



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Trabajo de Tesis Doctoral:

“El estudio de la disfunción del cotransportador sodio/bicarbonato electrogénico como causa del desarrollo de la hipertrofia cardíaca”

Tesista: Romina Alejandra Di Mattia

Director: Dr. Ernesto Alejandro Aiello

Codirector: Dr. Alejandro Orlowski

Año: 2022

ÍNDICE

Agradecimientos	3
Nomenclatura	5
Introducción	7
Hipótesis	39
Objetivos	40
Materiales y métodos	41
Resultados	56
Objetivo específico 1: Silenciamiento NBCe1 en ratas Wistar	56
Discusión Objetivo 1	69
Objetivo específico 2: Sobreexpresión NBCe1 en ratas SHR	73
Discusión Objetivo 2	79
Objetivo específico 3: Sobreexpresión NBCe1 en ratones c57bl/6	83
Discusión Objetivo 3	93
Objetivo específico 4: Silenciamiento NBCn1 en ratas Wistar	95
Discusión Objetivo 4	101
Conclusiones	103
Bibliografía	106

Agradecimientos

Estos últimos 6 años fueron sin lugar a duda los de mayor crecimiento personal y profesional que he tenido. Han sido años de transformación, de enseñanzas, de pequeñas revoluciones. Como también de crisis, de incertidumbres y de lucha. Ese tiempo se pasó rápido, sin darme cuenta, exactamente de la forma que avanza el tiempo cuando estás disfrutando el proceso, y de verdad que así fue. Me siento afortunada de haber podido compartirlo con mis compañeros y compañeras del Centro de Investigaciones Cardiovasculares.

Gracias a mi director Alejandro Aiello, que desde el primer momento me hizo sentir bienvenida. Por acompañarme en cada paso, por su apoyo y su confianza en mí. Por darme la libertad de llevar a cabo mis ideas y proyectos.

Gracias a mi co-director Alejandro Orłowski, por transmitirme con paciencia e inmensa generosidad todos sus conocimientos científicos, por enseñarme cada técnica y la importancia del trabajo de mesada. Por alentarme a cultivar mis propias ideas y siempre ayudar a mi crecimiento profesional.

Gracias a ambos por darme el espacio y el tiempo. Por transmitirme su pasión y amor por la ciencia. Por permitirme cometer errores y aprender de ellos. Porque además de ser excelentes profesionales son personas excepcionales.

A Carolina Ciancio por todos los mates, las charlas. Por compartir su espacio conmigo. Por su compromiso y su dedicación en el trabajo y por transmitirme todo su conocimiento y su amor por el cultivo celular.

A Carolina Jaquenod De Giusti, por ser una gran científica y persona. Por su generosidad, por sus enseñanzas y por su amistad.

Gracias a todos los integrantes del laboratorio: Verónica De Giusti, Alejandro Ibañez, Leandro Díaz Zegarra, Sofía Espejo, Valeria Martínez, Rayén Di Fazio. Por toda la ayuda brindada, por aportar su enfoque en las discusiones científicas y por cada mate compartido.

A Maite Zavala y Marilén Federico por su amistad y las mil charlas científicas y no tan científicas. Por ser las primeras en quienes pensaba para desahogar un día malo o festejar uno bueno.

Gracias a todas las personas que contribuyeron con su tiempo y trabajo a que esta tesis abarque tantos aspectos experimentales: Leandro Díaz Zegarra, Paula Blanco, Enrique Portiansky, Carlos Valverde, Leandro Di Cianni, Mónica Rando. A Luis Gonano, por su colaboración y enfoque siempre valioso.

Gracias a todes les becaries del CIC. No quiero dejar de nombrar a Malena Morell, Manuela Santalla, Alejandro Ciocci Pardo, Juan Ignacio Mariángelo, Juan Ignacio Burgos Migone, Andrés Medina, Alejandra Cely Ortiz, Soledad Brea, Joshua Godoy Coto y Fiorella Cavalli. Su compañía fue de las que más contribuyó al disfrute de estos años.

A Celeste Villa-Abrille por su cariño, sus charlas y su hospitalidad cada vez que le invadía el laboratorio.

Gracias a Alicia Mattiazzi, enorme ejemplo de trayectoria científica. Por su generosidad, sus invaluable aportes y su mirada siempre asertiva en cada discusión científica.

Agradezco a la Universidad Nacional de La Plata por la excelente formación brindada tanto de grado como de posgrado. Reivindico la importancia de contar con una universidad pública, gratuita y de calidad.

Gracias a mi familia, por apoyarme siempre en cada paso. Por todo el esfuerzo para que nunca nos falte nada, por haberme permitido estudiar una carrera de 6 años sin tener que preocuparme por el sostén económico. Por enseñarme la importancia de tenernos y por su amor infinito. A mis perros, que también son familia y me han brindado el amor más puro e incondicional.

Gracias a mis amigos, a la familia que elegí. Tengo el orgullo de poder decir que son muchas y que me han acompañado en las buenas y en las malas. Fueron mi soporte en los momentos de frustración y mis abrazos en los momentos de alegría. Gracias por sus charlas sinceras y las incontables risas.

Nomenclatura en orden alfabético

AAV9: Vector adenoasociado serotipo 9

AC: Anhidrasa carbónica

Ad: Adenovirus

aL3: anti loop 3

aL4: anti loop 4

Ald: Aldosterona

Ang II: Angiotensina II

ANP: Péptido natriurético auricular

APD₅₀: Duración del potencial de acción al 50% de la repolarización

APD₉₀: Duración del potencial de acción al 90% de la repolarización

BNP: Péptido natriurético cerebral

CMNR: Cardiomiocitos neonatales de rata

DPA: Duración de potencial de acción

ECG: Electrocardiograma

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GFP: Proteína fluorescente verde

GPER: Receptor de estrógenos acoplado a proteína G

HC: Hipertrofia cardíaca

IMVI: Índice de masa ventricular izquierda

I_{NBC}: Corriente de NBCe1

IRBIT: Proteína de unión al receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃R) liberada por IP₃

ITRs: Repeticiones terminales invertidas

KO: *Knockout*

MCM: Complejo de mantenimiento de minimicrosomas

MVI: Masa ventricular izquierda

NBCe1: Cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ electrogénico

NBCn1: Cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ electroneutro

NCX: Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

NHE1: Intercambiador Na^+/H^+

ORF: Marco de lectura abierto

PAC: Potencial de acción cardíaco

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular

pH_i: pH intracelular

PMR: Potencial de membrana en reposo

QTc: Intervalo QT corregido por frecuencia cardíaca

rAAV: Vector adenoasociado recombinante

SHR: Ratas espontáneamente hipertensas

TLR: Receptor de tipo toll

Vs.: Versus

INTRODUCCIÓN

1.1. Regulación del pH_i en el miocito cardíaco

La regulación eficaz del pH intracelular (pH_i) es de vital importancia para todos los procesos bioquímicos y fisiológicos, puesto que la estructura y función de prácticamente todas las proteínas se ve afectada por el pH . Un descenso del pH_i por debajo de 7.2 genera una acidosis que puede impactar de forma perjudicial en las funciones del miocito cardíaco afectando principalmente la respuesta contráctil^{1; 2}, dado que disminuye la afinidad de las proteínas contráctiles por el Ca^{2+} , y la actividad eléctrica, que puede verse reflejado en la aparición de arritmias³. Las células cardíacas cuentan con varios transportadores ácido-base que posibilitan ejercer un control adecuado del pH_i (Figura 1). Existen tres mecanismos acidificantes: los intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ o AE^4 (anion exchanger, por sus siglas en inglés) y Cl^-/OH^- o CHE^5 , que ingresan un Cl^- por cada HCO_3^- u OH^- respectivamente y el SLC26a6^6 , que intercambia Cl^- con HCO_3^- u OH^- , pero también con iones sulfato y oxalacetato. Al mismo tiempo, se conocen dos mecanismos alcalinizantes: el intercambiador Na^+/H^+ o $\text{NHE1}^{7; 8}$, que cataliza el influjo de un Na^+ por cada H^+ que extrae del espacio citosólico, y el cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ o $\text{NBC}^9;10$, que impulsa el co-influjo de un Na^+ por una o dos moléculas de HCO_3^- ¹¹.

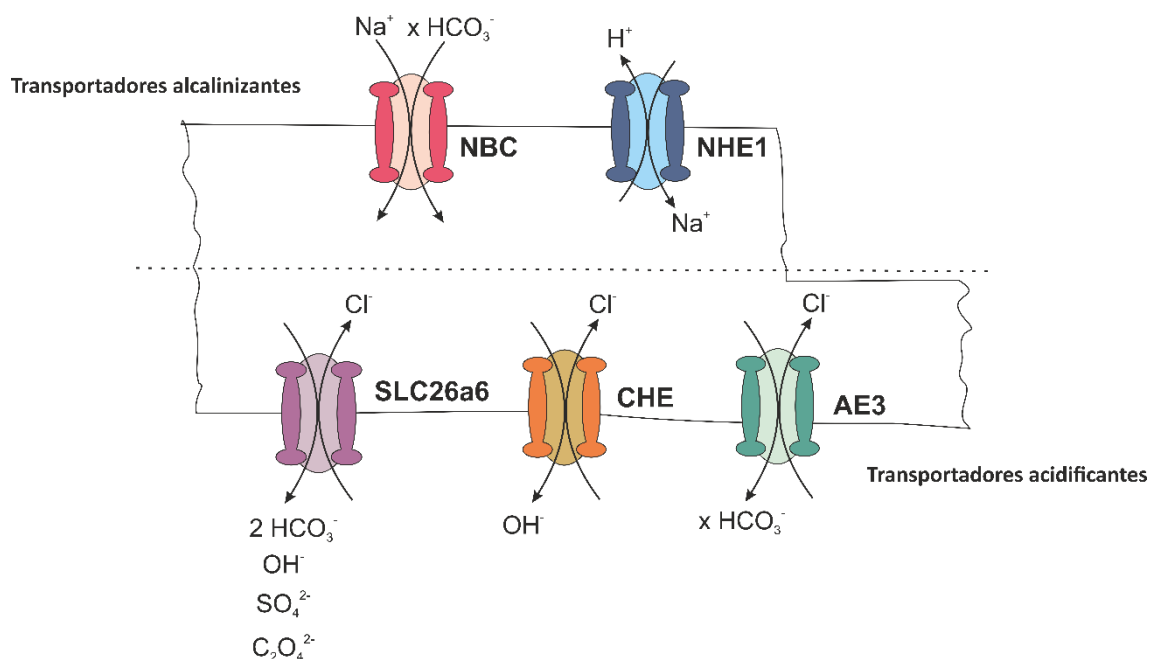


Figura 1. Esquema de los principales mecanismos reguladores del pH_i en un miocito cardíaco: dos mecanismos alcalinizantes (NBC y NHE1), que aumentan el pH_i cuando este disminuye por debajo del

fisiológico, y tres mecanismos acidificantes (AE3, CHE y SLC26a6) que disminuyen el pH_i cuando está por encima del normal.

El NBC es un producto de la familia de genes *SLC4* (*solute carrier bicarbonate transport*), que también incluye a los intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE, NDCBE, SLC4A9) y el SLC4A11, que transporta $\text{H}_2\text{O}-\text{H}^+/\text{OH}^-$, pero no HCO_3^- . En mamíferos, existen 10 genes de la familia SLC4 distintos que comparten homología en la secuencia proteica y se agrupan de acuerdo a sus propiedades funcionales (Figura 2). Todos los miembros de esta familia presentan la misma topología: 1) un gran N terminal citoplasmático (Nt) que abarca cerca del 40% de la proteína; 2) un gran dominio transmembrana grande (TMD) que consta de 10 a 14 segmentos transmembrana (TM) y que abarca el 50% de la proteína, y 3) un corto C terminal citoplasmático (Ct) que abarca al 10% de la proteína.

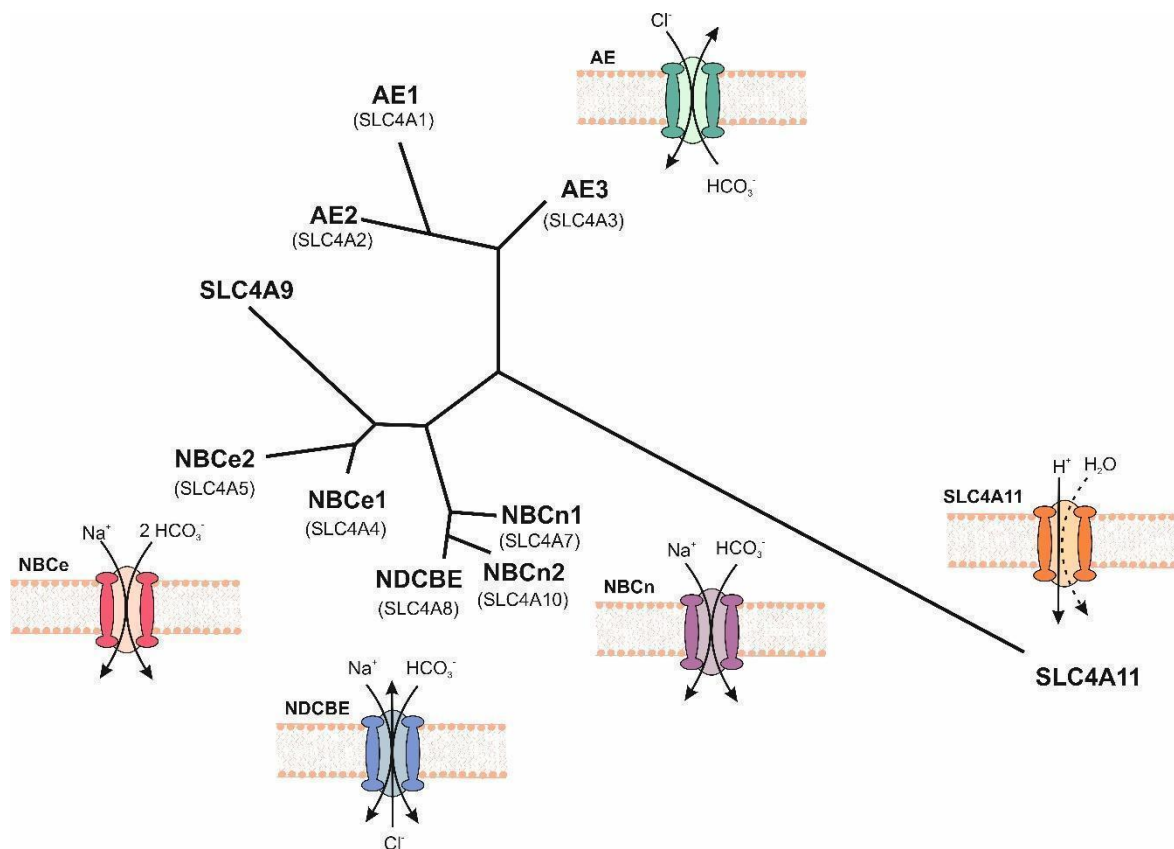


Figura 2. Esquema de la familia SCL4 de transportadores ácido-base. Dendrograma que grafica la similitud de secuencia proteica, tomando al humano como especie (basado en la herramienta web <http://www.phylogeny.fr/index.cgi>). Las mismas secuencias tienen una similitud del 82-98% con sus ortólogos en murinos (de acuerdo con <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

1.2. Cotransportador sodio bicarbonato (NBC)

El NBC se encuentra expresado de manera ubicua por su función principal como regulador del pH_i . En tejidos como corazón, cerebro, endotelio y músculo liso vascular el NBC actúa como transportador alcalinizante manteniendo la homeostasis celular. Asimismo, en tejidos como riñón, intestino y páncreas, el NBC contribuye al movimiento transcelular de HCO_3^- y por lo tanto a la secreción y excreción de ácidos y bases.

Como puede observarse en la figura 2, existen varias isoformas del NBC, que pueden clasificarse como electrogénicas o electroneutras según transporten o no cargas netas. En el miocito cardíaco se encuentran sólo dos de ellas: una electroneutra o NBCn1, de estequiometría $1Na^+/1HCO_3^-$ y una electrogénica o NBCe1, de estequiometría $1Na^+/2HCO_3^-$ ¹¹. Ambas isoformas contribuyen de manera equivalente a la regulación de pH_i en condiciones fisiológicas¹². A pesar de que se identificó también la presencia del NBCe2 en miocitos de humano¹³, no se logró demostrar la existencia del ARNm correspondiente a otra isoforma electrogénica del NBC en corazón de rata¹⁴.

Dentro del miocito cardíaco, podemos encontrar al NBCe1 y al NBCn1 expresados a lo largo de la membrana sarcolemal, mayoritariamente en los túbulos-t^{15; 16}, mientras que el NHE1 se encuentra ubicado en los discos intercalares¹⁶ (Figura 3). Cuando el ion HCO_3^- no se encuentra presente, el único mecanismo activo alcalinizante es el NHE1. Bajo condiciones fisiológicas, es decir en presencia de HCO_3^- , la contribución del NBC es del 40-50%¹⁷. En contraste, a medida que el pH basal disminuye, el NHE1 adquiere mayor relevancia¹¹. Si analizamos la contribución diferencial para cada isoforma del NBC en el cardiomiocito, podemos concluir además que la misma es equivalente para la regulación del pH_i ^{12; 18}.

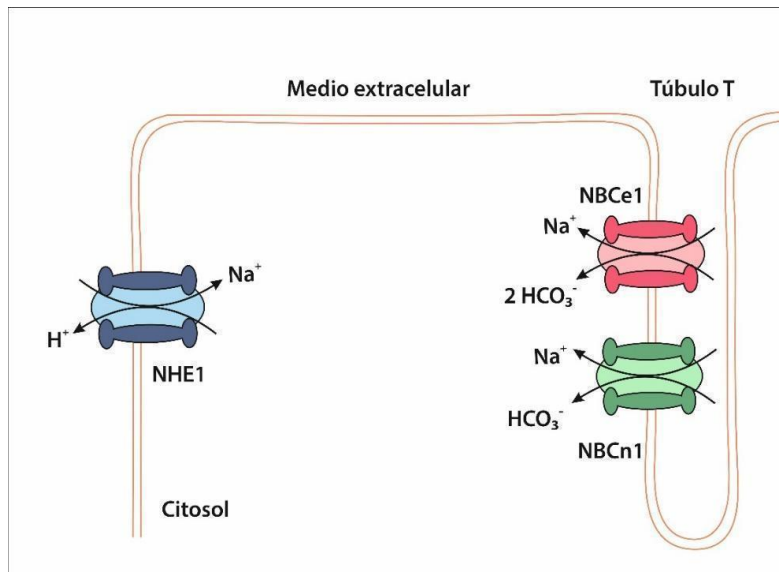


Figura 3. Esquema de la organización de los transportadores alcalinizantes de membrana en un miocito cardíaco.

1.2.2. Cotransportador sodio/bicarbonato electrogénico (NBCe1)

El cotransportador NBCe1 es una glicoproteína de membrana de 1035 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 130 kDa. Posee 13 segmentos transmembrana¹⁹ y 2 bucles extracelulares: un gran bucle glicosilado entre los segmentos transmembrana 5 y 6, el loop 3, y un bucle más pequeño entre los segmentos 7 y 8, el loop 4. A ambos se les han atribuido propiedades regulatorias²⁰.

Recientemente se ha descrito la estructura 3D del NBCe1 humano a través de criomicroscopía electrónica (Figura 4). Este análisis confirmó que se encuentra en solución como un homodímero. Además, se identificó un número pequeño de residuos ubicados en el sitio de coordinación del ion cuya modificación es capaz de transformar al NBCe1 en un AE. Estos datos sugieren que cotransportadores e intercambiadores utilizan una maquinaria de transporte similar, y que sutiles cambios en su región de unión al sustrato pueden tener efectos significativos en su modo de transporte²¹.

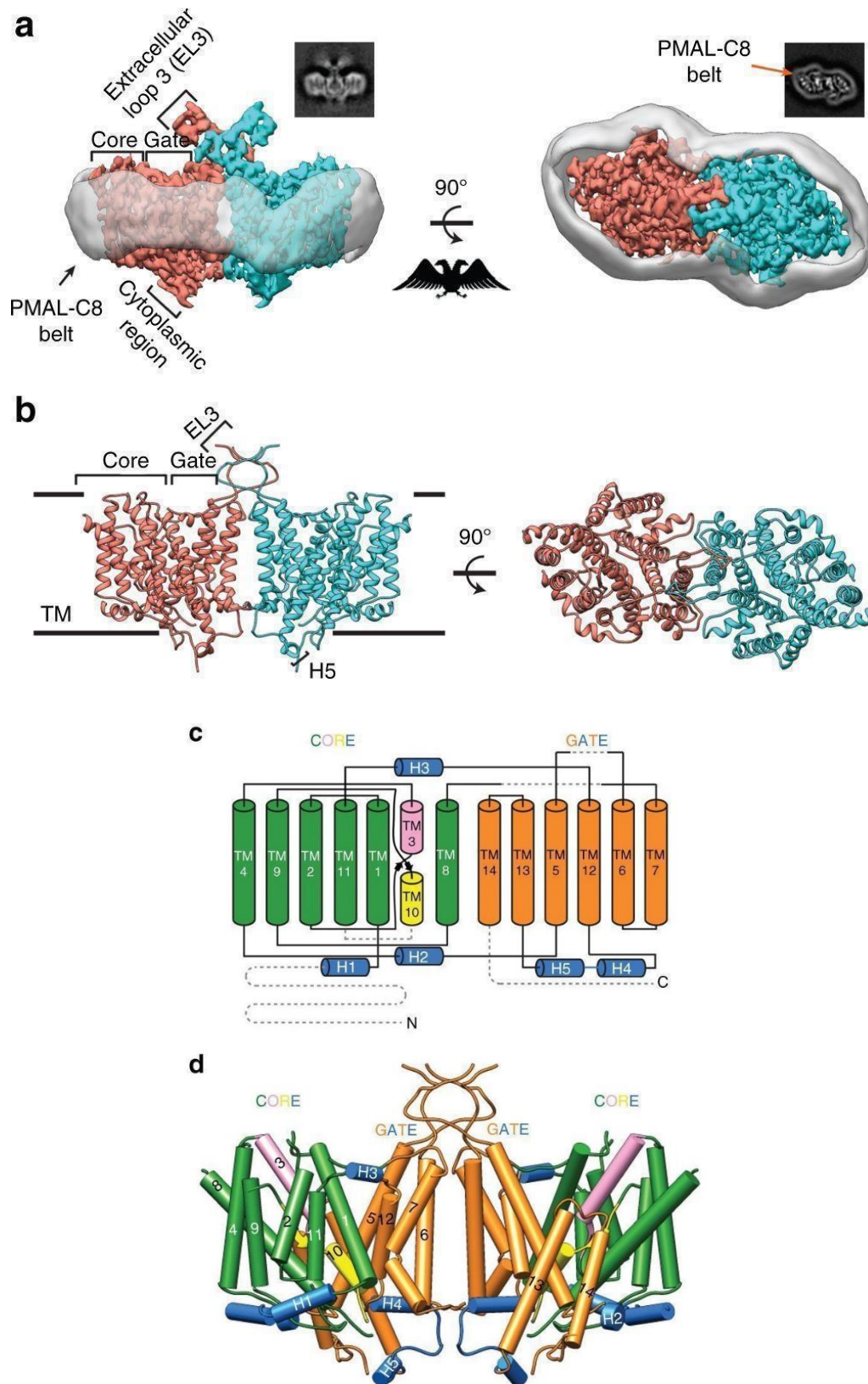


Figura 4. Tomada de *Huynh et al*, reconstrucción del NBCe1 humano a partir de microscopía crioelectrónica. **A.** Vista de costado (izquierda) y desde arriba (derecha) del dímero de NBCe1, cada monómero se muestra con un color diferente. **B.** Modelo de Cintas del dímero NBCe1 en vista de costado y desde arriba. **C.** Topología del NBCe1. Los segmentos transmembrana (TMs) 1, 2, 4, 8, 9, 11

(cilindros verdes) junto con TM3 (rosa) and TM10 (amarillo) pertenecen al dominio central, mientras que los TMs 5, 6, 7, 12, 13 y 14 (cilindros naranjas) forman el dominio de entrada. Las hélices 1–5 (H1–5) se muestran en azul. Las líneas punteadas en gris representan las regiones no modeladas. **D.** el modelo tridimensional (3D) del dímero NBCe1.

1.2.2.1. Corriente

En trabajos previos de nuestro laboratorio hemos determinado la influencia del NBCe1 en la configuración del potencial de acción cardíaco (PAC) de ventrículos de rata y gato^{22; 23}. El cotransportador es responsable de una corriente repolarizante aniónica dependiente de sodio y bicarbonato que produce un acortamiento del PAC de aproximadamente el 25% cuando se cambia la solución de HEPES a Bicarbonato. Asimismo, este cambio de soluciones hace que se hiperpolarice el potencial de membrana en reposo de 3-5 mV. Esta corriente (I_{NBC}) tiene un potencial de inversión de -95mV en miocitos de rata²² y su descubrimiento sugiere que el NBCe1 tiene implicancias no sólo en la regulación del pH_i , sino en la electrofisiología del miocito cardíaco.

La prolongación del PAC está asociada como iniciadora²⁴ o bien como consecuencia de una hipertrofia cardíaca y de eventos arritmogénicos²⁵. La corriente *outward* mediada por el NBCe1, que en condiciones normales acortaría el PAC, podría representar una protección para los miocitos.

1.2.2.2. Variantes de *splicing*

El gen SLC4A4 codifica tres variantes conocidas de corte y empalme del NBCe1 que difieren entre sí en sus extremos Nt y Ct. El NBCe1-A contiene un Nt distinto del NBCe1-B/C y el NBCe1-C presenta un dominio Ct distinto al NBCe1-A/B (Figura 5). NBCe1-A se encuentra predominantemente expresado en el túbulo contorneado proximal del riñón²⁶, localizado en la membrana basolateral donde propicia el eflujo de HCO_3^- a los capilares peritubulares. Por el contrario, el NBCe1-B se encuentra ampliamente distribuido en el cuerpo, estudiado especialmente en páncreas²⁷ y corazón²⁸. El NBCe1-C se encuentra únicamente expresado en el sistema nervioso, particularmente en astrocitos²⁹.

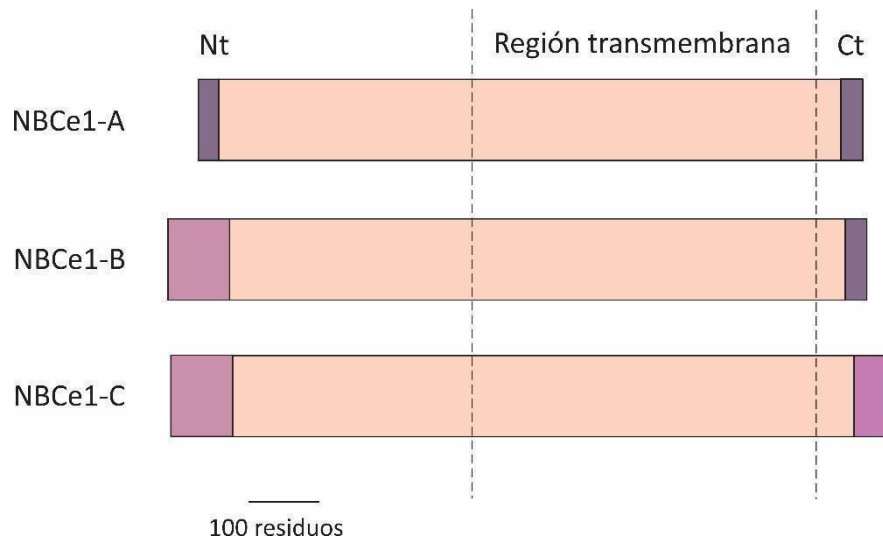


Figura 5. Representación de la homología estructural de las variantes de *splicing* del NBCe1.

1.2.2.3. Estequiometría

Gross *et al.* reportaron que la estequiometría del NBCe1 es dependiente del tipo celular³⁰. Consecuentemente, existen trabajos que postulan una estequiometría 1:3, tanto para NBCe1-A como NBCe1-B, cuando se expresan en una línea celular de túbulos renales³⁰, mientras que trabajos previos de nuestro laboratorio indican una estequiometría de 1:2 en miocitos ventriculares de gato y rata^{22; 23}. Además, también se reportó que la estequiometría varía según los niveles de calcio citosólicos: a 100nM se encontró una estequiometría 1:2 y al aumentar a 500nM cambió a 1:3³¹.

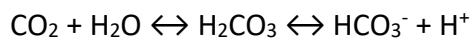
Como consecuencia de su estequiometría, el NBCe1 cardíaco contribuye con la mitad de Na^+ por HCO_3^- que ingresa a la célula, regulando el pH_i con mayor eficiencia que su contraparte electroneutra (NBCn1).

Se identificaron varias mutaciones en el gen *SLC4A4* humano en pacientes con acidosis tubular proximal renal, defectos visuales y auditivos y dentición anormal³²⁻³⁴. Al existir un alto grado de homología proteica (~97%) entre humanos y murinos, es natural que los fenotipos se condigan con los hallados en los modelos de ratones *knock out* para el gen *SLC4A4*^{35; 36} o ratones *knock in* con una mutación puntual³⁷. Varios estudios postulan que algunas de estas mutaciones resultan en pérdida de la actividad de NBCe1 debida a un tráfico de membrana afectado^{38; 39}.

1.2.2.4. Regulación

Anhidrasa carbónica (AC)

Las anhidrasas carbónicas (ACs) son una familia de metaloenzimas que participan en procesos biológicos esenciales como la respiración, la regulación del pH plasmático y el transporte de bicarbonato⁴⁰. Participan en la siguiente reacción, catalizando la generación de H₂CO₃, que se disocia espontáneamente en HCO₃⁻ y H⁺:



Las células cardíacas expresan al menos 5 isoformas: AC VB y AC VA⁴¹, de localización mitocondrial, AC II⁴² localizada en el citosol y AC IX, AC XII y AC XIV⁴³, cuyos dominios catalíticos son extracelulares y se encuentran asociadas a la membrana plasmática.

Las ACs están involucradas en el movimiento de HCO₃⁻, participando acopladas a sistemas de transporte de HCO₃⁻. En este sentido, se ha demostrado que al coexpresar AC I, AC II o AC III con NBCe1 en ovocitos de *Xenopus* se genera un complejo funcional entre las mismas⁴⁴. Además, se ha estudiado la asociación de la isoforma citosólica AC II con el NBCe1 en sistemas heterólogos⁴⁵. Teniendo en cuenta estos antecedentes y sabiendo que la isoforma extracelular IX de la AC presenta una expresión característica en los túbulos-t del músculo cardíaco⁴⁶ y esquelético⁴⁷, y que además coincide con el patrón de expresión del NBCe1 en miocitos aislados¹⁶, nuestro grupo de trabajo demostró en trabajos previos que existe una interacción física y funcional entre el NBCe1 y la AC IX a través del bucle extracelular 4, localizado entre los dominios transmembrana 7 y 8, que permite optimizar la regulación de pH_i en la célula cardíaca. Estas proteínas actúan en conjunto conforman un metabolón que por un lado y por acción de la AC IX incrementa la concentración de HCO₃⁻ en las proximidades del NBCe1, favoreciendo su fuerza impulsora y el transporte de HCO₃⁻ al interior celular y, por otro lado, la actividad de la AC II y su interacción con el dominio Ct del NBCe1 aumentan el eflujo de HCO₃⁻ fuera de la célula, disipando el incremento de este ion. De esta forma, las AC mantienen activo al NBCe1 en la célula cardíaca a través del suministro constante de HCO₃⁻⁴⁷.

La importancia moduladora de los bucles extracelulares 3 y 4 ya ha sido documentada con anterioridad por nuestro laboratorio, que ha desarrollado anticuerpos policlonales específicos contra estas regiones y ha demostrado la acción inhibitoria de la actividad del NBCe1 por el anticuerpo anti-Loop3 (aL3) y, en contraste, la acción estimuladora del anti-Loop4 (aL4)¹².

Por último, es de interés destacar que la inhibición de las ACs es capaz de prevenir y revertir la hipertrofia cardíaca en modelos murinos⁴². Si bien se atribuye estos resultados a la disminución de la actividad del NHE1, regulado por la AC II⁴⁸, también sería pertinente considerar la contribución del NBCe1 en este remodelado beneficioso.

IRBIT y las vías WNK/SPAK y PP1

La proteína de unión al receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃R) liberada por IP₃, o IRBIT por sus siglas en inglés, se expresa abundantemente en varios tejidos⁴⁹. IRBIT se une al dominio Nt de receptores IP₃ en estado de reposo para inhibir su actividad. Por el contrario, esta interacción IRBIT-IP₃R es inhibida por concentraciones fisiológicas de IP₃. Cuando se encuentra activa la cascada de señalización dependiente de un receptor acoplado a proteína G que genera la liberación de IP₃ por escisión de los fosfolípidos de membrana PIP₂ a través de la fosfolipasa 2, IRBIT se separa de IP₃R⁵⁰.

Mikoshiba *et al* realizaron un *screening* de las proteínas de unión a IRBIT a través de coinmuniprecipitación de extractos de cerebelo murino e identificaron al NBCe1 como una de ellas⁵¹. Se sabe que IRBIT se une específicamente a la región Nt de la variante NBCe1-B/C y no a NBCe1-A, cuya región Nt es diferente. En concordancia, estudios electrofisiológicos en ovocitos de *Xenopus* revelaron que IRBIT aumenta la actividad de NBCe1 aproximadamente siete veces⁵¹. Además, IRBIT también incrementa la actividad del NBCe1-B en células del ducto pancreático de ratón⁵². Mutaciones en Ser68, Ser71, Ser74 o Ser77 en la región rica en serina de IRBIT imposibilitan las interacciones con NBCe1 y su posterior activación, por lo que las fosforilaciones de estas serinas se consideran esenciales para el efecto estimulatorio^{51; 52}.

El NBCe1 contiene un dominio auto-inhibitorio (DAI) en su región Nt que suprime la actividad basal del cotransportador⁵³. Existe evidencia que indica que este DAI se haya solapado con el sitio de unión a IRBIT. Por lo tanto, el mecanismo de acción de IRBIT para activar NBCe1 podría ser el bloqueo de este dominio y la posterior eliminación de su auto-inhibición⁵⁴. Es de interés destacar que además de la activación directa del NBCe1, IRBIT también regula su expresión en la membrana celular (Figura 6). La internalización del NBCe1 está regulada a través de las vías de las quinasas WNK (*with-no-lysine kinase*) y SPAK (*Ste20-related proline alanine-rich kinase*)⁵⁵. La quinasa WNK recluta y fosforila SPAK, que a su vez fosforila al NBCe1 para disminuir su expresión en membrana^{55; 56}. El sitio de fosforilación de SPAK sobre NBCe1 es

sobre la S65 y la T49, en los primeros 85 residuos de la región Nt, que forman parte del DAI⁵⁶. Asimismo, IRBIT recluta PP1 (Proteína fosfatasa 1) vía su sitio de unión con NBCe1. El complejo IRBIT-PP1 desfosforila NBCe1, recuperando su expresión en la superficie celular⁵⁵. En consecuencia, IRBIT regula la actividad del NBCe1 por dos mecanismos complementarios: directamente a través de la supresión de su auto-inhibición y mediante la inhibición de la vía WKN/SPAK para estabilizar su expresión en membrana por desfosforilación dependiente de PP1⁵⁷.

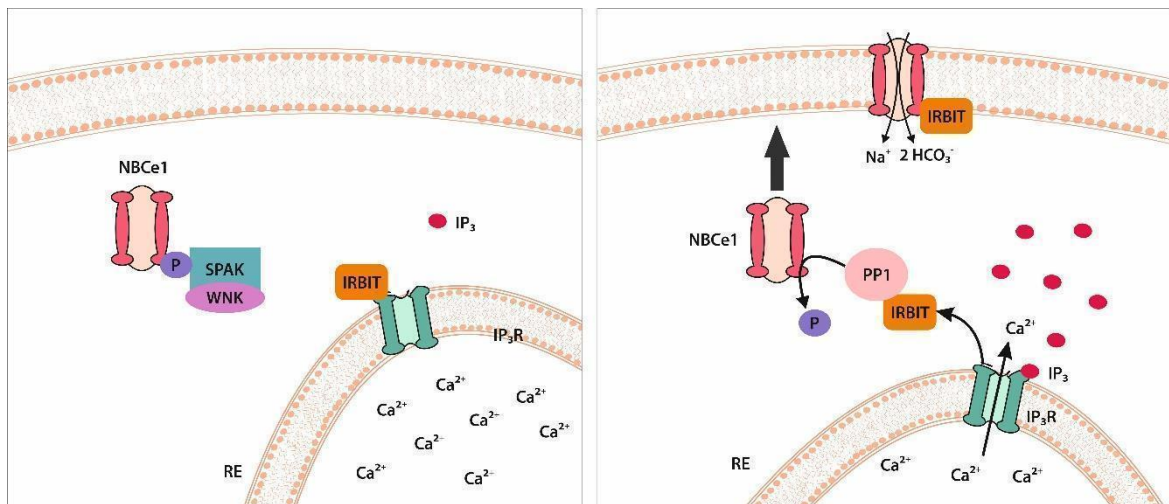


Figura 6. Panel izquierdo: La fosforilación de NBCe1 por la quinasa SPAK lo mantiene secuestrado en vesículas subcelulares. Panel derecho: Activación de NBCe1 dependiente de IRBIT, directa o mediada por la desfosforilación vía PP1.

Una disminución en los niveles de PIP₂ es capaz de inhibir al NBCe1, mientras que la hidrólisis de PIP₂ y el subsiguiente aumento de IP₃/Ca²⁺ se reporta como un activador de las isoformas B y C del NBCe1^{58; 59}. Asimismo, PIP₂ activa al NBCe1-A por mecanismos aún desconocidos⁶⁰.

Ion Cl⁻

El Cl⁻ intracelular (Cl_i) tiene un papel regulador en la absorción y secreción de HCO₃⁻⁶¹ y en la actividad del NBC⁶². En particular, el NBCe1-B cuenta con dos dominios GXXXP de interacción con Cl_i que le permiten detectar una amplia gama de cambios en el mismo. En estado de reposo, a una concentración de Cl_i de entre 20 y 60 mM, el NBCe1-B se encuentra inactivo y opera a aproximadamente el 40% de su actividad máxima. A concentraciones un poco más bajas sólo se obtiene un incremento modesto de su actividad. Por el contrario, a altas concentraciones del orden de 140 mM de Cl_i, se encuentra una inhibición del 60%⁶².

Cuando las células se estimulan con cualquier receptor generador de IP_3 , IRBIT se libera de los receptores de IP_3 y se activa el NBCe1-B. Esto genera que el DAI se revele, y junto con él, el segundo motivo sensor de Cl^-_i , que se encuentra enmascarado en esa región⁶³. Sólo se observa un aumento gradual en la actividad del NBCe1-B cuando la concentración de Cl^-_i disminuye progresivamente desde 20 mM.

Se cree que este mecanismo complejo de afinidad diferencial por el Cl^-_i ha sido desarrollado con un fin de ahorro energético, ya que un aumento acentuado en la actividad del NBCe1-B cuando el Cl^-_i se encuentra a bajas concentraciones activaría la bomba de Na^+/K^+ (a través del influjo de Na^+) y el intercambiador Cl^-/HCO_3^- (a través del influjo de HCO_3^-), lo cual a su vez aumentaría la concentración de Cl^-_i , disminuyendo de esta forma la actividad del NBCe1-B y disminuyendo la utilización de ATP. En consecuencia, una segunda ventaja para este modo de regulación es que las actividades de NBCe1-B y los intercambiadores Cl^-/HCO_3^- tienen una regulación recíproca en un mecanismo de retroalimentación a través del Cl^-_i ⁶².

Angiotensina II

La angiotensina II (ANG II) es un octapéptido generado a partir de la escisión del decapeptido angiotensina I por reacción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), presente en la superficie luminal de los endotelios vasculares de todo el cuerpo y abundante en el endotelio pulmonar. Una reducción del volumen circulante efectivo estimula las células granulares del aparato yuxtglomerular del riñón para que incrementen la síntesis y liberación de renina, que a su vez estimula la producción de ANG II y por tanto de aldosterona, en lo que se conoce como el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Además de actuar como un potente secretagogo de la aldosterona, la ANG II ejerce una potente acción vasoconstrictora sobre el músculo liso vascular.

Es de interés destacar que en el corazón existe producción y secreción local de ANG II⁶⁴. En este sentido, se ha demostrado que la ANG II es capaz de generar hipertrofia cardíaca, por medio de su secreción autocrina en miocitos como respuesta al estiramiento mecánico⁶⁵.

Se ha comprobado que la ANG II estimula la actividad del NBC en miocitos ventriculares de gato⁶⁶ y rata⁶⁷, en una vía dependiente de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de la quinasa ERK $\frac{1}{2}$. Específicamente, se sabe que por unión y activación de su receptor AT1 inhibe a la isoforma electrogénica NBCe1 vía la quinasa p38 y, a su vez, activa a la isoforma electroneutra

NBCn1 a través de un mecanismo dependiente de la quinasa ERK $\frac{1}{2}$ y ROS⁶⁸. Consecuentemente, se ha observado que ANG II inhibe la corriente aniónica generada por el NBCe1⁶⁸.

GPER

El receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER) se identificó inicialmente como un receptor huérfano, por lo que su anterior denominación era GPR30⁶⁹. En el año 2000 se postuló al estrógeno como uno de sus posibles ligandos⁷⁰ y más tarde en el 2011, se descubrió trabajando en células de músculo liso vascular que el GPER también era responsable de los efectos no genómicos de la aldosterona (Ald)⁷¹ que ya habían sido descritos en trabajos previos, pero sin encontrar el efector que los generaba. El GPER se encuentra expresado en todo el sistema cardiovascular, por lo que ha sido descrito tanto en corazón⁷² como en células endoteliales⁷³ y células de músculo liso⁷⁴ vasculares.

Nuestro grupo de trabajo ha contribuido al estudio de los efectos de la activación del GPER en miocitos ventriculares y ha demostrado por primera vez que Ald aumenta de manera aguda la actividad del cotransportador sodio/bicarbonato (NBC) actuando vía GPER y a través de un mecanismo no genómico⁷⁵. Se obtuvo la misma respuesta con el agonista sintético del GPER, G-1 y, por otro lado, en ambos casos el inhibidor sintético del GPER, G-15, fue capaz de bloquear la activación de NBC. Pudimos determinar que la vía de señalización del GPER implica la transactivación del receptor de factor de crecimiento epidérmico o EGFR, que estimula a la NADPH oxidasa (NOS) y a la vía PI3K/AKT. En un estudio posterior y mediante la técnica pulso de K⁺ en células cardíacas aisladas se pudo determinar que la isoforma blanco de la activación del GPER en el corazón es de hecho la electrogénica¹⁵. En el mismo trabajo se determinó que GPER y NBCe1 colocalizan, ubicándose ambos en los túbulos t de la membrana sarcolemal de miocitos ventriculares de rata.

1.2.2.5. Hipertrofia cardíaca y NBCe1

En el tejido cardíaco podemos encontrar dos tipos de hipertrofia: patológica y fisiológica. Inicialmente se generan como una respuesta adaptativa a estímulos patológicos o fisiológicos pero en cada caso se activan distintas vías de señalización celulares.

La hipertrofia cardíaca (HC) patológica se caracteriza por el engrosamiento de la pared del ventrículo izquierdo y es inicialmente la respuesta compensatoria a un incremento sostenido

de la presión arterial o a una injuria cardíaca, como un infarto de miocardio⁷⁶. Esta hipertrofia puede convertirse en maladaptativa cuando existe una pérdida de la función cardíaca y está acompañada de fibrosis, muerte celular, desregulación de las proteínas que se encargan del manejo del Ca^{2+} , disfunción mitocondrial, reprogramación metabólica para la utilización de glucosa, reactivación de la expresión de genes fetales, como ANP y BNP, alteración en la estructura sarcolemal y angiogénesis insuficiente. Todas estas características en conjunto favorecen finalmente que ocurra falla cardíaca.

La contribución del NHE1 en la hipertrofia patológica está muy estudiada. Se encontró que su hiperactivación genera hipertrofia ventricular izquierda^{77; 78}. Además, se ha probado que tanto la administración de bloqueantes farmacológicos^{79; 80; 81}, como su silenciamiento mediante métodos moleculares son eficientes para revertir la HC^{82; 83}. Se ha postulado que la hiperactividad del NHE1 produce un aumento del Na^+ intracelular, y que este incremento puede llevar a la activación del modo reverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (NCXr)^{84; 85}. Esta sobrecarga de Ca^{2+} es capaz de producir arritmias y activar vías pro-hipertróficas⁸⁶ que involucran la transcripción de genes fetales y el engrosamiento de la pared ventricular⁸⁷.

Se ha observado en un modelo de HC por coartación de la aorta abdominal¹⁴ que existe un aumento de los niveles de ARNm de NBCe1 y NBCn1 en conjunto con un aumento de la actividad de NBC total. Además, el tratamiento con el antagonista de los receptores AT_1 de Ang II, losartán, previno este incremento en la expresión de ambos cotransportadores.

Las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) tienen una predisposición genética al desarrollo de hipertensión sin etiología específica⁸⁸, por lo cual constituyen un buen modelo de HC. En estudios previos del laboratorio se encontró en estas ratas un aumento en la expresión y en la actividad del NBCn1. El NBCe1 se encontraba sobreexpresado en comparación con las ratas Wistar normotróficas pero su actividad estaba disminuida. Un abordaje más exhaustivo del modelo permitió dilucidar que esta reducción de la actividad se debía a que el NBCe1 se encontraba secuestrado en vesículas intracelulares y por lo tanto no estaba disponible para actuar a nivel de la membrana⁸⁹. Asimismo y en línea con la participación de ANG II como parte del SRAA que se encuentra sobre-activado en estas ratas, se descubrió que en presencia de losartán se revierte este patrón de localización. Debido a la falta de inhibidores específicos, no fuimos capaces de demostrar si este remodelado funcional es causa o consecuencia del desarrollo de hipertrofia cardíaca.

La hipertrofia cardíaca fisiológica implica generalmente una mejora en la función cardíaca debida al entrenamiento aeróbico sostenido en el tiempo. A diferencia de la hipertrofia patológica, puede ser reversible. Asimismo, se caracteriza por favorecer vías de supervivencia y regeneración celular y el aumento de la producción energética, por lo que puede estar implicado un incremento en la angiogénesis y en la actividad de los sistemas antioxidantes para mantener una eficiente función mitocondrial.

Se ha descrito que existe una hiperactivación y una sobreexpresión del NBCe1 en ratones en un modelo de hipertrofia cardíaca fisiológica generada por el entrenamiento voluntario en rueda⁹⁰. En concordancia, también se encontró que estos ratones entrenados tenían un potencial de acción cardíaco significativamente más corto.

Resulta relevante mencionar que en un estudio de entrenamiento aeróbico a intervalos de alta intensidad en hombres se descubrió que existe un aumento en la expresión del NBCe1 en biopsias musculares luego de un mes de entrenamiento⁹¹.

1.2.1. Cotransportador sodio/bicarbonato electroneutro (NBCn1)

El cotransportador NBCn1 humano, correspondiente al gen *SLC4A7*, consta de 1214 aminoácidos. Fue clonado por primera vez a partir de aorta de rata⁹² y músculo esquelético humano⁹³. Ambas isoformas del NBC, NBCn1 y NBCe1, tienen una homología en su secuencia de aminoácidos del 57% y la estructura predicha para el primero es similar a la que se conoce del segundo. Este cotransportador ingresa Na⁺ y HCO₃⁻ en las células operando con una estequiometría de 1:1, por lo que el movimiento de cargas ocurre sin cambios netos en el potencial de membrana, lo cual le valió la denominación de electroneutro.

1.2.1.1 Variantes de *splicing*

Se conocen 18 variantes debido a la existencia de promotores alternativos y eventos de corte y empalme en sus sitios Nt y Ct, desde NBCn1-A a NBCn1-R (Figura 7). Además, el gen *SLC4A7* es capaz de generar dos tipos especiales de variantes que contienen sólo el dominio Nt: NBCn1-e/g y NBCn1-c/h⁹⁴. Para simplificar su estudio, se agrupan las regiones variables de los dominios terminales en cuatro casetes: I, II y IV en el Nt y III en el Ct. Así es que cada variante funcional contiene uno o dos Nt alternativos con el mismo Ct e incluye o excluye estos casetes previamente definidos⁹⁴. El casete II es el que se encuentra predominantemente en músculo liso, esquelético y cardíaco⁹⁵. Desde el punto de vista experimental, estas numerosas regiones variables complican el mapeo de la expresión proteica del NBCn1. La mayoría de los anticuerpos desarrollados tienen como blanco a sus dominios citoplasmáticos y aquellos que reconocen el Nt, sólo serán eficientes para detectar algunas de las variantes de corte y empalme.

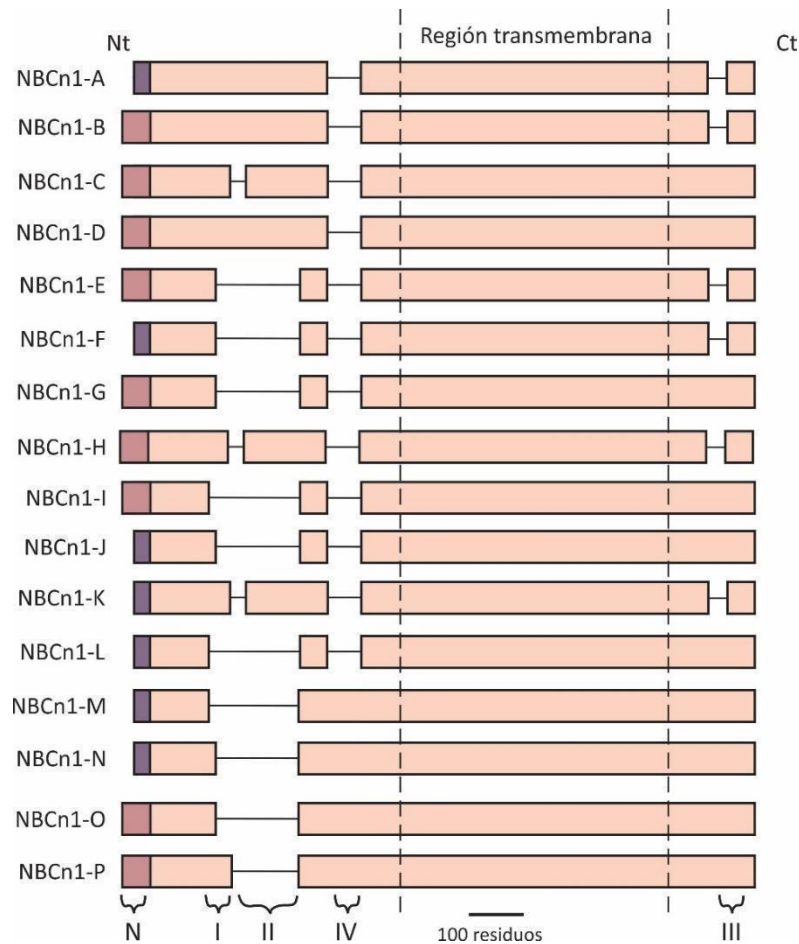


Figura 7. Representación de la homología estructural de las variantes de *splicing* del NBCn1. Estas variantes son idénticas salvo por un conjunto de cambios que pueden tener en el Nt (N), en un casete de 13 residuos en la región citoplasmática del Nt (I), un casete de 123 residuos (en rata o ratón) o de 124 residuos (en humanos) en la región citoplasmática Nt (II), un casete de 20 residuos en la región citoplasmática Nt (IV) y un casete de 36 residuos en la región citoplasmática Ct.

Funciones

El NBCn1 se encuentra ampliamente expresado en todo el cuerpo, lo cual le confiere un gran abanico de funcionalidades. En la mayoría de los tejidos epiteliales se localiza en la membrana basolateral⁹⁶⁻⁹⁸, donde incrementa las concentraciones de HCO_3^- intracelular colaborando con la secreción del mismo por la membrana apical por medio de otros mecanismos dependientes de HCO_3^- . Asimismo, en ductos pancreáticos⁹⁹ y glándulas salivares⁹⁸ se encuentra también en la membrana apical, donde actúa en conjunto con el canal de cloruro CFTR y propicia la acumulación de HCO_3^- .

Otra de las funciones principales del NBCn1 es la que ejerce en las células del asa ascendente de Henle y las células intercalares del túbulo colector renal, donde tiene localización basolateral¹⁰⁰. Considerando la dirección del transporte, el rol del NBCn1 en estos segmentos de la nefrona no debería estar asociado a la reabsorción de HCO_3^- , sino que compensaría con su actividad la sobrecarga de H^+ generada durante el transporte transcelular de $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ¹⁰¹, llevada a cabo también por el NHE4¹⁰². El transporte de NH_4^+ y su disociación a NH_3 y H^+ se ven aumentados significativamente durante la acidosis metabólica debido al incremento en la amoniogénesis. En sintonía con esto, se descubrió que la actividad y expresión del NBCn1 se encuentran incrementados en ratas alimentadas con una dieta baja en K^+ ¹⁰³ o tratadas con NH_4^+ en el agua de bebida¹⁰⁴, ambos mecanismos para incrementar el transporte de NH_4^+ al asa ascendente de Henle.

Los ratones knock-out (KO) para el NBCn1 y los datos genómicos recabados son herramientas útiles para identificar la función del NBCn1 en cada tejido. Se sabe que este transportador juega un papel importante en la percepción somato-sensorial, ya que los ratones KO exhiben ceguera y pérdida de la audición^{105; 106}.

Existe también un gran número de polimorfismos de nucleótido único (SNPs, por sus siglas en inglés) en el gen *SLC4A7* que se asocian con una mayor susceptibilidad al cáncer de mama en varias poblaciones¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Estas asociaciones son complejas, pero está claro que la expresión del NBCn1 generalmente promueve la supervivencia tumoral por acelerar la extrusión de ácido^{110; 111}, proceso también facilitado por el NHE1¹¹².

Actividad similar a canales

Se descubrió que el NBCn1 tiene una actividad intrínseca similar a los canales que es mediada por Na^+ y aumenta los niveles intracelulares de Na^+ en células HEK293 y ovocitos de *Xenopus*⁹². Esta actividad no está acoplada al cotransporte de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ y de hecho puede darse en ausencia de HCO_3^- . Asimismo, esta actividad de tipo canal afecta al potencial de membrana en reposo y al movimiento de iones a través de la membrana, lo cual está demostrado en sistemas heterólogos de expresión¹¹³. No está estudiado si esto también podría ocurrir en células *in vivo*.

Otros transportadores ya han demostrado contar con esta actividad de tipo canal. Por ejemplo, transportadores de HCO_3^- como el SLC26A7¹¹⁴ y el SLC26A9¹¹⁵, tienen la capacidad de generar corrientes aniónicas además de su función de intercambiadores.

Autorregulación

En un estudio de expresión en el sistema heterólogo de ovocitos se descubrió que tanto los Nt como los distintos casetes de las variantes tienen una influencia en la expresión de membrana y en la actividad del NBCn1. El Nt puede incrementar la expresión en superficie del NBCn1, pero no tiene efecto en la actividad del cotransportador. Los casetes I, II y III regulan la expresión en membrana por interacción con múltiples casetes. Los casetes II, III y IV modulan la actividad del NBCn1. Entre ellos el más importante parece ser el casete IV, que confiere un aumento de la actividad de 11 veces la actividad basal⁹⁴.

Calcineurina

La calcineurina es una proteína Ser/Thr fosfatasa dependiente de calcio hallada en una gran variedad de células¹¹⁶. La calcineurina interacciona con el casete II del NBCn1, hecho avalado por estudios de *screening* por hibridación en bibliotecas de cADN de músculo esquelético humano¹¹⁷.

Se sabe que la activación de la calmodulina por el aumento de Ca^{2+} intracelular estimula la recuperación por acidosis del NBCn1-B endógeno de células musculares lisas de arterias mesentéricas de rata¹¹⁷. De esta manera, el NBCn1-B sería fisiológicamente importante por la protección que les confiere a las células musculares lisas de una acidosis excesiva en cada contracción arterial. Asimismo, como el casete II está presente en los NBCn1 de células de músculo esquelético, vascular y cardíaco, esta regulación podría ser tejido específica, teniendo un rol protector en estos tejidos.

IRBIT

Como se comentó antes, IRBIT es una molécula de señalización liberada de los receptores de IP_3 cuando aumenta la concentración intracelular de IP_3 ⁴⁹, fundamentalmente debido a la activación de receptores acoplados a proteína Gq. IRBIT es capaz de interactuar con NBCn1-B, logrando estimular su actividad y también la conductancia al Na^+ en ovocitos de *Xenopus*. Asimismo, la co-expresión de IRBIT en células HeLa activa a la variante NBCn1-A. De manera

análoga a lo que se observa para el NBCe1, esta activación sería dependiente de las vías PP1 y WNK/SPAK. Sería esperable encontrar esta regulación en cualquier variante del NBCn1 que comparta los sitios de interacción con IRBIT del NBCe1⁵⁶.

Angiotensina II

Se ha demostrado en miocitos ventriculares aislados de gato⁶⁸ y rata⁶⁷ que la ANGII estimula al NBCn1 luego de la activación de los receptores AT₁ por una vía dependiente de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de la quinasa ERK ½.

1.2.1.2 NBCn1 y su influencia en el tejido vascular

Se estudió la presencia de NBCn1 en endotelio de arterias grandes, como la aorta, en músculo liso vascular y células endoteliales de pequeñas arterias, capilares de tejidos epiteliales, aurículas y ventrículos del corazón y en músculo esquelético¹¹⁸.

En concordancia, se demostró una recuperación de pH_i luego de una acidosis en arterias mesentéricas, coronarias y cerebrales de ratón. Además, en estos tejidos se encontró la presencia de ARNm de NBCn1 como el único transportador de bicarbonato de la familia de genes SLC4¹¹⁹. Utilizando un siRNA específico para el NBCn1 en arterias mesentéricas pequeñas de ratón se determinó la existencia de un pH_i basal menor a comparación de las arterias no carentes de NBCn1. El mismo resultado se encontró en células de músculo liso vascular de estas arterias en solución libre de CO₂/HCO₃⁻.

En estudios posteriores utilizando ratones knock out para el NBCn1 se describió una leve hipertensión sin cambios en la frecuencia cardíaca¹²⁰. Las arterias mesentéricas de estos ratones mostraron una reducida capacidad de relajación mediada por acetilcolina, explicada por una inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), la cual es dependiente del pH_i teniendo una actividad óptima a pH 7,5 (Figura 8). Asimismo, también se demostró la existencia de una reducida sensibilidad al Ca²⁺ en músculo liso vascular. Se planteó que este efecto se da por una inhibición de la vía rho-quinasa estimulada por noradrenalina, la cual también puede verse afectada en un entorno celular más ácido. Debido a que angiotensina II (ANG II) también activa la vía rho-quinasa, estos ratones son resistentes a desarrollar hipertensión por infusión con ANG II.

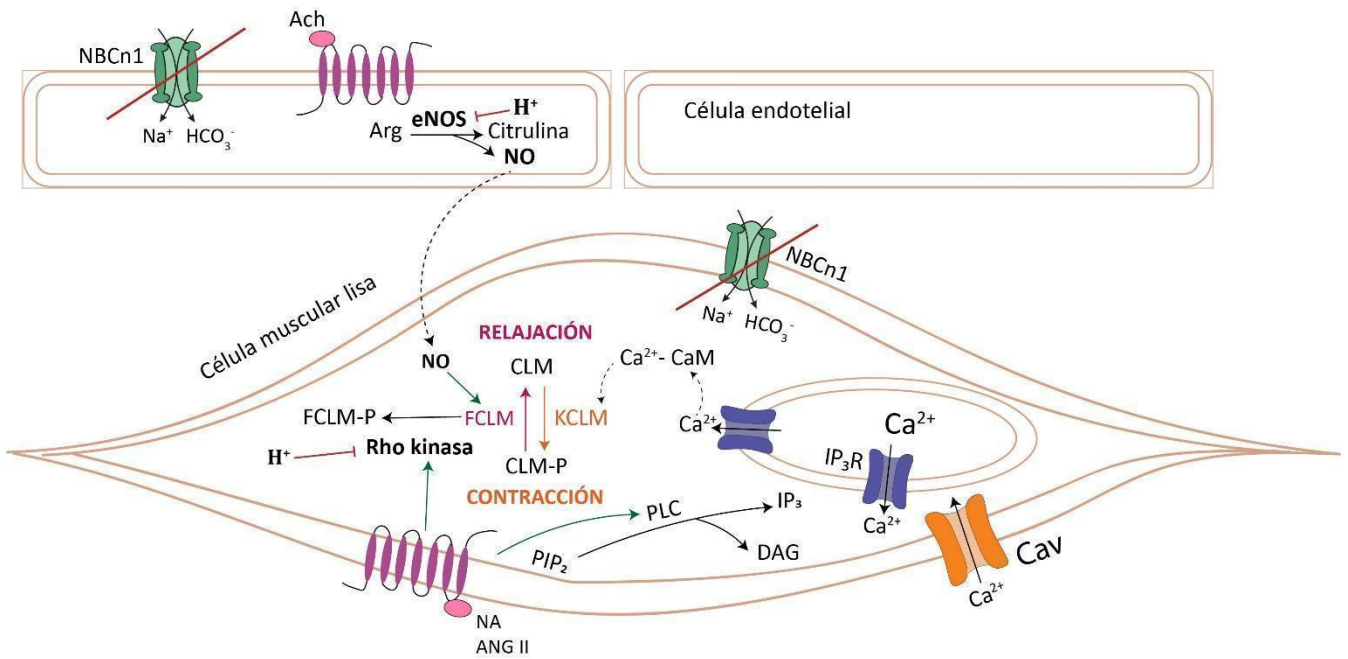


Figura 8. Para que el músculo liso se contraiga es necesario que las cadenas livianas de la miosina estén fosforiladas. Cuando no está presente el NBCn1, el pH basal de los miocitos es menor, inhibiendo enzimas importantes como la eNOS y la Rho kinasa. Ach: Acetilcolina; Arg: arginina; NO: óxido nítrico; CLM: cadena liviana de miosina; CLM-P: cadena liviana de miosina fosforilada (activa); KCLM: kinasa de la cadena liviana de miosina; FCLM: fosfatasa de la cadena liviana de miosina; FCLM-P: fosfatasa de la cadena liviana de miosina fosforilada (inactiva); CaM: calmodulina; PIP₂: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; IP₃: Inositol 1,4,5-tri-fosfato; DAG: diacilglicerol; PLC: fosfolipasa C; IP₃R: Receptor de IP₃; Cav: canal de calcio voltaje operado o de tipo L; NA: noradrenalina; ANG II: Angiotensina II.

En sintonía con lo encontrado en modelos animales, se conoce por el estudio de varios SNPs que se encuentran en las cercanías o dentro del gen *SLC4A7* que la disfunción del NBCn1 está también asociada al desarrollo de hipertensión en humanos^{121; 122}.

1.3 Virus adenoasociado serotipo 9 (AAV9)

Los virus adeno-asociados (AAV) son virus pequeños, que no poseen envoltura y su genoma es de ADN simple hebra, flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (ITRs) de 145 pares de bases (pb) que forman una estructura característica de horquilla en forma de T debido a su naturaleza palindrómica. Los AAV son miembros de la familia *Parvoviridae* descubiertos en 1965 como contaminantes en un aislamiento de Adenovirus (Ad)¹²³. Estos virus son defectuosos en el sentido de que requieren la co-infección con un virus *helper*, como un Ad o herpesvirus, para su completa replicación¹²³. Los AAV poseen amplias ventajas que los hacen vectores virales excelentes para la terapia génica.

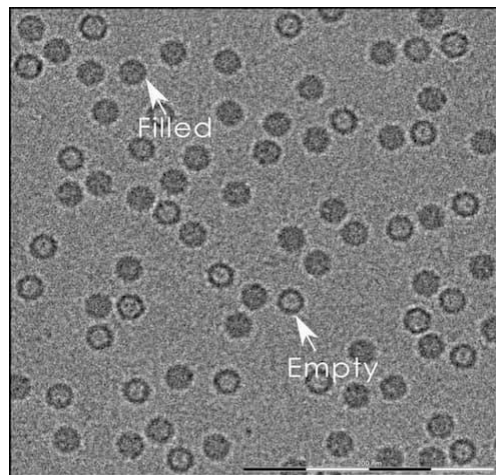


Figura 9. Micrografía electrónica de las partículas virales de AAV. Se observan su forma hexagonal característica y cápsides tanto vacías como llenas con el genoma viral. Tomada de Vironova, proveedor de análisis de AAV.

Genoma viral

El genoma viral consiste en tres marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican para ocho proteínas expresadas a partir de tres promotores^{124; 125}. Los ITRs en forma de T son el origen para la replicación del ADN y funcionan como la señal primaria de empaquetamiento. La cápside está formada por la secuencia aminoacídica de sólo un ORF (*cap*) y el DNA empaquetado. Por estas características, estos vectores son un blanco pobre para la activación del sistema inmunológico del hospedador.

El genoma viral, de aproximadamente 5kb, contiene tres ORFs: *rep* codifica para cuatro proteínas (Rep78, Rep68, Rep52, and Rep40) desde los promotores p5 y p19, con actividades

endonucleasa, ADN helicasa y ATPasa requeridas para la replicación viral^{125; 126} y el empaquetado en la cápside¹²⁷ y *cap* que inicia la transcripción a través del promotor p40 y por *splicing alternativo* genera dos proteínas de la cápside (VP1 y VP3) y una proteína activadora del ensamblado (AAP) (Figura 10). Una tercera proteína de cápside, VP2, se traduce a partir de un codón de iniciación anómalo ACG, ubicado dentro de la secuencia de Kozak. La cápside está compuesta por sólo 60 subunidades de VP1, VP2 y VP3 en una relación 1:1:10. Las dos menos abundantes, VP1 y VP2, contienen la misma secuencia aminoacídica presente en VP3 pero además cuentan con un Nt requerido para la infección y que presenta la señal de localización nuclear¹²⁸ y actividad fosfolipasa A2¹²⁹. AAP facilita la entrada al núcleo de VP3, proteína de cápside mayoritaria, y promueve el ensamblaje y la maduración de la cápside.

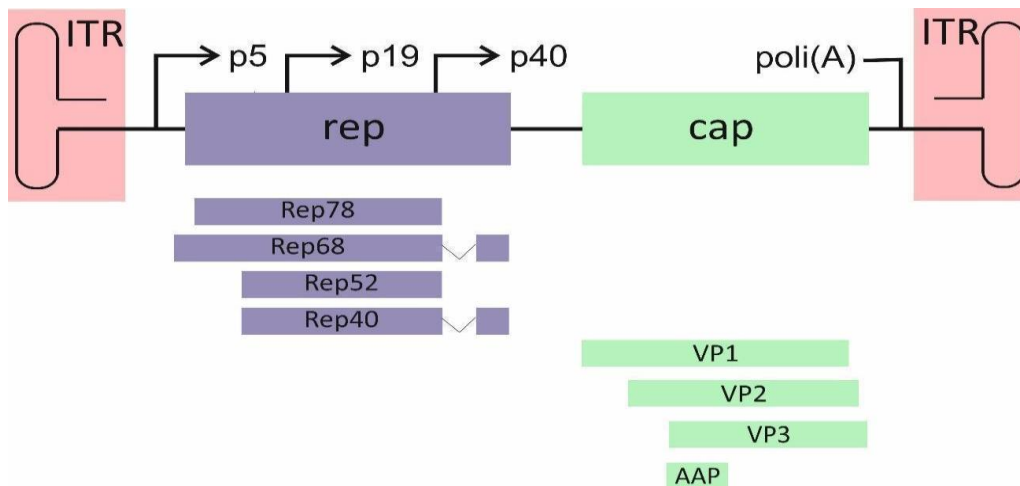


Figura 10. Esquema del mapa genético de un AAV. Se muestran los tres ORFs con sus correspondientes promotores: p5, p19 y p40 y los genes que codifican. La región codificante está rodeada por dos ITRs que forman una estructura palindrómica en forma de T.

Tropismo y serotipos

Actualmente se conocen 13 serotipos virales cada uno de los cuales presenta tropismo para tejidos específicos, hecho que ha sido explicado por las diferencias halladas en los receptores de superficie celular de cada serotipo. Un ejemplo de esto fue el descubrimiento del serotipo AAV6 identificado en 1998¹³⁰, que difiere del serotipo AAV1 en sólo 14 aminoácidos, pero sin embargo tiene distintas propiedades. Asimismo, se cree que el tropismo se ve afectado por la captación celular, el procesamiento intracelular, la llegada al núcleo del genoma de los vectores, la pérdida de la cápside y la síntesis del ADN de simple hebra.

El AAV2 es el serotipo más ampliamente estudiado por lo que la mayoría de la información obtenida sobre estructura, genética y ciclo vital corresponde a este serotipo.

El descubrimiento de que las proteínas de superficie de las cápsides determinan el tropismo se aprovechó para modificar genéticamente las cápsides virales y generar así vectores quiméricos específicos para la transducción eficiente en células de interés. Afortunadamente, la misma construcción con los ITRs del AAV2 puede ser empaquetada en cualquier serotipo de cápside solamente por el intercambio de la región codificante *cap* en el plásmido trans o el virus *helper*.

En la Tabla 1 se resumen los diversos tropismos hallados para cada serotipo, enfatizando sólo en los tejidos en los que la transducción es alta y por lo tanto pueden ser utilizados para aplicaciones clínicas.

Serotipo	Tropismo
AAV1	Corazón, músculo esquelético, SNC, pulmón
AAV2	SNC, músculo esquelético, hígado, músculo liso
AAV3	SNC
AAV4	Corazón, hígado, pulmón
AAV5	SNC
AAV6	Corazón, hígado, pulmón, músculo esquelético
AAV7	Músculo liso, hígado
AAV8	Hígado, Corazón
AAV9	Corazón, hígado, pulmón, músculo esquelético

Tabla 1. Listado de los principales serotipos virales y su correspondiente tropismo.

Así, para corazón se destacan por su afinidad los serotipos AAV1, AAV6 y AAV9¹³¹. Se ha analizado el uso de AAV1 en ensayos clínicos recientes para el tratamiento de la falla cardíaca, puntualmente aumentando la expresión de SERCA2a, una Ca²⁺-ATPasa que se encuentra disminuida en esta enfermedad¹³². A pesar de que se concluyó que los pacientes no mejoraron su sintomatología, no se observaron efectos adversos en ninguno de ellos¹³³. Trabajos recientes postulan una mayor eficacia de infección del AAV6 en células en cultivo, tanto cardiomiocitos neonatales de rata (CMNR) como células cardíacas derivadas de células madre

humanas pluripotentes inducidas (hiPSC-CMs). Por otro lado, el serotipo AAV9 fue el que mejor rendimiento presentó en ensayos *in vivo* en ratas adultas¹³⁴.

Infección

Los AAV ingresan a la célula por medio de la unión a azúcares presentes en proteoglicanos (como ácido siálico, para el caso de serotipos 1 y 6 o galactosa para AAV9) y a receptores celulares de membrana (receptor de factor de crecimiento epidérmico para el AAV6 o receptor de laminina para el AAV9)¹³⁵. Este doble tipo de receptor requerido se observa también frecuentemente para otros tipos de virus. Se internalizan luego por medio de endocitosis, proceso que comienza con la invaginación de zona de la membrana celular que contiene los complejos virus-receptor y termina con la liberación de las nuevas vesículas formadas al interior celular, en un proceso que puede ser dependiente o independiente de clatrina (Figura 11). Una vez dentro, los AAV se pueden localizar en todos los compartimientos subcelulares. Durante las primeras 2 horas post-infección, la mayoría de las partículas virales se acumulan en la zona perinuclear y se cree que es necesario un ambiente endosómico ácido para su transporte al núcleo o la disociación virus-receptor¹³⁵. Una de las hipótesis para este entorno ácido requerido es que se necesita para la extrusión del extremo Nt de la proteína de cápside VP1 a la superficie de la cápside¹²⁸. VP1 tiene actividad fosfolipasa A2, la cual sería importante para la ruptura del endosoma y el escape de las partículas virales al citoplasma¹²⁹ o bien para promover la entrada de la cápside al núcleo¹³⁶. VP1 también posee una señal de localización nuclear. Se desconoce el mecanismo que posibilita a las partículas del AAV el pasaje a través de la membrana nuclear, pero la evidencia presente sugiere que las partículas intactas son translocadas al núcleo antes de liberar el ADN¹³⁷. En el núcleo, el genoma del AAV se convierte en ADN doble cadena. Para el caso de un rAAV (AAV recombinante), la expresión del transgén de interés se logra con la transcripción al ARNm y su posterior traducción proteica.

Luego de la infección, los AAV permanecen latentes en formas integradas o no integradas hasta que un virus *helper* les provee las funciones necesarias para su replicación¹³⁸

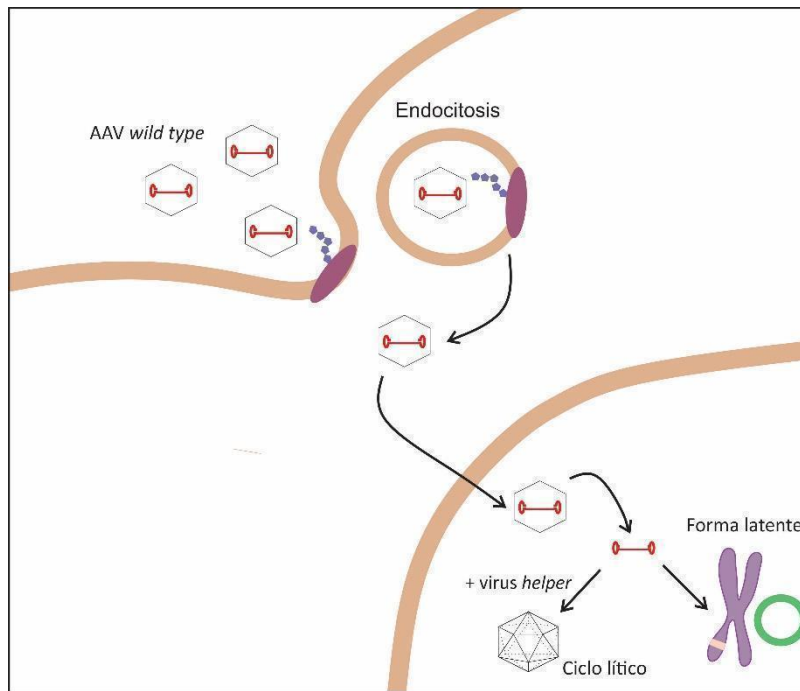


Figura 11. Esquema del ingreso del AAV *wild type* a la célula hospedadora.

Replicación

Los AAV no pueden propagarse por sí mismos, ya que para generar una infección viral necesitan la co-infección con un virus *helper*. Esto les provee una seguridad adicional que impide una proliferación inapropiada para su uso clínico. Se cree que su virus *helper* natural es el adenovirus (Ad) porque se encontró AAV como contaminación frecuente en sus aislamientos¹²³, pero también se sabe que tanto los herpesvirus como los baculovirus^{139; 140} pueden actuar como virus *helper* de los AAV.

Los AAV se replican mediante el mecanismo llamado horquilla rodante y este proceso ha podido ser imitado *in vitro* con los componentes purificados¹⁴¹. La replicación del ADN requiere Rep 78 o Rep 68, el complejo de la ADN polimerasa δ celular, el factor de replicación C (RFC), los antígenos nucleares de proliferación celular (PCNA) y el complejo de mantenimiento de minicromosomas (MCM) celular, que actúa como helicasa. Además, la replicación del ADN del AAV en extractos celulares también requiere una proteína de unión a ADN simple hebra, que pueden ser las proteínas celulares RPA¹⁴² o una codificada por un *helper virus*. El uso de estas enzimas celulares altamente conservadas podría explicar el amplio rango de hospedadores que tienen los AAV. Los rAAV se han utilizado para transducir

exitosamente una variedad de modelos animales entre ellos ratas, ratones, perros, cerdos, conejos, caballos y primates.

Función del virus *helper*

Las funciones de Ad específicas que han sido identificadas como necesarias para la replicación de los AAV son: E1a, E1b55k, E2a, E4 orf6, DBP (DNA *binding protein*) y ARN viral asociado (VA RNA)^{142; 143}. E1a y DBP actúan como activadores transcripcionales que inducen al promotor p5 del AAV por medio de su unión al represor YY1, inactivándolo¹⁴⁴. Esto permite generar la expresión de grandes cantidades de las proteínas Rep68/Rep78. Asimismo, E1a induce la fase S en las células hospedadoras, lo cual aumenta los niveles de ADN de las enzimas de replicación celulares necesarias para la replicación del AAV. De esta forma, la coinfección con Ad y la expresión de E1a actúa principalmente como un activador de la expresión genética del AAV cuando el entorno celular está comprometido a la replicación. Por otro lado, cuando el Ad no está presente, el promotor p5 está reprimido, generando niveles casi indetectables de Rep y manteniendo el genoma del AAV en estado latente. E2a estimula la procesividad de la replicación de los AAV *in vitro* y E1b55k, E4 orf6 y VA RNA promueven la replicación de los AAV y la síntesis de la cadena de ADN de simple hebra.

En la coinfección con herpesvirus se suma la expresión de varias proteínas que se reportan como necesarias para la replicación del AAV: proteínas de unión al ADN simple hebra, UL9 y el complejo de helicasa-primasa UL5/UL8/UL22^{145; 146}. Además, la expresión del complejo de la ADN polimerasa del herpesvirus (UL30/UL42) estimula, pero no es esencial para la replicación del AAV¹⁴⁷. Asimismo, se demostró que para la expresión de los genes *rep* se requieren tres proteínas reguladoras del herpesvirus (ICP0, ICP4, ICP22), las cuales parecen esenciales para la función de *helper* del herpesvirus.

En el caso del baculovirus, no se conocen los elementos virales involucrados en la función de virus *helper* para la propagación de los AAV.

Vectores AAV recombinantes (rAAV)

Cuando comenzaron a describirse estos vectores virales no existía un ensayo estándar de aislamiento de las partículas, debido a que se creía que se necesitaba la presencia de un virus *helper*. Luego se descubrió que podía haber infección de un AAV *wild type* si se transfectaba en células humanas previamente infectadas con adenovirus. Esto permitió borrar algunas

secuencias del virus y sustituirlas con ADN externo. Finalmente se demostró que se podían eliminar todas las regiones codificantes mientras que se mantuvieran los ITRs de 145 pares de bases para asegurar la replicación y empaquetado del genoma del AAV recombinante (rAAV) complementando en trans con plásmidos que expresaran los genes de *rep* y *cap* sin los ITRs para evitar el empaquetado del virus *wild type*.

Entonces, para la producción de un vector viral rAAV se requieren tres componentes principales (Figura 12):

- El genoma del AAV recombinante que contiene el transgén, elementos reguladores (promotor y cola de poli A) y los ITRs.
- Los genes *rep* y *cap* del AAV *wild type*.
- Los genes E2A, E4 y ARN VA del Ad virus *helper*, necesarios para la replicación viral, además de una línea celular que provee la maquinaria básica de biosíntesis. Dentro de las líneas celulares que se utilizan para la producción de los AAV se encuentran las HeLa y las HEK293 (*Human embryonic kidney*), las cuales expresan establemente los genes E1A y E1B del Ad.

Este método de producción de rAAV es ampliamente utilizado por su baja complejidad. Requiere la co-transfección de células HEK293 con tres plásmidos que expresan todas las proteínas necesarias para la replicación y el empaquetado del genoma del transgén de interés.

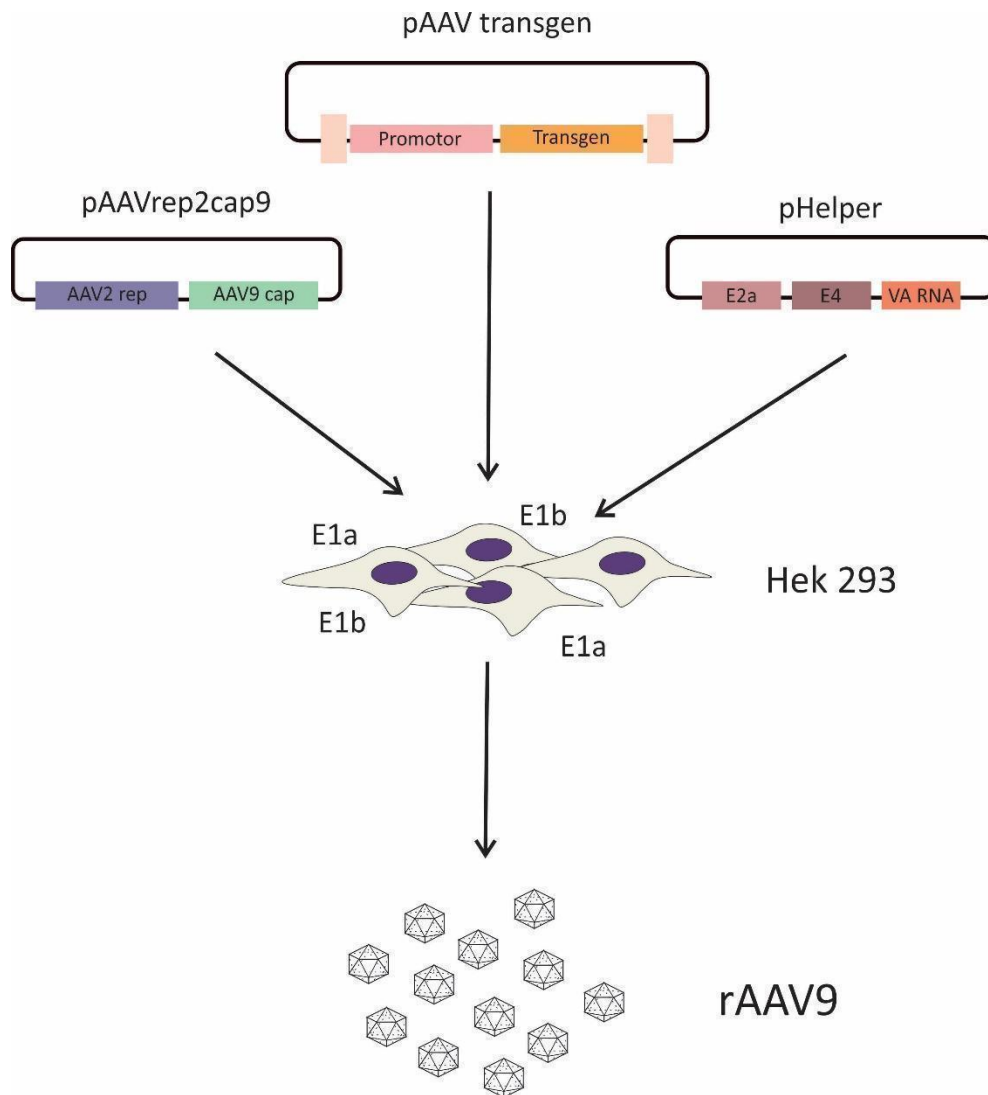


Figura 12. Esquema de producción de rAAV a través de la co-transfección de células HEK293 con tres plásmidos: pAAV transgén, el plásmido que contiene el gen de interés rodeado por los ITRs; pAAVrep2cap9, plásmido que contiene los genes rep del AAV2 y los genes de cápside del serotipo deseado (en este ejemplo AAV9); pHelper, el plásmido que contiene los genes del virus *helper* necesarios para la correcta infección del rAAV.

Actualmente existe un plásmido de empaquetamiento llamado pDG que combina los genes *rep* y *cap* con los genes del Ad *helper* E2a, E4 y VA ARN.

Estos métodos de co-transfección con varios plásmidos son simples y flexibles para investigación clínica básica pero limitados en escala y reproducibilidad para su uso en producciones más grandes. Para mejorar estos inconvenientes, se han diseñado líneas celulares con expresión estable de los genes necesarios para la reproducción y

empaquetamiento de los AAV. Así, se encuentra disponible por ejemplo la línea celular Rep/Cap HeLa.

Alternativamente, los rAAV pueden generarse mediante el uso de los virus *helpers* herpesvirus¹⁴⁸ o baculovirus¹⁴⁹. En este caso se generan cepas virales deficientes para la replicación que contengan los genes *rep* y *cap* y los elementos del AAV junto con el transgén de interés que se utilizan para coinfectar líneas celulares de mamíferos o insectos, respectivamente.

Los AAV son uno de los vehículos de *delivery* genético más prometedores y exitosos porque agrupan ciertas características importantes. Tienen la habilidad de infectar tanto células en división como quiescentes (tejidos como cerebro, retina, hígado, músculo esquelético y corazón), lo que permite que se pueda utilizar en un amplio rango de tipos celulares. Aunque los rAAV modernos han sido modificados de manera que no pueden integrarse en el genoma de la célula hospedadora, igualmente pueden persistir en una forma extra cromosomal por largos periodos de tiempo. Los AAV generan expresión estable en el tiempo en células no divisibles, tienen una muy baja patogenicidad y producen una respuesta inmune muy limitada, por lo cual son ideales para terapia génica.

Hasta la fecha han sido utilizados no sólo como herramienta para ensayos pre-clínicos en animales, sino que han sido los primeros vectores aprobados por la Unión Europea para el tratamiento de la deficiencia genética de lipoproteinlipasa¹⁵⁰ y por la FDA (Food and Drugs Administration) para el tratamiento de atrofia muscular espinal¹⁵¹ (Zolgensma) y distrofia retiniana hereditaria (Luxturna)¹⁵². Se reporta su uso en más de 250 ensayos clínicos, incluyendo estudios para fibrosis quística¹⁵³, enfermedades de almacenamiento lisosomal¹⁵⁴, hemofilia¹⁵⁵, distrofia muscular de Duchenne¹⁵⁶, falla cardíaca¹³² y enfermedad de Parkinson¹⁵⁷.

En un principio se creía que los AAV se integraban en el genoma del hospedador, pero actualmente hay pocos datos que confirmen esto *in vivo*. En cultivos celulares, los AAV *wild type* tienen una preferencia a integrarse en el cromosoma humano 19 cuando se expresa Rep^{158; 159}. Sin embargo, en estudios genómicos *in vivo* se ha encontrado que las partículas de ADN de los rAAV en músculo, corazón, cerebro, hígado y pulmón¹⁶⁰⁻¹⁶³ se convierten en círculos que persisten como episomas conteniendo múltiples copias del constructo,

generalmente en una configuración de “cabeza a cola”¹⁶⁴. La mayor frecuencia de integración se encontró en el hígado, donde aproximadamente 10% de las células integran el rAAV en su genoma¹⁶². Esto sugiere que los rAAV son adecuados para la modificación genética de los tejidos somáticos no divisibles como ojo, cerebro, corazón y músculo, y menos adecuados para los tejidos que normalmente se dividen. El hecho de que la integración sea un evento relativamente raro durante la transducción de los AAV *in vivo* reduce las posibilidades de una mutagénesis insercional y provee un margen adicional de seguridad para la terapia génica mediada por AAV.

Con respecto a la persistencia de la expresión de proteínas recombinantes luego de la infección con rAAV, se ha informado por ejemplo que para el caso de ratones inyectados *in vivo* para la expresión de los genes de eritropoyetina¹⁶⁵ y β -galactosidasa¹⁶⁶ se generaron niveles persistentes de expresión génica que no cambiaron con el paso del tiempo. Esta expresión de larga duración no se había reportado nunca, puesto que hasta ese momento la mayoría de los vectores virales perdían su expresión semanas o algunos meses luego de su administración *in vivo*. Algunas explicaciones para la pérdida de la expresión génica incluyen el *clearance* inmune para el caso de los Ad y el silenciamiento epigenético para los retrovirus. Por el contrario, se demostró que la β -galactosidasa mantuvo su expresión estable por más de un año y medio después de la inyección intramuscular y para la eritropoyetina se informaron niveles constantes por 6 meses luego de la inyección sistémica del rAAV. Se reportaron los mismos efectos a largo plazo en modelos animales en los cuales la administración del rAAV se realizó por vía ocular, cerebral, en la médula espinal, en músculo y en hígado¹⁶⁷⁻¹⁷¹. Esta ventaja de expresión persistente a largo plazo abre la posibilidad de mejorar enfermedades genéticas con una sola aplicación del rAAV que duraría toda la vida.

Los AAV se han encontrado presentes en casi el 80% de la población humana y el 60% de la población global posee anticuerpos neutralizantes contra los serotipos 1, 2, 3 y 5¹⁷². Los anticuerpos neutralizantes más frecuentemente encontrados corresponden al AAV2, seguido por el AAV1. Estos anticuerpos se reportan a temprana edad, con un pico alrededor de los 3 años¹⁷³. Se ha observado que aún títulos bajos de anticuerpos neutralizantes son suficientes para generar el bloqueo en la transducción de los rAAV en ensayos clínicos, por lo cual la solución actual a este inconveniente es medir previamente el nivel de anticuerpos neutralizantes de los pacientes, con el riesgo de no garantizarse la terapia en todos los casos.

Recientemente se reportó que la depleción mediante matrices de inmunoadsorción y hemaféresis de anticuerpos neutralizantes contra AAV mejora ampliamente la transducción posterior a los tejidos¹⁷⁴. Esto podría ser una solución que incluya a cualquier paciente, tenga o no anticuerpos neutralizantes previamente y además resuelve los inconvenientes en aquellos tratamientos que requieran una readministración del vector. También están en investigación los anticuerpos neutralizantes como una posible fuente de toxicidad relacionada con la activación del complemento¹⁷⁵.

Además de la presencia de anticuerpos neutralizantes, las cápsides de las partículas virales del rAAV pueden ser reconocidas por el receptor TLR2 y el genoma viral por los receptores TLR9 intracelulares. Además, la degradación de las proteínas de la cápside en proteosomas celulares podría activar el complejo mayor de histocompatibilidad, generando además una respuesta celular citotóxica.

Aunque los AAV presentan muchas cualidades que los hacen excelentes vectores virales para el *delivery* genético, también se pueden nombrar algunas desventajas. La principal es que a causa de su pequeño genoma (~4,7Kb) restringe el tamaño del gen a colocar en su interior. Otros vectores virales como los adenovirus o los lentivirus son capaces de albergar genomas de un tamaño 5 a 10 veces mayor. Sin embargo, para la mayoría de sus usos el tamaño máximo permitido para la incorporación al vector rAAV no es un problema ya que en promedio las proteínas eucariotas tienen un tamaño de alrededor de 375 aminoácidos¹⁷⁶.

En la Tabla 2 se comparan las características de los principales vectores virales que se utilizan más frecuentemente.

Propiedades	Lentivirus	Adenovirus	AAV
Capacidad de empaquetamiento	5 Kb	8-9 Kb	3,4 Kb
Eficiencia	+++	++++	+++
Tipo celular	La mayoría de las células en división y no divisibles	La mayoría de las células en división y no divisibles y altos niveles de	Todos los tipos celulares

		transducción en cultivos primarios	
Integración	si	no	90% no
Respuesta inmune	+++	+++++	++

Tabla 2. Comparación entre los distintos vectores que se utilizan para *delivery* génico en la actualidad.

Hipótesis

Se propone que el silenciamiento del NBCe1 cardíaco reducirá su actividad desencadenando una respuesta compensatoria que implicaría el aumento de la expresión de los transportadores alcalinizantes restantes, NHE1 y NBCn1. Se podría esperar además un concomitante incremento en la actividad de los mismos, lo cual generaría un mayor ingreso de Na^+ intracelular. De haber un aumento en la concentración intracelular de Na^+ , se desplazará el potencial de inversión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) hacia valores más negativos, provocando que el mismo actúe ingresando Ca^{2+} a la célula. El NCX, cuya estequiometría para el miocito cardíaco es $3\text{Na}^+:1\text{Ca}^{2+}$, puede funcionar tanto en modo directo como inverso, con la dirección de transporte determinada por el voltaje transmembrana y la concentración de los iones intercambiados. El Ca^{2+} es necesario para la contracción a corto plazo, pero en caso de mantenerse elevado en el tiempo, podría actuar como una señal pro-hipertrofica, desencadenando entonces una hipertrofia cardíaca.

Objetivo general

El objetivo general de este proyecto es investigar la contribución de la isoforma electrogénica del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cardíaco (NBCe1) al desarrollo de la hipertrofia cardíaca (HC). Utilizando diferentes modelos experimentales se propone dilucidar la implicancia de la disminución de la función del NBCe1 sobre las alteraciones morfológicas, iónicas y electrofisiológicas que se producen como resultado del desarrollo y evolución de dicha enfermedad. La valoración de la participación del NBCe1 permitirá establecer si la disminución de su función es causa o consecuencia del desarrollo de HC, estableciendo su posible utilidad como blanco terapéutico para el tratamiento de esta patología.

Objetivos específicos

Para cumplir con el objetivo general se desarrollarán cuatro modelos experimentales:

- 1- Se inyectará en ratas Wistar un vector adenoasociado con tropismo cardíaco en el cual ha sido clonado un shRNA dirigido al NBCe1 (AAV9-shNBCe1) o un shRNA de secuencia control (AAV9-shControl).
- 2- Se inyectará un vector adenoasociado con tropismo cardíaco (AAV9-NBCe1 o AAV9-mCherry como control) para la sobreexpresión del NBCe1 en ratas espontáneamente hipertensas (SHR).
- 3- Se inyectará un vector adenoasociado con tropismo cardíaco (AAV9-NBCe1 o AAV9-mCherry como control) para la sobreexpresión del NBCe1 en ratones C57BL/6.
- 4- Se inyectará en ratas Wistar un vector adenoasociado con tropismo cardíaco en el cual ha sido clonado un shRNA dirigido al NBCn1 (AAV9-shNBCn1) o un shRNA de secuencia control (AAV9-shControl).

MATERIALES Y MÉTODOS

Construcción de los vectores de expresión

Los plásmidos que se utilizan se denominan cis-plásmidos y contienen el transgén de interés o elementos reguladores para la expresión de ese gen en el hospedador, como shRNAs, rodeados por los ITRs virales.

El casete CMV-EGFPNeo se obtuvo de la empresa *VectorBuilder Inc.* el cual se amplificó a través de PCR (Q5, NEB) y se agregó en los extremos de los cebadores secuencias para las enzimas de restricción necesarias para la clonación en un vector cis-plásmido AAV. Todas las construcciones fueron verificadas por secuenciación y la correcta expresión fluorescente en sistemas heterólogos. Los cis-plásmidos correspondientes para la generación de AAV para la expresión de NBCe1, mCherry, shNBCe1, shNBCn1 o shControl fueron obtenidos de la empresa *VectorBuilder Inc.*

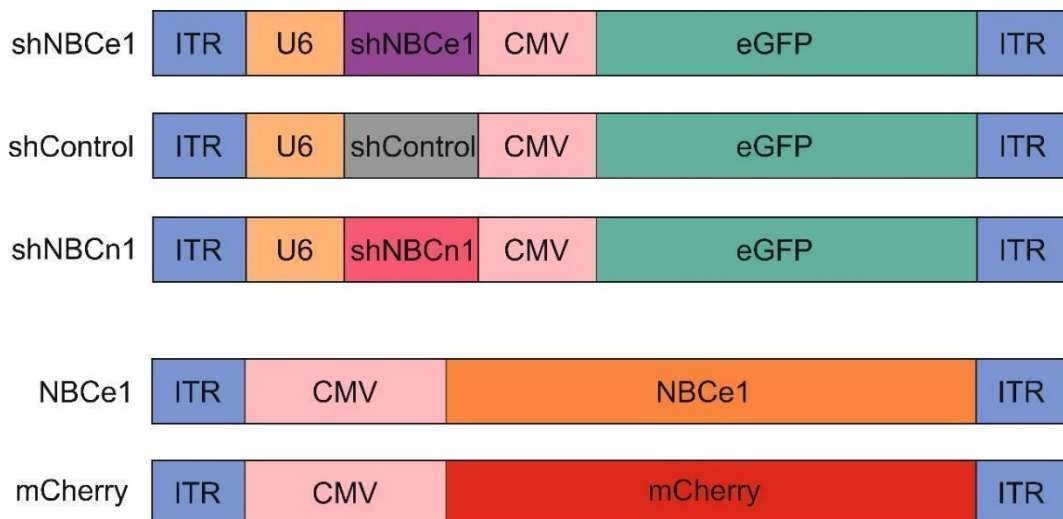


Figura 13. Esquema de los cis-plásmidos utilizados para generar los virus del silenciamiento del NBCe1 (shNBCe1), el NBCn1 (shNBCn1) y el control (shControl) y la sobreexpresión del NBCe1 y su control mCherry.

Co-transfección de los plásmidos

Los rAAV9 se generaron por transfección de células HEK293. Se utilizaron los cis-plásmidos nombrados anteriormente y un plásmido *helper* pDG9 que codifica para rep, cap, AAP y las funciones adenovirales necesarias.

Se cultivaron las células HEK293T en medio de cultivo DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico (Penicilina/Streptomina) a 37°C y con 5% de CO₂. Una vez que alcanzaron una confluencia del 80%, fueron co-transfectadas con el plásmido pDG9 (*helper*) y con cada uno de los cis-plásmidos (pNBCe1, pshNBCe1, pshNBCn1, pmCherry, pshControl) en una solución de DMEM 2% SFB con PEI-max (*Polysciences*) y manteniendo la relación 1:3 para cis-plásmido:pDG9. Las células se mantuvieron en cultivo por 72 horas y pasado este tiempo se cosecharon.

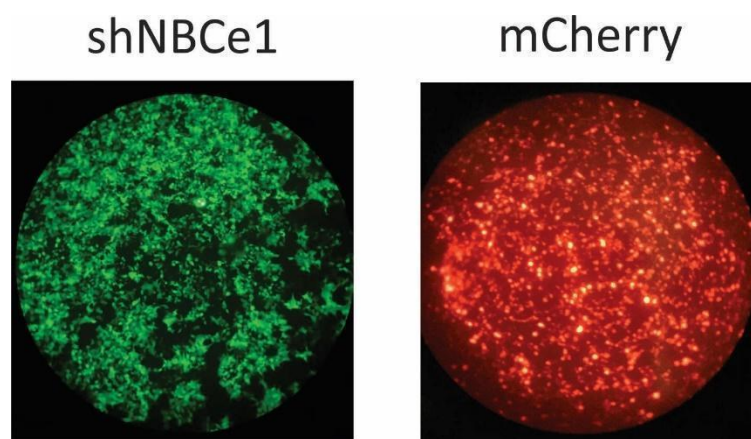


Figura 14. Imágenes tomadas desde el microscopio de fluorescencia evidenciando la transfección exitosa de dos de los cis-plásmidos usados: shNBCe1 y mCherry. Aumento 4x.

Aislamiento y concentración de las partículas virales

Se realizó una centrifugación (1000 x g por 15 minutos) para separar el sobrenadante del pellet celular. El pellet celular fue resuspendido en un buffer de lisis (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5) y el contenido celular se liberó mediante tres ciclos de congelado-descongelado sucesivos. Luego se incubó por 30 minutos con 2 μ L (10 IU/ μ L) de nucleasa (cat. no.: 88700, *Thermo Fisher Scientific*) para eliminar ARN y ADN tanto genómico como no encapsidado. Para finalizar el procesamiento celular, se realizó una centrifugación (5000 x g por 20 minutos) y se reservó el sobrenadante para ultracentrifugación en gradiente de iodixanol (cat. no.: D1556, Sigma-Aldrich).

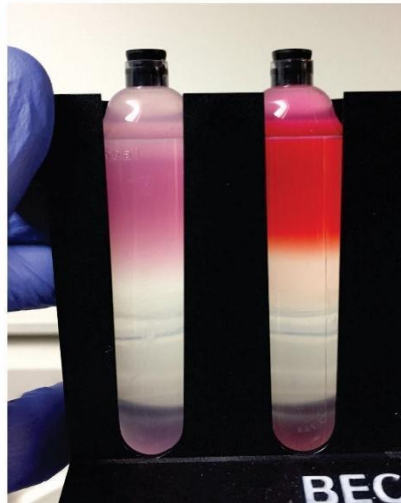
El virus del sobrenadante del cultivo celular se precipitó mediante la adición de 31,3 g de sulfato de amonio por cada 100 ml de sobrenadante seguido de incubación en hielo durante al menos 30 minutos. El precipitado se peleteó mediante centrifugación, se resuspendió en 5

ml de buffer de lisis y luego se combinó con el sobrenadante del sedimento celular para ultracentrifugación en gradiente de iodixanol.

Las preparaciones de rAAV generalmente presentan una mezcla de cápsidas llenas y vacías, por lo que con una centrifugación en gradiente de densidad, en este caso utilizando iodixanol, basta para separar las cápsidas vacías, las cuales además de ser contaminantes podrían disminuir la eficiencia de transducción *in vivo*. Sin embargo, en estudios recientes se reportó que las cápsidas vacías podrían funcionar como señuelos para los anticuerpos neutralizantes circulantes y por lo tanto, mejorar la transducción¹⁷⁷.

Los lisados virales se colocaron por encima de gradientes discontinuos de iodixanol compuestos por 4 ml de iodixanol al 60%, 4 ml al 40%, 4,9 ml al 25% y 7,3 ml al 15% (con NaCl 1M). Los gradientes se centrifugaron a $350.333 \times g$ (promedio) durante 60 minutos a 18°C en un rotor de ángulo fijo *Beckman* tipo 70 Ti. Finalmente, se recogieron fracciones (1,25 ml) del fondo del tubo, considerando las más enriquecidas en partículas virales las cercanas a la interfase entre 60% y 40% de iodixanol, siendo estas la fracción 4 y parte de la 5.

A.



B.



Figura 15. A. Fotografía de los gradientes de iodixanol y los lisados virales por encima de los mismos, antes de la ultracentrifugación. **B.** Luego de la ultracentrifugación, se realizó un agujero con una aguja y se recolectaron varias fracciones de 1,25 ml.



Figura 16. Micrografías electrónicas tomadas de Kohlbrenner *et al*, *Methods Mol Biol* 2017. Las partículas virales completas, es decir genoma más cápside, se visualizan como hexágonos enteros blancos, mientras que las cápsides vacías se visualizan como hexágonos blancos con el centro oscuro. En la imagen **a** se observa la primera fracción recogida, mostrando un 60% de cápsides con genoma viral. En la imagen **b**, tomada de la fracción 4 se observa alrededor de un 98% de cápsides completas. En la imagen **c**, tomada de la fracción 7, se observa solo un 5% de cápsides con genoma viral.

Las fracciones seleccionadas se dializaron en solución de Ringer lactato (Baxter International), se filtraron a través de un filtro de poros de 0,22 μm (*Merck Millipore*) y se almacenaron a -80°C . Para la concentración de las partículas virales se utilizó vivaspin20 (*GE Healthcare*).

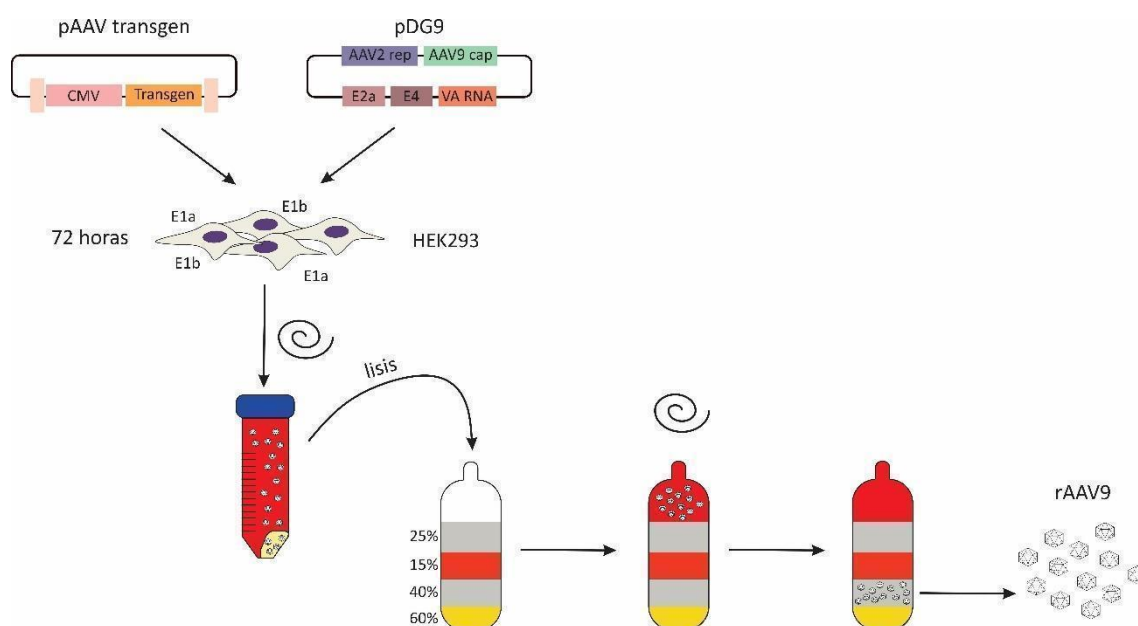


Figura 17. Esquema resumido de la producción de AAV9 en células HEK293 con el método de co-transfección y posterior purificación en gradiente de iodixanol.

Determinación de la pureza de los vectores virales

Para caracterizar la pureza de la preparación viral obtenida se separaron por electroforesis las proteínas de la cápside viral VP1, VP2 y VP3. Se realizó un gel de acrilamida 10% SDS-PAGE. Se

utilizaron 30 μ l de muestras de distintas fracciones a los cuales se agregó buffer de carga y se corrieron a 125 V por 2-3 horas, previo calentado de las muestras a 95°C por 3 minutos. Luego de la corrida, se tiñeron los geles durante la noche con una solución 50% metanol, 10% ácido acético y 0,003% Coomassie Blue. Para el desteñido se utilizó una solución 40% metanol y 8% ácido acético.

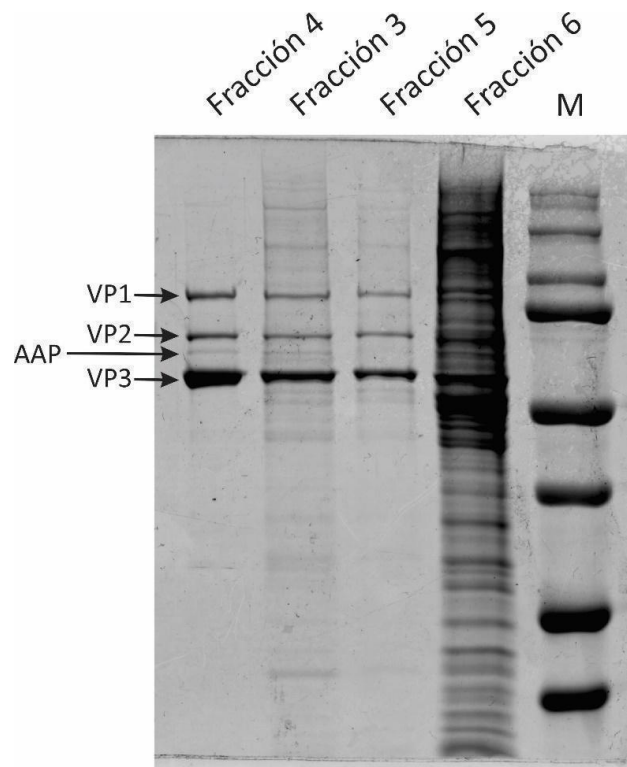


Figura 18. Fotografía del gel SDS-PAGE mostrando las proteínas de la cápside viral. Se observa que la fracción 4 es la más enriquecida en cápsides y además la más limpia, encontrando sólo partículas virales en la preparación.

Determinación del título de genoma viral

La cuantificación del título de genoma viral se realizó mediante un gel de agarosa alcalino. Las muestras se prepararon en un buffer de carga (4x: 1,2% SDS, 20% glicerol, 0,01% azul de bromofenol) y se sembraron en conjunto con un marcador de peso molecular de ADN de 1kb (*New England Biolabs*). El gel se corrió en un buffer alcalino (50x: 2,5M NaOH, 50mM EDTA) a 4°C durante toda la noche y a 20 V. Luego, se lavó el gel con una solución de 0,1M Tris-HCl pH 8,5 en agitación por una hora. Se retiró el buffer de lavado y se incubó después en agitación durante 2 horas con Gel red en 0,1M NaCl, a resguardo de la luz. Finalmente, se visualizó en un transiluminador UV y se tomó una foto del mismo.

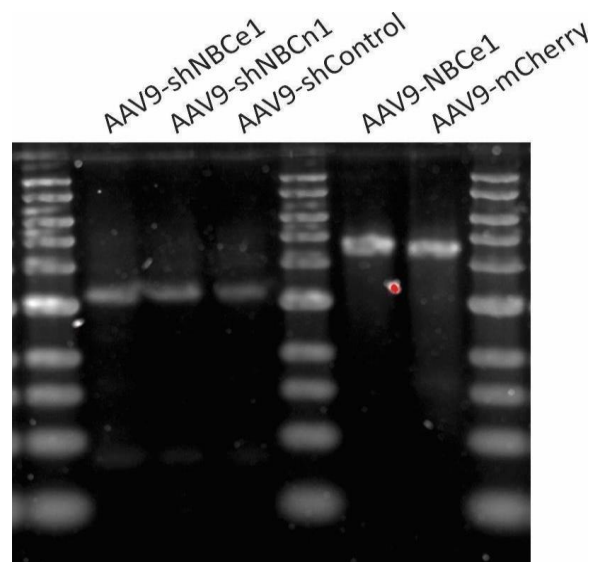
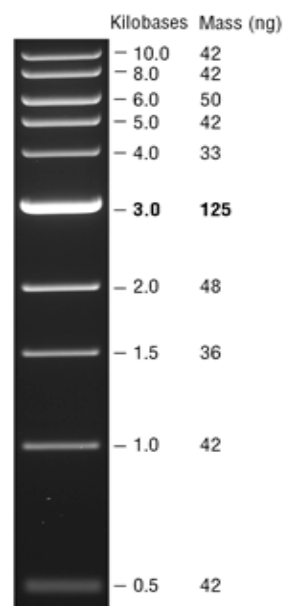


Figura 19. Fotografía del gel alcalino tomada con el transiluminador UV. Puede observarse la presencia de genoma de los cinco rAAV9 desarrollados.

Para la cuantificación del genoma viral se utiliza el marcador de peso molecular de ADN. La cantidad de ng/5 μ l de ADN correspondientes a cada banda es informada por el fabricante, por lo tanto se puede hacer un promedio de la densidad de cada banda teniendo en cuenta su masa. De esta forma, se podrá calcular la masa de cada genoma viral midiendo su densidad por relación con el promedio correspondiente a las masas y densidades del marcador de peso molecular.

Para el gel anterior:

ng/5 μ l	Densidad medida
42	3185
42	2726
50	2505
42	2419
125	10552



Densidad promedio de la banda marcador \longrightarrow ng correspondientes
 Densidad medida de la banda AAV9 \longrightarrow x= ng DNA en AAV9

AAV9	Densidad medida	ng promedio
shNBCe1	5808,217	90,3
shNBCn1	7393,267	115
shControl	3991	62,1
NBCe1	14090	219,1
mCherry	11367,125	176,8

Luego, conociendo el tamaño de cada genoma y su masa correspondiente, se calculó cuántas copias del mismo se obtuvieron. Además, se calculó el volumen que se debería inyectar en los animales para alcanzar el título viral de 1×10^{12} partículas virales:

AAV9	Vcg/ μ l	μ l a inyectar
shNBCe1	$2,9 \times 10^9$	280
shNBCn1	$3,6 \times 10^9$	250
shControl	2×10^9	500
NBCe1	$4,8 \times 10^9$	200
mCherry	$3,9 \times 10^9$	260

Administración de AAV9 en ratas

Los adenoasociados obtenidos fueron inyectados a través de la vena lateral de la cola de ratas de 3-4 meses (1×10^{12} pv/kg). Para la realización del procedimiento se durmió a los animales con anestesia inhalatoria (isoflurano). Luego se procedió a la inyección con una aguja 27,5 G y se comprobó que la solución inyectada ingresara correctamente en la vena.

Administración de AAV9 en ratones c57bl/6

Los adenoasociados obtenidos fueron inyectados en el seno retro-orbital de ratones c57bl/6 machos de 3-4 meses de edad (1×10^{12} pv/kg). Primero se durmió a los animales con anestesia inhalatoria (isoflurano) y se administró también un anestésico oftálmico (propacaína 0,5%). Luego se procedió a la inyección con una aguja 27,5 G y posteriormente se administró un antibiótico (tobramicina)¹⁷⁸.

Aislamiento de miocitos cardíacos

Se utilizaron ratas macho de 4-5 meses de edad, a las cuales se las anestesió con una inyección intraperitoneal de uretano (1,5g/kg del animal). Para el aislamiento de miocitos de ratones macho de 4-5 meses de edad, se procedió a la dislocación cervical previa anestesia.

Los animales se heparinizaron (200U/ml) para evitar coágulos y luego de la apertura torácica, el corazón se extrajo rápidamente, se canuló la aorta y se colocó en un sistema Langendorff de perfusión retrógrada. El corazón se lavó durante 5 min con una solución HEPES (mM): 146,2 NaCl, 4,69 KCl, 11 glucosa, 10 HEPES, 0,35 NaH₂PO₄.H₂O, 1,05 SO₄Mg.7H₂O, 1 Cl₂Ca, 100% O₂, pH 7,4. Una vez limpio, se perfundió con una solución de EGTA (0,1 mM), quelante de Ca²⁺, y en ausencia de Cl₂Ca. Transcurridos 5 min, se inició la perfusión con la solución enzimática, HEPES con 0,5 mM Cl₂Ca y 0,2 mg/ml de colagenasa tipo II 280U/ml (*Worthington Biochemical*).

Una vez finalizada la digestión, el corazón fue desmontado del equipo Langendorff y se disgregó el tejido mecánicamente con pinzas.

Finalmente, se restituyó progresivamente el Ca²⁺ de la solución para evitar la muerte celular por recalcificación rápida con el agregado de Cl₂Ca hasta lograr una concentración final de 1 mM para las ratas y 1,8 mM para los ratones.

Determinación de pH_i por epifluorescencia

El pH intracelular (pH_i) de los miocitos se midió por un sistema de epifluorescencia (*Ion Optix, Milton, MA*). Se utilizaron los miocitos cardíacos aislados de rata en el mismo día. Las células fueron cargadas en el medio buffer HEPES salino con 10 μM del indicador de pH_i, 2'-7'-bis (2-carboxyethyl) -5, 6-carboxyfluorescein (BCECF)-AM a temperatura ambiente durante 10 minutos, al cabo de los cuales se lavó el medio extracelular con solución libre de indicador.

El modo de carga del indicador se basa en que las formas acetoxi-metil-éster (AM) de los indicadores fluorescentes atraviesan fácilmente la membrana, y una vez en el citosol, las esterasas intracelulares hidrolizan la porción AM para liberar la forma ácida del indicador, que es la activa cuando se combina con el ion correspondiente (H⁺).

Transcurridos 30 minutos de lavado, los miocitos fueron colocados sobre la platina de un microscopio invertido (*Nikon TE 2000-U*), a flujo continuo (2ml/min) y estimulados a través de dos electrodos de platino a una frecuencia de 0,5 Hz. La luz de excitación, provista por una cámara de Xenón de 75 watt, fue centrada a 440 y 490 nm y transmitida a los miocitos. La

fluorescencia emitida fue colectada por un fotomultiplicador provisto de un filtro de 535 nm. El cociente (490/440) fue digitalizado a 10 kHz (*ION WIZARD software*) para análisis de fluorescencia.

Al término de cada día experimental, se realizó una calibración con Nigericina y alto K^+ . La nigericina es un ionóforo que permite igualar el pH de la solución externa con el pH_i . Con un ajuste lineal y conociendo el pH de las soluciones externas se logró transformar las unidades arbitrarias de fluorescencia del cociente 490/440 en unidades de pH_i .

En estas condiciones se realizó el protocolo denominado pulso de potasio, el cual se explicará a continuación.

Pulso de K^+ : Actividad del NBCe1

Se estudió la actividad del NBCe1 con un protocolo experimental denominado “Despolarización por alto K^+ ”¹⁵, en el cual los miocitos aislados fueron expuestos a una solución que contiene: (mM) 118 NaCl, 5 KCl, 1 $MgSO_4$, 0,35 NaH_2PO_4 , 10 glucosa, 40 cloruro de colina, 20 $NaHCO_3$, pH 7,45 mM, la cual corresponde a una solución de K^+ normal. Una vez estabilizado el registro de pH_i , los miocitos cardíacos se comenzaron a perfundir con una solución isosmótica pero con 45 mM de K^+ , solución de alto K^+ .

La mayor concentración de K^+ de la solución produce una despolarización de la célula de aproximadamente 60 mV, activando todos los mecanismos electrogénicos, entre ellos el NBCe1. La activación del NBCe1 se traducirá como un incremento del pH_i .

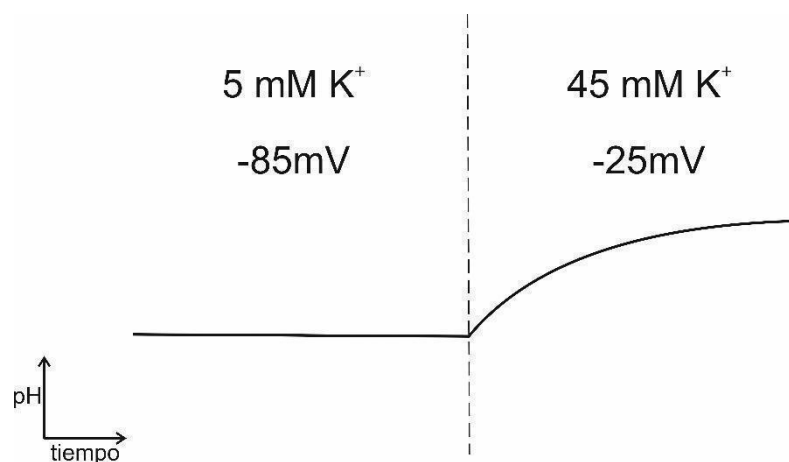


Figura 20. Esquema representativo del registro que se obtiene con la técnica de despolarización con alto K^+ .

Determinación de pH basal

El pH intracelular (pH_i) de los miocitos se midió por un sistema de epifluorescencia (*Ion Optix, Milton, MA*). Se utilizaron miocitos ventriculares aislados de ratón cargados con BCECF-AM como se ha descrito anteriormente. Las células se perfundieron con buffer bicarbonato (en mM): 118 NaCl, 5 KCl, 1,8 CaCl₂, 0,8 MgCl₂, 1,2 MgSO₄, 20 NaHCO₃ y 10 Glucosa (pH 7,4 con 95% O₂ - 5% CO₂). Se registró la fluorescencia por varios minutos estimulando a 0,5Hz. Se realizaron calibraciones con Nigericina y alto K⁺ para obtener los valores de pH_i.

Registro de potencial de acción cardíaco (PAC)

Para las medidas de duración de PAC se utilizó la técnica de *patch-clamp* en su configuración *whole cell* perforado en células aisladas. Se utilizó un amplificador Axopatch 200B (*Axon Instruments, Foster City, Calif*) y un conversor análogo-digital Digidata 1322A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El análisis de los datos se realizó con pClamp 9.2 Software (Molecular Device). Las pipetas de borosilicato se fabricaron de manera de obtener una resistencia final de 2-3,5 MΩ. Se utilizó como electrodo de referencia un alambre de Ag/AgCl en contacto con la solución extracelular. La solución de pipeta contenía (en mM): 125 K-Gluconato, 10 KCl, 8 Na-Gluconato, 1 MgCl₂, 10 HEPES and 0,30 mg/ml de nistatina (pH 7,2 con KOH, concentración final de K⁺: 140 mM). La solución de HCO₃⁻ contenía (en mM): 120 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 20 NaHCO₃, 5 Glucosa y 13 Cloruro de colina (pH 7,4 con 95% O₂ - 5% CO₂). Los PAC se generaron con pulsos de 2 milisegundos de corriente despolarizante a 1Hz (ratón) y 0,5Hz (rata). Todos los datos obtenidos fueron normalizados con el potencial de junta de -14,7 mV en la solución de HCO₃⁻. El potencial de junta fue calculado con la herramienta del software pClamp Clampex 10.3. Los datos fueron procesados en ClampFit 10.3 (Molecular Device). Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22-25°C). Para cada célula aislada se midió la corriente capacitiva, de manera que los PAC registrados fueron normalizados por la capacitancia de la misma. Se utilizaron soluciones y protocolos electrofisiológicos destinados a registrar los PACs como se realizó previamente en nuestro laboratorio^{22; 23}.

Detección de Ca²⁺ citosólico por microscopía confocal

Los cardiomiocitos se cargaron con Fluo4-AM 10 μM (*Thermo fisher scientific*) disuelto en 20% F-127 plurónico en dimetilsulfóxido (DMSO). Luego de 10 minutos de carga a temperatura ambiente, las células se lavaron y se colocaron en una cámara de perfusión montada en un

microscopio confocal invertido Zeiss 410 (*LSMTech*, Pennsylvania, USA) equipado con un objetivo 63x de inmersión. Todas las medidas fueron realizadas a temperatura ambiente (24 °C). Los miocitos fueron estimulados repetidamente con pulsos de 10 mseg de duración. La longitud de onda de excitación fue 488 nm, para lo cual se utilizó un láser de argón, y la fluorescencia emitida se recolectó a 500-550 nm. La señal fluorescente se registró en modo *linescan*, con una línea de 512 píxeles colocada en el eje longitudinal de las células. Cada registro consistió en 512 *linescans* consecutivos (4,3 mseg por línea), que luego fueron agrupados para crear un perfil espacio temporal.

Determinación de frecuencia de ondas de Ca²⁺

Para la medida de la frecuencia de aparición de ondas de calcio se utilizaron cardiomiocitos ventriculares aislados cargados con Fluo4-AM como se describió anteriormente. Se estimularon eléctricamente aumentando la frecuencia de 1 a 5 Hz durante un minuto y luego se frenó la estimulación para determinar el calcio liberado espontáneamente.

Estudio electrocardiográfico (ECG)

El ECG de superficie se registró a 40KHz utilizando electrodos de ECG estándar (derivación I) y un sistema de adquisición de datos Power Lab 4ST (Adinstruments, Nueva Zelanda)¹⁷⁹. Se tomaron registros de 2 minutos luego de verificar una frecuencia cardíaca constante. Para la cuantificación de la duración del intervalo QT, se midieron aproximadamente 50 registros de ECG. Los valores de QT corregido se obtuvieron con la fórmula de Bazett: $QTc = QT/(RR)^{1/2}$, donde RR es el período promedio entre dos ondas R consecutivas.

El registro de los ratones se realizó con los animales conscientes y colocando los electrodos en el pecho. Para el monitoreo del ECG de las ratas se requirió anestesia inhalatoria (isoflurano) y los electrodos se colocaron en el pecho de los animales mediante agujas de acupuntura, con el objetivo de obtener registros menos ruidosos.

Análisis por ecocardiografía

La ecocardiografía utiliza las propiedades de las ondas sonoras para diferenciar tejidos de densidad variable en el cuerpo humano. El sonido viaja a través de ondas mecánicas con una velocidad dependiente de la densidad y las propiedades elásticas del medio en el que están viajando. Las ondas de ultrasonido, que se utilizan en aplicaciones médicas, tienen frecuencias

más altas que las audibles para el oído humano. Cuando una onda sonora, que se genera por estimulación eléctrica de un cristal piezoeléctrico, viaja a través de una interfaz entre dos tejidos de distinta densidad acústica, como miocardio y sangre, una porción de la energía se refleja (onda reflejada) y el resto viaja a través del siguiente tejido (onda refractada). La onda refractada es captada por el transductor, convertida en energía eléctrica, amplificada y registrada en el monitor.

Los roedores fueron monitoreados ecocardiográficamente durante todo el tratamiento. Para las ratas, se utilizó anestesia inhalatoria (isoflurano) y se mantuvieron dormidas durante todo el proceso. Las ecocardiografías de los ratones, en cambio, se realizaron con los animales despiertos. Las ecocardiografías bidimensionales se realizaron en modo M, con un transductor de 15 MHz para los ratones y de 12MHz para las ratas. Algunas ecocardiografías también se realizaron en modo ultrasonido *Doppler*, método que permite estimar de manera no invasiva la velocidad del flujo sanguíneo en el corazón y los vasos y la presión de llenado de las cámaras cardíacas, siendo de gran utilidad para aportar datos hemodinámicos. En este sentido, el parámetro analizado fue la relación onda de llenado ventricular temprano (E)/contracción auricular (A). Las medidas fueron realizadas de acuerdo a los protocolos propuestos por la *American Society of Echocardiography*.

Medición de la presión arterial

Se midió en ratas conscientes la presión arterial sistólica por el método pletismográfico de medida de la presión arterial, utilizando la vena de la cola de estos animales¹⁸⁰. Estas medidas se realizaron una vez por semana, antes y luego de finalizado el tiempo de tratamiento post inyección.

Medida de área de sección transversal

El tejido ventricular se fijó en 10% de formaldehído en PBS y fue embebido en parafina. Las secciones del ventrículo izquierdo (5 μ m de grosor) se tiñeron con hematoxilina-eosina para determinar el área de la sección transversal de los cardiomiocitos. Solo se consideraron células redondas a ovoides con núcleo redondo visible y se contaron 50 células en al menos 10 imágenes obtenidas de cada ventrículo izquierdo. Cada célula se trazó individualmente y su área de sección transversal se determinó directamente. Todos los cortes teñidos se observaron bajo un microscopio (*Olympus BX-50, Tokio, Japón*) y las imágenes se capturaron con una cámara de

video analógica. Las imágenes fueron digitalizadas y procesadas por un software de computadora (*Image-Pro Plus*).

Análisis de proteínas por Western-blots

Los corazones de los roedores fueron pulverizados en nitrógeno líquido y homogeneizados en un buffer RIPA con inhibidores de proteasas (*MiniComplete Tablets, Roche*) como aditivo. Se midió la concentración proteica total por el método de Bradford y las muestras se diluyeron en un buffer de carga SDS/PAGE (10% (v/v) de glicerol, 1-3% (v/v) 2-mercaptoetanol, 2% (p/v) SDS, 0,5% (p/v) de azul de bromofenol, 75 mM Tris, pH 6,8). Luego fueron resueltas en 7,5-12% de poliacrilamida, dependiendo del peso molecular de la proteína en estudio. Una vez finalizada la corrida electroforética, se transfirieron a membranas de PVDF por electroforesis (SDS-PAGE). Las membranas fueron bloqueadas con una solución que contiene leche al 5% para luego ser incubadas toda la noche con los anticuerpos específicos para cada una de las proteínas de interés. Al día siguiente se incubó por 1 hora con los anticuerpos secundarios, conjugados con una peroxidasa de rábano (HRP, en inglés). La detección de las proteínas inmunoreactivas se hizo por quimioluminiscencia (*Amersham*) y las señales se cuantificaron mediante análisis densitométrico. Los blots fueron visualizados por quimioluminiscencia con ECL® y cuantificados mediante análisis densitométrico con el software *Image J*.

Lista de anticuerpos utilizados:

Anticuerpo	Origen
Anti- NBCe1 (1:500, 1% leche en TTBS)	Producido en el laboratorio, policlonal de conejo ¹²
Anti- NBCn1 (1:1000, 1% leche en TTBS)	<i>Santa Cruz Biotechnology, sc-99633</i>
Anti- NHE1 (1:1000, 1% leche en TTBS)	<i>Santa Cruz Biotechnology, sc-136239</i>
Anti- GAPDH (1:2000, 1% leche en TTBS)	<i>Ambion, #AM4300</i>
Anti- rabbit (1:10000, 1% leche en TTBS)	<i>Santa Cruz Biotechnology, sc-2004</i>
Anti- mouse (1:5000, 1% leche en TTBS)	<i>Millipore, #AP124P</i>

Cuantificación de genes usando PCR cuantitativa (qRT-PCR).

El RNA total fue extraído a partir de muestras de ventrículo izquierdo de los roedores cosechadas en TriReagent (*GenBiotech*) y disgregados mecánicamente. Se realizará la cuantificación y análisis de la calidad del mismo utilizando espectrofotómetro Spectrophotometer ND-100 (*Nanodrop Technologies Inc.*). 0,5 a 1,5 µg del RNA será retrotranscrito utilizando random hexamers (*Byodinamics, Argentina*) y Transcriptasa Reversa MMLV (*Promega, Argentina*) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las reacciones de qPCR serán realizadas en un ciclador *I-Cycler Bio-Rad*. La eficiencia de cada par de *primers* será evaluada a partir diluciones seriadas de un pool de los cDNAs a estudiar como molde y los *primers* en cuestión. A partir de los valores de ciclo umbral Ct (del inglés *cycle threshold*) de cada muestra y haciendo uso de las eficiencias de los *primers* y normalizándolo con los mismos parámetros del gen *housekeeping* se podrán obtener los valores de expresión normalizados.

Lista de *primers* utilizados:

Transcripto	Dirección	Secuencia
ANP	<i>Forward</i>	GGATTTCAAGAACCTGCTAGACCA
	<i>Reverse</i>	CTGCTTCCTCAGTCTGCTCACTCA
GAPDH	<i>Forward</i>	GGGTGTGAACCACGAGAAAT
	<i>Reverse</i>	CCACAGTCTTCTGAGTGGCA

Determinación de colágeno

Se utilizaron secciones de 5 µm tomadas de los ventrículos izquierdos de los grupos de animales estudiados. Las secciones se tiñeron con la técnica de Picrosirius red (Direct Red 80, *Aldrich, Milwaukee, WI 53233, USA*) para la evaluación de colágeno. Las muestras se observaron bajo luz polarizada, usando un analizador (U-ANT, *Olympus*) y un polarizador (UPOT, *Olympus*) para estudiar la birrefringencia del colágeno. Las imágenes fueron digitalizadas con una cámara (*Olympus DP73, Japan*) acoplada a un microscopio de campo amplio (*Olympus BX53, Japan*).

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como promedio ± error estándar. Para comparar los grupos experimentales se utilizó el test de Student o ANOVA de una o dos vías con su correspondiente test de comparaciones múltiples según el caso, considerándose significativo un p-valor < 0,05.

Para un mejor entendimiento, se aclara luego de cada figura en los resultados el análisis estadístico utilizado y el correspondiente p-valor arrojado por el test elegido.

RESULTADOS

Objetivo específico 1

Investigar la contribución de la isoforma electrogénica del NBC (NBCe1) al desarrollo de hipertrofia cardíaca (HC). La valoración de la participación del NBCe1 permitirá establecer si la disminución de su función es causa o consecuencia del desarrollo de HC, estableciendo su posible utilidad como blanco terapéutico para el tratamiento de esta patología. Para este fin, se diseñó un ARN de interferencia específico contra el NBCe1, el cual fue clonado en un vector viral adeno-asociado cardiotrópico (AAV9-shNBCe1).

Objetivos propuestos

- 1- Administración sistémica de los vectores AAV9-shNBCe1 y AAV9-shControl en ratas adultas y comprobación de eficiencia de transducción. Seguimiento de crecimiento y presión arterial.
- 2- Estudio morfométrico del tejido cardíaco: Análisis del tamaño y función ventricular por ecocardiografía y tamaño de las células cardíacas por medición en preparados histológicos. Cuantificación del gen fetal ANP por PCR cuantitativa (qPCR).
- 3- Estudio electrofisiológico del tejido cardíaco: Medida de la duración del potencial de acción cardíaco (PAC). Análisis de la actividad eléctrica del corazón mediante electrocardiograma (ECG).
- 4- Estudio fisiológico y molecular del tejido cardíaco: Evaluación de la actividad de NBCe1 mediante monitoreo de pH_i en un sistema de epifluorescencia. Análisis de los perfiles proteicos de los transportadores alcalinizantes de membrana vía western blot. Determinación de cantidad de colágeno en preparados histológicos. Estudio de amplitud de transitorios de calcio y frecuencia de ondas de calcio en cardiomiocitos aislados.

1- Administración sistémica de los vectores AAV9-shNBCe1 y AAV9-shControl en ratas adultas y comprobación de eficiencia de transducción. Seguimiento de crecimiento y presión arterial.

Se inyectaron ambos vectores virales (AAV9-shNBCe1 y AAV9-shControl) en la vena lateral de la cola de ratas Wistar macho de 3-4 meses de edad. Para constatar que el virus inyectado sistémicamente tuviera una transducción efectiva al corazón, se realizaron cortes histológicos que confirmaran la presencia de la proteína fluorescente verde (GFP) introducida en el vector como gen reportero (Figura 21 A). Los corazones recolectados luego del mes de tratamiento fueron procesados adecuadamente para medir la expresión proteica de NBCe1, encontrándose una disminución significativa de la misma en los corazones transducidos con el vector AAV9-shNBCe1 (shControl: $1,00 \pm 0,11$, $n=7$; shNBCe1*: $0,71 \pm 0,04$, $n=5$; * $p < 0,05$ vs shControl) (Figura 21 B). Estos datos permiten comprobar la transducción eficiente de los rAAV9 al tejido cardíaco.

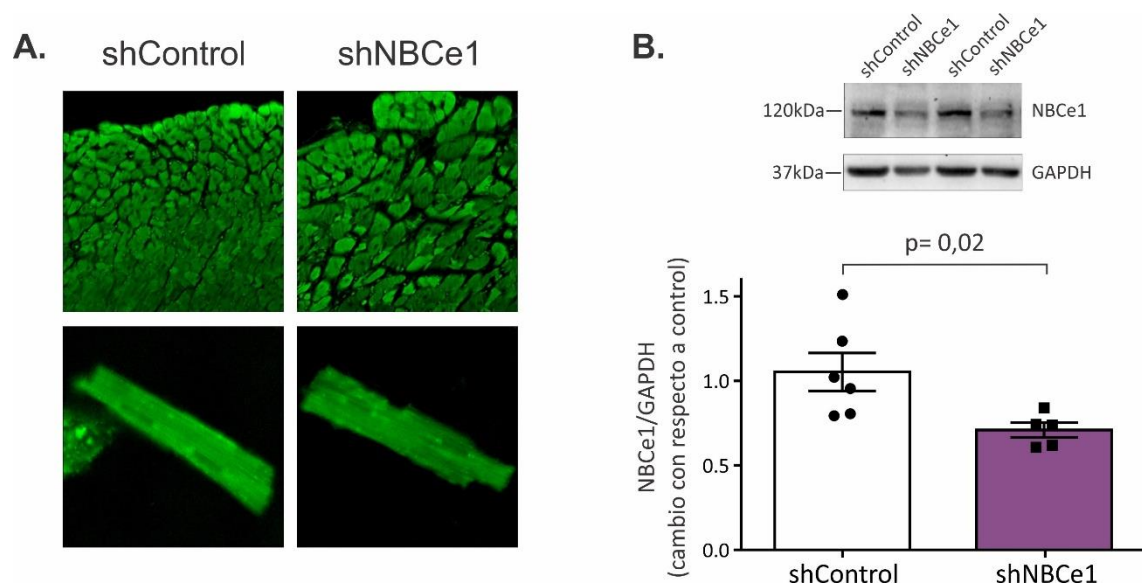


Figura 21. A. Micrografías de cortes histológicos (panel superior) y de células ventriculares aisladas (panel inferior) tomadas mediante microscopía confocal. La presencia del gen reportero GFP demuestra la transducción exitosa de los cardiomiocitos. **B.** Western Blots representativos de la expresión proteica de NBCe1 normalizado por GAPDH y su correspondiente análisis densitométrico. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. shControl.

Por otro lado, se realizó el seguimiento de la presión arterial por el método pletismográfico de registro de presión sistólica en la vena de la cola durante 4 semanas post inyección, sin registrar cambios significativos en la presión sistólica entre los grupos shNBCe1 y shControl (Figura 22 A).

Además, se estudió la variación del peso de los roedores y no se encontraron cambios significativos entre ambos grupos (Figura 22 B).

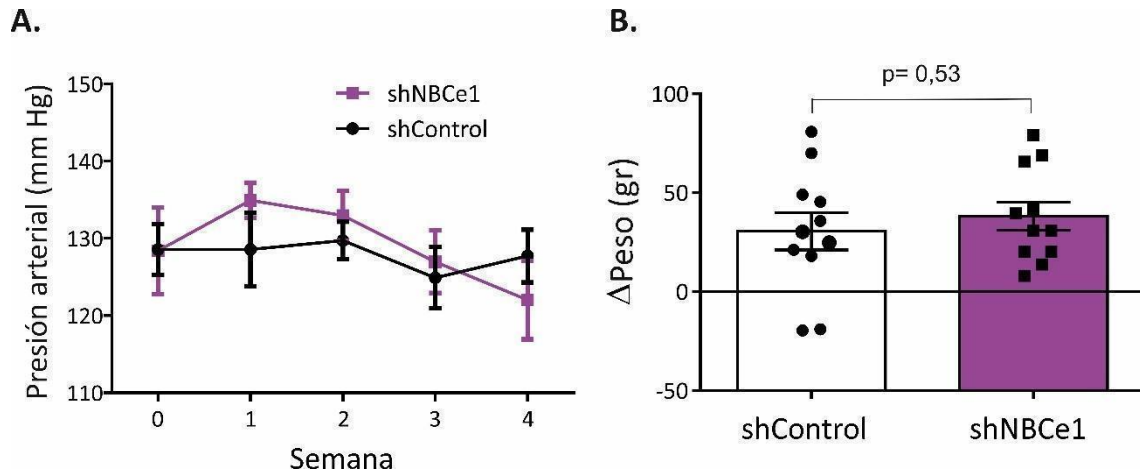


Figura 22. A. Registro de la presión arterial medida por el método pletismográfico a lo largo de todo el tratamiento. **B.** Diferencia de peso de los roedores al final y al inicio del tratamiento. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. shControl.

2- Estudio morfométrico del tejido cardíaco: Análisis del tamaño y función ventricular por ecocardiografía y tamaño de las células cardíacas por medición en preparados histológicos. Cuantificación del gen fetal ANP por PCR cuantitativa (qPCR).

Se realizó un seguimiento ecocardiográfico durante el mes de tratamiento al que fueron sometidos los animales de ambos grupos para evaluar el posible desarrollo de hipertrofia cardíaca. Las ratas inyectadas con el AAV9-shNBCe1 mostraron un aumento significativo del índice de masa ventricular izquierda (IMVI) normalizado por el peso corporal (mg/g; shControl: $1,013 \pm 0,01$, $n=11$; shNBCe1*: $1,46 \pm 0,11$, $n=11$; * $p < 0,05$ vs shControl) (Figura 23 A). Además, se registró un aumento en el grosor de la pared ventricular, ambos signos característicos de hipertrofia cardíaca (shControl: $1,011 \pm 0,07$, $n=12$; shNBCe1*: $1,34 \pm 0,09$, $n=10$; * $p < 0,05$ vs shControl) (Figura 23 B).

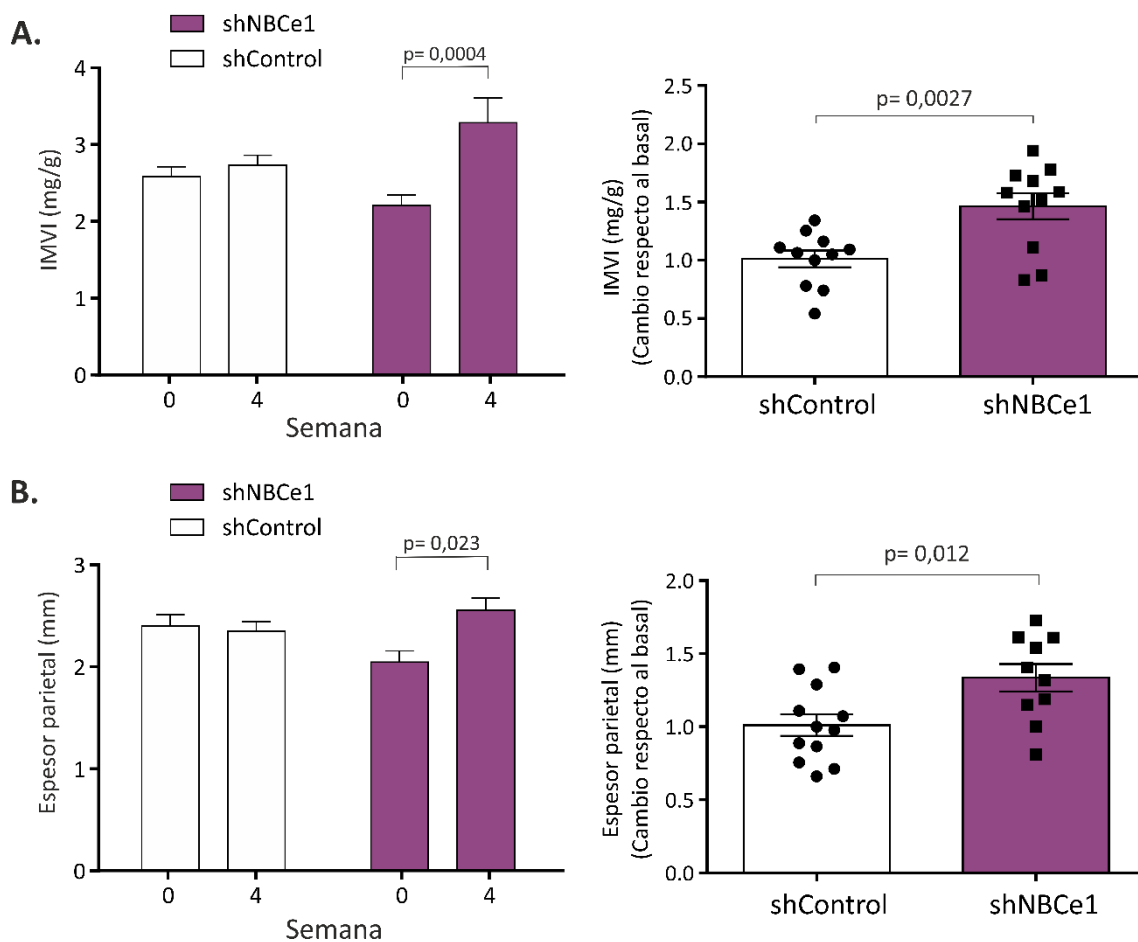


Figura 23. A. (Izq) Datos promedio del índice de masa ventricular izquierdo (IMVI) normalizado por el peso del animal al principio y al final del tratamiento. (Der) Datos promedio del IMVI con respecto al tiempo cero de tratamiento para cada grupo de animales. **B.** (Izq) Datos promedio del espesor de la pared ventricular al comienzo y al final del tratamiento. (Der) Datos promedio del espesor parietal con respecto al tiempo cero de tratamiento para cada grupo experimental. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student o ANOVA de dos vías corregido por test de Sidak cuando correspondiese, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. shControl.

Al momento de evaluar la función cardíaca, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros fracción de acortamiento (shControl: $0,91 \pm 0,11$, $n=12$; shNBCe1: $0,82 \pm 0,08$, $n=11$; $*p < 0,05$ vs shControl) y fracción de eyección (shControl: $0,96 \pm 0,05$, $n=12$; shNBCe1: $0,91 \pm 0,04$, $n=11$; $*p < 0,05$ vs shControl) (Figura 24 A-B). Estos resultados demuestran que la hipertrofia generada por la disminución del NBCe1 cardíaco no modifica la función cardíaca.

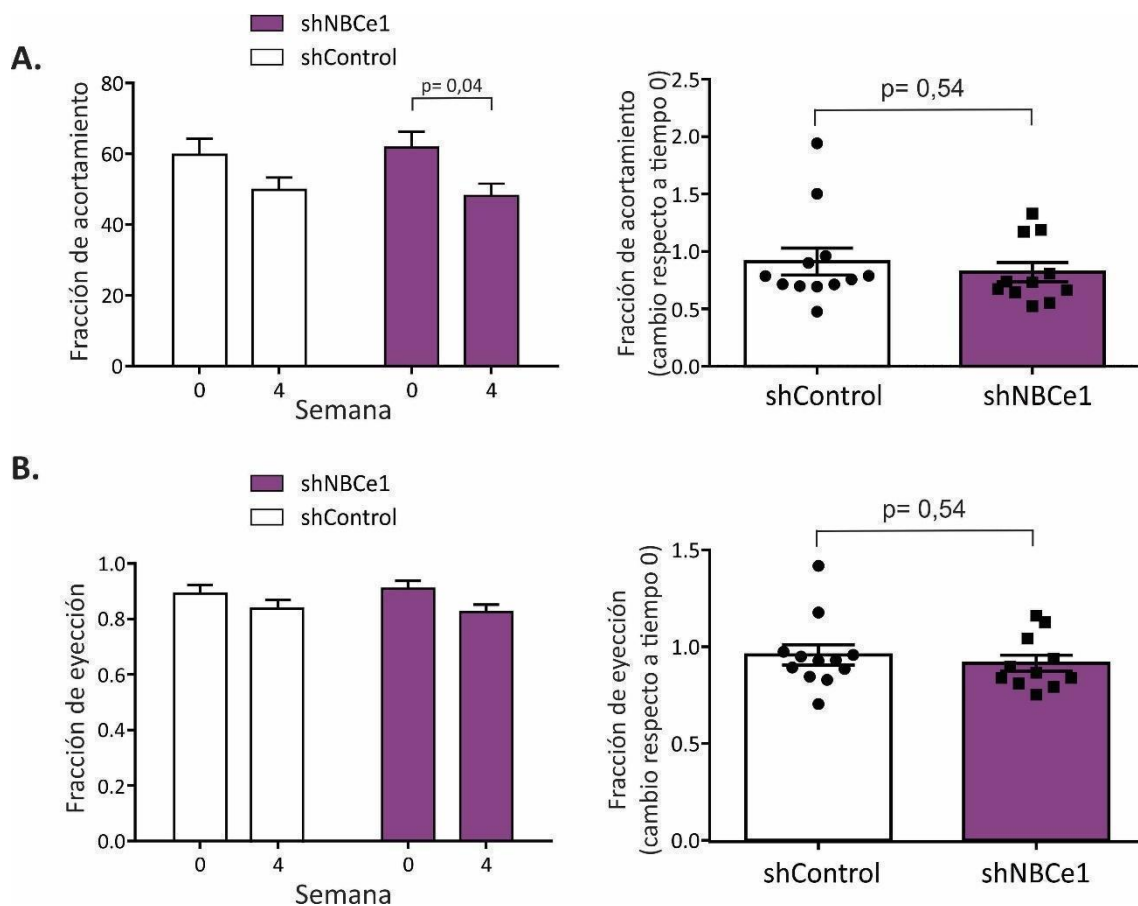


Figura 24. A. (Izq) Datos promedio de la fracción de acortamiento medida mediante ecocardiografía al principio y al final del tratamiento. (Der) Datos promedio de la fracción de acortamiento con respecto al tiempo cero de tratamiento para cada grupo de animales. **B.** (Izq) Datos promedio de la fracción de eyección medida por ecocardiografía al comienzo y al final del tratamiento. (Der) Datos promedio de la fracción de eyección con respecto al tiempo cero de tratamiento para cada grupo experimental. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student o ANOVA de dos vías corregido por test de Sidak cuando correspondiese, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. shControl.

Los datos obtenidos a través de la medida del área de sección transversal en preparados histológicos de ventrículos izquierdos teñidos con hematoxilina-eosina muestran un aumento significativo en el tamaño de los miocitos cardíacos (μm^2 ; shControl: $247,5 \pm 13,7$, $n=9$; shNBCe1*: $297,6 \pm 15,9$, $n=8$; * $p < 0,05$ vs shControl), confirmando de esta forma los datos obtenidos por ecocardiografía (Figura 25).

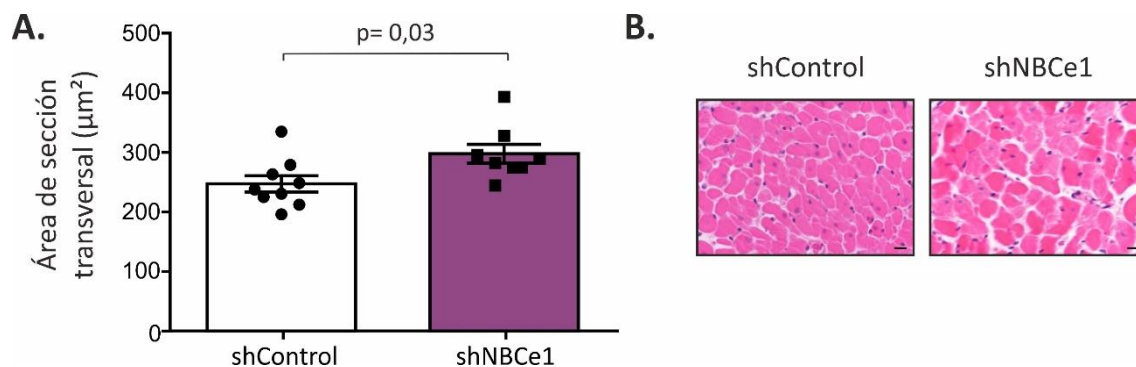


Figura 25. A. Cuantificación del área de sección transversal de los cardiomiocitos. **B.** Micrografías representativas de los preparados histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. 20x, las barras corresponden a 10µm. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. shControl.

Además de estos datos morfométricos, se evaluó por PCR cuantitativa los niveles del RNAm del gen ANP en muestras de ventrículos, el cual aumenta frente a una hipertrofia cardíaca¹⁸¹ (Figura 26). Los resultados obtenidos reflejan un incremento significativo de ANP en las ratas inyectadas con el AAV9-shNBCe1 y por lo tanto confirman molecularmente el desarrollo de hipertrofia cardíaca (shControl: $1 \pm 0,24$, $n=5$; shNBCe1*: $2,18 \pm 0,44$, $n=5$; * $p < 0,05$ vs. shControl).

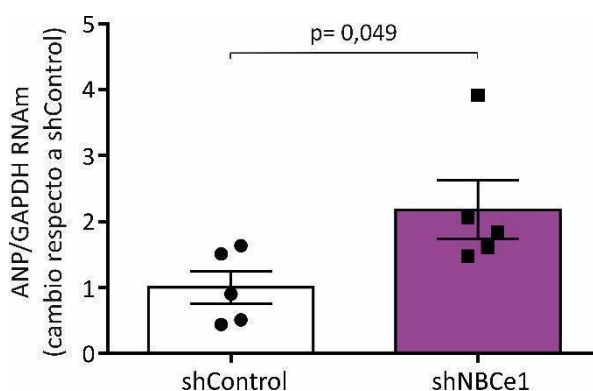


Figura 26. Datos promedio de la cuantificación por qPCR de los niveles de RNA mensajero del gen ANP, normalizado con el gen GAPDH. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. shControl.

3- Estudio electrofisiológico del tejido cardíaco: Medida de la duración del potencial de acción cardíaco (PAC). Análisis de la actividad eléctrica del corazón mediante electrocardiograma (ECG).

Teniendo en cuenta que la corriente generada por la activación del NBCe1 (I_{NBC}) puede provocar cambios en el potencial de acción cardíaco (PAC), se analizó mediante la técnica *patch clamp* en buffer bicarbonato la duración del mismo en miocitos ventriculares aislados de los dos grupos ensayados (Figura 27). Se encontró que aquellos animales a los cuales se les silenció el NBCe1 presentaban un aumento significativo en la duración de su PAC, medido al 50% de la repolarización (APD_{50}) (mseg; shControl: $45,21 \pm 4,74$, $n=10$; shNBCe1*: $75,06 \pm 14,3$, $n=9$; * $p < 0,05$ vs. shControl). Con respecto al APD_{90} , no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Además, los animales del grupo AAV9-shNBCe1 presentaron un potencial de membrana en reposo (PMR) más positivo que las ratas del grupo control (PMR (mV): shControl: $-80,18 \pm 0,51$, $n=11$; shNBCe1*: $-73,82 \pm 2,18$, $n=10$; * $p < 0,05$ vs. shControl). Estos resultados son coherentes con la disminución de la actividad del NBCe1 encontrada en los miocitos aislados de estas ratas, hecho que estaría impactando a su vez en la corriente I_{NBC} y provocando estos cambios en el potencial de las células.

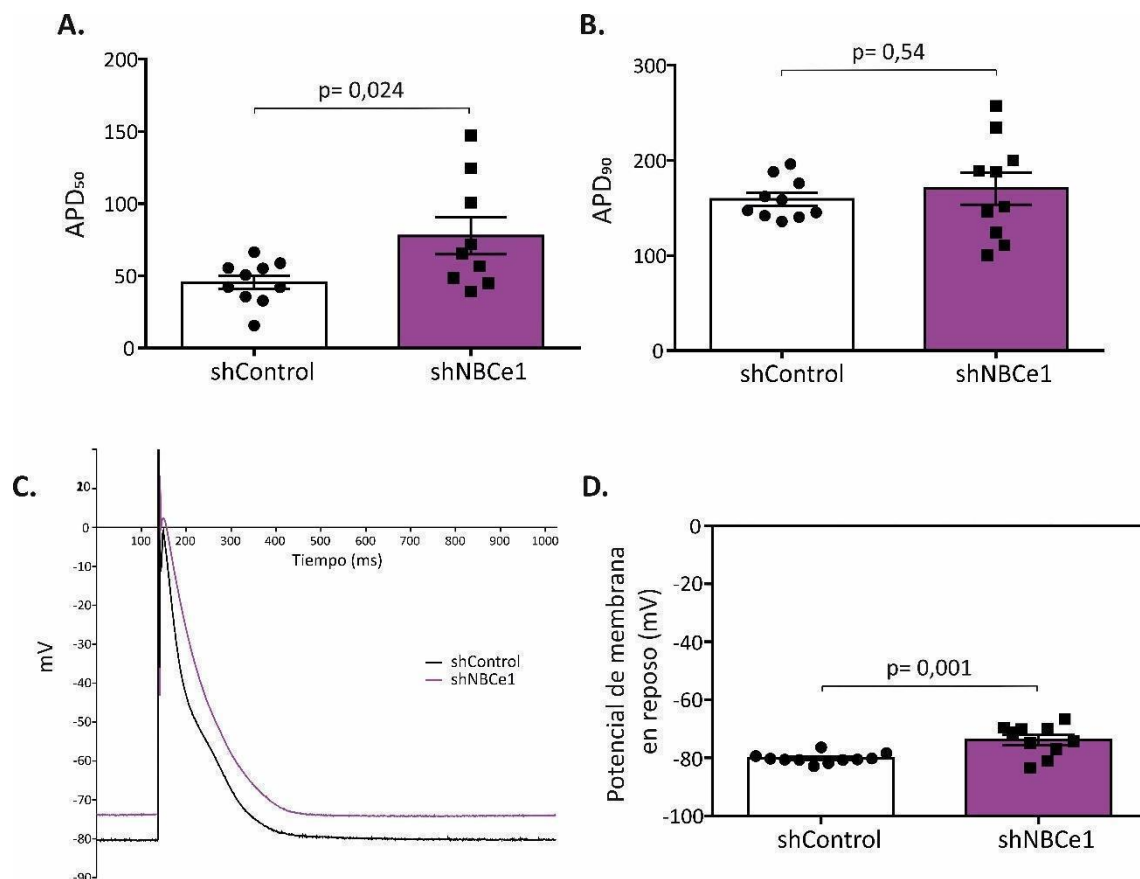


Figura 27. **A.** Datos promedio de duración del potencial de acción al 50% de la repolarización (APD_{50}) medido en células aisladas. **B.** Datos promedio del potencial de acción al 90% de la repolarización (APD_{90}) medido en células aisladas. **C.** Trazos representativos del PAC registrado en células

ventriculares aisladas en ambos grupos experimentales. **D.** Datos promedio de potencial de membrana en reposo medido en células aisladas. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. shControl.

Asimismo, se realizaron en cardiomiocitos ventriculares aislados las mismas mediciones en buffer HEPES libre de bicarbonato para confirmar que los datos obtenidos en la Figura 27 fueran explicados por la presencia de la corriente I_{NBC} (Figura 28). No se encontraron diferencias significativas en el PMR o en la duración del PAC entre las células de ambos grupos experimentales (PMR (mV): shControl: $-80,3 \pm 0,72$, $n=10$; shNBCe1: $-77,73 \pm 2,18$, $n=4$; APD_{50} (mseg): shControl: $70,6 \pm 5,86$, $n=8$; shNBCe1: $76,07 \pm 7,44$, $n=6$; $*p < 0,05$ vs. shControl). Estos resultados señalan que sólo se encontraron cambios electrofisiológicos en las células aisladas de miocitos de ratas shNBCe1 en buffer bicarbonato, por lo cual se pueden atribuir a la presencia de la corriente repolarizante asociada al NBCe1, I_{NBC} , ausente en buffer HEPES.

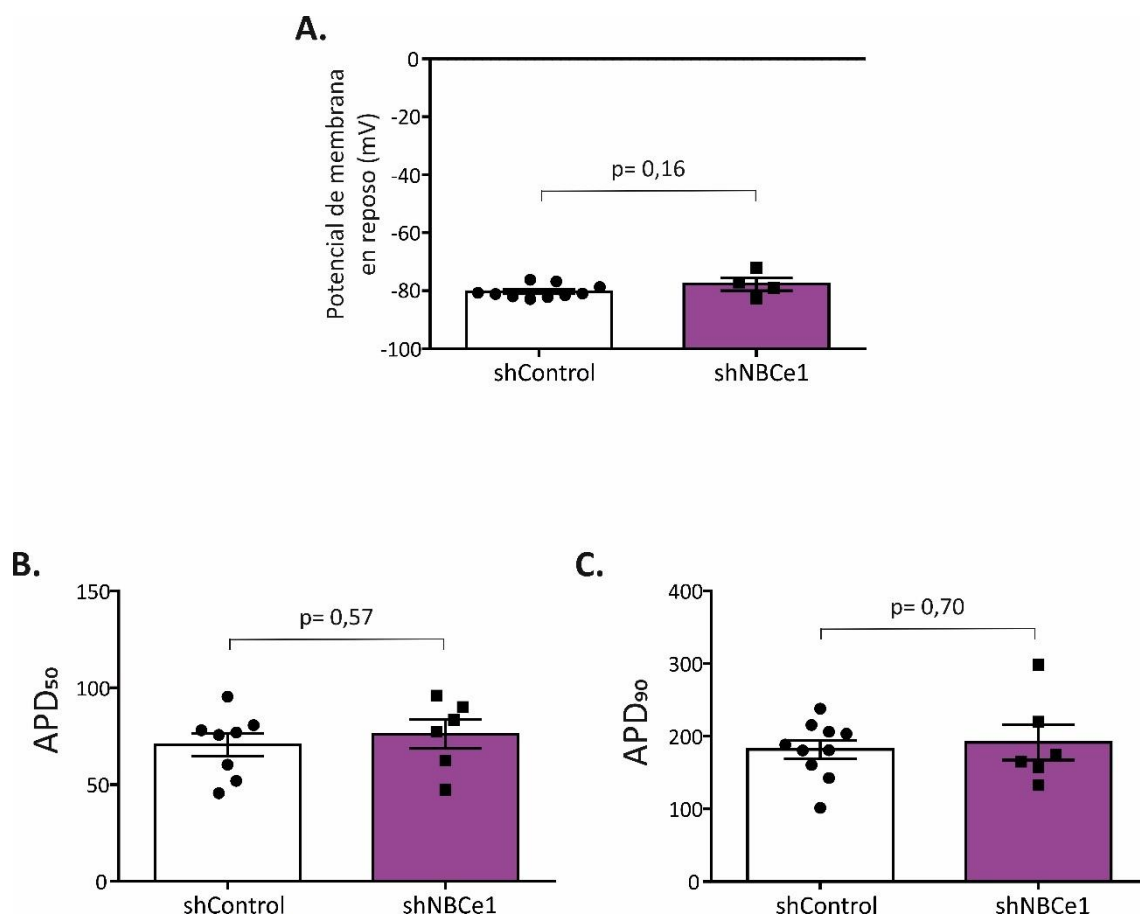


Figura 28. **A.** Datos promedio de potencial de membrana en reposo medido en células aisladas. **B.** Datos promedio de duración del potencial de acción al 50% de la repolarización (APD_{50}) medido en células aisladas. **C.** Datos promedio del potencial de acción al 90% de la repolarización (APD_{90}) medido

en células aisladas. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. shControl.

Por otro lado, para realizar un estudio más completo de las consecuencias electrofisiológicas de silenciar el NBCe1 también se evaluó la actividad eléctrica ventricular de ambos grupos mediante electrocardiograma, realizados antes y luego de 1 mes de tratamiento. Se analizó la duración del intervalo QT corregido por frecuencia cardíaca (QTc), que corresponde a la despolarización y repolarización ventricular en cada ciclo cardíaco, por lo que su duración es un reflejo de la duración del potencial de acción de cada miocito ventricular. Se encontró un aumento significativo del mismo en las ratas que tenían silenciado el NBCe1 cardíaco. Asimismo, la frecuencia cardíaca no presentó variaciones entre los grupos (Figura 29). Estos datos coinciden con el aumento significativo encontrado en la duración del potencial de acción cardíaco de las células aisladas en la Figura 27.

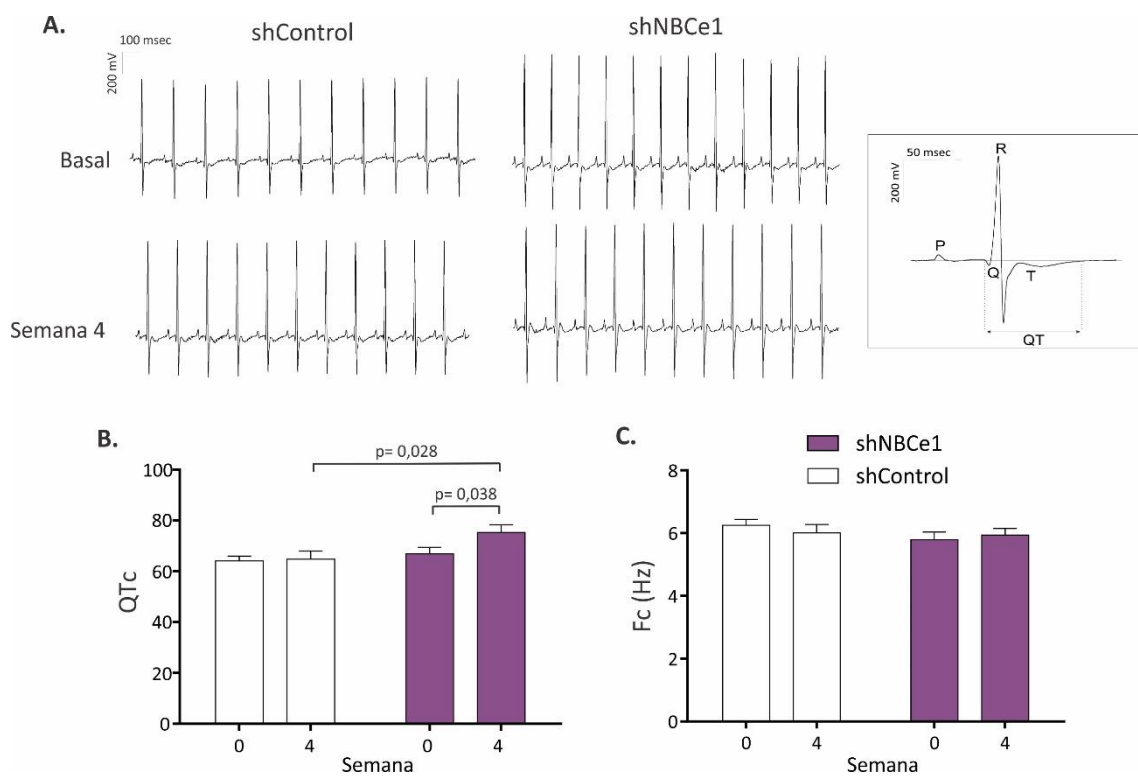


Figura 29. A. Imágenes representativas de los registros de ECG obtenidos para ambos grupos experimentales al inicio y al final del tratamiento. **(Recuadro)** Esquema representativo del ECG de rata. **B:** Datos promedio del intervalo QT corregido por la frecuencia cardíaca (QTc), obtenidos por ECG durante todo el tratamiento. **C.** Datos promedio de la frecuencia cardíaca, obtenida por ECG durante todo el tratamiento. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos vías corregido por test de Sidak, considerándose significativo un $p < 0,05$, indicado en el gráfico.

4- Estudio fisiológico y molecular del tejido cardíaco: Evaluación de la actividad de NBCe1 mediante monitoreo de pH_i en un sistema de epifluorescencia. Análisis de los perfiles proteicos de los transportadores alcalinizantes de membrana vía western blot. Determinación de cantidad de colágeno en preparados histológicos. Estudio de amplitud de transitorios de calcio y frecuencia de ondas de calcio en cardiomiocitos aislados.

Para medir la función del cotransportador NBCe1 cardíaco se aislaron miocitos de los corazones de los animales luego de 1 mes de la inyección sistémica con shControl o shNBCe1. Los cardiomiocitos se cargaron con un indicador fluorescente ratiométrico sensible a pH, BCECF-AM, y la fluorescencia se registró con el sistema *IonOptix*. Se realizó además una curva de calibración para transformar ese valor en pH, utilizando soluciones con pH conocido. Se midió el aumento de pH_i generado por la técnica "Pulso de K^+ " en la cual las células se despolarizan y se activan de esta forma únicamente los mecanismos electrogénicos. Entonces, la diferencia de pH_i registrada es debida al funcionamiento del NBCe1, que actuará ingresando HCO_3^- y por lo tanto alcalinizando el interior celular.

El análisis de los datos confirma que además de haberse generado una disminución de la expresión del NBCe1 cardíaco en los animales inyectados con shNBCe1, la función de este cotransportador se encuentra también significativamente reducida (Figura 30) (shControl: $0,15 \pm 0,05$, $n=5$; shNBCe1*: $0,03 \pm 0,02$, $n=7$; * $p < 0,05$ vs. shControl).

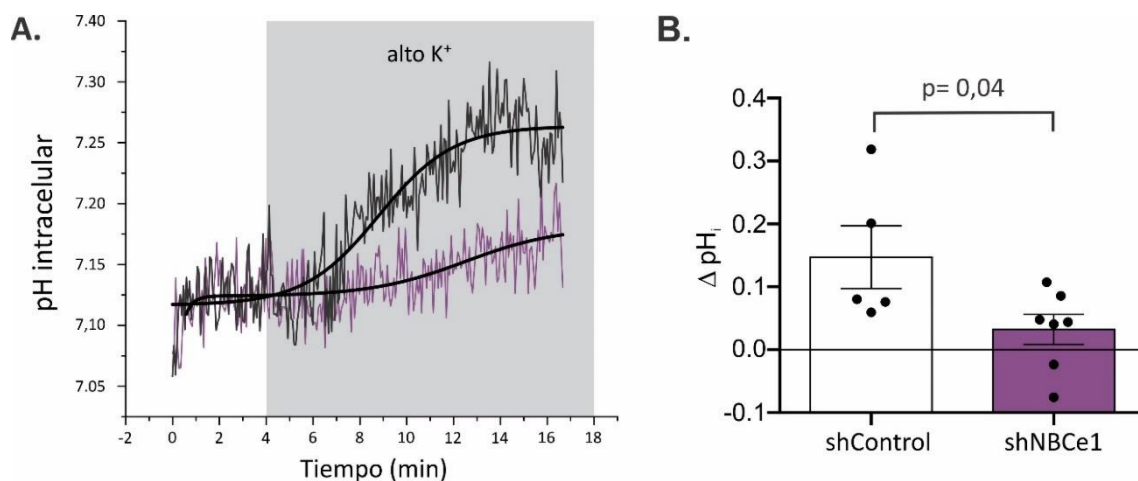


Figura 30. A. Figura representativa de los registros de pH_i medidos en células cardíacas aisladas con el indicador BCECF-AM en un microscopio mediante epifluorescencia con el sistema *IonOptix*. **B.** Datos promedio de la diferencia de pH_i en los registros antes y después del pulso de K^+ . El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. shControl.

Con la hipótesis de que podría existir una maniobra compensadora para el silenciamiento del NBCe1 cardíaco, teniendo en cuenta que no es el único mecanismo alcalinizante sarcolemal, se buscaron cambios en la expresión proteica de NBCn1 y NHE1. El análisis de estos resultados confirma que ambos se encuentran aumentados significativamente en aquellas ratas que tienen disminuido el NBCe1 (NHE1: shControl: $1\pm 0,14$, $n=6$; shNBCe1*: $1,91\pm 0,32$, $n=5$; * $p<0,05$ vs shControl; NBCe1: shControl: $1\pm 0,09$, $n=5$; shNBCe1*: $1,47\pm 0,15$, $n=5$; * $p<0,05$ vs. shControl) (Figura 31). Esta sobreexpresión compensatoria podría ser la causante de la hipertrofia cardíaca encontrada en el modelo, puesto que se esperaría frente a la misma un aumento en el ingreso de Na^+ a las células, lo cual indirectamente podría sobrecargar al miocito de Ca^{2+} y activar vías pro-hipertróficas.

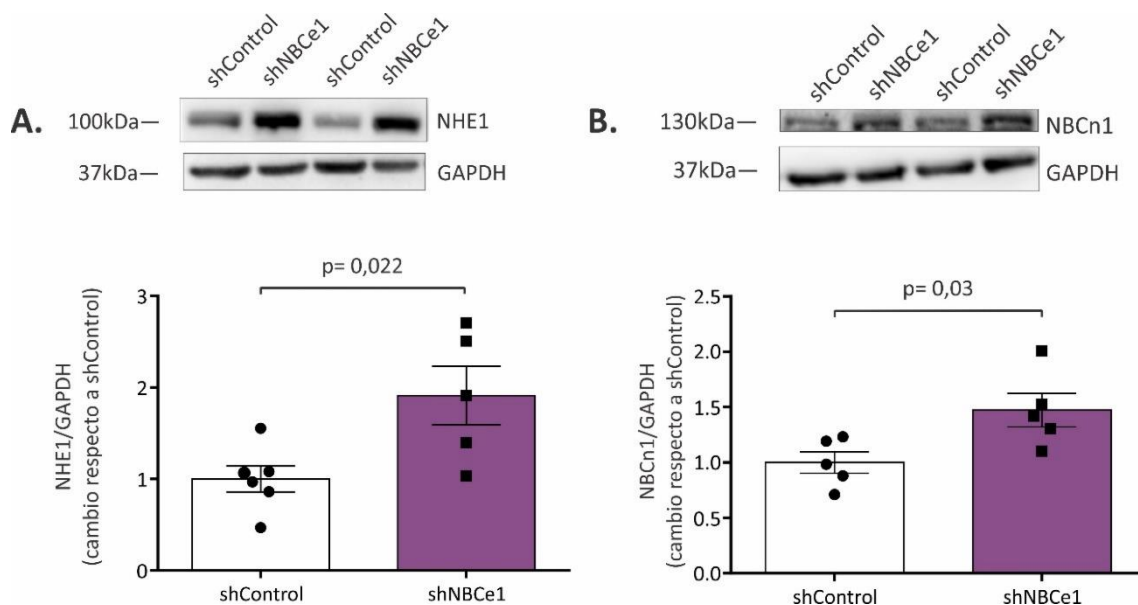


Figura 31. A. Western Blots representativos de la expresión proteica de NHE1 normalizado por GAPDH y su correspondiente análisis densitométrico. **B.** Western Blots representativos de la expresión proteica de NBCn1 normalizado por GAPDH y su correspondiente análisis densitométrico. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p<0,05$ vs. shControl.

Para confirmar esta hipótesis se evaluó mediante microscopía de fluorescencia en un microscopio confocal los niveles de Ca^{2+} en cardiomiocitos aislados cargados con el indicador Fluo 4-AM, sensible a Ca^{2+} . El análisis de la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} no indica que existan diferencias entre los dos grupos ensayados (Figura 32 A). Sin embargo, las células aisladas de las ratas inyectadas con AAV9-shNBCe1 presentaron una mayor frecuencia de

ondas de calcio, debidas a la liberación espontánea de calcio del retículo sarcoplásmico, como puede observarse en las imágenes representativas (Figura 32 B).

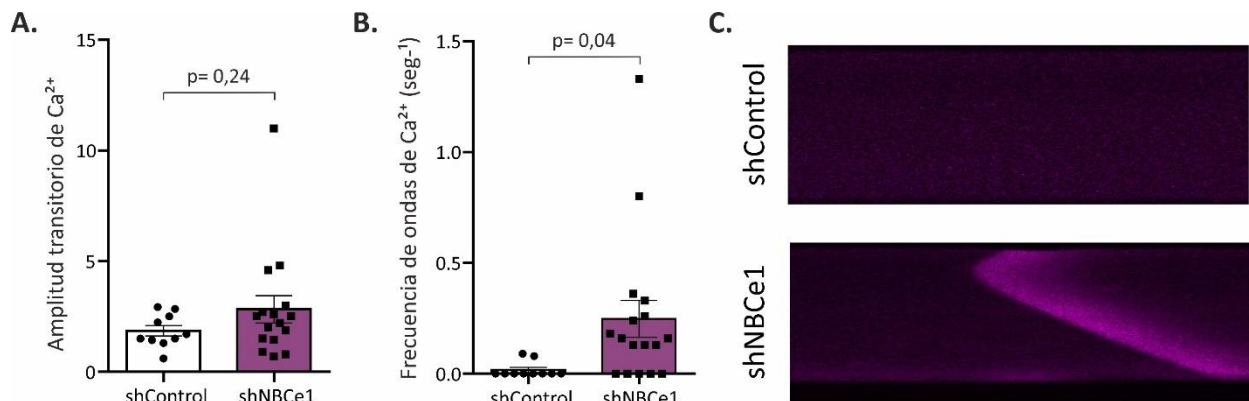


Figura 32. **A.** Datos promedio de la amplitud de los transitorios de calcio en células aisladas luego de un mes de tratamiento para ambos grupos experimentales. **B.** Datos promedio de la frecuencia de ondas de calcio medidos en células aisladas luego de un mes de tratamiento para ambos grupos experimentales. **C.** Imágenes representativas tomadas con microscopía confocal de fluorescencia. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. shControl.

Por otro lado, para evaluar la posible presencia de fibrosis en las ratas que carecían parcialmente de NBCe1 se cuantificó mediante la técnica *Picrosirius red* el colágeno total en cortes histológicos de los ventrículos izquierdos tomados de ambos grupos de animales (Figura 33). El colágeno es una proteína fibrilar secretada principalmente por fibroblastos y cuya cantidad aumenta en presencia de una fibrosis. Asimismo, se discriminó entre colágeno tipo I y tipo III y se calculó la relación de los mismos. En ambos casos no se encontraron diferencias significativas en las muestras evaluadas.

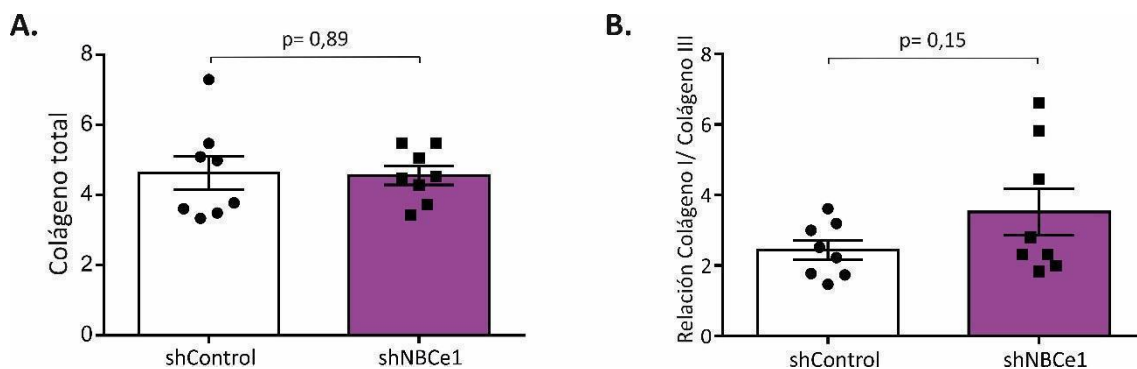


Figura 33. **A.** Datos promedio de la determinación de colágeno total medido en preparados histológicos de ventrículos para ambos grupos experimentales. **B.** Datos promedios de la relación

colágeno I/colágeno III medido en preparados histológicos de ventrículos para ambos grupos experimentales. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. shControl.

Discusión de Objetivo específico 1

En esta primera parte del trabajo se administró sistémicamente en ratas Wistar adultas un vector viral adenoasociado recombinante para generar el silenciamiento del cotransportador sodio/bicarbonato electrogénico cardíaco (NBCe1). Se demostró que este vector, AAV9-shNBCe1, es efectivo para alcanzar los miocitos cardíacos, como puede observarse en los preparados histológicos que a través de microscopía confocal se visualizan verdes por la presencia de la proteína fluorescente verde (GFP), que se encuentra tanto en el vector AAV9-shNBCe1 como en el control AAV9-shControl. Además, el análisis de la expresión proteica de NBCe1, medida por western blot y cuantificada por densitometría mostró una disminución significativa en las ratas inyectadas con el vector AAV9-shNBCe1. En conjunto, estos resultados, demuestran una transducción viral exitosa.

Asimismo, se demostró que las ratas que tienen silenciado el NBCe1 también presentan una reducción significativa de su actividad. Estos resultados se obtuvieron gracias a la maniobra pulso de K^+ , que consiste en cambiar el medio extracelular en el que se encuentran los miocitos aislados desde una solución con K^+ normal hacia otra con K^+ alto, provocando una despolarización en las células que activa al NBCe1.

Por otro lado, el seguimiento ecocardiográfico de ambos grupos de ratas demuestra que sólo el grupo que carece parcialmente del NBCe1 desarrolla hipertrofia cardíaca (HC), hecho avalado conjuntamente con el incremento significativo del tamaño de los miocitos, medido en preparados histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, y con el aumento del gen pro-hipertrófico ANP en las ratas mencionadas.

En este sentido, el aumento hallado en el intervalo QTc de las ratas hipertróficas medido a través del ECG podría ir de la mano con los resultados anteriores, teniendo en cuenta que la HC genera un incremento de este parámetro. Sin embargo, para la discusión de este dato no debe dejarse de lado la contribución de la corriente repolarizante I_{NBC} , que en este caso se encontraría reducida generando el alargamiento del PAC observado al 50% de la repolarización y pudiendo explicar también el alargamiento del intervalo QTc mencionado. El hecho de que en buffer libre de HCO_3^- no se encuentran diferencias significativas en el PMR o en la duración del PAC confirma que los cambios electrofisiológicos hallados en los animales

que tienen silenciado el NBCe1 son causados por los efectos de esta maniobra en la actividad y la corriente del NBCe1 cardíaco.

EL aumento en la duración del PAC observado en miocitos ventriculares aislados fue significativo al 50% de la repolarización, pero no al 90% de la misma. Como el potencial de reversión esperado para I_{NBC} es cercano a -95mV , una posible explicación para esta discordancia es que la relevancia de esta corriente en el PAC es más importante a potenciales a nivel de la meseta que a potenciales cercanos al potencial de membrana en reposo.

Los resultados expuestos en este apartado del trabajo sugieren que la HC se desarrolla, al menos en parte, por la disminución de la expresión del NBCe1. Esta HC, además, se da independientemente de cambios vasculares, puesto que no se encontraron diferencias significativas en la presión sistólica de ambos grupos experimentales. Cabe destacar que además no se reporta expresión de NBCe1 en arterias coronarias, cerebrales y mesentéricas¹¹⁹. Sin embargo, sí se reporta presencia de ARNm de NBCe1 en arteriolas aferentes renales de ratón, tanto en células musculares lisas como en células endoteliales¹⁸².

Se propone que esta reducción en la actividad y expresión del NBCe1 desencadena una respuesta compensatoria que implica el aumento de la expresión de los transportadores alcalinizantes restantes, NHE1 y NBCn1. En este sentido, ya existen reportes en ratones KO para NBCe1 del aumento en los niveles de mRNA de NHE1¹⁸³. Se podría esperar además un concomitante incremento en la actividad de los mismos, lo cual generaría un mayor ingreso de Na^+ intracelular. De haber un aumento en la concentración intracelular de Na^+ , se desplazará el potencial de inversión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) hacia valores más negativos, provocando que el mismo actúe ingresando Ca^{2+} a la célula⁸⁴. Este mecanismo ya ha sido propuesto para explicar la activación de NCX dependiente del aumento de Na^+ por NHE1⁸⁴. El NCX, cuya estequiometría para el miocito cardíaco es $3\text{Na}^+:1\text{Ca}^{2+}$ ¹⁸⁴, puede funcionar tanto en modo directo como inverso, con la dirección de transporte determinada por el voltaje transmembrana y la concentración de los iones intercambiados. Además, se ha descrito que en modelos de hipertrofia cardíaca existe un aumento tanto del Na^+ como del Ca^{2+} intracelular¹⁸⁵⁻¹⁸⁸.

El Ca^{2+} es necesario para la contracción a corto plazo, pero en caso de mantenerse elevado en el tiempo, podría actuar como una señal hipertrófica activando vías dependientes de

calcineurina (CaN) y el factor nuclear de células T activadas (NFAT)¹⁸⁹ o de la quinasa regulada por Ca^{2+} y calmodulina (CaMKII), que culminaría con la expresión de genes fetales y pro-hipertróficos^{87; 190}: los péptidos natriuréticos BNP y ANP, las cadenas pesadas de miosina (α -MHC, β -MHC), cadena liviana de miosina 2, entre otros.

En las ratas hipertróficas inyectadas con el shNBCe1 no se ha encontrado un aumento significativo del Ca^{2+} intracelular, sin embargo se observa una tendencia. Los datos obtenidos de cardiomiocitos aislados para el grupo shNBCe1 tienen mayor variabilidad, lo cual podría explicarse por la posibilidad de que se hayan medido células no transducidas. La eficiencia de transducción nunca fue del 100%, lo cual se ha comprobado observando las células en un microscopio de fluorescencia en varios aislamientos y además puede deducirse en las imágenes representativas de la Figura 21 A, en la cual se pueden distinguir cardiomiocitos con menor intensidad de verde. Debe tenerse en cuenta que las células cardíacas presentan cierta autofluorescencia cuando son estimuladas con luz de longitudes de onda cercanas al verde. Por el contrario, sí se observó un incremento significativo de la frecuencia de ondas de calcio espontáneas en las ratas hipertróficas.

Por todo esto, se propone a la sobrecarga de Na^+ generada por la ausencia del NBCe1 como la responsable de la HC encontrada. De hecho, existen varios estudios que enfatizan en el aumento de Na^+ encontrado en modelos de HC¹⁸⁵⁻¹⁸⁸, a pesar de que los métodos de medición de Na^+ son variados y la mayoría tiene limitaciones.

Adicionalmente, estos datos ayudan a esclarecer la patogenia del modelo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR), en el que se encontró una disminución de la expresión del NBCe1 en membrana en conjunto con una funcionalidad reducida⁸⁹, pudiendo así establecer la causalidad de su hipertrofia cardíaca. Por otro lado, también son consistentes con los resultados encontrados previamente en el grupo de trabajo, que indican que ANG II, hormona pro-hipertrófica, es capaz de activar al NBCn1 y al mismo tiempo inhibir al NBCe1⁶⁸.

En conclusión, el aumento compensador en la expresión de NBCn1 y NHE1 generado a partir de silenciar al NBCe1 provocaría un incremento en la concentración intracelular de Na^+ . Como se ha dicho, el NBCe1 actúa regulando el pH de manera más eficiente por incorporar menor cantidad de Na^+ (1/2 molécula por cada molécula de HCO_3^-) a comparación del NBCn1. Se

generaría entonces por acción del NCX una sobrecarga de Ca^{2+} , que resultaría ser deletérea para las células cardíacas y desencadenaría el desarrollo de una hipertrofia cardíaca.

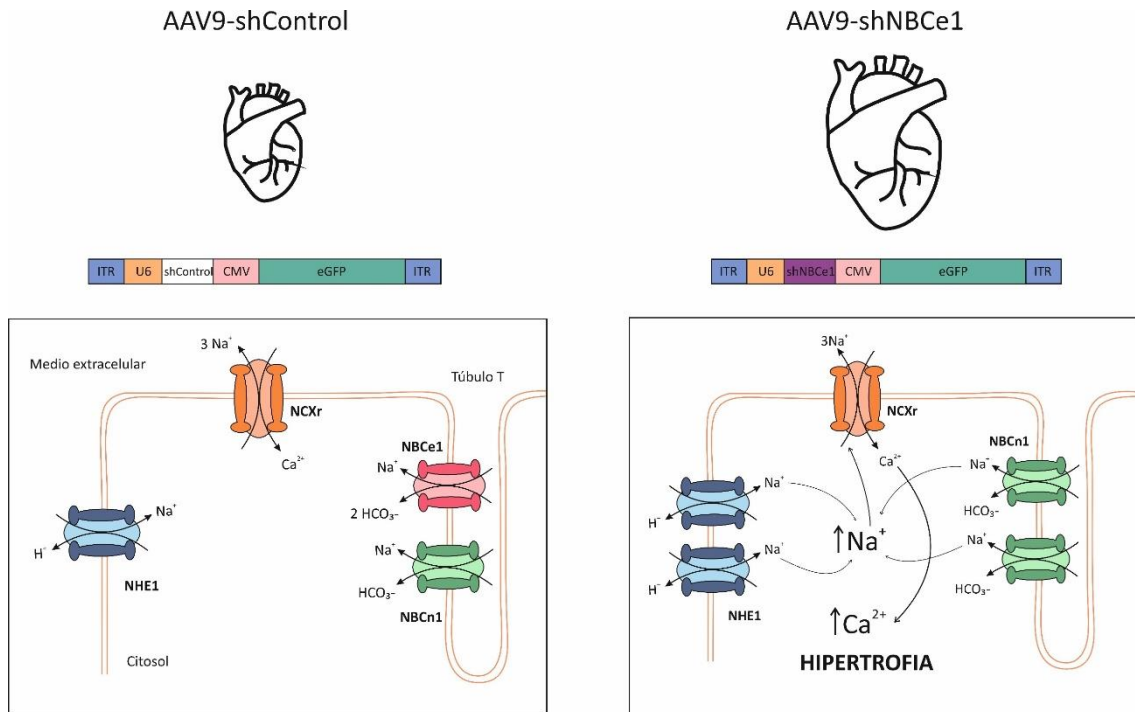


Figura 34. Panel derecho. Fisiología normal: corazón normotrófico con todos los mecanismos alcalinizantes activos. **Panel izquierdo.** Cardiomiocito con silenciamiento del NBCe1: corazón hipertrófico con sobreexpresión del NBCn1 y NHE1 y sobrecarga de Ca^{2+} .

Objetivo específico 2

Evaluar las consecuencias de la sobreexpresión del NBCe1 en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), un modelo de hipertrofia cardíaca (HC) por incremento sostenido de la presión arterial. Teniendo en cuenta que una disminución del NBCe1 puede llevar al desarrollo de hipertrofia cardíaca, se sugiere que un aumento del NBCe1 podría llevar a revertir la hipertrofia una vez establecida. Para este fin, se diseñó un vector viral adeno-asociado cardioprotector para la sobreexpresión del NBCe1 (AAV9-NBCe1).

Objetivos propuestos

- 1- Administración sistémica de los vectores AAV9-NBCe1 y AAV9-mCherry en ratas SHR adultas y comprobación de eficiencia de transducción. Seguimiento de crecimiento y presión arterial.
- 2- Estudio morfométrico del tejido cardíaco: Análisis del tamaño y función ventricular por ecocardiografía y tamaño de las células cardíacas por medición en preparados histológicos.

1- Administración sistémica de los vectores AAV9-NBCe1 y AAV9-mCherry en ratas SHR adultas y comprobación de eficiencia de transducción. Seguimiento de crecimiento y presión arterial.

Se inyectaron ambos vectores virales (AAV9-NBCe1 y AAV9-mCherry) en la vena lateral de la cola de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) macho de 3-4 meses de edad. Durante las 7 semanas de duración del tratamiento se realizó la medida de presión arterial por el método pletismográfico de registro de presión sistólica en la vena de la cola. No se registraron cambios en la presión arterial a lo largo del tiempo entre estos animales (Figura 35 A). Además, se estudió la variación del peso de los roedores y tampoco se encontraron cambios significativos entre ambos grupos (Figura 35 B).

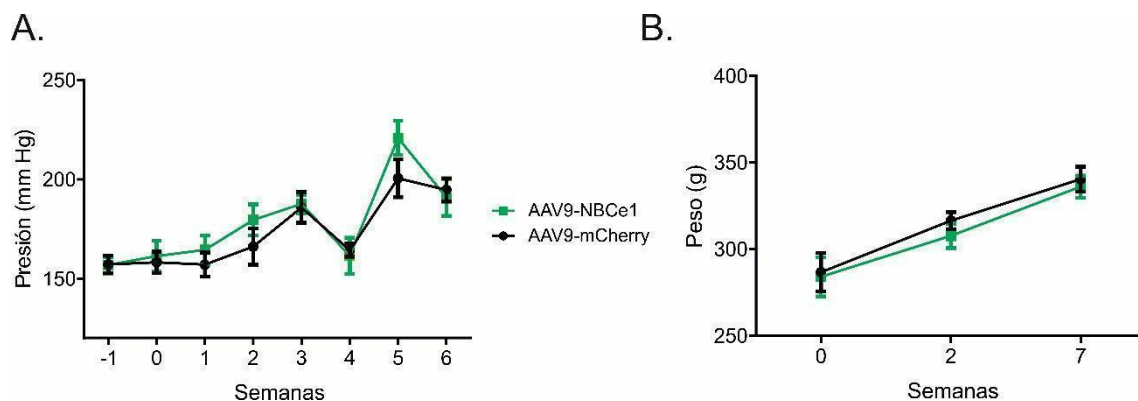


Figura 35. A. Registro de la presión arterial medida por el método pletismográfico a lo largo de todo el tratamiento. **B.** Datos promedio del peso de ambos grupos de ratas durante todo el tratamiento. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos vías corregido por test de Sidak, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry.

Para comprobar la eficiencia de transducción del vector viral recombinante, se midió la expresión proteica de NBCe1 en estas ratas. Se encontró un aumento de la expresión del NBCe1 de aproximadamente un 50% con respecto a los animales control (AAV9-mCherry: $1,0 \pm 0,09$, $n=6$; AAV9-NBCe1*: $1,53 \pm 0,17$, $n=5$, * $p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry).

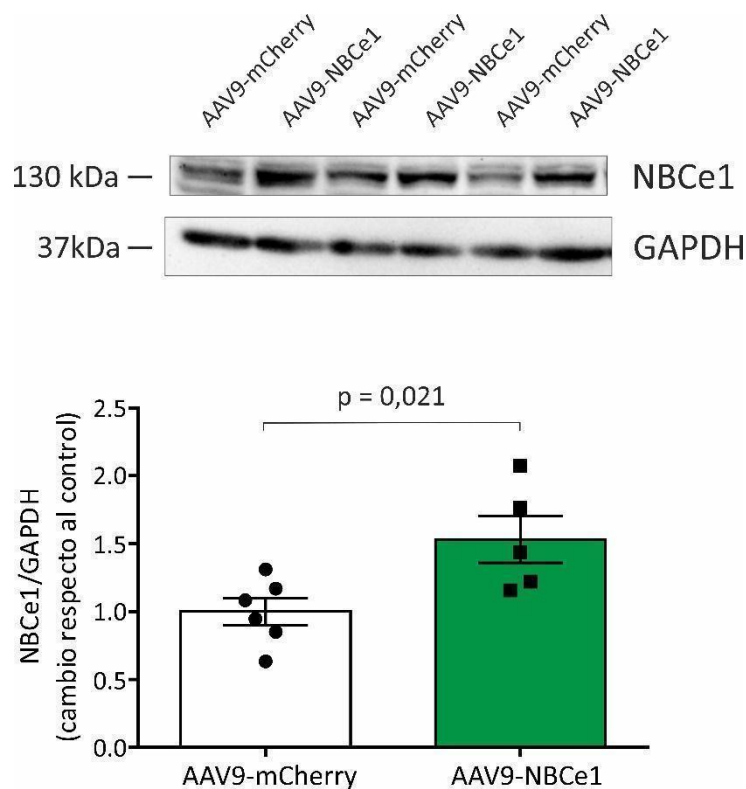


Figura 36. Western Blots representativos de la expresión proteica de NBCe1 normalizada por GAPDH y su correspondiente análisis densitométrico. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry.

2- Estudio morfométrico del tejido cardíaco: Análisis del tamaño y función ventricular por ecocardiografía y tamaño de las células cardíacas por medición en preparados histológicos.

Con el objetivo de evaluar si el vector AAV9-NBCe1 es capaz de provocar cambios en el tamaño ventricular, se realizó un seguimiento ecocardiográfico de los animales de ambos grupos durante las 7 semanas post-inyección. Se encontró en aquellas ratas inyectadas con el AAV9-NBCe1 un aumento significativo de la masa ventricular izquierda (MVI) y del índice de masa ventricular izquierda (IMVI), indicando que la hipertrofia cardíaca ya establecida se había incrementado. Cuando se comparó el cambio en el tiempo del IMVI de los dos grupos experimentales (Figura 37 C) se encontró una tendencia de las ratas SHR que sobreexpresan el NBCe1 a presentar un incremento de este parámetro a comparación con las ratas control.

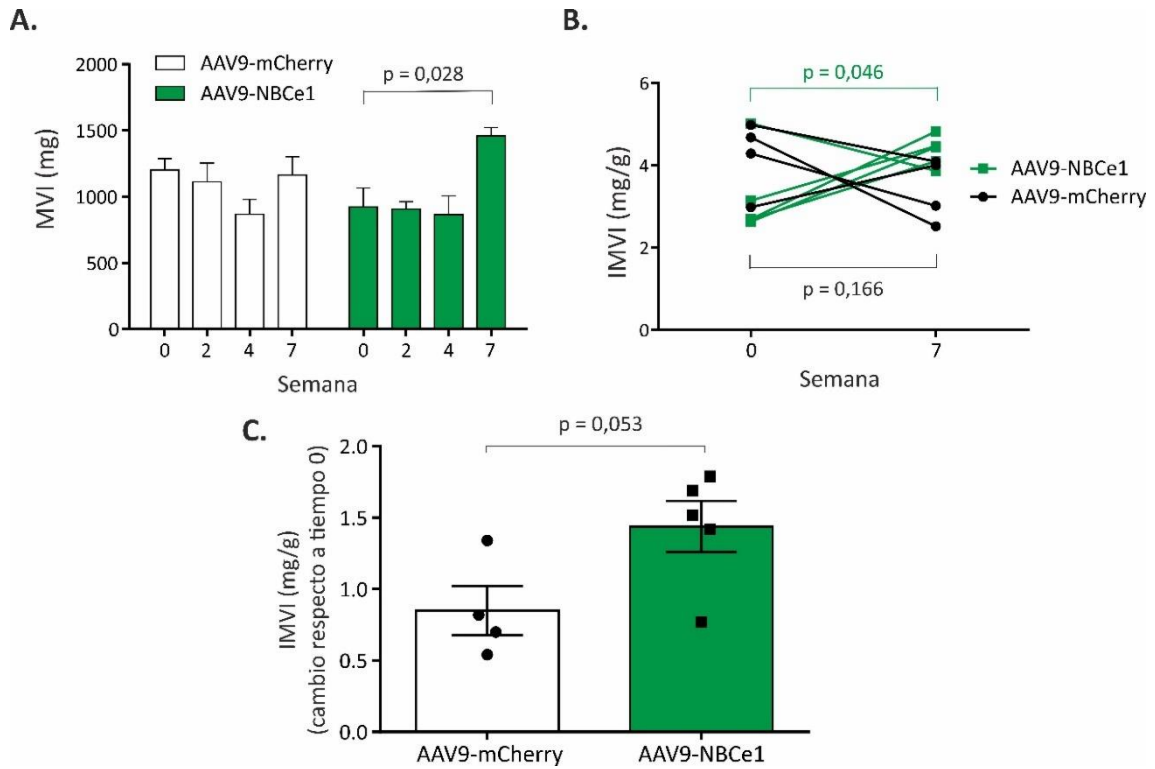


Figura 37. A. Datos promedio de la masa ventricular izquierda (MVI) durante todo el tratamiento. **B.** Datos individuales del índice de masa ventricular izquierdo (IMVI) normalizado por el peso del animal al principio y una vez finalizado el tratamiento. **C.** Datos promedio del IMVI con respecto al tiempo cero de tratamiento para cada grupo de animales. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student o ANOVA de dos vías corregido por test de Sidak cuando correspondiese, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry.

Además, se analizó la correlación entre la expresión de NBCe1 y el IMVI en las ratas SHR de ambos grupos y se encontró un valor $p = 0,0028$ en la prueba de correlación de Pearson.

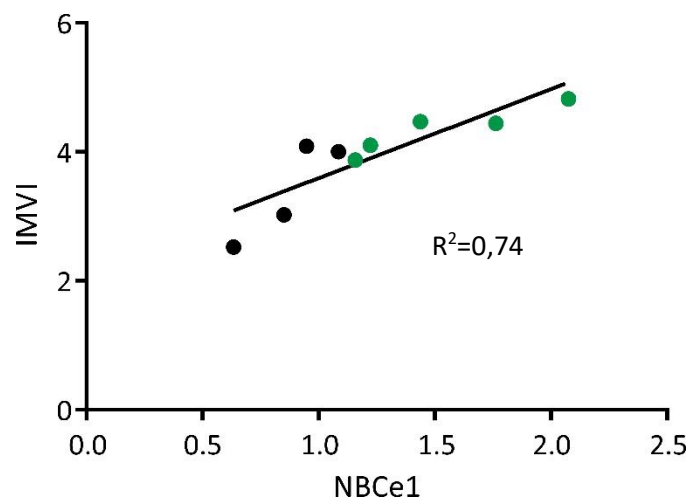


Figura 38. Relación lineal entre el índice de masa ventricular izquierda y la expresión proteica de NBCe1 en las ratas SHR, tanto AAV9-mCherry (en negro) como AAV9-NBCe1 (en verde). El análisis estadístico fue realizado mediante test de correlación de Pearson, considerándose significativo un $p < 0,05$.

Por otro lado se analizó el espesor de la pared ventricular, que en una hipertrofia cardíaca se encuentra característicamente aumentado. Sin embargo, no se encontraron cambios significativos en la comparación del mismo entre ambos grupos experimentales (AAV9-mCherry: $1,062 \pm 0,22$, $n=4$; AAV9-NBCe1: $1,21 \pm 0,15$, $n=5$, $*p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry) (Figura 39).

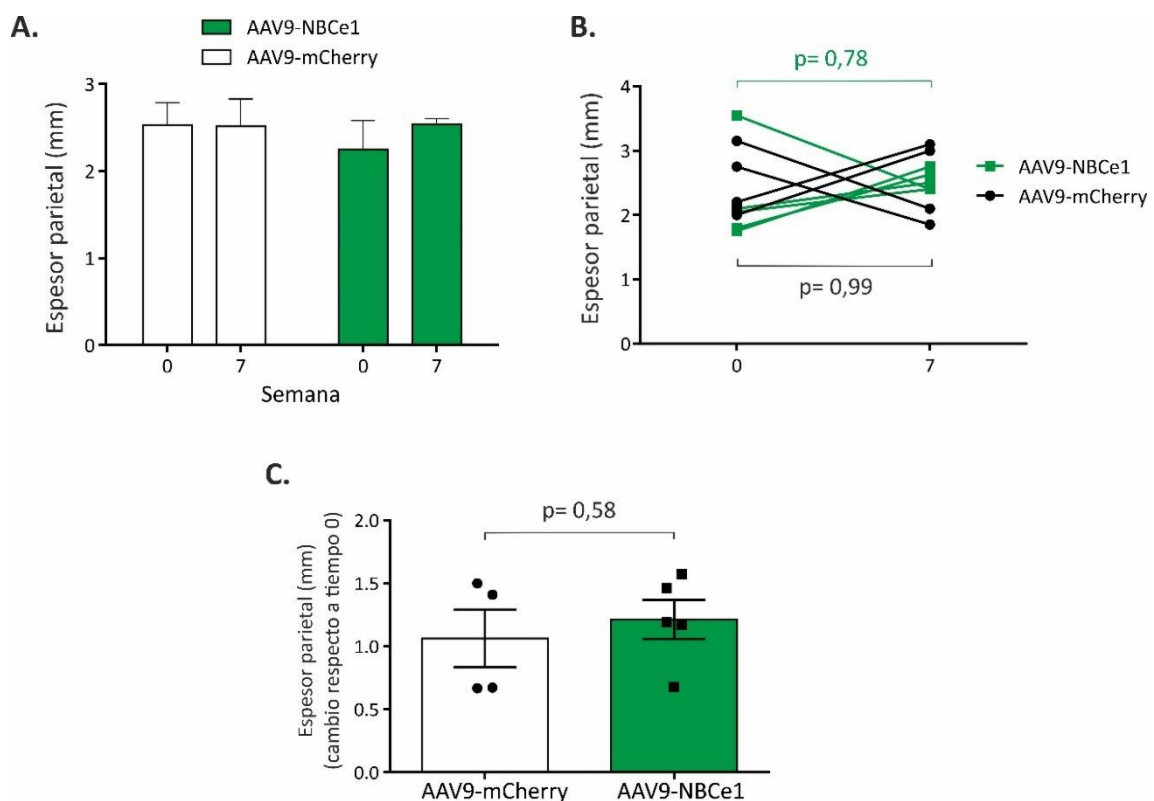


Figura 39. A. Datos promedio del espesor de la pared ventricular al comienzo y al final del tratamiento. **B.** Datos individuales del espesor de la pared ventricular al comienzo y al final del tratamiento. **C.** Datos promedio del espesor parietal con respecto al tiempo cero de tratamiento para cada grupo experimental. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student o ANOVA de dos vías corregido por test de Sidak cuando correspondiese, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry.

Asimismo, se evaluó la función cardíaca representada por los parámetros fracción de acortamiento y fracción de eyección mediante ecocardiografía bidimensional (Figura 40). Se

encontró que las ratas de la cepa SHR que sobreexpresan NBCe1 presentaban una función cardíaca conservada luego de las 7 semanas post inyección.

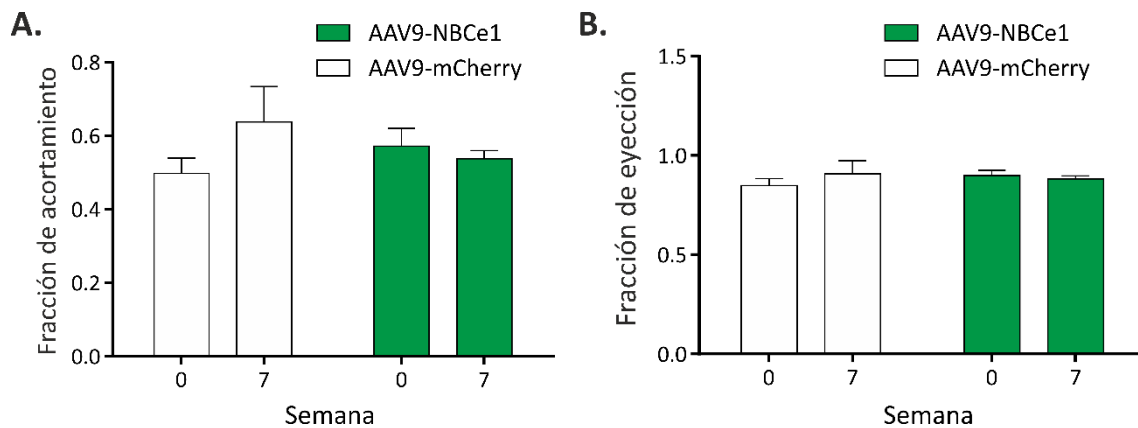


Figura 40. A. Datos promedio de la fracción de acortamiento al principio y 7 semanas post-inyección. **B.** Datos promedio de la fracción de eyección al comienzo y al final del tratamiento. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos vías corregido por test de Sidak, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry.

Por otro lado, los datos obtenidos a través de la medida del área de sección transversal en preparados histológicos de ventrículo teñidos con hematoxilina-eosina no demuestran que exista una diferencia significativa en el tamaño de los cardiomiocitos entre los grupos experimentales analizados (μm^2 ; AAV9-mCherry: $230,1 \pm 36,1$, $n=4$; AAV9-NBCe1: $262,2 \pm 45,68$, $n=5$, $*p < 0,05$ vs AAV9-mCherry).

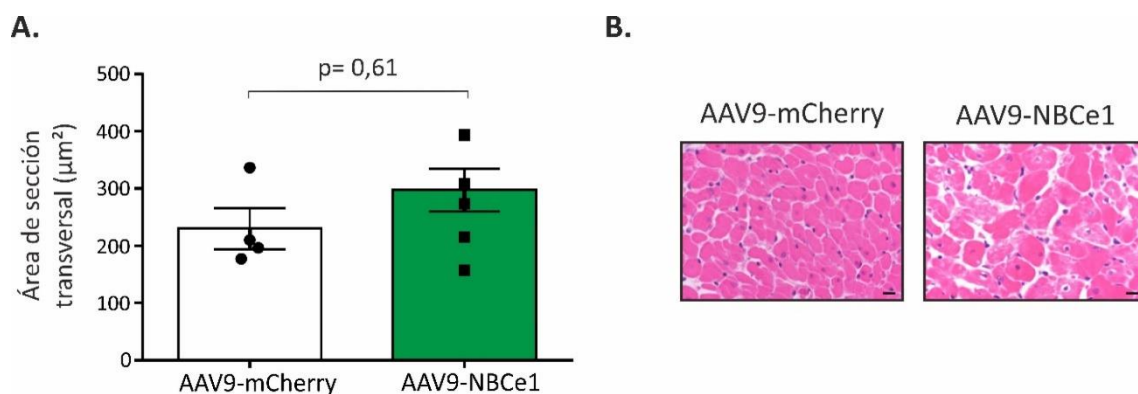


Figura 41. A. Cuantificación del área de sección transversal de los cardiomiocitos. **B.** Micrografías representativas de los preparados histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. 20x, las barras corresponden a $10\mu\text{m}$. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry.

Discusión de Objetivo específico 2

La hipertensión arterial es la causa principal de hipertrofia ventricular izquierda y falla cardíaca¹⁹¹. Una sobrecarga de presión sostenida en el tiempo puede llevar al desarrollo compensatorio de hipertrofia cardíaca (HC) y progresar luego a un estadio más severo con disfunción ventricular diastólica y sistólica y disfunción cardíaca. Las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) son un modelo de hipertensión arterial esencial ampliamente utilizado y se caracterizan por un aumento temprano de la presión arterial y una hipertrofia ventricular izquierda, que evoluciona lentamente hasta una disfunción ventricular y falla cardíaca en la madurez y senescencia¹⁹². La transición de HC compensada a HC con falla cardíaca se da acompañada por una fibrosis miocárdica marcada con un aumento en la relación colágeno tipo I/colágeno tipo III^{193; 194}. Esta cepa de animales desarrolla HC a partir de los 3 meses de edad¹⁹⁵.

Es de interés destacar que las ratas SHR poseen una sobre-activación del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA)¹⁹⁶, lo cual las hace susceptible a terapias que inhiben esta vía para el tratamiento tanto de la hipertensión¹⁹⁷, la hipertrofia cardíaca¹⁹⁸ o la fibrosis¹⁹⁹.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en ratas Wistar normotróficas que avalan el desarrollo de HC generado a partir del silenciamiento génico del NBCe1 cardíaco, se razonó que podría ser beneficioso sobreexpresar el NBCe1 en un modelo donde la misma se encontrara francamente establecida -las ratas SHR- en la búsqueda de una terapia exitosa para esta patología. Con este fin, se inyectaron dos grupos de ratas SHR: un grupo con un vector viral cardioprotéico que sobreexpresa NBCe1 (AAV9-NBCe1) y un segundo grupo con un vector control que sobreexpresa la proteína fluorescente roja mCherry (AAV9-mCherry). Por impedimentos de tamaño génico fue imposible generar un vector combinando NBCe1 y la proteína mCherry, puesto que el tamaño combinado de ambos genes superaría la capacidad de empaquetamiento de los AAVs (4,7 Kb). Debe considerarse que todos estos resultados están enmarcados en un miocardio que sobreexpresa NBCe1, como lo demuestra el aumento significativo del 50% en la expresión proteica del mismo en las ratas SHR inyectadas con el vector viral AAV9-NBCe1.

Para un estudio más exhaustivo y teniendo en cuenta además el modelo utilizado, ratas hipertensas, se registró la presión sistólica por el método pletismográfico de medición en la

vena de la cola de los animales y no se encontraron cambios significativos en la misma en ninguno de los grupos experimentales a lo largo del tratamiento.

Se realizó el seguimiento ecocardiográfico de estos animales, encontrando que ni a las 2 semanas ni al mes de tratamiento se registraron cambios en el tamaño ventricular. Por esto, se decidió prolongar el tratamiento unas semanas más, hasta completarlo en la semana 7 post inyección, en la que se observó un aumento en la HC de las ratas inyectadas con AAV9-NBCe1, medida que basalmente estos animales ya poseían aumentada por su hipertensión. Sin embargo, el análisis de los resultados obtenidos de la medida de área transversal de los cardiomiocitos en preparados histológicos teñidos con hematoxilina-eosina no demuestra que existan diferencias significativas entre los grupos en este aspecto. Esta discordancia podría deberse a que exista también un aumento de colágeno que esté contribuyendo al aumento de la masa cardíaca, lo cual parece plausible si se observa la imagen representativa del área de sección transversal de AAV9-NBCe1 en la Figura 41 B. En este apartado no se ha medido cantidad de colágeno, por lo cual sería interesante realizar este análisis en el futuro. Asimismo, el número de animales es bajo y quizás aumentarlo pueda favorecer las tendencias encontradas.

Es importante destacar que el índice de masa ventricular normalizado por peso de los animales 7 semanas post inyección correlaciona positivamente y de manera lineal con la expresión proteica del NBCe1 medida en los mismos.

Por trabajos previos del laboratorio, se sabe que el NBCe1 se encuentra disfuncional en los cardiomiocitos de la cepa SHR, hallándose aumentado en expresión total pero imposibilitado para actuar por encontrarse disminuida su expresión en membrana, donde es activo.

Este objetivo se planteó siguiendo la hipótesis de que si el silenciamiento del NBCe1 genera HC, su sobreexpresión en un modelo donde la HC estuviese establecida podría ser la causa de su regresión, quizás por una disminución compensatoria de la expresión de NBCn1 y NHE1. Sin embargo, los experimentos realizados en esta parte sugieren que al sobreexpresar el NBCe1 en las ratas SHR se habría provocado un incremento de la HC ya establecida en el modelo, medido por el IMVI. Es posible que la sobreexpresión del NBCe1 provoque un mayor ingreso de Na^+ al cardiomiocito. De esta forma, el aumento del tamaño ventricular podría atribuirse en parte a la sobrecarga de Na^+ a la que estarían sometidos estos animales, ya que

como se ha descrito anteriormente, provoca que el NCX actúe en su modo reverso, ingresando Ca^{2+} y transportando Na^+ afuera del interior celular, y exacerbando con este aumento de Ca^{2+} una serie de vías pro-hipertróficas¹⁹⁰ y posibles eventos arritmogénicos²⁰⁰.

Asimismo, no cabría pensar que el aumento del Na^+ intracelular se dé a expensas de los otros transportadores alcalinizantes de membrana, puesto que ya se encuentran hiperactivos en estas ratas^{89; 201} y además la respuesta compensatoria al incremento del NBCe1 consistiría en disminuir su expresión, si se extrapolan los resultados obtenidos en las ratas normotróficas inyectadas con el vector AAV9-shNBCe1. Sería interesante medir los niveles de Na^+ en células ventriculares aisladas, para poder confirmar este posible escenario.

Por otro lado, también se debería tener en cuenta en este análisis que al tratarse de un modelo patológico los resultados podrían desviarse de lo esperado. En este sentido, se ha reportado que existe una sobreexpresión del NBCe1 en corazones hipertróficos^{14; 89} y con falla cardíaca²⁰². Además, se ha descrito que la inhibición del NBCe1 mejora la función cardíaca luego de un protocolo de isquemia-reperfusión^{202; 203}. En los ratones KO para NBCe1, se ha encontrado que existe una disminución de la apoptosis en los cardiomiocitos luego de isquemia-reperfusión y que la pérdida de NBCe1 no empeora la función cardíaca en condiciones basales o en respuesta a estimulación β -adrenérgica¹⁸³. Asimismo, se ha reportado que sobreexpresar al NBCe1 en ratones transgénicos sometidos a ligación de la arteria coronaria izquierda exagera el remodelado patológico en esos corazones, efecto que atribuyen al aumento de Ca^{2+} intracelular²⁰⁴.

En conclusión, estos datos sugieren que sobreexpresar al NBCe1 en un miocardio hipertrófico no mejora la patología, sino que por el contrario la empeora. El incremento de la expresión del NBCe1 en ratas SHR generaría una sobrecarga de Na^+ , que aunque quizás leve considerando la estequiometría de este cotransportador ($1/2 \text{Na}^+ - 1\text{HCO}_3^-$), sería suficiente para aumentar el ingreso de Ca^{2+} al cardiomiocito y exagerar así la HC establecida en este modelo.

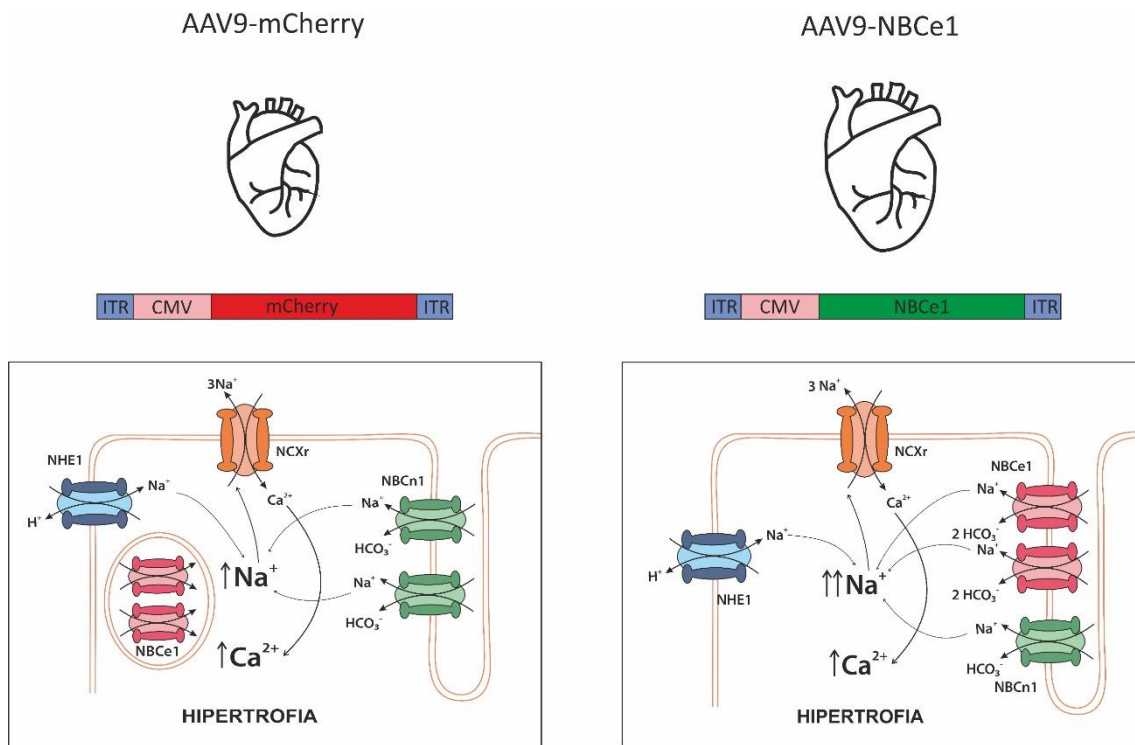


Figura 42. Panel derecho. Rata SHR hipertrofica con aumento de la actividad y expresi3n de NBCn1 y NBCe1 con expresi3n aumentada, pero secuestrado en ves3culas endoc3ticas. **Panel izquierdo.** Rata SHR con sobreexpresi3n de NBCe1, lo cual genera una hipertrofia card3aca exacerbada por aumento de Na^+ .

Objetivo específico 3

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la sección anterior, donde se sobreexpresa el NBCe1 en un modelo de hipertrofia cardíaca patológica, se plantea estudiar las consecuencias de sobreexpresar el NBCe1 en condiciones fisiológicas, específicamente a nivel electrofisiológico. Con este fin, se ha administrado por vía sistémica el vector viral cardioprotector AAV9-NBCe1, utilizado previamente.

Objetivos propuestos

- 1- Administración sistémica de los vectores AAV9-NBCe1 y AAV9-mCherry en ratones c57bl/6 y comprobación de eficiencia de transducción. Seguimiento de crecimiento.
- 2- Estudio morfométrico del tejido cardíaco: Análisis del tamaño ventricular por ecocardiografía y del tamaño de las células cardíacas por medición en preparados histológicos.
- 3- Estudio electrofisiológico del tejido cardíaco: Medida de la duración del potencial de acción cardíaco (PAC). Análisis de la actividad eléctrica del corazón mediante electrocardiograma (ECG).
- 4- Estudio fisiológico del tejido cardíaco: Evaluación del pH basal en cardiomiocitos aislados.

1- Administración sistémica de los vectores AAV9-NBCe1 y AAV9-mCherry en ratones c57bl/6 y comprobación de eficiencia de transducción. Seguimiento de crecimiento.

Se inyectaron ambos vectores, AAV9-NBCe1 y AAV9-mCherry, en el seno retro-orbital de ratones c57bl/6 de 3-4 meses de edad, previa anestesia con isofluorano. Para comprobar la eficiencia de transducción, se visualizaron en un microscopio de fluorescencia cardiomiocitos ventriculares aislados de los ratones inyectados con AAV9-mCherry. Se confirmó una alta eficiencia de transducción mediante la observación de células rojas (Figura 43). Las células aisladas de los ratones inyectados con AAV9-NBCe1 no poseen fluorescencia roja puesto que el rAAV tiene como limitante el tamaño génico y no permite el empaquetado de ambos genes.

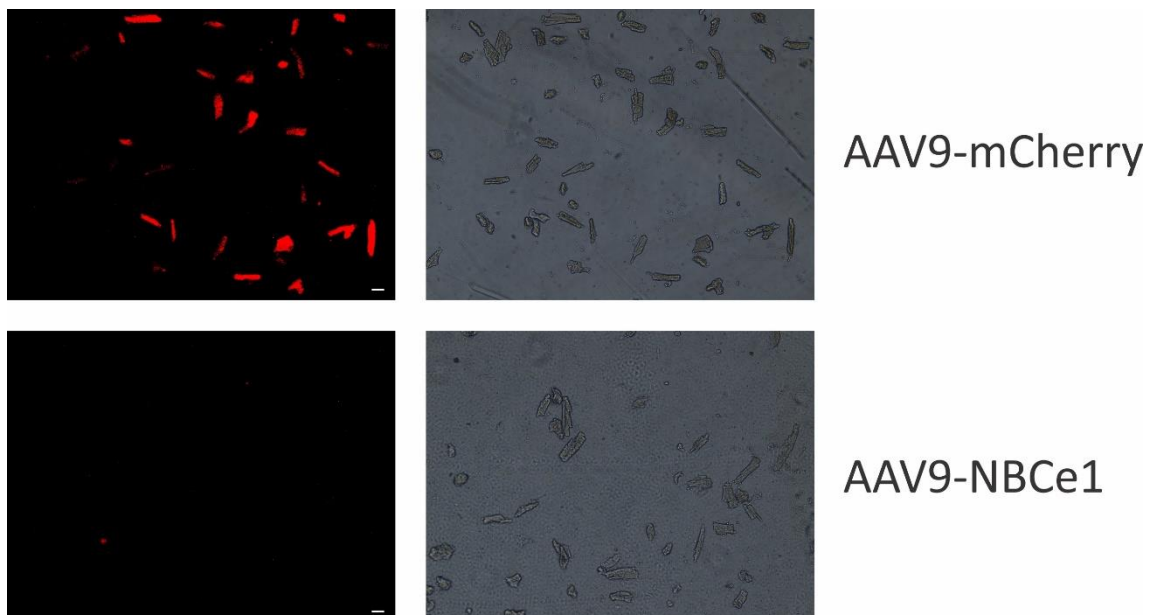


Figura 43. Micrográficas de células ventriculares aisladas tomadas mediante microscopía de fluorescencia. La presencia del gen reportero mCherry demuestra la transducción exitosa de los cardiomiocitos en los ratones control. 20x, las barras corresponden a 25 μ m.

Se analizaron tanto la expresión proteica como los niveles de mRNA de NBCe1 mediante cuantificación por PCR cuantitativa (Figura 44). De esta forma, se confirmó que existía un incremento significativo en la expresión de este cotransportador en los corazones de los animales inyectados con el vector AAV9-NBCe1 (Expresión proteica: AAV9-mCherry: $1\pm 0,24$, n=4; AAV9-NBCe1*: $2,53\pm 0,31$, n=5; *p<0,05 vs. AAV9-mCherry; Niveles de mRNA: AAV9-mCherry: $1\pm 0,06$, n=4; AAV9-NBCe1*: $1,66\pm 0,09$, n=4; *p<0,05 vs. AAV9-mCherry).

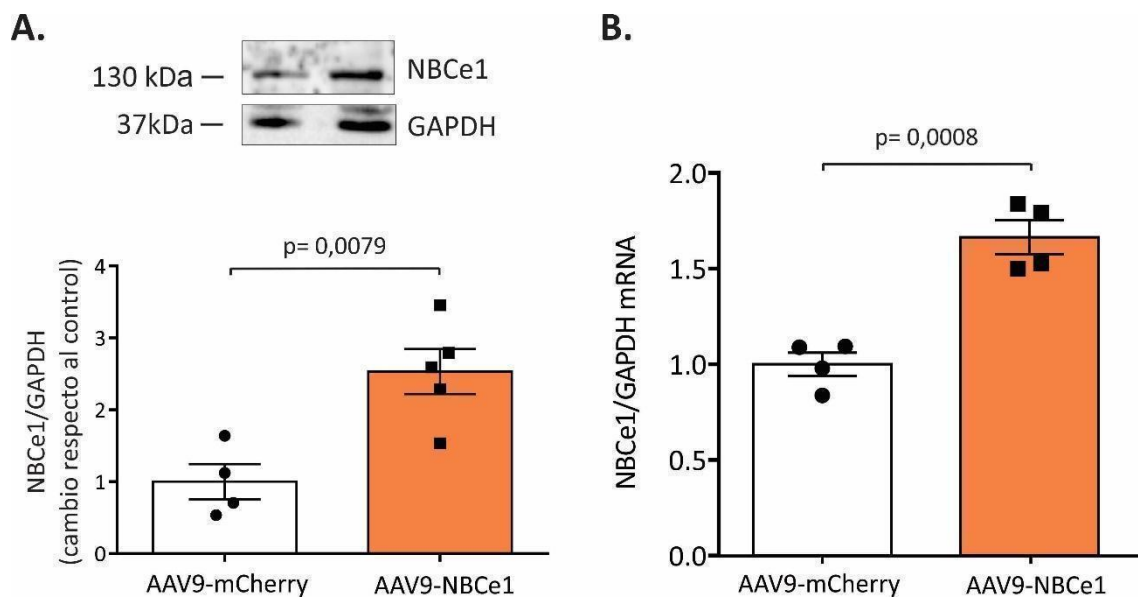


Figura 44. A. Western Blots representativos de la expresión proteica de NBCe1 normalizada por GAPDH y su correspondiente análisis densitométrico. **B.** Análisis de los niveles de mRNA de NBCe1 normalizados por niveles de GAPDH. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry.

Además, para un mejor estudio del modelo se registró la variación del peso en el tiempo de los roedores (Figura 45) y no se encontraron cambios significativos entre los grupos (AAV9-mCherry: $3,57 \pm 0,61$, $n=5$; AAV9-NBCe1: $1,19 \pm 0,54$, $n=6$; $*p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry).

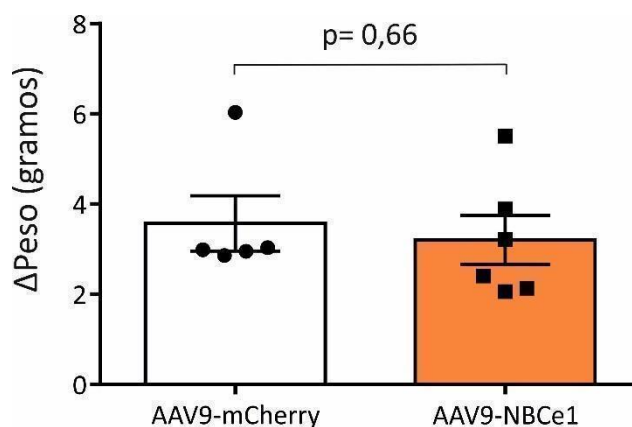


Figura 45. Datos promedio de la diferencia de peso al final y al principio de tratamiento para cada animal. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry.

2- Estudio morfométrico del tejido cardíaco: Análisis del tamaño ventricular por ecocardiografía y del tamaño de las células cardíacas por medición en preparados histológicos.

Con el objetivo de evaluar si el vector AAV9-NBCe1 era capaz de provocar cambios en el tamaño ventricular, se realizó el análisis ecocardiográfico durante el mes del tratamiento (Figura 46). Los resultados confirman que no se encontraron diferencias significativas en el índice de masa ventricular izquierdo (IMVI) en ninguno de los grupos evaluados (mg/g; AAV9-mCherry: $1,279 \pm 0,13$, n=5; AAV9-NBCe1: $1,065 \pm 0,08$, n=6; * $p < 0,05$ vs AAV9-mCherry).

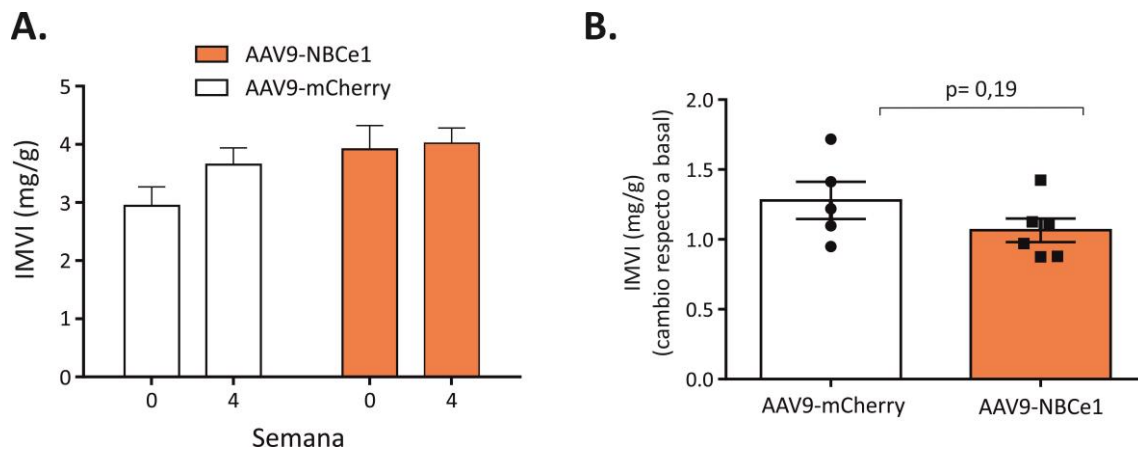


Figura 46. A. Datos promedio del índice de masa ventricular izquierdo (IMVI) normalizado por el peso del animal durante todo el tratamiento. **B.** Datos promedio del IMVI con respecto al tiempo cero de tratamiento para cada grupo de animales. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student o ANOVA de dos vías corregido por test de Sidak cuando correspondiese, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry.

Además, el análisis de la función sistólica medida por fracción de acortamiento, parámetro que se obtiene del estudio ecocardiográfico bidimensional indicó que no hubo cambios en la funcionalidad cardíaca durante el tratamiento.

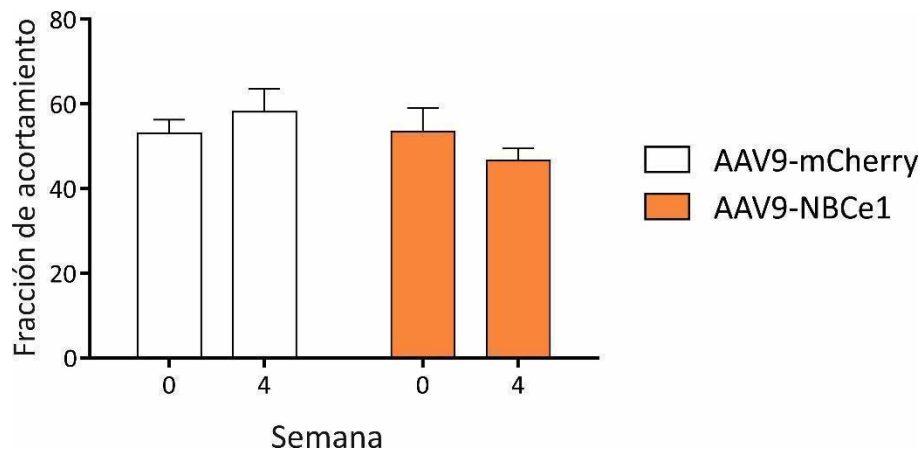


Figura 47. Datos promedio de la fracción de acortamiento ventricular en sístole. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos vías corregido por test de Sidak, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry.

Asimismo, el estudio de la función cardíaca diastólica en estos roedores mediante ecocardiografía Doppler descarta que existan diferencias significativas entre ambos grupos.

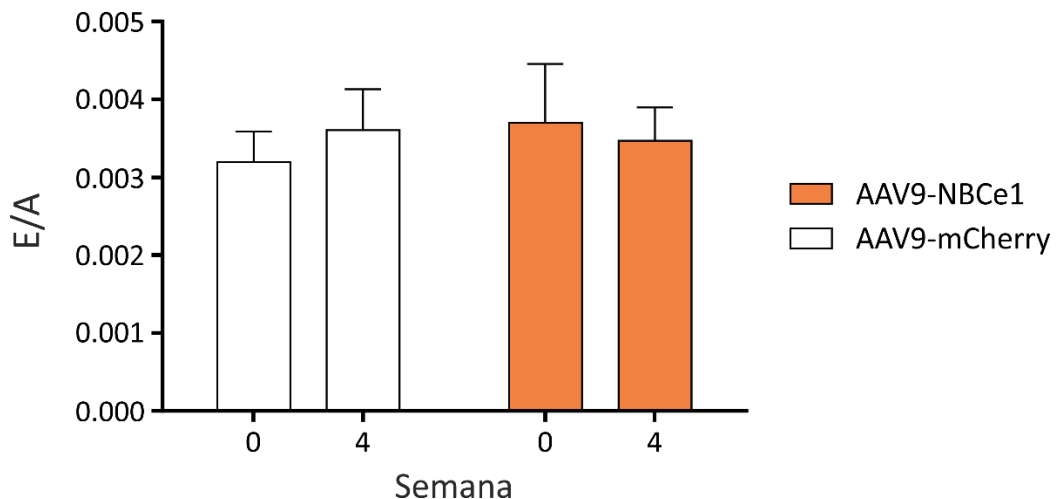


Figura 48. Datos promedio de la relación onda de llenado ventricular temprano (E)/contracción auricular (A), parámetro utilizado para evaluar función diastólica. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos vías corregido por test de Sidak, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry.

De esta forma, todos los parámetros ecocardiográficos evaluados indican que los corazones de ambos grupos experimentales se comportan de manera similar en cuanto a función y poseen la misma masa ventricular.

Por otra parte, para confirmar lo encontrado en el diagnóstico por imágenes en corazón entero, se evaluó el tamaño de los cardiomiocitos en cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina (Figura 49). En concordancia con los datos previos, no se encontraron diferencias entre ambos grupos de ratones (μm^2 ; AAV9-mCherry: $201,8 \pm 12,24$, $n=5$; AAV9-NBCe1: $183,3 \pm 19,08$, $n=6$; $*p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry).

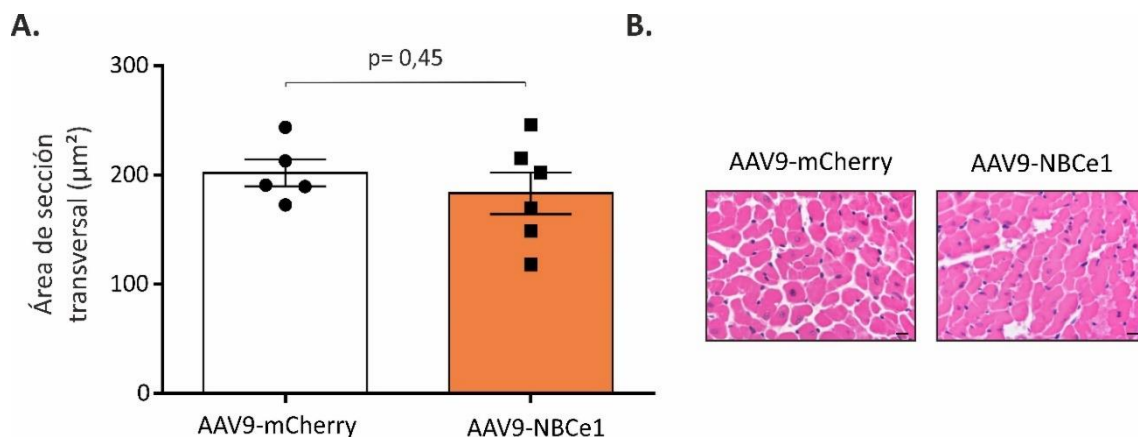


Figura 49. A. Cuantificación del área de sección transversal de los cardiomiocitos. **B.** Micrografías representativas de los preparados histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. 20x, las barras corresponden a 10µm. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry.

Por último, el análisis del peso tanto del corazón como del ventrículo izquierdo (VI) de ambos grupos de ratones normalizados por la longitud de la tibia de los mismos indicó que no existen diferencias significativas entre ellos.

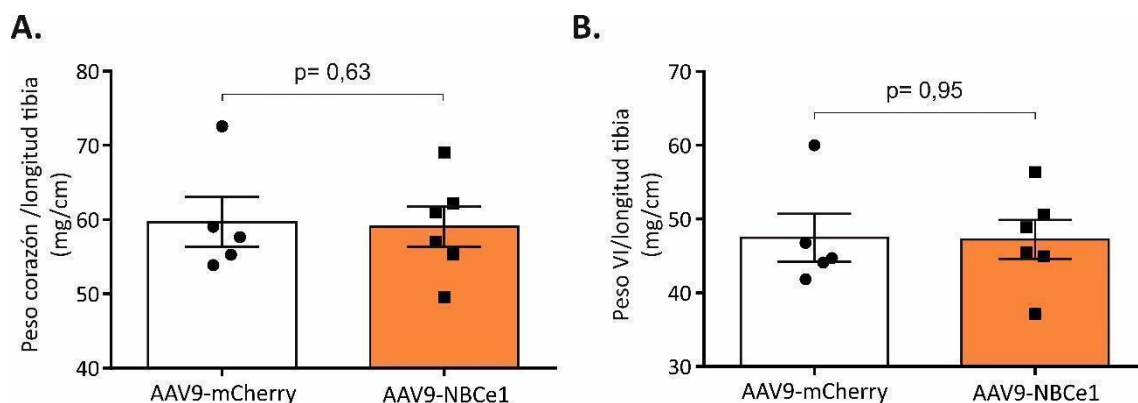


Figura 50. A. Datos promedio del peso de los corazones de los ratones normalizados por la longitud de sus tibias un mes post-inyección. **B.** Datos promedio del peso de los ventrículos izquierdos (VI) de los ratones normalizados por la longitud de sus tibias un mes post-inyección. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry.

3- Estudio electrofisiológico del tejido cardíaco: Medida de la duración del potencial de acción (PAC) cardíaco. Análisis de la actividad eléctrica del corazón mediante electrocardiograma (ECG).

Teniendo en cuenta que la corriente generada por la activación del NBCe1 (I_{NBC}) puede generar cambios en el PAC, se estudió mediante la técnica *patch clamp* en buffer bicarbonato la duración del mismo en miocitos ventriculares aislados de los dos grupos de animales. Se encontró que los ratones inyectados con el vector AAV9-NBCe1 presentaban una disminución en el APD_{50} , es decir, en la duración del PA al 50% de la repolarización (mseg; AAV9-mCherry: $17,68 \pm 3,27$, $n=6$; AAV9-NBCe1*: $10,38 \pm 1,53$, $n=9$; * $p < 0,05$ vs AAV9-mCherry) (Figura 51 A). Además, se observó en las células que sobreexpresaban NBCe1 un potencial de membrana significativamente más negativo (mV; AAV9-mCherry: $-77 \pm 0,74$, $n=8$; AAV9-NBCe1*: $-80,3 \pm 1,04$, $n=9$; * $p < 0,05$ vs AAV9-mCherry). Estos datos electrofisiológicos son consistentes con un miocardio que sobreexpresa NBCe1, puesto que se podría razonar que una sobreexpresión del mismo aumentará la corriente repolarizante I_{NBC} .

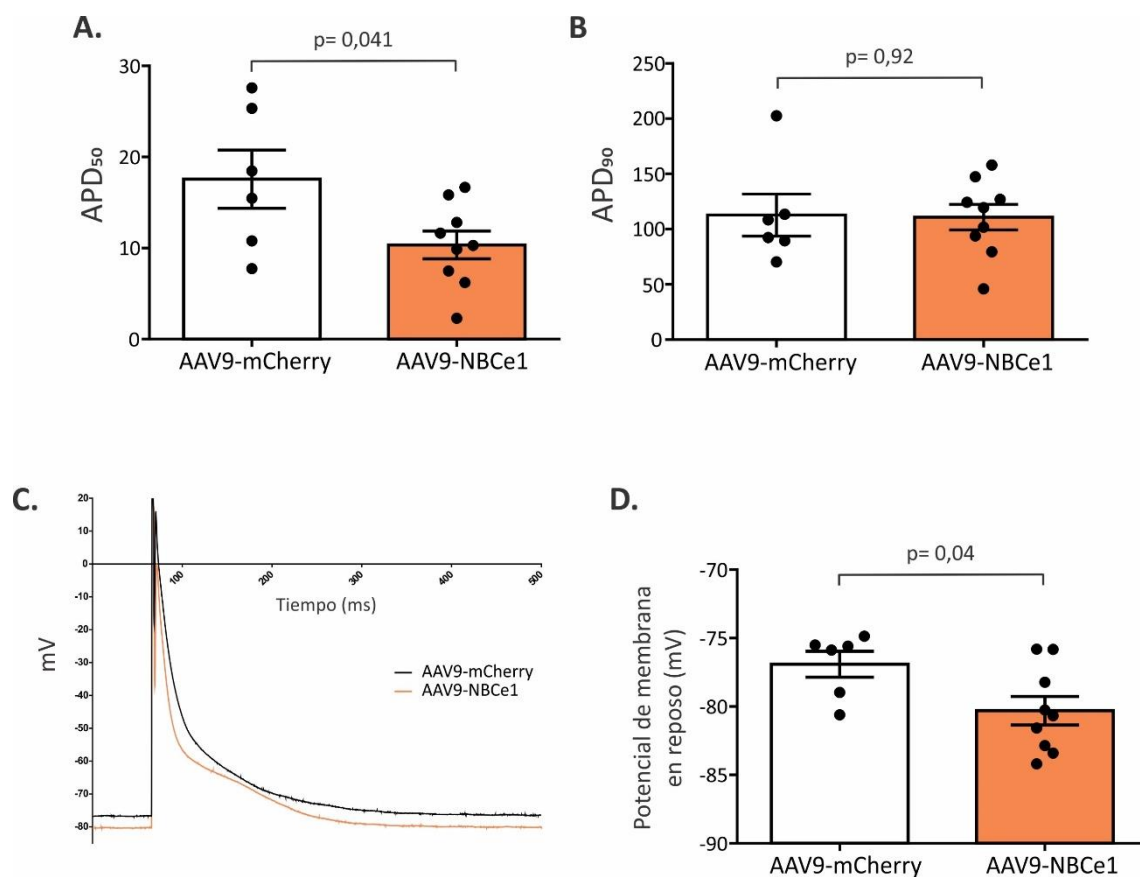


Figura 51. **A.** Datos promedio de la duración del potencial de acción de células aisladas al 50% de la repolarización (APD_{50}) en buffer bicarbonato. **B.** Datos promedio de la duración del potencial de acción de células aisladas al 90% de la repolarización (APD_{90}) en buffer bicarbonato. **C.** Trazos representativos de los potenciales de acción registrados en las células ventriculares aisladas para cada grupo experimental. **D.** Datos promedio del potencial de membrana en reposo de los miocitos cardíacos

aislados en buffer bicarbonato. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry.

Así, con el objetivo de confirmar que los efectos observados eran debidos específicamente a la activación de I_{NBC} se evaluaron los mismos parámetros en buffer HEPES, es decir, en ausencia de HCO_3^- (Figura 52), medio en el cual no se encuentra activo el NBCe1 y por lo tanto tampoco su corriente I_{NBC} . En todos los casos, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (PMR (mV): AAV9-mCherry: $-75,05 \pm 1,33$, $n=5$; AAV9-NBCe1: $-76,18 \pm 0,75$, $n=5$; APD_{50} (mseg): AAV9-mCherry: $9,01 \pm 2,85$, $n=5$; AAV9-NBCe1: $7,57 \pm 2,76$, $n=5$; $*p < 0,05$ vs AAV9-mCherry).

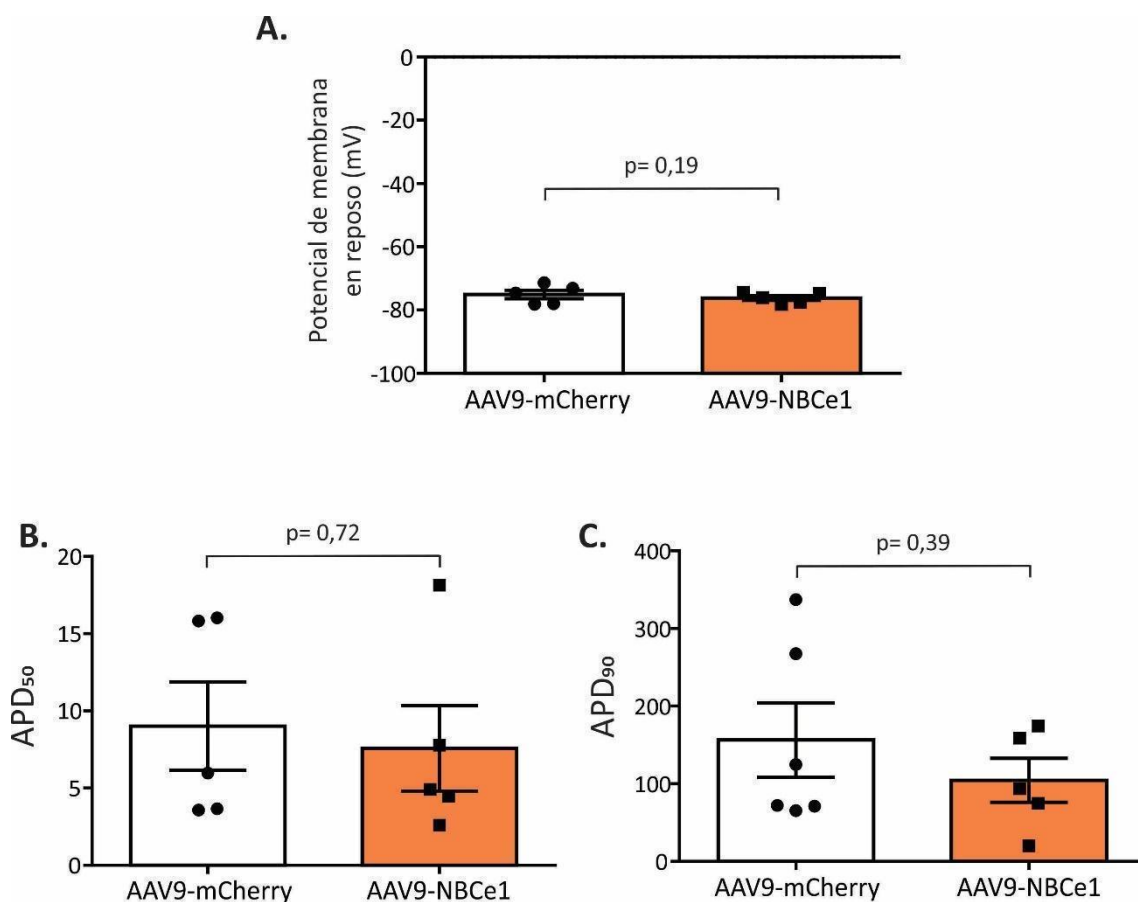


Figura 52. **A.** Datos promedio del potencial de membrana en reposo de los miocitos cardíacos aislados en buffer libre de bicarbonato. **B.** Datos promedio de la duración del potencial de acción de células aisladas al 50% de la repolarización (APD_{50}) en buffer libre de bicarbonato. **C.** Datos promedio de la duración del potencial de acción de células aisladas al 90% de la repolarización (APD_{90}) en buffer libre de bicarbonato. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry.

Por otro lado, para completar el análisis electrofisiológico del modelo, se realizaron electrocardiogramas (ECG) en ambos grupos experimentales durante las 4 semanas de tratamiento. Se analizó el intervalo QT corregido por la frecuencia cardíaca, correspondiente a la actividad eléctrica ventricular, y se encontró una disminución significativa del mismo en los ratones que sobreexpresan NBCe1 (Figura 53). Además, se muestra el análisis del intervalo PR, el cual corresponde a la actividad eléctrica auricular y de la frecuencia cardíaca medida como latidos por minuto a través de la magnitud del intervalo RR en cada registro.

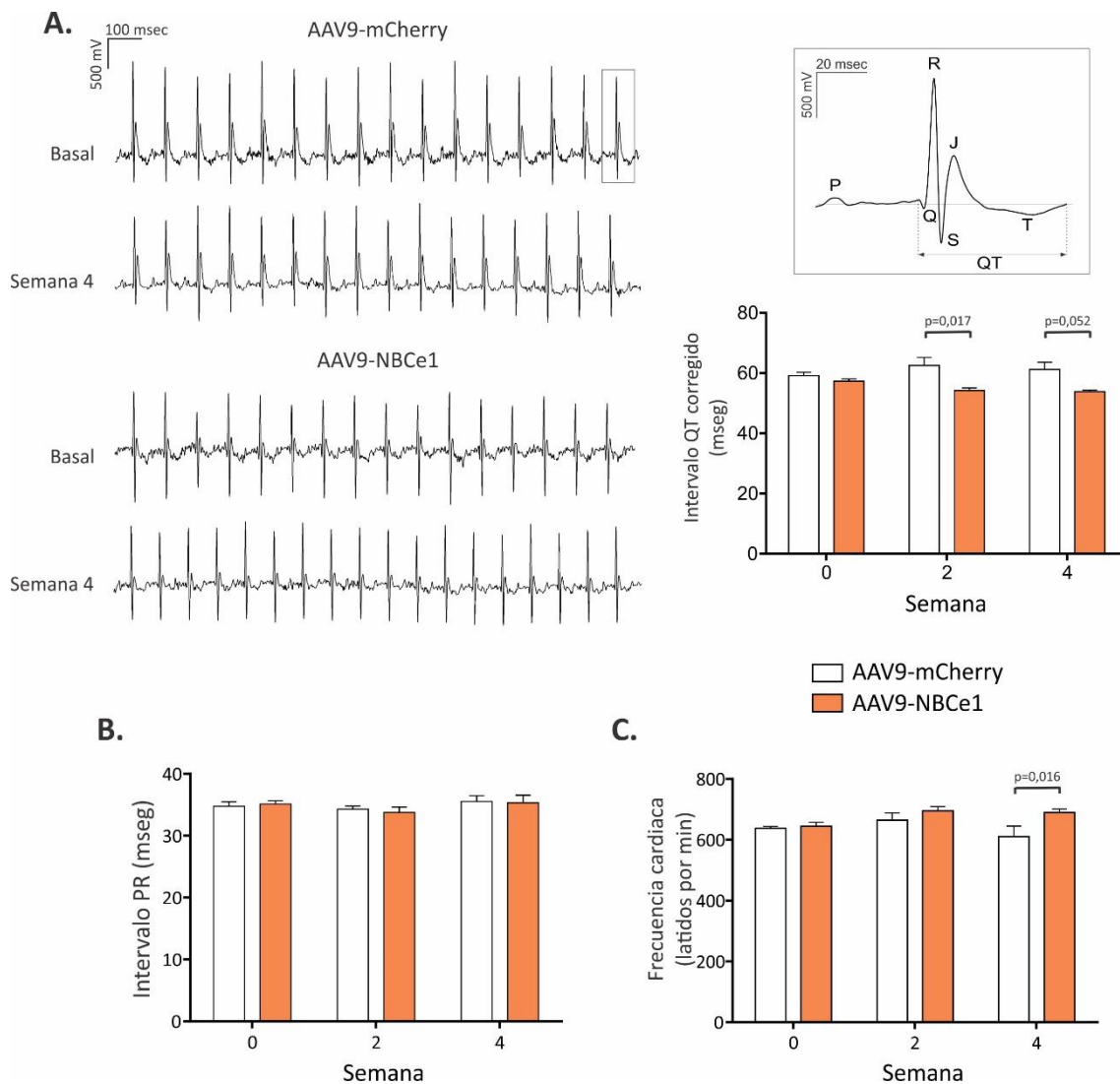


Figura 53. A. Panel izquierdo: Imágenes representativas de los registros de ECG obtenidos para ambos grupos experimentales al inicio y al final del tratamiento. **Panel derecho arriba:** Esquema representativo del ECG de ratón. **Panel derecho abajo:** Datos promedio del intervalo QT corregido por la frecuencia cardíaca, obtenidos por ECG durante todo el tratamiento. **B.** Datos promedio del intervalo PR para cada grupo experimental, medido durante todo el tratamiento. **C.** Datos promedio de la frecuencia cardíaca, obtenida por ECG durante todo el tratamiento. El análisis estadístico fue realizado

mediante ANOVA de dos vías corregido por test de Sidak, considerándose significativo un $p < 0,05$, indicado en el gráfico.

Se puede evidenciar de esta forma que los datos obtenidos mediante ECG son consistentes con los experimentos realizados en miocitos aislados mediante la técnica *patch clamp* y reflejaron un aumento en la expresión de NBCe1 y en el incremento de su corriente I_{NBC} .

4- Estudio fisiológico del tejido cardíaco: Evaluación del pH basal en cardiomiocitos aislados.

Teniendo en cuenta que se está sobreexpresando un transportador sarcolemal encargado de la regulación del pH en el miocito cardíaco, se evaluó el pH intracelular basal de los mismos. Las células se cargaron con el indicador sensible a pH BCECF-AM y se registró su fluorescencia con el sistema *IonOptix* en buffer bicarbonato (Figura 54). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de ratones inyectado con AAV9-NBCe1 (AAV9-mCherry: $7,10 \pm 0,03$, $n=11$; AAV9-NBCe1: $7,10 \pm 0,23$, $n=8$).

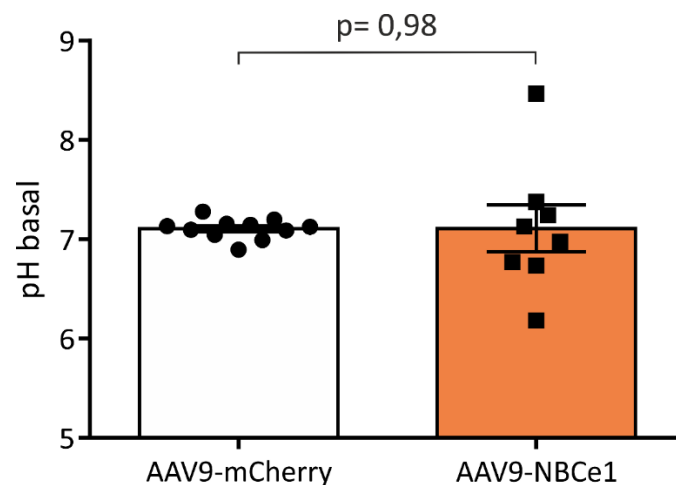


Figura 54. Datos promedio del pH basal de los miocitos ventriculares en buffer bicarbonato. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs. AAV9-mCherry.

Discusión de Objetivo específico 3

En este tramo del trabajo se ha propuesto estudiar las consecuencias de sobreexpresar al NBCe1 en los corazones de roedores sanos, sin patología previa.

Con este fin se administró por vía sistémica un vector viral AAV9 con tropismo cardíaco y se estudiaron sus efectos luego de un mes de tratamiento. Teniendo en cuenta que en esta parte del trabajo se utilizaron ratones, la vía elegida fue la inyección retro-orbital en el seno venoso de los roedores, método muy útil y alternativo a la inyección por la vena lateral de la cola, entre otras razones por ser menos dificultoso en su realización. La inyección por la vena lateral de la cola requiere que el ratón esté despierto y tiene menor tasa de éxito debido al tamaño de la vena, lo que aumenta el número de intentos en caso de fracaso inicial y puede estresar al animal. Por el contrario, la inyección retro-orbital se realiza con el ratón bajo anestesia y el procedimiento dura pocos segundos. Asimismo, estudios enfocados en comparar el rendimiento de ambos métodos aseguran que no existen diferencias entre los mismos, pudiendo utilizarse de manera indistinta²⁰⁵, y que además, la inyección retro-orbital provoca menos estrés en los roedores¹⁷⁸.

Un mes después de la inyección con el vector AAV9-NBCe1 (10^{12} pv/kg) se registró un incremento de más del doble en la expresión proteica de NBCe1 en el tejido cardíaco de los ratones. Asimismo, las células aisladas de ratones inyectados con AAV9-mCherry se observaron rojas mediante microscopía de fluorescencia, por lo que se puede confirmar la transducción eficiente de ambos rAAV.

Los datos obtenidos a través del estudio de los ratones que sobreexpresan el NBCe1 en sus corazones indican que no desarrollan hipertrofia cardíaca, hecho avalado por métodos tanto morfométricos como por el análisis de imágenes de cortes histológicos. Resultados similares se han reportado previamente en modelos de sobreexpresión de NBCe1 en ratones transgénicos²⁰⁴. Este hecho podría explicarse sobre la base de una disminución compensatoria de la actividad o expresión del NBCn1 y el NHE1. A pesar de que no se han medido estos parámetros, el hecho de que el pH_i basal en buffer bicarbonato de las células de ambos grupos se encuentre igual es consistente con esta hipótesis. Sería interesante profundizar en el entendimiento de estos mecanismos en el futuro.

Es de interés destacar que a partir del estudio de estos roedores se descubrió que existen cambios en su electrofisiología. Se observa tanto una disminución de la duración del potencial de acción cardíaco (PAC) como una disminución de la duración del intervalo QT corregido por la frecuencia cardíaca (QTc) en el electrocardiograma (ECG) *in vivo*. Asimismo, los resultados son consecuentes y se contraponen con lo observado en el modelo de ratas que tienen silenciado el NBCe1.

Es posible que los efectos electrofisiológicos observados tanto en el PAC como en la duración del intervalo QTc sean exclusivamente consecuencia de la sobreactivación de la corriente I_{NBC} luego de sobreexpresar NBCe1. El hecho de que no se registraron cambios electrofisiológicos en ausencia de HCO_3^- indicaría que I_{NBC} es la corriente responsable cuando este buffer está presente en el medio extracelular. Sin embargo, no se podría descartar por completo la influencia de esta maniobra experimental en otras corrientes aniónicas.

La disminución en la duración del PAC observada en miocitos ventriculares aislados fue significativa al 50% de la repolarización, pero no al 90% de la misma. Como se ha señalado anteriormente, el potencial de reversión esperado para I_{NBC} es cercano a $-95mV^{22}$ por lo cual una posible explicación para esta discordancia es que la corriente I_{NBC} tiene más relevancia a potenciales a nivel de la meseta que a potenciales cercanos al PMR. Por otro lado, se evidenció una reducción significativa en el intervalo QTc. Como estos registros se obtuvieron *in vivo*, la frecuencia cardíaca y la temperatura fisiológicas podrían haber colaborado en la detección del impacto repolarizante tardío de I_{NBC} en la duración del intervalo QTc.

Objetivo específico 4

Investigar las consecuencias cardiovasculares de silenciar el NBCn1 en ratas Wistar normotróficas machos de 3 meses de edad. Para este fin, se diseñó un ARN de interferencia específico contra el NBCn1, el cual fue clonado en un vector viral adeno-asociado cardioprotector (AAV9-shNBCn1).

Objetivos propuestos

- 1- Administración sistémica de los vectores AAV9-shNBCn1 y AAV9-shControl en ratas adultas y comprobación de eficiencia de transducción. Seguimiento de crecimiento y presión arterial.
- 2- Estudio morfométrico del tejido cardíaco: Análisis del tamaño y función ventricular por ecocardiografía y tamaño de las células cardíacas por medición en preparados histológicos.
- 3- Estudio molecular del tejido cardíaco: Análisis de los perfiles proteicos de los transportadores alcalinizantes de membrana vía western blot.

1- Administración sistémica de los vectores AAV9-shNBCn1 y AAV9-shControl en ratas adultas y comprobación de eficiencia de transducción. Seguimiento de crecimiento y presión arterial.

Se administraron por vía intravenosa los vectores AAV9-shNBCn1 y AAV9-shControl en ratas Wistar macho de 3-4 meses de edad. Para constatar que el virus inyectado sistémicamente haya tenido una transducción efectiva al tejido cardíaco, se realizaron cortes histológicos que confirmaran la presencia de la proteína fluorescente verde (GFP) introducida en el vector como gen reportero (Figura 55 A). Se utilizaron además muestras de ventrículo para determinar la expresión proteica de NBCn1, encontrándose disminuidos en los animales inyectados con el vector AAV9-shNBCn1 (shControl: $1,0 \pm 0,12$, $n=5$; shNBCn1*: $0,58 \pm 0,10$, $n=5$; $p < 0,05$ vs. shControl).

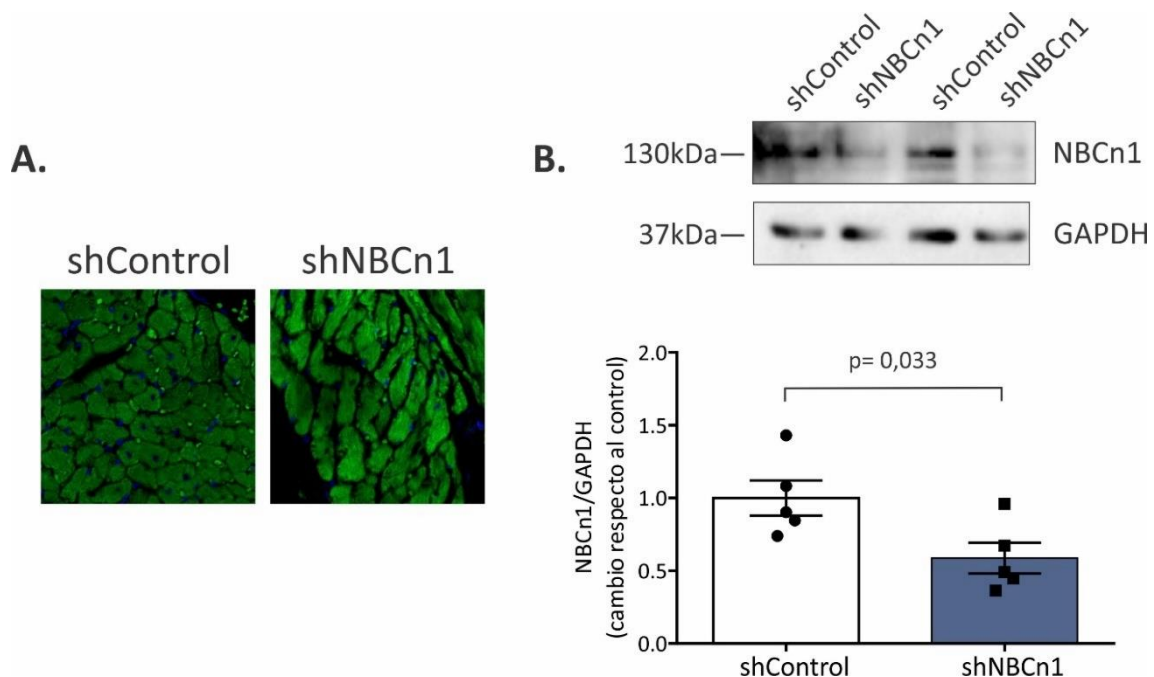


Figura 55. A. Micrografías de cortes histológicos tomadas mediante microscopía confocal. La presencia del gen reportero GFP demuestra la transducción exitosa de los cardiomiocitos. **B.** Datos promedio y geles representativos del análisis de la expresión proteica de NBCn1. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$.

Por otro lado, con el fin de estudiar posibles efectos vasculares, se midió la presión arterial mediante el método pletismográfico de registro de la presión sistólica utilizando la vena de la cola. Se determinó que las ratas shNBCn1 presentaban un incremento leve pero significativo de la presión arterial, encontrado a partir de la tercera semana de tratamiento (Figura 56).

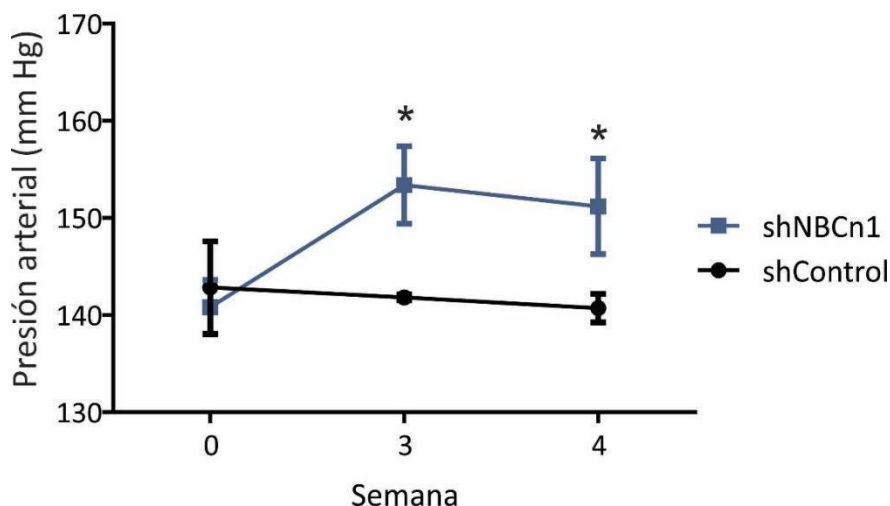


Figura 56. Registro de la presión arterial medida por el método pletismográfico a lo largo de todo el tratamiento. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos vías corregido por test de Sidak, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs shControl.

Para encontrar una explicación a este incremento en la presión arterial se colectaron las arterias aortas de las ratas al momento del sacrificio y se realizaron preparados histológicos en los que se observó la presencia de GFP tanto en las muestras de las ratas inyectadas con AAV9-shNBCn1 como en las muestras control, AAV9-shControl. En la Figura 57 también puede observarse una tercera imagen correspondiente a un preparado de aorta sin inyectar con AAV9. De esta forma, se confirmó que los AAV9 son capaces de transducir músculo liso vascular.

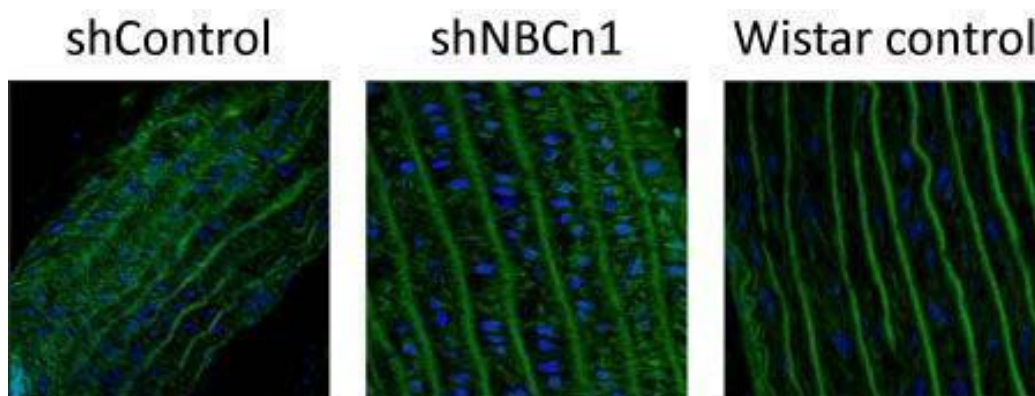


Figura 57 Micrografías que dan cuenta de la transducción de las células musculares lisas, que se observan verdes por contener GFP. Se visualizan intercaladas las fibras elásticas características del tejido vascular aórtico, que autofluorescen. La marca azul corresponde a DAPI, marcador de núcleos.

Además, se monitoreó el peso de los animales antes y durante el tratamiento para descartar que silenciar el NBCn1 tuviese algún efecto en este parámetro (Figura 58). No se encontraron

diferencias significativas entre los grupos en ningún momento del tratamiento (shControl: $29,8 \pm 7,19$, $n=5$; shNBCn1: $36,2 \pm 3,81$, $n=5$; $p < 0,05$ vs. shControl).

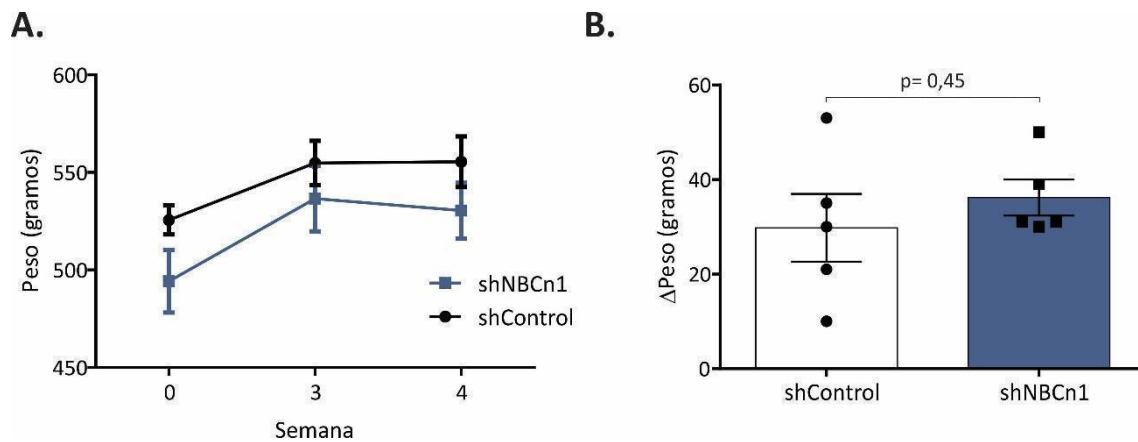


Figura 58. A. Medida del peso corporal de los animales antes y durante el tratamiento con ambos vectores virales. **B.** Diferencia entre el peso corporal final e inicial para ambos grupos experimentales. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student o ANOVA de dos vías corregido por test de Sidak cuando correspondiese, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs shControl.

2- Estudio morfométrico del tejido cardíaco: Análisis del tamaño y función ventricular por ecocardiografía y tamaño de las células cardíacas por medición en preparados histológicos.

Para estudiar posibles efectos pro-hipertróficos, teniendo en cuenta los resultados obtenidos al inyectar AAV9-shNBCe1, se realizó el análisis ecocardiográfico durante el mes del tratamiento para ambos grupos de animales (Figura 59). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el IMVI en ninguno de los grupos evaluados (mg/g; shControl: $0,97 \pm 0,11$, $n=5$; shNBCn1: $0,92 \pm 0,07$, $n=5$; $*p < 0,05$ vs shControl).

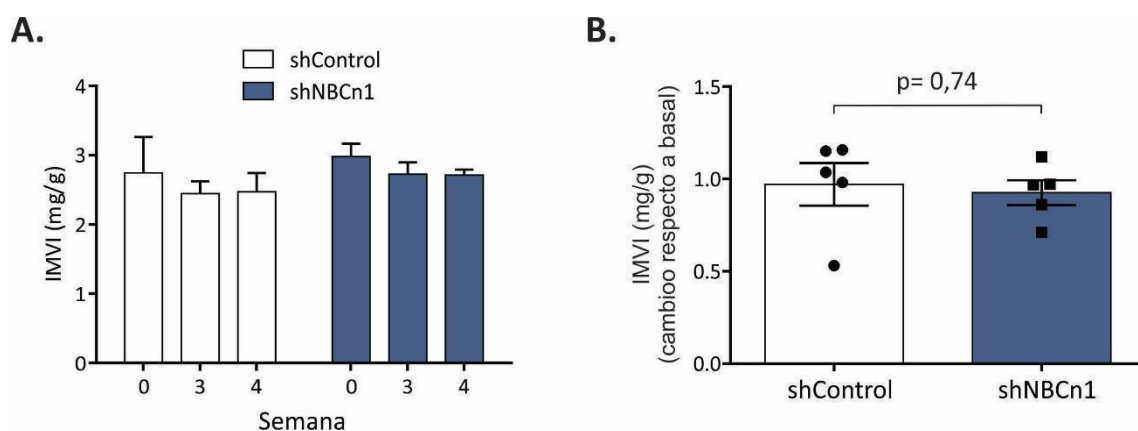


Figura 59. A. Datos promedio del índice de masa ventricular izquierdo (IMVI) normalizado por el peso del animal al principio y al final del tratamiento. **B.** Datos promedio del IMVI con respecto al tiempo

ceros de tratamiento para cada grupo de animales. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student o ANOVA de dos vías corregido por test de Sidak cuando correspondiese, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs shControl.

Por otra parte, se evaluó el tamaño de los cardiomiocitos en cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina (Figura 60), y en concordancia con los datos previos, no se encontró diferencia entre ambos grupos de animales (μm^2 ; shControl: $292,6 \pm 29,8$, $n=5$; shNBCn1: $260,1 \pm 23,1$, $n=5$; $*p < 0,05$ vs. shControl).

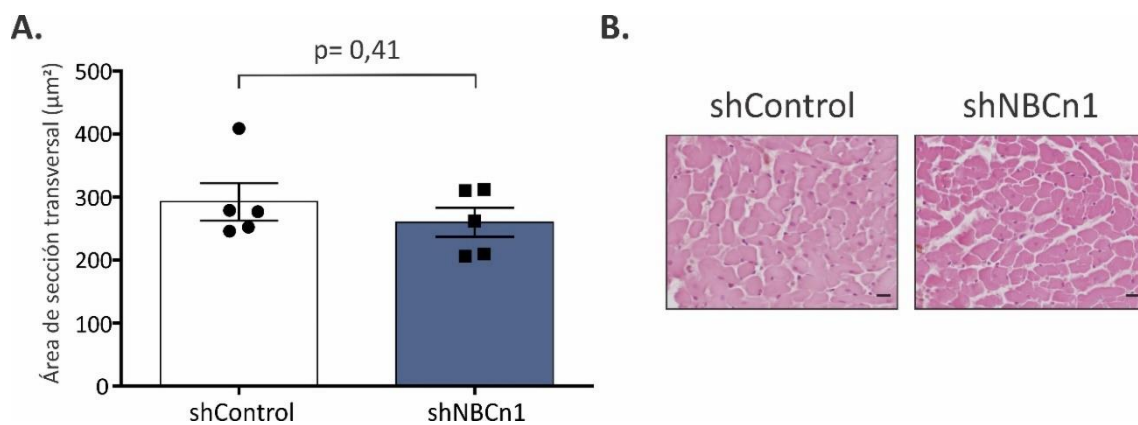


Figura 60. A. Cuantificación del área de sección transversal de los cardiomiocitos. **B.** Micrografías representativas de los preparados histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. 20x, las barras corresponden a 10 μm . El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs shControl.

Por último, el análisis del peso tanto del corazón como del ventrículo izquierdo (VI) de las ratas normalizados por la longitud de la tibia de los mismos (Figura 61) indicó que no existen diferencias significativas entre ellos (PC/LT: shControl: $0,29 \pm 0,005$, $n=5$; shNBCn1: $0,29 \pm 0,005$, $n=5$; PVI/LT: shControl: $0,24 \pm 0,004$, $n=5$; shNBCn1: $0,24 \pm 0,003$, $n=5$; $p < 0,05$ vs. shControl).

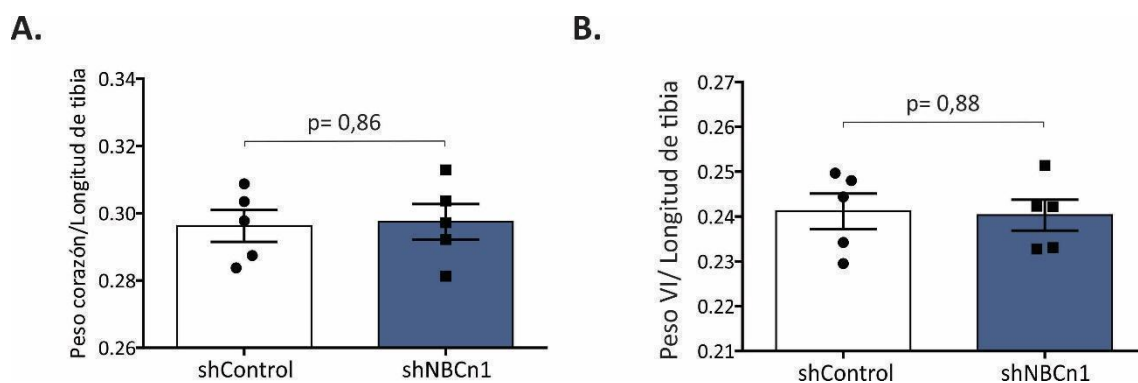


Figura 61. A. Datos promedio del peso de los corazones de las ratas normalizados por la longitud de sus tibias un mes post-inyección. **B.** Datos promedio del peso de los ventrículos izquierdos (VI) de las

ratas normalizados por la longitud de sus tibias un mes post-inyección. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$ vs shControl.

De esta forma, se puede concluir tanto por métodos de análisis de imágenes como biométricos que el silenciamiento del NBCn1 cardíaco no genera hipertrofia cardíaca.

3- Estudio molecular del tejido cardíaco: Análisis de los perfiles proteicos de los transportadores alcalinizantes de membrana vía western blot.

Teniendo en cuenta que se encontró un aumento compensador en la expresión de los mecanismos alcalinizantes cuando se silenció al NBCe1, se evaluó la expresión proteica del NBCe1 en las ratas inyectadas con shNBCn1. A pesar de haber analizado pocas muestras, se observa una tendencia a favor de un aumento de la expresión del NBCe1 en las ratas shNBCn1 (shControl: $1 \pm 0,08$, $n=3$; shNBCn1: $2,01 \pm 0,33$, $n=5$; $*p < 0,05$ vs. shControl). De todas formas, es necesario aumentar el número de muestras para confirmar esta tendencia.

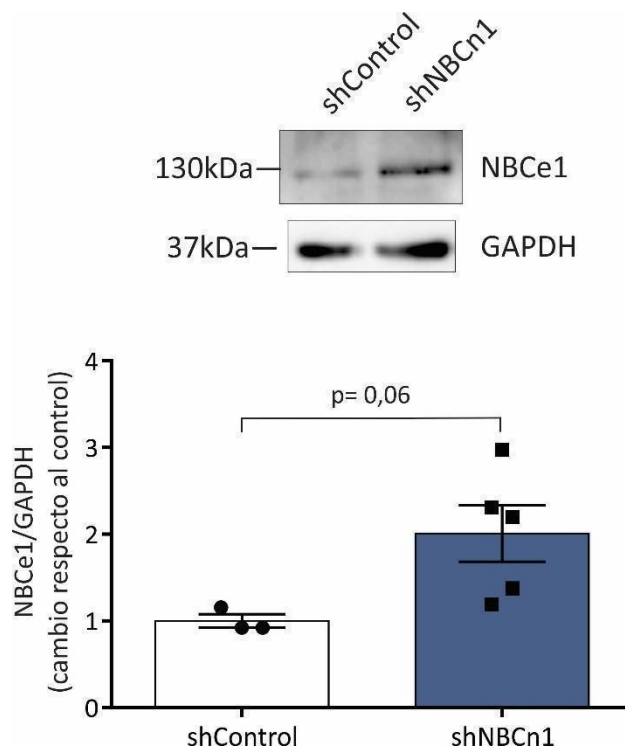


Figura 62. Datos promedio y geles representativos del análisis de la expresión proteica de NBCe1. El análisis estadístico fue realizado mediante test de Student, considerándose significativo un $p < 0,05$.

Discusión de objetivo específico 4

Se administró sistémicamente el vector AAV9-shNBCn1 para estudiar los efectos *in vivo* de disminuir la expresión del cotransportador sodio bicarbonato electroneutro cardíaco (NBCn1). En un principio, se demostró que el vector viral fue capaz de transducir células cardíacas, encontrándose marca fluorescente en preparados histológicos de ventrículos extraídos de los animales estudiados. Asimismo, se determinó que existía una disminución significativa en la expresión proteica del NBCn1, validando entonces el modelo en análisis.

El monitoreo en el tiempo de la presión arterial permitió comprobar que la misma se encontraba incrementada significativamente en los animales que tenían silenciado el NBCn1 desde la semana 3. Este dato concuerda con lo hallado en los ratones KO para NBCn1¹²⁰, los cuales también presentan un aumento leve en la presión arterial. Se demostró entonces que el vector AAV9-shNBCn1 es capaz de transducir células musculares lisas mediante la presencia de GFP en preparados de aorta obtenidos al momento del sacrificio de los animales. Al respecto del uso del serotipo 9 para transducir músculo liso, se ha reportado su eficiencia en aorta de ratones adultos por administración intravenosa. Se señala además que la eficiencia de transducción es pobre cuando se ensayan aortas de ratones recién nacidos²⁰⁶.

Se ha descrito que en el modelo de ratones KO NBCn1^{-/-} existe una reducida capacidad de relajación y sensibilidad al Ca²⁺ en músculo liso de arterias mesentéricas¹²⁰. En esta tesis no se ha profundizado en estos aspectos moleculares, pero es posible que sean los causantes del aumento de la presión arterial encontrado en las ratas shNBCn1.

El estudio ecocardiográfico de ambos grupos experimentales a lo largo del tratamiento descarta que se desarrolle una hipertrofia cardíaca en los animales shNBCn1. Estos datos están avalados además por el análisis del área de sección transversal de los cardiomiocitos en preparados histológicos teñidos con hematoxilina-eosina y por los datos obtenidos por el pesaje del tejido al momento del sacrificio normalizado por la longitud de la tibia para cada rata. Es posible que no se evidencie una hipertrofia aún en presencia de un aumento de la presión arterial debido a que ese incremento es de solo 10 mm Hg y puede no ser suficiente para generar una sobrecarga hemodinámica. También se debe tener en cuenta que por la duración del tratamiento tampoco se trata de un estímulo sostenido por tiempo suficiente.

Se describió en estas ratas un posible aumento compensador en la expresión del NBCe1. Esta sobreexpresión podría explicar que no se haya encontrado un aumento en el tamaño ventricular, ya que podría ser un modelo similar a la sobreexpresión de NBCe1 en ratones, analizado en el objetivo específico 3. Sin embargo, para un mejor esclarecimiento de este modelo debería medirse también la expresión del NHE1, que en este caso podría no estar incrementada.

En conclusión, el silenciamiento del NBCn1 en ratas genera principalmente un aumento leve en la presión sistólica. En contraposición a las ratas a las cuales se les silenció el NBCe1, no se encontraron evidencias de desarrollo de hipertrofia cardíaca.

CONCLUSIONES

Las enfermedades cardiovasculares, entre ellas la hipertrofia cardíaca, constituyen la principal causa de muerte en el mundo actual. La hipertrofia cardíaca se define como un aumento de la masa miocárdica que excede al crecimiento embrionario y postnatal normal del corazón. Si bien existen ciertas cardiomiopatías hipertróficas familiares consecuencia de mutaciones genéticas, es mucho más frecuente la hipertrofia cardíaca reactiva, provocada por sobrecarga hemodinámica. Así, en el marco de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial, valvulopatías o luego de un infarto agudo de miocardio se desarrolla un tipo maladaptativo de hipertrofia que puede culminar en falla cardíaca y muerte.

En esta tesis doctoral se propuso investigar la contribución del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ electrogénico (NBCe1) cardíaco en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca (HC). Teniendo como antecedente que en ratas SHR, que constituyen un modelo de HC explicado por hipertensión arterial esencial, se describió que la función del NBCe1 estaba deficiente, se razonó que esta podía ser la causa de HC en esta cepa. Para comprobar esto, se desarrolló un vector viral adenoasociado cardioprotector que permitió el silenciamiento génico del NBCe1 (AAV9-shNBCe1). Los resultados obtenidos indican que el miocardio se hipertrofia como consecuencia de esta maniobra y se ha podido demostrar que esto es debido al aumento compensatorio en la expresión de los transportadores NBCn1 y NHE1, que indirectamente sobrecargarían al miocito de calcio.

Los datos presentados contribuyen con el esclarecimiento de esta patología cardíaca y a su vez permiten proponer a los transportadores alcalinizantes sarcolemales como blanco terapéutico para revertir la HC. En este sentido, se han reportado varios estudios que enfatizan en el silenciamiento o inhibición del NHE1 para disminuir la HC en distintos modelos^{79; 82; 83}. Sin embargo, no existen investigaciones que apunten a las isoformas cardíacas del NBC. Se ha propuesto como objetivo específico sobreexpresar al NBCe1 en ratas SHR con la hipótesis de que se revertiría la HC presente en esta cepa. No obstante, los resultados no han sido favorables para confirmar esto, sino que por el contrario parecería ser que esta maniobra empeora la HC ya establecida. Desde ya, es necesario un mejor estudio de este modelo para confirmar estas aseveraciones. Asimismo, sobreexpresar NBCe1 en ratones c57bl/6 sin patología previa no genera cambios en la masa o función ventricular, al menos luego de un mes de administrado el vector adenoasociado recombinante. Si bien hay trabajos

que avalan la sobreexpresión del NBCe1 como deletérea, por ejemplo en el remodelado por daño post-infarto de miocardio²⁰⁴, en esta tesis doctoral no ha sido posible identificar a esta proteína reguladora del pH_i como autora de alguna injuria miocárdica en animales sanos ni como blanco terapéutico en animales hipertróficos. Por estos motivos, se apuntó entonces al estudio de la contribución de la isoforma electroneutra del NBC en corazón. El silenciamiento del NBCn1 cardíaco no genera cambios a nivel del tamaño ventricular o de los cardiomiocitos ventriculares. Adicionalmente, se observa una tendencia al aumento compensatorio en la expresión del NBCe1, que debido a su estequiometría ($1/2Na^+$ por cada HCO_3^-) no estaría generando una sobrecarga intracelular de Na^+ y el aumento de Ca^{2+} concomitante. Se presume que el NHE1 no se encontraría sobreexpresado o actuando con mayor actividad en este modelo, pero esto no se ha podido evaluar en el presente trabajo.

Sería interesante investigar las consecuencias de silenciar al NBCn1 en ratas hipertróficas, posiblemente en la cepa SHR⁸⁹ o en ratas sometidas a sobrecarga hemodinámica por constricción de la aorta¹⁴, modelos en los cuales se ha reportado una sobreexpresión de dicho cotransportador. Teniendo presente además que su silenciamiento en ratas normotróficas no provoca HC, es factible que esta maniobra contribuya a prevenir o revertir este parámetro una vez establecida.

La corriente del NBCe1 (I_{NBC}) fue descrita por nuestro laboratorio en miocitos ventriculares de gato y rata como una corriente repolarizante aniónica dependiente de sodio y bicarbonato que produce un acortamiento del potencial de acción cardíaco (PAC) de aproximadamente el 25%^{22; 23}. Con respecto al PAC, ya había sido reportado en trabajos previos del laboratorio que el uso de anticuerpos policlonales inhibitorios ($\alpha L3$) y estimulatorios ($\alpha L4$) contra el NBCe1 generaba el incremento y la disminución de la duración del mismo, respectivamente¹². En esta tesis doctoral se ha establecido la participación del NBCe1 a través de su corriente I_{NBC} en la duración del PAC. Esto ha sido avalado tanto en la sobreexpresión como en el silenciamiento génico del NBCe1, encontrando en cada caso resultados contrapuestos.

El ECG es la herramienta clínica para medir la actividad eléctrica del corazón. Lo que se obtiene es un registro gráfico de la propagación de los PA a través de los cardiomiocitos en función del tiempo, de manera no invasiva. El intervalo QT representa toda la actividad eléctrica ventricular, es decir tanto despolarización como repolarización, y se mide desde el comienzo del complejo QRS hasta el final de la onda T. Debido a que su duración depende de forma

inversamente proporcional a la frecuencia cardíaca, es necesario para su mejor estudio analizarlo normalizado por la misma. Como el intervalo QTc indica cuánto tiempo permanecen despolarizados los ventrículos, es una medida grosera de la duración del “potencial de acción ventricular”. En este trabajo de tesis se encontraron por primera vez cambios electrofisiológicos registrados *in vivo* mediante el ECG debidos a la influencia del NBCe1. Estos cambios han sido contrapuestos en el silenciamiento y la sobreexpresión del NBCe1, confirmando la importancia de la corriente I_{NBC} en el ECG.

De esta forma, los resultados presentados evidencian la participación del NBCe1 a través de su corriente repolarizante en la duración del PAC y del intervalo QTc en el ECG, demostrándose su importancia por primera vez *in vivo* y convirtiéndose de esta manera en un actor a tener en cuenta en estudios electrofisiológicos futuros.

BIBLIOGRAFÍA

1. Harrison, S.M., Frampton, J.E., McCall, E., Boyett, M.R., and Orchard, C.H. (1992). Contraction and intracellular Ca^{2+} , Na^{+} , and H^{+} during acidosis in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 262, C348-357.
2. Orchard, C.H., and Kentish, J.C. (1990). Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. *Am J Physiol* 258, C967-981.
3. Orchard, C.H., and Cingolani, H.E. (1994). Acidosis and arrhythmias in cardiac muscle. *Cardiovasc Res* 28, 1312-1319.
4. Shcheynikov, N., Wang, Y., Park, M., Ko, S.B., Dorwart, M., Naruse, S., Thomas, P.J., and Muallem, S. (2006). Coupling modes and stoichiometry of $\text{Cl}^{-}/\text{HCO}_3^{-}$ exchange by *slc26a3* and *slc26a6*. *J Gen Physiol* 127, 511-524.
5. Niederer, S.A., Swietach, P., Wilson, D.A., Smith, N.P., and Vaughan-Jones, R.D. (2008). Measuring and modeling chloride-hydroxyl exchange in the Guinea-pig ventricular myocyte. *Biophys J* 94, 2385-2403.
6. Alvarez, B.V., Kieller, D.M., Quon, A.L., Markovich, D., and Casey, J.R. (2004). *Slc26a6*: a cardiac chloride-hydroxyl exchanger and predominant chloride-bicarbonate exchanger of the mouse heart. *J Physiol* 561, 721-734.
7. Orłowski, J., and Grinstein, S. (2004). Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch* 447, 549-565.
8. Sardet, C., Franchi, A., and Pouyssegur, J. (1989). Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ antiporter. *Cell* 56, 271-280.
9. Romero, M.F., Chen, A.P., Parker, M.D., and Boron, W.F. (2013). The SLC4 family of bicarbonate (HCO_3^{-}) transporters. *Mol Aspects Med* 34, 159-182.
10. Boron, W.F., and Boulpaep, E.L. (1983). Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Basolateral HCO_3^{-} transport. *J Gen Physiol* 81, 53-94.
11. Vaughan-Jones, R.D., Spitzer, K.W., and Swietach, P. (2009). Intracellular pH regulation in heart. *J Mol Cell Cardiol* 46, 318-331.
12. De Giusti, V.C., Orłowski, A., Villa-Abrille, M.C., de Cingolani, G.E., Casey, J.R., Alvarez, B.V., and Aiello, E.A. (2011). Antibodies against the cardiac sodium/bicarbonate cotransporter (NBCe1) as pharmacological tools. *Br J Pharmacol* 164, 1976-1989.
13. Pushkin, A., Abuladze, N., Newman, D., Lee, I., Xu, G., and Kurtz, I. (2000). Cloning, characterization and chromosomal assignment of NBC4, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family. *Biochim Biophys Acta* 1493, 215-218.
14. Yamamoto, T., Shirayama, T., Sakatani, T., Takahashi, T., Tanaka, H., Takamatsu, T., Spitzer, K.W., and Matsubara, H. (2007). Enhanced activity of ventricular $\text{Na}^{+}/\text{HCO}_3^{-}$ cotransport in pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H1254-1264.
15. Orłowski, A., De Giusti, V.C., Ciancio, M.C., Espejo, M.S., and Aiello, E.A. (2016). The cardiac electrogenic sodium/bicarbonate cotransporter (NBCe1) is activated by aldosterone through the G protein-coupled receptor 30 (GPR 30). *Channels (Austin)* 10, 428-434.
16. Garcarena, C.D., Ma, Y.L., Swietach, P., Huc, L., and Vaughan-Jones, R.D. (2013). Sarcolemmal localisation of $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchange and $\text{Na}^{+}/\text{HCO}_3^{-}$ co-transport influences the spatial regulation of intracellular pH in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 591, 2287-2306.
17. Lagadic-Gossmann, D., Buckler, K.J., and Vaughan-Jones, R.D. (1992). Role of bicarbonate in pH recovery from intracellular acidosis in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol* 458, 361-384.
18. Ibanez, A.M., Espejo, M.S., Zavala, M.R., Villa-Abrille, M.C., Lofeudo, J.M., Aiello, E.A., and De Giusti, V.C. (2019). Regulation of Intracellular pH is Altered in Cardiac Myocytes of Ovariectomized Rats. *J Am Heart Assoc* 8, e011066.

19. Boron, W.F. (2006). Acid-base transport by the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* 17, 2368-2382.
20. Boron, W.F., Chen, L., and Parker, M.D. (2009). Modular structure of sodium-coupled bicarbonate transporters. *J Exp Biol* 212, 1697-1706.
21. Huynh, K.W., Jiang, J., Abuladze, N., Tsirolnikov, K., Kao, L., Shao, X., Newman, D., Azimov, R., Pushkin, A., Zhou, Z.H., et al. (2018). CryoEM structure of the human SLC4A4 sodium-coupled acid-base transporter NBCe1. *Nat Commun* 9, 900.
22. Aiello, E.A., Petroff, M.G., Mattiazzi, A.R., and Cingolani, H.E. (1998). Evidence for an electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ symport in rat cardiac myocytes. *J Physiol* 512 (Pt 1), 137-148.
23. Villa-Abrille, M.C., Petroff, M.G., and Aiello, E.A. (2007). The electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransport modulates resting membrane potential and action potential duration in cat ventricular myocytes. *J Physiol* 578, 819-829.
24. Lebeche, D., Kaprielian, R., and Hajjar, R. (2006). Modulation of action potential duration on myocyte hypertrophic pathways. *J Mol Cell Cardiol* 40, 725-735.
25. Weisser-Thomas, J., Nguyen, Q., Schuettel, M., Thomas, D., Dreiner, U., Grohe, C., and Meyer, R. (2007). Age and hypertrophy related changes in contractile post-rest behavior and action potential properties in isolated rat myocytes. *Age (Dordr)* 29, 205-217.
26. Schmitt, B.M., Biemesderfer, D., Romero, M.F., Boulpaep, E.L., and Boron, W.F. (1999). Immunolocalization of the electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter in mammalian and amphibian kidney. *Am J Physiol* 276, F27-38.
27. Abuladze, N., Lee, I., Newman, D., Hwang, J., Boorer, K., Pushkin, A., and Kurtz, I. (1998). Molecular cloning, chromosomal localization, tissue distribution, and functional expression of the human pancreatic sodium bicarbonate cotransporter. *J Biol Chem* 273, 17689-17695.
28. Choi, I., Romero, M.F., Khandoudi, N., Bril, A., and Boron, W.F. (1999). Cloning and characterization of a human electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter isoform (hhNBC). *Am J Physiol* 276, C576-584.
29. Majumdar, D., Maunsbach, A.B., Shacka, J.J., Williams, J.B., Berger, U.V., Schultz, K.P., Harkins, L.E., Boron, W.F., Roth, K.A., and Bevensee, M.O. (2008). Localization of electrogenic Na/bicarbonate cotransporter NBCe1 variants in rat brain. *Neuroscience* 155, 818-832.
30. Gross, E., Hawkins, K., Abuladze, N., Pushkin, A., Cotton, C.U., Hopfer, U., and Kurtz, I. (2001). The stoichiometry of the electrogenic sodium bicarbonate cotransporter NBC1 is cell-type dependent. *J Physiol* 531, 597-603.
31. Muller-Berger, S., Ducoudret, O., Diakov, A., and Fromter, E. (2001). The renal Na-HCO₃⁻ cotransporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes: change in stoichiometry in response to elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration. *Pflugers Arch* 442, 718-728.
32. Demirci, F.Y., Chang, M.H., Mah, T.S., Romero, M.F., and Gorin, M.B. (2006). Proximal renal tubular acidosis and ocular pathology: a novel missense mutation in the gene (SLC4A4) for sodium bicarbonate cotransporter protein (NBCe1). *Mol Vis* 12, 324-330.
33. Dinour, D., Chang, M.H., Satoh, J., Smith, B.L., Angle, N., Knecht, A., Serban, I., Holtzman, E.J., and Romero, M.F. (2004). A novel missense mutation in the sodium bicarbonate cotransporter (NBCe1/SLC4A4) causes proximal tubular acidosis and glaucoma through ion transport defects. *J Biol Chem* 279, 52238-52246.
34. Igarashi, T., Inatomi, J., Sekine, T., Seki, G., Shimadzu, M., Tozawa, F., Takeshima, Y., Takumi, T., Takahashi, T., Yoshikawa, N., et al. (2001). Novel nonsense mutation in the Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter gene (SLC4A4) in a patient with permanent isolated proximal renal tubular acidosis and bilateral glaucoma. *J Am Soc Nephrol* 12, 713-718.
35. Lacruz, R.S., Nanci, A., White, S.N., Wen, X., Wang, H., Zalzal, S.F., Luong, V.Q., Schuetter, V.L., Conti, P.S., Kurtz, I., et al. (2010). The sodium bicarbonate cotransporter (NBCe1) is essential for normal development of mouse dentition. *J Biol Chem* 285, 24432-24438.

36. Gawenis, L.R., Bradford, E.M., Prasad, V., Lorenz, J.N., Simpson, J.E., Clarke, L.L., Woo, A.L., Grisham, C., Sanford, L.P., Doetschman, T., et al. (2007). Colonic anion secretory defects and metabolic acidosis in mice lacking the NBC1 Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter. *J Biol Chem* 282, 9042-9052.
37. Lobov, G.I., and Kubyshkina, N.A. (2001). Effect of acidosis on contractile function of mesenterial lymphatic vessels in bulls. *Bull Exp Biol Med* 132, 622-624.
38. Zhu, Q., Kao, L., Azimov, R., Newman, D., Liu, W., Pushkin, A., Abuladze, N., and Kurtz, I. (2010). Topological location and structural importance of the NBCe1-A residues mutated in proximal renal tubular acidosis. *J Biol Chem* 285, 13416-13426.
39. Suzuki, M., Van Paesschen, W., Stalmans, I., Horita, S., Yamada, H., Bergmans, B.A., Legius, E., Riant, F., De Jonghe, P., Li, Y., et al. (2010). Defective membrane expression of the Na⁽⁺⁾-HCO₃⁽⁻⁾ cotransporter NBCe1 is associated with familial migraine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15963-15968.
40. Widdas, W.F., Baker, G.F., and Baker, P. (1994). The acceleration of pH volume changes in human red cells by bicarbonate and the role of carbonic anhydrase. *Cytobios* 80, 7-24.
41. Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taguchi, T., and Onishi, S. (1999). Human mitochondrial carbonic anhydrase VB. cDNA cloning, mRNA expression, subcellular localization, and mapping to chromosome x. *J Biol Chem* 274, 21228-21233.
42. Alvarez, B.V., Johnson, D.E., Sowah, D., Soliman, D., Light, P.E., Xia, Y., Karmazyn, M., and Casey, J.R. (2007). Carbonic anhydrase inhibition prevents and reverts cardiomyocyte hypertrophy. *J Physiol* 579, 127-145.
43. Scheibe, R.J., Gros, G., Parkkila, S., Waheed, A., Grubb, J.H., Shah, G.N., Sly, W.S., and Wetzel, P. (2006). Expression of membrane-bound carbonic anhydrases IV, IX, and XIV in the mouse heart. *J Histochem Cytochem* 54, 1379-1391.
44. Schueler, C., Becker, H.M., McKenna, R., and Deitmer, J.W. (2011). Transport activity of the sodium bicarbonate cotransporter NBCe1 is enhanced by different isoforms of carbonic anhydrase. *PLoS One* 6, e27167.
45. Yamada, H., Horita, S., Suzuki, M., Fujita, T., and Seki, G. (2011). Functional role of a putative carbonic anhydrase II-binding domain in the electrogenic Na⁺ -HCO₃⁻ cotransporter NBCe1 expressed in *Xenopus* oocytes. *Channels (Austin)* 5, 106-109.
46. Hallerdei, J., Scheibe, R.J., Parkkila, S., Waheed, A., Sly, W.S., Gros, G., Wetzel, P., and Endeward, V. (2010). T tubules and surface membranes provide equally effective pathways of carbonic anhydrase-facilitated lactic acid transport in skeletal muscle. *PLoS One* 5, e15137.
47. Orlowski, A., De Giusti, V.C., Morgan, P.E., Aiello, E.A., and Alvarez, B.V. (2012). Binding of carbonic anhydrase IX to extracellular loop 4 of the NBCe1 Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter enhances NBCe1-mediated HCO₃⁻ influx in the rat heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 303, C69-80.
48. Li, X., Liu, Y., Alvarez, B.V., Casey, J.R., and Fliegel, L. (2006). A novel carbonic anhydrase II binding site regulates NHE1 activity. *Biochemistry* 45, 2414-2424.
49. Ando, H., Mizutani, A., Matsu-ura, T., and Mikoshiba, K. (2003). IRBIT, a novel inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptor-binding protein, is released from the IP₃ receptor upon IP₃ binding to the receptor. *J Biol Chem* 278, 10602-10612.
50. Ando, H., Mizutani, A., Kiefer, H., Tsuzurugi, D., Michikawa, T., and Mikoshiba, K. (2006). IRBIT suppresses IP₃ receptor activity by competing with IP₃ for the common binding site on the IP₃ receptor. *Mol Cell* 22, 795-806.
51. Shirakabe, K., Priori, G., Yamada, H., Ando, H., Horita, S., Fujita, T., Fujimoto, I., Mizutani, A., Seki, G., and Mikoshiba, K. (2006). IRBIT, an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding protein, specifically binds to and activates pancreas-type Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter 1 (pNBC1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9542-9547.
52. Yang, D., Shcheynikov, N., Zeng, W., Ohana, E., So, I., Ando, H., Mizutani, A., Mikoshiba, K., and Muallem, S. (2009). IRBIT coordinates epithelial fluid and HCO₃⁻ secretion by

- stimulating the transporters pNBC1 and CFTR in the murine pancreatic duct. *J Clin Invest* 119, 193-202.
53. McAlear, S.D., Liu, X., Williams, J.B., McNicholas-Bevensee, C.M., and Bevensee, M.O. (2006). Electrogenic Na/HCO₃ cotransporter (NBCe1) variants expressed in *Xenopus* oocytes: functional comparison and roles of the amino and carboxy termini. *J Gen Physiol* 127, 639-658.
 54. Lee, S.K., Boron, W.F., and Parker, M.D. (2012). Relief of autoinhibition of the electrogenic Na-HCO₃ [corrected] cotransporter NBCe1-B: role of IRBIT vs.amino-terminal truncation. *Am J Physiol Cell Physiol* 302, C518-526.
 55. Yang, D., Li, Q., So, I., Huang, C.L., Ando, H., Mizutani, A., Seki, G., Mikoshiba, K., Thomas, P.J., and Muallem, S. (2011). IRBIT governs epithelial secretion in mice by antagonizing the WNK/SPAK kinase pathway. *J Clin Invest* 121, 956-965.
 56. Hong, J.H., Yang, D., Shcheynikov, N., Ohana, E., Shin, D.M., and Muallem, S. (2013). Convergence of IRBIT, phosphatidylinositol (4,5) biphosphate, and WNK/SPAK kinases in regulation of the Na⁺-HCO₃⁻ cotransporters family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 4105-4110.
 57. Park, S., Hong, J.H., Ohana, E., and Muallem, S. (2012). The WNK/SPAK and IRBIT/PP1 pathways in epithelial fluid and electrolyte transport. *Physiology (Bethesda)* 27, 291-299.
 58. Thornell, I.M., Wu, J., Liu, X., and Bevensee, M.O. (2012). PIP₂ hydrolysis stimulates the electrogenic Na⁺-bicarbonate cotransporter NBCe1-B and -C variants expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* 590, 5993-6011.
 59. Thornell, I.M., and Bevensee, M.O. (2015). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate degradation inhibits the Na⁺/bicarbonate cotransporter NBCe1-B and -C variants expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 593, 541-558.
 60. Wu, J., McNicholas, C.M., and Bevensee, M.O. (2009). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) stimulates the electrogenic Na/HCO₃ cotransporter NBCe1-A expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14150-14155.
 61. Edwards, A., and Crambert, G. (2017). Versatility of NaCl transport mechanisms in the cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 313, F1254-F1263.
 62. Shcheynikov, N., Son, A., Hong, J.H., Yamazaki, O., Ohana, E., Kurtz, I., Shin, D.M., and Muallem, S. (2015). Intracellular Cl⁻ as a signaling ion that potently regulates Na⁺/HCO₃⁻ transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E329-337.
 63. Vachel, L., Shcheynikov, N., Yamazaki, O., Fremder, M., Ohana, E., Son, A., Shin, D.M., Yamazaki-Nakazawa, A., Yang, C.R., Knepper, M.A., et al. (2018). Modulation of Cl⁻ signaling and ion transport by recruitment of kinases and phosphatases mediated by the regulatory protein IRBIT. *Sci Signal* 11.
 64. Shyu, K.G., Chen, C.C., Wang, B.W., and Kuan, P. (2001). Angiotensin II receptor antagonist blocks the expression of connexin43 induced by cyclical mechanical stretch in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 33, 691-698.
 65. Sadoshima, J., and Izumo, S. (1996). Autocrine secretion of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Contrib Nephrol* 118, 214-221.
 66. De Giusti, V.C., Garcarena, C.D., and Aiello, E.A. (2009). Role of reactive oxygen species (ROS) in angiotensin II-induced stimulation of the cardiac Na⁺/HCO₃⁻ cotransport. *J Mol Cell Cardiol* 47, 716-722.
 67. Baetz, D., Haworth, R.S., Avkiran, M., and Feuvray, D. (2002). The ERK pathway regulates Na⁽⁺⁾-HCO₃⁽⁻⁾ cotransport activity in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H2102-2109.
 68. De Giusti, V.C., Orlowski, A., and Aiello, E.A. (2010). Angiotensin II inhibits the electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransport of cat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 49, 812-818.

69. Owman, C., Blay, P., Nilsson, C., and Lolait, S.J. (1996). Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 228, 285-292.
70. Filardo, E.J., Quinn, J.A., Bland, K.I., and Frackelton, A.R., Jr. (2000). Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 14, 1649-1660.
71. Gros, R., Ding, Q., Sklar, L.A., Prossnitz, E.E., Arterburn, J.B., Chorazyczewski, J., and Feldman, R.D. (2011). GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. *Hypertension* 57, 442-451.
72. Kvingedal, A.M., and Smeland, E.B. (1997). A novel putative G-protein-coupled receptor expressed in lung, heart and lymphoid tissue. *FEBS Lett* 407, 59-62.
73. Gros, R., Ding, Q., Liu, B., Chorazyczewski, J., and Feldman, R.D. (2013). Aldosterone mediates its rapid effects in vascular endothelial cells through GPER activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 304, C532-540.
74. Ding, Q., Gros, R., Limbird, L.E., Chorazyczewski, J., and Feldman, R.D. (2009). Estradiol-mediated ERK phosphorylation and apoptosis in vascular smooth muscle cells requires GPR 30. *Am J Physiol Cell Physiol* 297, C1178-1187.
75. De Giusti, V.C., Orłowski, A., Ciancio, M.C., Espejo, M.S., Gonano, L.A., Caldiz, C.I., Vila Petroff, M.G., Villa-Abrille, M.C., and Aiello, E.A. (2015). Aldosterone stimulates the cardiac sodium/bicarbonate cotransporter via activation of the g protein-coupled receptor gpr30. *J Mol Cell Cardiol* 89, 260-267.
76. Ganau, A., Devereux, R.B., Roman, M.J., de Simone, G., Pickering, T.G., Saba, P.S., Vargiu, P., Simongini, I., and Laragh, J.H. (1992). Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 19, 1550-1558.
77. Mraiche, F., Oka, T., Gan, X.T., Karmazyn, M., and Fliegel, L. (2011). Activated NHE1 is required to induce early cardiac hypertrophy in mice. *Basic Res Cardiol* 106, 603-616.
78. Nakamura, T.Y., Iwata, Y., Arai, Y., Komamura, K., and Wakabayashi, S. (2008). Activation of Na⁺/H⁺ exchanger 1 is sufficient to generate Ca²⁺ signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 103, 891-899.
79. Baartscheer, A., Hardziyenka, M., Schumacher, C.A., Belterman, C.N., van Borren, M.M., Verkerk, A.O., Coronel, R., and Fiolet, J.W. (2008). Chronic inhibition of the Na⁺/H⁺ - exchanger causes regression of hypertrophy, heart failure, and ionic and electrophysiological remodelling. *Br J Pharmacol* 154, 1266-1275.
80. Cingolani, H.E., and Ennis, I.L. (2007). Sodium-hydrogen exchanger, cardiac overload, and myocardial hypertrophy. *Circulation* 115, 1090-1100.
81. Garcarena, C.D., Caldiz, C.I., Portiansky, E.L., Chiappe de Cingolani, G.E., and Ennis, I.L. (2009). Chronic NHE-1 blockade induces an antiapoptotic effect in the hypertrophied heart. *J Appl Physiol* (1985) 106, 1325-1331.
82. Medina, A.J., Pinilla, O.A., Portiansky, E.L., Caldiz, C.I., and Ennis, I.L. (2019). Silencing of the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger 1(NHE-1) prevents cardiac structural and functional remodeling induced by angiotensin II. *Exp Mol Pathol* 107, 1-9.
83. Nolly, M.B., Pinilla, A.O., Ennis, I.L., Cingolani, H.E., and Morgan, P.E. (2015). Cardiac hypertrophy reduction in SHR by specific silencing of myocardial Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger. *J Appl Physiol* (1985) 118, 1154-1160.
84. Aiello, E.A., Villa-Abrille, M.C., Dulce, R.A., Cingolani, H.E., and Perez, N.G. (2005). Endothelin-1 stimulates the Na⁺/Ca²⁺ exchanger reverse mode through intracellular Na⁺ (Naⁱ)-dependent and Naⁱ-independent pathways. *Hypertension* 45, 288-293.
85. Baartscheer, A., and van Borren, M.M. (2008). Sodium ion transporters as new therapeutic targets in heart failure. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 6, 229-236.

86. Cingolani, H.E., Perez, N.G., Aiello, E.A., Ennis, I.L., Garcarena, C.D., Villa-Abrille, M.C., Dulce, R.A., Caldiz, C.I., Yeves, A.M., Correa, M.V., et al. (2008). Early signals after stretch leading to cardiac hypertrophy. Key role of NHE-1. *Front Biosci* 13, 7096-7114.
87. Molkentin, J.D., Lu, J.R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S.R., and Olson, E.N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93, 215-228.
88. Hallback, M., and Weiss, L. (1977). Mechanisms of spontaneous hypertension in rats. *Med Clin North Am* 61, 593-609.
89. Orłowski, A., Ciancio, M.C., Caldiz, C.I., De Giusti, V.C., and Aiello, E.A. (2014). Reduced sarcolemmal expression and function of the NBCe1 isoform of the Na⁽⁺⁾-HCO₃⁽⁻⁾ cotransporter in hypertrophied cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res* 101, 211-219.
90. Medina, A.J., Ibanez, A.M., Diaz-Zegarra, L.A., Portiansky, E.L., Blanco, P.G., Pereyra, E.V., de Giusti, V.C., Aiello, E.A., Yeves, A.M., and Ennis, I.L. (2020). Cardiac up-regulation of NBCe1 emerges as a beneficial consequence of voluntary wheel running in mice. *Arch Biochem Biophys* 694, 108600.
91. McGinley, C., and Bishop, D.J. (2016). Influence of training intensity on adaptations in acid/base transport proteins, muscle buffer capacity, and repeated-sprint ability in active men. *J Appl Physiol* (1985) 121, 1290-1305.
92. Choi, I., Aalkjaer, C., Boulpaep, E.L., and Boron, W.F. (2000). An electroneutral sodium/bicarbonate cotransporter NBCn1 and associated sodium channel. *Nature* 405, 571-575.
93. Pushkin, A., Abuladze, N., Lee, I., Newman, D., Hwang, J., and Kurtz, I. (1999). Cloning, tissue distribution, genomic organization, and functional characterization of NBC3, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family. *J Biol Chem* 274, 16569-16575.
94. Liu, Y., Qin, X., Wang, D.K., Guo, Y.M., Gill, H.S., Morris, N., Parker, M.D., Chen, L.M., and Boron, W.F. (2013). Effects of optional structural elements, including two alternative amino termini and a new splicing cassette IV, on the function of the sodium-bicarbonate cotransporter NBCn1 (SLC4A7). *J Physiol* 591, 4983-5004.
95. Cooper, D.S., Lee, H.J., Yang, H.S., Kippen, J., Yun, C.C., and Choi, I. (2006). The electroneutral sodium/bicarbonate cotransporter containing an amino terminal 123-amino-acid cassette is expressed predominantly in the heart. *J Biomed Sci* 13, 593-595.
96. Park, H.J., Rajbhandari, I., Yang, H.S., Lee, S., Cucoranu, D., Cooper, D.S., Klein, J.D., Sands, J.M., and Choi, I. (2010). Neuronal expression of sodium/bicarbonate cotransporter NBCn1 (SLC4A7) and its response to chronic metabolic acidosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 298, C1018-1028.
97. Praetorius, J., Kim, Y.H., Bouzinova, E.V., Frische, S., Rojek, A., Aalkjaer, C., and Nielsen, S. (2004). NBCn1 is a basolateral Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter in rat kidney inner medullary collecting ducts. *Am J Physiol Renal Physiol* 286, F903-912.
98. Gresz, V., Kwon, T.H., Vorum, H., Zelles, T., Kurtz, I., Steward, M.C., Aalkjaer, C., and Nielsen, S. (2002). Immunolocalization of electroneutral Na⁽⁺⁾-HCO cotransporters in human and rat salivary glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G473-480.
99. Luo, X., Choi, J.Y., Ko, S.B., Pushkin, A., Kurtz, I., Ahn, W., Lee, M.G., and Muallem, S. (2001). HCO₃⁻ salvage mechanisms in the submandibular gland acinar and duct cells. *J Biol Chem* 276, 9808-9816.
100. Vorum, H., Kwon, T.H., Fulton, C., Simonsen, B., Choi, I., Boron, W., Maunsbach, A.B., Nielsen, S., and Aalkjaer, C. (2000). Immunolocalization of electroneutral Na-HCO₃⁽⁻⁾ cotransporter in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F901-909.
101. Odgaard, E., Jakobsen, J.K., Frische, S., Praetorius, J., Nielsen, S., Aalkjaer, C., and Leipziger, J. (2004). Basolateral Na⁺-dependent HCO₃⁻ transporter NBCn1-mediated HCO₃⁻ influx in rat medullary thick ascending limb. *J Physiol* 555, 205-218.

102. Bourgeois, S., Meer, L.V., Wootla, B., Bloch-Faure, M., Chambrey, R., Shull, G.E., Gawenis, L.R., and Houillier, P. (2010). NHE4 is critical for the renal handling of ammonia in rodents. *J Clin Invest* 120, 1895-1904.
103. Jakobsen, J.K., Odgaard, E., Wang, W., Elkjaer, M.L., Nielsen, S., Aalkjaer, C., and Leipziger, J. (2004). Functional up-regulation of basolateral Na⁺-dependent HCO₃⁻ transporter NBCn1 in medullary thick ascending limb of K⁺-depleted rats. *Pflügers Arch* 448, 571-578.
104. Kwon, T.H., Fulton, C., Wang, W., Kurtz, I., Frokiaer, J., Aalkjaer, C., and Nielsen, S. (2002). Chronic metabolic acidosis upregulates rat kidney Na-HCO cotransporters NBCn1 and NBC3 but not NBC1. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F341-351.
105. Bok, D., Galbraith, G., Lopez, I., Woodruff, M., Nusinowitz, S., BeltrandelRio, H., Huang, W., Zhao, S., Geske, R., Montgomery, C., et al. (2003). Blindness and auditory impairment caused by loss of the sodium bicarbonate cotransporter NBC3. *Nat Genet* 34, 313-319.
106. Lopez, I.A., Acuna, D., Galbraith, G., Bok, D., Ishiyama, A., Liu, W., and Kurtz, I. (2005). Time course of auditory impairment in mice lacking the electroneutral sodium bicarbonate cotransporter NBC3 (slc4a7). *Brain Res Dev Brain Res* 160, 63-77.
107. Ahmed, S., Thomas, G., Ghousaini, M., Healey, C.S., Humphreys, M.K., Platte, R., Morrison, J., Maranian, M., Pooley, K.A., Luben, R., et al. (2009). Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23.2. *Nat Genet* 41, 585-590.
108. Chen, W., Zhong, R., Ming, J., Zou, L., Zhu, B., Lu, X., Ke, J., Zhang, Y., Liu, L., Miao, X., et al. (2012). The SLC4A7 variant rs4973768 is associated with breast cancer risk: evidence from a case-control study and a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 136, 847-857.
109. Antoniou, A.C., Beesley, J., McGuffog, L., Sinilnikova, O.M., Healey, S., Neuhausen, S.L., Ding, Y.C., Rebbeck, T.R., Weitzel, J.N., Lynch, H.T., et al. (2010). Common breast cancer susceptibility alleles and the risk of breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: implications for risk prediction. *Cancer Res* 70, 9742-9754.
110. Boedtker, E., Moreira, J.M., Mele, M., Vahl, P., Wielenga, V.T., Christiansen, P.M., Jensen, V.E., Pedersen, S.F., and Aalkjaer, C. (2013). Contribution of Na⁺,HCO₃⁻-cotransport to cellular pH control in human breast cancer: a role for the breast cancer susceptibility locus NBCn1 (SLC4A7). *Int J Cancer* 132, 1288-1299.
111. Lee, S., Mele, M., Vahl, P., Christiansen, P.M., Jensen, V.E., and Boedtker, E. (2015). Na⁺,HCO₃⁻-cotransport is functionally upregulated during human breast carcinogenesis and required for the inverted pH gradient across the plasma membrane. *Pflügers Arch* 467, 367-377.
112. McLean, L.A., Roscoe, J., Jorgensen, N.K., Gorin, F.A., and Cala, P.M. (2000). Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 278, C676-688.
113. Choi, I., Soo Yang, H., and Boron, W.F. (2007). The electrogenicity of the rat sodium-bicarbonate cotransporter NBCe1 requires interactions among transmembrane segments of the transporter. *J Physiol* 578, 131-142.
114. Kim, K.H., Shcheynikov, N., Wang, Y., and Muallem, S. (2005). SLC26A7 is a Cl⁻ channel regulated by intracellular pH. *J Biol Chem* 280, 6463-6470.
115. Dorwart, M.R., Shcheynikov, N., Wang, Y., Stippec, S., and Muallem, S. (2007). SLC26A9 is a Cl⁻ channel regulated by the WNK kinases. *J Physiol* 584, 333-345.
116. Rusnak, F., and Mertz, P. (2000). Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80, 1483-1521.
117. Danielsen, A.A., Parker, M.D., Lee, S., Boron, W.F., Aalkjaer, C., and Boedtker, E. (2013). Splice cassette II of Na⁺,HCO₃⁻ cotransporter NBCn1 (slc4a7) interacts with calcineurin A: implications for transporter activity and intracellular pH control during rat artery contractions. *J Biol Chem* 288, 8146-8155.
118. Damkier, H.H., Nielsen, S., and Praetorius, J. (2006). An anti-NH₂-terminal antibody localizes NBCn1 to heart endothelia and skeletal and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H172-180.

119. Boedtkjer, E., Praetorius, J., and Aalkjaer, C. (2006). NBCn1 (slc4a7) mediates the Na⁺-dependent bicarbonate transport important for regulation of intracellular pH in mouse vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 98, 515-523.
120. Boedtkjer, E., Praetorius, J., Matchkov, V.V., Stankevicius, E., Mogensen, S., Fuchtbauer, A.C., Simonsen, U., Fuchtbauer, E.M., and Aalkjaer, C. (2011). Disruption of Na⁺,HCO₃⁽⁻⁾ cotransporter NBCn1 (slc4a7) inhibits NO-mediated vasorelaxation, smooth muscle Ca⁽²⁾(⁺) sensitivity, and hypertension development in mice. *Circulation* 124, 1819-1829.
121. Lu, X., Wang, L., Lin, X., Huang, J., Charles Gu, C., He, M., Shen, H., He, J., Zhu, J., Li, H., et al. (2015). Genome-wide association study in Chinese identifies novel loci for blood pressure and hypertension. *Hum Mol Genet* 24, 865-874.
122. International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association, S., Ehret, G.B., Munroe, P.B., Rice, K.M., Bochud, M., Johnson, A.D., Chasman, D.I., Smith, A.V., Tobin, M.D., Verwoert, G.C., et al. (2011). Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature* 478, 103-109.
123. Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hammon, W.M. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 149, 754-756.
124. Sonntag, F., Schmidt, K., and Kleinschmidt, J.A. (2010). A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10220-10225.
125. Im, D.S., and Muzyczka, N. (1990). The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* 61, 447-457.
126. Im, D.S., and Muzyczka, N. (1992). Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep52, and Rep40 and their biochemical characterization. *J Virol* 66, 1119-1128.
127. King, J.A., Dubielzig, R., Grimm, D., and Kleinschmidt, J.A. (2001). DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO J* 20, 3282-3291.
128. Sonntag, F., Bleker, S., Leuchs, B., Fischer, R., and Kleinschmidt, J.A. (2006). Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. *J Virol* 80, 11040-11054.
129. Girod, A., Wobus, C.E., Zadori, Z., Ried, M., Leike, K., Tijssen, P., Kleinschmidt, J.A., and Hallek, M. (2002). The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J Gen Virol* 83, 973-978.
130. Rutledge, E.A., Halbert, C.L., and Russell, D.W. (1998). Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *J Virol* 72, 309-319.
131. Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* 16, 1073-1080.
132. Jessup, M., Greenberg, B., Mancini, D., Cappola, T., Pauly, D.F., Jaski, B., Yaroshinsky, A., Zsebo, K.M., Dittrich, H., Hajjar, R.J., et al. (2011). Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation* 124, 304-313.
133. Greenberg, B., Butler, J., Felker, G.M., Ponikowski, P., Voors, A.A., Desai, A.S., Barnard, D., Bouchard, A., Jaski, B., Lyon, A.R., et al. (2016). Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet* 387, 1178-1186.
134. Ambrosi, C.M., Sadananda, G., Han, J.L., and Entcheva, E. (2019). Adeno-Associated Virus Mediated Gene Delivery: Implications for Scalable in vitro and in vivo Cardiac Optogenetic Models. *Front Physiol* 10, 168.
135. Nonnenmacher, M., and Weber, T. (2012). Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 19, 649-658.

136. Hansen, J., Qing, K., and Srivastava, A. (2001). Infection of purified nuclei by adeno-associated virus 2. *Mol Ther* 4, 289-296.
137. Xiao, P.J., and Samulski, R.J. (2012). Cytoplasmic trafficking, endosomal escape, and perinuclear accumulation of adeno-associated virus type 2 particles are facilitated by microtubule network. *J Virol* 86, 10462-10473.
138. Balakrishnan, B., and Jayandharan, G.R. (2014). Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Curr Gene Ther* 14, 86-100.
139. Buller, R.M., Janik, J.E., Sebring, E.D., and Rose, J.A. (1981). Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* 40, 241-247.
140. Urabe, M., Nakakura, T., Xin, K.Q., Obara, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kotin, R.M., and Ozawa, K. (2006). Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *J Virol* 80, 1874-1885.
141. Nash, K., Chen, W., and Muzyczka, N. (2008). Complete in vitro reconstitution of adeno-associated virus DNA replication requires the minichromosome maintenance complex proteins. *J Virol* 82, 1458-1464.
142. Ward, P., Dean, F.B., O'Donnell, M.E., and Berns, K.I. (1998). Role of the adenovirus DNA-binding protein in in vitro adeno-associated virus DNA replication. *J Virol* 72, 420-427.
143. Chang, L.S., Shi, Y., and Shenk, T. (1989). Adeno-associated virus P5 promoter contains an adenovirus E1A-inducible element and a binding site for the major late transcription factor. *J Virol* 63, 3479-3488.
144. Shi, Y., Seto, E., Chang, L.S., and Shenk, T. (1991). Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* 67, 377-388.
145. Slanina, H., Weger, S., Stow, N.D., Kuhrs, A., and Heilbronn, R. (2006). Role of the herpes simplex virus helicase-primase complex during adeno-associated virus DNA replication. *J Virol* 80, 5241-5250.
146. Weindler, F.W., and Heilbronn, R. (1991). A subset of herpes simplex virus replication genes provides helper functions for productive adeno-associated virus replication. *J Virol* 65, 2476-2483.
147. Alazard-Dany, N., Nicolas, A., Ploquin, A., Strasser, R., Greco, A., Epstein, A.L., Fraefel, C., and Salvetti, A. (2009). Definition of herpes simplex virus type 1 helper activities for adeno-associated virus early replication events. *PLoS Pathog* 5, e1000340.
148. Clement, N., Knop, D.R., and Byrne, B.J. (2009). Large-scale adeno-associated viral vector production using a herpesvirus-based system enables manufacturing for clinical studies. *Hum Gene Ther* 20, 796-806.
149. Urabe, M., Ding, C., and Kotin, R.M. (2002). Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther* 13, 1935-1943.
150. Gaudet, D., Methot, J., and Kastelein, J. (2012). Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Curr Opin Lipidol* 23, 310-320.
151. Mendell, J.R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W.D., Rodino-Klapac, L.R., Prior, T.W., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Church, K., et al. (2017). Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 377, 1713-1722.
152. Maguire, A.M., High, K.A., Auricchio, A., Wright, J.F., Pierce, E.A., Testa, F., Mingozzi, F., Bencicelli, J.L., Ying, G.S., Rossi, S., et al. (2009). Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 374, 1597-1605.
153. Aitken, M.L., Moss, R.B., Waltz, D.A., Dovey, M.E., Tonelli, M.R., McNamara, S.C., Gibson, R.L., Ramsey, B.W., Carter, B.J., and Reynolds, T.C. (2001). A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease. *Hum Gene Ther* 12, 1907-1916.
154. Tardieu, M., Zerah, M., Husson, B., de Bournonville, S., Deiva, K., Adamsbaum, C., Vincent, F., Hocquemiller, M., Broissand, C., Furlan, V., et al. (2014). Intracerebral administration

- of adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human SGSH and SUMF1 cDNAs in children with mucopolysaccharidosis type IIIA disease: results of a phase I/II trial. *Hum Gene Ther* 25, 506-516.
155. Nathwani, A.C., Tuddenham, E.G., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D.C., Chowdhary, P., Riddell, A., Pie, A.J., Harrington, C., et al. (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 365, 2357-2365.
 156. Mendell, J.R., Sahenk, Z., Lehman, K., Nease, C., Lowes, L.P., Miller, N.F., Iammarino, M.A., Alfano, L.N., Nicholl, A., Al-Zaidy, S., et al. (2020). Assessment of Systemic Delivery of rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in Children With Duchenne Muscular Dystrophy: A Nonrandomized Controlled Trial. *JAMA Neurol* 77, 1122-1131.
 157. Marks, W.J., Jr., Bartus, R.T., Siffert, J., Davis, C.S., Lozano, A., Boulis, N., Vitek, J., Stacy, M., Turner, D., Verhagen, L., et al. (2010). Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol* 9, 1164-1172.
 158. Linden, R.M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E., and Berns, K.I. (1996). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11288-11294.
 159. Samulski, R.J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J.D., Housman, D.E., Epstein, N., and Hunter, L.A. (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* 10, 3941-3950.
 160. Penaud-Budloo, M., Le Guiner, C., Nowrouzi, A., Toromanoff, A., Cherel, Y., Chenuaud, P., Schmidt, M., von Kalle, C., Rolling, F., Moullier, P., et al. (2008). Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. *J Virol* 82, 7875-7885.
 161. Clark, K.R., Sferra, T.J., Lo, W., Qu, G., Chen, R., and Johnson, P.R. (1999). Gene transfer into the CNS using recombinant adeno-associated virus: analysis of vector DNA forms resulting in sustained expression. *J Drug Target* 7, 269-283.
 162. Nakai, H., Yant, S.R., Storm, T.A., Fuess, S., Meuse, L., and Kay, M.A. (2001). Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol* 75, 6969-6976.
 163. Flotte, T.R., Afione, S.A., and Zeitlin, P.L. (1994). Adeno-associated virus vector gene expression occurs in nondividing cells in the absence of vector DNA integration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11, 517-521.
 164. Schnepf, B.C., Jensen, R.L., Clark, K.R., and Johnson, P.R. (2009). Infectious molecular clones of adeno-associated virus isolated directly from human tissues. *J Virol* 83, 1456-1464.
 165. Kessler, P.D., Podsakoff, G.M., Chen, X., McQuiston, S.A., Colosi, P.C., Matelis, L.A., Kurtzman, G.J., and Byrne, B.J. (1996). Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14082-14087.
 166. Xiao, X., Li, J., and Samulski, R.J. (1996). Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* 70, 8098-8108.
 167. Flannery, J.G., Zolotukhin, S., Vaquero, M.I., LaVail, M.M., Muzyczka, N., and Hauswirth, W.W. (1997). Efficient photoreceptor-targeted gene expression in vivo by recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6916-6921.
 168. Mandel, R.J., Spratt, S.K., Snyder, R.O., and Leff, S.E. (1997). Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus encoding rat glial cell line-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration model of Parkinson's disease in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14083-14088.
 169. Peel, A.L., Zolotukhin, S., Schrimsher, G.W., Muzyczka, N., and Reier, P.J. (1997). Efficient transduction of green fluorescent protein in spinal cord neurons using adeno-associated virus vectors containing cell type-specific promoters. *Gene Ther* 4, 16-24.
 170. Snyder, R.O., Spratt, S.K., Lagarde, C., Bohl, D., Kaspar, B., Sloan, B., Cohen, L.K., and Danos, O. (1997). Efficient and stable adeno-associated virus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice. *Hum Gene Ther* 8, 1891-1900.

171. Snyder, R.O., Miao, C.H., Patijn, G.A., Spratt, S.K., Danos, O., Nagy, D., Gown, A.M., Winther, B., Meuse, L., Cohen, L.K., et al. (1997). Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet* 16, 270-276.
172. Weitzman, M.D., and Linden, R.M. (2011). Adeno-associated virus biology. *Methods Mol Biol* 807, 1-23.
173. Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Gao, G., Lin, J., and Wilson, J.M. (2009). Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis* 199, 381-390.
174. Orłowski, A., Katz, M.G., Gubara, S.M., Fagnoli, A.S., Fish, K.M., and Weber, T. (2020). Successful Transduction with AAV Vectors after Selective Depletion of Anti-AAV Antibodies by Immunoabsorption. *Mol Ther Methods Clin Dev* 16, 192-203.
175. Walport, M.J. (2001). Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344, 1058-1066.
176. Brocchieri, L., and Karlin, S. (2005). Protein length in eukaryotic and prokaryotic proteomes. *Nucleic Acids Res* 33, 3390-3400.
177. Mingozi, F., Anguela, X.M., Pavani, G., Chen, Y., Davidson, R.J., Hui, D.J., Yazicioglu, M., Elkouby, L., Hinderer, C.J., Faella, A., et al. (2013). Overcoming preexisting humoral immunity to AAV using capsid decoys. *Sci Transl Med* 5, 194ra192.
178. Yardeni, T., Eckhaus, M., Morris, H.D., Huizing, M., and Hoogstraten-Miller, S. (2011). Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim (NY)* 40, 155-160.
179. Gonano, L.A., Sepulveda, M., Rico, Y., Kaetzel, M., Valverde, C.A., Dedman, J., Mattiazzi, A., and Vila Petroff, M. (2011). Calcium-calmodulin kinase II mediates digitalis-induced arrhythmias. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 4, 947-957.
180. Fritz, M., and Rinaldi, G. (2008). Blood pressure measurement with the tail-cuff method in Wistar and spontaneously hypertensive rats: influence of adrenergic- and nitric oxide-mediated vasomotion. *J Pharmacol Toxicol Methods* 58, 215-221.
181. Ruskoaho, H., Kinnunen, P., Taskinen, T., Vuolteenaho, O., Leppaluoto, J., and Takala, T.E. (1989). Regulation of ventricular atrial natriuretic peptide release in hypertrophied rat myocardium. Effects of exercise. *Circulation* 80, 390-400.
182. Jiang, S., Wang, X., Wei, J., Zhang, G., Zhang, J., Xie, P., Xu, L., Wang, L., Zhao, L., Li, L., et al. (2019). NaHCO₃ Dilates Mouse Afferent Arteriole Via Na⁽⁺⁾/HCO₃⁽⁻⁾ Cotransporters NBCs. *Hypertension* 74, 1104-1112.
183. Vairamani, K., Prasad, V., Wang, Y., Huang, W., Chen, Y., Medvedovic, M., Lorenz, J.N., and Shull, G.E. (2018). NBCe1 Na⁽⁺⁾-HCO₃⁽⁻⁾ cotransporter ablation causes reduced apoptosis following cardiac ischemia-reperfusion injury in vivo. *World J Cardiol* 10, 97-109.
184. Fujioka, Y., Komeda, M., and Matsuoka, S. (2000). Stoichiometry of Na⁺-Ca²⁺ exchange in inside-out patches excised from guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 523 Pt 2, 339-351.
185. Jelicks, L.A., and Siri, F.M. (1995). Effects of hypertrophy and heart failure on [Na⁺]_i in pressure-overloaded guinea pig heart. *Am J Hypertens* 8, 934-943.
186. Gray, R.P., McIntyre, H., Sheridan, D.S., and Fry, C.H. (2001). Intracellular sodium and contractile function in hypertrophied human and guinea-pig myocardium. *Pflugers Arch* 442, 117-123.
187. Jelicks, L.A., and Gupta, R.K. (1994). Nuclear magnetic resonance measurement of intracellular sodium in the perfused normotensive and spontaneously hypertensive rat heart. *Am J Hypertens* 7, 429-435.
188. Verdonck, F., Volders, P.G., Vos, M.A., and Sipido, K.R. (2003). Increased Na⁺ concentration and altered Na/K pump activity in hypertrophied canine ventricular cells. *Cardiovasc Res* 57, 1035-1043.
189. Molkenstein, J.D. (2004). Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res* 63, 467-475.

190. Wilkins, B.J., and Molkenin, J.D. (2004). Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 1178-1191.
191. Go, A.S., Mozaffarian, D., Roger, V.L., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Blaha, M.J., Dai, S., Ford, E.S., Fox, C.S., Franco, S., et al. (2014). Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 129, e28-e292.
192. Bing, O.H., Brooks, W.W., Robinson, K.G., Slawsky, M.T., Hayes, J.A., Litwin, S.E., Sen, S., and Conrad, C.H. (1995). The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol* 27, 383-396.
193. Conrad, C.H., Brooks, W.W., Hayes, J.A., Sen, S., Robinson, K.G., and Bing, O.H. (1995). Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation* 91, 161-170.
194. Mukherjee, D., and Sen, S. (1990). Collagen phenotypes during development and regression of myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 67, 1474-1480.
195. Pfeffer, M.A., Pfeffer, J.M., Weiss, A.K., and Frohlich, E.D. (1977). Development of SHR hypertension and cardiac hypertrophy during prolonged beta blockade. *Am J Physiol* 232, H639-644.
196. Gouldsbrough, I., Lindop, G.B., and Ashton, N. (2003). Renal renin-angiotensin system activity in naturally reared and cross-fostered spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 16, 864-869.
197. Simko, F., Pechanova, O., Pelouch, V., Krajcovicova, K., Mullerova, M., Bednarova, K., Adamcova, M., and Paulis, L. (2009). Effect of melatonin, captopril, spironolactone and simvastatin on blood pressure and left ventricular remodelling in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl* 27, S5-10.
198. Pereira, L.M., and Mandarin-de-Lacerda, C.A. (2002). Myocardial changes after spironolactone in spontaneous hypertensive rats. A laser scanning confocal microscopy study. *J Cell Mol Med* 6, 49-57.
199. Zhao, H., Gu, D.W., Li, H.T., Ge, Q.F., and Li, G.P. (2015). Inhibitory effects of spironolactone on myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Genet Mol Res* 14, 10315-10321.
200. Bompotis, G.C., Pappas, L.K., Angelidis, C., Kossyvakis, C., Giannopoulos, G., and Deftereos, S. (2016). Calcium Handling and Arrhythmogenesis. *Med Chem* 12, 170-176.
201. Perez, N.G., Alvarez, B.V., Camilion de Hurtado, M.C., and Cingolani, H.E. (1995). pH regulation in myocardium of the spontaneously hypertensive rat. Compensated enhanced activity of the Na(+)-H+ exchanger. *Circ Res* 77, 1192-1200.
202. Khandoudi, N., Albadine, J., Robert, P., Krief, S., Berrebi-Bertrand, I., Martin, X., Bevensee, M.O., Boron, W.F., and Bril, A. (2001). Inhibition of the cardiac electrogenic sodium bicarbonate cotransporter reduces ischemic injury. *Cardiovasc Res* 52, 387-396.
203. Fantinelli, J.C., Orłowski, A., Aiello, E.A., and Mosca, S.M. (2014). The electrogenic cardiac sodium bicarbonate co-transporter (NBCe1) contributes to the reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol* 23, 224-230.
204. Chen, Z., Chen, L., Chen, K., Lin, H., Shen, M., Chen, L., Zhu, H., Zhu, Y., Wang, Q., Xi, F., et al. (2020). Overexpression of Na(+)-HCO₃(-) cotransporter contributes to the exacerbation of cardiac remodeling in mice with myocardial infarction by increasing intracellular calcium overload. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1866, 165623.
205. Steel, C.D., Stephens, A.L., Hahto, S.M., Singletary, S.J., and Ciavarra, R.P. (2008). Comparison of the lateral tail vein and the retro-orbital venous sinus as routes of intravenous drug delivery in a transgenic mouse model. *Lab Anim (NY)* 37, 26-32.
206. Bostick, B., Ghosh, A., Yue, Y., Long, C., and Duan, D. (2007). Systemic AAV-9 transduction in mice is influenced by animal age but not by the route of administration. *Gene Ther* 14, 1605-1609.