



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Participación del receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER/GPR30) en los efectos no genómicos de aldosterona en el corazón

Tesista:

María Sofía Espejo

Director:

Dr. E. Alejandro Aiello

Co-directora:

Dra. Verónica C. De Giusti

Año:

2019

A El
A mi familia

Índice

Agradecimientos	5
1-Introducción	6
Receptores acoplados a proteína G	6
<i>El Receptor de estrógenos acoplado a GPER</i>	7
Localización.....	8
<i>Ligandos fisiológicos del GPER</i>	9
Estradiol (E2).....	9
Aldosterona (Aldo).....	10
<i>Agonistas y antagonistas sintéticos del receptor GPER</i>	13
Señalización intracelular iniciada por GPER	13
Rol fisiopatológico del GPER.....	15
Importancia de la regulación de pH cardíaco	15
Fisiopatología del NHE	18
Fisiopatología del NBC	19
Acoplamiento Excito-Contráctil Cardíaco	22
<i>Eventos a nivel del sarcolema: el potencial de acción</i>	23
<i>Potencial de acción ventricular</i>	23
<i>Principales estructuras relacionadas a los movimientos de Ca⁺⁺</i>	25
Objetivo General	34
Hipótesis	34
2- Materiales y métodos	35
Cuidado y uso animal	35
Obtención de cardiomiocitos del corazón de rata	35
.....	36
Pulsos de NH₄Cl: Actividades de NBC y NHE-1	37
Pulso de alto K⁺: Actividad del NBCe1	39
Producción de especies reactivas del Oxígeno (ROS)	41
<i>En cardiomiocitos aislados: Producción de ROS</i>	41
<i>En secciones de tejido ventricular cardíaco: Producción de O₂⁻</i>	41
Western Blots (WB)	42
Inmunofluorescencia de GPER y NBCe1 en cardiomiocitos	42
Respuesta excito-contráctil: Flujos de Ca⁺⁺ en cardiomiocitos	42
Contenido de Ca⁺⁺ del Retículo Sarcoplasmático	44

Registro de la corriente de Ca⁺⁺	44
Análisis estadístico	45
3-Resultados	46
Rol del GPER en la regulación del pH intracelular	46
<i>Transportadores alcalinizantes: Co-transportador Na⁺/HCO₃⁻ (NBC)</i>	46
<i>Receptores involucrados en los efectos rápidos de Aldo</i>	48
<i>GPER como regulador de NBC en los efectos no genómicos de Aldo</i>	50
<i>Participación de las especies reactivas del O₂ (ROS) en la estimulación de NBC</i>	54
<i>La isoforma electrogénica del cotransportador Na⁺/HCO₃⁻ (NBCe1) es activada por GPER</i>	56
<i>Localización en el cardiomiocito de NBCe1 y GPER</i>	57
Transportadores alcalinizantes: Intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE-1)	58
Rol del GPER en la contractilidad cardíaca y el manejo de Ca⁺⁺	60
<i>Función contráctil</i>	60
<i>Participación de Aldo en la contractilidad cardíaca</i>	62
<i>Participación de Estradiol en la contractilidad cardíaca</i>	63
<i>Amplitud del transitorio de Ca⁺⁺</i>	64
<i>Carga de Ca⁺⁺ en el Retículo Sarcoplasmático</i>	65
<i>Corriente de Ca⁺⁺ a través del canal Ca_L</i>	66
4-Discusión	69
Conclusiones	78
Anexo	79
Bibliografía	81

Agradecimientos

Quisiera aprovechar el uso de algunas letras para agradecer a todos los que formaron parte de este proceso, de estos 5 años de aprendizaje, formación y de esta vida tan intrigante y a veces abnegada de los que nos encanta la ciencia.

Gracias Alex, por confiar en mi luego de hablar unas cuantas veces y darme la posibilidad de trabajar en tu laboratorio, gracias a todos los integrantes del mismo: Vero, Ale O, Caro, Romi, Ale I, Lean y Noe; por ayudarme en los diferentes pasos que requirió todo este trabajo, desarrollar ideas, hacer experimentos e incluso innovarlos, discutir resultados y formarnos mutuamente, pero principalmente por la calidad humana que generalmente hay en este lugar sin olvidarnos nunca de unos buenos mates.

Gracias a todo el Centro de Investigaciones Cardiovasculares. Y quisiera nombrar especialmente a Luis y Male que me ayudaron al meterme en el mundo del Ca^{++} . A Mai y Mari, por colaborar con muchas de mis “nerdeadas” porque nos encanta cerrar el labo. A Fio por la alegría que soles compartirme siempre. Y para lo último, a las que conocí desde que entre, ellas iban algo más avanzadas que yo y siempre me dieron una mano, compartimos congresos, disfrutamos cervezas, asados e incluso viajes. Un placer tenerlas en mi vida a las dras. y amigas Sole y Barbi.

A mi querido equipo de handball Unión Vecinal, que me devolvió la alegría de volver a jugar este deporte que adoro, que me permitió conocer muchísima gente y que me dio de los mejores viajes de mi vida. Porque encontré muy buenas amigas y espero que no perdamos el contacto. Principalmente Agus y Zurdita gracias por bancar mi calesita de humor cuando estuve por entregar la tesis y por cuestiones previas también.

Gracias enormes al CCU, mi amada comunidad rosarina, a todos los amigos que me dio, que me sostuvieron y que siempre que nos veíamos (una vez por año con suerte) era como si el tiempo no hubiese pasado, gracias Lu, Cele, Jero, Estefi, Fati, por esas charlas, comidas, visitas y abrazos. A todos, realmente, los nombraría pero necesitaría muchas páginas más. Y como no nombrar a mi hermanita Tita, gracias por tanto a pesar que nos vemos tan poco. Gracias a montones, porque en todos y cada uno de ustedes pude seguir abrazadita a Él.

Por último, a los más importantes, sin los cuales no sería nada, mi familia toda, Mami y Papi, por bancarme siempre, Rodri y Luz, porque sé que cuento con ustedes; con la más pequeña vivimos un tiempo juntas, conociéndonos un poco más, confiándonos cosas, gracias por tenerte hermanita. Gracias a los abuelos, porque a pesar que piensan que soy yo su orgullo, aprovecho para decirles que lo más lindo y el verdadero orgullo son ustedes; gracias a los tíos y primos que siempre nos juntamos, comemos (si es asado mejor) y jugamos al truco, todos esos momentos son que hacen que quiera viajar para Venado.

Gracias, hasta cansarme, porque por ustedes, soy y seré siempre feliz, porque de eso se trata vivir.

1-Introducción

Receptores acoplados a proteína G

Los receptores acoplados a proteína G (GPCRs, por G protein coupled receptors) son proteínas integrales de membrana sintetizadas en el retículo endoplasmático rugoso (RER) y llevadas a la membrana plasmática mediante el movimiento vesicular del aparato de Golgi e intercambiadas dinámicamente con la misma. Según modelos alostéricos descriptos para los requerimientos específicos que rigen la especificidad y afinidad por los ligandos (Ls) de estos receptores, se describe que el estado en el que estos receptores se encuentran unidos a la proteína G sería el que presenta la mayor afinidad por su/s L/s. (Wells 2014). Una vez que se encuentran unidos, los GPCRs desarrollan cambios conformacionales que permiten el intercambio del nucleótido GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$ de la proteína G que luego se disocia de las subunidades $G\beta\gamma$, pasando así del complejo en el cual se encontraba unido a L a un estado de menor afinidad por el mismo. Luego, la transducción de señales resulta en la activación de enzimas de membrana o canales iónicos dependiendo del tipo de subunidad $G\alpha$ (entre las cuales las más conocidas son: $G\alpha_s$, $G\alpha_i/o$, $G\alpha_q11$ o $G\alpha_{12/13}$). También las proteínas denominadas “de anclaje” del receptor unido a L en estado activo, como β -arrestinas, quinasas acopladas a GPCR (GRKs) o quinasas del tipo Src podrían ser mediadoras de las vías iniciadas por estos receptores. Las subunidades $G\beta\gamma$ de la proteína G también son capaces de transducir señales como la activación de la vía fosfoinositol-3quinasa (PI3K), la liberación de Ca^{++} intracelular ($Ca^{++}i$) y la estimulación de exo-proteasas que clivan y liberan factores de crecimiento retenidos en la membrana (Lin and Smrcka 2011).

A pesar de que la membrana plasmática es el lugar en el cual se ubican clásicamente estos receptores, hay diferentes modos en los que se pueden transducir señales también desde membranas endosomales (Irannejad, Kotowski et al. 2014). La localización en la membrana plasmática de los GPCRs puede modularse por estímulos extrínsecos y regulaciones post-traduccionales (Dong, Filipeanu et al. 2007). El transporte desde el RER a través del aparato de Golgi y finalmente a la membrana plasmática ocurre por un proceso altamente ordenado que requiere fosfatasa de GTP, incluyendo a Rab-1 y Arf, así como también de chaperonas de transporte proteico como COPI/II (Beck, Rawet et al. 2009) que otorga el estado de glicosilación, el plegamiento y la dimerización.

Luego de ensamblarse con sus ligandos, los GPCRs disparan o inician una variedad de cascadas de señalización y subsecuentemente continúan con una endocitosis para evitar una sobre-estimulación, un proceso conocido como “desensibilización”. Generalmente los GPCRs internalizados tienen 2 destinos:

se reciclan rápidamente, lo cual resultaría en un restablecimiento de receptores funcionales y recupero de señal (proceso conocido como “re-sensibilización”); o son marcados para degradación lo cual llevaría a un cese total de la señalización o regulación negativa de la misma (Marchese, Paing et al. 2008, Scita and Di Fiore 2010, Jean-Alphonse and Hanyaloglu 2011). De esta manera, endocitosis, reciclado y degradación de los GPCRs son mecanismos clave bajo los cuales las células se protegen de una estimulación crónica por sus ligandos, permitiendo una señalización celular regulada espaciotemporalmente. Interesantemente, una regulación disfuncional de la endocitosis, reciclado o degradación de los GPCRs se asocia con varias enfermedades (Morisco, Marrone et al. 2008, Scita and Di Fiore 2010, Jean-Alphonse and Hanyaloglu 2011)

Los GPCRs codifican una amplia variedad de respuestas, como las que se dan a diversos procesos autócrinos, parácrinos y endócrinos. Por lo cual son los blancos de muchas drogas farmacológicas y de ahí el gran interés por investigarlos. Alrededor de 800 GPCRs han sido identificados en el hombre y cerca de la mitad presentan funciones sensoriales. Los aproximadamente 350 restantes no-sensoriales median señalizaciones por ligandos desde pequeñas moléculas hasta péptidos o incluso grandes proteínas y son los blancos para la mayoría de las drogas utilizadas en uso clínico (Rask-Andersen, Masuram et al. 2014). Muchos de estos receptores se identifican a partir de su secuencia de ADN y no a partir de sus ligandos específicos, por lo cual existen muchos receptores que al no conocerse su ligando natural se los denomina GPCRs huérfanos (Civelli, Reinscheid et al. 2013)

El Receptor de estrógenos acoplado a GPER

El receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER) fue descubierto en 1997 como un receptor huérfano acoplado a proteína G, denominándose GPR30 (Carmeci, Thompson et al. 1997). Más tarde los estrógenos fueron propuestos como sus ligandos endógenos, rebautizándose como GPER (Olde and Leeb-Lundberg 2009, Maggiolini and Picard 2010, Prossnitz and Barton 2014). Su función principal es la de mediar respuestas rápidas o no genómicas de los estrógenos (llamadas así por no involucrar fenómenos de expresión génica), a diferencia de sus receptores clásicos.

A pesar de no conocerse la estructura atómica de GPER, en una de las bases de datos más reconocidas como Protein Data Bank (PDB) (Rosano, Ponassi et al. 2016), el análisis exhaustivo de la secuencia de aminoácidos ha revelado que el GPER, presenta el “sello” característico de un GPCR, con una estructura en forma de serpentina definida por 7 dominios trans-membrana hidrofóbicos. Particularmente GPER posee una secuencia de 375 AAs y un peso molecular de

aproximadamente 42KDa. Las 7 regiones trans-membrana características constarían de entre 18 y 29 AAs y presentaría AAs con posibles modificaciones post-traduccionales como: 3 posibles sitios de N-glicosilaciones (características de GPCRs) y la potencial formación de un puente disulfuro intramolecular entre el 1er y 2do loop extracelular, para mantener la estructura del receptor (<https://www.uniprot.org/>).

Localización

En principio se creía que GPR30 funcionaba como un receptor de estrógenos asociado a membrana plasmática, basados en estudios en los que se unía su expresión a la trans-activación dependiente de proteína G del receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR (Filardo, Quinn et al. 2000) y de la activación de la adenilato ciclasa con la consecuente producción de AMPc (Filardo, Quinn et al. 2002). Sin embargo, análisis inmunofluorescentes usando anticuerpos contra GPER demostraron un patrón intracelular, normalmente en epitelio mamario y ovárico, en cánceres de mama y endometrial e incluso en líneas celulares derivadas de cánceres (Filardo, Quinn et al. 2007, Revankar, Mitchell et al. 2007, Prossnitz and Barton 2014). También se observó la misma distribución en células vasculares de músculo liso (Meyer, Fredette et al. 2014) y células de las islas pancreáticas (Balhuizen, Kumar et al. 2010, Meyer, Clegg et al. 2011). Sin embargo, la ubicación intracelular de GPER no es la única descrita, como diferentes grupos han demostrado, GPER se encuentra en la membrana plasmática en el epitelio uterino (Tica, Dun et al. 2011), el miometrio (Maiti, Paul et al. 2011), el epitelio renal (Cheng, Dong et al. 2014) y neuronas del hipocampo (Akama, Thompson et al. 2013). Estas observaciones indican que el receptor no está estrictamente confinado a membranas intracelulares lo cual sería consistente con la idea cada tejido del cuerpo puede regular la actividad estrogénica vía GPER en respuesta a estímulos extrínsecos (como la disponibilidad de estrógenos) o factores intrínsecos para determinar la abundancia relativa del receptor en la membrana plasmática.

Es importante destacar que GPER se expresa en tejido cardíaco (Bopassa, Eghbali et al. 2010) pero aún no se conoce específicamente su localización celular ya que como hemos descrito, puede presentarse en diferentes zonas.

Ligandos fisiológicos del GPER

Estradiol (E2)

La forma más activa y fisiológica de los estrógenos es el E2 (Fig. 1.1), formado por la aromatización de la testosterona en múltiples tejidos, pero principalmente en los ovarios. Otras formas adicionales de estrógenos incluyen a la menos abundante estrona (E1) y a la producida principalmente durante el embarazo, estriol (E3). La cantidad de estrógenos séricos (E1 y E2) en mujeres pre-menopáusicas se encuentran alrededor de 0.1 a 1.3 nM, mientras que en mujeres post menopáusicas descienden a 0.02-0.2 nM y en hombres se observan niveles significativamente menores como 0.07-0.25 nM (Kushnir, Rockwood et al. 2008, Blair 2010). Sin embargo, hay que destacar que las concentraciones locales de E2 podrían ser considerablemente más altas, llegando a superar el valor plasmático hasta 8 veces (Huhtinen, Desai et al. 2012).

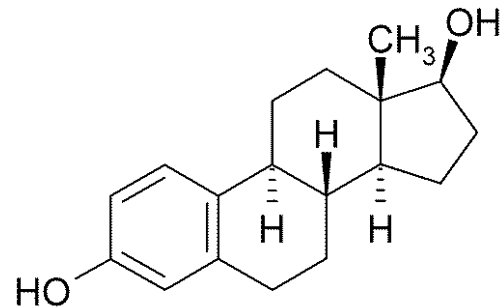


Fig. 1.1) Estructura química del Estradiol

E2 presenta una K_d de alrededor de 0.1-0.4 nM para los receptores clásicos de estrógenos (ER), determinadas en varios sistemas, como células permeabilizadas, homogenatos de células o tejidos, por unión al ER purificado o por unión del E2 al dominio de unión proteico (Anstead, Carlson et al. 1997, Kuiper, Carlsson et al. 1997, Bologna, Revankar et al. 2006). Por otro lado, la afinidad de E2 por GPER determinado por estudios con células permeabilizadas o en preparaciones de membrana es aproximadamente 10 veces menor, en el rango de los 3-6 nM (Revankar, Cimino et al. 2005, Thomas, Pang et al. 2005)

La unión de GPER a E2 lleva a la activación rápida y transitoria de numerosas vías intracelulares. Sin embargo, existe cierto debate respecto a la autonomía de GPER y el ER, incluso sobre el rol de cada tipo de receptor en una señalización rápida en la membrana, iniciada por E2. Estas discusiones se basan en que ambos receptores presentan una amplia y solapada distribución en los tejidos, que son relativamente escasos en la superficie celular en varios tipos celulares y principalmente se presentan en el interior celular. Incluso existe una falta de un entendimiento que precise claramente los mecanismos que regulen la presencia de GPER o ER en la membrana plasmática o cerca de la misma.

Aldosterona (Aldo)

La Aldosterona (Fig. 1.2) es una hormona esteroidea de la familia de los mineralocorticoides, sintetizada en la zona glomerular de la corteza de la glándula suprarrenal y de suma importancia en la regulación de la presión arterial. Como miembro del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) actúa en la conservación del Na^+ , en la secreción de K^+ y en el incremento de la presión sanguínea a través del receptor de mineralocorticoides (MR) en el riñón. Esta hormona, fue aislada por primera vez por Simpson y Tait en 1953 y presenta una afinidad por MR con una K_d de aproximadamente 1-2 nM.

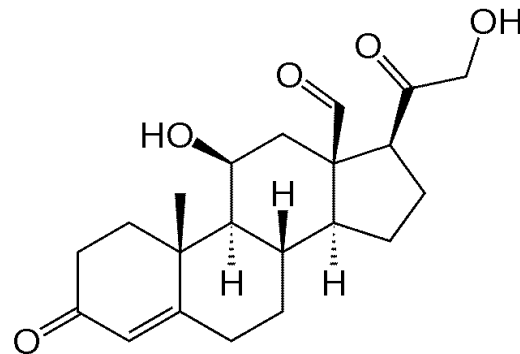


Fig. 1.2) Estructura química de Aldosterona

Como ocurre con ER, se ha propuesto que MR es capaz de iniciar vías de señalización rápidas o no genómicas como el incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Bopassa, Eghbali et al. 2010), la fosforilación de las quinasas reguladas por señales extracelulares (vía ERK) (Meyer, Prossnitz et al. 2011) y activación de transportadores iónicos de membrana (Barbato, Rashid et al. 2004, Chai, Garrelds et al. 2005, Diez 2008, Bopassa, Eghbali et al. 2010, De Giusti, Nolly et al. 2011, Kang, Liu et al. 2012). Sin embargo, este receptor no estaría mediando todas las respuestas rápidas encontradas ya que el uso de antagonistas de MR no evita todos los efectos no genómicos observados por la administración de Aldo. Incluso se han observado efectos no genómicos de Aldo en ratones KO para MR (Haseroth, Gerdes et al. 1999). Y debido a ello se propone que Aldo activaría GPER, como se demostró en células vasculares de músculo liso a concentraciones fisiológicas (Feldman and Gros 2011). Se observó también que células endoteliales aórticas de rata que expresan GPER y no MR responden similarmente a Aldo y al agonista farmacológico de GPER, G1; generando una rápida fosforilación de ERK y mediando señales proapoptóticas y antiproliferativas que se evitan usando un antagonista de GPER (Gros, Ding et al. 2013). Además, la acción de Aldo vía GPER ha sido asociada a la dilatación de la micro-arteriolas en el glomérulo utilizando eplerenona o el inhibidor selectivo de GPER, G36 (Ren, D'Ambrosio et al. 2014). Estos descubrimientos presentan una importante implicancia para el rol de GPER en la función renal y sugieren que GPER sería un receptor de Aldo, desafiando el concepto de que GPER sea específicamente un receptor de estrógenos (Funder 2011, Lothar, Moser et al. 2015).

Sin embargo, se han publicado estudios de unión de Aldo a extractos de citosol o membrana provenientes de riñón, utilizando una Aldo tritiada o incluso estudios de competitividad de Aldo con E2 tritiada donde se observó que Aldo sólo se uniría a MR (Cheng, Dong et al. 2014). Estos resultados sugieren que a pesar que la expresión de GPER mediaría la señalización rápida de Aldo, la unión específica de esta hormona a GPER no estaría involucrada (Prossnitz and Barton 2014). Incluso el descubrimiento de que E2 y no Aldo es capaz de iniciar la activación de la proteína G, medida por la transferencia de [35S]- γ -GTP, (Cheng, Dong et al. 2014) genera dudas respecto del concepto de que Aldo sería un ligando del GPER. De todos modos, debido a la divergencia y falta de claridad, resulta interesante evaluar la posibilidad de que el GPER se encuentre mediando las respuestas no genómicas evocadas por estas hormonas esteroideas, sin la participación de sus receptores clásicos.

Fisiopatología de Aldo y MR

Varias décadas atrás, el grupo de KT Weber demostró que la hipertrofia cardíaca y la fibrosis en ratas producida por altas dosis de Aldo y sal se asocian con la proliferación de fibroblastos, hipertrofia de cardiomiocitos y una gran acumulación de colágenos tipo I y II (Weber, Brilla et al. 1993, Robert, Van Thiem et al. 1994), lo cual se evitaba con la administración previa del antagonista del MR, espirolactona (Brilla, Matsubara et al. 1993). La administración crónica de Aldo a las ratas con una dieta alta en sodio resulta en una infiltración de macrófagos temprana en el miocardio y la vasculatura, con un incremento de marcadores inflamatorios, seguido de remodelamiento vascular y cardíaco luego de algunas semanas (Rocha, Stier et al. 2000, Rocha, Rudolph et al. 2002). Esta respuesta cardíaca a aldosterona y sal se ha descrito como un efecto directo sobre el corazón e independiente de la presión arterial (Young, Fullerton et al. 1994, Gomez Sanchez 1995, Young and Rickard 2012).

Tanto Angiotensina II (Ang II) como Aldo se encuentran aumentadas en la falla cardíaca congestiva (FCC) y el incremento continuo de ambas produce claras consecuencias deletéreas en las estructuras vasculares y cardíacas. El tratamiento de los pacientes con FCC con inhibidores de la enzima convertidora de Ang II constituye el principal tratamiento ya que disminuiría los niveles de Ang II y así sus efectos sobre el corazón y los vasos, e indirectamente disminuiría los niveles de Aldo. Lamentablemente, luego de un tratamiento crónico con inhibidores de la enzima convertidora de Ang II en pacientes con FCC, Aldo vuelve a sus niveles basales o incluso los sobrepasa (Pitt 1995). Debido a la asociación entre los niveles plasmáticos de aldosterona y la mortalidad en pacientes con FCC e hipertrofia ventricular izquierda (HVI) (Swedberg, Eneroth et al. 1990, Rossi, Sacchetto et al. 1997), e incluso a la existencia de un “escape” de Aldo en pacientes con FCC y tratados con inhibidores de la enzima

convertidora de Ang II, se diseñó la prueba de Evaluación Randomizada de Aldactona (RALES) para evaluar el efecto de sumar a Espironolactona (Espiro) al tratamiento clásico para los pacientes con FCC (Pitt, Zannad et al. 1999). La prueba RALES evaluaba la hipótesis de que un tratamiento diario con Espiro disminuiría significativamente el riesgo de muerte por todas las causas entre pacientes que hayan tenido falla cardíaca severa como resultado de una disfunción ventricular sistólica izquierda y que estén recibiendo la terapia estándar incluyendo los inhibidores de la enzima convertidora de Ang II (Pitt, Zannad et al. 1999). El estudio fue finalizado rápidamente por su respuesta positiva en los pacientes tratados, beneficio que por supuesto no tenían los del grupo placebo. Se encontró una disminución significativa del 30 % en el riesgo de muerte del grupo de Espiro, así como también una reducción de 31 % de muerte por causas cardíacas y una disminución de un 30 % de riesgo de hospitalización por causas cardíacas entre los pacientes del grupo Espiro. Estos resultados llevaron a un ensayo clínico similar para evaluar el bloqueo de MR en pacientes con infarto agudo de miocardio con disfunción ventricular izquierda y falla cardíaca; el ensayo de eficacia y sobrevida de Eplererona (Eple) en falla cardíaca post infarto agudo de miocardio (EPHESUS) (Pitt, Remme et al. 2003). Se utilizó Eple y se observaron reducciones significativas en la mortalidad, la muerte a partir de causas cardíacas y la hospitalización por eventos cardiovasculares en todos los grupos que recibían el antagonista de MR. Estos 2 ensayos, RALES y EPHESUS confirmaron el rol crucial del MR en la patogénesis de las enfermedades cardíacas. La otra pregunta por resolver era si los antagonistas del MR podían mejorar la sobrevida en personas con falla cardíaca sistólica y síntomas moderados (Zannad, McMurray et al. 2011). Ensayos clínicos con ese tipo de pacientes confirmaron la participación de MR en FCC originada por causas isquémicas y no isquémicas, e incluso demostraron que estos efectos no estaban relacionados con cambios en K^+ (Rossignol, Menard et al. 2011). Este último descubrimiento fue crucial, el K^+ sérico se encuentra bajo en FCC, por lo que se había propuesto que algunos de los efectos benéficos de Espiro en el ensayo RALES podría haberse debido al incremento del K^+ que disminuiría las arritmias. Aunque la inhibición de MR tiene riesgo de hiperpotasemia debido a la disminución en la secreción de K^+ , eso no ha mostrado problemas en los estudios realizados. Eple se comparó con Enalapril (inhibidor de la enzima convertidora de Ang II) e incluso se combinaron en pacientes con hipertensión e hipertrofia ventricular izquierda. Tanto Eple como Enalapril tienen efectos comparables en la disminución de la presión arterial y la hipertrofia, y la combinación de los dos resultó más efectiva (Pitt, Reichek et al. 2003). Incluso se han realizado estudios en otros subgrupos de falla cardíaca como el TOPCAT en el cual se tomaron pacientes con falla cardíaca congestiva y preservación de la fracción de eyección, sin embargo en este ensayo no se encontraron mejoras respecto al tratamiento clásico (Pitt, Pfeffer et al. 2014) y el ensayo ALBATROSS fue realizado para evaluar los efectos del bloqueo de MR

poco tiempo después de un infarto de miocardio, en el cual lamentablemente tampoco se lograron beneficios adicionales al tratamiento estándar (Beygui, Cayla et al. 2016).

Agonistas y antagonistas sintéticos del receptor GPER

A pesar de que E2 es considerado el ligando endógeno principal, el GPER se considera un receptor promiscuo a varias hormonas esteroideas (Mendez-Luna, Martínez-Archundia et al. 2015) y por ello se han desarrollado agonistas y antagonistas no esteroideos y específicos del receptor que facilitan su estudio en la fisiopatología de diferentes tejidos. El agonista sintético específico más conocido e implementado en diversos trabajos sobre la participación del GPER, es el G-1 (Fig. 1.3) con un peso molecular de 412.3 g/mol (Revankar, Cimino et al. 2005, Bologna, Revankar et al. 2006).

Y los antagonistas implementados para corroborar la participación de GPER son G-15 (Fig. 1.4) (Chevalier, Vega et al. 2012) y G-36 (Fig. 1.5) (Filardo and Thomas 2012, Brailoiu, Arterburn et al. 2013).

Estos fármacos han sido utilizados en este trabajo de tesis para evaluar la participación de GPER en la fisiología cardíaca.

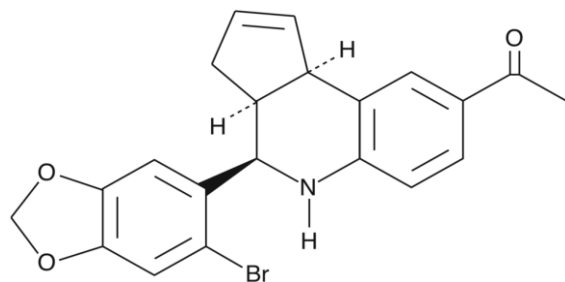


Fig. 1.3) Estructura química del agonista farmacológico específico del GPER, el G-1

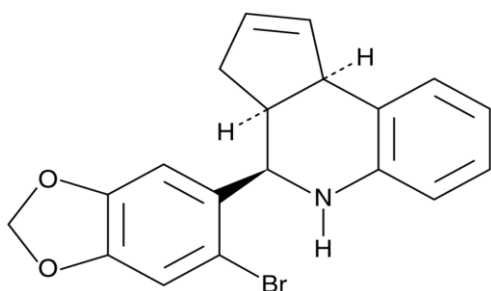


Fig. 1.4) Estructura química del antagonista farmacológico específico del GPER, el G-15

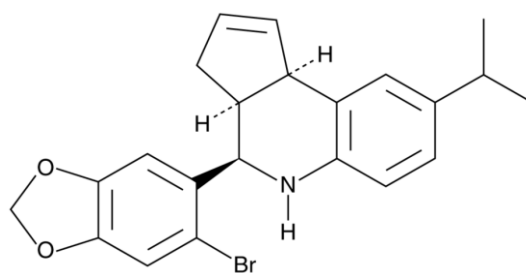


Fig. 1.5) Estructura química del antagonista farmacológico específico del GPER, el G-36

Señalización intracelular iniciada por GPER

Mediante varios estudios se ha determinado que GPER funcionaría como un GPCR acoplado a proteína $G\alpha_s$. Primero, se ha observado que GPER se encuentra físicamente asociado a $G\alpha_s$ cuando se encuentra en estado inactivo

y que ese complejo se disocia luego de la estimulación con E2 (Filardo, Quinn et al. 2007). Segundo, la producción de AMPc y la señalización dependiente del mismo se ha observado en células de cáncer de mama intactas y en queratinocitos (Filardo, Quinn et al. 2002, Kanda and Watanabe 2003, Thomas, Pang et al. 2005) incluso se había determinado producción de AMPc luego de la estimulación con E2 de membranas plasmáticas con GPER (Filardo, Quinn et al. 2002). En tercer lugar, el tratamiento previo de fracciones de membrana que contienen GPER con la toxina del cólera, que resulta en una menor unión de E2 al receptor (Thomas, Pang et al. 2005), lo cual es consistente con la idea de que el desacoplamiento del GPER y $G\alpha_s$ resultaría en una menor afinidad por el ligando. Sin embargo, también se ha reportado que GPER utiliza las subunidades $G\beta\gamma$ de la proteína G para promover trans-activación mediada por estrógenos del EGFR y la señalización vía ERK y vía PI3K (Filardo, Quinn et al. 2000, Filardo, Quinn et al. 2002). Contrariamente, se ha propuesto que GPER impediría la producción de AMPc mediante la posibilidad de unirse a proteína $G\alpha_i$ (Broselid, Berg et al. 2014).

La activación de la vía MAPK mediante las arrestinas difiere entre los diferentes GPCRs dependiendo de la potencia, duración y estabilidad de la interacción de GPCR y las arrestinas luego del secuestro del receptor de la membrana celular. Los GPCRs que se secuestran fuertemente por arrestinas 2/3 forman interacciones firmes y ensamblan un complejo endosómico de señalización de la vía MAPK, mientras que GPCRs que forman asociaciones transitorias con arrestinas forman complejos de señalización más débiles (Tohgo, Choy et al. 2003). GPER ha demostrado un mecanismo de tráfico intravesicular inusual para la familia de GPCRs ya que resulta en una regulación negativa con una vida media de aproximadamente 30 minutos sin formar vesículas estables con arrestinas tipo 2/3 y se acumularía en la zona perinuclear, siendo llevado luego a degradación por proteosomas. A pesar de que se detecta GPER en el retículo endoplasmático, este no sería el endocitado desde la membrana. Estos resultados podrían explicar porque GPER se encuentra principalmente en membranas intracelulares y que la endocitosis del receptor sería un punto importante en su regulación funcional (Cheng, Quinn et al. 2011).

Se han descrito muchas y diversas señalizaciones para el GPER, lo cual era de esperarse debido a la variedad de proteínas G a las que parece acoplarse. A modo de resumen, participaría en la regulación de la producción de AMPc, la movilización de Ca^{++} , en la liberación del factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) vía receptores Tirosina Quinasa y la trans-activación del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) activando vías de señalización corriente abajo como las ampliamente conocidas de fosfoinositol 3-quinasa: PI3K/AKT y la de proteínas quinasas activadas por mitógenos: ERK/MAPK.

Rol fisiopatológico del GPER

Se ha observado que la activación del GPER, ya sea por estrógenos o por su agonista farmacológico específico G1, mejora la recuperación funcional frente al daño por isquemia/re-perfusión (Weil, Manukyan et al. 2010, Kang, Liu et al. 2012). Además, en un modelo de isquemia/re-perfusión se ha logrado revertir la protección del G1 o E2 mediante un anticuerpo contra GPER (Patel, Chen et al. 2010).

El receptor también participaría en la reducción de la hipertrofia y la fibrosis perivascular dependiente de la proteína de modificación del receptor RAMP3, que interacciona con el GPER modulando su tráfico a la membrana, especificidad de unión a ligando y la señalización corriente abajo del mismo (Lenhart, Broselid et al. 2013). Por otro lado, se demostró que la administración de G1 preserva la función diastólica y evita el remodelamiento ventricular izquierdo luego de un infarto de miocardio en ratas ovariectomizadas (Wang, Jessup et al. 2012). Incluso, GPER regularía la presión arterial estimulando la vasodilatación y reduciendo la proliferación del músculo liso vascular y de células endoteliales (Lindsey, Liu et al. 2014). Se ha sugerido que la administración de E2 y G1 a ratas ovariectomizadas atenúa la hipertrofia ventricular (mediante determinaciones del tamaño de los cardiomiocitos) lo cual se correlaciona con la activación de la vía PI3K/Akt/eNOS (Lee, Lin et al. 2014). Incluso GPER podría presentar beneficios al limitar la injuria cerebral inducida por paro cardíaco, lo cual se ha demostrado por el uso de G1 en un modelo de isquemia cerebral global (Kosaka, Quillinan et al. 2012).

Importancia de la regulación de pH cardíaco

Debido a su alta reactividad química, los H⁺ presentes en el citoplasma son importantes reguladores de la función celular cardíaca en los movimientos de Ca⁺⁺ y la contractilidad (mecanismos a explicarse más adelante). Estos iones son capaces de disminuir la unión de Ca⁺⁺ a la Troponina C (Ball, Johnson et al. 1994), generar cambios en las concentraciones sistólica y diastólica de Ca⁺⁺ (Choi, Trafford et al. 2000, Saegusa, Moorhouse et al. 2011), inhibir las actividades del intercambiador Na⁺/Ca⁺⁺ (NCX) (Boyman, Hagen et al. 2011) y de la bomba de Ca⁺⁺ dependiente de ATP del retículo sarcoplasmático (SERCA) (Mandel, Kranias et al. 1982) y, dependiendo de las condiciones, producir un incremento o una inhibición de la corriente de Ca⁺⁺ del canal tipo L (Saegusa, Moorhouse et al. 2011).

Los H⁺ se generan continuamente como productos finales del metabolismo aeróbico y anaeróbico, lo cual en el corazón tiene una gran importancia debido a la demanda energética inherente al mantenimiento de contracciones rítmicas. El pH intracelular se encuentra alrededor de 7,2, por lo tanto la concentración

normal de iones H^+ es de aproximadamente 60 nM y se necesita una regulación muy estricta de su concentración en el citoplasma frente a fenómenos de acidosis. En isquemia de miocardio, cuando la expulsión ácida se vuelve insuficiente para contrarrestar la producción intracelular, la caída de pH resultante contribuye a la falla contráctil y a la ocurrencia de arritmias (Elliott, Smith et al. 1992, Orchard and Cingolani 1994). La correcta actividad de los transportadores es totalmente necesaria para la función normal del corazón.

Mecanismos reguladores del pH cardíaco

Al menos 5 tipos de proteínas transportadoras genéricas de H^+ se han identificado funcionalmente en cardiomiocitos ventriculares de mamíferos (Poole, Halestrap et al. 1989, Lagadic-Gossmann, Buckler et al. 1992, Xu and Spitzer 1994, Sun, Leem et al. 1996, Leem, Lagadic-Gossmann et al. 1999). Los mecanismos que median la carga de H^+ frente a un descenso en la concentración son los intercambiadores Cl^-/HCO_3^- (CBE, por chloride bicarbonate exchanger o también AE por anion exchanger) y el intercambiador Cl^-/OH^- (CHE). También existe un cotransporte de lactato y H^+ (MCT) que funciona tanto mediando el influjo o eflujo de H^+ dependiendo de las circunstancias (de Hemptinne, Marrannes et al. 1983, Poole, Halestrap et al. 1989). Y para eliminar el exceso de H^+ los cardiomiocitos utilizan principalmente dos tipos de transportadores alcalinizantes: el intercambiador Na^+/H^+ (NHE) y el cotransportador Na^+/HCO_3^- (NBC) (Lagadic-Gossmann, Buckler et al. 1992, Leem, Lagadic-Gossmann et al. 1999). De este último existen 2 isoformas en el tejido cardíaco, una electrogénica (NBCe1, $2HCO_3^-:1Na^+$) (Aiello, Petroff et al. 1998) y otra electroneutra (NBCn1, $1HCO_3^-:1Na^+$) (Camilion de Hurtado, Perez et al. 1995, Damkier, Nielsen et al. 2006, De Giusti, Orłowski et al. 2011).

Además, cabe destacar la localización sub-celular diferencial del NHE, presente en discos intercalares, y del NBC en sus dos isoformas, ubicados por todo el sarcolema, es decir toda la membrana celular (Fig. 1.6) (De Giusti, Orłowski et al. 2011, Garcarena, Ma et al. 2013). Esta localización del NBC en el sarcolema, e inclusive en los túbulos T podría ser clave para la regulación del pH en la

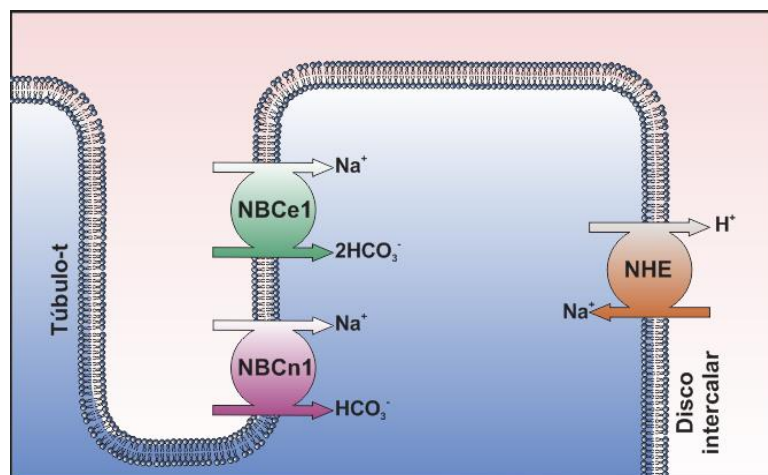


Fig. 1.6) Transportadores alcalinizantes y su ubicación en el miocito ventricular cardíaco.

misma localización de proteínas sumamente importantes del acoplamiento excito contráctil como lo son el canal de Ca^{++} tipo L (Ca_L) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (NCX) (Brette and Orchard 2003, Despa, Brette et al. 2003) sin dejar de lado los receptores de Rianodina (RyR2) que se encuentran próximos al Ca_L . Inclusive, el mantenimiento de las concentraciones adecuadas de los iones involucrados en el transporte: H^+ , Na^+ , HCO_3^- y Ca^{++} sería de suma importancia para los procesos eléctricos desarrollados en el sarcolema. Los mecanismos alcalinizantes cardíacos NBC y NHE además de regular el pH aumentan la concentración de Na^+ intracelular (Diez 2008, De Giusti, Nolly et al. 2011). Ese aumento del Na^+ puede generar que el NCX funcione en modo reverso (NCXr), aumentando la concentración de Ca^{++} , mediador de diversos procesos intracelulares, como la contractilidad cardíaca (Chai, Garrelds et al. 2005, Yamamoto, Swietach et al. 2005, Grossmann and Gekle 2009).

La actividad transportadora de H^+ en los cardiomiocitos está acoplada a receptores de membrana y puede regularse ampliamente por neurotransmisores, hormonas y otros ligandos. Los primeros trabajos relacionaron compuestos mitogénicos y promotores de tumores con un incremento en la actividad del NHE (Moolenaar, Tsien et al. 1983, Sardet, Counillon et al. 1990). La estimulación, que usualmente ocurre por un incremento en la pKi efectiva del transportador genera una retroalimentación positiva que en varios casos parece anticipar un incremento de H^+ asociado a la producción metabólica. En células cardíacas la estimulación o inhibición del NHE puede ocurrir en respuesta a adrenalina (Lagadic-Gossmann and Vaughan-Jones 1993) y AngII (Matsui, Barry et al. 1995, Gunasegaram, Haworth et al. 1999) y ambos pueden llevar a un incremento en la producción metabólica de H^+ . Un agente del tipo de la adrenalina puede causar efectos opuestos en diferentes transportadores de H^+ ya que la activación del receptor β_1 enlentece la extrusión ácida por NHE pero la estimula a través del NBC. Esto provee flexibilidad a la respuesta del cardiomiocito frente a cambios ácido/base. Posiblemente la señalización más conocida sea a través de la cascada de la proteína activada por mitógeno (MAPK) que involucra a la quinasa relacionada con señal extracelular (ERK) (Wang, Silva et al. 1997) que mediante la quinasa S6 ribosómica p90 (RSK) fosforila la Ser703 en la región CD del NHE1 y estimula así el eflujo de H^+ (Cuello, Snabaitis et al. 2007). ERK puede fosforilar la región CD directamente, por lo cual tanto ERK como RSK podrían formar la vía común para varios agentes estimulatorios incluyendo AngII, endotelina, trombina y catecolaminas. Estos agonistas parecen estar acoplados a ERK vía estimulación de la proteína quinasa C (PKC).

Cabe destacar que las especies reactivas del oxígeno (ROS), parecerían estimular la vía MAPK y así activar al NHE1. La activación de ERK puede estar involucrada en la sobre-estimulación de la actividad del NHE1 durante la acidosis

intracelular sostenida (Haworth, McCann et al. 2003). Incluso parecería que ERK está involucrada en la estimulación de NBC por agonistas β (Baetz, Haworth et al. 2002).

Un incremento en la concentración intracelular del Ca^{++} sería otro factor que estimule al NHE1 (Wakabayashi, Bertrand et al. 1994, Le Prigent, Lagadic-Gossmann et al. 1997). A pesar que se ha descrito que una vía podría ser la fosforilación de NHE1 por calmodulina (CaM) actuando sobre CaM quinasa II (CaMKII) (Fliegel, Walsh et al. 1992), parece más probable que CaM actúe directamente sobre la región CD del transportador (Wakabayashi, Bertrand et al. 1994)

También se observó que eventos como estiramiento muscular y encogimiento osmótico pueden estimular la actividad del transportador en tejido ventricular (Whalley, Hemsworth et al. 1991, Cingolani, Alvarez et al. 1998), posiblemente mediante una cascada autócrina que involucraría endotelina y angiotensina.

La activación mecánica de NHE1 incrementa el Na^+ intracelular y esto puede respaldar parte del leve incremento de la contractilidad observado en tejido ventricular luego del fenómeno de escalera o del efecto Anrep (Alvarez, Perez et al. 1999, Niederer and Smith 2007, Ward, Williams et al. 2008), aunque otro mecanismo importante que involucra canales catiónicos activados por estiramiento (TRPC1 y/o 6) también ha sido propuesto (Ward, Williams et al. 2008).

Las vías inhibitorias de NHE1 están menos caracterizadas, algunas involucran elevación en AMPc (Wu and Vaughan-Jones 1994) y GMPc (Perez, Piaggio et al. 2007). Otro mecanismo, que se activaría por un receptor de adenosina (A1), involucra la desfosforilación de NHE1 por la enzima fosfatasa (PP2A); probablemente en el sitio de fosforilación en la región CD (Ser703) que es el sitio blanco de ERK/RSK (Snabaitis, D'Mello et al. 2006). Incluso se ha observado que la proteína quinasa B (PKB, o AKT) una serina/treonina quinasa involucrada en el metabolismo de la glucosa, la señalización de la insulina, el crecimiento celular y la supervivencia, también estaría involucrada en la disminución de la actividad del NHE1 ya que fosforilaría la Ser648 e impediría la asociación de CaM al NHE1, ya que el sitio de unión se encuentra entre los residuos aminoacídicos 636-656)(Snabaitis, Cuello et al. 2008).

Fisiopatología del NHE

Uno de los resultados más importantes del desarrollo de inhibidores selectivos de NHE ha sido la observación que su administración crónica a bajas dosis durante varias semanas podría atenuar o incluso revertir el desarrollo de la hipertrofia cardíaca mal adaptativa y su progresión a falla cardíaca en varios

modelos. El mecanismo por el cual ocurre no parece estar completamente claro, pero puede estar relacionado al acoplamiento funcional entre NHE/NBC, NCX y Ca^{++} (Nakamura, Iwata et al. 2008), especialmente a que la sobrecarga de Ca^{++} es un estímulo hipertrofiante (Berridge 2006). El desarrollo de hipertrofia cardíaca en estos modelos parece estar correlacionada con la sobre-expresión de NHE y el aumento en la concentración de Na^+ citoplasmática. La asociación entre la sobreexpresión del NHE y la hipertrofia puede extenderse también al modelo de diabetes tipo 2 de rata Goto-Kakizaki (Darmellah, Baetz et al. 2007) en contraste con el modelo de estreptozosina (diabetes tipo 1) en el cual la actividad del NHE parece estar disminuida (Le Prigent, Lagadic-Gossmann et al. 1997). El rol de las proteínas regulatorias de pH en la patología cardíaca y su asociación con la regulación de Ca^{++} enfatiza la importancia de una potencial relación entre la actividad metabólica y la función cardíaca.

La hipertrofia cardíaca es usualmente acompañada por disfunción mitocondrial como la apertura del poro de transición mitocondrial o un desbalance entre las proteínas de fusión y fisión. Ciertos estudios demostraron la presencia de NHE1 en las mitocondrias, ya que su inhibición farmacológica atenúa la apertura del poro de transición mitocondrial y disminuye la expresión elevada de proteínas de fusión y fisión (Javadov, Rajapurohitam et al. 2011, Villa-Abrille, Cingolani et al. 2011).

Fisiopatología del NBC

En el corazón, el mecanismo del NBC es responsable de 40-50% de la extrusión total de ácido en los cardiomiocitos (Baetz, Haworth et al. 2002, Vaughan-Jones, Spitzer et al. 2009). En un trabajo previo, nuestro grupo pudo diferenciar las actividades de NBCn1 y NBCe1 utilizando un anticuerpo inhibitorio que une al loop extracelular 3 del NBCe1 (a-L3) (De Giusti, Orłowski et al. 2011) y así se ha observado un efecto diferencial de AngII sobre las isoformas de NBC, demostrando que AngII inhibe NBCe1 vía activación de la quinasa p38 mientras que NBCn1 se activa por una vía dependiente de ERK 1/2 y ROS. El efecto neto es la regulación positiva de la actividad de NBC ya que la activación de NBCn1 solo es parcialmente enmascarada por la inhibición de NBCe1 (De Giusti, Orłowski et al. 2010). En otro trabajo de nuestro grupo (Orłowski, Ciancio et al. 2014) se muestra que las ratas SHR, modelo de hipertensión e hipertrofia cardíaca, presentan un remodelamiento en las isoformas de NBC que resulta en un decaimiento en la cantidad de NBCe1 en la superficie celular y un incremento de NBCn1 a modo compensatorio. Estas alteraciones fueron revertidas por el tratamiento de las ratas con losartan, un antagonista de los receptores AT1, sugiriendo que AngII estaría involucrada en este remodelamiento.

Como se ha reportado que el NBC es responsable del 30% del influjo de Na^+ a las células durante la recuperación de la acidosis (Vaughan-Jones, Villafuerte et al. 2006), la sobreexpresión y sobre-activación de NBCn1 en las SHR podría ser parte de la sobrecarga de Na^+ observada en la hipertrofia cardíaca (Gray, McIntyre et al. 2001, Verdonck, Volders et al. 2003). Además, teniendo en cuenta la estequiometría de los 2 NBC, se podría considerar que el NBCe1 es un transportador de bicarbonato que ahorra Na^+ lo cual indicaría que no solo la sobreexpresión de NBCn1 sino que también la disminución de la función de NBCe1 en los corazones hipertróficos podría contribuir a los efectos deletéreos de una sobrecarga de Na^+ y Ca^{++} .

Por otro lado, el grupo de Khandoudi (Khandoudi, Albadine et al. 2001) ha demostrado que la inhibición selectiva de NBCe1 durante la re-perfusión luego de la isquemia mejora significativamente la recuperación de la contractilidad cardíaca. Incluso, en el mismo trabajo se ha observado que NBCe1 está sobre-expresado en falla cardíaca humana.

El tratamiento crónico con bloqueantes de la señalización de AngII, tanto con inhibidores de la enzima convertidora de AngII como antagonistas de AT1 reducen el ARNm, la sobreexpresión y sobre-activación de NBC (Sandmann, Yu et al. 2001) demostrando una relación cercana entre NBC, AngII e infarto de miocardio. Incluso se ha demostrado que tanto NBCe1 como NBCn1 se encuentran sobre-expresados en cardiomiocitos ventriculares aislados de corazones hipertróficos de ratas sujetos a sobrecarga de presión no isquémica (Yamamoto, Shirayama et al. 2007).

Aun no existe un consenso sobre la extensión de la activación de NBC y NHE durante la isquemia, pero está ampliamente aceptado que la re-perfusión post isquemia impulse una importante reactivación de NBC y NHE (Alvarez, Loiselle et al. 2003, Allen and Xiao 2003). Una considerable activación del intercambio H^+/Na^+ o del cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ lleva a una sobrecarga intracelular considerable de Na^+ , una salida de éste por el modo reverso del NCX incrementa las concentraciones de Ca^{++} que sobrecargan el retículo y las mitocondrias llevando a una mayor generación de ondas de Ca^{++} y la aparición de post-potenciales tardíos (DADs) (Lederer and Tsien 1976). Estos pueden iniciar arritmias eléctricas y predecir eventos como fibrilación ventricular (Scholz, Albus et al. 1995, Karmazyn, Sostaric et al. 2001). La administración de inhibidores de NHE y NBC genéricos (Amiloride, Cariporide para NHE y DIDS, no selectivo para NBC) pueden ser cardioprotectores durante una re-perfusión post isquémica (Scholz, Albus et al. 1995, Khandoudi, Albadine et al. 2001). En modelos animales, la sobrecarga de Na^+ y Ca^{++} disminuye, se reduce la injuria y la arritmogénesis (Janse and Wit 1989). A pesar de lo prometedores que resultaron los experimentos en animales, los ensayos clínicos no han arrojado resultados

positivos, particularmente porque la administración de cariporide podría estar asociada con una leve incidencia de paro cardíaco (Avkiran, Cook et al. 2008).

El tráfico inapropiado de NHE1 y NBC parece estar exacerbado en la falla cardíaca debido a la pérdida de túbulos T en los cardiomiocitos ventriculares (Wei, Guo et al. 2010), así como también en los auriculares de mamíferos mayores (Richards, Clarke et al. 2011).

Acoplamiento Excito-Contráctil Cardíaco

Se denomina Acoplamiento Excito-Contráctil (AEC, Fig. 1.7) al conjunto de eventos que comienzan con la despolarización del sarcolema luego de un estímulo despolarizante supra-umbral dando por resultado el aumento de Ca^{2+} citoplasmático y consecuentemente la contracción muscular. El Ca^{2+} cumple el rol de conexión o acoplamiento entre los eventos a nivel de la membrana plasmática y la contracción muscular, que ocurre a nivel de los miofilamentos, en el interior celular.

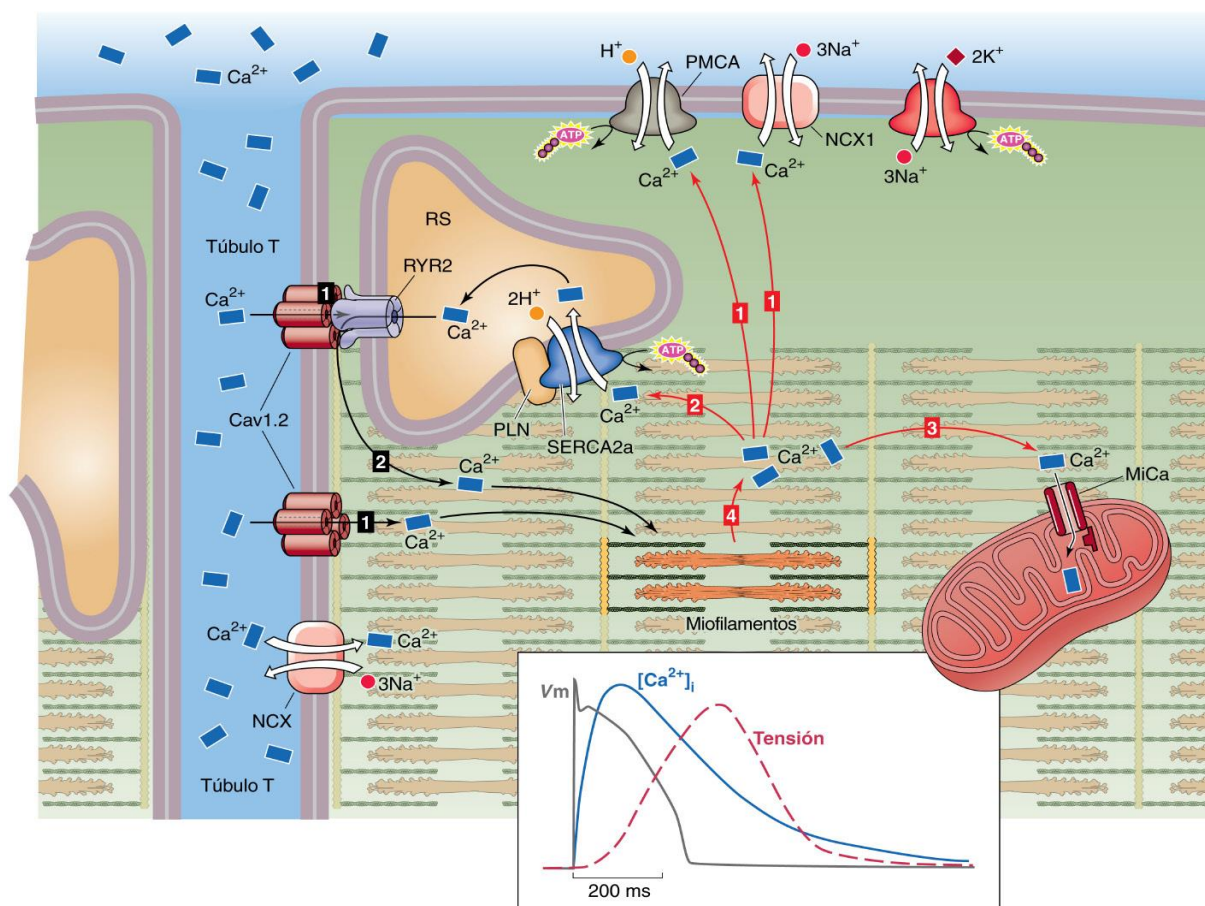


Fig. 1.7) Tomada del libro Fisiología Médica – Boron & Boulpaep 3ra edición 2017. Describe completamente el proceso de acoplamiento excito-contráctil. En números crecientes y flechas negras se observan los procesos que liberan Ca^{2+} al citosol para permitir la contracción de los miofilamentos: 1) Ingreso de Ca^{2+} por los Ca_v ; 2) Liberación de Ca^{2+} del RS por los RyR2 y consecuente captura del Ca^{2+} por TnC .

En números decrecientes y flechas rojas los procesos que reestablecen los niveles de Ca^{2+} citosólicos y logran la relajación: 4) Liberación del Ca^{2+} de los filamentos intermedios se logra por la 3) Captura del Ca^{2+} citosólico por las mitocondrias 2) Proceso de retoma más importante del RS por la SERCA2a y 1) remoción del Ca^{2+} "ingresado por Ca_v " por NCX y PMCA .

Eventos a nivel del sarcolema: el potencial de acción

El evento que inicia el AEC es el potencial de acción cardíaco (PA). El PA es un cambio rápido y transitorio del potencial de membrana (E_m) determinado por una compleja interacción de diferentes canales iónicos y transportadores electrogénicos.

El latido cardíaco normal se inicia en el nódulo sino auricular (SA), debido a que estas células poseen la propiedad de automatismo, es decir son capaces de despolarizarse espontáneamente hasta llegar al umbral de excitabilidad y lo hacen rítmicamente siendo así las determinantes de la frecuencia cardíaca. Las células del nódulo SA están más despolarizadas en reposo y tienen además una mayor velocidad de despolarización diastólica con respecto a otras células del sistema de conducción cardíaco. Estas propiedades hacen del nódulo SA el marcapaso principal del corazón. El potencial de acción se propaga por las paredes auriculares a través de haces preferenciales al nódulo auriculoventricular y desde allí, luego de un retraso fisiológico, a la red de Purkinje ventricular a través del haz de His. Si bien el PA es heterogéneo, es decir varía en las diferentes regiones del corazón, e incluso a través de la pared del ventrículo, describiremos aquí sólo el PA de los miocitos ventriculares y las corrientes que lo determinan.

Potencial de acción ventricular

En la Figura 1.8 se muestra un esquema de un PA ventricular de roedor, que puede dividirse en 5 fases. La *fase 4* corresponde al potencial de membrana en reposo (PMR, potencial de membrana en reposo) de alrededor -80 mV. La *fase 0*, denominada despolarización rápida, desplaza el E_m a valores positivos entre $+15-20$ mV; ésta es seguida por una repolarización rápida temprana, la *fase 1*, que en modelos de roedores pequeños presenta una gran importancia y no tanto así en mamíferos superiores. Luego tiene lugar la *fase 2* o meseta que ocupa aproximadamente el 70% de la duración del PA y es característica del PA cardíaco ventricular, cualidad poco preservada en estos animales ya que se caracterizan por presentar forma triangular (Huang 2017). Esa diferencia es explicada por la gran frecuencia cardíaca que presentan estos animales, que se encuentra entre 5-10 Hz. A continuación, la *fase 3* es una repolarización rápida que retorna el potencial de membrana al valor del potencial de reposo. Inclusive en la misma figura se observan los movimientos iónicos principales responsables de las diferentes fases.

Existen ciertos factores característicos en estas fases que son las que determinan las propiedades del miocardio. La velocidad de despolarización de la *fase 0* cumple un rol fundamental en la conducción. La duración de la *fase 2* regula la entrada de Ca^{++} , factor clave en el AEC y es responsable de que durante este periodo el miocardio no pueda contraerse tetánicamente si recibe una frecuencia muy elevada de estímulos, porque durante este periodo la célula se encuentra en periodo refractario absoluto. Además, hay transportadores electrogénicos que participan en estos cambios de potencial de membrana. En nuestro laboratorio se ha demostrado que el NBCe1 genera una corriente aniónica que participa en la repolarización y duración del PA (Aiello, Petroff et al. 1998, Villa-Abrille, Petroff et al. 2007).

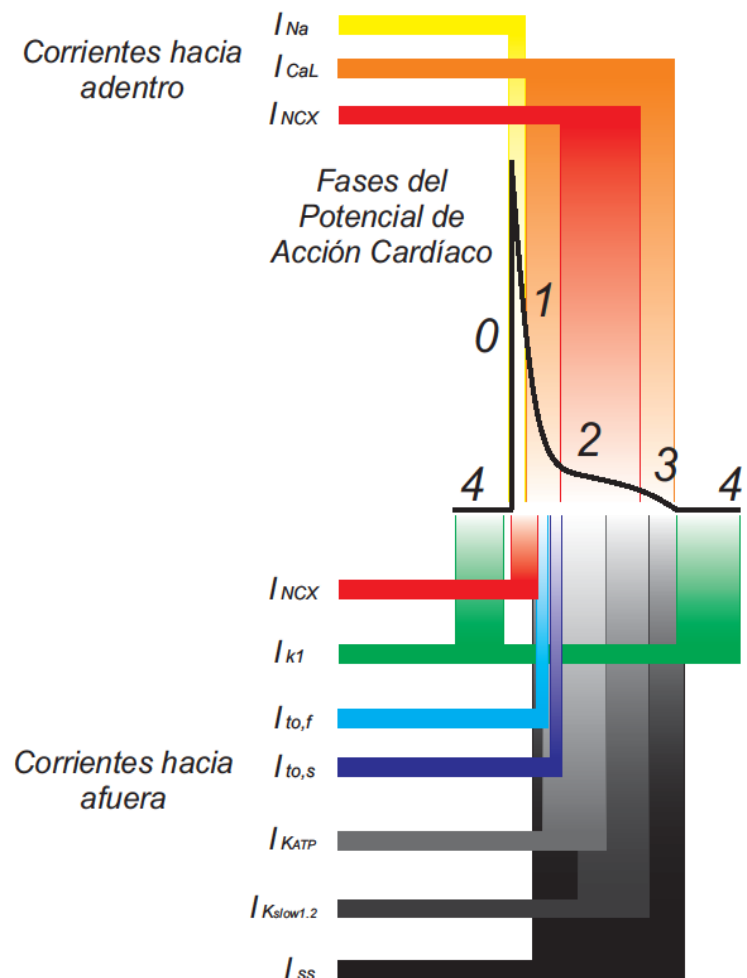


Fig. 1.8) Adaptada de: Huang CL-H. Murine Electrophysiological Models of Cardiac Arrhythmogenesis. *Physiological Reviews*. 2017;97(1):283-409. doi:10.1152/physrev.00007.2016. Se observa un potencial de acción cardíaco ventricular de rata/ratón con las principales corrientes implicadas en cada fase. Observándose las corrientes hacia adentro (despolarizantes) o hacia afuera (repolarizantes). I_{Na} : corriente rápida de Na^+ , $I_{Ca^{++}}$: corriente lenta de Ca^{++} , I_{NCX} : corriente del cotransportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$; I_{k1} : corriente rectificadora de K^+ , $I_{to,f}$: corriente transitoria de K^+ rápida, $I_{to,s}$: corriente transitoria de Cl^- lenta, I_{KATP} : corriente de K^+ dependiente de ATP, $I_{Kslow1.2}$: corriente de K^+ de inactivación lenta, I_{ss} corriente de K^+ de no-inactivación.

Como el ión Ca^{++} conecta o acopla los eventos a nivel de la membrana plasmática y la contracción a nivel de los miofilamentos, es muy importante conocer las estructuras que tienen implicancias en sus movimientos o flujos y las que interaccionan directamente con éste.

Principales estructuras relacionadas a los movimientos de Ca^{++}

Sarcolema: membrana celular que rodea las células musculares. Por fuera del sarcolema se encuentra el glicocálix que está formado por glicoproteínas y mucopolisacáridos. El sarcolema presenta invaginaciones que penetran en el interior de la célula: los túbulos transversales o túbulos T que se describirán luego. El complejo sarcolema-glicocálix tiene un gran número de sitios con carga negativa (debido a los mucopolisacáridos ácidos, aminoácidos ácidos y fosfolípidos que lo componen), que presentan una electroafinidad por iones cargados positivamente como el Ca^{++} . Éste entra a la célula fundamentalmente por los Ca_L de la membrana plasmática (se describen más adelante). En determinadas circunstancias el Ca^{++} puede entrar por el intercambiador NCX, sin embargo en condiciones fisiológicas éste funciona principalmente sacando 1 Ca^{++} de la célula e ingresando 3 Na^+ (Nagy, Kormos et al. 2014).

Túbulos Transversales (túbulos T): En el músculo cardíaco los túbulos T son invaginaciones de gran diámetro (alrededor de $0.2 \mu m$ en roedores) de la membrana plasmática hacia el interior de la célula. Estas invaginaciones están acompañadas por glicocálix. Una de las funciones de este sistema es la de conducir hacia el interior de la célula cardíaca el PA con la posterior entrada de Ca^{++} y liberación del mismo desde los reservorios intracelulares, principalmente por los canales RyR2 del Retículo Sarcoplasmático.

Retículo Sarcoplasmático (RS): Es el mayor depósito de Ca^{++} del tejido muscular y tiene como rol principal la liberación y recaptura del Ca^{++} hacia y desde el citosol, respectivamente. Por tal motivo participa en dos eventos fundamentales de la célula muscular: el AEC y la relajación.

El RS toma la forma de un conjunto de túbulos anastomosados entre sí que rodean a las miofibrillas y se yuxtaponen a los túbulos T. En el músculo cardíaco se encuentra frecuentemente la conjunción de dos elementos: una cisterna terminal del RS y un túbulo T, denominándose *díada*. Ésta asociación descripta resulta útil para comprender el proceso de liberación de Ca^{++} inducida por Ca^{++} (LCIC), y en último término para la producción de la contracción muscular. Efectivamente, en los túbulos T se encuentra una gran densidad de canales de Ca^{++} , encargados de ingresar el ión durante la despolarización de la membrana plasmática de la célula cardíaca. Dicho Ca^{++} es el que se unirá a los RyR2 del RS para provocar la liberación de más Ca^{++} del reservorio.

Canales de Ca^{++} : Existen diferentes clases de canales, tipo T (transitorio), L (lento), N (por ser específicos del sistema nervioso) y P (por haber sido caracterizados por primera vez en células de Purkinje en cerebelo). El tejido cardíaco contiene canales tipo L y T. Los canales del tipo T son activados a Em

más positivos que -60mV , se inactivan con rapidez y se pueden bloquear con Ni^{++} . Los canales de Ca^{++} tipo L (Ca_L) se activan a E_m más positivos que -40mV y entre las drogas que lo bloquean se puede mencionar a las dihidropiridinas, como la nifedipina o la nitrendipina. Los Ca_L son los más importantes en el AEC ya que cumplen la importante función de ser la vía de entrada del Ca^{++} hacia el interior de la célula. Se encuentran ubicados en los túbulos T de la membrana celular y se abren durante la despolarización ocasionada por el PA.

En el músculo cardíaco, una pequeña entrada de Ca^{++} durante el PA a través de este canal promueve una liberación de Ca^{++} del RS, mecanismo llamado “liberación de Ca^{++} inducida por Ca^{++} ” (LCIC) (Fabiato and Fabiato 1975), fundamental para el AEC.

Estructuralmente los Ca_L tienen un peso molecular de 250 a 270 kDa (Fig. 1.9). Están conformados por 5 subunidades: α_1 , α_2 , β , γ y δ . La subunidad α_1 está

formada por 4 dominios (I al IV) y cada uno de ellos posee 6 segmentos transmembrana hidrófobos (denominados S1-S6) con conexiones intra y extracelulares. El segmento S4 conformaría el sensor de voltaje ya que contiene residuos

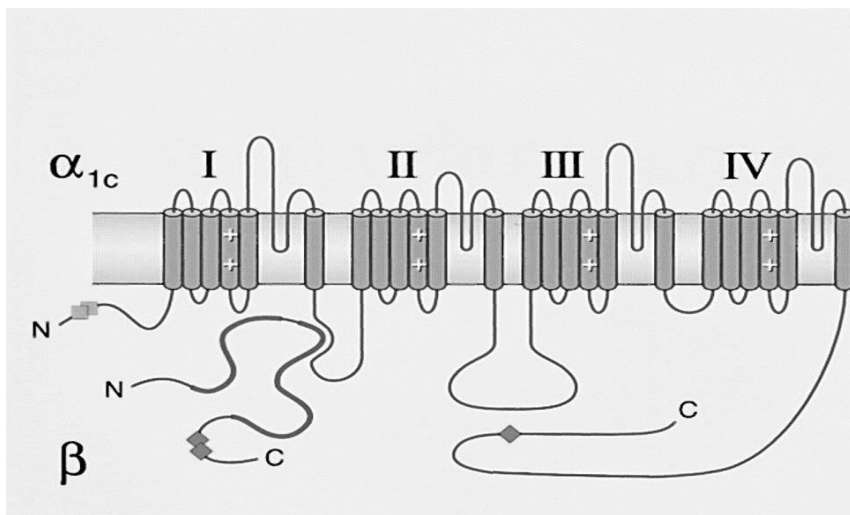


Fig. 1.9) Estructura del Canal de Ca^{++} . Figura adaptada de “Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C”, Timothy J. Kamp, Johannes W. Hell, *Circulation Research*. 2000;87:1095-1102

aminoacídicos

cargados positivamente (de Lys y Arg). Los últimos 2 segmentos (S5 y S6) estarían unidos por un tramo más largo que los otros, en forma de horquilla, que se denomina H5 o P. La relevancia del tramo H5 se debe a que los aminoácidos que lo forman son, junto a los segmentos P de las otras 3 subunidades, los que tapizan el poro del canal alrededor del cual se juntan las 4 subunidades para generarlo y así otorgar la selectividad propia del canal (Colecraft, Alseikhan et al. 2002, Bourdin, Briot et al. 2017).

La entrada de Ca^{++} por los Ca_L presenta 2 tipos de regulaciones denominadas: inactivación dependiente de Ca^{++} (CDI) el cual limita el ingreso de Ca^{++} por el canal (Peterson, DeMaria et al. 1999, Catterall 2000) y la facilitación dependiente de Ca^{++} (CDF), un mecanismo que incrementa el ingreso del ión (Anderson 2001)

y podría estar mediado por CaMKII (Bers and Morotti 2014). Se ha demostrado que la Calmodulina (CaM) se une a la subunidad formadora del poro del canal ($\alpha 1c$) y que regula esos 2 procesos completamente opuestos (Zuhlke, Pitt et al. 1999). Varias de las regiones del extremo C terminal del canal han sido reportadas como capaces de unir CaM unida a Ca^{++} (CaM- Ca^{++}) o CaM libre. Una de esas secuencias se denomina péptido IQ (AAs entre 1665 y 1685, en la secuencia de la isoforma humana) y presenta dominios de unión a CaM que involucran tanto CDI como CDF (Zuhlke and Reuter 1998).

Los Ca_L son conocidos por ser regulados por una variedad de hormonas y transmisores, a través de GPCRs y segundos mensajeros. Una vía de regulación en el sistema cardiovascular es el incremento de las corrientes de Ca^{++} por la estimulación PKC corriente abajo de una proteína $G\alpha_q$ y fosforilando al canal en el sitio consenso de esta quinasa: Ser1928.

De manera opuesta, la subunidad $G\beta\gamma$ regularía la subunidad $\alpha 1c$ del canal disminuyendo el paso de iones por el mismo (Weiss, Keren-Raifman et al. 2012). Los resultados de este trabajo sugieren un complejo antagónico entre PKC y $G\beta\gamma$ en la regulación del Ca_L en el cual muchos segmentos de la subunidad formadora del poro están involucrados. Recientemente se ha propuesto que PKC podría incluso incrementar la cantidad de canales de Ca^{++} en la superficie celular (Raifman, Kumar et al. 2017).

La estimulación β -adrenérgica, a través de la activación de PKA, aumenta el ingreso de Ca^{++} por el Ca_L al incrementar el "gating" (apertura y cierre de sus compuertas) del canal y su probabilidad de apertura como se ha descrito hace tiempo (Osterrieder, Brum et al. 1982). Así, este mayor influjo de Ca^{++} lleva a un aumento en la fuerza de contracción. Esta acción β -adrenérgica es un importante mecanismo de regulación latido a latido mediante inotropismo, cronotropismo y lusitropismo positivos, y puede actuar en una gran variedad de condiciones fisiológicas como por ejemplo durante el ejercicio físico. Además, la reducción de la regulación β -adrenérgica por mutar el sitio de unión a PKA en el dominio C-terminal genera falla cardíaca (Yang, Dai et al. 2016). Por otro lado, parece que los canales de calcio localizados en las cavéolas agravan desarrollo de hipertrofia cardíaca mediante retroalimentación positiva con CaMKII en esos microdominios (Tonegawa, Otsuka et al. 2017). Se ha observado en musculo liso cerebral, que la regulación oxidativa del influjo de Ca^{++} donde los vasoconstrictores se acoplan a la NADPH oxidasa (como AngII) inducen sitios discretos de producción de ROS resultando en la activación de $PKC\alpha$ que incrementan la actividad de los canales L llevando a un aumento de la contracción (Amberg, Earley et al. 2010)

Receptores de Rianodina (RyR): son estructuras ubicadas en el RS, enfrentando los túbulos T como así también entre las cisternas sub-sarcolemales, enfrentando al sarcolema. Fueron descriptos inicialmente como “pies” ya que hacen protrusión en el citoplasma (Franzini-Armstrong, Protasi et al. 1999). Reciben este nombre debido a la gran afinidad que presentan con el alcaloide rianodina. Se conocen tres tipos diferentes de RyR: RyR1, expresado en músculo esquelético principalmente, RyR2, en músculo cardíaco y RyR3, expresado en músculo liso y tejidos no musculares. En el presente trabajo de Tesis nos referiremos exclusivamente a los RyR2.

Los RyR2, también son identificados bajo el nombre de “canales liberadores de Ca^{++} del RS”. Están conformados por 4 unidades polipeptídicas que dan lugar al dominio citoplasmático. La porción que forma el canal del RyR2 está constituida por una pequeña porción trans-membrana. El RyR2 posee diferentes sitios de unión para diferentes ligandos que regulan la función de este canal, así, por ejemplo existe un sitio específico para el Ca^{++} y uno para rianodina.

Calsequestrina (CSQ): La CSQ es una proteína que se encuentra en el interior del RS principalmente a nivel de las cisternas laterales del mismo. Su función es la de acoplarse al Ca^{++} y “amortiguar” el Ca^{++} libre dentro del RS.

Bomba de Ca^{++} del RS (SERCA): Es una ATPasa movilizadora de iones Ca^{++} , del tipo “P” al igual que la bomba Na^+/K^+ y la ATPasa del sarcolema (PMCA). Utiliza la energía liberada por la hidrólisis del ATP para movilizar al Ca^{++} . La “P” denota que en este tipo de bombas existe un paso clave donde se forman intermediarios fosforilados con dos conformaciones (E1-E2). La SERCA cumple con la función de recapturar activamente Ca^{++} desde el citosol hacia el RS. Se encuentra en la membrana del RS. Se conocen 5 isoformas de esta bomba codificadas por 3 genes. La bomba del tejido cardíaco se denomina SERCA2a (también se la encuentra en el tejido muscular esquelético lento). En esta isoforma, la velocidad de transporte es regulada por una proteína inhibitoria llamada fosfolamban (PLN) (Tada, Kirchberger et al. 1974, Tada, Kirchberger et al. 1975).

Fosfolamban (PLN): es una fosfoproteína compuesta por 52 aminoácidos que en su estado desfosforilado une a la SERCA2a (reduciendo la afinidad aparente de la SERCA2a por el Ca^{++}), disminuyendo así, la recaptura de Ca^{++} por el RS. La fosforilación de PLN libera esta unión, incrementando significativamente la velocidad de recaptura de Ca^{++} por el RS. Esta proteína puede ser fosforilada *in vitro* en tres sitios diferentes: Ser16 por proteínas quinasas dependientes de GMP y AMP cíclico (PKG y PKA, respectivamente) y Thr17 por la Ca^{++} calmodulina quinasa II (CaMKII).

ATPasa del sarcolema (PMCA): es una proteína que atraviesa la bicapa lipídica diez veces y cuyas regiones hidrofílicas se encuentran en el citoplasma. Su peso molecular es de 100kDa y se inhibe por vanadato y lantano. Se conocen 4 isoformas de esta bomba (PMCA1-4). Es activada por el complejo formado por Ca^{++} y Calmodulina. CaM actúa sobre la bomba aumentando la afinidad de la misma por el Ca^{++} y aumentando la velocidad de transporte de Ca^{++} (Quadroni, L'Hostis et al. 1998). El porcentaje de Ca^{++} expulsado de la célula a través de la misma varía en las diferentes especies (Shannon, Ginsburg et al. 2002).

Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (NCX): es una proteína trans-membrana de 110 kDa formada por 970 aminoácidos. Posee varios segmentos de carácter hidrofóbicos que forman dominios transmembrana y uno de mayor tamaño cuya función sería la regulación del transportador. Existen tres isoformas: NCX1, NCX2 y NCX3. La primera es la que abunda en el corazón, en el músculo liso y riñón. Las otras dos isoformas se han encontrado en cerebro y músculo esquelético.

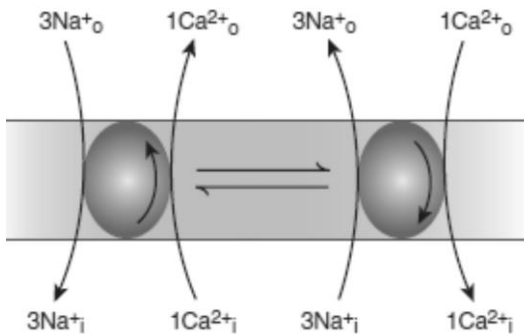


Fig. 1.10) Los 2 modos funcionales del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, directo a la izquierda y reverso a la derecha.

El Ca^{++} que ingresa como señal para el AEC debe ser extruido para mantener el balance de Ca^{++} de la célula. La ATPasa del sarcolema no es suficiente para tal fin y se ha demostrado que la capacidad que poseen las células para expulsar el Ca^{++} se debe a que expresan este intercambiador en su membrana plasmática que acopla la expulsión de un ion Ca^{++} por la entrada de tres iones Na^+ . Este intercambio ($3\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$) es por lo tanto electrogénico y su fuerza impulsora depende del potencial de membrana y de la concentración de Na^+ y Ca^{++} a ambos lados de la membrana.

Cuando el intercambiador trabaja sacando Ca^{++} e ingresando Na^+ se dice que lo hace en su modo directo, ayudando a la remoción del Ca^{++} citosólico, pero también puede trabajar intercambiando Na^+ intracelular por Ca^{++} extracelular, trabajando en su modo inverso, y por lo tanto introduciendo Ca^{++} (Bers and Weber 2002). El potencial de equilibrio del NCX es negativo y cercano a -40 mV ; por lo tanto cerca del potencial de reposo trabaja en su modo directo dando lugar a una corriente despolarizante ($I_{\text{Na/Ca}}$). Cuando se exagera esta corriente, a la que nos referimos previamente, por aumento de la pérdida de Ca^{++} del RS, pueden generarse arritmias. Cuando el NCX trabaja en su modo inverso da lugar a una corriente repolarizante promoviendo la entrada de Ca^{++} en la célula durante la fase 1 y 2 del PA. Esta entrada, es, sin embargo poco importante para el AEC. La $I_{\text{Na/Ca}}$ vuelve a ser despolarizante (modo directo) durante el resto de la fase 2 y durante la fase 3 del PA (Fig. 1.8).

Principales estructuras relacionadas a la contractilidad cardíaca

Sarcómero y proteínas contráctiles

Al observar las células musculares bajo microscopía se ve que presentan bandas transversales claras y oscuras dispuestas de manera alternada. De esta particularidad deriva el nombre de músculo estriado (tanto para el músculo cardíaco como para el esquelético). Esta sucesión de bandas parece continua, pero se halla sólo en elementos independientes denominadas *miofibrillas* que se encuentran a lo largo del citoplasma. Las miofibrillas forman el aparato contráctil del músculo y son las efectoras finales del AEC. La estriación que muestran las miofibrillas se debe a la repetición a lo largo de las mismas de la unidad contráctil del músculo, el *sarcómero*. A su vez cada sarcómero está compuesto por filamentos finos y gruesos interdigitados entre sí.

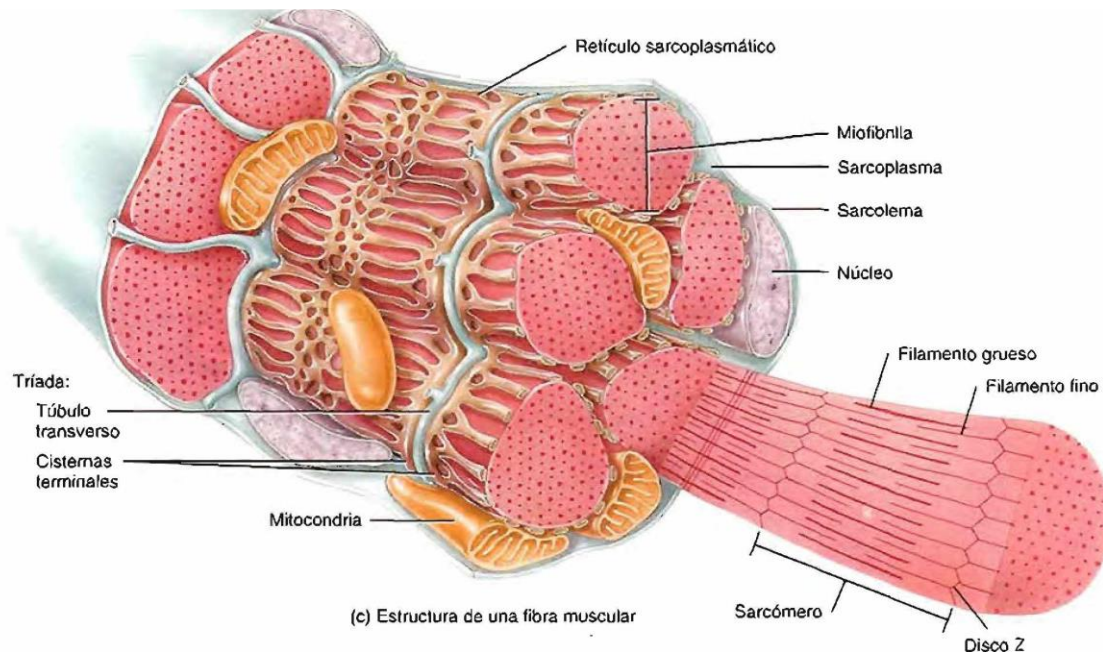


Fig. 1.11) Estructura de las principales organelas del miocito (Núcleo, Sarcolema, Mitocondria, Túbulo transversal (o túbulo T) y Retículo Sarcoplasmático. Disposición de las fibras contráctiles (finas y gruesas). *Figura extraída y editada del libro Principios de Anatomía y Fisiología, de Tórtora y Derrickson 11ª edición.*

Filamentos gruesos: compuestos por miosina y poseen una longitud de 1,55 μm . La miosina es una proteína que tiene una cola que se orienta hacia el centro del filamento y la cabeza de forma globular y flexible se extiende fuera de él. La cabeza de la miosina tiene actividad ATPasa y forma la base molecular del puente cruzado o transversal. En la cabeza, la miosina posee dos pares de cadenas livianas: una, es el par de cadenas livianas esenciales (MLC17) y el otro par, son las cadenas livianas regulatorias (MLC20). La fosforilación de éstas permite la cinética de los puentes cruzados.

Filamentos finos: formados principalmente por actina. También los componen otras dos proteínas: la troponina y la tropomiosina, fundamentales en la regulación de la contracción muscular. Tienen una longitud aproximada de 1 μm y se extienden desde las llamadas líneas Z del sarcómero (que constituyen su límite), hacia el centro. Las moléculas de actina se ordenan en cadenas enroscadas helicoidalmente entre sí y forman el cuerpo del filamento fino. La actina posee la propiedad de interactuar con la miosina y la de activar su actividad ATPasa. Las moléculas de tropomiosina son largas y delgadas y se unen entre sí, extremo con extremo, dando lugar a un filamento que se extiende a lo largo del filamento fino en el hueco que se genera cuando se enroscan entre sí dos filamentos de actina. Una molécula de tropomiosina se extiende sobre siete monómeros de actina. A su vez cada siete moléculas de actina (por ende cada una de tropomiosina), hay un complejo de troponina. Éste complejo está formado por tres elementos: la troponina T, la I y la C (TnT, TnI y TnC respectivamente). La troponina T es la que une el complejo de troponina con la tropomiosina, la I inhibe la interacción entre la actina y la miosina junto con la tropomiosina y la C es la que tiene la capacidad de unirse al Ca^{++} .

La troponina y la tropomiosina cumplen un papel de regulación del proceso de contracción impidiendo la interacción entre la actina y la miosina. Cuando el músculo está en reposo o relajado, el complejo que forma la troponina y la tropomiosina cubre físicamente el sitio activo de la actina bloqueando la interacción entre ésta y la miosina. Cuando ocurre la excitación con el consiguiente aumento del Ca^{++} dentro de la célula, éste se une a la troponina C. Esta unión genera un cambio en el complejo troponina-tropomiosina que hace que esta última se desplace. Este corrimiento libera el bloqueo del sitio activo de la actina permitiendo que se una a la miosina. Cuando la concentración de Ca^{++} en el citoplasma baja, el músculo vuelve a su estado de relajación. Así se pone de manifiesto el rol del Ca^{++} : libera el bloqueo preexistente entre la actina y la miosina. El aumento de la fuerza activa resulta de un mayor reclutamiento de puentes que ciclan activamente, sin cambios en la cinética de esos puentes (Shannon, Ginsburg et al. 2002).

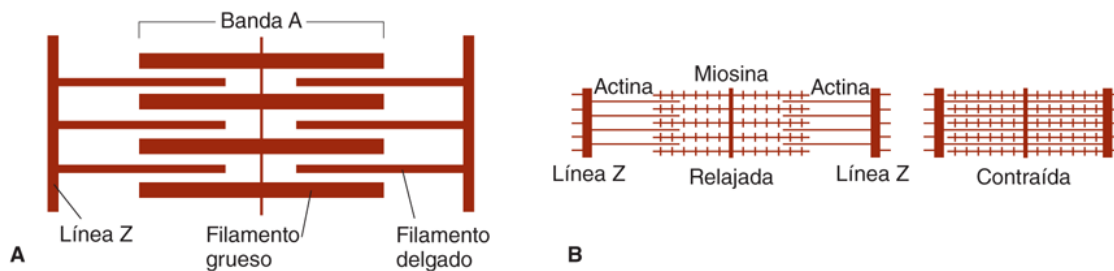


Fig.1.12) En el panel A se observa un esquema de la disposición de la unidad funcional sarcómero con sus partes principales: banda A, líneas Z y los filamentos gruesos y delgados. En el panel B se observa modelo de deslizamiento de filamentos de actina sobre los filamentos de miosina para lograr la contracción muscular. La presencia de ATP y Ca^{++} permite este proceso. *Figura extraída y editada del libro Fisiología Médica, Ganong, 23ª edición.*

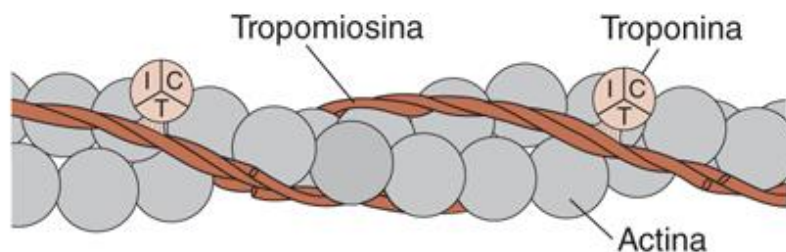


Fig. 1.13) Se observa la estructura de la actina junto a Troponina y Tropomiosina. La unión de Ca^{++} a la Troponina liberaría el sitio de unión de las cabezas de miosina a actina que permitiría la contracción. *Figura extraída y editada del libro Fisiología Médica, Ganong, 23ª edición.*

Existen además de las proteínas contráctiles y regulatorias nombradas, otras proteínas asociadas al sarcómero como la proteína M, la miomesina, la tropomodulina, la titina (o conectina) y la nebulina que forman los filamentos de titina y nebulina. Cada molécula de titina se extiende a lo largo del filamento que lleva el mismo nombre desde la línea Z a la línea M, dando lugar a un tercer filamento en el sarcómero, además de la actina y la miosina. Cada filamento de titina sitúa a la miosina en el centro del sarcómero y lo ancla a la banda Z. Posee propiedades elásticas que explican en gran parte la relación que existe en reposo entre la tensión y longitud del músculo estriado (tensión diastólica en el músculo cardíaco). La titina provee estabilidad a los sarcómeros en la rama descendente de la relación fuerza-longitud y para los filamentos de miosina en la mitad del sarcómero. Cuando se elimina la titina, toda la transmisión de fuerza, ya sea activa o pasiva a lo largo del sarcómero, se pierde (Herzog, Powers et al. 2015).

En resumen y habiendo descrito todas las estructuras intracelulares podemos decir que si la intensidad del estímulo antes mencionado es suficiente, el

resultado del mismo es la despolarización de la membrana celular, la entrada de Ca^{++} y la liberación de más Ca^{++} por el RS (LCIC), resultando esto en el aumento del Ca^{++} citosólico que pasa de un valor basal de 10^{-7} M aproximadamente a 10^{-5} M, y la contracción muscular. Así el Ca^{++} es el nexo entre la excitación y la contracción. El Ca^{++} se une a la TnC y genera la contracción muscular. La mayor parte del Ca^{++} es recapturado por el RS con la utilización de energía proveniente del ATP para su posterior liberación ante un nuevo PA. Cuando baja el nivel de Ca^{++} por la recaptura de Ca^{++} por el RS, el Ca^{++} unido a la TnC se desprende de la misma y se produce la relajación.

Objetivo General

Investigar la participación del novedoso receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER) en la fisiología cardíaca, haciendo hincapié en la regulación del pH, los movimientos de Ca^{++} y la contractilidad ya que son mecanismos que se regulan rápidamente y en los que se cree que participaría este receptor.

Objetivos específicos

1. Estudiar la regulación del cotransportador sodio/bicarbonato (NBC) y el intercambiador Na^+/H^+ (NHE) a través de GPER y Aldo. Rol de diferentes quinasas y las especies reactivas del oxígeno (ROS).
2. Estudiar la regulación del manejo de Ca^{++} y la contractilidad cardíaca a través de GPER, Aldo y E2.
3. Estudiar la localización del GPER en el miocito cardíaco.

Hipótesis

El receptor GPER media efectos no genómicos de Aldosterona y Estradiol en el corazón, regulando el pH, el manejo de Ca^{++} intracelular y modulando la contractilidad.

2- Materiales y métodos

Cuidado y uso animal

Para todos los experimentos, se utilizan ratas Wistar (*Rattus Novergicus*) de 3-4 meses de edad. Los procedimientos llevados a cabo durante la investigación fueron realizados de acuerdo a la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, publicada por el Instituto Nacional de Salud (NIH No. 85-23, revisado en 1996), y siguiendo las directrices establecidas por el Comité de Bienestar Animal de la Facultad de Medicina de La Plata.

Obtención de cardiomiocitos del corazón de rata

La rata Wistar se anestesia con ketamina-diazepam (75-25 mg/kg) por vía intraperitoneal para realizar una toracotomía. Se inyecta 1 ml de heparina sódica (200 U/ml) dentro de la cavidad ventricular para evitar la coagulación sanguínea dentro de los vasos que irrigan el corazón. Posteriormente, el corazón se remueve y coloca en un Sistema de Langerdorff para realizar la perfusión retrógrada *ex vivo* con la solución HBS (conformada por: NaCl 146,5 mM, KCl 4,69 mM, Glucosa 11 mM, HEPES 10 mM, NaH₂PO₄.H₂O 0,35 mM, MgSO₄.7H₂O 1,05 mM) con 1 mM CaCl₂ que le permite al corazón seguir latiendo y así reemplazar la sangre remanente con la solución en todos los vasos del órgano. Se prosigue por 5 minutos con la solución HBS con 0,1 mM de EGTA y sin CaCl₂, para quelar el Ca⁺⁺ y permitir que el corazón quede quiescente y se relaje. Luego se recircula por 15 minutos una solución de digestión enzimática: solución HBS, 0,5 mM CaCl₂, 0,18 mg/ml de Colagenasa tipo II (aproximadamente 300U/ml), 0,01 mg/ml de proteasa y albúmina bovina 0,5 mg/ml, que disgregará la red de colágeno y permitirá liberar los miocitos del tejido.

Una vez concluido el tiempo de digestión, el corazón se desmonta y el tejido ventricular se disocia mecánicamente con pinzas y tijeras liberando los cardiomiocitos en la solución utilizada. Se centrifuga para descartar la solución enzimática y se restituye progresiva y lentamente el Ca⁺⁺ hasta la concentración de 1 mM para evitar la muerte por recalcificación rápida. Los cardiomiocitos se mantienen en solución HBS con Ca⁺⁺ 1 mM hasta su uso experimental. En la Fig. 2.1 se observan los pasos para la obtención de los cardiomiocitos ventriculares como se ha descripto.

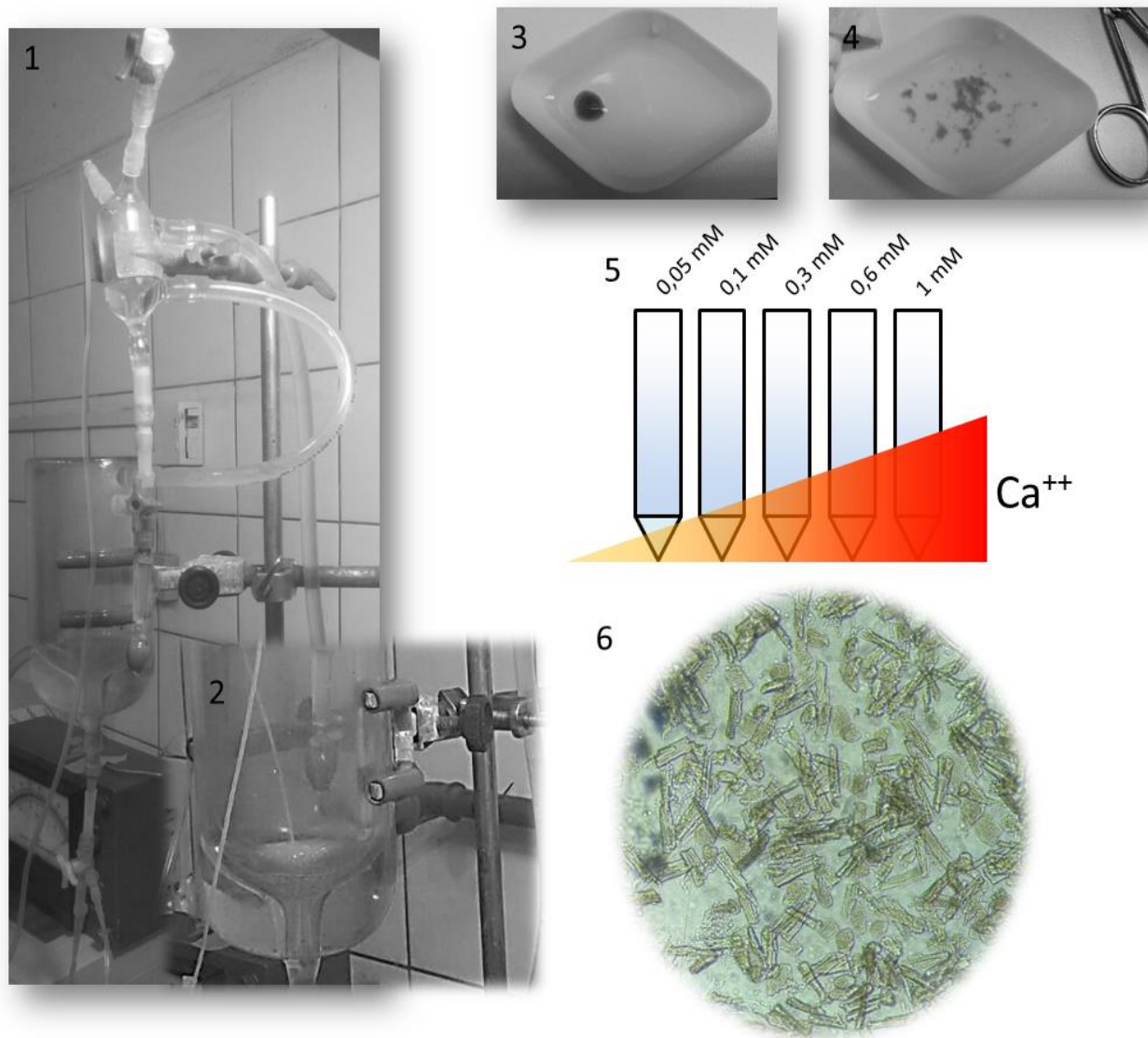


Fig. 2.1) Pasos del aislamiento de cardiomiocitos de rata: 1) Equipo de Langendorff con corazón de rata en perfusión aórtica ex vivo 2) Perfusión con solución de digestión enzimática y dentro de la camisa de vidrio que permite mantener la temperatura en 37°C 3) Ventriculo izquierdo desmontado del equipo 4) Fragmentos de tejido cardíaco luego de la digestión mecánica con pinzas y tijeras 5) Esquema de los pasos para la restitución de Ca^{++} 6) Cardiomiocitos obtenidos luego del procedimiento. Los que se encontraban en estado quiescente, con la correcta morfología de bastón y con estriaciones visibles se utilizaron para todos los experimentos siguientes.

Pulsos de NH₄Cl: Actividades de NBC y NHE-1

El pH intracelular (pH_i) de los miocitos se evalúa por el sistema de epifluorescencia Ion Optix (Milton, MA). Se utilizan miocitos cardíacos cargados con aproximadamente 3 μM del indicador fluorescente de pH_i, 2'-7'-bis (2-carboxiethyl) -5, 6-carboxyfluorescein-Acetoximetyl Ester (BCECF-AM, Thermofisher). Para estudiar la actividad del NBC (en buffer HCO₃⁻/CO₂: [NaCl 118 mM, KCl 5 mM, glucosa 10 mM, NaHCO₃ 20 mM, MgCl₂ 0,8 mM, MgSO₄·7H₂O 1,2 mM] + HOE642 (HOE) 10 μM, inhibidor del NHE-1) o del NHE-1 (en solución HBS) se utilizaron 2 pulsos de NH₄Cl consecutivos sobre la misma célula, el 2^{do} luego de permitir su recuperación a pH cercano al basal observado antes del 1^{ro}.

Inicialmente los miocitos fueron expuestos a una solución extracelular de HBS (pH=7,4) o HCO₃⁻/CO₂ (se burbujea con carbógeno: CO₂ 5%/O₂ 95% para llevarla y mantenerla a pH=7,4), registrándose el pH_i hasta su estabilización. Paso siguiente, se expone los miocitos a NH₄Cl 20 mM durante 3 minutos lo cual genera una alcalosis intracelular debido a la difusión rápida, a través de la membrana, del amoníaco (NH₃) y una difusión lenta de NH₄⁺. Cuando el NH₃ ingresa actúa como base frente a la presencia de H₂O liberando OH⁻ alcalinizando el medio intracelular rápidamente. Luego de esa rápida alcalinización, por los 3 minutos siguientes se produce una leve acidificación por el equilibrio entre el NH₄⁺ y el NH₃ que libera H⁺. Cuando el NH₄Cl es eliminado del medio extracelular el NH₃ difunde rápidamente fuera de la célula, forzando el equilibrio entre NH₃ y NH₄⁺ hacia la formación de NH₃ dejando una sobrecarga ácida (H⁺) debida principalmente del NH₄⁺ que difundió pasivamente durante los 3 minutos, en el interior celular. Durante los siguientes 15 minutos en solución HBS o HCO₃⁻/CO₂ el pH_i se recuperará gracias a la acción de los transportadores alcalinizantes presentes y funcionales. Luego de este 1^{er} pulso, se incuba por 15 minutos con Aldo, G1, los inhibidores de GPER, quinasas o ROS según corresponda. Constituyendo así un lo que denominamos doble pulso de NH₄Cl sobre la célula y así podemos seguir el efecto en la recuperación de pH_i del 2^{do} pulso respecto al 1^{ro} en el mismo sujeto experimental.

Fundamento gráfico de la técnica implementada:

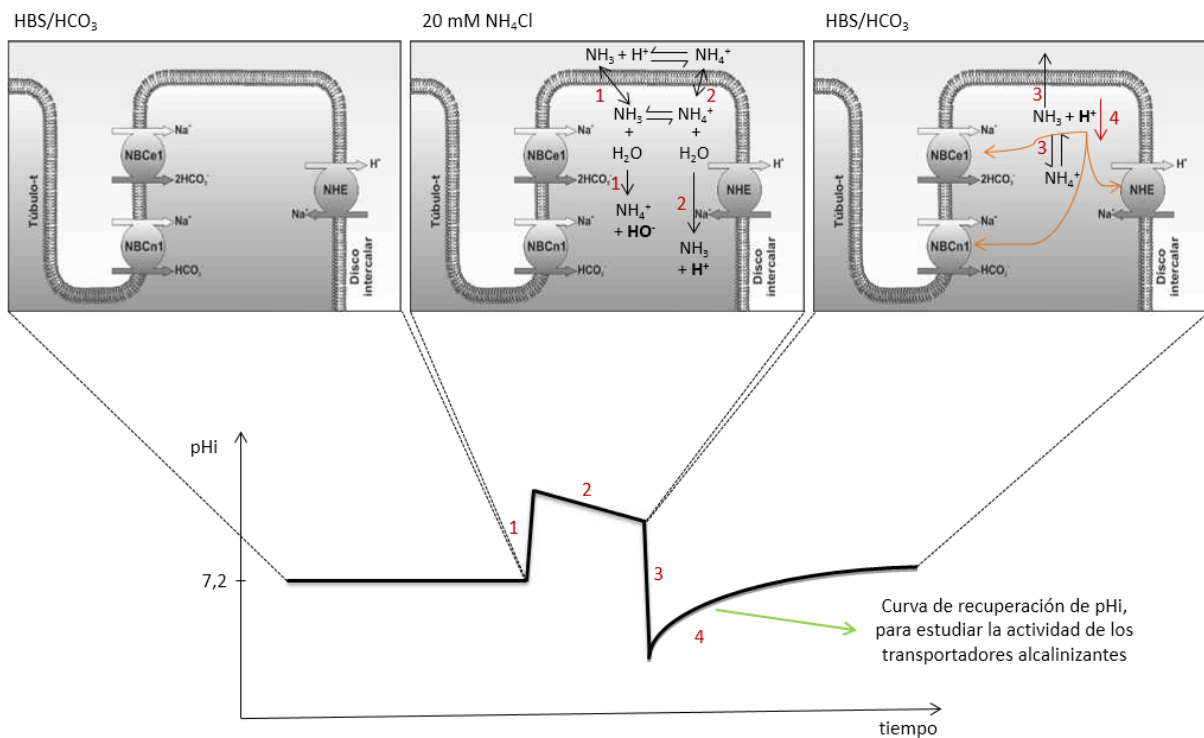


Fig. 2.2). Pulso de amonio: El NH₃ ingresa rápidamente a la célula produciendo alcalinización por formación de NH₄⁺ y el NH₄⁺ difunde más lentamente lo que se observa en la leve acidificación observada en el registro de pHi vs. tiempo luego del rápido incremento del pH. Una vez que se prosigue a eliminar el NH₄Cl del medio extracelular se genera una rápida acidificación por eliminación del NH₃ del interior celular (por la disociación del NH₄⁺ acumulado en el citosol durante el período previo) dejando una mayor cantidad de H⁺. Esta acidificación provoca la activación de los mecanismos alcalinizantes: NBC y NHE-1 para la recuperación del pHi.

El análisis se realizó utilizando el software Origin 8, se ajustó la curva de recuperación de pHi con una función de decaimiento exponencial de primer orden. Del mismo se obtiene la velocidad (dpHi/dt) de recuperación a cada pHi y luego, con este dato y conociendo la capacidad amortiguadora total (β_{tot}), se calculó el flujo de protones (J_H) o de bicarbonato (J_{HCO_3}) según corresponda, en mM/min. La β_{tot} fue calculada a partir de la suma entre la capacidad amortiguadora del CO₂ intracelular (β_{CO_2}) y la capacidad amortiguadora intrínseca (β_i).

La β_{CO_2} se calculó como $\beta_{CO_2} = 2,3 \times [HCO_3^-]_i$ donde $[HCO_3^-]_i = [HCO_3^-]_o \times 10^{pHi - pHo}$ según se ha descrito previamente (Roos and Boron 1981).

La β_i de los miocitos fue calculada exponiendo las células a diferentes concentraciones de NH₄Cl (20, 15, 12, 9, 5 y 3 mM) en buffer HBS sin Na⁺ y registrando el pHi obtenido para cada concentración de NH₄Cl durante 3 minutos, utilizando luego el promedio de los valores de pHi.

Sabiendo que $NH_4^+_i = NH_4^+_o \times 10^{(pH_o - pH_i) / (1 + 10^{(pH_o - pK)})}$, la β_i se calculó como $\beta_i = \Delta[NH_4^+]_i / \Delta pH_i$, y referida al punto medio de las medidas de pH_i , con pK del $NH_4^+ = 9,21$ y el $pH_o = 7,4$ (Zaniboni, Swietach et al. 2003). La β_i a diferentes valores de pH_i fue estimada sobre un ajuste lineal obtenido de la gráfica entre la β_i en función del pH_i

Por otro lado, para conocer los pHs evaluados se realizaron las calibraciones correspondientes en cardiomiocitos cargados con BCECF-AM y nigericina que permite equilibrar el pH intracelular con el extracelular que presenta pHs conocidos (Eisner, Kenning et al. 1989). En el anexo se observa una calibración de pH representativa en el sistema de Microscopía Ionoptix.

Pulso de alto K⁺: Actividad del NBCe1

Se estudió la actividad del NBC electrogénico (NBCe1) mediante el protocolo experimental "Despolarización por alto K⁺", donde los miocitos aislados y cargados con BCECF-AM son expuestos a una solución con concentración de K⁺ normal conformada por: NaCl 118 mM, KCl 5 mM, MgSO₄·7H₂O 1 mM, NaH₂PO₄·H₂O 0,35 mM, glucosa 10 mM, cloruro de colina (C₅H₁₄ClNO) 40mM y NaHCO₃ 20 mM a pH 7,4. Una vez estabilizado el registro de pH_i , se modifica a una solución iso-osmótica e igual pH extracelular, pero con 45 mM de KCl y sin cloruro de colina, manteniéndose esta última solución por 15 minutos. Se realizaron experimentos controles y con el agregado de G1 y Aldo.

La relación de concentraciones dentro y fuera del cardiomiocito normalmente es $[K^+]_i \sim 145$ mM y $[K^+]_o \sim 5$ mM (como en la solución de K⁺ normal) lo que genera un potencial de equilibrio para el K⁺ de aproximadamente -95 mV, como el K⁺ es el ion más permeante el potencial de membrana en reposo de los cardiomiocitos se encuentra alrededor de -85 mV. Al incrementar la concentración $[K^+]_o \sim 45$ mM, el gradiente de concentraciones a través de la membrana disminuye, disminuyendo la fuerza impulsora para la generación del potencial de equilibrio del K⁺, lo cual lleva el potencial de equilibrio a valores más despolarizados (la solución de alto K⁺ produciría una despolarización de aproximadamente 60 mV). Este procedimiento activa todos los mecanismos electrogénicos, entre ellos el NBCe1 que se activa por despolarización y esta activación del NBCe1 se traduce como un incremento del pH_i .

Esquema del funcionamiento del pulso de alto K^+ :

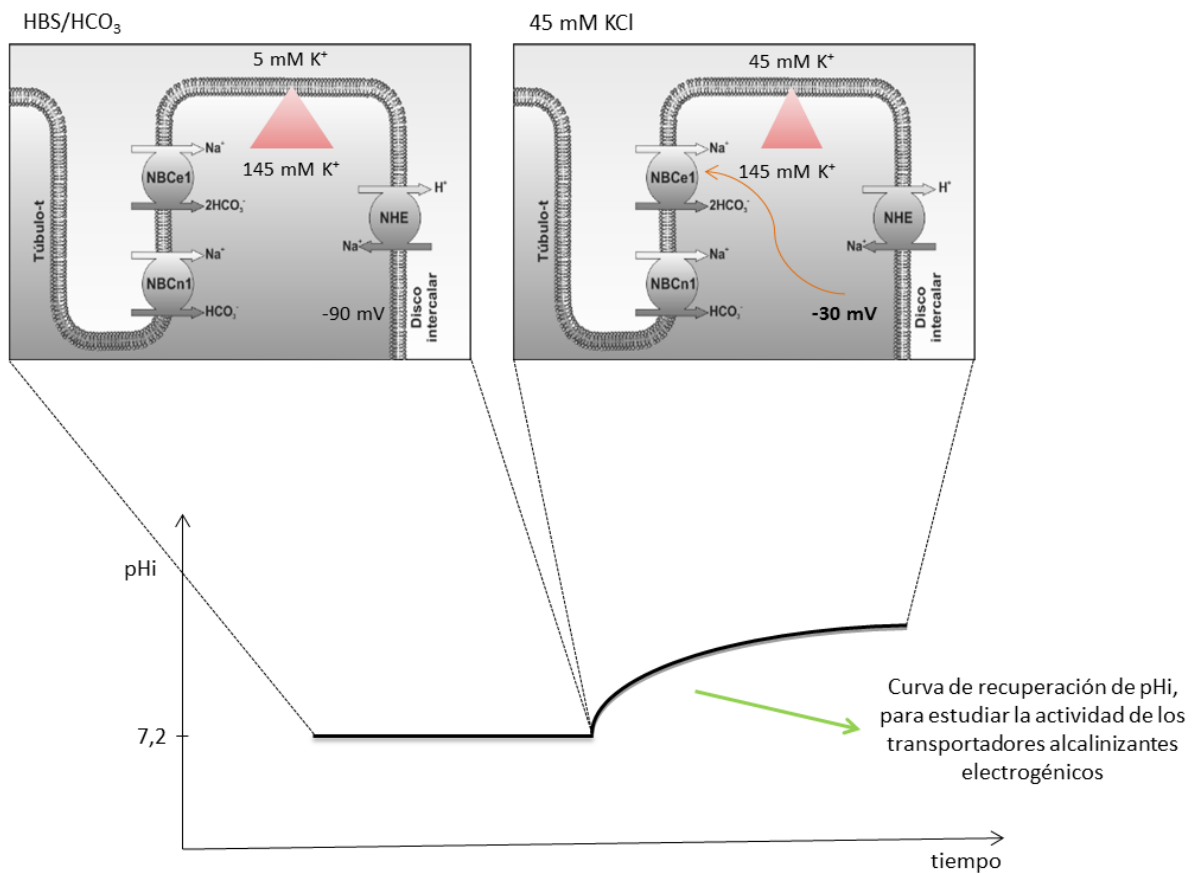


Fig. 2.3) Fundamento gráfico de la técnica de pulso de K^+ . El cambio de concentraciones extracelulares de K^+ provoca una despolarización de la membrana activando los transportadores alcalinizantes electrogénicos y así se registra como un incremento en el pHi.

Producción de especies reactivas del Oxígeno (ROS)

En cardiomiocitos aislados: Producción de ROS.

La producción intracelular de ROS se estudió por microscopía de epifluorescencia (Microscopio Zeiss 410) en miocitos aislados de rata Wistar pre-incubados con 5 μ M del indicador fluorescente 5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluorescein diacetato (CM-H2DCF DA, Invitrogen/Molecular Probes). Los miocitos se excitaron a 488 nm de longitud de onda (λ). La fluorescencia emitida se registra 510-560 nm y la intensidad de la misma dependerá de la producción de todos los ROS intracelulares de diferentes fuentes, las más importantes son la proteína de membrana NADPH oxidasa y la cadena transportadora de electrones mitocondrial con todos los complejos de membrana que llevan a la oxidación de la molécula de O₂.

Se estimó la producción de ROS en base a la pendiente de aumento en la señal fluorescente ya que ocurre una leve oxidación del indicador con el tiempo de exposición a la luz láser de 488 nm.

La fluorescencia de cada célula se registró por 30 minutos. Los primeros 15 minutos son condiciones control y en los segundos 15 minutos se realiza el tratamiento correspondiente. Para el análisis serán calculadas ambas pendientes y luego se obtendrá la relación entre ambas. Se realizaron experimentos Control, en presencia de G1, G1+G15 (inhibidor de GPER), Aldo, Aldo+G15.

En secciones de tejido ventricular cardíaco: Producción de O₂⁻

Se trabajó con secciones de corazón del ventrículo izquierdo (1 x 5 mm aproximadamente), y se utilizó el método de quimioluminiscencia aumentada por lucigenina (Caldiz, Garcarena et al. 2007). Las secciones de corazón fueron incubadas en buffer de lucigenina en ausencia (Control) o presencia de G1, G1+G15, G1+Apocinina (Apo) y G1 + AG1748, y en presencia de Aldo, Aldo+G15 durante 30 minutos en un incubador a 37°C con 95% O₂ -5% CO₂. La quimioluminiscencia de la luciferasa por la producción del anión superóxido (O₂⁻) en las secciones de tejido fue medida en unidades arbitrarias y se registró con un luminómetro (Chameleon; Hidex; Finland) durante 15 minutos. La producción de O₂⁻ se expresó como porcentaje respecto al valor control.

Western Blots (WB)

Las muestras de tejido fueron preparadas a partir del ventrículo izquierdo de corazones rápidamente extirpados y lavados con solución HBS. El tejido cardíaco fue homogeneizado en buffer de lisis. Se centrifugó el homogenato a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C, y se fraccionó el sobrenadante en alícuotas para conservarlo a -80°C. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (Bradford 1976).

Buffer de lisis: Composición
KH ₂ PO ₄ 0,5 M - pH 7,3
NaF 0,5 M
EDTA 0,1 M
Sacarosa 100 mg/ml
Igepal 25 %
Coctel de inhibidores de proteasas 25 %

En la corrida electroforética, 90 µg de proteína fueron mezclados con buffer de corrida SDS-PAGE.

Las muestras fueron corridas en geles de acrilamida al 10%. Se realizaron 30 minutos iniciales a 80 mV para concentrar las proteínas, y luego se continuó a 120 mV para separar a las proteínas según su peso molecular. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF por electroforesis por 2 hs a 65 mV, en un buffer de transferencia a 0°C (Buffer Tris Salino (TBS) con 20% de metanol y 1% SDS). Las membranas fueron luego bloqueadas por incubación durante 2 hs en solución de bloqueo (TBS 0,1% Tween 20 con 5% proteínas de la leche), e incubadas toda la noche con los anticuerpos primarios correspondientes. A continuación, se usaron anticuerpos secundarios indicados para cada anticuerpo primario, conjugados con una peroxidasa. Las bandas se visualizaron con un reactivo de luminiscencia (ECL, Millipore) en el equipo Chemidoc Station (Bio-Rad), y se cuantificaron con el software de análisis Image J.

Inmunofluorescencia de GPER y NBCe1 en cardiomiocitos

Se estudió la distribución espacial de NBCe1 y GPER mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal (Microscopio Zeiss 410). Los cardiomiocitos aislados fueron fijados y permeabilizados, posteriormente se incubaron con anticuerpos primarios para NBCe1 (Millipore) o para GPER (Abcam). Luego fueron incubados con el anticuerpo secundario correspondiente que presenta el grupo Alexa Fluor 488 y observados microscopía confocal. Se obtuvieron fotos y se determinó la intensidad de fluorescencia por un escaneo longitudinal para establecer correlación entre los patrones de tinción observados.

Respuesta excito-contráctil: Flujos de Ca⁺⁺ en cardiomiocitos

Se estudió el transitorio de Ca⁺⁺ en miocitos aislados cargados con el indicador fluorescente Fura2-AM (Molecular Probes/Invitrogen) aproximadamente a concentración de 3 µM y, en lo posible, simultáneamente se registró la contractilidad como el promedio del acortamiento de los sarcómeros o del largo

celular (Ion Optix System). Se realizaron estos experimentos en presencia de G1, G36, Aldo y E2. Los registros obtenidos fueron analizados con el software de análisis Ion Optix System.

Fundamento fisiológico de los registros obtenidos:

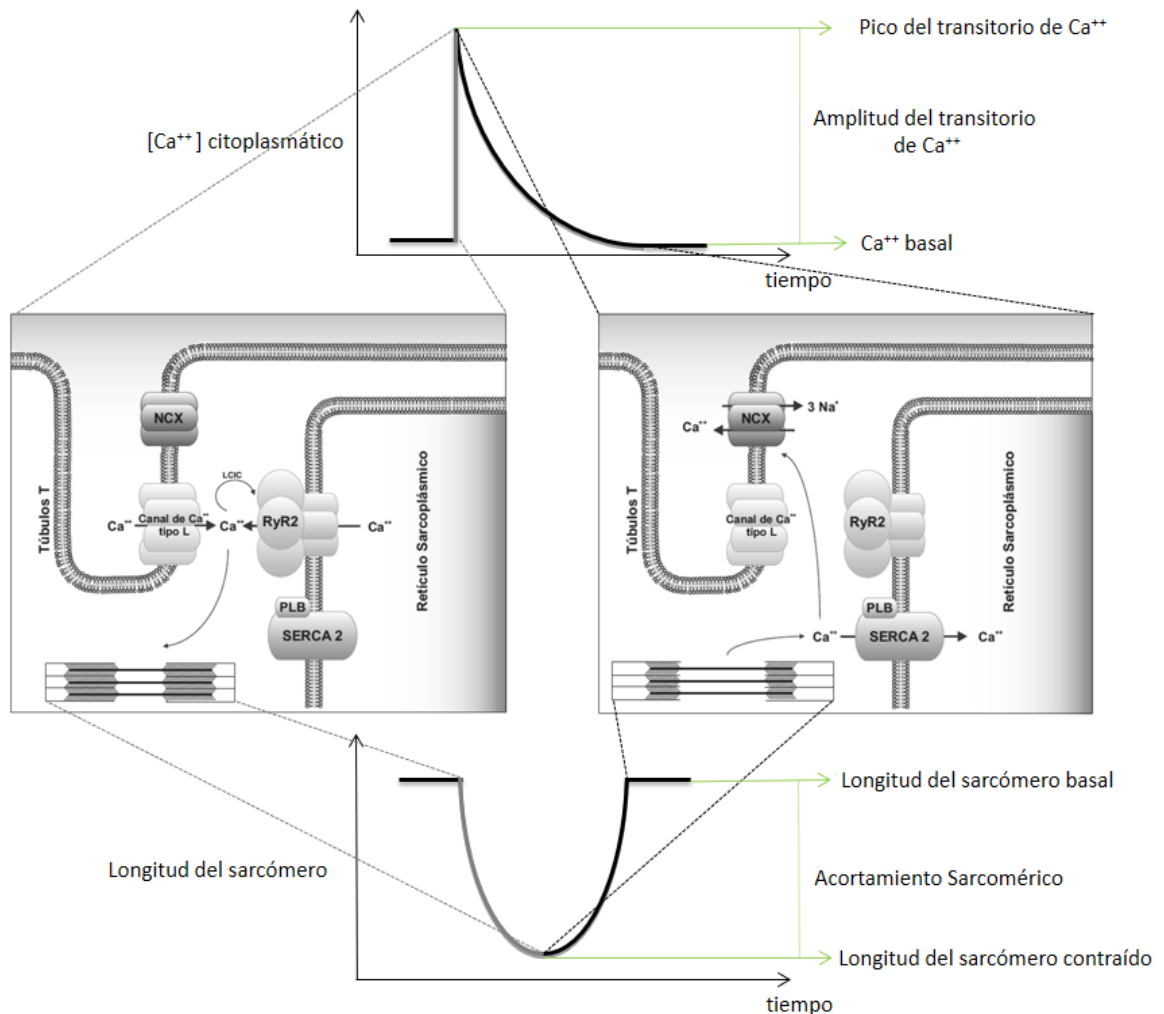


Fig. 2.4) Acoplamiento Excito-Contráctil en los cardiomiocitos, la despolarización de membrana provocada por el potencial de acción activa los canales de Ca^{2+} tipo L que inducen la apertura del canal de Rianodina (RyR2) por el fenómeno de Liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (LCIC) produciendo un gran y rápido incremento en el Ca^{2+} intracelular a partir de las reservas del Retículo Sarcoplasmático. El Ca^{2+} une a troponina C liberando las cabezas de miosina y permitiendo la contracción. Luego el calcio se libera de los filamentos de miosina por la recaptura del mismo hacia el Retículo Sarcoplasmático de la bomba de calcio dependiente de ATP del Retículo Sarcoplasmático (SERCA 2) y la extrusión al medio extracelular por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) en el Sarcolema.

Contenido de Ca^{++} del Retículo Sarcoplasmático

Se utilizó la misma metodología para estimar el contenido de Ca^{++} en los cardiomiocitos en buffer $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ con el agregado o no de G1. Los miocitos fueron estimulados eléctricamente a 0,5 Hz hasta estabilizar la contractilidad, se interrumpe la estimulación y se aplica un pulso de cafeína (15 mM) para liberar el contenido de Ca^{++} del RS. La amplitud del transitorio de Ca^{++} generado por el agregado de cafeína es un estimativo de la carga del RS. (Diaz, Graham et al. 2004). Los registros obtenidos fueron analizados con el software de análisis Ion Optix System.

Registro de la corriente de Ca^{++}

Luego de obtener una configuración de Whole-Cell (WC) estable se registró la corriente de Ca^{++} generada a través del Ca_L utilizando un protocolo de Voltage Clamp (Clampeo de Voltaje) de 2 pasos de despolarización: primero se clampea el voltaje a -80 mV y se lo lleva a -40 mV por 200 ms para abrir los canales rápidos de Na^+ y mantenerlos en su forma inactiva, luego se despolariza a 0 mV por 500 ms para estudiar la corriente de Ca^{++} (I_{CaL}) generada. Una vez estabilizada la amplitud de I_{CaL} se procede a realizar un protocolo de determinación de la corriente a diferentes voltajes luego de la inactivación de la corriente de Na^+ , desde -50 mV a +70 mV en pasos de 10 mV para obtener la curva corriente-voltaje (IV) y caracterizar el funcionamiento del canal. Cada determinación de corriente del Ca_L a diferentes voltajes se realizó a una frecuencia de 0.14 Hz. El electrodo Ag/AgCl en contacto directo con la solución extracelular se usó como referencia. Para cada célula se determinó la corriente capacitiva para así poder determinar la capacitancia de la membrana, y de esta manera las corrientes medidas podrán ser normalizadas por la capacitancia de las células. Se realizaron estos experimentos en presencia de G1, E2 y G36.

Protocolo de *Clampeo de Voltaje* utilizado para estudiar la corriente de Ca^{++} en miocitos ventriculares:

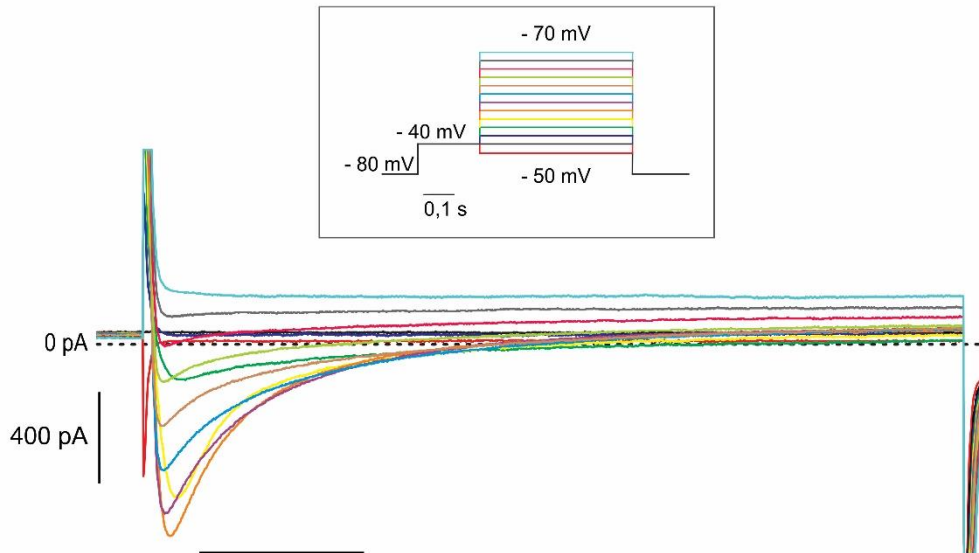


Fig. 2.5) Protocolo de curva IV (Corriente vs. Voltaje) por clampeo de voltaje de pasos cada 10 mV, luego de inactivar la Corriente de Na^+ a -40mV, que se inician en -50mV y llegan a 70 mV. En el panel inferior se observan los registros de las corrientes generadas por el Ca_L a cada paso de voltaje en correspondencia con los colores indicados en el protocolo utilizado.

Solución de pipeta: CsCl 140 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, Na_2ATP 4 mM, EGTA 5 mM, HEPES 10 mM, llevada a pH 7,2 con NaOH.

Solución extracelular: CsCl 5 mM, NaCl 133 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, HEPES 10 mM, TEA-Cl 10 mM, 4-Aminopiridina 5 mM, Cl_2Ca 1 mM, Glucosa 5 mM, llevada a pH 7,4 con NaOH.

El análisis de los datos de la I_{CaL} (Voltaje Clamp) se realizó con el software pClamp (Clampfit).

Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como promedio \pm error estándar. Para comparar los grupos se utilizó el Test de Student correspondiente o ANOVA de una vía con su consecuente test de comparaciones múltiples, según el caso. Para mayor claridad, en cada Figura de Resultados se especifica el análisis estadístico utilizado.

3-Resultados

Rol del GPER en la regulación del pH intracelular

Transportadores alcalinizantes: Co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC)

Para estudiar la actividad de NBC se realizaron dobles pulsos de amonio en una solución con buffer $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ y el agregado de $10 \mu\text{M}$ de HOE dejando a los NBC como único mecanismo alcalinizante para revertir de la acidosis provocada por el protocolo.

Primero realizamos dobles pulsos control, en los cuales encontramos una disminución significativa en la recuperación del segundo pulso respecto del primero a pHs ácidos, como se observa en la Fig. 3.1 donde el segundo pulso presenta un $J_{\text{HCO}_3^-}$ menor que el primero. La disminución del influjo de HCO_3^- mediado por NBC durante el segundo pulso fue aproximadamente de 20 %. Este fenómeno se puede deber a que la célula pierde la habilidad de recuperarse con la misma velocidad frente a una segunda acidosis.

A pesar de este inconveniente técnico, este protocolo fue utilizado en los experimentos sucesivos, realizados en presencia de las diferentes intervenciones farmacológicas, debiendo recordar por lo tanto que los efectos estimulatorios de las drogas aplicadas durante el segundo pulso podrían resultar subestimadas en aproximadamente 20 %.

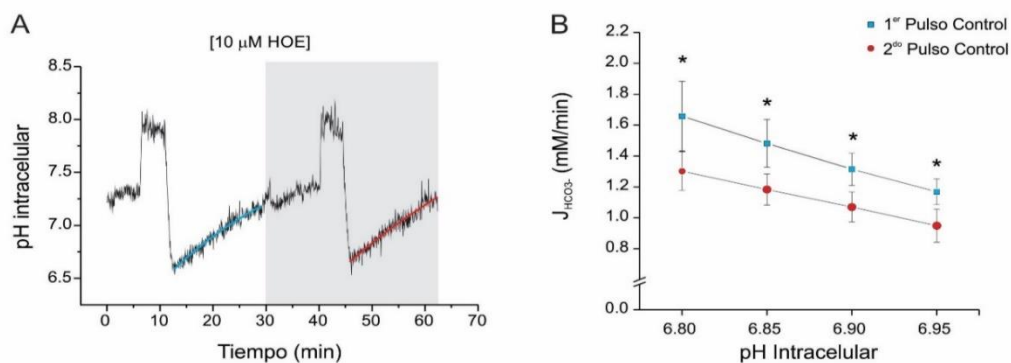


Fig. 3.1) Pulsos de amonio control. En el panel A observamos un registro representativo de pH en tiempo observándose 2 pulsos de amonio consecutivos en la misma célula en presencia de HOE durante todo el registro. En el panel B observamos e $J_{\text{HCO}_3^-}$ a pHs ácidos del primer y segundo pulso. * indica $p < 0,05$ por prueba T apareada.

En primera medida intentamos evaluar el efecto agudo de Aldo sobre la actividad de NBC. Al incubar a las células con Aldo (10 nM) a partir de los 10 minutos previos al segundo pulso, encontramos un incremento significativo en la velocidad de recuperación del segundo pulso, como se observa en la Fig. 3.2.

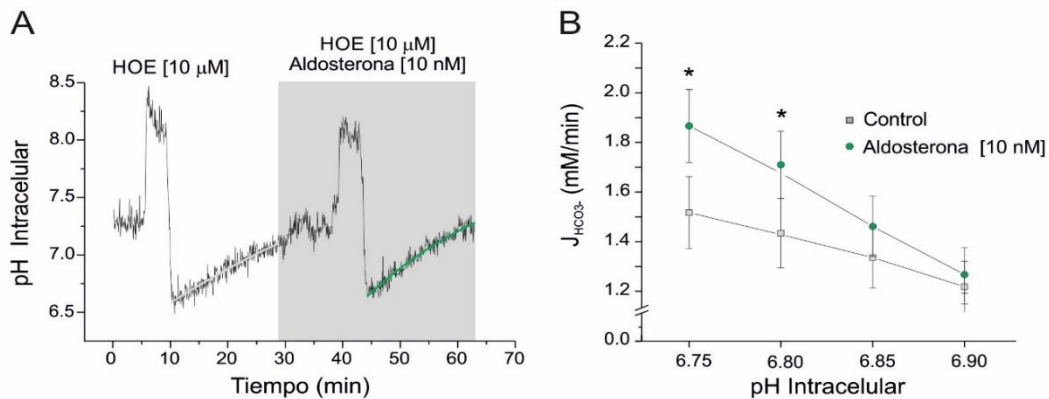


Fig. 3.2) Pulsos de amonio con Aldo. En el panel A observamos un registro representativo de pH en tiempo observándose 2 pulsos de amonio consecutivos en la misma célula en presencia de HOE durante todo el registro y el agregado de Aldo antes del 2^{do} pulso. En el panel B observamos el $J_{\text{HCO}_3^-}$ a pHs ácidos del 1^{er} y 2^{do} pulso. * indica $p < 0,05$ por prueba T apareada.

Al encontrar un aumento en la actividad del NBC con Aldo, comenzamos a dilucidar la vía de señalización por la cual ocurría este incremento de aproximadamente 30% en el $J_{\text{HCO}_3^-}$. Como observamos en la Fig. 3.3 panel medio, la activación del NBC no ocurre en presencia de Eple (1 μM), bloqueante del receptor de MR, indicando que la señalización parecería ser disparada por la unión de Aldo a este receptor (para mayor claridad en la Fig. 3.3 panel izquierdo, se repiten los valores de $J_{\text{HCO}_3^-}$ determinados a pH 6,8 de la Fig. 3.2). El MR es un receptor clásico de la hormona esteroidea que cuando se une al ligando transloca al núcleo donde regula la transcripción génica (el clásicamente conocido efecto genómico de la hormona). El efecto de Aldo sobre el NBC observado en la Fig. 3.2 es muy rápido como para representar un efecto genómico. Con el objetivo de confirmar esta idea, a continuación realizamos los

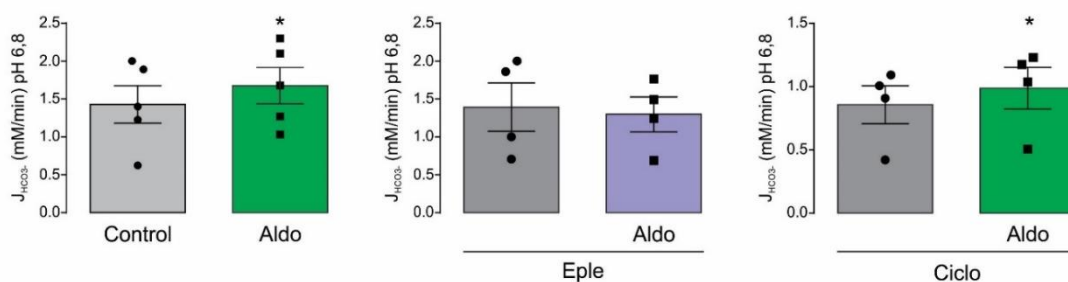


Fig. 3.3) Promedios de $J_{\text{HCO}_3^-}$ a pH 6,8 en el primer y segundo pulso luego del agregado de Aldo en el primer gráfico, y frente al uso previo de inhibidores Eple y Ciclo. * indica $p < 0,05$ por prueba T apareada.

experimentos en presencia del inhibidor de la síntesis proteica: Cicloheximida (Ciclo, 10 μ M). Como se puede observar en la Fig. 3.3 panel derecho, Ciclo no evitó el aumento de la actividad del NBC mediado por Aldo. Por lo tanto, podemos concluir que la vía pertenece a las vías rápidas o no genómicas de Aldo.

Receptores involucrados en los efectos rápidos de Aldo

Frente a estos resultados que demuestran efectos no genómicos de Aldo, nos preguntamos si podría estar participando un receptor distinto del MR. En células musculares lisas y células endoteliales se han descrito efectos rápidos de Aldo a través de la activación del receptor GPER (Gros, Ding et al. 2011). Por lo tanto, se trató a las células con G15 (1 μ M, antagonista específico de GPER). Para nuestra sorpresa, esta droga fue capaz de inhibir la activación del NBC inducida por Aldo (Fig. 3.4), lo cual reveló que GPER está involucrado en este efecto no genómico. Cabe destacar que los efectos de Eple observados en la Fig. 3.3 podrían deberse a una acción inespecífica de esta droga sobre el GPER, como ha sido previamente reportado para músculo liso vascular (Gros, Ding et al. 2011).

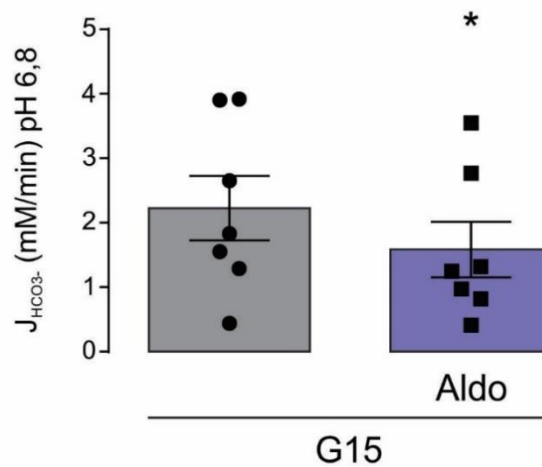


Fig. 3.4) Promedios de $J_{\text{HCO}_3^-}$ a pH 6,8 en el primer y segundo pulso luego del agregado de Aldo y el uso previo de G15. * indica $p < 0.05$ por prueba T apareada.

Para corroborar la participación de GPER en la estimulación del NBC, los cardiomiocitos fueron incubados con su agonista farmacológico específico G1 (1 μ M) por 10 minutos antes del inicio del segundo pulso de amonio, como se observa en la Fig. 3.5.

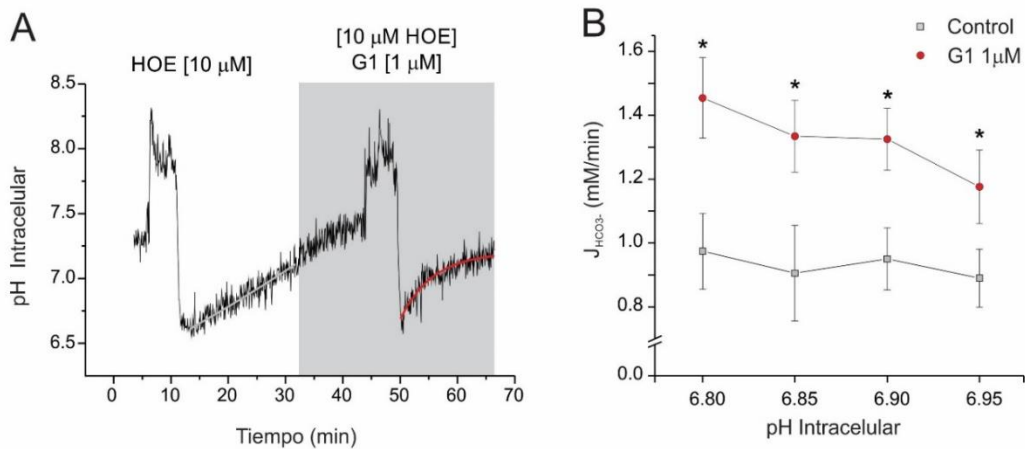


Fig. 3.5) Pulsos de amonio con G1. En el panel A observamos un registro representativo de pH en tiempo observándose 2 pulsos de amonio consecutivos en la misma célula en presencia de HOE durante todo el registro y el agregado de G1 antes del 2^{do} pulso. En el panel B observamos el $J_{\text{HCO}_3^-}$ a pHs ácidos del 1^{er} y 2^{do} pulso. * indica $p < 0,05$ por prueba T apareada.

En la Fig. 3.6 se observa el incremento significativo en el $J_{\text{HCO}_3^-}$ a pH 6,8 inducido por G1 (panel izquierdo), para poder comparar con G15 y Eple. El aumento del $J_{\text{HCO}_3^-}$ fue prevenido con G15, como era esperable para un efecto selectivo de G1 (Fig. 3.6, panel derecho). Sin embargo lo observado con Eple no era lo esperado.

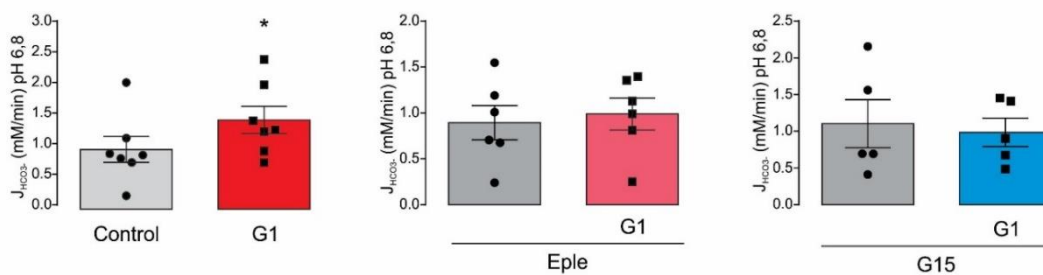


Fig. 3.6) Promedios de $J_{\text{HCO}_3^-}$ a pH 6,8 en el primer y segundo pulso luego del agregado de G1 en el primer gráfico, y frente al uso previo de inhibidores Eple y G15. * indica $p < 0,05$ por prueba T apareada.

Para corroborar que lo observado con Eple podría deberse a efectos inespecíficos de esta droga sobre el GPER (ver más arriba, Fig. 3.3), preincubamos con Eple y no observamos efectos significativos del G1 (Fig. 3.6 panel medio), indicando que podría haber efectos inespecíficos.

Una posibilidad para explicar los resultados con el bloqueante del MR podría ser que Eple actúe como agonista parcial de GPER y por lo tanto Aldo o G1 no demuestren efectos significativos sobre la función del NBC una vez que el receptor está ocupado por Eple. Vale la pena aclarar que este fenómeno fue sugerido por el grupo del Dr. Feldman pero nunca fue confirmado experimentalmente (Gros, Ding et al. 2011). Por lo tanto nosotros evaluamos la posibilidad de que Eple presente activación *per se* del NBC. La Fig. 3.7 demuestra este efecto, que además puede verse inhibido por G15, indicando la selectividad del mismo sobre GPER. De acuerdo a estos resultados, proponemos que Eple se comporta como agonista parcial del GPER, además de ser un antagonista del MR.

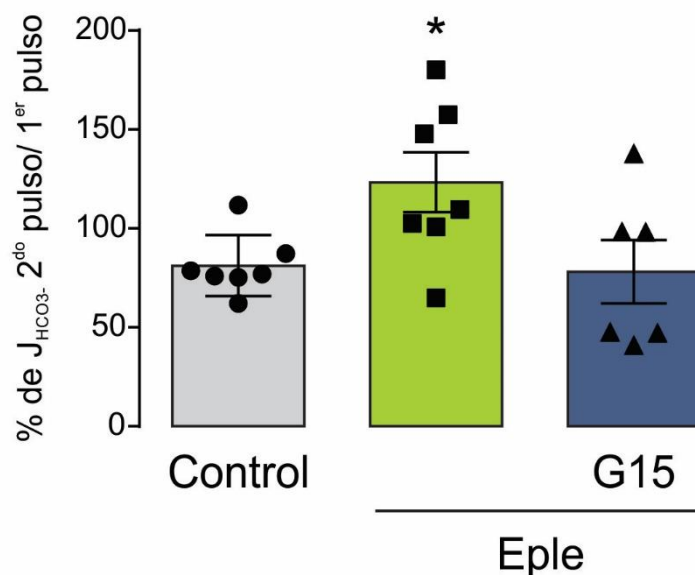


Fig. 3.7) Relación de $J_{\text{HCO}_3^-}$ a pH 6,8 en el primer y segundo pulso control, luego del agregado de eple y frente a la pre-incubación con G15. * indica $p < 0,05$ por ANOVA y comparación con el control por el test de Dunnet.

GPER como regulador de NBC en los efectos no genómicos de Aldo

Debido a que en las primeras publicaciones GPER fue descrito como un receptor acoplado a proteína $G_{\alpha s}$ que estimula la Adenilato Ciclasa de membrana (Thomas, Pang et al. 2005, Hsieh, Yu et al. 2007), se estudió el potencial rol de la proteína quinasa A (PKA) en la vía intracelular disparada por la activación de este receptor. Sin embargo, también se ha propuesto que puede trans-activar al EGFR vía subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G (Quinn, Graeber et al. 2009). Por lo tanto, utilizamos H89 (10 μM , inhibidor de PKA) para evitar la vía de señalización clásica dependiente de Gs y Wormanina (Wor, inhibidor de PI3K,

100nM) para evaluar la vía PI3K/AKT que es dependiente de la trans-activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) por $G\beta\gamma$ (Chien, Lin et al. 2015) La Fig. 3.8 muestra que G1 aumenta el influjo de HCO_3^- mediado por NBC a pesar de encontrarse H89 pero no lo logra cuando pre-incubamos con Wor. Por lo cual podemos decir que, en nuestras condiciones experimentales, GPER no señalizaría por Gs pero sí lo hace vía PI3K, probablemente vía $G\beta\gamma$.

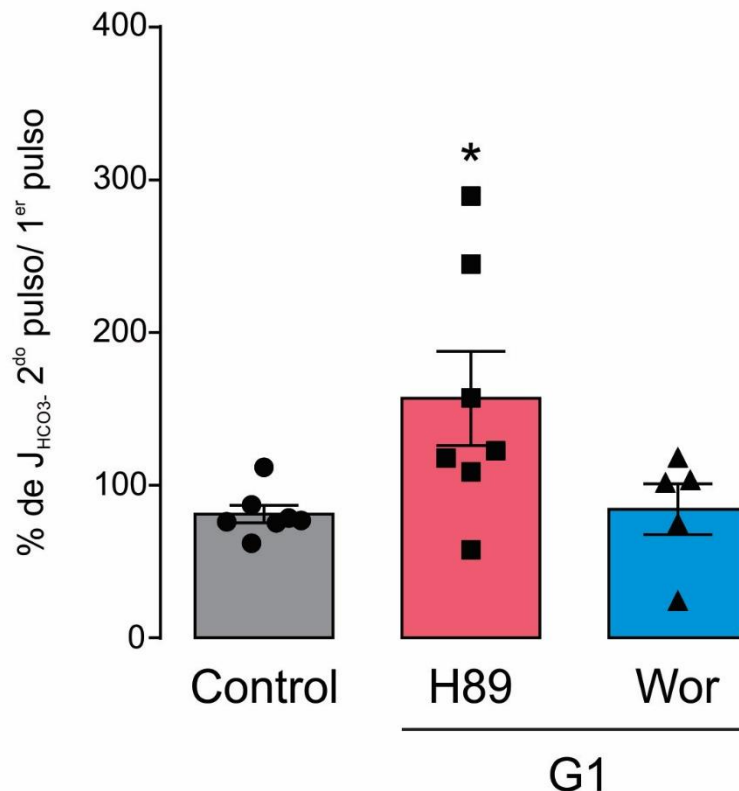


Fig. 3.8) Relación de $J_{HCO_3^-}$ a pH 6,8 en el primer y segundo pulso control, frente a la incubación con H89 o Wor en el primer pulso y el agregado de G1 para el 2º pulso. * indica $p < 0,05$ por ANOVA y comparación con el control por el test de Dunnet.

Para corroborar la vía utilizada por GPER, siendo que su señalización intracelular parecería ser mediante $G\beta\gamma$, evaluamos la posibilidad de que ocurra una trans-activación a EGFR, como fue sugerido previamente. Para ello, utilizamos el bloqueante del EGFR, AG1478 ($1 \mu M$) para evaluar la actividad del NBC frente al efecto de G1. La Fig. 3.9 muestra que no encontramos un incremento de actividad frente a la pre-incubación con AG1478 y el posterior agregado de G1, sugiriendo que la activación de GPER estaría trans-activando al EGFR. Adicionalmente, utilizamos EGF exógeno ($1 \mu M$) para estimular directamente a su receptor EGFR y se encontró así un aumento del $J_{HCO_3^-}$ como vemos a la derecha, en la Fig. 3.9.

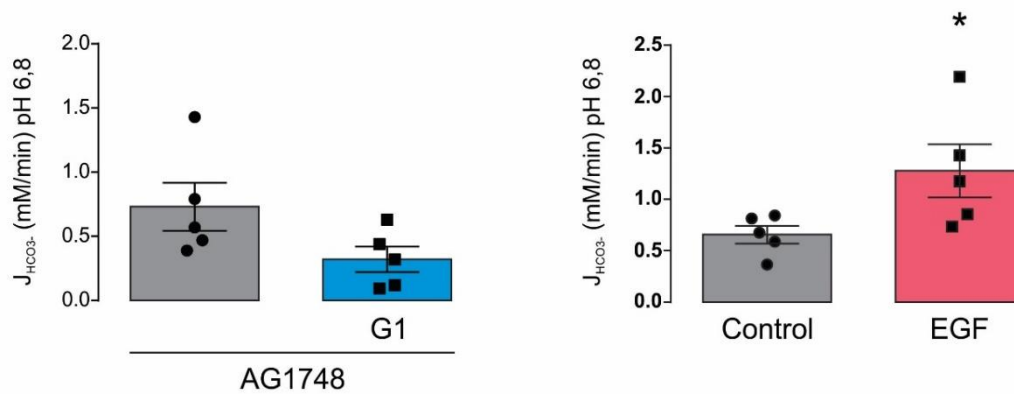


Fig. 3.9) Promedios de $J_{\text{HCO}_3^-}$ a pH 6,8 en el primer y segundo pulso luego del agregado de G1; pre-incubando con AG1748 y en el otro utilizando EGF ($1 \mu\text{M}$) en el segundo pulso. * indica $p < 0,05$ por prueba T apareada.

Con el objetivo de confirmar los experimentos anteriores, evaluamos el nivel de fosforilación de AKT en presencia de G1 (ya que esta quinasa, AKT, es activada por fosforilación a través de PI3K). Haciendo uso de la técnica de WB encontramos que AKT se fosforila luego de la activación del GPER por G1 (Fig. 3.10), e incluso esta fosforilación no se produce frente a la pre-incubación con el antagonista de GPER, G15 y tampoco frente a la pre-incubación con el bloqueante de la NOX, Apocinina (Apo).

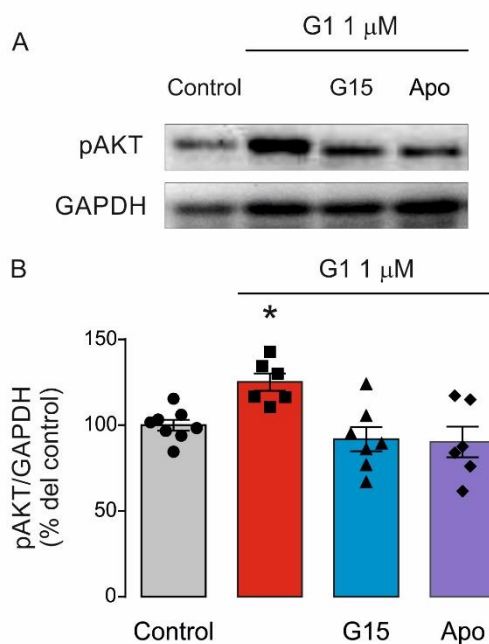


Fig. 3.10) En el panel A observamos WB representativos de p-AKT y su normalizador GAPDH en situaciones Control, el uso de G1 y la pre-incubación con G15 o Apo. En el panel B observamos los promedios de DO expresados como porcentajes del control. * indica $p < 0,05$ por ANOVA y comparación con el control por el test de Dunnet.

Como se ha descrito que EGFR puede señalizar también vía ERK, e incluso estaba descrito que Aldo señalizaba por esa vía (De Giusti, Nolly et al. 2011), procedimos a evaluar la fosforilación de ERK tanto con G1 como con Aldo. Mediante WB encontramos que ERK no sufre cambios en la fosforilación cuando se incubaba con G1 pero si lo hace luego de la incubación con Aldo y esa fosforilación es impedida por Eple, aunque G15 no logra inhibirla (Fig. 3.11). Estos resultados indican que GPER no señalizaría vía p-ERK en tejido cardíaco ventricular y Aldo es capaz de estimular la fosforilación de ERK vía MR.

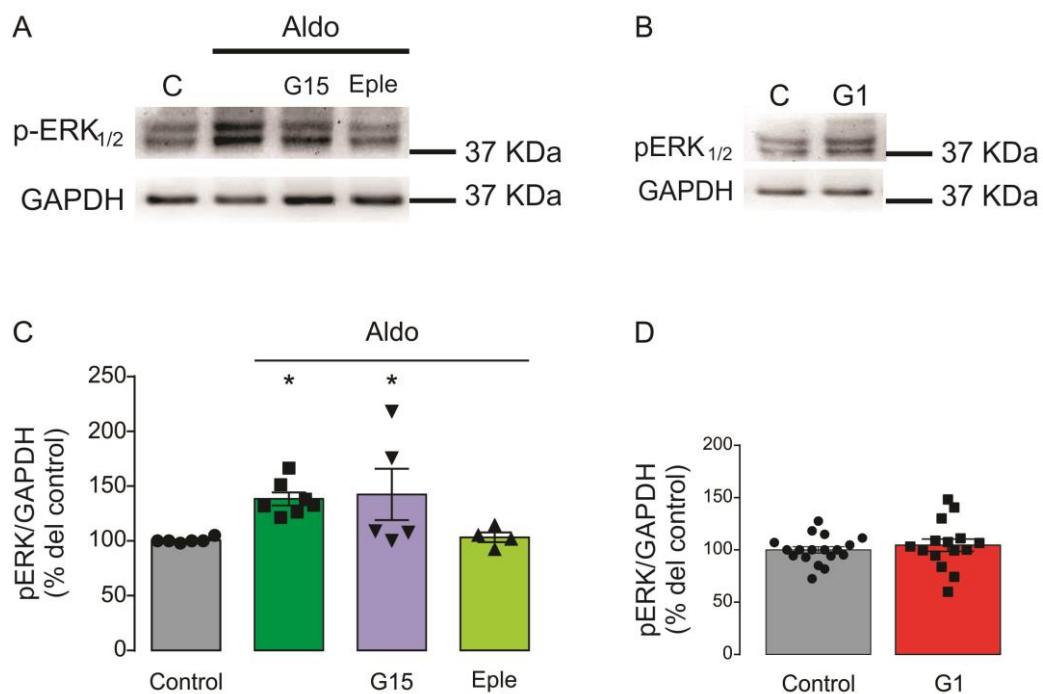


Fig. 3.11) En el panel A observamos WB representativos de p-ERK y su normalizador GAPDH en situaciones Control, incubado con Aldo, Aldo+Eple, Aldo+G15. En el panel B los representativos para Control y G1. En el panel C observamos los promedios de DO expresados como porcentajes del Control para los blots de Aldo y en el panel D los promedios de DO para el control y G1. * indica $p < 0,05$ por prueba T para el blot con G1 y por ANOVA con comparación con el control por el test de Dunnet para el blot con Aldo.

Participación de las especies reactivas del O_2 (ROS) en la estimulación de NBC

Por otro lado, las ROS han sido involucradas en diferentes vías de señalización intracelular estimuladas por agentes extracelulares como angiotensina II (AngII), endotelina, EGF y Aldo (Cingolani, Villa-Abrille et al. 2006, De Giusti, Nolly et al. 2011, He, Joiner et al. 2011). Para evaluar la implicancia de las ROS en la activación del NBC vía GPER por Aldo o G1, examinamos el efecto de 2-mercaptopropionil glicina (MPG, 2 mM, secuestrador general de ROS) o Apocinina (Apo, 300 μ M, inhibidor de la NADPH oxidasa, NOX) en la recuperación de pH_i mediada por NBC. Como se puede ver en la Fig. 3.12, los

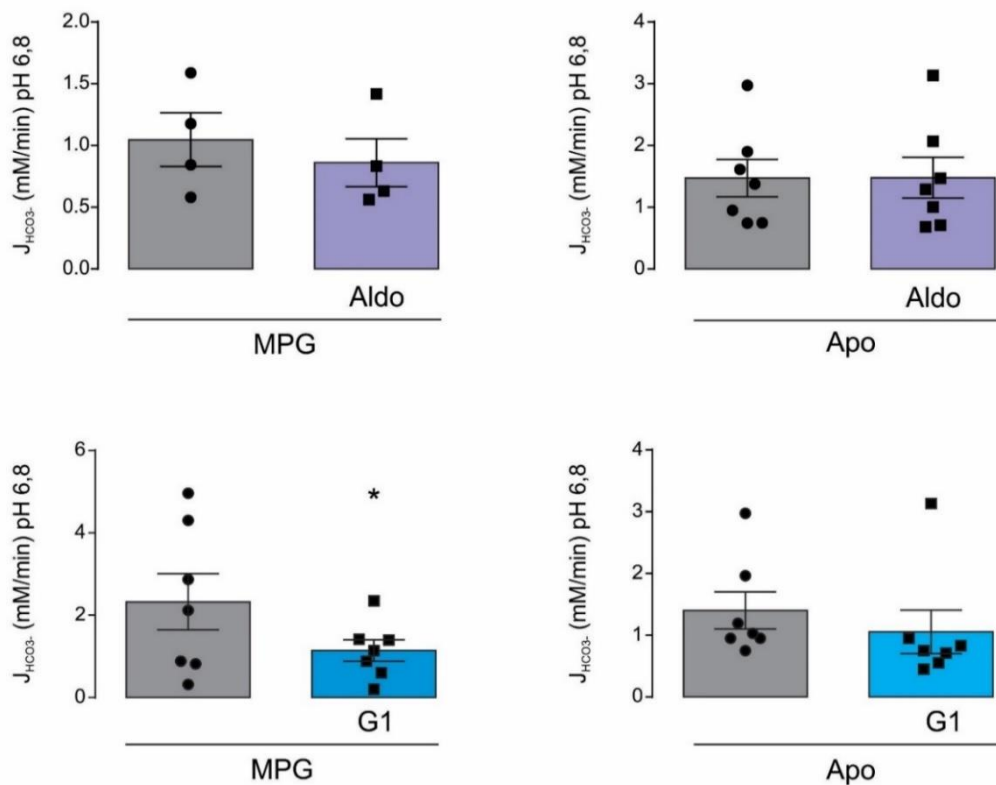


Fig. 3.12) Promedios de $J_{HCO_3^-}$ a pH 6,8 en el primer y segundo pulso luego del agregado de G1 o Aldo en el segundo pulso; pre-incubando con MPG o Apo según el caso. * indica $p < 0,05$ por prueba T apareada.

efectos de Aldo y G1 fueron prevenidos al pre-incubar los cardiomiocitos con MPG o Apo.

Para corroborar lo observado en los pulsos de amonio, se realizaron experimentos en el microscopio confocal (Zeiss LSM 400) utilizando el indicador

CM-H2DCF DA (Invitrogen) para determinar la producción de ROS en presencia de Aldo o G1 en cardiomiocitos (Fig. 3.13 A y 3.13 B). Además, se estimó la producción del anión O_2^- en porciones de tejido miocárdico mediante la técnica de lucigenina (Fig. 3.13 C). En ambos modelos se confirmó la participación de GPER en la producción de ROS inducida por Aldo o G1 ya que en ambos casos este efecto fue inhibido por G15. Además, la producción de O_2^- inducida por G1 fue bloqueada por AG1748 ($1 \mu M$) indicando que la producción de ROS sería un evento posterior a la trans-activación del EGFR. Este fenómeno además se produce corriente arriba de la activación de AKT, ya que no se observó

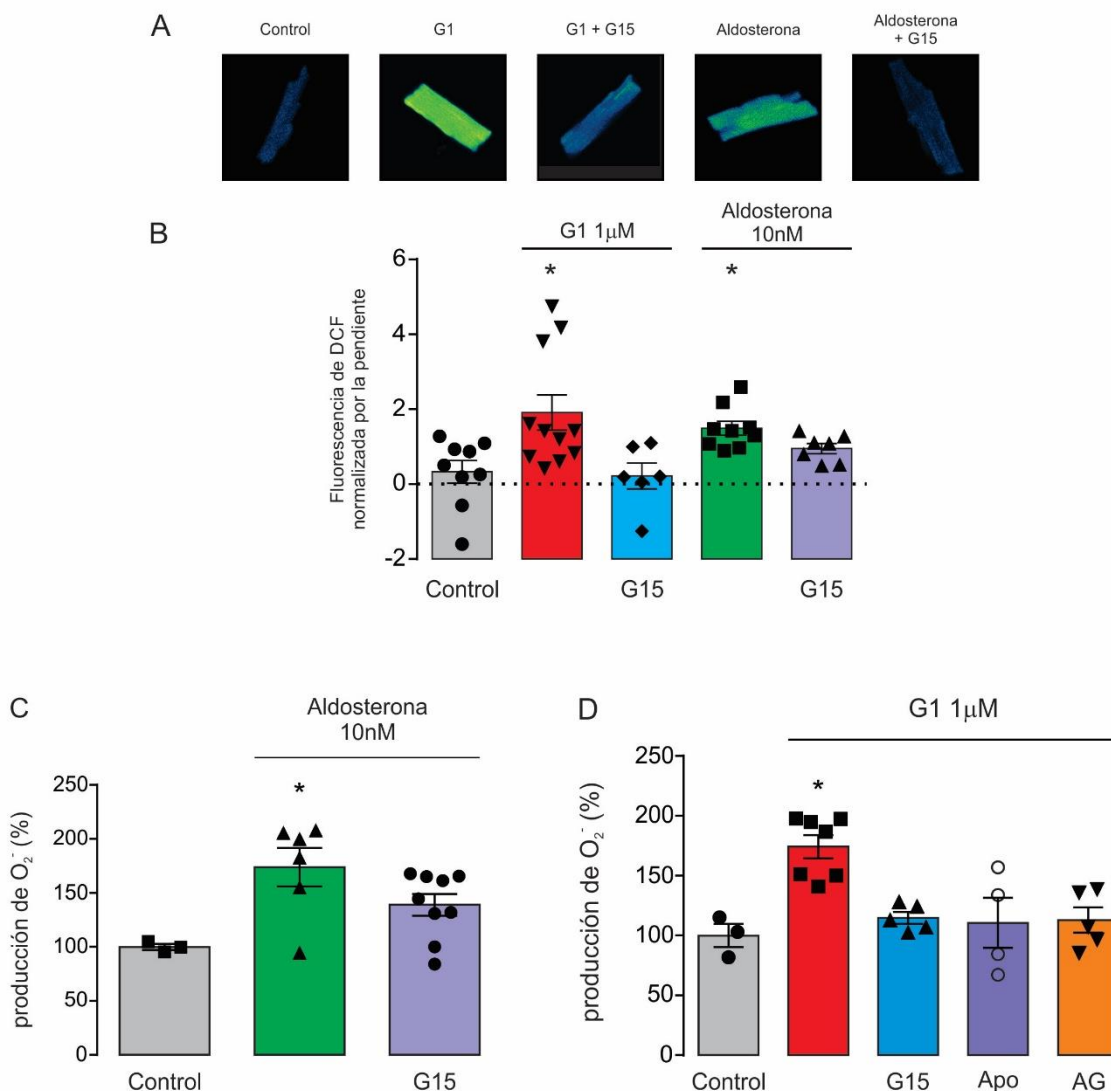


Fig. 3.13) En el panel A observamos fotos representativas de cardiomiocitos cargados con CM-H2DCF, en situación control, tratados con G1, G1+G15, Aldo y Aldo+G15. En el panel B se grafican los promedios de la pendiente de Fluorescencia del indicador sensible a ROS en los diferentes tratamientos mencionados en el panel A. En paneles C y D vemos los promedios de la producción de O_2^- en tejido miocárdico bajo diferentes tratamientos. En C: Control, Aldo y Aldo+G15 y en D: G1, G1+G15, G1+Apo y G1+AG. * indica $p < 0,05$ por ANOVA y comparación con el control por el test de Dunnet.

fosforilación de esta quinasa por G1 si se pre-incubaban las células con Apo (Fig. 3.10).

La isoforma electrogénica del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBCe1) es activada por GPER

Cabe recordar que existen al menos dos isoformas funcionales del NBC en el corazón: el NBCe1 (electrogénico; media el ingreso de 1Na^+ y 2HCO_3^-) y el NBCn1 (electroneutro; introduce 1Na^+ y 1HCO_3^-) (Aiello, Petroff et al. 1998, Villa-Abrille, Petroff et al. 2007). Para identificar la isoforma del NBC regulada por la activación del GPER se aisló la función del NBCe1, para lo cual se utilizó el protocolo de Despolarización por alto K^+ (Ver en Materiales y Métodos), que activa específicamente al NBCe1. Este protocolo genera una despolarización celular de aproximadamente 60 mV que estimula al NBCe1 y su actividad se evidencia a través de un aumento del pH_i que es completamente cancelado por un suero conteniendo un anticuerpo inhibitor específico del lazo (“loop”) extracelular 3 del NBCe1 (a-L3) que fue producido previamente en nuestro laboratorio (De Giusti, Orlowski et al. 2011). El suero Sham sin presencia del a-L3 se utilizó como control del efecto de este anticuerpo. Como se puede observar en los trazos representativos del panel A y los valores promedios de los paneles B y C de la Fig. 3.14, al agregar G1 o Aldo se encontró un incremento significativo

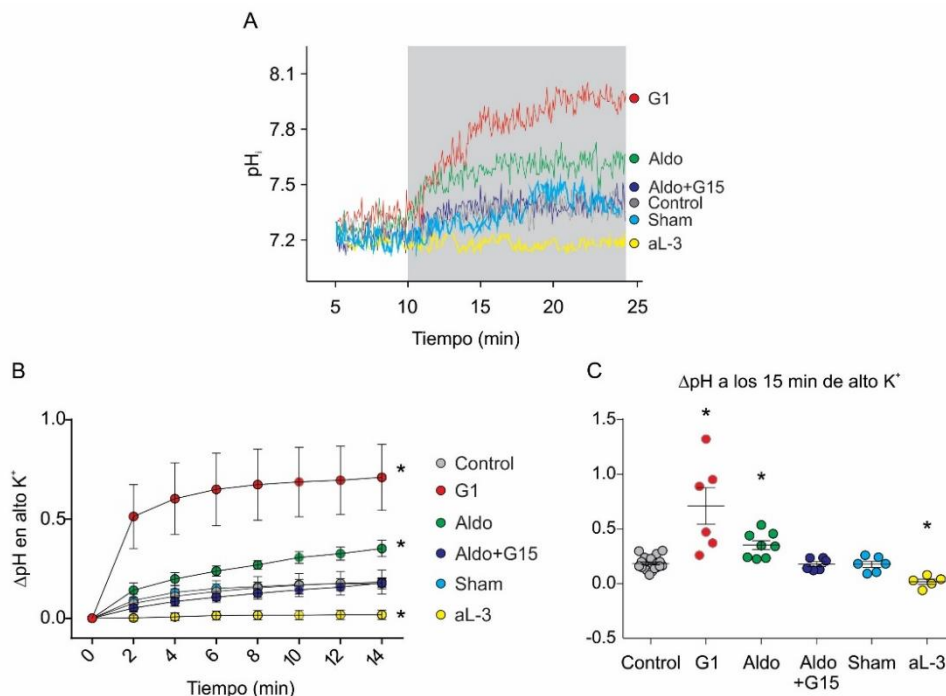


Fig. 3.14) Variación de pH_i frente al pulso de K^+ . En el panel A se pueden observar registros representativos del grupo control y los diferentes tratamientos utilizados: G1, Aldo, Aldo+G15, Sham y aL-3. En el panel B se ven los promedios y errores del grupo control y los grupos tratados con G1, Aldo, Aldo+G15, Sham y aL-3. En el panel C, para mayor claridad los valores de variación de pH_i tanto de los valores controles como los tratados con G1, Aldo, Aldo+G15, Sham y aL-3. * indica $p < 0,05$ por ANOVA y comparación con el control por el test de Dunnet.

en el pH_i con respecto al control. Se confirmó la participación del GPER en el efecto de Aldo sobre el NBCe1 ya que el mismo fue bloqueado por G15 (Fig. 3.14).

Para corroborar si el NBCe1 es la isoforma modulada por GPER, se realizaron dobles pulsos de amonio en una solución con buffer HCO_3^-/CO_2 (con $10 \mu M$ de HOE) en presencia de a-L3. Como se puede ver en la Fig. 3.15, el incremento del $J_{HCO_3^-}$ generado por Aldo se evita por la pre-incubación con a-L3, confirmando que sólo el NBCe1 sería la activado por GPER.

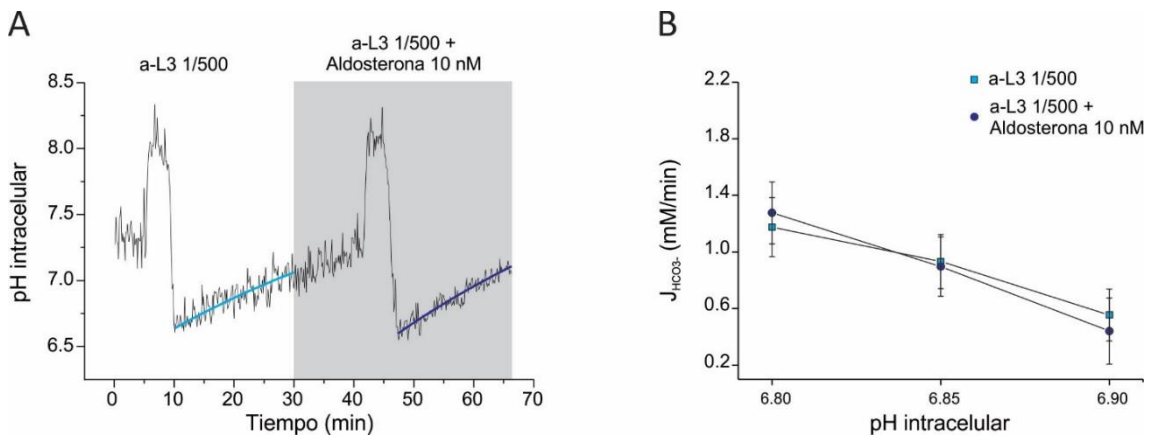


Fig. 3.15) Doble pulso de amonio en buffer HCO_3^-/CO_2 con Aldo en el 2^{do}. A) Registro representativo de Doble pulso de amonio en buffer HCO_3^-/CO_2 con aL-3 en el primer pulso y Aldo en el 2^{do}. B) Promedios de los $J_{HCO_3^-}$ de las recuperaciones de 1^{er} y 2^{do} a pH_i intracelulares ácidos.

Localización en el cardiomiocito de NBCe1 y GPER

Al encontrar esta asociación funcional entre GPER y NBCe1, se evaluó la posibilidad de que ambas proteínas se encuentren localizadas próximas, favoreciendo la integración de la señalización de manera eficiente. Por lo tanto, se evaluó la localización de NBCe1 y GPER mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Los cardiomiocitos aislados fueron fijados y permeabilizados y posteriormente se incubaron con anticuerpos primarios para NBCe1 (Millipore) o para GPER (Abcam). Luego fueron incubados con el anticuerpo secundario correspondiente que presenta un grupo Alexa Fluor 488 y observados mediante imágenes obtenidas por microscopía confocal. La tinción inmunológica *in situ* de ambas proteínas demostró un fuerte patrón transversal estriado (Fig. 3.16, panel A). Al determinar la intensidad de fluorescencia por un escaneo longitudinal y graficarla en función de la longitud se encontraron patrones oscilatorios en fase para NBCe1 y GPER, con una periodicidad promedio de aproximadamente $1,7 \mu m$ (Fig. 3.16, panel C) que coincide con la distancia entre dos líneas Z, representando un sarcómero limitado por dos túbulos-T. Estos resultados sugieren una posible co-localización del NBCe1 y GPER en los túbulos-T. La Fig. 3.16, panel D muestra la especificidad de los

anticuerpos contra NBCe1 y GPER por Westerns Blots de homogenatos de cardiomiocitos de rata. Se pueden ver las bandas correspondientes a NBCe1 (PM \approx 130 kDa) y a GPER (PM \approx 42 kDa).

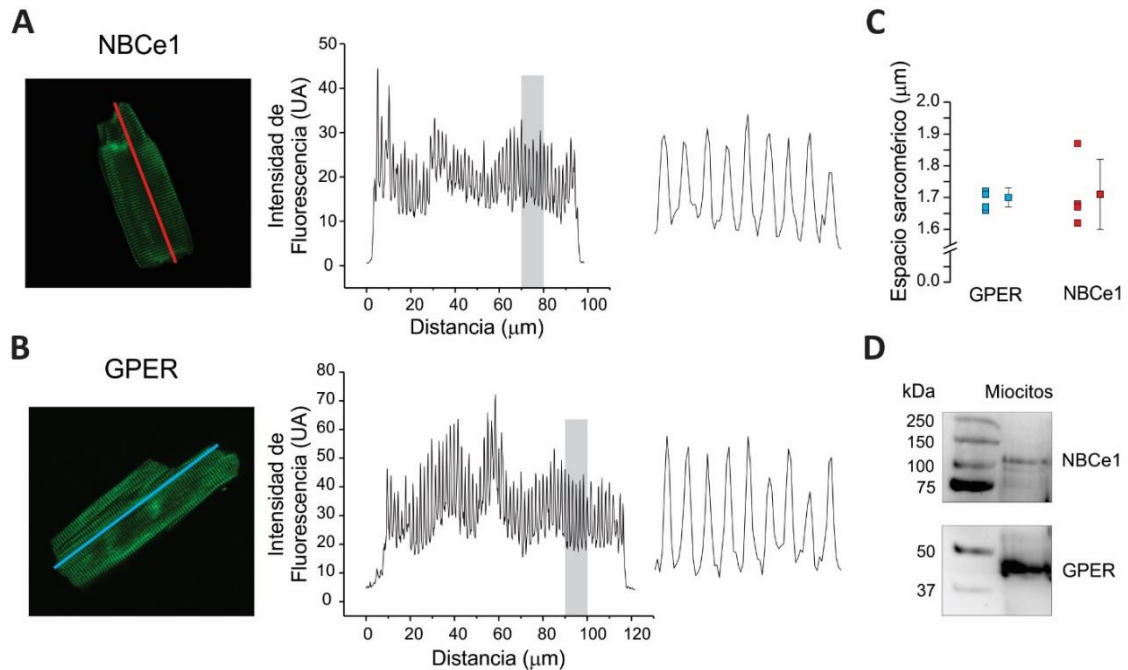


Fig. 3.16) Los paneles A y B muestran fotos representativas de la inmunotinción contra NBCe1 y GPER respectivamente. Al medio se observa la variación de la intensidad de fluorescencia a lo largo de un escaneo confocal y longitudinal del miocito, destacando en gris los picos amplificadas a la derecha del panel. C) Distancia promedio de los picos de fluorescencia obtenidos por las fotos de microscopia confocal. D) Westerns Blots de NBCe1 y GPER a los PMs esperados.

Transportadores alcalinizantes: Intercambiador Na^+/H^+ (NHE-1)

Nuestro grupo de trabajo había demostrado previamente que Aldo activa al NHE-1 a través de un mecanismo no genómico mediado por el MR (De Giusti, Orłowski et al. 2015). Dado que en la presente tesis se presentan efectos *no genómicos* mediados por Aldo a través del GPER, se evaluó la posibilidad que los efectos sobre el NHE-1 también sean debidos a la activación de este receptor. Por lo tanto, se realizaron experimentos en solución HBS (sin HCO_3^-) para evaluar la participación del GPER sobre la actividad del NHE-1. Como puede observarse en la Fig. 3.17, G1 no modificó la actividad de NHE-1 y G15 fue incapaz de prevenir la estimulación del intercambiador por Aldo, a pesar de que Eple si lo evitó. Estos resultados, junto a los observados previamente (Fig. 3.11 donde se observa fosforilación de ERK por Aldo y no por G1), nos permiten descartar posibles efectos inespecíficos de G1 y G15, como así también proponer dos vías paralelas iniciadas por Aldo, una que involucra la activación de NHE-1 por MR y otra que implica la activación del NBCe1 mediada por GPER.

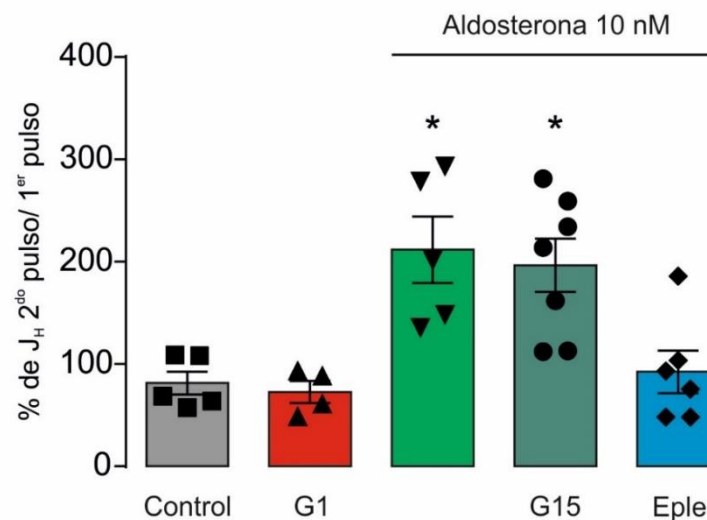


Fig. 3.17) Observamos los promedios de los ΔJ_H del 1^{er} pulso control y el 2^{do} pulso tratado con G1 o Aldo y el agregado de G15 y Eple en solución HBS. * indica $p < 0,05$ respecto al control por ANOVA y comparación con el control por el test de Dunnet.

En resumen, los resultados obtenidos sugieren una activación del transportador NBCe1 por Aldosterona a través del GPER en el cardiomiocito vía PI3K/AKT. Podemos concluir que Aldo activa a GPER en tejido cardíaco, el cual transactiva al EGFR y éste activaría la NOX, así la producción de O_2^- incrementa la cantidad de H_2O_2 intracelular. Estos ROS producidos podrían estimular al EGFR en retroalimentación positiva (Paulsen, Truong et al. 2011) favoreciendo así la estimulación PI3K que lleva a la fosforilación de AKT y conduce a la activación del transporte alcalinizante de NBCe1.

Rol del GPER en la contractilidad cardíaca y el manejo de Ca⁺⁺

Al encontrar al GPER ubicado en los túbulos-T del cardiomiocito y observarse bibliografía que describe potenciales implicancias del receptor en movimientos de Ca⁺⁺ en diversos tipos celulares evaluamos la posibilidad de estudiar la participación de este receptor en la regulación del manejo del Ca⁺⁺ intracelular y la contractilidad cardíaca.

Función contráctil

Se evaluó la contractilidad como el porcentaje de cambio del acortamiento en el tiempo y se obtuvieron los valores de acortamiento de los sarcómeros o del largo celular en el sistema de microscopía Ion Optix.

Se estudió la respuesta contráctil de los cardiomiocitos al agonista G1 y el bloqueo del efecto del agonista por el antagonista G36 para corroborar la acción del receptor en buffer HCO₃⁻/CO₂. La activación selectiva del GPER disminuyó la contractilidad cardíaca (efecto inotrópico negativo) ya que se encontró una disminución significativa del porcentaje de acortamiento de cardiomiocitos aislados sólo en presencia de G1, como se observa en la Fig. 3.18. Cabe destacar que se prosiguió a utilizar el G36 en lugar de G15 porque se discontinuó la comercialización de este último. De todos modos, el antagonista G36 mostró una mayor selectividad por el GPER (Dennis, Field et al. 2011).

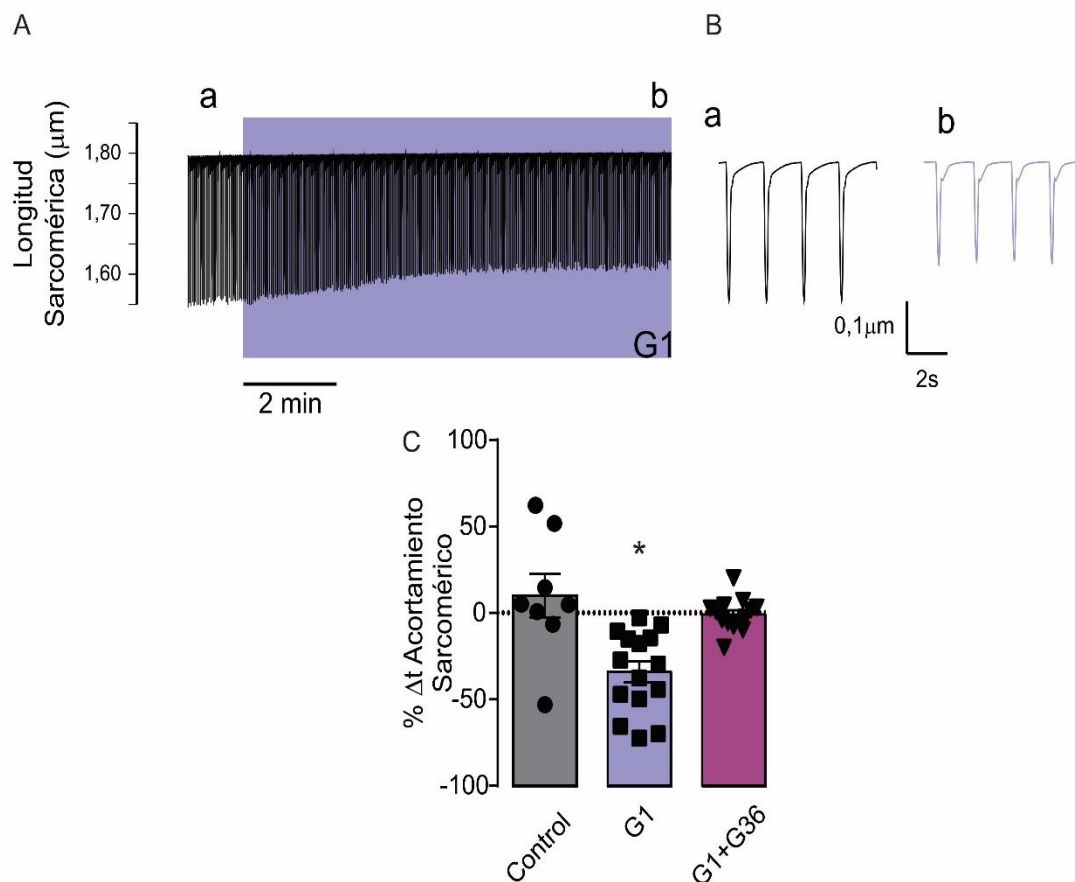


Fig. 3.18) En el panel A se observa un registro representativo de contractilidad cardíaca y la respuesta al agregado de G1, en el B se amplían las zonas *a* y *b* del registro para mejor visualización. En panel C, se observa el gráfico de barras con los promedios del porcentaje de cambio en la contractilidad en condiciones Control, frente al agregado de G1 y el agregado de G1 con la pre-incubación con G36. El porcentaje de cambio se calculó en la misma célula como el acortamiento a los 15 minutos luego de la aplicación de la droga en relación al tiempo 0. En ausencia de droga (Control) se estableció la relación del acortamiento entre los tiempos 0 y 15 minutos. * indica $p < 0,05$ por ANOVA y comparación con el Control por el test de Dunnett.

Debido a que en la sección anterior determinamos que el G1 activa al NBCe1, nos preguntamos si este efecto podría estar implicado en la disminución de la contractilidad producida por el agonista del GPER. La activación del NBCe1 podría estar incrementando el pH_i basal, afectando de este modo la contractilidad. Sin embargo, este efecto se debería asociar a un aumento de la contractilidad y no a una reducción de la misma, ya que la alcalinización aumenta la sensibilidad al Ca^{++} de las proteínas contráctiles (Shahid and Rodger 1989). En contraste, la activación del NBCe1 (por ser electrogénico) genera una corriente aniónica y debería acortar el potencial de acción, reduciendo el tiempo durante el cual se encuentran abiertos los Ca_L . En este caso, la acción del G1 sobre el NBCe1 sí podría explicar una disminución en la contractilidad. Por lo tanto, con el objetivo de evaluar la potencial participación del NBCe1 en el efecto inotrópico negativo del G1, se procedió a estudiar la contractilidad basal de los

miocitos en ausencia de HCO_3^- extracelular (solución HBS) para descartar la participación de este mecanismo. La Fig. 3.19 muestra que en condiciones donde el NBCe1 no es funcional, G1 reduce la contractilidad en una magnitud similar a la observada en los experimentos realizados en presencia de HCO_3^- (Fig. 3.18, alrededor de un 30% comparada con su control). Estos experimentos descartan la participación del NBCe1 en la disminución de la contractilidad inducida por G1.

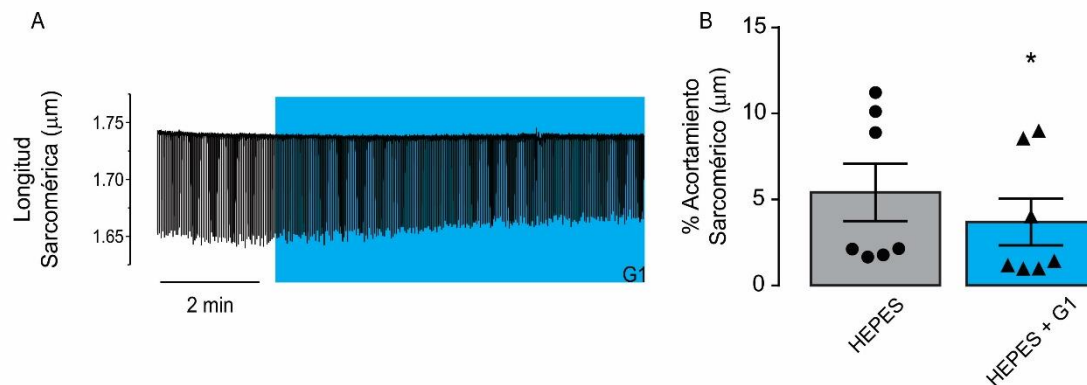


Fig. 3.19) En el panel A se observa un registro representativo de contractilidad cardíaca y la respuesta al agregado de G1, en el B se observa el gráfico de barras se observan los cambios del porcentaje de cambio en la contractilidad. * indica $p < 0,05$ respecto al control, por prueba T apareada.

Participación de Aldo en la contractilidad cardíaca

A pesar de encontrar implicancias en la transducción de señales del receptor GPER sobre la contractilidad, no hemos podido reproducir esos resultados con Aldo en buffer $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ en nuestras condiciones experimentales (Fig. 3.20). Sin embargo, al estudiar la posible participación del GPER utilizando el inhibidor G36 encontramos un leve inotropismo positivo en presencia de Aldo, como se observa en la Fig. 3.20. Estos resultados nos permitirían inferir que MR y GPER presentan efectos inotrópicos opuestos, es decir el MR generaría un efecto inotrópico positivo que es compensado por GPER, por lo cual no observamos diferencias al utilizar Aldo que activaría a los 2 receptores.

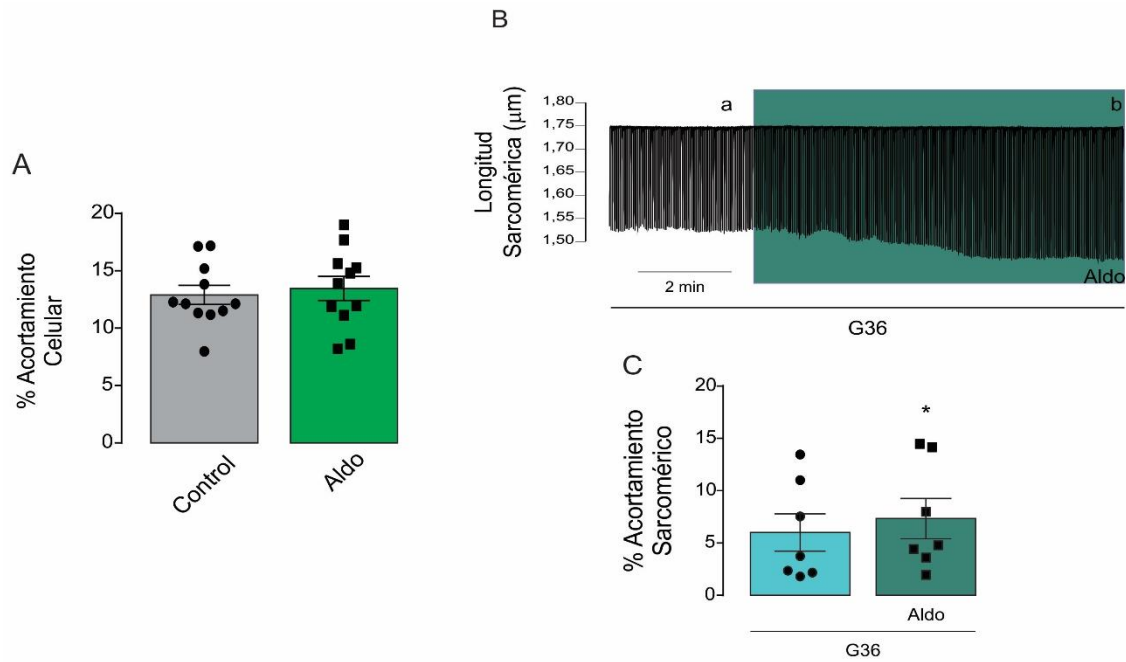


Fig. 3.20) En el panel A se observan los promedios del porcentaje de acortamiento en situaciones control y después del agregado de Aldo. El panel B muestra un registro representativo de contractilidad cardíaca y la respuesta al agregado de Aldo con la preincubación en G36. En el panel C, se observan los promedios de acortamiento incubados con G36 y después del agregado de Aldo. * indica $p < 0,05$ por prueba T apareada.

Participación de Estradiol en la contractilidad cardíaca

Otro agonista ampliamente conocido del GPER es el Estradiol (E2). Por lo cual se evaluó la respuesta contráctil de los cardiomiocitos al E2 y al bloqueo del efecto por G36. La activación del GPER provocó un efecto inotrópico negativo ya que se encontró una disminución significativa del porcentaje de acortamiento de cardiomiocitos aislados cuando se los mantuvo en presencia de E2, como se observa en la Fig. 3.21. Este efecto fue cancelado por el uso de G36, confirmando la participación de GPER en este mecanismo.

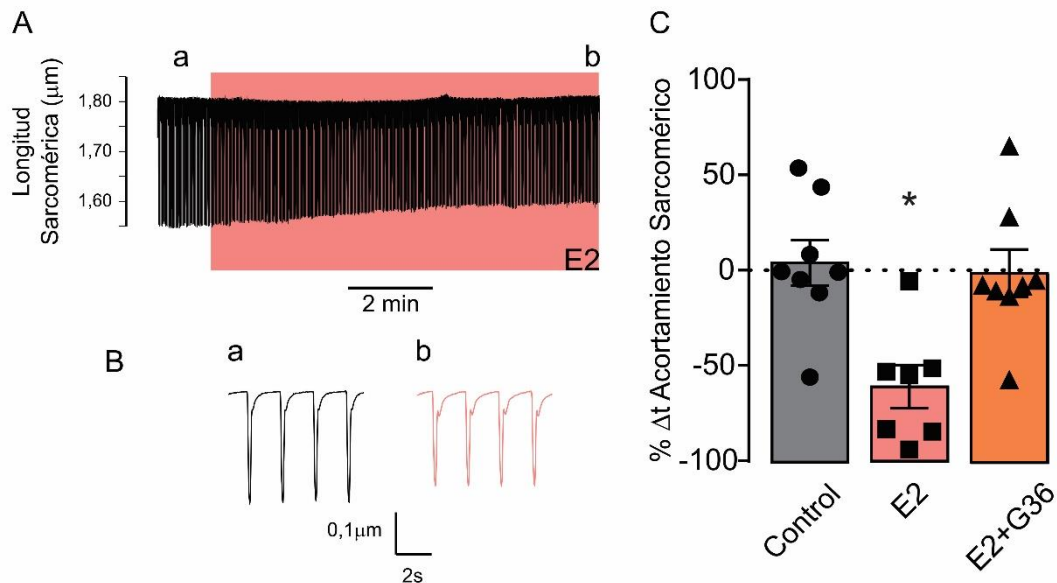


Fig. 3.21) En el panel A se observa un registro representativo de contractilidad cardíaca y la respuesta al agregado de E2, en el B se amplían las zonas *a* y *b* del registro para mejor visualización. En panel C, se observa el gráfico de barras que muestran los promedios del porcentaje de cambio en la contractilidad en la zona *b* respecto de la *a*. En el panel C, el gráfico de barras muestra los promedios del porcentaje de cambio en la contractilidad en condiciones Control, frente al agregado de E2 y el agregado de E2 con la pre-incubación con G36. El porcentaje de cambio se calculó en la misma célula como el acortamiento a los 15 minutos luego de la aplicación de la droga en relación al tiempo 0. En ausencia de droga (Control) se estableció la relación del acortamiento entre los tiempos 0 y 15 minutos. * indica $p < 0,05$ por ANOVA y comparación con el Control por el test de Dunnett.

Amplitud del transitorio de Ca^{++}

A la vista de estos resultados, podemos decir que el receptor GPER está involucrado en la regulación de la contractilidad cardíaca. Por lo tanto, para dilucidar la manera ante la cual ocurre este efecto inotrópico negativo se procedió a evaluar el manejo de Ca^{++} por los cardiomiocitos con el indicador fluorescente Fura 2. Consistentemente, se obtuvo una disminución significativa en la amplitud de los transitorios de Ca^{++} en buffer HCO_3/CO_2 luego de 15 minutos de tratamiento, tanto con G1 ($n=11$ células) como con E2 ($n=9$ células) que se evitó al pre-incubar a los cardiomiocitos con G36 (Fig. 3.22).

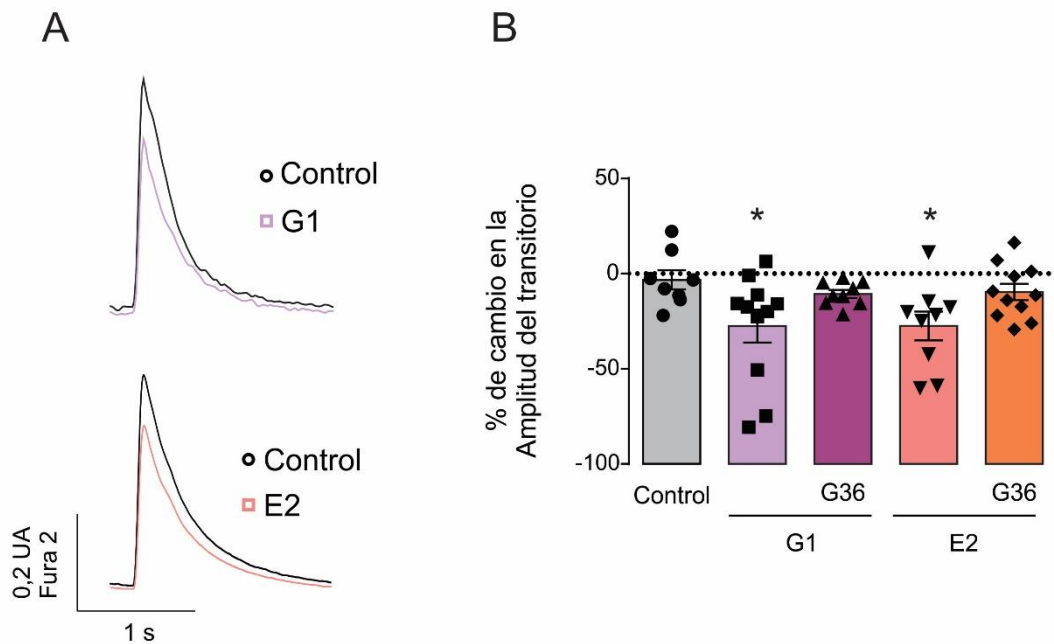


Fig. 3.22) En el panel A observamos transitorios de Ca^{++} representativos controles y frente al agregado de G1 o E2. En el panel B, el gráfico de barras muestra los promedios del porcentaje de cambio en la amplitud del transitorio en condiciones Control, frente al agregado de E2, G1 y el agregado de E2 o G1 con la pre-incubación con G36. El porcentaje de cambio se calculó en la misma célula como el acortamiento a los 15 minutos luego de la aplicación de la droga en relación al tiempo 0. En ausencia de droga (Control) se estableció la relación del acortamiento entre los tiempos 0 y 15 minutos. * indica $p < 0,05$ por ANOVA y comparación con el Control por el test de Dunnet.

Carga de Ca^{++} en el Retículo Sarcoplasmático

Al haber encontrado participación del GPER en el manejo del Ca^{++} , realizamos experimentos para dilucidar el mecanismo por el cual ocurre esta disminución en el transitorio de Ca^{++} . Por un lado, podría ocurrir que los reservorios de Ca^{++} estén disminuidos en su contenido. Por ello, se ha estimado la carga de Ca^{++} del RS mediante la aplicación de un pulso de cafeína (15 mM) que genera la salida de todo el Ca^{++} de los depósitos intracelulares. No se han encontrado diferencias significativas entre la carga de Ca^{++} entre los cardiomiocitos controles y aquellos incubados con G1 (Fig. 3.23). Estos resultados nos permiten sugerir que el contenido de Ca^{++} de los depósitos intracelulares no se modifica por la activación del GPER, llevándonos a buscar otra causa para la disminución del transitorio de Ca^{++} observado.

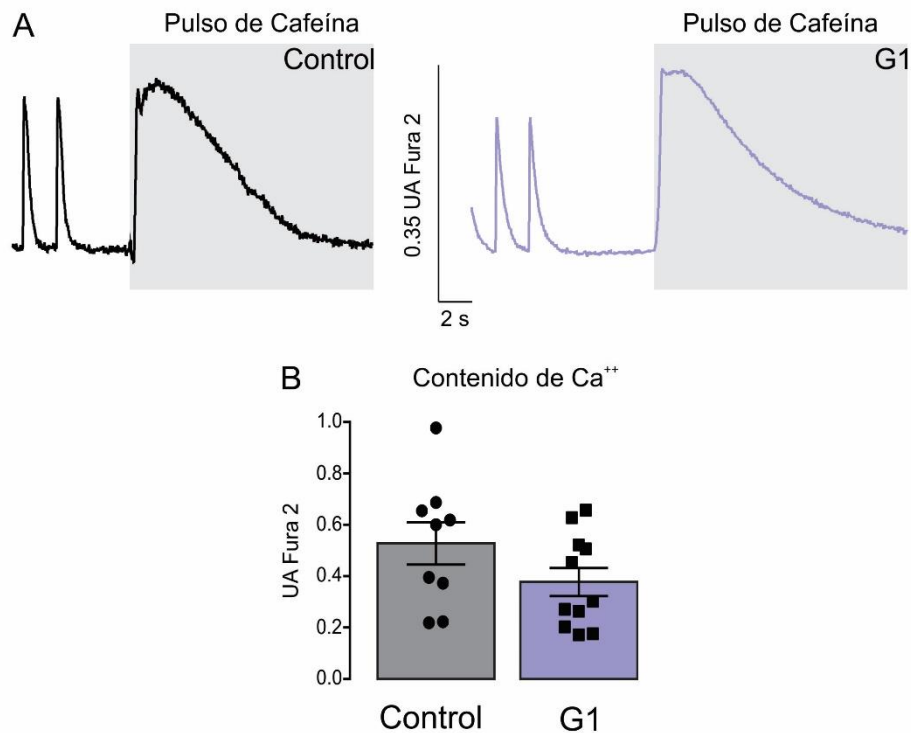


Fig. 3.23) En el panel A se observan pulsos de cafeína representativos para cardiomiocitos control o tratados con G1. En el panel B se observan los promedios de amplitud de los pulsos de cafeína, indicativos del Contenido de Ca⁺⁺ del RS.

Corriente de Ca⁺⁺ a través del canal Ca_L

Otro participante importante en el acoplamiento excito-contráctil es el canal de Ca⁺⁺ tipo L voltaje-operado, que es el encargado de permitir el influjo de Ca⁺⁺ que induce la liberación de Ca⁺⁺ del RS (LCIC). Por lo tanto, se estudió la corriente de Ca⁺⁺ en miocitos ventriculares como posible mediadora de la disminución del transitorio de Ca⁺⁺.

Mediante la técnica de Patch-Clamp en su configuración Whole Cell, se obtuvo la determinación de la corriente de Ca⁺⁺. Se encontró una disminución significativa en la corriente pico generada por los Ca_L tanto con G1 (Fig. 3.24) como con E2 (Fig. 3.26). La pre-incubación con G36 no permitió ningún efecto de los agonistas sobre la I_{Ca} (Fig. 3.25 y Fig. 3.27) confirmando así que el Ca_L sería el responsable de los efectos encontrados en el inotropismo.

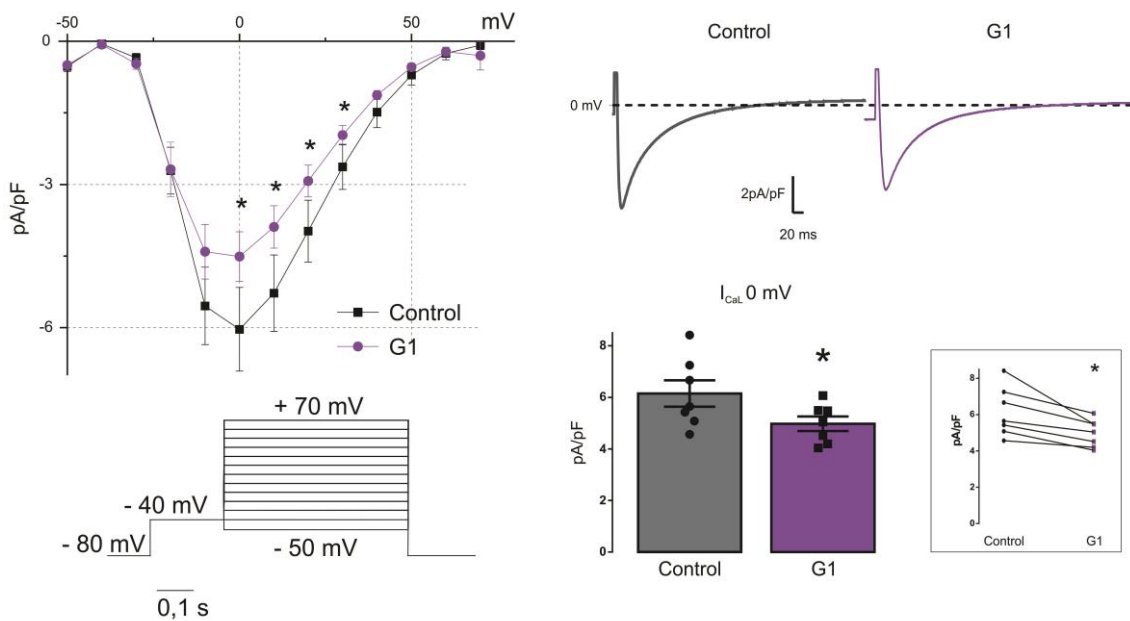


Fig. 3.24) En el panel A se observan las curvas IV promedio del pico de corriente de Ca²⁺ en situaciones Control y luego del agregado de G1, abajo se esquematiza el protocolo implementado. En el panel B se observan trazos representativos de la corriente de Ca²⁺ a 0 mV. En el panel C se ven los promedios de corriente a 0 mV, y en el cuadro a la derecha del mismo panel se observan los mismos datos que en el gráfico de barras apareados por célula correspondiente antes y después de G1. * indica $p < 0,05$ vs control, por prueba T apareada.

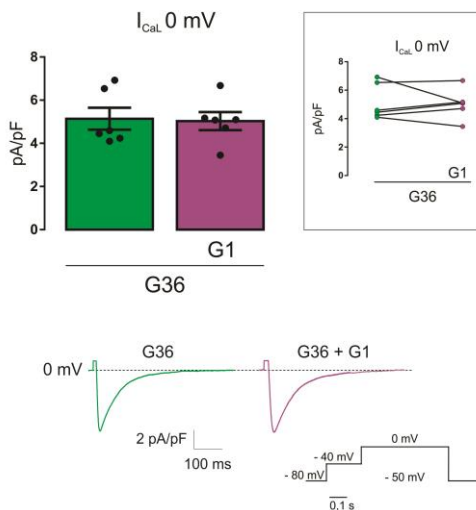


Fig. 3.25) Se observan los promedios de la corriente pico de Ca²⁺ a 0 mV pre-incubado con G36 y el posterior agregado de G1, a la derecha en el cuadro se observan los mismos datos que en el gráfico de barras apareados por célula correspondiente. Abajo se observan registros representativos a 0 mV de la corriente pico de Ca²⁺ a 0 mV pre-incubado con G36 y el posterior agregado de G1 con el protocolo de clampeo de voltaje utilizado.

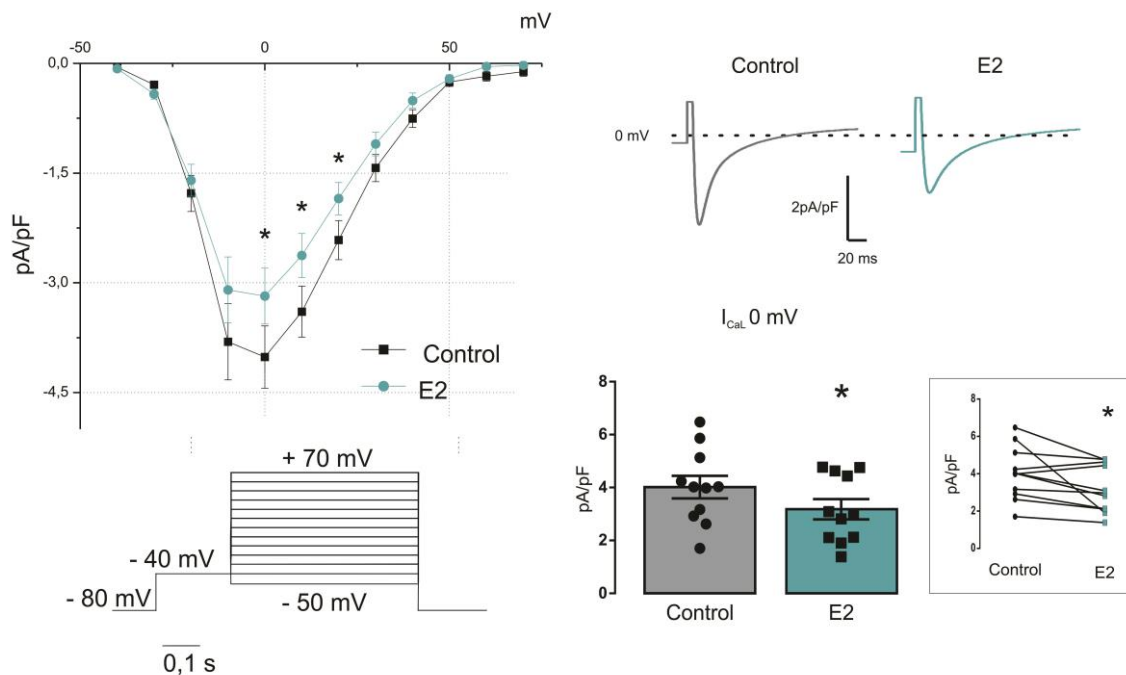


Fig. 3.26) En el panel A se observan las curvas IV promedio del pico de corriente de Ca^{++} en situaciones Control y luego del agregado de E2, abajo se esquematiza el protocolo implementado. En el panel B se observan trazos representativos de la corriente de Ca^{++} a 0 mV. En el panel C se ven los promedios de la corriente pico de Ca^{++} a 0 mV pre-incubado con G36 y el posterior agregado de E2, y en el cuadro, a la derecha del mismo panel se observan los mismos datos que en el gráfico de barras apareados por célula correspondiente antes y después de E2. . * indica $p < 0,05$ vs control por prueba T apareada

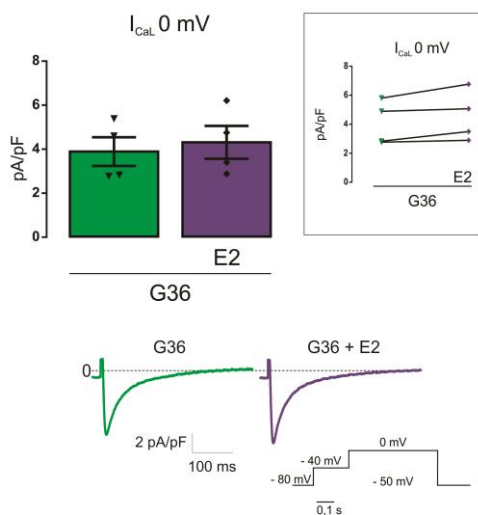


Fig. 3.27) Se observan los promedios de la corriente pico de Ca^{++} a 0 mV pre-incubado con G36 y el posterior agregado de E2, a la derecha se observan los mismos datos en el cuadro se observan los mismos datos que en el gráfico de barras apareados por célula correspondiente. Abajo se observan registros representativos a 0 mV de la corriente pico de Ca^{++} a 0 mV pre-incubado con G36 y el posterior agregado de E2 con el protocolo de clampeo de voltaje utilizado.

En resumen, los resultados obtenidos sugieren una inhibición del pico de corriente del Ca_L por E2 o G1 a través del GPER en el cardiomiocito que llevaría a una menor contractilidad cardíaca sin cambios en la carga de calcio del retículo sarcoplasmático. Será interesante estudiar la vía de señalización intracelular que produce este efecto en experimentos futuros.

4-Discusión

El receptor GPER ha sido identificado como el principal mediador de los efectos rápidos de los estrógenos en diversas líneas celulares, lo cual se ha evidenciado por la fosforilación de ERK 1/2 (Filardo, Quinn et al. 2000). Se ha descrito que ésta respuesta estaría mediada por proteína G $\beta\gamma$ y posterior trans-activación de EGFR. En 2005, dos grupos Revenkar et al y Thomas et al encontraron que GPER une a E2 y en respuesta a ello inicia vías de señalización intracelulares como la ampliamente conocida PI3K/AKT. Debido a la participación de esta vía en fenómenos tanto fisiológicos como patológicos este nuevo receptor cobró gran relevancia en diferentes organismos y tejidos (Zhang, Subramanian et al. 2010, Sharma and Prossnitz 2011, Murata, Dietrich et al. 2013). Últimamente se han desarrollado una amplia cantidad de trabajos utilizando a G1, G15 o G36 y E2. Y actualmente se ha establecido al GPER como un receptor a nivel de membrana de E2.

Por otro lado, se ha visto que Aldo, también presentaría efectos no genómicos además de los genómicos a nivel cardíaco (Chai, Garrelds et al. 2005, Ashton, Le et al. 2015). MR, es un receptor citoplasmático que según algunos trabajos se encontraría ubicado próximo a la membrana plasmática y podría co-localizar con el EGFR, siendo así responsable de las respuestas rápidas disparadas por Aldo (Grossmann and Gekle 2009, Krug, Pojoga et al. 2011). Sin embargo, existe evidencia acerca de algunos efectos no genómicos de Aldo que no pueden ser evitados por el uso de bloqueantes del receptor MR (Wehling, Kasmayr et al. 1991). Por lo tanto se aceptaría la existencia de otro receptor para Aldo y de acuerdo con esto, el grupo del Dr. Feldman demostró en células vasculares que el GPER participa de los efectos rápidos generados por Aldo (Gros, Ding et al. 2011).

En esta tesis doctoral demostramos que el GPER es el mediador de los efectos rápidos/no genómicos de Aldo asociados a la regulación del pH_i mediada por el NBC en cardiomiocitos adultos.

De acuerdo con nuestros resultados, el grupo de Ashton (Ashton, Le et al. 2015) sugirió la activación de GPER por Aldo, mediante el uso de una Aldo no permeable unida a poli-etilenglicol (PEG-Aldosterona), en el marco de respuestas no genómicas de esta hormona en la línea celular de mioblastos H9c2. En oposición a publicaciones previas que describían efectos no genómicos mediados por el MR, este grupo propuso que solamente estas respuestas rápidas de Aldo eran mediadas por GPER (como por ejemplo la previamente nombrada fosforilación de ERK1/2). Sin embargo, en este trabajo de tesis, de acuerdo con los estudios realizados por el grupo del Dr. Feldman

(Gros, Ding et al. 2011, Gros, Ding et al. 2013), demostramos que los efectos no genómicos de Aldo sobre los cardiomiocitos se comparten entre GPER y MR. Evidenciamos que existen efectos no genómicos paralelos de Aldo, uno asociado a MR y NHE, el cual se relacionaría con la fosforilación de ERK 1/2 observada por WB en la Fig. 3.11 que no se impide por G15, y otro a GPER y NBC por medio de la fosforilación de AKT, como se demostró en la Fig. 3.10. Adicionalmente, se puede observar que en las determinaciones de ROS, aunque no se detectó diferencias estadísticas con el control, la tendencia de los datos sugiere que el uso de G15 no inhibe completamente la producción de H_2O_2 ni $O_2^{\cdot-}$ a partir de Aldo, pero sí lo logra cuando se utiliza G1 para activar al receptor (Fig. 3.13). Esto también avalaría la idea de que Aldo inicia 2 vías paralelas. Aunque reste ensayar experimentos en presencia de bloqueantes selectivos del MR, estos datos sugieren que Aldo produce ROS por medio de sus 2 receptores: MR y GPER.

En el presente trabajo de tesis, describimos que Aldo activa GPER en corazón, que luego transactiva al EGFR, posiblemente mediante las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G, estimulando una vía dependiente de PI3K/AKT. De acuerdo a lo que se ha reportado previamente: GPER utilizaría las subunidades $G\beta\gamma$ de la proteína G para promover trans-activación mediada por estrógenos del EGFR y la señalización de las vías ERK y PI3K (Filardo, Quinn et al. 2000, Filardo, Quinn et al. 2002). Sin embargo, en este trabajo no hemos podido encontrar fosforilación de ERK vía GPER (Fig. 3.11). Por otro lado, se ha visto que la administración de E2 y G1 a ratas ovariectomizadas atenúa la hipertrofia ventricular mediante determinaciones del tamaño de los cardiomiocitos lo cual se correlaciona con la activación de la vía PI3K/Akt/eNOS (Lee, Lin et al. 2014), e iría de acuerdo con la vía planteada en este trabajo y con que el activar a GPER sea un mecanismo benéfico para el corazón. La vía propuesta en este trabajo que finaliza con la activación del NBCe1, sumaría aún más al mecanismo cardioprotector ya que los cardiomiocitos serían capaces de contrarrestar una alta actividad metabólica con un menor ingreso de Na^+ .

Se conoce ampliamente que Aldo incrementa el nivel de ROS intracelular y proponemos que éstos actuarían como moléculas intracelulares de señalización fisiológica. Nuestros resultados nos permiten sugerir que GPER está involucrado en la producción de ROS por Aldo. En la Fig. 3.12 observamos que tanto Apo (inhibidor de la NADPH oxidasa) como MPG (*scavenger* de ROS) eliminan la estimulación de NBC, indicando la participación de la oxidasa y las ROS en la vía de señalización disparada por GPER. La participación de las ROS se corrobora en la Fig. 3.13 donde se observa la producción de ROS tanto en cardiomiocitos aislados como en tejido ventricular. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) fue considerado activador de la NOX en tejido cardíaco (Nolly, Caldiz et al. 2014, Brea, Diaz et al. 2016). En nuestro trabajo el inhibidor del

EGFR, AG1478 impide la producción de ROS a partir de NADPH oxidasa, indicando que el EGFR se encontraría corriente arriba de la misma en esta vía. Además en la Fig. 3.10 se observa que Apo impide la fosforilación de AKT, indicando que el anión O_2^- se generaría corriente arriba de la activación de AKT. Cabe destacar que el lugar exacto donde el anión O_2^- o H_2O_2 actúan no se dilucida en esta tesis, pero si se pudo determinar la secuencialidad: GPER, EGFR, producción de ROS (mediante NOX) y finalmente p-AKT que activa NBC.

Previamente se ha demostrado que Aldo estimula al MR de lo cual deriva la producción de ROS y la fosforilación de ERK 1/2 (De Giusti, Nolly et al. 2011). Los experimentos llevados a cabo en esta tesis demostraron que G1 es incapaz de activar a NHE e incluso G15 no logra impedir esta activación de NHE mediada por Aldo en la recuperación de pH frente a una acidificación provocada por un pulso de amonio en solución HEPES, como podemos observar en la Fig. 3.17. Estos resultados soportarían también la hipótesis de que Aldo activaría 2 vías de señalización: una mediante el receptor MR estimulando al NHE y por otro lado mediante el receptor GPER llevando a la activación de NBC. Incluso, estas diferentes vías quizás se deban a la localización diferencial de estos transportadores, ya que las dos isoformas del co-transportador NBC están ubicados a nivel de los túbulos T y el NHE-1 se encuentra en los discos intercalares (Garciaarena, Ma et al. 2013).

Luego de observar el incremento funcional del NBC inducido por Aldo, hemos logrado identificar a la isoforma implicada en estos efectos rápidos, la cual es la isoforma electrogénica del transportador, NBCe1. Utilizando un anticuerpo específico que une a NBCe1 e impide su funcionalidad hemos demostrado que Aldo no afecta la actividad del NBCn1 (Fig. 3.15) e inclusive fue capaz de incrementar la actividad de NBCe1 registrada con el protocolo de pulso de K^+ como se observa en la Fig. 3.14. Así, es posible especular que la estimulación de NBCe1 a través de GPER disminuya el ingreso de Na^+ al recuperar el pH basal frente a una sobrecarga ácida. Como se sabe, el aumento en la concentración de Na^+ es crucial para el desarrollo fisiopatológico cardíaco, ya que un incremento en la $[Na^+]_i$ disminuye la fuerza impulsora del modo directo del intercambiador Na^+/Ca^{++} (NCX) e incluso favorece el modo reverso de este intercambiador llevando a un aumento intracelular de las concentraciones de $[Ca^{++}]_i$ (Rothstein, Byron et al. 2002, Brill 2003, Aiello, Villa-Abrille et al. 2005). Por lo tanto, Aldo, mediante GPER, al ingresar una menor cantidad de Na^+ por una mayor actividad del NBCe1 y no por el NBCn1, aportaría, al menos en parte, a las propiedades cardioprotectoras de GPER.

Además, en este trabajo se usó inmunofluorescencia y análisis de microscopía confocal para mostrar que tanto NBCe1 como GPER se ubicarían espacialmente a la distancia sarcomérica, indicando que ambos co-localizan a nivel de los

túbulos T. Al distribuirse por toda la extensión celular y no estar circunscripto a una zona, es esperable que intervenga en muchos y variados procesos celulares. Por ejemplo, se ha reportado que GPER cumple un rol cardioprotector, ya que el suministro de G1 ha reducido el tamaño de infarto durante protocolos de isquemia/re-perfusión (Deschamps and Murphy 2009, Bopassa, Eghbali et al. 2010), ha disminuido el engrosamiento de la pared ventricular y el tamaño de los cardiomiocitos en hipertrofia (Jessup, Lindsey et al. 2010), e inclusive disminuye la progresión a la falla cardíaca (Kang, Liu et al. 2012) y la fibrosis peri vascular (Lenhart, Broselid et al. 2013). Además, la estimulación de GPER inhibe la hipertrofia generada por Angiotensina II en la línea de mioblastos H9c2 (Li, Xiang et al. 2015).

Como primera conclusión del trabajo podemos inferir la vía de señalización intracelular descrita por Aldo (y G1) en la activación del NBCe1, como se esquematiza en la Fig. 4.1. Brevemente, Aldo y G1 activan a GPER el cual transactivaría vía proteína $G\beta\gamma$ al EGFR (Filardo, Quinn et al. 2000). EGFR inicia la vía PI3K/AKT (Filardo, Quinn et al. 2008) y la NOX (Paulsen, Truong et al. 2011). El H_2O_2 producido por la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ producido por la NOX inhibiría a la fosfatasa PTEN, evitando la desfosforilación de PIP3 y el bloqueo de la fosforilación de AKT (Filardo, Quinn et al. 2008). Al mismo tiempo H_2O_2 incrementa la fosforilación de EGFR y así la continua activación de NOX en lo que podemos hipotetizar un mecanismo de retroalimentación positiva ya que la producción de ROS es necesaria para activar a AKT, lo cual también iría de la mano con trabajos que tratan a las ROS como moléculas de señalización local e incluso la existencia de redoxomas que medien la señalización (Oakley, Abbott et al. 2009, Nolly, Caldiz et al. 2014). Finalmente AKT estimularía al NBCe1 fosforilándolo directamente o por proteínas regulatorias.

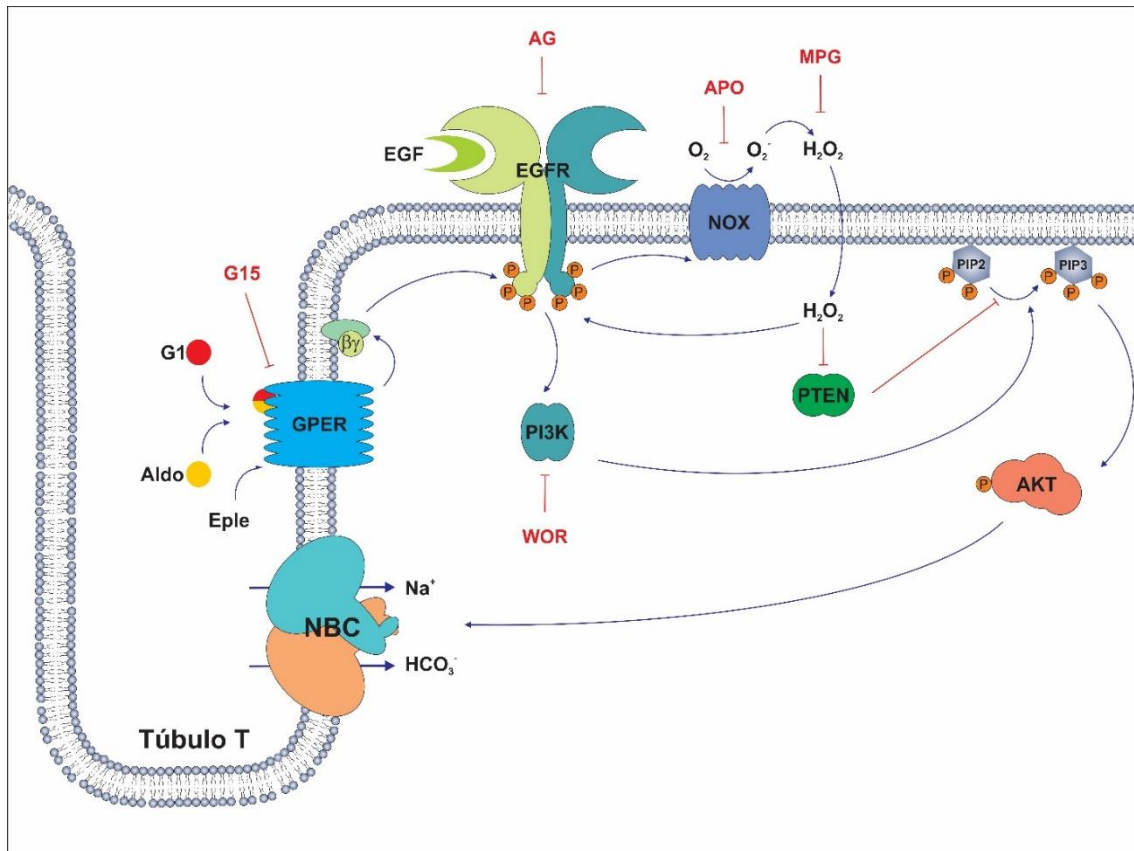


Fig. 4.1) Esquema de la vía de señalización sugerida por la activación del receptor GPER con Aldo. Tanto Aldo como G1 pueden activar a GPER y Eple se comportaría como un agonista parcial. El GPER transactiva a EGFR, probablemente vía la proteína $G\beta\gamma$. Luego EGFR activaría la vía PI3K/AKT y la NOX. El H_2O_2 producido por la dismutación del O_2^- producido por la NOX podría inhibir a la fosfatasa PTEN, evitando la desfosforilación de PIP3 y el bloqueo de la fosforilación de AKT. Al mismo tiempo H_2O_2 incrementa la fosforilación de EGFR y así la continua activación de NOX en un mecanismo de retroalimentación positiva. Finalmente AKT estimularía al NBCe1 por fosforilación directa o por proteínas regulatorias. Se muestran en rojo todos los antagonistas utilizados en los experimentos realizados. Cabe destacar que GPER y NBCe1 se ubican en los túbulos T.

Por otro lado, la localización descrita del GPER en los túbulos T (Fig. 3.16), incita también a evaluar la participación del receptor en la contractilidad cardíaca, ya que el proceso de Acoplamiento Excito-Contráctil depende ampliamente de esta estructura celular.

Como primera determinación, se evaluó la contractilidad cardíaca y se observó una disminución en la misma por administración de G1 a cardiomiocitos aislados, en concordancia con lo descrito previamente con el uso de E2 y G1 en corazones de ratas macho en los cuales encontraron un decaimiento en la contractilidad (Filice, Recchia et al. 2009). Sin embargo en ese trabajo previo no pudieron dilucidar si este efecto se debe sólo a GPER, ya que E2 activa también

a los ERs. En este trabajo de tesis debido al uso de su agonista G1 y su antagonista específico G36, podemos decir que el efecto inotrópico negativo se debe a GPER. Además, estos datos coinciden con la disminución en la contractilidad observada en corazones perfundidos en el sistema Langendorff utilizando G1 en estudios en ratas Wistar y SHR (De Francesco, Angelone et al. 2013).

A pesar de haberse observado la participación del GPER, la administración de Aldo no alteró significativamente la contractilidad cardíaca en nuestro protocolo experimental. Sin embargo, cuando se realizaron experimentos con Aldo en presencia de G36 se pudo observar un aumento en la contractilidad (Fig. 3.20), sugiriendo que el efecto inotrópico negativo mediado por GPER se encontraba enmascarado por un efecto inotrópico positivo opuesto, posiblemente mediado por MR estimulando al NHE (De Giusti, Nolly et al. 2011) En relación con esta especulación, se ha demostrado previamente un inotropismo positivo producido por Aldo (Barbato, Rashid et al. 2004), aunque en ese trabajo se han realizado los experimentos en buffers sin HCO_3^- , por lo que no estarían funcionales los transportadores acidificantes que permitirían la amortiguación de un cambio de pH (i.e. el AE, intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) y esto llevaría a un cambio inotrópico positivo apreciable por la sola estimulación de NHE, que al incrementar el pH_i llevaría a un aumento de la sensibilidad al Ca^{++} de las proteínas contráctiles. De todos modos, es importante notar que son necesarios experimentos futuros para confirmar el potencial efecto dual de Aldo sobre el inotropismo cardíaco.

Debido a que con Aldo no podemos estudiar claramente la participación de GPER sobre la contractilidad, procedimos a evaluar la participación en la respuesta contráctil de otro agonista ampliamente reconocido del GPER, el E2. Este agonista del GPER no estimula al MR, resultando útil para enfocar la respuesta en el GPER, sin embargo no debemos olvidarnos de la participación de los ERs que también se encuentran en éstas células. Consistentemente con G1, el E2 produjo una respuesta inotrópica negativa (Fig. 3.22), incluso en concordancia con estudios previos que demuestran que E2 produce efectos inotrópicos negativos como hemos dicho anteriormente (Filice, Recchia et al. 2009). Además, E2 demostró regular el efecto lusitrópico mediante la fosforilación y S-nitrosilación de PLN (Filice, Angelone et al. 2011). También se ha observado que en modelos murinos de αER y βER knock-out, E2 disminuye la corriente de Ca^{++} y consecuentemente la contractilidad (Ullrich, Krust et al. 2008). Estos estudios no involucraron al GPER, pero estos resultados irían de acuerdo con nuestros experimentos, ya que el bloqueo de GPER por G36 cancela completamente los efectos observados, tanto con G1 como con E2.

Posteriormente, se procedió a evaluar la amplitud del transitorio de Ca^{++} como mediador de este efecto contráctil. Encontramos una leve pero significativa

disminución en la amplitud del mismo frente al uso de G1 y E2, definiendo así un menor incremento en la concentración de Ca^{++} en el compartimento citoplasmático durante la estimulación de los miocitos. Esta disminución de la amplitud del transitorio de Ca^{++} no ocurre por un descenso en el contenido de Ca^{++} en el RS, como observamos en la Fig. 3.23, determinado por la amplitud del transitorio de Ca^{++} provocado por el agregado de altas dosis de cafeína (Macquaide, Bito et al. 2015). Sin embargo, mediante técnicas electrofisiológicas determinamos que la corriente pico de Ca^{++} a través del canal de Ca_L se encuentra disminuida a 0 mV por un menor influjo de Ca^{++} al utilizar ambos agonistas G1 y E2. Esto sustentaría la disminución en la amplitud de los transitorios de Ca^{++} observados en este trabajo, ya que causaría una menor liberación de Ca^{++} a través de los canales de RyR2 durante los transitorios de Ca^{++} (Fig. 3.22). La disminución de la corriente pico se vio también en la línea celular de musculo esquelético C2C12 cuando fue tratada con diferentes esteroides (Passaquin, Lhote et al. 1998) que podrían ser agonistas del GPER, sin embargo en ese trabajo la participación de este receptor no fue evaluada.

El adecuado funcionamiento del Ca_L es de suma importancia en procesos tanto fisiológicos como patológicos. El canal presenta una amplia variedad de reguladores, sus subunidades accesorias $\alpha_2\delta$ (Canti, Nieto-Rostro et al. 2005) y β (Van Petegem, Clark et al. 2004) así como proteínas de membrana de único paso: fosfoleman (Mirza, Zhang et al. 2004, Wang, Gao et al. 2010) y KCNE2 (Liu, Deng et al. 2014). Inclusive proteínas asociadas con la regulación de GPCRs suelen modular el canal como las β -arrestinas (Kashihara, Nakada et al. 2017) y la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G (Volkers, Weidenhammer et al. 2011). Además, se ha observado la participación de GPER en la regulación de canales iónicos como por ejemplo en la atenuación del canal BK en músculo liso por GPER mediante el uso de G1 (Evanson, Goldsmith et al. 2018). También en cultivo celular HEK293T se vio que E2 puede modular la fosforilación del canal de K^+ neuronal TREK1 a través de GPER (Choudhury and Sikdar 2018). Por otro lado E2 ha demostrado disminuir la población de canales Cav1.2 en tejido vascular al disminuir la expresión de la subunidad α formadora del poro, aunque este efecto es atribuido a los receptores clásicos de estrógenos (Hill, Dalton et al. 2017). En tejido pulmonar se ha descrito que GPER regula canales de Na^+ (Greenlee, Mitzelfelt et al. 2013) y que también participa en la relajación de músculo liso vascular por afectar la actividad de canales de K^+ en ambos sexos (Peixoto, Aires et al. 2017).

En estudios previos se ha observado que E2 disminuye la actividad del Cav1.2 arterial mediante mecanismos no genómicos (Hill, Gebre et al. 2010). Sin embargo no han involucrado al GPER como mediador de ese mecanismo en ese

trabajo. En conjunto, todos estos datos previos de la literatura dan sustento a las observaciones del presente trabajo.

Se podría sugerir que la protección mediada por G1 en Isquemia/Re-perfusión (Deschamps and Murphy 2009, Bopassa, Eghbali et al. 2010, Rocca, Femmino et al. 2018) o frente a la apoptosis (Li, Xiang et al. 2015) incluya una disminución en el ingreso de Ca^{++} por el Ca_L . Esto evitaría una sobrecarga de Ca^{++} citoplasmático y por lo tanto las vías pro-apoptóticas no se desarrollarían masivamente. Por otro lado, el impedir la sobrecarga de Ca^{++} podría ser de utilidad en el desarrollo de hipertrofia mal-adaptativa dependiente de Ca^{++} o frente a miocardiopatía isquémica. Sin embargo, habría que realizar más experimentos para dilucidar la validez de estas hipótesis.

Restaría evaluar el mecanismo de señalización por el cual GPER modula la corriente de Ca^{++} . Por ejemplo, el estimular al GPER se podría generar cambios conformacionales en el receptor que lleven a modificar la estructura del Ca_L disminuyendo así su probabilidad de apertura. Incluso, GPER podría disminuir la actividad del canal mediante la subunidad $\beta\gamma$ como se ha descrito frente a la estimulación adrenérgica (Volkers, Weidenhammer et al. 2011) y eso iría de acuerdo con lo postulado previamente para la regulación del NBCe1. Además, podríamos hipotetizar que participan AKT y/o ROS. Por otro lado, habría que evaluar la posibilidad de que alguna de las subunidades regulatorias del canal estén siendo involucradas o que ocurra alguna modificación postraduccional como una fosforilación, tanto en el canal como en las subunidades auxiliares. Es también posible que cambie la disponibilidad de Ca_L en la membrana mediante la regulación del transporte y agregación de la proteína a la misma (“trafficking”). Un importante mediador de este proceso es la proteína BIN1, que resultaría también interesante evaluar (Hong, Smyth et al. 2012). Por todo esto, queda un interesante campo de investigación por dilucidar.

El gráfico de la Fig. 4.2 esquematiza los resultados obtenidos en relación al efecto inotrópico negativo asociado a GPER y una posible señalización propuesta. Tanto G1 como E2 se unen y activan a GPER, éste regularía al Ca_L posiblemente por la proteína $\text{G}\beta\gamma$ como se ha descrito en tejido muscular liso (Filardo, Quinn et al. 2002) e incluso sugerimos en tejido cardíaco en nuestro grupo de trabajo (De Giusti, Orłowski et al. 2015). La proteína $\text{G}\beta\gamma$ interaccionaría con el Ca_L lo cual generaría lo observado experimentalmente, una disminución en el ingreso de Ca^{++} el cual induce una menor liberación de Ca^{++} del RS (Fig. 3.22) generando una menor fuerza de contracción (Fig. 3.21 y Fig. 3.18). En experimentos sucesivos y en continuidad con este trabajo de tesis, se intentará dilucidar en detalle la vía de señalización que participa de este fenómeno excito-contráctil.

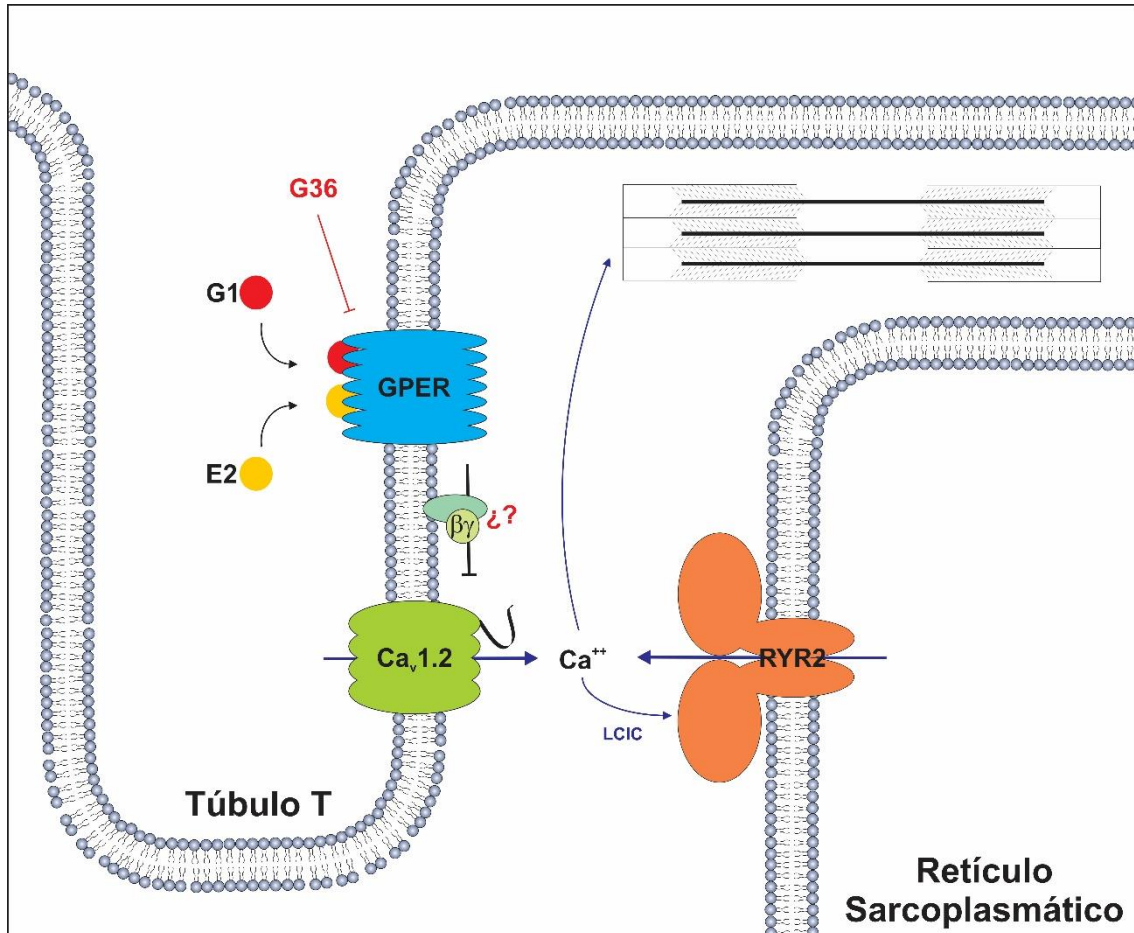


Fig. 4.2) Esquema de la participación del GPER en el manejo de Ca^{2+} cardíaco. La activación del GPER disminuye el influjo de Ca^{2+} a través del Ca_L , posiblemente mediante la proteína $G\beta\gamma$. Esto genera transitorios de Ca^{2+} de menor amplitud y así se desarrolla una menor fuerza de contracción.

Conclusiones

En el presente trabajo de tesis se ha dilucidado la participación del GPER en la regulación del pH intracelular por medio de la activación del NBCe1, la vía de señalización por la cual lo realiza, descartando la participación de NBCn1 y NHE-1. Esta vía es compartida con la hormona Aldo, por lo cual podemos concluir que la regulación del pH se encuentra entre los efectos rápidos mediados por Aldo en el corazón, sin la participación de MR y por activación de GPER. Esta vía alcalinizante disparada por la activación del GPER podría ser protectora al compensar efectos acidificantes producidos por injurias del miocardio, como pueden ser isquemia, acumulación de lactato, alteraciones metabólicas, etc.

El otro aporte importante de esta tesis es que se demostró por primera vez que el GPER regula la contractilidad cardíaca. Mediante estudios electrofisiológicos se observó una disminución significativa en la corriente de Ca^{++} , pudiendo ser, al menos en parte, la causa de que disminuya la amplitud del transitorio de Ca^{++} y por ello la contractilidad. Estos resultados no son reproducibles mediante la administración de Aldo, posiblemente por efectos opuestos de los receptores MR y GPER. Sin embargo E2, otro agonista ampliamente reconocido del receptor ha demostrado los mismos efectos que G1, corroborando el papel de GPER. Restaría evaluar la vía de señalización por la cual el receptor modula el Ca_L . La relevancia fisiopatológica de este fenómeno podría estar asociada al efecto cardioprotector que significa disminuir el calcio citoplasmático en condiciones como isquemia, hipertrofia cardíaca mal-adaptativa o apoptosis.

Anexo

Calibración de pH

Determinación de valores de pH de las soluciones mediante pHmetro:

Promedio pH	7,46	7,18	6,96	6,47
Error	0,05	0,05	0,05	0,05

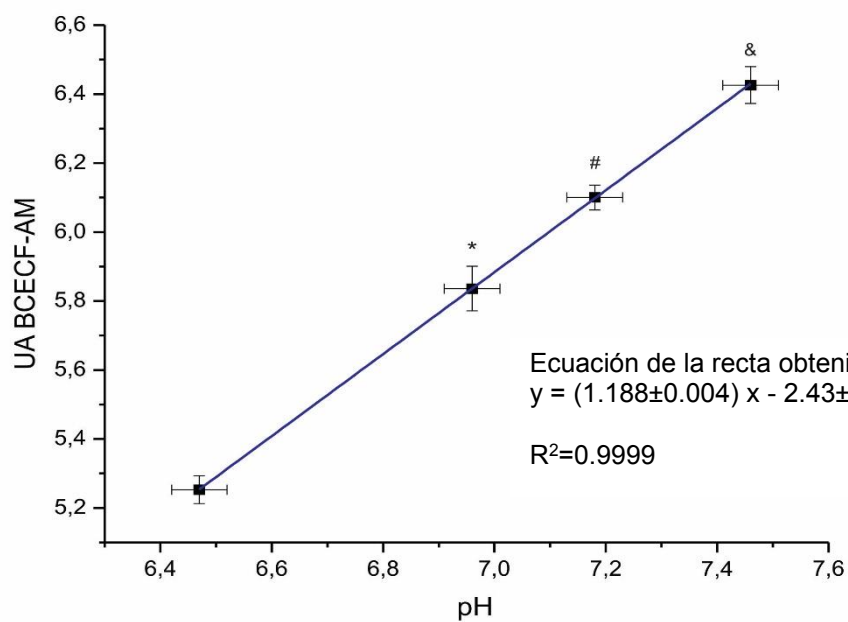
Determinación de valores de Fluorescencia de BCECF-AM en células cargadas con el indicador, tratadas con nigericina para equilibrar los pHs intra y extra celular y perfundidas con soluciones con pH conocido (evaluadas mediante pHmetro) y en el Sistema de Microscopía de Epifluorescencia IonOptix:

Promedio Fluorescencia BCECF-AM	6,426	6,100	5,778	5,253
n	49	47	64	52
Error	0,05347	0,0362	0,0663	0,0401

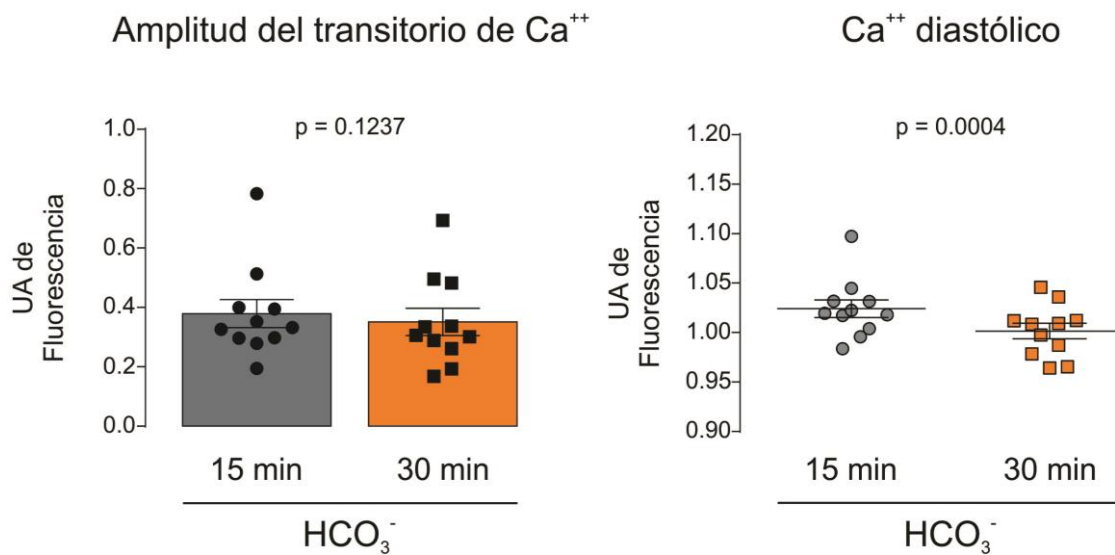
Evaluación de Normalidad de distribución de Fluorescencia de BCECF-AM

D'Agostino & Pearson				
K2	1,515	2,010	0,2198	0,5856
Valor de p	0,4687	0,3661	0,8959	0,7462
La distribución es normal (alpha=0.05)?	Si	Si	Si	Si
Shapiro-Wilk normality				
W	0,9806	0,9800	0,9906	0,9926
Valor de p	0,5926	0,5937	0,9100	0,9860
La distribución es normal (alpha=0.05)?	Si	Si	Si	Si

Test de comparaciones múltiples de Dunn	Principal diferencia en el rango	Significancia?	Valor de p estimado
7,18 vs. 7,46	-34,09	Si	0,0391
6,96 vs. 7,46	-70,04	Si	< 0,0001
6,47 vs. 7,46	-126,3	Si	< 0,0001
6,96 vs. 7,18	-35,95	Si	0,0138
6,47 vs. 7,18	-92,18	Si	< 0,0001
6,47 vs. 6,96	-56,23	Si	< 0,0001



Controles de tiempo en cardiomiocitos cargados con Fura2AM



Bibliografía

Aiello, E. A., M. G. Petroff, A. R. Mattiazzi and H. E. Cingolani (1998). "Evidence for an electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ symport in rat cardiac myocytes." J Physiol **512 (Pt 1)**: 137-148.

Aiello, E. A., M. C. Villa-Abrille, R. A. Dulce, H. E. Cingolani and N. G. Perez (2005). "Endothelin-1 stimulates the Na⁺/Ca²⁺ exchanger reverse mode through intracellular Na⁺ (Na⁺_i)-dependent and Na⁺_i-independent pathways." Hypertension **45(2)**: 288-293.

Akama, K. T., L. I. Thompson, T. A. Milner and B. S. McEwen (2013). "Post-synaptic density-95 (PSD-95) binding capacity of G-protein-coupled receptor 30 (GPR30), an estrogen receptor that can be identified in hippocampal dendritic spines." J Biol Chem **288(9)**: 6438-6450.

Alvarez, B. V., F. B. Loiselle, C. T. Supuran, G. J. Schwartz and J. R. Casey (2003). "Direct extracellular interaction between carbonic anhydrase IV and the human NBC1 sodium/bicarbonate co-transporter." Biochemistry **42(42)**: 12321-12329.

Alvarez, B. V., N. G. Perez, I. L. Ennis, M. C. Camilion de Hurtado and H. E. Cingolani (1999). "Mechanisms underlying the increase in force and Ca²⁺ transient that follow stretch of cardiac muscle: a possible explanation of the Anrep effect." Circ Res **85(8)**: 716-722.

Allen, D. G. and X. H. Xiao (2003). "Role of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger during ischemia and reperfusion." Cardiovasc Res **57(4)**: 934-941.

Amberg, G. C., S. Earley and S. A. Glapa (2010). "Local regulation of arterial L-type calcium channels by reactive oxygen species." Circ Res **107(8)**: 1002-1010.

Anderson, M. E. (2001). "Ca²⁺-dependent regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels: is a unifying mechanism at hand?" J Mol Cell Cardiol **33(4)**: 639-650.

Anstead, G. M., K. E. Carlson and J. A. Katzenellenbogen (1997). "The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site." Steroids **62(3)**: 268-303.

Ashton, A. W., T. Y. Le, C. E. Gomez-Sanchez, M. C. Morel-Kopp, B. McWhinney, A. Hudson and A. S. Mihailidou (2015). "Role of Nongenomic Signaling Pathways Activated by Aldosterone During Cardiac Reperfusion Injury." Mol Endocrinol **29(8)**: 1144-1155.

Avkiran, M., A. R. Cook and F. Cuello (2008). "Targeting Na⁺/H⁺ exchanger regulation for cardiac protection: a RSKy approach?" Curr Opin Pharmacol **8(2)**: 133-140.

Baetz, D., R. S. Haworth, M. Avkiran and D. Feuvray (2002). "The ERK pathway regulates Na⁺-HCO₃⁻ cotransport activity in adult rat cardiomyocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283(5)**: H2102-2109.

Balhuizen, A., R. Kumar, S. Amisten, I. Lundquist and A. Salehi (2010). "Activation of G protein-coupled receptor 30 modulates hormone secretion and counteracts cytokine-induced apoptosis in pancreatic islets of female mice." Mol Cell Endocrinol **320(1-2)**: 16-24.

Ball, K. L., M. D. Johnson and R. J. Solaro (1994). "Isoform specific interactions of troponin I and troponin C determine pH sensitivity of myofibrillar Ca²⁺ activation." Biochemistry **33**(28): 8464-8471.

Barbato, J. C., S. Rashid, P. J. Mulrow, J. I. Shapiro and R. Franco-Saenz (2004). "Mechanisms for aldosterone and spironolactone-induced positive inotropic actions in the rat heart." Hypertension **44**(5): 751-757.

Beck, R., M. Rawet, F. T. Wieland and D. Cassel (2009). "The COPI system: molecular mechanisms and function." FEBS Lett **583**(17): 2701-2709.

Berridge, M. J. (2006). "Remodelling Ca²⁺ signalling systems and cardiac hypertrophy." Biochem Soc Trans **34**(Pt 2): 228-231.

Bers, D. M. and S. Morotti (2014). "Ca²⁺ current facilitation is CaMKII-dependent and has arrhythmogenic consequences." Front Pharmacol **5**: 144.

Bers, D. M. and C. R. Weber (2002). "Na/Ca exchange function in intact ventricular myocytes." Ann N Y Acad Sci **976**: 500-512.

Beygui, F., G. Cayla, V. Roule, F. Roubille, N. Delarche, J. Silvain, E. Van Belle, L. Belle, M. Galinier, P. Motreff, L. Cornillet, J. P. Collet, A. Furber, P. Goldstein, P. Ecollan, D. Legallois, A. Lebon, H. Rousseau, J. Machecourt, F. Zannad, E. Vicaut, G. Montalescot and A. Investigators (2016). "Early Aldosterone Blockade in Acute Myocardial Infarction: The ALBATROSS Randomized Clinical Trial." J Am Coll Cardiol **67**(16): 1917-1927.

Blair, I. A. (2010). "Analysis of estrogens in serum and plasma from postmenopausal women: past present, and future." Steroids **75**(4-5): 297-306.

Bologa, C. G., C. M. Revankar, S. M. Young, B. S. Edwards, J. B. Arterburn, A. S. Kiselyov, M. A. Parker, S. E. Tkachenko, N. P. Savchuck, L. A. Sklar, T. I. Oprea and E. R. Prossnitz (2006). "Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30." Nat Chem Biol **2**(4): 207-212.

Bopassa, J. C., M. Eghbali, L. Toro and E. Stefani (2010). "A novel estrogen receptor GPER inhibits mitochondria permeability transition pore opening and protects the heart against ischemia-reperfusion injury." Am J Physiol Heart Circ Physiol **298**(1): H16-23.

Bourdin, B., J. Briot, M. P. Tetreault, R. Sauve and L. Parent (2017). "Negatively charged residues in the first extracellular loop of the L-type CaV1.2 channel anchor the interaction with the CaV α 2 δ 1 auxiliary subunit." J Biol Chem **292**(42): 17236-17249.

Boyman, L., B. M. Hagen, M. Giladi, R. Hiller, W. J. Lederer and D. Khanashvili (2011). "Proton-sensing Ca²⁺ binding domains regulate the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger." J Biol Chem **286**(33): 28811-28820.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Brailoiu, G. C., J. B. Arterburn, T. I. Oprea, V. C. Chitravanshi and E. Brailoiu (2013). "Bradycardic effects mediated by activation of G protein-coupled estrogen receptor in rat nucleus ambiguus." Exp Physiol **98**(3): 679-691.

Brea, M. S., R. G. Diaz, D. S. Escudero, C. I. Caldiz, E. L. Portiansky, P. E. Morgan and N. G. Perez (2016). "Epidermal Growth Factor Receptor Silencing Blunts the Slow Force Response to Myocardial Stretch." J Am Heart Assoc **5**(10).

Brette, F. and C. Orchard (2003). "T-tubule function in mammalian cardiac myocytes." Circ Res **92**(11): 1182-1192.

Bril, A. (2003). "[Ion transporters and cardiovascular diseases: pH control or modulation of intracellular calcium concentration]." Ann Cardiol Angeiol (Paris) **52**(1): 41-51.

Brilla, C. G., L. S. Matsubara and K. T. Weber (1993). "Antifibrotic effects of spironolactone in preventing myocardial fibrosis in systemic arterial hypertension." Am J Cardiol **71**(3): 12A-16A.

Broselid, S., K. A. Berg, T. A. Chavera, R. Kahn, W. P. Clarke, B. Olde and L. M. Leeb-Lundberg (2014). "G protein-coupled receptor 30 (GPR30) forms a plasma membrane complex with membrane-associated guanylate kinases (MAGUKs) and protein kinase A-anchoring protein 5 (AKAP5) that constitutively inhibits cAMP production." J Biol Chem **289**(32): 22117-22127.

Caldiz, C. I., C. D. Garcarena, R. A. Dulce, L. P. Novaretto, A. M. Yeves, I. L. Ennis, H. E. Cingolani, G. Chiappe de Cingolani and N. G. Perez (2007). "Mitochondrial reactive oxygen species activate the slow force response to stretch in feline myocardium." J Physiol **584**(Pt 3): 895-905.

Camilion de Hurtado, M. C., N. G. Perez and H. E. Cingolani (1995). "An electrogenic sodium-bicarbonate cotransport in the regulation of myocardial intracellular pH." J Mol Cell Cardiol **27**(1): 231-242.

Canti, C., M. Nieto-Rostro, I. Foucault, F. Hebllich, J. Wratten, M. W. Richards, J. Hendrich, L. Douglas, K. M. Page, A. Davies and A. C. Dolphin (2005). "The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of alpha2delta subunits is key to trafficking voltage-gated Ca²⁺ channels." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11230-11235.

Carmeci, C., D. A. Thompson, H. Z. Ring, U. Francke and R. J. Weigel (1997). "Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer." Genomics **45**(3): 607-617.

Catterall, W. A. (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 521-555.

Cingolani, H. E., B. V. Alvarez, I. L. Ennis and M. C. Camilion de Hurtado (1998). "Stretch-induced alkalinization of feline papillary muscle: an autocrine-paracrine system." Circ Res **83**(8): 775-780.

Cingolani, H. E., M. C. Villa-Abrille, M. Cornelli, A. Nolly, I. L. Ennis, C. Garcarena, A. M. Suburo, V. Torbidoni, M. V. Correa, M. C. Camilion de Hurtado and E. A. Aiello (2006). "The positive inotropic effect of angiotensin II: role of endothelin-1 and reactive oxygen species." Hypertension **47**(4): 727-734.

- Civelli, O., R. K. Reinscheid, Y. Zhang, Z. Wang, R. Fredriksson and H. B. Schiöth (2013). "G protein-coupled receptor deorphanizations." Annu Rev Pharmacol Toxicol **53**: 127-146.
- Colecraft, H. M., B. Alseikhan, S. X. Takahashi, D. Chaudhuri, S. Mittman, V. Yegnasubramanian, R. S. Alvania, D. C. Johns, E. Marban and D. T. Yue (2002). "Novel functional properties of Ca(2+) channel beta subunits revealed by their expression in adult rat heart cells." J Physiol **541**(Pt 2): 435-452.
- Cuello, F., A. K. Snabaitis, M. S. Cohen, J. Taunton and M. Avkiran (2007). "Evidence for direct regulation of myocardial Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 phosphorylation and activity by 90-kDa ribosomal S6 kinase (RSK): effects of the novel and specific RSK inhibitor fmk on responses to alpha1-adrenergic stimulation." Mol Pharmacol **71**(3): 799-806.
- Chai, W., I. M. Garrelds, U. Arulmani, R. G. Schoemaker, J. M. Lamers and A. H. Danser (2005). "Genomic and nongenomic effects of aldosterone in the rat heart: why is spironolactone cardioprotective?" Br J Pharmacol **145**(5): 664-671.
- Cheng, S. B., J. Dong, Y. Pang, J. LaRocca, M. Hixon, P. Thomas and E. J. Filardo (2014). "Anatomical location and redistribution of G protein-coupled estrogen receptor-1 during the estrus cycle in mouse kidney and specific binding to estrogens but not aldosterone." Mol Cell Endocrinol **382**(2): 950-959.
- Cheng, S. B., J. A. Quinn, C. T. Graeber and E. J. Filardo (2011). "Down-modulation of the G-protein-coupled estrogen receptor, GPER, from the cell surface occurs via a trans-Golgi-proteasome pathway." J Biol Chem **286**(25): 22441-22455.
- Chevalier, N., A. Vega, A. Bouskine, B. Siddeek, J. F. Michiels, D. Chevallier and P. Fenichel (2012). "GPR30, the non-classical membrane G protein related estrogen receptor, is overexpressed in human seminoma and promotes seminoma cell proliferation." PLoS One **7**(4): e34672.
- Chien, P. T., C. C. Lin, L. D. Hsiao and C. M. Yang (2015). "c-Src/Pyk2/EGFR/PI3K/Akt/CREB-activated pathway contributes to human cardiomyocyte hypertrophy: Role of COX-2 induction." Mol Cell Endocrinol **409**: 59-72.
- Choi, H. S., A. W. Trafford, C. H. Orchard and D. A. Eisner (2000). "The effect of acidosis on systolic Ca²⁺ and sarcoplasmic reticulum calcium content in isolated rat ventricular myocytes." J Physiol **529 Pt 3**: 661-668.
- Choudhury, N. and S. K. Sikdar (2018). "17beta-estradiol potentiates TREK1 channel activity through G protein-coupled estrogen receptor." J Steroid Biochem Mol Biol **183**: 94-105.
- Damkier, H. H., S. Nielsen and J. Praetorius (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**(1): H172-180.
- Darmellah, A., D. Baetz, F. Prunier, S. Tamarelle, C. Rucker-Martin and D. Feuvray (2007). "Enhanced activity of the myocardial Na⁺/H⁺ exchanger contributes to left ventricular hypertrophy in the Goto-Kakizaki rat model of type 2 diabetes: critical role of Akt." Diabetologia **50**(6): 1335-1344.

De Francesco, E. M., T. Angelone, T. Pasqua, M. Pupo, M. C. Cerra and M. Maggiolini (2013). "GPER mediates cardiotropic effects in spontaneously hypertensive rat hearts." PLoS One **8**(8): e69322.

De Giusti, V. C., M. B. Nolly, A. M. Yeves, C. I. Caldiz, M. C. Villa-Abrille, G. E. Chiappe de Cingolani, I. L. Ennis, H. E. Cingolani and E. A. Aiello (2011). "Aldosterone stimulates the cardiac Na(+)/H(+) exchanger via transactivation of the epidermal growth factor receptor." Hypertension **58**(5): 912-919.

De Giusti, V. C., A. Orlowski and E. A. Aiello (2010). "Angiotensin II inhibits the electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransport of cat cardiac myocytes." J Mol Cell Cardiol **49**(5): 812-818.

De Giusti, V. C., A. Orlowski, M. C. Ciancio, M. S. Espejo, L. A. Gonano, C. I. Caldiz, M. G. Vila Petroff, M. C. Villa-Abrille and E. A. Aiello (2015). "Aldosterone stimulates the cardiac sodium/bicarbonate cotransporter via activation of the g protein-coupled receptor gpr30." J Mol Cell Cardiol **89**(Pt B): 260-267.

De Giusti, V. C., A. Orlowski, M. C. Villa-Abrille, G. E. de Cingolani, J. R. Casey, B. V. Alvarez and E. A. Aiello (2011). "Antibodies against the cardiac sodium/bicarbonate cotransporter (NBCe1) as pharmacological tools." Br J Pharmacol **164**(8): 1976-1989.

de Hemptinne, A., R. Marrannes and B. Vanheel (1983). "Influence of organic acids on intracellular pH." Am J Physiol **245**(3): C178-183.

Dennis, M. K., A. S. Field, R. Burai, C. Ramesh, W. K. Petrie, C. G. Bologna, T. I. Oprea, Y. Yamaguchi, S. Hayashi, L. A. Sklar, H. J. Hathaway, J. B. Arterburn and E. R. Prossnitz (2011). "Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity." J Steroid Biochem Mol Biol **127**(3-5): 358-366.

Deschamps, A. M. and E. Murphy (2009). "Activation of a novel estrogen receptor, GPER, is cardioprotective in male and female rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(5): H1806-1813.

Despa, S., F. Brette, C. H. Orchard and D. M. Bers (2003). "Na/Ca exchange and Na/K-ATPase function are equally concentrated in transverse tubules of rat ventricular myocytes." Biophys J **85**(5): 3388-3396.

Diaz, M. E., H. K. Graham and A. W. Trafford (2004). "Enhanced sarcolemmal Ca²⁺ efflux reduces sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content and systolic Ca²⁺ in cardiac hypertrophy." Cardiovasc Res **62**(3): 538-547.

Diez, J. (2008). "Effects of aldosterone on the heart: beyond systemic hemodynamics?" Hypertension **52**(3): 462-464.

Dong, C., C. M. Filipeanu, M. T. Duvernay and G. Wu (2007). "Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking." Biochim Biophys Acta **1768**(4): 853-870.

Eisner, D. A., N. A. Kenning, S. C. O'Neill, G. Pocock, C. D. Richards and M. Valdeolmillos (1989). "A novel method for absolute calibration of intracellular pH indicators." Pflugers Arch **413**(5): 553-558.

Elliott, A. C., G. L. Smith, D. A. Eisner and D. G. Allen (1992). "Metabolic changes during ischaemia and their role in contractile failure in isolated ferret hearts." J Physiol **454**: 467-490.

Evanson, K. W., J. A. Goldsmith, P. Ghosh and M. D. Delp (2018). "The G protein-coupled estrogen receptor agonist, G-1, attenuates BK channel activation in cerebral arterial smooth muscle cells." Pharmacol Res Perspect **6**(4): e00409.

Fabiato, A. and F. Fabiato (1975). "Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells." J Physiol **249**(3): 469-495.

Feldman, R. D. and R. Gros (2011). "Unraveling the mechanisms underlying the rapid vascular effects of steroids: sorting out the receptors and the pathways." Br J Pharmacol **163**(6): 1163-1169.

Filardo, E., J. Quinn, Y. Pang, C. Graeber, S. Shaw, J. Dong and P. Thomas (2007). "Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane." Endocrinology **148**(7): 3236-3245.

Filardo, E. J., J. A. Quinn, K. I. Bland and A. R. Frackelton, 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**(10): 1649-1660.

Filardo, E. J., J. A. Quinn, A. R. Frackelton, Jr. and K. I. Bland (2002). "Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis." Mol Endocrinol **16**(1): 70-84.

Filardo, E. J., J. A. Quinn and E. Sabo (2008). "Association of the membrane estrogen receptor, GPR30, with breast tumor metastasis and transactivation of the epidermal growth factor receptor." Steroids **73**(9-10): 870-873.

Filardo, E. J. and P. Thomas (2012). "Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology." Endocrinology **153**(7): 2953-2962.

Filice, E., T. Angelone, E. M. De Francesco, D. Pellegrino, M. Maggiolini and M. C. Cerra (2011). "Crucial role of phospholamban phosphorylation and S-nitrosylation in the negative lusitropism induced by 17beta-estradiol in the male rat heart." Cell Physiol Biochem **28**(1): 41-52.

Filice, E., A. G. Recchia, D. Pellegrino, T. Angelone, M. Maggiolini and M. C. Cerra (2009). "A new membrane G protein-coupled receptor (GPR30) is involved in the cardiac effects of 17beta-estradiol in the male rat." J Physiol Pharmacol **60**(4): 3-10.

Fliegel, L., M. P. Walsh, D. Singh, C. Wong and A. Barr (1992). "Phosphorylation of the C-terminal domain of the Na⁺/H⁺ exchanger by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II." Biochem J **282** (Pt 1): 139-145.

Franzini-Armstrong, C., F. Protasi and V. Ramesh (1999). "Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles." Biophys J **77**(3): 1528-1539.

Funder, J. W. (2011). "GPR30, mineralocorticoid receptors, and the rapid vascular effects of aldosterone." Hypertension **57**(3): 370-372.

- Garciarena, C. D., Y. L. Ma, P. Swietach, L. Huc and R. D. Vaughan-Jones (2013). "Sarcolemmal localisation of Na⁺/H⁺ exchange and Na⁺-HCO₃⁻ co-transport influences the spatial regulation of intracellular pH in rat ventricular myocytes." J Physiol **591**(9): 2287-2306.
- Gomez Sanchez, E. P. (1995). "Mineralocorticoid modulation of central control of blood pressure." Steroids **60**(1): 69-72.
- Gray, R. P., H. McIntyre, D. S. Sheridan and C. H. Fry (2001). "Intracellular sodium and contractile function in hypertrophied human and guinea-pig myocardium." Pflugers Arch **442**(1): 117-123.
- Greenlee, M. M., J. D. Mitzelfelt, L. Yu, Q. Yue, B. J. Duke, C. S. Harrell, G. N. Neigh and D. C. Eaton (2013). "Estradiol activates epithelial sodium channels in rat alveolar cells through the G protein-coupled estrogen receptor." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **305**(11): L878-889.
- Gros, R., Q. Ding, B. Liu, J. Chorazyczewski and R. D. Feldman (2013). "Aldosterone mediates its rapid effects in vascular endothelial cells through GPER activation." Am J Physiol Cell Physiol **304**(6): C532-540.
- Gros, R., Q. Ding, L. A. Sklar, E. E. Prossnitz, J. B. Arterburn, J. Chorazyczewski and R. D. Feldman (2011). "GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone." Hypertension **57**(3): 442-451.
- Grossmann, C. and M. Gekle (2009). "New aspects of rapid aldosterone signaling." Mol Cell Endocrinol **308**(1-2): 53-62.
- Gunasegaram, S., R. S. Haworth, D. J. Hearse and M. Avkiran (1999). "Regulation of sarcolemmal Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger activity by angiotensin II in adult rat ventricular myocytes: opposing actions via AT₁ versus AT₂ receptors." Circ Res **85**(10): 919-930.
- Haseroth, K., D. Gerdes, S. Berger, M. Feuring, A. Gunther, C. Herbst, M. Christ and M. Wehling (1999). "Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice." Biochem Biophys Res Commun **266**(1): 257-261.
- Haworth, R. S., C. McCann, A. K. Snabaitis, N. A. Roberts and M. Avkiran (2003). "Stimulation of the plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 by sustained intracellular acidosis. Evidence for a novel mechanism mediated by the ERK pathway." J Biol Chem **278**(34): 31676-31684.
- He, B. J., M. L. Joiner, M. V. Singh, E. D. Luczak, P. D. Swaminathan, O. M. Koval, W. Kutschke, C. Allamargot, J. Yang, X. Guan, K. Zimmerman, I. M. Grumbach, R. M. Weiss, D. R. Spitz, C. D. Sigmund, W. M. Blankesteyn, S. Heymans, P. J. Mohler and M. E. Anderson (2011). "Oxidation of CaMKII determines the cardiotoxic effects of aldosterone." Nat Med **17**(12): 1610-1618.
- Herzog, W., K. Powers, K. Johnston and M. Duvall (2015). "A new paradigm for muscle contraction." Front Physiol **6**: 174.

Hill, B. J., S. Gebre, B. Schlicker, R. Jordan and S. Necessary (2010). "Nongenomic inhibition of coronary constriction by 17 β -estradiol, 2-hydroxyestradiol, and 2-methoxyestradiol." Can J Physiol Pharmacol **88**(2): 147-152.

Hill, B. J. F., R. J. Dalton, B. K. Joseph, K. M. Thakali and N. J. Rusch (2017). "17 β -estradiol reduces Cav 1.2 channel abundance and attenuates Ca²⁺ -dependent contractions in coronary arteries." Pharmacol Res Perspect **5**(5).

Hong, T. T., J. W. Smyth, K. Y. Chu, J. M. Vogan, T. S. Fong, B. C. Jensen, K. Fang, M. K. Halushka, S. D. Russell, H. Colecraft, C. W. Hoopes, K. Ocorr, N. C. Chi and R. M. Shaw (2012). "BIN1 is reduced and Cav1.2 trafficking is impaired in human failing cardiomyocytes." Heart Rhythm **9**(5): 812-820.

Hsieh, Y. C., H. P. Yu, M. Frink, T. Suzuki, M. A. Choudhry, M. G. Schwacha and I. H. Chaudry (2007). "G protein-coupled receptor 30-dependent protein kinase A pathway is critical in nongenomic effects of estrogen in attenuating liver injury after trauma-hemorrhage." Am J Pathol **170**(4): 1210-1218.

Huang, C. L. (2017). "Murine Electrophysiological Models of Cardiac Arrhythmogenesis." Physiol Rev **97**(1): 283-409.

Huhtinen, K., R. Desai, M. Stahle, A. Salminen, D. J. Handelsman, A. Perheentupa and M. Poutanen (2012). "Endometrial and endometriotic concentrations of estrone and estradiol are determined by local metabolism rather than circulating levels." J Clin Endocrinol Metab **97**(11): 4228-4235.

Irannejad, R., S. J. Kotowski and M. von Zastrow (2014). "Investigating signaling consequences of GPCR trafficking in the endocytic pathway." Methods Enzymol **535**: 403-418.

Janse, M. J. and A. L. Wit (1989). "Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction." Physiol Rev **69**(4): 1049-1169.

Javadov, S., V. Rajapurohitam, A. Kilic, J. C. Hunter, A. Zeidan, N. Said Faruq, N. Escobales and M. Karmazyn (2011). "Expression of mitochondrial fusion-fission proteins during post-infarction remodeling: the effect of NHE-1 inhibition." Basic Res Cardiol **106**(1): 99-109.

Jean-Alphonse, F. and A. C. Hanyaloglu (2011). "Regulation of GPCR signal networks via membrane trafficking." Mol Cell Endocrinol **331**(2): 205-214.

Jessup, J. A., S. H. Lindsey, H. Wang, M. C. Chappell and L. Groban (2010). "Attenuation of salt-induced cardiac remodeling and diastolic dysfunction by the GPER agonist G-1 in female mRen2.Lewis rats." PLoS One **5**(11): e15433.

Kanda, N. and S. Watanabe (2003). "17 β -estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression." J Invest Dermatol **121**(6): 1500-1509.

Kang, S., Y. Liu, D. Sun, C. Zhou, A. Liu, C. Xu, Y. Hao, D. Li, C. Yan and H. Sun (2012). "Chronic activation of the G protein-coupled receptor 30 with agonist G-1 attenuates heart failure." PLoS One **7**(10): e48185.

- Karmazyn, M., J. V. Sostaric and X. T. Gan (2001). "The myocardial Na⁺/H⁺ exchanger: a potential therapeutic target for the prevention of myocardial ischaemic and reperfusion injury and attenuation of postinfarction heart failure." Drugs **61**(3): 375-389.
- Kashihara, T., T. Nakada, K. Kojima, T. Takeshita and M. Yamada (2017). "Angiotensin II activates Ca_v 1.2 Ca(2⁺) channels through beta-arrestin2 and casein kinase 2 in mouse immature cardiomyocytes." J Physiol **595**(13): 4207-4225.
- Khandoudi, N., J. Albadine, P. Robert, S. Krief, I. Berrebi-Bertrand, X. Martin, M. O. Bevensee, W. F. Boron and A. Brill (2001). "Inhibition of the cardiac electrogenic sodium bicarbonate cotransporter reduces ischemic injury." Cardiovasc Res **52**(3): 387-396.
- Kosaka, Y., N. Quillinan, C. Bond, R. Traystman, P. Hurn and P. Herson (2012). "GPER1/GPR30 activation improves neuronal survival following global cerebral ischemia induced by cardiac arrest in mice." Transl Stroke Res **3**(4): 500-507.
- Krug, A. W., L. H. Pojoga, G. H. Williams and G. K. Adler (2011). "Cell membrane-associated mineralocorticoid receptors? New evidence." Hypertension **57**(6): 1019-1025.
- Kuiper, G. G., B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Haggblad, S. Nilsson and J. A. Gustafsson (1997). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." Endocrinology **138**(3): 863-870.
- Kushnir, M. M., A. L. Rockwood, J. Bergquist, M. Varshavsky, W. L. Roberts, B. Yue, A. M. Bunker and A. W. Meikle (2008). "High-sensitivity tandem mass spectrometry assay for serum estrone and estradiol." Am J Clin Pathol **129**(4): 530-539.
- Lagadic-Gossmann, D., K. J. Buckler and R. D. Vaughan-Jones (1992). "Role of bicarbonate in pH recovery from intracellular acidosis in the guinea-pig ventricular myocyte." J Physiol **458**: 361-384.
- Lagadic-Gossmann, D. and R. D. Vaughan-Jones (1993). "Coupling of dual acid extrusion in the guinea-pig isolated ventricular myocyte to alpha 1- and beta-adrenoceptors." J Physiol **464**: 49-73.
- Le Prigent, K., D. Lagadic-Gossmann and D. Feuvray (1997). "Modulation by pH₀ and intracellular Ca²⁺ of Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange in diabetic rat isolated ventricular myocytes." Circ Res **80**(2): 253-260.
- Lederer, W. J. and R. W. Tsien (1976). "Transient inward current underlying arrhythmogenic effects of cardiotonic steroids in Purkinje fibres." J Physiol **263**(2): 73-100.
- Lee, T. M., S. Z. Lin and N. C. Chang (2014). "Both GPER and membrane oestrogen receptor-alpha activation protect ventricular remodelling in 17beta oestradiol-treated ovariectomized infarcted rats." J Cell Mol Med **18**(12): 2454-2465.
- Leem, C. H., D. Lagadic-Gossmann and R. D. Vaughan-Jones (1999). "Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte." J Physiol **517** (Pt 1): 159-180.

- Lenhart, P. M., S. Broselid, C. J. Barrick, L. M. Leeb-Lundberg and K. M. Caron (2013). "G-protein-coupled receptor 30 interacts with receptor activity-modifying protein 3 and confers sex-dependent cardioprotection." J Mol Endocrinol **51**(1): 191-202.
- Li, W. L., W. Xiang and Y. Ping (2015). "Activation of novel estrogen receptor GPER results in inhibition of cardiocyte apoptosis and cardioprotection." Mol Med Rep **12**(2): 2425-2430.
- Lin, Y. and A. V. Smrcka (2011). "Understanding molecular recognition by G protein betagamma subunits on the path to pharmacological targeting." Mol Pharmacol **80**(4): 551-557.
- Lindsey, S. H., L. Liu and M. C. Chappell (2014). "Vasodilation by GPER in mesenteric arteries involves both endothelial nitric oxide and smooth muscle cAMP signaling." Steroids **81**: 99-102.
- Liu, W., J. Deng, G. Wang, C. Zhang, X. Luo, D. Yan, Q. Su and J. Liu (2014). "KCNE2 modulates cardiac L-type Ca(2+) channel." J Mol Cell Cardiol **72**: 208-218.
- Lothar, A., M. Moser, C. Bode, R. D. Feldman and L. Hein (2015). "Mineralocorticoids in the heart and vasculature: new insights for old hormones." Annu Rev Pharmacol Toxicol **55**: 289-312.
- Macquaide, N., V. Bito and K. R. Sipido (2015). "Measuring sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content, fractional release, and Ca²⁺ buffering in cardiac myocytes." Cold Spring Harb Protoc **2015**(4): 403-407.
- Maggiolini, M. and D. Picard (2010). "The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor." J Endocrinol **204**(2): 105-114.
- Maiti, K., J. W. Paul, M. Read, E. C. Chan, S. C. Riley, P. Nahar and R. Smith (2011). "G-1-activated membrane estrogen receptors mediate increased contractility of the human myometrium." Endocrinology **152**(6): 2448-2455.
- Mandel, F., E. G. Kranias, A. Grassi de Gende, M. Sumida and A. Schwartz (1982). "The effect of pH on the transient-state kinetics of Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. A comparison with skeletal sarcoplasmic reticulum." Circ Res **50**(2): 310-317.
- Marchese, A., M. M. Paing, B. R. Temple and J. Trejo (2008). "G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes." Annu Rev Pharmacol Toxicol **48**: 601-629.
- Matsui, H., W. H. Barry, C. Livsey and K. W. Spitzer (1995). "Angiotensin II stimulates sodium-hydrogen exchange in adult rabbit ventricular myocytes." Cardiovasc Res **29**(2): 215-221.
- Mendez-Luna, D., M. Martinez-Archundia, R. C. Maroun, G. Ceballos-Reyes, M. J. Fragoso-Vazquez, D. E. Gonzalez-Juarez and J. Correa-Basurto (2015). "Deciphering the GPER/GPR30-agonist and antagonists interactions using molecular modeling studies, molecular dynamics, and docking simulations." J Biomol Struct Dyn **33**(10): 2161-2172.

- Meyer, M. R., D. J. Clegg, E. R. Prossnitz and M. Barton (2011). "Obesity, insulin resistance and diabetes: sex differences and role of oestrogen receptors." Acta Physiol (Oxf) **203**(1): 259-269.
- Meyer, M. R., N. C. Fredette, T. A. Howard, C. Hu, C. Ramesh, C. Daniel, K. Amann, J. B. Arterburn, M. Barton and E. R. Prossnitz (2014). "G protein-coupled estrogen receptor protects from atherosclerosis." Sci Rep **4**: 7564.
- Meyer, M. R., E. R. Prossnitz and M. Barton (2011). "The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function." Vascul Pharmacol **55**(1-3): 17-25.
- Mirza, M. A., X. Q. Zhang, B. A. Ahlers, A. Qureshi, L. L. Carl, J. Song, A. L. Tucker, J. P. Mounsey, J. R. Moorman, L. I. Rothblum, T. S. Zhang and J. Y. Cheung (2004). "Effects of phospholemman downregulation on contractility and $[Ca^{2+}]_i$ transients in adult rat cardiac myocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(4): H1322-1330.
- Moolenaar, W. H., R. Y. Tsien, P. T. van der Saag and S. W. de Laat (1983). "Na⁺/H⁺ exchange and cytoplasmic pH in the action of growth factors in human fibroblasts." Nature **304**(5927): 645-648.
- Morisco, C., C. Marrone, J. Galeotti, D. Shao, D. E. Vatner, S. F. Vatner and J. Sadoshima (2008). "Endocytosis machinery is required for beta1-adrenergic receptor-induced hypertrophy in neonatal rat cardiac myocytes." Cardiovasc Res **78**(1): 36-44.
- Murata, T., H. H. Dietrich, C. Xiang and R. G. Dacey, Jr. (2013). "G protein-coupled estrogen receptor agonist improves cerebral microvascular function after hypoxia/reoxygenation injury in male and female rats." Stroke **44**(3): 779-785.
- Nagy, N., A. Kormos, Z. Kohajda, A. Szebeni, J. Szepesi, P. Pollesello, J. Levijoki, K. Acsai, L. Virag, P. P. Nanasi, J. G. Papp, A. Varro and A. Toth (2014). "Selective Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibition prevents Ca²⁺ overload-induced triggered arrhythmias." Br J Pharmacol **171**(24): 5665-5681.
- Nakamura, T. Y., Y. Iwata, Y. Arai, K. Komamura and S. Wakabayashi (2008). "Activation of Na⁺/H⁺ exchanger 1 is sufficient to generate Ca²⁺ signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure." Circ Res **103**(8): 891-899.
- Niederer, S. A. and N. P. Smith (2007). "A mathematical model of the slow force response to stretch in rat ventricular myocytes." Biophys J **92**(11): 4030-4044.
- Nolly, M. B., C. I. Caldiz, A. M. Yeves, M. C. Villa-Abrille, P. E. Morgan, N. Amado Mondaca, E. L. Portiansky, G. E. Chiappe de Cingolani, H. E. Cingolani and I. L. Ennis (2014). "The signaling pathway for aldosterone-induced mitochondrial production of superoxide anion in the myocardium." J Mol Cell Cardiol **67**: 60-68.
- Oakley, F. D., D. Abbott, Q. Li and J. F. Engelhardt (2009). "Signaling components of redox active endosomes: the redoxosomes." Antioxid Redox Signal **11**(6): 1313-1333.
- Olde, B. and L. M. Leeb-Lundberg (2009). "GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology." Trends Endocrinol Metab **20**(8): 409-416.
- Orchard, C. H. and H. E. Cingolani (1994). "Acidosis and arrhythmias in cardiac muscle." Cardiovasc Res **28**(9): 1312-1319.

Orlowski, A., M. C. Ciancio, C. I. Caldiz, V. C. De Giusti and E. A. Aiello (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**(2): 211-219.

Osterrieder, W., G. Brum, J. Hescheler, W. Trautwein, V. Flockerzi and F. Hofmann (1982). "Injection of subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase into cardiac myocytes modulates Ca²⁺ current." Nature **298**(5874): 576-578.

Passaquin, A. C., P. Lhote and U. T. Ruegg (1998). "Calcium influx inhibition by steroids and analogs in C2C12 skeletal muscle cells." Br J Pharmacol **124**(8): 1751-1759.

Patel, V. H., J. Chen, M. Ramanjaneya, E. Karteris, E. Zachariades, P. Thomas, M. Been and H. S. Randeva (2010). "G-protein coupled estrogen receptor 1 expression in rat and human heart: Protective role during ischaemic stress." Int J Mol Med **26**(2): 193-199.

Paulsen, C. E., T. H. Truong, F. J. Garcia, A. Homann, V. Gupta, S. E. Leonard and K. S. Carroll (2011). "Peroxide-dependent sulfenylation of the EGFR catalytic site enhances kinase activity." Nat Chem Biol **8**(1): 57-64.

Peixoto, P., R. D. Aires, V. S. Lemos, N. S. Bissoli and R. L. D. Santos (2017). "GPER agonist dilates mesenteric arteries via PI3K-Akt-eNOS and potassium channels in both sexes." Life Sci **183**: 21-27.

Perez, N. G., M. R. Piaggio, I. L. Ennis, C. D. Garcarena, C. Morales, E. M. Escudero, O. H. Cingolani, G. Chiappe de Cingolani, X. P. Yang and H. E. Cingolani (2007). "Phosphodiesterase 5A inhibition induces Na⁺/H⁺ exchanger blockade and protection against myocardial infarction." Hypertension **49**(5): 1095-1103.

Peterson, B. Z., C. D. DeMaria, J. P. Adelman and D. T. Yue (1999). "Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺ -dependent inactivation of L-type calcium channels." Neuron **22**(3): 549-558.

Pitt, B. (1995). "'Escape' of aldosterone production in patients with left ventricular dysfunction treated with an angiotensin converting enzyme inhibitor: implications for therapy." Cardiovasc Drugs Ther **9**(1): 145-149.

Pitt, B., M. A. Pfeffer, S. F. Assmann, R. Boineau, I. S. Anand, B. Claggett, N. Clausell, A. S. Desai, R. Diaz, J. L. Fleg, I. Gordeev, B. Harty, J. F. Heitner, C. T. Kenwood, E. F. Lewis, E. O'Meara, J. L. Probstfield, T. Shaburishvili, S. J. Shah, S. D. Solomon, N. K. Sweitzer, S. Yang, S. M. McKinlay and T. Investigators (2014). "Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction." N Engl J Med **370**(15): 1383-1392.

Pitt, B., N. Reichek, R. Willenbrock, F. Zannad, R. A. Phillips, B. Roniker, J. Kleiman, S. Krause, D. Burns and G. H. Williams (2003). "Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy: the 4E-left ventricular hypertrophy study." Circulation **108**(15): 1831-1838.

Pitt, B., W. Remme, F. Zannad, J. Neaton, F. Martinez, B. Roniker, R. Bittman, S. Hurley, J. Kleiman, M. Gattlin, E. Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure and I. Survival Study (2003). "Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction." N Engl J Med **348**(14): 1309-1321.

Pitt, B., F. Zannad, W. J. Remme, R. Cody, A. Castaigne, A. Perez, J. Palensky and J. Wittes (1999). "The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators." N Engl J Med **341**(10): 709-717.

Poole, R. C., A. P. Halestrap, S. J. Price and A. J. Levi (1989). "The kinetics of transport of lactate and pyruvate into isolated cardiac myocytes from guinea pig. Kinetic evidence for the presence of a carrier distinct from that in erythrocytes and hepatocytes." Biochem J **264**(2): 409-418.

Prossnitz, E. R. and M. Barton (2014). "Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities." Mol Cell Endocrinol **389**(1-2): 71-83.

Quadroni, M., E. L. L'Hostis, C. Corti, I. Myagkikh, I. Durussel, J. Cox, P. James and E. Carafoli (1998). "Phosphorylation of calmodulin alters its potency as an activator of target enzymes." Biochemistry **37**(18): 6523-6532.

Quinn, J. A., C. T. Graeber, A. R. Frackelton, Jr., M. Kim, J. E. Schwarzbauer and E. J. Filardo (2009). "Coordinate regulation of estrogen-mediated fibronectin matrix assembly and epidermal growth factor receptor transactivation by the G protein-coupled receptor, GPR30." Mol Endocrinol **23**(7): 1052-1064.

Raifman, T. K., P. Kumar, H. Haase, E. Klussmann, N. Dascal and S. Weiss (2017). "Protein kinase C enhances plasma membrane expression of cardiac L-type calcium channel, CaV1.2." Channels (Austin) **11**(6): 604-615.

Rask-Andersen, M., S. Masuram and H. B. Schioth (2014). "The druggable genome: Evaluation of drug targets in clinical trials suggests major shifts in molecular class and indication." Annu Rev Pharmacol Toxicol **54**: 9-26.

Ren, Y., M. A. D'Ambrosio, J. L. Garvin, P. Leung, K. Kutskill, H. Wang, E. L. Peterson and O. A. Carretero (2014). "Aldosterone sensitizes connecting tubule glomerular feedback via the aldosterone receptor GPR30." Am J Physiol Renal Physiol **307**(4): F427-434.

Revankar, C. M., D. F. Cimino, L. A. Sklar, J. B. Arterburn and E. R. Prossnitz (2005). "A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling." Science **307**(5715): 1625-1630.

Revankar, C. M., H. D. Mitchell, A. S. Field, R. Burai, C. Corona, C. Ramesh, L. A. Sklar, J. B. Arterburn and E. R. Prossnitz (2007). "Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30." ACS Chem Biol **2**(8): 536-544.

Richards, M. A., J. D. Clarke, P. Saravanan, N. Voigt, D. Dobrev, D. A. Eisner, A. W. Trafford and K. M. Dibb (2011). "Transverse tubules are a common feature in large mammalian atrial myocytes including human." Am J Physiol Heart Circ Physiol **301**(5): H1996-2005.

Robert, V., N. Van Thiem, S. L. Cheav, C. Mouas, B. Swynghedauw and C. Delcayre (1994). "Increased cardiac types I and III collagen mRNAs in aldosterone-salt hypertension." Hypertension **24**(1): 30-36.

Rocca, C., S. Femmino, G. Aquila, M. C. Granieri, E. M. De Francesco, T. Pasqua, D. C. Rigracciolo, F. Fortini, M. C. Cerra, M. Maggiolini, P. Pagliaro, P. Rizzo, T. Angelone and C. Penna (2018). "Notch1 Mediates Preconditioning Protection Induced by GPER in Normotensive and Hypertensive Female Rat Hearts." Front Physiol **9**: 521.

Rocha, R., A. E. Rudolph, G. E. Friedrich, D. A. Nachowiak, B. K. Kekec, E. A. Blomme, E. G. McMahon and J. A. Delyani (2002). "Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(5): H1802-1810.

Rocha, R., C. T. Stier, Jr., I. Kifor, M. R. Ochoa-Maya, H. G. Rennke, G. H. Williams and G. K. Adler (2000). "Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy." Endocrinology **141**(10): 3871-3878.

Roos, A. and W. F. Boron (1981). "Intracellular pH." Physiol Rev **61**(2): 296-434.

Rosano, C., M. Ponassi, M. F. Santolla, A. Pisano, L. Felli, A. Vivacqua, M. Maggiolini and R. Lappano (2016). "Macromolecular Modelling and Docking Simulations for the Discovery of Selective GPER Ligands." AAPS J **18**(1): 41-46.

Rossi, G. P., A. Sacchetto, E. Pavan, P. Palatini, G. R. Graniero, C. Canali and A. C. Pessina (1997). "Remodeling of the left ventricle in primary aldosteronism due to Conn's adenoma." Circulation **95**(6): 1471-1478.

Rossignol, P., J. Menard, R. Fay, F. Gustafsson, B. Pitt and F. Zannad (2011). "Eplerenone survival benefits in heart failure patients post-myocardial infarction are independent from its diuretic and potassium-sparing effects. Insights from an EPHEBUS (Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study) substudy." J Am Coll Cardiol **58**(19): 1958-1966.

Rothstein, E. C., K. L. Byron, R. E. Reed, L. Fliegel and P. A. Lucchesi (2002). "H₂O₂-induced Ca²⁺ overload in NRVM involves ERK1/2 MAP kinases: role for an NHE-1-dependent pathway." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(2): H598-605.

Saegusa, N., E. Moorhouse, R. D. Vaughan-Jones and K. W. Spitzer (2011). "Influence of pH on Ca²⁺ current and its control of electrical and Ca²⁺ signaling in ventricular myocytes." J Gen Physiol **138**(5): 537-559.

Sandmann, S., M. Yu, E. Kaschina, A. Blume, E. Bouzinova, C. Aalkjaer and T. Unger (2001). "Differential effects of angiotensin AT₁ and AT₂ receptors on the expression, translation and function of the Na⁺-H⁺ exchanger and Na⁺-HCO₃⁻ symporter in the rat heart after myocardial infarction." J Am Coll Cardiol **37**(8): 2154-2165.

Sardet, C., L. Counillon, A. Franchi and J. Pouyssegur (1990). "Growth factors induce phosphorylation of the Na⁺/H⁺ antiporter, glycoprotein of 110 kD." Science **247**(4943): 723-726.

Scita, G. and P. P. Di Fiore (2010). "The endocytic matrix." Nature **463**(7280): 464-473.

Scholz, W., U. Albus, L. Counillon, H. Gogelein, H. J. Lang, W. Linz, A. Weichert and B. A. Scholkens (1995). "Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion." Cardiovasc Res **29**(2): 260-268.

Shahid, M. and I. W. Rodger (1989). "The inotropic effect of 4-aminopyridine and pH changes in rabbit papillary muscle." J Pharm Pharmacol **41**(9): 601-606.

Shannon, T. R., K. S. Ginsburg and D. M. Bers (2002). "Quantitative assessment of the SR Ca²⁺ leak-load relationship." Circ Res **91**(7): 594-600.

Sharma, G. and E. R. Prossnitz (2011). "Mechanisms of estradiol-induced insulin secretion by the G protein-coupled estrogen receptor GPR30/GPER in pancreatic beta-cells." Endocrinology **152**(8): 3030-3039.

Snabaitis, A. K., F. Cuello and M. Avkiran (2008). "Protein kinase B/Akt phosphorylates and inhibits the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger NHE1." Circ Res **103**(8): 881-890.

Snabaitis, A. K., R. D'Mello, S. Dashnyam and M. Avkiran (2006). "A novel role for protein phosphatase 2A in receptor-mediated regulation of the cardiac sarcolemmal Na⁺/H⁺ exchanger NHE1." J Biol Chem **281**(29): 20252-20262.

Sun, B., C. H. Leem and R. D. Vaughan-Jones (1996). "Novel chloride-dependent acid loader in the guinea-pig ventricular myocyte: part of a dual acid-loading mechanism." J Physiol **495** (Pt 1): 65-82.

Swedberg, K., P. Eneroth, J. Kjekshus and L. Wilhelmsen (1990). "Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group." Circulation **82**(5): 1730-1736.

Tada, M., M. A. Kirchberger and A. M. Katz (1975). "Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase." J Biol Chem **250**(7): 2640-2647.

Tada, M., M. A. Kirchberger, D. I. Repke and A. M. Katz (1974). "The stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase." J Biol Chem **249**(19): 6174-6180.

Thomas, P., Y. Pang, E. J. Filardo and J. Dong (2005). "Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells." Endocrinology **146**(2): 624-632.

Tica, A. A., E. C. Dun, O. S. Tica, X. Gao, J. B. Arterburn, G. C. Brailoiu, T. I. Oprea and E. Brailoiu (2011). "G protein-coupled estrogen receptor 1-mediated effects in the rat myometrium." Am J Physiol Cell Physiol **301**(5): C1262-1269.

Tohgo, A., E. W. Choy, D. Gesty-Palmer, K. L. Pierce, S. Laporte, R. H. Oakley, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz and L. M. Luttrell (2003). "The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation." J Biol Chem **278**(8): 6258-6267.

Tonegawa, K., W. Otsuka, S. Kumagai, S. Matsunami, N. Hayamizu, S. Tanaka, K. Moriwaki, M. Obana, M. Maeda, M. Asahi, H. Kiyonari, Y. Fujio and H. Nakayama (2017). "Caveolae-specific activation loop between CaMKII and L-type Ca(2+) channel aggravates cardiac hypertrophy in alpha1-adrenergic stimulation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **312**(3): H501-H514.

Ullrich, N. D., A. Krust, P. Collins and K. T. MacLeod (2008). "Genomic deletion of estrogen receptors ERalpha and ERbeta does not alter estrogen-mediated inhibition of Ca²⁺ influx and contraction in murine cardiomyocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **294**(6): H2421-2427.

Van Petegem, F., K. A. Clark, F. C. Chatelain and D. L. Minor, Jr. (2004). "Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain." Nature **429**(6992): 671-675.

Vaughan-Jones, R. D., K. W. Spitzer and P. Swietach (2009). "Intracellular pH regulation in heart." J Mol Cell Cardiol **46**(3): 318-331.

Vaughan-Jones, R. D., F. C. Villafuerte, P. Swietach, T. Yamamoto, A. Rossini and K. W. Spitzer (2006). "pH-Regulated Na⁺ influx into the mammalian ventricular myocyte: the relative role of Na⁺-H⁺ exchange and Na⁺-HCO₃⁻ Co-transport." J Cardiovasc Electrophysiol **17 Suppl 1**: S134-S140.

Verdonck, F., P. G. Volders, M. A. Vos and K. R. Sipido (2003). "Increased Na⁺ concentration and altered Na/K pump activity in hypertrophied canine ventricular cells." Cardiovasc Res **57**(4): 1035-1043.

Villa-Abrille, M. C., E. Cingolani, H. E. Cingolani and B. V. Alvarez (2011). "Silencing of cardiac mitochondrial NHE1 prevents mitochondrial permeability transition pore opening." Am J Physiol Heart Circ Physiol **300**(4): H1237-1251.

Villa-Abrille, M. C., M. G. Petroff and E. A. Aiello (2007). "The electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransport modulates resting membrane potential and action potential duration in cat ventricular myocytes." J Physiol **578**(Pt 3): 819-829.

Volkers, M., C. Weidenhammer, N. Herzog, G. Qiu, K. Spaich, F. V. Wegner, K. Peppel, O. J. Muller, S. Schinkel, J. E. Rabinowitz, H. J. Hippe, H. Brinks, H. A. Katus, W. J. Koch, A. D. Eckhart, O. Friedrich and P. Most (2011). "The inotropic peptide betaARKct improves betaAR responsiveness in normal and failing cardiomyocytes through G(betagamma)-mediated L-type calcium current disinhibition." Circ Res **108**(1): 27-39.

Wakabayashi, S., B. Bertrand, T. Ikeda, J. Pouyssegur and M. Shigekawa (1994). "Mutation of calmodulin-binding site renders the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) highly H⁺-sensitive and Ca²⁺ regulation-defective." J Biol Chem **269**(18): 13710-13715.

Wang, H., J. A. Jessup, M. S. Lin, C. Chagas, S. H. Lindsey and L. Groban (2012). "Activation of GPR30 attenuates diastolic dysfunction and left ventricle remodelling in oophorectomized mRen2.Lewis rats." Cardiovasc Res **94**(1): 96-104.

Wang, H., N. L. Silva, P. A. Lucchesi, R. Haworth, K. Wang, M. Michalak, S. Pelech and L. Fliegel (1997). "Phosphorylation and regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger through mitogen-activated protein kinase." Biochemistry **36**(30): 9151-9158.

Wang, X., G. Gao, K. Guo, V. Yarotsky, C. Huang, K. S. Elmslie and B. Z. Peterson (2010). "Phospholemman modulates the gating of cardiac L-type calcium channels." Biophys J **98**(7): 1149-1159.

Ward, M. L., I. A. Williams, Y. Chu, P. J. Cooper, Y. K. Ju and D. G. Allen (2008). "Stretch-activated channels in the heart: contributions to length-dependence and to cardiomyopathy." Prog Biophys Mol Biol **97**(2-3): 232-249.

Weber, K. T., C. G. Brilla and J. S. Janicki (1993). "Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors." Cardiovasc Res **27**(3): 341-348.

Wehling, M., J. Kasmayr and K. Theisen (1991). "Rapid effects of mineralocorticoids on sodium-proton exchanger: genomic or nongenomic pathway?" Am J Physiol **260**(5 Pt 1): E719-726.

Wei, S., A. Guo, B. Chen, W. Kutschke, Y. P. Xie, K. Zimmerman, R. M. Weiss, M. E. Anderson, H. Cheng and L. S. Song (2010). "T-tubule remodeling during transition from hypertrophy to heart failure." Circ Res **107**(4): 520-531.

Weil, B. R., M. C. Manukyan, J. L. Herrmann, Y. Wang, A. M. Abarbanell, J. A. Poynter and D. R. Meldrum (2010). "Signaling via GPR30 protects the myocardium from ischemia/reperfusion injury." Surgery **148**(2): 436-443.

Weiss, S., T. Keren-Raifman, S. Oz, A. Ben Mocha, H. Haase and N. Dascal (2012). "Modulation of distinct isoforms of L-type calcium channels by G(q)-coupled receptors in *Xenopus* oocytes: antagonistic effects of Gbetagamma and protein kinase C." Channels (Austin) **6**(6): 426-437.

Wells, G. J. (2014). "Allosteric modulators of G protein-coupled receptors." Curr Top Med Chem **14**(15): 1735-1737.

Whalley, D. W., P. D. Hemsworth and H. H. Rasmussen (1991). "Sodium-hydrogen exchange in guinea-pig ventricular muscle during exposure to hyperosmolar solutions." J Physiol **444**: 193-212.

Wu, M. L. and R. D. Vaughan-Jones (1994). "Effect of metabolic inhibitors and second messengers upon Na(+)-H+ exchange in the sheep cardiac Purkinje fibre." J Physiol **478** (Pt 2): 301-313.

Xu, P. and K. W. Spitzer (1994). "Na-independent Cl(-)-HCO₃⁻ exchange mediates recovery of pHi from alkalosis in guinea pig ventricular myocytes." Am J Physiol **267**(1 Pt 2): H85-91.

Yamamoto, T., T. Shirayama, T. Sakatani, T. Takahashi, H. Tanaka, T. Takamatsu, K. W. Spitzer and H. Matsubara (2007). "Enhanced activity of ventricular Na⁺-HCO₃⁻ cotransport in pressure overload hypertrophy." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(2): H1254-1264.

Yamamoto, T., P. Swietach, A. Rossini, S. H. Loh, R. D. Vaughan-Jones and K. W. Spitzer (2005). "Functional diversity of electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransport in ventricular myocytes from rat, rabbit and guinea pig." J Physiol **562**(Pt 2): 455-475.

Yang, L., D. F. Dai, C. Yuan, R. E. Westenbroek, H. Yu, N. West, H. O. de la Iglesia and W. A. Catterall (2016). "Loss of beta-adrenergic-stimulated phosphorylation of CaV1.2 channels on Ser1700 leads to heart failure." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(49): E7976-E7985.

Young, M., M. Fullerton, R. Dilley and J. Funder (1994). "Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis." J Clin Invest **93**(6): 2578-2583.

Young, M. J. and A. J. Rickard (2012). "Mechanisms of mineralocorticoid salt-induced hypertension and cardiac fibrosis." Mol Cell Endocrinol **350**(2): 248-255.

Zaniboni, M., P. Swietach, A. Rossini, T. Yamamoto, K. W. Spitzer and R. D. Vaughan-Jones (2003). "Intracellular proton mobility and buffering power in cardiac ventricular

myocytes from rat, rabbit, and guinea pig." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(3): H1236-1246.

Zannad, F., J. J. McMurray, H. Krum, D. J. van Veldhuisen, K. Swedberg, H. Shi, J. Vincent, S. J. Pocock, B. Pitt and E.-H. S. Group (2011). "Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms." N Engl J Med **364**(1): 11-21.

Zhang, B., S. Subramanian, S. Dziennis, J. Jia, M. Uchida, K. Akiyoshi, E. Migliati, A. D. Lewis, A. A. Vandenberg, H. Offner and P. D. Hurn (2010). "Estradiol and G1 reduce infarct size and improve immunosuppression after experimental stroke." J Immunol **184**(8): 4087-4094.

Zuhlke, R. D., G. S. Pitt, K. Deisseroth, R. W. Tsien and H. Reuter (1999). "Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels." Nature **399**(6732): 159-162.

Zuhlke, R. D. and H. Reuter (1998). "Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha1C subunit." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3287-3294.