cardiomiocito al ser estimulado eléctricamente evidencia en la imagen o el registro una disminución de la fluorescencia correspondiente a una baja en la concentración de calcio intraluminal en cada sístole. La barra blanca corresponde a 20 μm .

En su conjunto, estos resultados demuestran que fuimos capaces de transducir *in vivo* cardiomiocitos ventriculares de ratón con el AAV9-rCEPIAer. Además, a través de experimentos con microscopía confocal demostramos la capacidad de estudiar los eventos de liberación de Ca^{2+} en células aisladas.

Discusión y conclusiones

En este trabajo final de grado nos propusimos obtener un vector AAV serotipo 9 con tropismo cardíaco para la expresión de un sensor de calcio genéticamente codificado dirigido al retículo sarcoplásmico con el objetivo de poder obtener registros de la dinámica del calcio intraluminal.

Algunas patologías cardiovasculares como la insuficiencia cardíaca o las arritmias pueden encontrar su origen o su progresión en alteraciones en el manejo del Ca^{2+} en las células cardíacas (Denniss et al., 2020; Hamilton & Terentyev, 2019; Njagic et al., 2020). Por esta razón, es importante contar con herramientas moleculares que permitan registrar los niveles de Ca^{2+} dentro del retículo sarcoplásmico en cardiomiocitos. Se utilizan enfoques experimentales basados en colorantes de baja afinidad para medir directamente la $[\text{Ca}^{2+}]$. Dentro de ellos se encuentra Fluo-5N que se conoce que se acumula dentro del RS en cardiomiocitos. Este colorante presenta limitaciones ya que no es posible usarlo en roedores pequeños, los cuales son modelo de estudio en muchas patologías cardiovasculares. A su vez, puede acumularse en otros compartimentos subcelulares, lo que llevaría a que la señal del Ca^{2+} del RS se contamine; y muchas veces la señal fluorescente producida por este colorante disminuye a lo largo de los experimentos, por extrusión del tinte y fotoblanqueo (Bovo et al., 2016). Por lo mencionado anteriormente, es importante contar con indicadores de Ca^{2+} que superen estas desventajas. En nuestro caso, el uso de rCEPIAer como indicador de Ca^{2+} RS demostró que es posible obtener señal fluorescente proveniente del RS, al ser administrado *in vivo* con AAV9 en ratones C57BL/6 (**Figura 13**). A su vez, mediante el registro de la actividad de rCEPIAer en un sistema heterólogo (HEK293T) pudimos demostrar que el sensor responde al aumento de la concentración de Ca^{2+} (**figura 6**). La ventaja de trabajar con células recién aisladas del tejido cardíaco radica en que se conserva su estructura y fisiología, manteniendo las mismas propiedades de homeostasis de Ca^{2+} que poseían en el tejido cardíaco.

Existe una amplia diversidad de serotipos de AAV con diferentes tropismos, los cuales son aprovechados para dirigir la expresión de determinados genes a órganos de interés (Davidoff et al., 2005). En nuestro caso, se utilizó AAV9 para conducir la expresión de un sensor sensible a Ca^{2+} (rCEPIAer) al RS de miocitos cardíacos. En el tejido cardíaco este serotipo de AAV es ampliamente utilizado ya que se considera

cardiotrópico, aunque existe evidencia de que no se dirige exclusivamente al corazón cuando se administra de manera sistémica, encontrando niveles similares de expresión en hígado y músculo esquelético.

En este trabajo logramos obtener AAV9-rCEPIAer para expresar el rCEPIAer con una calidad óptima para su utilización *in vivo* como podemos observar en los resultados del gel alcalino y el SDS- PAGE (**figura 8 y 9**).

Los resultados de la cuantificación de las partículas virales, demuestra que los valores obtenidos a lo largo de los tres métodos no son similares.

En el caso del SDS-PAGE es un método que nos permite determinar si la preparación viral se encuentra contaminada con proteínas, es un método barato, rápido y de fácil reproducción. Permite cuantificar las partículas virales a través de la densitometría de VP3 junto con una curva de calibración de albúmina. Si bien, este método tiene muchas ventajas, la principal y mayor desventaja de la cuantificación del título viral por SDS-PAGE es que se basa solo en las proteínas de las cápsides, es decir, estamos sobreestimando la titulación debido a que en la mayoría de las veces tenemos cápsides que no empaquetaron el genoma, esto genera una distorsión muy grande (en ocasiones de un orden de magnitud).

El uso de geles de agarosa alcalino para evaluar la presencia e integridad del genoma es un método útil que nos permitió determinar que la muestra de AAV no estaba contaminada con ningún otro material genético. A su vez, nos permitió observar si el tamaño del genoma empaquetado corresponde con el esperado teóricamente. El análisis cuantitativo a través de esta técnica es aproximado ya que se relativiza el valor del título viral a la cantidad de ng que se sembró del marcador de peso molecular, pudiendo ser sobreestimando nuevamente el resultado al suponer que el tamaño del genoma viral es similar al de las moléculas del marcador. Este método no permite ver si la muestra se encuentra contaminada con restos de proteínas (contaminación más típica).

A diferencia de los dos métodos anteriores, la cuantificación por qPCR detecta y cuantifica la cantidad de genoma viral presente en la muestra al medir la fluorescencia generada durante la fase de crecimiento exponencial de la reacción. Es el método más ampliamente utilizado por los laboratorios para la obtención del título viral debido a que es técnicamente sencillo, rápido y estandarizado. A diferencia de los dos métodos anteriores que solo era necesario un equipamiento menor, la cuantificación por qPCR utiliza equipos de mediano porte, por lo que se encarece el costo. Se utilizó una curva

patrón generada con un virus de concentración conocida para calcular el número de partículas virales presentes en la muestra (**figura 10**). En este caso se utilizaron primers complementarios a las regiones ITR, detectando cualquier material genético que esté flanqueado por estas secuencias. De esta manera, no podemos asegurar que lo que se está amplificando es la secuencia completa del sensor de calcio rCEPIAer. Actualmente, se está utilizando la ddPCR (digital droplet PCR) para obtener una cuantificación absoluta, sin necesidad de referenciar a patrones o controles endógenos (Kojabad et al., 2021).

Una vez superado los controles de calidad y habiendo obtenido un título viral aceptable el AAV-rCEPIAer fue inyectado sistémicamente en ratones C57BL/6 de 3 meses de edad y los miocitos cardíacos fueron aislados luego de 28 días de la inyección. Si bien se obtuvo transducción de los cardiomiocitos esta no fue con una eficiencia esperada (estimamos que menos del 10% de los cardiomiocitos fueron transducidos), creemos que esto ocurre principalmente porque el sensor utilizado no posee una intensidad de emisión de fluorescencia muy alta y es probable que haya un mayor número de miocitos transducidos que los que realmente se logran observar. Esta limitación se podría mejorar con varias estrategias: 1- aumentar el título viral con el que fueron inyectados los miocitos. 2- Transducir ratones neonatos (p4) y utilizarlos luego de 3 meses. 3- Cambiar por otro sensor de calcio genéticamente codificado que posea mayor intensidad de fluorescencia de emisión.

Una vez seleccionado un miocito que posee una intensidad de fluorescencia aceptable se estimula a través de dos electrodos de platino de manera de lograr la despolarización celular y disparar el ciclado de calcio. Logramos registrar el decaimiento de la señal de fluorescencia debido a la disminución de la concentración de calcio del retículo (**figura 13**). Si bien estos resultados parecen ser muy alentadores en el uso de este sensor ciertos inconvenientes a la hora de registrar la fluorescencia generan alguna inquietud. En primer lugar, como se dijo anteriormente la intensidad de fluorescencia no resultó de una intensidad reproducible lo que dificulta la adquisición de los registros de calcio ya que depende en gran medida del miocito seleccionado. Segundo, la autofluorescencia propia de los cardiomiocitos que se encuentran dentro de los espectros de emisión del rCEPIAer provoca un solapamiento de la señal quitando precisión en las medidas.

Si bien, en este trabajo hemos logrado cumplir con los objetivos propuestos, concluimos que para el estudio del ciclado del calcio en el retículo sarcoplásmico de cardiomiocitos el sensor rCEPIAer no brindó resultados óptimos. Proponemos utilizar el

sensor denominado GCamp6f que posee características espectroscópicas que se ajusta teóricamente a las propiedades necesarias para la detección del calcio en el retículo.

Referencias

- Atchison, R. W., Casto, B. C., & McD Hammon, W. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. In *New Series* (Vol. 149, Issue 3685).
- Aurnhammer, C., Haase, M., Muether, N., Hausl, M., Rauschhuber, C., Huber, I., Nitschko, H., Busch, U., Sing, A., Ehrhardt, A., & Baiker, A. (2012). Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. *Human Gene Therapy Methods*, 23(1), 18–28. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2011.034>
- Baltogiannis, G. G., Lysitsas, D. N., di Giovanni, G., Ciconte, G., Sieira, J., Conte, G., Kolettis, T. M., Chierchia, G. B., de Asmundis, C., & Brugada, P. (2019). CPVT: Arrhythmogenesis, Therapeutic Management, and Future Perspectives. A Brief Review of the Literature. In *Frontiers in Cardiovascular Medicine* (Vol. 6). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00092>
- Bardach, A. E., Elorriaga, N., Alcaraz, A. O., Rubinstein, A. L., & Tavella, J. M. (2018). Community-based cardiovascular health promotion in Argentina. A systematic review. In *Health promotion international* (Vol. 33, Issue 4, pp. 695–712). <https://doi.org/10.1093/heapro/daw107>
- Beard, N. A., Laver, D. R., & Dulhunty, A. F. (2004). Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. In *Progress in Biophysics and Molecular Biology* (Vol. 85, Issue 1, pp. 33–69). <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.07.001>
- Belevych, A. E., Radwański, P. B., Carnes, C. A., & Györke, S. (2013). “Ryanopathy”: Causes and manifestations of RyR2 dysfunction in heart failure. In *Cardiovascular Research* (Vol. 98, Issue 2, pp. 240–247). <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt024>
- Bers, D. M. (2006). Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. In *Physiology* (Vol. 21, Issue 6, pp. 380–387). <https://doi.org/10.1152/physiol.00019.2006>
- Blayney, L. M., & Lai, F. A. (2009). Ryanodine receptor-mediated arrhythmias and sudden cardiac death. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 123, Issue 2, pp. 151–177). <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.03.006>
- Bleker, S., Sonntag, F., & Kleinschmidt, J. A. (2005). Mutational Analysis of Narrow Pores at the Fivefold Symmetry Axes of Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids Reveals a Dual Role in Genome Packaging and Activation of Phospholipase A2 Activity. *Journal of Virology*, 79(4), 2528–2540. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.4.2528-2540.2005>
- Brown, K. E. (2010). The expanding range of parvoviruses which infect humans. In *Reviews in Medical Virology* (Vol. 20, Issue 4, pp. 231–244). <https://doi.org/10.1002/rmv.648>
- Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2021). Viral vector platforms within the gene therapy landscape. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 6, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>
- Calcedo, R., Vandenberghe, L. H., Gao, G., Lin, J., & Wilson, J. M. (2009). Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *Journal of Infectious Diseases*, 199(3), 381–390. <https://doi.org/10.1086/595830>

- Cely-Ortiz, A., Felice, J. I., Diaz-Zegarra, L. A., Valverde, C. A., Federico, M., Palomeque, J., Wehrens, X. H. T., Kranias, E. G., Aiello, E. A., Lascano, E. C., Negroni, J. A., & Mattiazzi, A. (2020). Determinants of Ca²⁺ release restitution: Insights from genetically altered animals and mathematical modeling. *Journal of General Physiology*, 152(11). <https://doi.org/10.1085/JGP.201912512>
- Clément, N., & Grieger, J. C. (2016). Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials. In *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development* (Vol. 3, p. 16002). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.2>
- D.A. Eisner, T. K. L. A. V. A. W. T. (2009). From the Ryanodine Receptor to Cardiac Arrhythmias. *Circulation Journal*, 73, 1561–1567.
- Davidoff, A. M., Gray, J. T., Ng, C. Y. C., Zhang, Y., Zhou, J., Spence, Y., Bakar, Y., & Nathwani, A. C. (2005). Comparison of the ability of adeno-associated viral vectors pseudotyped with serotype 2, 5, and 8 capsid proteins to mediate efficient transduction of the liver in murine and nonhuman primate models. *Molecular Therapy*, 11(6), 875–888. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.12.022>
- Denniss, A. L., Dashwood, A. M., Molenaar, P., & Beard, N. A. (2020). Sarcoplasmic reticulum calcium mishandling: central tenet in heart failure? In *Biophysical Reviews* (Vol. 12, Issue 4, pp. 865–878). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00736-y>
- Díaz, M. E., Eisner, D. A., & O'Neill, S. C. (2002). Depressed ryanodine receptor activity increases variability and duration of the systolic Ca²⁺ transient in rat ventricular myocytes. *Circulation Research*, 91(7), 585–593. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000035527.53514.C2>
- Díaz, M. E., O'Neill, S. C., & Eisner, D. A. (2004). Sarcoplasmic Reticulum Calcium Content Fluctuation Is the Key to Cardiac Alternans. *Circulation Research*, 94(5), 650–656. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000119923.64774.72>
- D J Pereira, D. M. M. N. M. (1997). The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J Virol*, 1079–1088.
- Donald M. Bers. (2002). Cardiac excitation–contraction coupling. www.nature.com
- Dridi, H., Kushnir, A., Zalk, R., Yuan, Q., Melville, Z., & Marks, A. R. (2020). Intracellular calcium leak in heart failure and atrial fibrillation: a unifying mechanism and therapeutic target. In *Nature Reviews Cardiology* (Vol. 17, Issue 11, pp. 732–747). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0394-8>
- Duan, D., Yan, Z., Yue, Y., & Engelhardt, J. F. (1999). *RAPID COMMUNICATION Structural Analysis of Adeno-Associated Virus Transduction Circular Intermediates*. <http://www.idealibrary.com>
- Edwards, J. N., & Blatter, L. A. (2014). Cardiac alternans and intracellular calcium cycling. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 41(7), 524–532. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12231>
- Eisner, D. A., Li, Y., & O'Neill, S. C. (2006). Alternans of intracellular calcium: Mechanism and significance. In *Heart Rhythm* (Vol. 3, Issue 6, pp. 743–745). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2005.12.020>

- Frank, K. F., Bolck, B., Erdmann, E., & Schwinger, R. H. G. (2003). Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. In *Cardiovascular Research* (Vol. 57). www.elsevier.com/locate/cardiores
- Gambardella, J., Trimarco, B., Iaccarino, G., & Santulli, G. (2018). New insights in cardiac calcium handling and excitation-contraction coupling. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1067, pp. 373–385). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/5584_2017_106
- Gao, L., Tripathy, A., Lu, X., & Meissner, G. (1997). Evidence for a role of C-terminal amino acid residues in skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) function. *FEBS Letters*, 412(1), 223–226. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00781-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00781-3)
- Gao, G., Vandenberghe, L. H., Alvira, M. R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X., & Wilson, J. M. (2004). Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues. *Journal of Virology*, 78(12), 6381–6388. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.12.6381-6388.2004>
- Goldhaber, J. I., & Philipson, K. D. (2013). Cardiac sodium-calcium exchange and efficient excitation-contraction coupling: Implications for heart disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 961, 355–364. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4756-6_30
- Gonano, L. A., & Jones, P. P. (2017). FK506-binding proteins 12 and 12.6 (FKBPs) as regulators of cardiac Ryanodine Receptors: Insights from new functional and structural knowledge. In *Channels* (Vol. 11, Issue 5, pp. 415–425). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/19336950.2017.1344799>
- Hamilton, S., & Terentyev, D. (2019). Altered Intracellular Calcium Homeostasis and Arrhythmogenesis in the Aged Heart. In *International journal of molecular sciences* (Vol. 20, Issue 10). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/ijms20102386>
- Hoy, S. M. (2019). Onasemnogene Apeparovvec: First Global Approval. *Drugs*, 79(11), 1255–1262. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01162-5>
- Jones, P. P., MacQuaide, N., & Louch, W. E. (2018). Dyadic Plasticity in Cardiomyocytes. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01773>
- Kelich, J. M., Ma, J., Magura, C., & Yang, W. (2016). Super-Resolution Imaging of Nuclear Import of Adeno-Associated Virus in Live Cells. *Biophysical Journal*, 110(3), 596a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.3181>
- Kojabad, A. A., Farzanehpour, M., Galeh, H. E. G., Dorostkar, R., Jafarpour, A., Bolandian, M., & Nodooshan, M. M. (2021). Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives. In *Journal of Medical Virology* (Vol. 93, Issue 7, pp. 4182–4197). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jmv.26846>
- Kotin, R. M., Siniscalcot, M., Samulskit, R. J., Zhu, X., Hupert, L., Laughlin, C. A., Mclaughlin ¶, S., Muzyczka ¶, N., Rocchi, M., & Berns, K. I. (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 87).
- Kronenberg, S., Böttcher, B., von der Lieth, C. W., Bleker, S., & Kleinschmidt, J. A. (2005). A Conformational Change in the Adeno-Associated Virus Type 2 Capsid Leads to the Exposure of Hidden VP1 N Termini. *Journal of Virology*, 79(9), 5296–5303. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.9.5296-5303.2005>

- Leif, H. M., Zhong, X., Sun, B., Vallmitjana, A., Mi, T., Guo, W., Ni, M., Wang, R., Guo, A., Duff, H. J., Gillis, A. M., Song, L. S., Benitez, R., & Chen, S. R. W. (2016). Suppression of ryanodine receptor function prolongs Ca²⁺ release refractoriness and promotes cardiac alternans in intact hearts. *Biochemical Journal*, 473(21), 3951–3964. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160606>
- Linden, R. M., & Berns, K. I. (2000). *Molecular Biology of Adeno-Associated Viruses*. In *Contrib Microbiol. Basel, Karger* (Vol. 4).
- Liu, T., Xiong, F., Qi, X. Y., Xiao, J., Villeneuve, L., Abu-Taha, I., Dobrev, D., Huang, C., & Nattel, S. (2020). Altered calcium handling produces reentry-promoting action potential alternans in atrial fibrillation-remodeled hearts. *JCI Insight*, 5(8). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.133754>
- Louch, W. E., Hake, J., Mørk, H. K., Hougen, K., Skrbic, B., Ursu, D., Tønnessen, T., Sjaastad, I., & Sejersted, O. M. (2013). Slow Ca²⁺ sparks de-synchronize Ca²⁺ release in failing cardiomyocytes: Evidence for altered configuration of Ca²⁺ release units? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 58(1), 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.01.014>
- Lusby, E., F. K. H., & B. K. I. (1980). Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *Journal of Virology*, 34(2), 402–409.
- Meier, A. F., Fraefel, C., & Seyffert, M. (2020). The interplay between adeno-associated virus and its helper viruses. In *Viruses* (Vol. 12, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v12060662>
- Mensah, G. A., Roth, G. A., & Fuster, V. (2019). The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors: 2020 and Beyond. In *Journal of the American College of Cardiology* (Vol. 74, Issue 20, pp. 2529–2532). Elsevier USA. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.10.009>
- Mietzsch, M., Broecker, F., Reinhardt, A., Seeberger, P. H., & Heilbronn, R. (2014). Differential Adeno-Associated Virus Serotype-Specific Interaction Patterns with Synthetic Heparins and Other Glycans. *Journal of Virology*, 88(5), 2991–3003. <https://doi.org/10.1128/jvi.03371-13>
- Millet, J., Aguilar-Sanchez, Y., Kornyejev, D., Bazmi, M., Fainstein, D., Copello, J. A., & Escobar, A. L. (2021). Thermal modulation of epicardial Ca²⁺ dynamics uncovers molecular mechanisms of Ca²⁺ alternans. *Journal of General Physiology*, 153(2). <https://doi.org/10.1085/JGP.202012568>
- M Nonnenmacher & T Weber. (2012). Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors.
- Njegic, A., Wilson, C., & Cartwright, E. J. (2020). Targeting Ca²⁺ Handling Proteins for the Treatment of Heart Failure and Arrhythmias. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.01068>
- Nonnenmacher, M. E., Cintrat, J.-C., Gillet, D., & Weber, T. (2015). Syntaxin 5-Dependent Retrograde Transport to the trans -Golgi Network Is Required for Adeno-Associated Virus Transduction. *Journal of Virology*, 89(3), 1673–1687. <https://doi.org/10.1128/jvi.02520-14>

- Ogden, P. J., Kelsic, E. D., Sinai, S., & Church, G. M. (n.d.). Comprehensive AAV capsid fitness landscape reveals a viral gene and enables machine-guided design. <http://science.sciencemag.org/>
- Rosenbaum, D. S., Cutler, M. J., Wan, X., Laurita, K. R., & Hajjar, R. J. (2009). Targeted SERCA2a gene expression identifies molecular mechanism and therapeutic target for arrhythmogenic cardiac alternans. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 2(6), 686–694. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.109.863118>
- Russell, S., Bennett, J., Wellman, J. A., Chung, D. C., Yu, Z. F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., McCague, S., Cross, D., Marshall, K. A., Walshire, J., Kehoe, T. L., Reichert, H., Davis, M., Raffini, L., George, L. A., Hudson, F. P., ... Maguire, A. M. (2017). Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*, 390(10097), 849–860. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31868-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31868-8)
- Salganik, M., Venkatakrisnan, B., Bennett, A., Lins, B., Yarbrough, J., Muzyczka, N., Agbandje-McKenna, M., & McKenna, R. (2012). Evidence for pH-Dependent Protease Activity in the Adeno-Associated Virus Capsid. *Journal of Virology*, 86(21), 11877–11885. <https://doi.org/10.1128/jvi.01717-12>
- Samulski, R. J., & Muzyczka, N. (2014). AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes. *Annual Review of Virology*, 1(1), 427–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085355>
- Samulski, R. J., Srivastava, A., Berns, K. I., & Muzyczka, N. (1983). *Rescue of Adeno-Associated Virus from Recombinant Plasmids: Gene Correction within the Terminal Repeats of AAV* (Vol. 33).
- Scott, L. J. (2015). Alipogene tiparvovec: A review of its use in adults with familial lipoprotein lipase deficiency. In *Drugs* (Vol. 75, Issue 2, pp. 175–182). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0339-9>
- Sepúlveda, M., Gonano, L. A., Viotti, M., Morell, M., Blanco, P., López Alarcón, M., Peroba Ramos, I., Bastos Carvalho, A., Medei, E., & Vila Petroff, M. (2017). Calcium/Calmodulin Protein Kinase II-Dependent Ryanodine Receptor Phosphorylation Mediates Cardiac Contractile Dysfunction Associated with Sepsis. *Critical Care Medicine*, 45(4), e399–e408. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002101>
- Shiferaw, Y., Watanabe, M. A., Garfinkel, A., Weiss, J. N., & Karma, A. (2003). Model of Intracellular Calcium Cycling in Ventricular Myocytes. *Biophysical Journal*, 85(6), 3666–3686. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74784-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74784-5)
- Simmerman, H. K. B., Collins, J. H., Theibert, J. L., Wegener, A. D., & Jones, L. R. (1986). Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *Journal of Biological Chemistry*, 261(28), 13333–13341. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)69309-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)69309-3)
- Sonntag, F., Schmidt, K., & Kleinschmidt, J. A. (2010). A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(22), 10220–10225. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001673107>
- Sun, B., Wei, J., Zhong, X., Guo, W., Yao, J., Wang, R., Vallmitjana, A., Benitez, R., Hove-Madsen, L., & Wayne Chen, S. R. (2018). The cardiac ryanodine receptor, but not

sarcoplasmic reticulum Ca²-ATPase, is a major determinant of Ca² alternans in intact mouse hearts. *Journal of Biological Chemistry*, 293(35), 13650–13661. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003760>

Sun, B., Yao, J., Ni, M., Wei, J., Zhong, X., Guo, W., Zhang, L., Wang, R., Belke, D., Chen, Y.-X., Lieve, K. V., Broendberg, A. K., Roston, T. M., Blankoff, I., Kammeraad, J. A., von Alvensleben, J. C., Lazarte, J., Vallmitjana, A., Bohne, L. J., ... Wayne Chen, S. R. (2021). Cardiac ryanodine receptor calcium release deficiency syndrome. In *Sci. Transl. Med* (Vol. 13). <https://www.science.org>

Suzuki, J., Kanemaru, K., Ishii, K., Ohkura, M., Okubo, Y., & Iino, M. (2014). Imaging intraorganellar Ca²⁺ at subcellular resolution using CEPIA. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5153>

Tunwell, R. E. A., Wickenden, C., Bertrand, M. A., Shevchenko, V. I., Walsh, M. B., Allen, P. D., & Lai, F. A. (1996). The human cardiac muscle ryanodine receptor-calcium release channel: identification, primary structure and topological analysis. In *Biochem. J* (Vol. 318).

Van Oort, R. J., McCauley, M. D., Dixit, S. S., Pereira, L., Yang, Y., Respress, J. L., Wang, Q., De Almeida, A. C., Skapura, D. G., Anderson, M. E., Bers, D. M., & Wehrens, X. H. T. (2010). Ryanodine receptor phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II promotes life-threatening ventricular arrhythmias in mice with heart failure. *Circulation*, 122(25), 2669–2679. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.982298>

Venkatakrishnan, B., Yarbrough, J., Domsic, J., Bennett, A., Bothner, B., Kozyreva, O. G., Samulski, R. J., Muzyczka, N., McKenna, R., & Agbandje-McKenna, M. (2013). Structure and Dynamics of Adeno-Associated Virus Serotype 1 VP1-Unique N-Terminal Domain and Its Role in Capsid Trafficking. *Journal of Virology*, 87(9), 4974–4984. <https://doi.org/10.1128/jvi.02524-12>

Wagner, H. J., Weber, W., & Fussenegger, M. (2021). Synthetic Biology: Emerging Concepts to Design and Advance Adeno-Associated Viral Vectors for Gene Therapy. In *Advanced Science* (Vol. 8, Issue 9). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/advs.202004018>

Wang, D., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 18, Issue 5, pp. 358–378). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>

Wang, L., Myles, R. C., De Jesus, N. M., Ohlendorf, A. K. P., Bers, D. M., & Ripplinger, C. M. (2014). Optical mapping of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ in the intact heart: Ryanodine receptor refractoriness during alternans and fibrillation. *Circulation Research*, 114(9), 1410–1421. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302505>

Wang, Q., Shui, B., Kotlikoff, M. I., & Sondermann, H. (2008). Structural Basis for Calcium Sensing by GCaMP2. *Structure*, 16(12), 1817–1827. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.10.008>

Wehrens, X. H. T., Mathur, N., Sood, S., Wang, S., Van Oort, R. J., Sarma, S., Li, N., Skapura, D. G., Bayle, J. H., & Valderrábano, M. (2009). Sudden infant death syndrome in mice with an inherited mutation in RyR2. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 2(6), 677–685. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.109.894683>

- Weiss, J. N., Nivala, M., Garfinkel, A., & Qu, Z. (2011). Alternans and arrhythmias : From cell to heart. In *Circulation Research* (Vol. 108, Issue 1, pp. 98–112). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223586>
- Xiao, P. J., Mitchell, A. M., Huang, L., Li, C., & Samulski, R. J. (2016). Disruption of Microtubules Post-Virus Entry Enhances Adeno-Associated Virus Vector Transduction. *Human Gene Therapy*, 27(4), 309–324. <https://doi.org/10.1089/hum.2016.008>
- Yang, J., Zhou, W., Zhang, Y., Zidon, T., Ritchie, T., & Engelhardt, J. F. (1999). Concatamerization of Adeno-Associated Virus Circular Genomes Occurs through Intermolecular Recombination. In *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 73, Issue 11).
- Yang, Z., Pascarel, C., Steele, D. S., Komukai, K., Brette, F., & Orchard, C. H. (2002). Na⁺-Ca²⁺ exchange activity is localized in the t-tubules of rat ventricular myocytes. *Circulation Research*, 91(4), 315–322. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000030180.06028.23>
- Ylä-Herttua, S. (2012). Endgame: Glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. In *Molecular Therapy* (Vol. 20, Issue 10, pp. 1831–1832). <https://doi.org/10.1038/mt.2012.194>
- Zhao, Z., Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2022). Viral vector-based gene therapies in the clinic. In *Bioengineering and Translational Medicine* (Vol. 7, Issue 1). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/btm2.10258>
- Zima, A. V., Bovo, E., Bers, D. M., & Blatter, L. A. (2010). Ca²⁺ spark-dependent and -independent sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in normal and failing rabbit ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, 588(23), 4743–4757. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.197913>
- Zima, A. V., Bovo, E., Mazurek, S. R., Rochira, J. A., Li, W., & Terentyev, D. (2014). Ca handling during excitation-contraction coupling in heart failure. In *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* (Vol. 466, Issue 6, pp. 1129–1137). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1469-3>