



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Biológicas

Trabajo de Tesis Doctoral

“Rol fisiopatológico del receptor de estrógenos
acoplado a proteína G (GPER) en la electrofisiología
cardíaca”

Tesista: Lic. Leandro Agustín Diaz Zegarra

Director: Dr. Ernesto Alejandro Aiello

Co-Directora: Dra. Verónica Celeste De Giusti

2023

INDICE

Agradecimientos	.4
Abreviaturas	.5
Introducción	.9
1.1 Receptores acoplados a proteína G	.9
2.1 Receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER)	.11
2.1.1 Localización	.12
2.1.2 Ligandos de GPER	.13
2.1.2.1 Estradiol	.13
2.1.2.2 Agonista sintético, G1	.14
2.1.2.3 Antagonistas sintéticos: G-15, G-36 y CIMBA	.15
2.1.3 Actividad fisiológica de GPER	.15
2.1.4 Actividad fisiopatológica de GPER	.16
3.1 Corazón	.18
3.1.1 Célula muscular cardíaca	.19
3.1.1.1 Filamentos Gruesos	.20
3.1.1.2 Filamentos Finos	.20
3.1.2 Acoplamiento excito-contráctil	.21
3.1.2.1 Potencial de acción cardíaco	.22
3.1.2.2 El calcio como mediador del AEC	.23
3.1.2.3 Mecanismo de contracción	.24
3.1.2.4 Mecanismo de relajación	.24
3.1.3 Electrofisiología cardíaca	.25

3.1.4 Hipertrofia cardíaca	.27
4.1 Corriente iónica	.29
5.1 Canales iónicos	.31
5.1.1 Canal de calcio tipo-L	.33
5.1.2 Canales de potasio	.37
5.1.2.1 Canales Kv	.39
5.1.2.2 Canales Kir	.41
5.1.2.3 Regulación de canales de K ⁺	.42
5.1.3 Canales e hipertrofia	.43
Hipótesis	.45
Objetivos Generales	.46
Objetivos Específicos	.46
Materiales y Métodos	.48
Resultados	.64
1. Determinación de la señalización de GPER en corazones de ratas Normotróficos	.64
2. Determinación de actividad de GPER en ratones Normotróficos (SHAM) e Hipertróficos (TAC)	.72
Discusión y Conclusiones	.96
Conclusión General	.106
Referencias	.109

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Alex, por ser mi director; y a Vero por ser mi codirectora de tesis, desarrollada en el Centro de Investigaciones Cardiovasculares. Gracias a sus valiosos aportes y sugerencias durante el desarrollo del presente trabajo.

Le agradezco a los integrantes del Alex Lab por su apoyo y sugerencias en todos estos años.

Al personal de apoyo, en especial a Moni, por su ayuda durante los aislamientos en los primeros años de becario.

A mis viejos por bancarme tantos años de estudio de grado y parte de posgrado.

A Yani, que me aguantó todos mis bajones y me calmó cuando los experimentos no salían.

Gracias a todos.

ABREVIATURAS

AEC → acoplamiento excito-contráctil

AID → dominio de interacción α

AMPc → adenosina monofosfato cíclico

ANP → péptido natriurético atrial

AS → acortamiento sarcomérico

ATP → adenosina trifosfato

BID → dominio de interacción β

BNP → péptido natriurético cerebral

CaL → canales de calcio tipo L

CaM → calmodulina

CaMKII → calcio calmodulina kinasa 2

CaT → transitorio de calcio

CIMBA → 2-cyclohexil-4-isopropil-N-(4-metoxibenzil) anilina

DMSO → dimetilsulfóxido

DPA → duración del potencial de acción

DPP → proteína similar a la dipeptidil peptidasa

E1 → estrona

E2 → 17- β -estradiol

E3 → estriol

EE → estado estacionario

EGFR → receptor del factor de crecimiento epidérmico

eNOS → óxido nítrico sintasa endotelial

ER → receptor de estrógeno

Erk1/2 → enzima extracelular regulada por señal extracelular

ER α → receptor de estrógeno α

Er β → receptor de estrógeno β

Em → potencial de membrana

Ex → potencial de equilibrio del ion X

FAEn → fracción de acortamiento endocárdico

G1 → rel-1-[4-(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)-3aR,4S,5,9bS-tetrahidro-3H-cyclopenta[c]quinolin-8-yl]-etanona

G15 → (3aS,4R,9bR)-4-(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahidro-3H-cyclopenta[c]quinolina

G36 → (4S)-rel-4-(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)-3aR,4,5,9bS-tetrahidro-8-(1-metiletil)-3H-ciclopenta[c]quinolina

GDP → guanosina di fosfato

GMPC → guanosina monofosfato cíclico

GPCR → receptor de estrógenos acoplado a proteína G

GPER → receptor de estrógenos acoplado a proteína G

GPR30 → receptor acoplado a proteína G 30

GTP → guanosina tri fosfato

HC → hipertrofia cardíaca

HEK → Human Embryonic Kidney

HEPES → Acido N-(2-Hidroxietil) piperazina-N'-(2-ethanesulfonico)

I_{CaL} → corriente de calcio tipo L

I_{K1} → corriente de potasio rectificadora entrante

IMVI → índice de masa ventricular izquierda

I_{Na} → corriente de sodio

i.p → intraperitoneal

I_{to} → corriente de potasio transitoria saliente

KChIP → proteína de interacción con los canales Kv

Kd → constante de disociación

LCIC → liberación de calcio inducida por calcio

LEC → líquido extracelular

LIC → líquido intracelular

L-NAME → N ω -Nitro-L-arginina metil ester

MCU → uniporte de calcio mitocondrial

MLC → cadena liviana de la miosina

NA → noradrenalina

NCX → intercambiador sodio calcio

NO → óxido nítrico

Nodo SA → nodo sinoauricular

OVX → ovariectomía

PA → potencial de acción

PAC → potencial de acción cardíaco

PE → potencial electrotónico

PI3K → fosfatidilinositol 3 kinasa

PIP2 → fosfatidil inositol-4,5-bifosfato

PKA → proteína quinasa dependiente de AMPc

PKB → proteína quinasa B

PKC → proteína quinasa C

PKG → proteína quinasa G

PLN → fosfolamban

PMCA → ATPasa de calcio de la membrana plasmática

PMR → potencial de membrana en reposo

Po → probabilidad de apertura de un canal

PP1 → protein fosfatasa 1

PTK → protein tirosin kinasa

PU → potencial de umbral

RAMP → proteínas modificadoras de la actividad del receptor

ROS → especie reactiva de oxigeno

RS → retículo sarcoplasmático

RyR → receptor de rianodina

SERCA → ATPasa de calcio del retículo sarcoplasmático

sGC → guanilato ciclasa soluble

TAC → constricción aórtica transversa

TnC → troponina C

TnI → troponina I

TnT → troponina T

WC → Whole Cell (célula entera)

ΔE → gradiente eléctrico

ΔQ → gradiente químico

$\Delta \Psi$ → gradiente electroquímico

INTRODUCCION

1.1 Receptores acoplados a proteína G

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR de sus siglas en inglés, *G protein coupled receptor*) constituye la familia más grande de receptores de la superficie celular, con más de mil miembros conocidos o predichos a partir de secuenciación genómica. Los GPCRs median las respuestas celulares a un conjunto diversos de moléculas de señalización, ya sean hormonas, neurotransmisores, quimosinas y péptidos regulatorios ¹. A pesar de la diversidad química de sus ligandos, la mayoría de los receptores de esta clase presentan una estructura similar (**Figura 1**). Consta de una única cadena polipeptídica con siete segmentos α -hélices transmembrana, un extremo N-terminal extracelular que presenta glicosilación, un gran bucle citoplasmático que se compone principalmente de aminoácidos hidrófilos entre las hélices 5 y 6, y un dominio hidrófilo en el extremo C-terminal citoplasmático ¹.

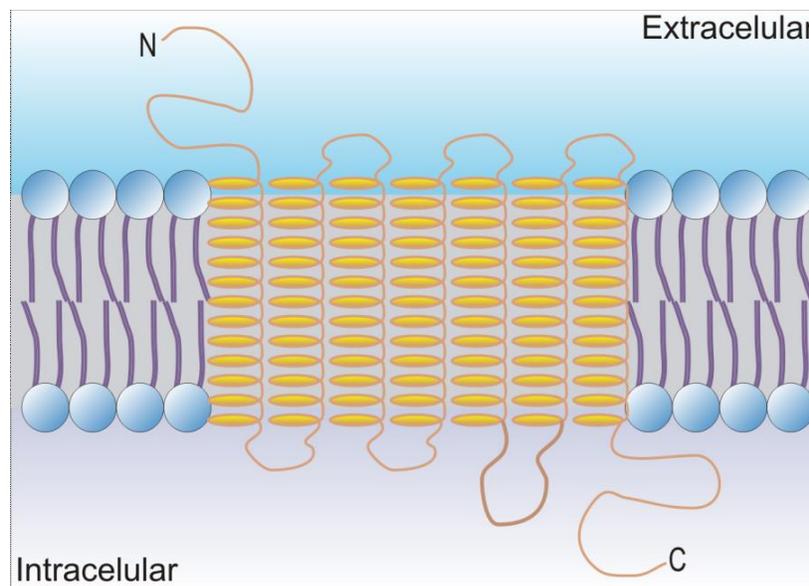


Figura 1 - Estructura transmembrana estándar de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs).

La estimulación de estos receptores, con un determinado ligando, media la activación de proteínas de unión a GTP (proteína G), que regula varios efectores celulares, como enzimas específicas y canales iónicos¹. La proteína G es una proteína heterotrimérica, la cual hidroliza GTP y alterna entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo unido a GDP². La proteína G está constituida por tres subunidades: α , β y γ , que pueden variar entre tejidos presentes en un mismo organismo, otorgando una gran variabilidad de efectos. Los GPCRs más conocidos en el organismo son: proteína Gs, Gi, Gi/o y Gq. Una vez activo el GPCR, las subunidades se separan permitiendo iniciar la señalización correspondiente. La subunidad α se une al GTP hidrolizándolo e interactúa con proteínas efectoras posteriores, como enzimas. Por ejemplo, GPCR acoplado a Gs activa a la adenilato-ciclasa². Por su parte, las subunidades $\beta\gamma$ intervienen en la transducción de señales al interactuar con moléculas efectoras distintas de las reguladas por las subunidades α .

Posterior a la unión de un determinado ligando al GPCR correspondiente, se inician procesos diversos de señalización intracelular. Una vez iniciado este proceso, mecanismos de regulación se ponen en marcha. La endocitosis de los receptores evita que se produzca una sobre estimulación en el tejido, proceso conocido como desensibilización. Una vez endocitado los GPCRs siguen dos caminos: se reciclan rápidamente, permitiendo restablecer receptores funcionales, favoreciendo la estimulación nuevamente del tejido (proceso conocido como resensibilización); o son señalizados para degradación, lo que provoca disminución o cese de la señalización en el tejido diana³⁻⁵. Estos procesos permiten proteger al tejido frente a una estimulación continua del ligando, regulando así la señalización intracelular del receptor.

Cerca de ochocientos GPCRs han sido identificados en el humano y cerca de la mitad actúan a nivel sensorial, el resto de los receptores actúan en procesos de señalización de varios ligandos y son los blancos terapéuticos para fármacos en el ámbito clínico⁶.

La caracterización de un nuevo GPCR se debe principalmente a la secuenciación genómica del receptor en el tejido en cuestión ¹. A partir de una base de datos conocidos de GPCRs, se asocian los datos de secuenciación y se predice si presentan secuencias homólogas para indicar si es o no un GPCR. No se realiza a partir de posibles ligandos del receptor, por la posibilidad de que el ligando estudiado interaccione con otro receptor que no se desea estudiar y porque no se conoce aún con exactitud qué ligando podría interactuar con el receptor. Por lo tanto, una vez identificado el GPCR, a este se lo identifica como receptor huérfano (GPCR huérfano) debido a la falta de datos para la determinación de su o sus posible/s ligandos ⁷.

2.1 Receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER)

Así el GPER inicialmente fue caracterizado como un receptor huérfano debido a que no se conocía ligando alguno que podría activarlo. En la última década del siglo XX se determinó que su estructura característica presentaba homologías a un GPCR, tales como: estructura de siete segmentos α -hélices transmembrana, un extremo N-terminal extracelular, un gran bucle citoplasmático, y un dominio hidrófilo en el extremo C-terminal citoplasmático ¹. Se caracterizó además que podría interactuar con los estrógenos por su homología del sitio de unión a ligando, en su secuencia genómica, de los receptores de estrógenos clásicos (ER, ER α y ER β), denominándolo GPR30 inicialmente ⁸, para años más tarde denominarlo GPER.

Los estudios para caracterizar las implicancias fisiológicas del GPR30 continuaron sin presentar especificidad hacia él, postulando a los estrógenos como posible ligando. Por ejemplo, aumentan los niveles de Erk1/2 en presencia de 17- β -estradiol (E2) en células que presentan y no presentan los ERs ⁹ y se generan cambios rápidos en el manejo de calcio por E2 ¹⁰, entre otros efectos que podrían implicar al GPR30 con los estrógenos.

En 2006, por screening biomolecular y por testeos computacionales, se sintetizó el agonista selectivo a GPR30, el G1¹¹. Gracias a la síntesis del G1, el enfoque para determinar el ligando de GPR30 permitió dilucidar que los estrógenos activan al receptor permitiendo así confirmar que los mismos son sus ligandos¹². Gracias a la síntesis del G1 las implicancias fisiológicas del GPR30, ahora llamado GPER (nomenclatura designada por la *International Union of Basic and Clinical Pharmacology*), permitió investigar los efectos producidos por su activación de forma más específica, obteniéndose efectos rápidos o no genómicos (llamadas así por no involucrar fenómenos de expresión génica), diferente a los receptores ERs clásicos¹⁰, y de actividad fisiológica similar a E2¹².

2.1.1 Localización

Es ampliamente conocido hace años que los estrógenos regulan varios procesos funcionales en numerosos tejidos, sin embargo, lo que no se sabía era si el GPER podría estar involucrado en estos procesos. Durante la identificación de su estructura, se realizaron estudios para determinar en qué tejidos se encuentra expresado, observándose que el GPER se encuentra asociado a varios tejidos humanos, pero con diferentes grados de expresión, siendo el cerebro, los pulmones, páncreas e hígados los tejidos de menor expresión, y el corazón y la placenta los órganos de mayor expresión de este receptor⁸. Además, se ha determinado su expresión en varios grupos de células patológicas, como cáncer de mama, cáncer endometrial y en líneas celulares derivadas de cáncer¹³⁻¹⁵.

Su localización celular, por otro lado, presenta un grado de dificultad a la hora de poder determinarlo. En principio se creía que, por ser un GPCR, debería estar en la membrana celular para que el ligando pueda reconocerlo y activarlo¹⁶. Sin embargo, se observó, mediante técnicas de inmunofluorescencia, que presenta expresión en un sistema reticular intercelular, abarcando a la envoltura nuclear, en fibroblastos derivadas de riñón¹⁰. Se

encontró el mismo patrón de distribución en músculo liso de tejido vascular ¹⁷, sin embargo, al seguir determinando la localización celular, diversos grupos de trabajo han demostrado que el GPER se encuentra en la membrana plasmática de epitelio uterino ¹⁸, el miometrio ¹⁹, el epitelio renal ²⁰ y neuronas del hipocampo ²¹. Por lo tanto, se puede establecer que el GPER puede encontrarse en la membrana plasmática y/o en el interior celular ²².

Como se mencionó anteriormente, GPER presenta expresión en el corazón ⁸ y, además, se determinó que su expresión es independiente del sexo ²³, permitiendo su estudio en ambos géneros. Es importante mencionar que en nuestro laboratorio se determinó la localización de este receptor en los túbulos T de los cardiomiocitos, sugiriendo que su señalización podría ser relevante para el acoplamiento éxito-contráctil ²⁴.

2.1.2 Ligandos del GPER

2.1.2.1 Estradiol

Ya establecido como su ligando endógeno, los estrógenos son hormonas sexuales femeninas sintetizadas y secretadas principalmente por los ovarios. De forma endógena, hay 3 tipos de estrógenos: la estrona (E1), hormona poco abundante en el organismo; estriol (E3), producida en gran cantidad durante el embarazo; y estradiol (E2, **Figura 2**), la forma más activa y fisiológica de los tres estrógenos. Su biosíntesis involucra al colesterol como precursor, dando lugar a la biosíntesis de testosterona para finalmente, mediante una reacción de aromatización, producir E2 ².

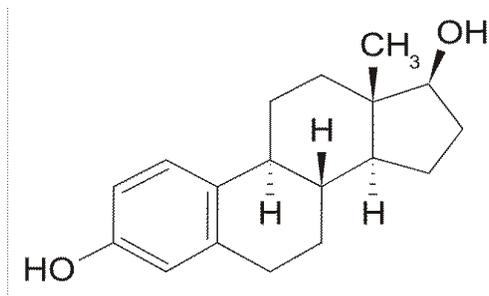


Figura 2 – Estructura del estradiol, E2.

La actividad de E2 en sus ERs clásicos presenta una constante de disociación (K_d) de entre 0.1-0.4 nM, determinadas en varios sistemas de estudio, entre los cuales podemos encontrar células permeabilizadas, homogenatos de células o tejidos, unión a ERs purificados o por unión de E2 al dominio de unión proteico^{11, 25, 26}. En cuanto a la actividad de E2 actuando sobre el GPER, este presenta un K_d de aproximadamente 3-6 nM, unas diez veces mayor que sus receptores clásicos^{10, 27}.

2.1.2.2 Agonista sintético, G1

Como se describió anteriormente, el agonista sintético para el GPER es el G1 (**Figura 3**). La síntesis de este compuesto permitió dilucidar no solo que el GPER es receptor para los estrógenos, sino que también permitió determinar sus implicancias fisiológicas con mayor especificidad, ya que el GPER presenta afinidad a varios compuestos endógenos o exógenos^{28, 29}.

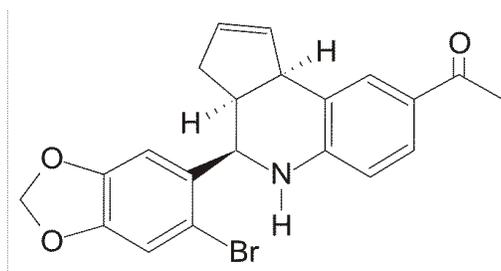


Figura 3 – Estructura de G1, agonista sintético de GPER.

Debido a su estructura química, G1 difiere de E2 por poseer características no esteroideas y alta especificidad hacia GPER y muy poca afinidad hacia los receptores ERs clásicos, presentando cierta afinidad hacia estos receptores a concentraciones mayores a $1 \mu\text{M}$ ¹¹.

2.1.2.3 Antagonistas sintéticos, G-15, G-36 y CIMBA

Para asegurar una mejor designación a los efectos generados por la activación de GPER tanto por G1 como por E2, fue necesario la síntesis de antagonistas selectivos a GPER. Del mismo modo que G1, se realizaron screening biomoleculares y testeos computacionales para determinar la estructura de los antagonistas basándose en la estructura del G1. El primero en sintetizarse fue G15³⁰ presentando afinidad similar a G1, y poca afinidad hacia los ERs (**Figura 4A**). El segundo en sintetizarse fue G36³¹, presentando una mejora en el antagonismo de GPER respecto a G15 (**Figura 4B**). Y finalmente, un antagonista relativamente nuevo, CIMBA, permitió diferenciar la actividad de GPER a partir de un compuesto diferente químicamente respecto a los dos anteriores antagonistas (**Figura 4C**)³².

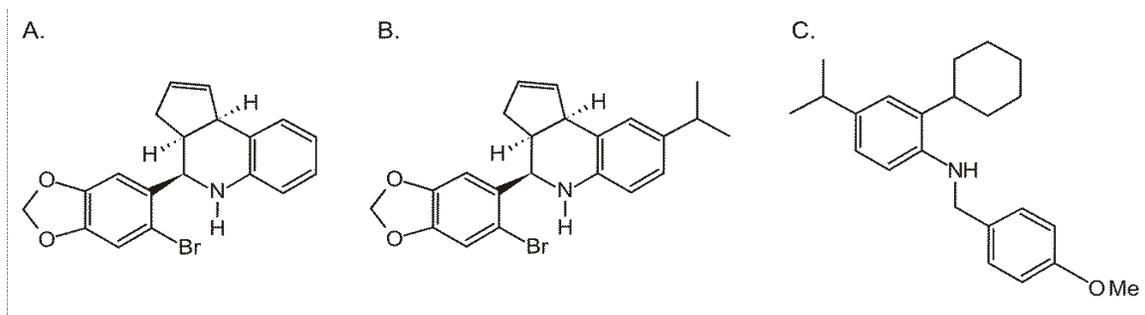


Figura 4 – Antagonistas de GPER. **A.** G15. **B.** G36. **C.** CIMBA.

2.1.3 Actividad fisiológica del GPER

El estudio de GPER ha llevado a determinar una amplia gama de vías fisiológicas estableciendo así efectos tejidos dependientes. Se ha descrito que GPER media respuestas por activación de la proteína Gas en células HEK, promoviendo la trans-activación del

receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, de sus siglas en inglés *Epidermic Grow Factor Receptor*) y la señalización vía enzima extracelular regulada por señal extracelular (ERK) y vía fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) ⁹; genera aumento de la concentración de AMPc en células de cáncer de pulmón ³³; incrementa la concentración de calcio intracelular en fibroblastos de riñón de mono (COS7) por vías no genómicas ¹⁰; induce la despolarización del potencial de membrana en neuronas de la espina dorsal de neonatos de rata ³⁴ y produce una disminución de AMPc por formación de complejos reguladores asociados a GPER en células HEK ³⁵, entre otros efectos.

Desde el punto de vista cardiovascular, se han descrito varias vías respecto a la actividad de GPER. Las más investigadas presentan activación de ERK, PI3K, PKA, eNOS y sGC, tanto por G1 como por E2, en corazones de ratas machos a través de proteína Gi/o ¹²; activación de PI3K, por G1, implicando vías que involucran p-AKT y p-ERK en corazones tanto en ratas macho como en ratas hembras ²³; activación del canal BK_{Ca} en presencia de G1, en musculo liso de arterias coronarias ³⁶; activación de vías AMPc/PKA por G-1 en arterias coronarias de cerdo ³⁷; disminución de la generación espontánea de transitorios de calcio inducidas posiblemente por atenuación de la actividad de CaL por G1 en células de músculo liso vascular ³⁸; vasodilatación de arterias mesentéricas de ratas hembras por G1 vía NO y AMPc ³⁹. De lo anterior, se desprende que la activación de GPER presenta una amplia gama de posibles vías intracelulares en tejido cardiovascular, que podrían mediar su respuesta fisiológica. Nuestro laboratorio demostró que una de esas vías es mediada por la transactivación del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la consecuente activación de la vía de la PI3K-AKT ⁴⁰.

2.1.4 Actividad fisiopatológica del GPER

Se ha establecido que la activación de GPER tanto por E2 como por G1 permite generar respuestas diversas dependiendo el tipo de tejido. En cultivo celular y en pruebas *in vivo* de células de diversos cánceres, la activación de GPER media respuestas desfavorables para estas patologías, como aumento del tamaño de tumor y aumento en la metástasis de ciertos cánceres⁴¹. Sin embargo, su expresión en estos tipos de patologías aumenta, por lo que podría llevar a plantear al GPER como predictor de cánceres agresivos¹³.

Desde el punto de vista cardiovascular, la activación de GPER tanto en tejido vascular como en tejido cardiaco, otorga efectos fisiológicos beneficiosos. Se ha descrito que la activación de GPER tanto por su agonista endógeno E2 como por el ligando sintético G1, produce: aumento de la frecuencia cardiaca con disminución del inotropismo¹²; disminución de la presión arterial en rata ovariectomizadas (OVX)⁴²; mejora de la función cardíaca luego de procesos de isquemia-reperfusión, independiente del género estudiado²³; evita la disfunción diastólica por aumento de la presión arterial inducida por la sal⁴³; previene la hipertrofia cardiaca patológica y fibrosis perivascular dependiente de la proteína de modificación del receptor RAMP3, proteína que interacciona con el GPER modulando el tráfico del receptor a la membrana, la especificidad a ligando y la señalización corriente abajo del mismo⁴⁴, entre otros efectos cardioprotectores descritos. En nuestro laboratorio se ha determinado que el tratamiento crónico en ratas OVX con G1, favorece la recuperación frente a isquemia-reperfusión, disminuye el tamaño de infarto y mejora las funciones mitocondriales de estas ratas⁴⁵.

Es importante remarcar que la depleción específica de GPER en corazón, produce aumento de la masa ventricular con pérdida de la función cardiaca, acompañada de cambios estructurales en tejido vascular⁴⁶⁻⁴⁹, lo que refuerza la idea de que el GPER cumple un rol protector fundamental en el corazón.

3.1 Corazón

El corazón es la bomba biomecánica del aparato circulatorio. En realidad, consta de dos bombas interconectadas en serie mediante los vasos pulmonares y los vasos sistémicos, denominadas cavidad izquierda y cavidad derecha (**Figura 5**), con subdivisiones internas denominadas aurículas (derecha e izquierda) y ventrículos (derecho e izquierdo), ambos separados por válvulas. La sangre por lo tanto circula entre estas cavidades de forma orquestada, de tal manera que cambios en la biomecánica del corazón desencadenan cambios en la fisiología cardiovascular y hemodinámica, implicando alteraciones funcionales del resto de los sistemas que componen al organismo.

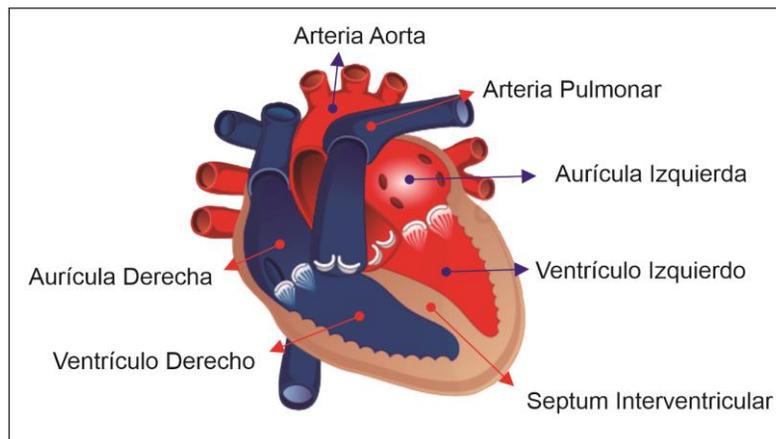


Figura 5 – Estructura del corazón, observando cavidades y vasos más relevantes.

La estructura del corazón comprende al menos dos tipos celulares de miocitos. Por un lado, se encuentra las células denominadas células marcapaso, cuya función principal es mantener el ritmo cardiaco mediante despolarizaciones espontáneas del potencial de membrana para transmitirlo a todo el corazón mediante los potenciales de acción (PA) iniciados por dicha despolarización. Por el otro lado, se encuentran los miocitos cardíacos clásicos, células musculares que mediante la estimulación del PA generado por las células marcapaso disparan

sus PA cardíaco (PAC), permitiendo acoplar la mecánica de contracción y relajación (ver más adelante).

La contracción va a permitir entonces que el corazón lleve a cabo el movimiento de la sangre, producto de la fuerza generada por las paredes de las cavidades cardíacas, elevando así las presiones de estas hasta tal punto que hará circular la sangre por todo el lecho vascular para retornar, finalmente, hacia sí mismo.

3.1.1 Célula muscular cardíaca

Los miocitos cardíacos presentan una estructura celular de aproximadamente 200 μm de largo. Su membrana celular presenta invaginaciones hacia el interior celular conocidas como túbulos transversales (túbulos T), con diámetros de aproximadamente 0.2 μm . Además, presenta estriaciones intracelulares que corresponden a las proteínas contráctiles, los filamentos gruesos (filamentos de miosina) y finos (filamentos de actina), que alineados conforman el sarcómero (**Figura 6**), la unidad funcional de la contracción muscular.

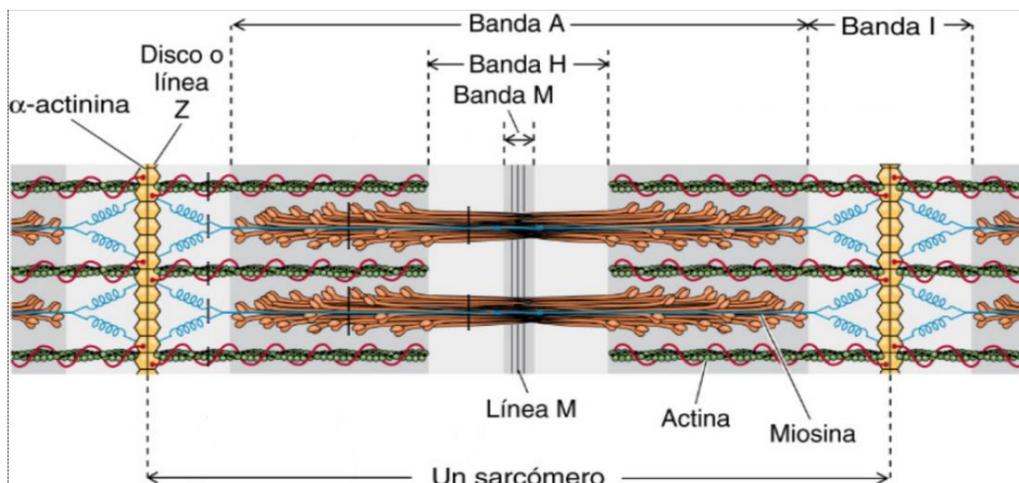


Figura 6 – Estructura del sarcómero de una célula muscular cardíaca. Imagen tomada y editada del libro *Fisiología Médica – Boron & Boulpaep, 3ra edición, 2017*.

3.1.1.1 Filamentos gruesos

Los filamentos gruesos se encuentran compuestos por miosina (**Figura 7A**), proteína que contiene una cola que se orienta hacia el centro del filamento y la cabeza de forma globular y flexible que se extiende fuera de él. Las cabezas de miosina presentan actividad ATPasa y forma la base molecular del puente cruzado o transversal durante la contracción muscular. En la cabeza de miosina se encuentran dos pares de cadenas proteicas, denominadas livianas. Una de estas cadenas se la denomina esencial (MLC-1), mientras que a la otra se la denomina reguladora (MLC-2). Ambas cadenas pueden ser fosforiladas alterando así la cinética de unión por la actina (o la generación de puentes cruzados).

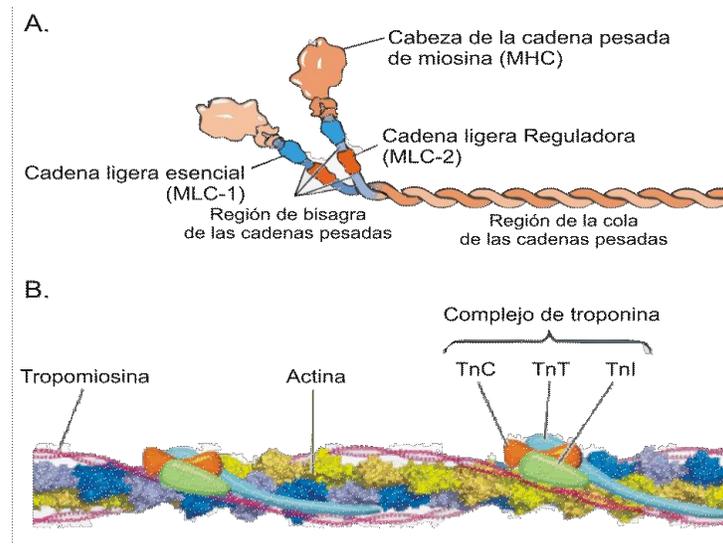


Figura 7 – Estructura de las proteínas contráctiles del músculo cardíaco. **A.** Estructura de la miosina. **B.** Estructura de la actina. Imagen tomada y editada del libro *Fisiología Médica – Boron & Boulpaep, 3ra edición, 2017.*

3.1.1.2 Filamentos finos

Los filamentos finos se encuentran conformados por varias proteínas, pero principalmente por actina (**Figura 7B**), la cual posee la propiedad de interactuar con la miosina e impulsar actividad ATPasa. Sin embargo, la cadena de actina presenta varios tipos de proteínas reguladoras que van a estar modulando la contracción muscular: la troponina y la

tropomiosina. La troponina son un conjunto de proteínas reguladoras para la interacción entre la actina y la miosina. Se compone por tres grupos proteicos: troponina T (TnT), regula la unión entre la actina y la miosina durante los eventos de contracción, uniéndose a la tropomiosina; troponina I (TnI), inhibe el sitio de unión ubicado en la actina para la miosina; y troponina C (TnC), permite liberar el sitio de unión entre la actina y la miosina cuando el Ca^{2+} se le une. La tropomiosina se extiende a lo largo de toda la actina uniéndose a la misma en la TnT, permitiendo regular la unión entre la actina y la miosina.

Los miocitos se encuentran unidos célula a célula mediante desmosomas y uniones de hendidura, permitiendo así que los PAs se propaguen a todas las células del corazón. Estas uniones van a permitir que el corazón se contraiga casi simultáneamente en su totalidad, evento conocido como sincitio.

3.1.2 Acoplamiento excito-contráctil

Como se mencionó anteriormente, la contracción es un proceso que inicia con la despolarización de las células marcapaso generando un potencial de acción cardiaco (PAC), propagándose por todo el corazón, induciendo la generación de un PA en los miocitos cardíacos, y activando en consecuencia los mecanismos contráctiles, proceso denominado acoplamiento excito-contráctil (AEC, **Figura 8**).

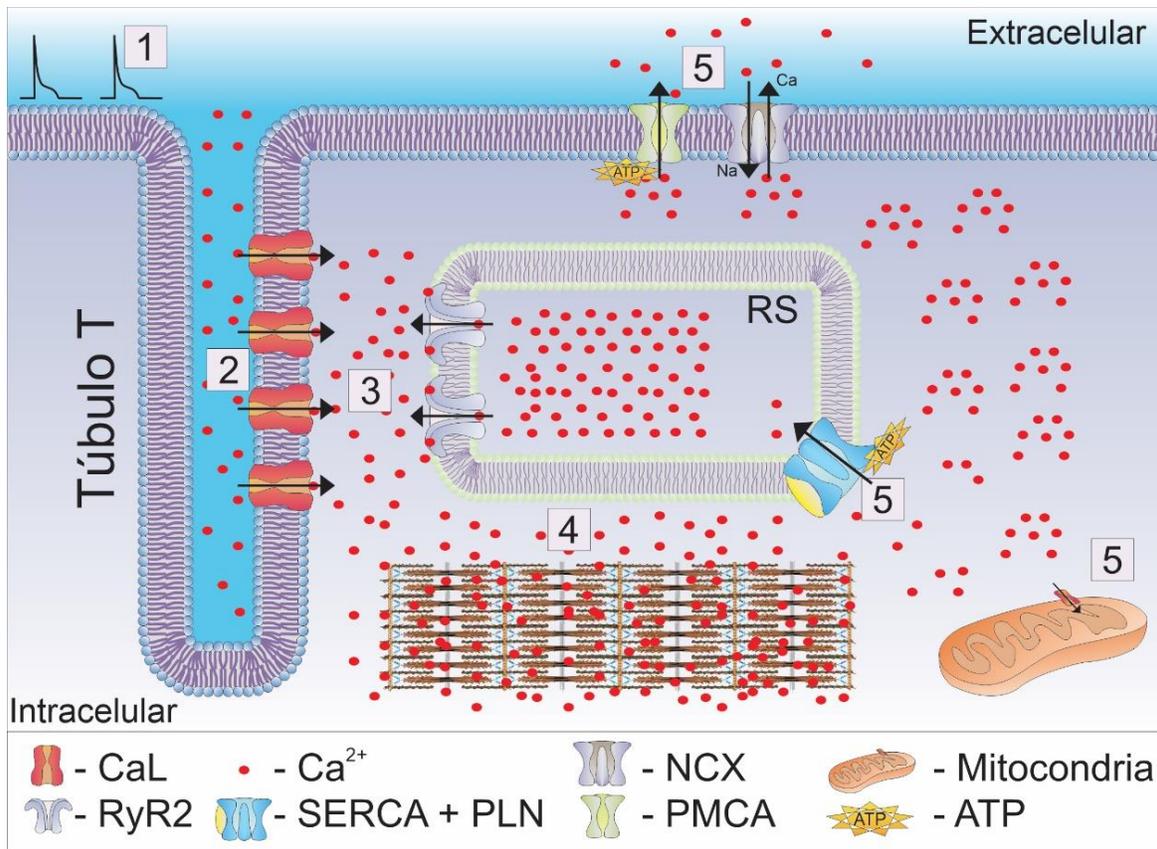


Figura 8 – Acoplamiento excito-contráctil (AEC). **1.** Generación del potencial de acción. **2.** Apertura de los canales de calcio tipo L (CaL) permitiendo la entrada de Ca²⁺ al interior celular. **3.** Activación de los receptores de rianodina (RyR1) por la entrada de Ca²⁺ provocando la liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (LCIC) desde el retículo sarcoplásmico (RS). **4.** Aumento del Ca²⁺ intracelular y activación de los mecanismos contráctiles. **5.** Extrusión del Ca²⁺ del interior celular por varias vías posibles: a través de la SERCA (regulada por fosfolamban –PLN-); por transportadores y canales de Ca²⁺ mitocondriales, almacenándolo en su interior; a través del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (NCX) o por la bomba de Ca²⁺ dependiente de ATP (PMCA).

3.1.2.1 Potencial de acción cardíaco

Un potencial de acción (PA) es un cambio transitorio y rápido del potencial de membrana de una célula excitable frente a un determinado estímulo. Generalmente se inicia por la entrada de iones positivos (cationes) a través de sus respectivos canales, que irán despolarizando la membrana celular hasta el punto tal que si la membrana celular llega al potencial conocido como potencial de umbral (PU), se disparará el PA. Si la despolarización no llega al PU, el PA no se generará y en su lugar se produce un potencial electrofónico (PE).

En el caso del corazón, el potencial de acción inicia en las células marcapaso del nodo sinoauricular (nodo SA), y a diferencia de lo anteriormente dicho, el PA generado por estas células es independiente de estímulo alguno, debido a su capacidad de autodespolarizar su membrana plasmática y así llegar al PU. Este evento se realiza de forma periódica, permitiendo así determinar el ritmo cardiaco, debiéndose exclusivamente a las corrientes iónicas presentes en la membrana de las células de nodo SA.

De esta manera el PA, generado en el nodo SA, se propaga por el corazón hasta alcanzar los miocitos cardiacos auriculares y ventriculares. Una vez estimulados los miocitos, se dispara su PA, el cual presenta una morfología diferente a la del nodo SA, evento que permitirá coordinar varios canales iónicos ubicados en la membrana del miocito y así iniciar la mecánica contráctil.

3.1.2.2 El calcio como mediador del AEC

La generación del PA en el miocito cardíaco, se genera por cambios en la actividad de canales iónicos y transportadores electrogénicos. Dentro de los canales iónicos que participan del PA, uno permitirá iniciar la mecánica contráctil de la célula y así acoplar la parte excitatoria (el PA) con la parte contráctil. Dicho canal es el canal de calcio tipo L voltaje operado (CaL, descrito más adelante), ubicados en los túbulos T en gran cantidad, permitiendo ingresar calcio (Ca^{2+}) a la célula a favor de su gradiente electroquímico.

El ingreso de Ca^{2+} permite que se activen receptores ionotrópicos permitiendo la apertura de estos receptores que actúan como canales iónicos regulados por Ca^{2+} , denominados receptores de rianodina (RyR) ubicados en el retículo endoplasmático liso (conocido también como retículo sarcoplasmático –RS-) del miocito. La apertura de los RyR por el Ca^{2+} permite liberar Ca^{2+} almacenado en el RS. Esta liberación de Ca^{2+} permitirá activar más cantidad de RyR del RS iniciando así un proceso conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}

(LCIC). Esta liberación masiva de Ca^{2+} permitirá aumentar su concentración en el interior celular para así iniciar la mecánica contráctil.

3.1.2.3 Mecanismo de contracción

Brevemente, una vez que la concentración intracelular de Ca^{2+} aumenta, las proteínas contráctiles se activan para iniciar la contracción. El Ca^{2+} se une a TnC permitiendo generar un cambio conformacional de este complejo de troponinas, liberando el sitio de unión de la miosina hacia la actina, la cual se encontraba bloqueada por TnI. Una vez producida la liberación del sitio de unión, se prosiguen ciclos de unión a ATP e hidrólisis de esta molécula por la cabeza pesada de la miosina, permitiéndole elongarse, unirse a la actina y generar la tensión sobre la actina para luego separarse e hidrolizar ATP, comenzando nuevamente el ciclo.

3.1.2.4 Mecanismo de relajación

Luego de generar la contracción, es necesario relajar el músculo cardiaco. Para ello, es necesario extruir el Ca^{2+} presente en el citoplasma, provocando así que la interacción TnC- Ca^{2+} desaparezca. Con ello el complejo de troponina vuelve a inhibir la interacción entre miosina y actina produciendo finalmente la relajación.

Para extruir el Ca^{2+} , la célula consta de varios mecanismos, presentes tanto en el citosol como en la membrana plasmática. Desde el punto de vista del citosol, el RS alberga la bomba de Ca^{2+} (SERCA), siendo una ATPasa que moviliza los iones Ca^{2+} hacia el interior del RS y extruye protones (H^+) hacia el citoplasma. Este evento representa más del 70% de la retoma de Ca^{2+} , y es de vital importancia ya que la mayor cantidad de Ca^{2+} que participa de la contracción cardiaca proviene del RS. El otro contribuyente en el citosol es la mitocondria,

que almacena el Ca^{2+} en su interior en mucha menor medida que el RS, y lo realiza a través de sus canales MCU.

SERCA se encuentra regulada por la proteína fosfolamban (PLN), que en su estado desfosforilado se une a SERCA, reduciendo su afinidad hacia el Ca^{2+} y, por lo tanto, disminuyendo la retoma de Ca^{2+} hacia el RS. Caso contrario, al encontrarse fosforilada, PLN se desacopla de SERCA y permite aumentar la retoma por aumento de la afinidad de SERCA al Ca^{2+} .

Finalmente, los mecanismos presentes en la membrana plasmática son, el intercambiador sodio/calcio ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, NCX), que extruye un Ca^{2+} e introduce tres Na^+ en su estado conformacional directo. Su forma conformacional reversa produce lo contrario, extruye Na^+ e ingresa Ca^{2+} , con la misma estequiometría. El otro contribuyente para la extracción de Ca^{2+} , es otra bomba, la ATPasa del sarcolema (PMCA), sin embargo, esta bomba contribuye en menor medida que el NCX para extruir el Ca^{2+} del interior celular.

3.1.3 Electrofisiología cardíaca

Durante el AEC, la generación de un PA es crucial para que se lleve a cabo el proceso de contracción. Por ello, los eventos electroquímicos deben coordinarse para llevar a cabo un correcto desarrollo del PA. Por lo tanto, las concentraciones de los iones y la actividad de los canales iónicos y de los transportadores electrogénicos deben mantenerse estables en todo momento.

En la **Figura 9** se puede observar un esquema típico de un PAC ventricular de roedor. Este se puede dividir en cinco fases, descritas a continuación. La fase cuatro corresponde al potencial de membrana en reposo (PMR) de alrededor de -80 mV. En esta fase, la prevalencia de la actividad de canales de potasio (principalmente I_{K1} , descrito más adelante) permite

mantener el PMR de manera estable. La fase cero, denominada despolarización rápida, desplaza el potencial de membrana a valores positivos entre +15/+20 mV. Este rápido ascenso en el potencial de membrana es generado por canales de gran conductancia, los canales de sodio voltaje operados (I_{Na}). La fase uno, denominada repolarización temprana, presenta, en roedores pequeños, una gran importancia. En esta fase predominan corrientes de potasio (I_{to1}) y de cloruro (I_{to2}) y en menor medida, pero no menos importante, la corriente del intercambiador Na^+/Ca^{2+} (I_{NCX}). La fase dos (meseta) ocupa aproximadamente un 70% de la duración del PA de mamíferos superiores, sin embargo, en roedores pequeños es poco conservada, debido a la morfología triangular del PAC⁵⁰. Dicha diferencia se explica por la frecuencia cardíaca, debido a que los roedores alcanzan frecuencias de entre cinco y diez Hertz (Hz). En esta fase se encuentra activa la corriente de calcio tipo L (I_{CaL}) junto con una permeabilidad de las corrientes de potasio. Finalmente, la fase tres, denominada repolarización rápida, permite retornar al PMR, donde predominan los canales de potasio, inicialmente I_{Ks} y finalmente nuevamente I_{K1} .

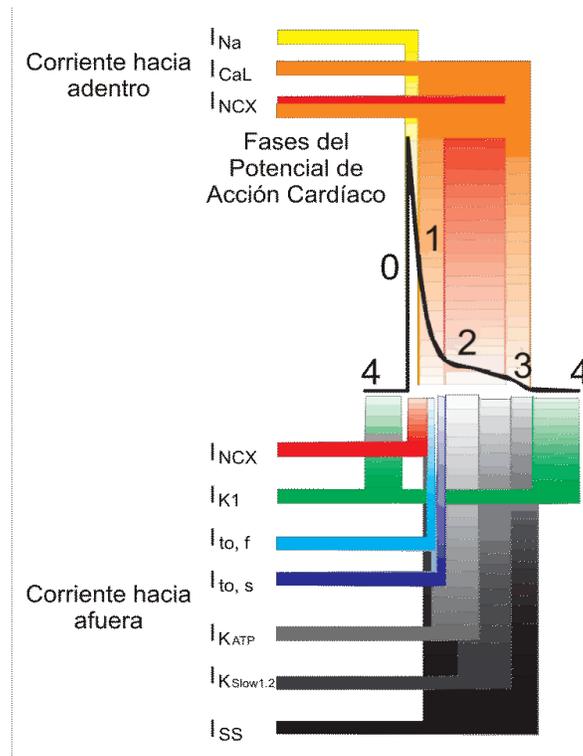


Figura 9 – PAC ventricular de ratón con las principales corrientes implicadas en cada fase. Se observa corrientes hacia adentro (despolarizantes) y hacia afuera (repolarizantes). I_{Na} : corriente rápida de Na^+ . I_{CaL} : corriente lenta de Ca^{2+} . I_{NCX} : corriente del cotransportador Na^+/Ca^{2+} . I_{K1} : corriente rectificadora de K^+ . I_{to1} : corriente transitoria de K^+ . I_{to2} : 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.

3.1.4 Hipertrofia cardíaca

La hipertrofia cardíaca (HC) es un proceso adaptativo que genera aumento de la masa del corazón. Existen dos tipos de HC: HC fisiológica y HC patológica (**Figura 10**). La HC patológica, implica influencia continua de sobrecarga hemodinámica, siendo las alteraciones/enfermedades más comunes que le dan origen, la hipertensión arterial, cardiomiopatía isquémica y patologías valvulares, entre muchas otras ⁵¹. Sin intervención alguna, la HC patológica conlleva engrosamiento del espesor de la pared del ventrículo izquierdo, provocando aumento de la masa ventricular (HC concéntrica) o aumento de la cavidad ventricular con espesor relativo de la pared normal, aumentado o disminuido (HC

excéntrica)⁵². Como respuesta compensatoria a las injurias anteriormente mencionadas, se promueven entonces la fibrosis, muerte celular, desregulación de las proteínas que se encargan del manejo de Ca^{2+} , disfunción mitocondrial, reprogramación metabólica para la utilización de glucosa, reactivación de la expresión de genes fetales, como péptido natriurético atrial (ANP) y cerebral (BNP), alteración en la estructura del sarcolema y angiogénesis insuficiente.

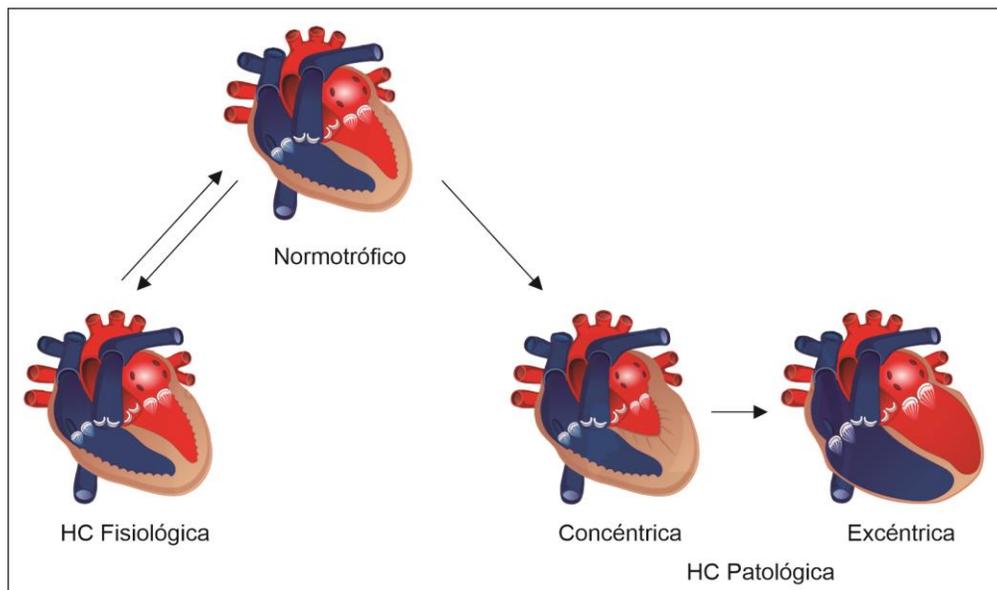


Figura 10 – Esquema de tipos de Hipertrofia Cardíaca (HC) fisiológica y patológica, junto a sus dos posibles variables.

En conjunto, estas características favorecen finalmente la falla cardíaca congestiva, y arritmias malignas, resultando en conjunto en una muerte cardíaca súbita⁵³.

Cambios electrofisiológicos se han descrito durante la aparición y la progresión de la HC patológica, manifestándose como retrasos en la repolarización incluyendo aumento en el intervalo QT y la duración del potencial de acción (DPA)⁵⁴⁻⁵⁶, atribuido a alteraciones en las corrientes repolarizantes de potasio⁵⁷⁻⁵⁹, cambios en las corrientes que involucran al calcio⁵⁹⁻⁶¹, y cambios en las corrientes que involucran al cloruro^{62,63}.

La HC fisiológica, es un cambio adaptativo que promueve mejorar la función cardíaca debido al entrenamiento aeróbico sostenido en el tiempo. Difiere de la HC patológica con que esta última implica cambios no reversibles, mientras que la HC fisiológica sí. Además, se caracteriza por favorecer vías de supervivencia, regeneración celular y el aumento de la producción energética, por lo que puede estar implicando un incremento en la angiogénesis y en la actividad de los sistemas antioxidantes para mantener una eficiencia en la función mitocondrial. Tampoco hay aumento de la fibrosis ni re-expresión de genes fetales. Desde el punto de vista electrofisiológico, se determinó que hay mejoras en la actividad de los canales de potasio⁶⁴ sin cambios en el intervalo QT; disminución de la DPA por cambios en la actividad del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ ⁶⁵, entre otras cambios beneficiosos en la actividad eléctrica cardíaca.

4.1 Corriente iónica

La membrana plasmática es una bicapa fosfolipídica, donde cada capa posee una cabeza polar y dos colas hidrofóbicas. De acuerdo con esta estructura, los iones no pueden atravesar la membrana plasmática dado que al poseer carga resultan repelidos. Por lo tanto, es necesario un “camino o una vía” alternativa para su ingreso o egreso de la célula. Dicho camino lo aportan diversos tipos de proteínas ancladas en la membrana plasmática, como los canales iónicos, bombas iónicas y transportadores.

Para que se genere una corriente iónica es necesario que se establezca un gradiente de concentración de un determinado ion, además de la presencia de canales iónicos en la membrana plasmática, delimitando el espacio intracelular y el espacio extracelular. Las concentraciones de las partículas iónicas tanto en el líquido intracelular (LIC) como en el líquido extracelular (LEC) son diferentes y significativamente importantes a la hora de estudiar corrientes iónicas.

Frente a la apertura de un canal iónico y en presencia de un gradiente de concentración a ambos lados de la membrana plasmática, las partículas se desplazarán en principio desde donde haya una concentración mayor hacia donde haya menos concentración. Por lo tanto, se establece una corriente iónica debido al movimiento de partículas cargadas a favor de su gradiente químico (ΔQ). Sin embargo, la generación de corriente no solo depende del gradiente químico debido al ingreso o egreso de un determinado ion, sino que tiene otro contribuyente que se denomina gradiente eléctrico (ΔE), el cual representa una diferencia de potencial generado por los gradientes químicos de iones de un lado al otro de la membrana plasmática.

Considerando en conjunto ambos gradientes surge un tercer término, el gradiente electroquímico ($\Delta \Psi$), el cual permite establecer el movimiento de los iones a un lado y otro de la membrana. En el caso de que ΔQ y ΔE fuesen iguales, no se generaría un flujo neto de un determinado ion debido a que el $\Delta \Psi$ sería cero. Con esta idea, Walther Nernst hizo una correlación entre el ΔQ y el ΔE , formulando con ello una de las ecuaciones más utilizadas en el ámbito de la electrofisiología, la cual permite conocer a qué potencial de membrana la corriente iónica neta es igual a cero, frente a una determinada concentración intra y extracelular de un ion determinado. Es conocida como ecuación de Nernst y su expresión es:

$$\text{Ecuación de Nernst: } E_x = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} * \text{Ln} \left(\frac{[X]_e}{[X]_i} \right)$$

Donde E_x es el potencial de equilibrio del ion X estudiado. R es la constante de los gases, cuyas unidades son de $\frac{C \cdot V}{mol \cdot K}$ (Coulomb por Voltio sobre mol por Kelvin). T es la temperatura expresada en grados Kelvin. z es la carga que del ion X (es decir el número de valencia que se le otorga al ion junto con su símbolo positivo o negativo). F es la constante de Faraday

(cuyas unidades son $\frac{C}{mol}$). Por último, $[X]_i$ y $[X]_e$ son las concentraciones del ion X dentro y fuera de la célula, respectivamente.

5.1 Canales iónicos

Los canales iónicos son estructuras proteicas ancladas a la membrana plasmática, cuya función es permitir el pasaje de ciertos iones a través de su estructura y a favor del $\Delta\Psi$ del ion en cuestión. La mayoría de los canales no permiten el pasaje de cualquier otro ion, sino que son selectivos a uno determinado.

Cada canal iónico presenta estructuras y subunidades diferentes, sin embargo, todos comparten similitudes estructurales tales como: el poro, región del canal por el cual se lleva a cabo el pasaje de iones; filtro de selectividad, región dentro del poro que permite seleccionar específicamente un determinado ion; y sensor de voltaje, estructura proteica que poseen ciertos grupos de canales que les permite abrir, cerrar o inactivar el canal dependiendo del voltaje de membrana presente.

Dentro del filtro de selectividad se encuentran estructuras proteicas de composición aminoacídica variable, que le otorgan a cada canal la particularidad de dejar pasar determinados iones y no todos los presentes en la célula o fuera de ella. Por ello los canales son específicos a la hora de dejar pasar iones.

Los canales iónicos presentan varios estados conformacionales, es decir estructuras que varían según modificaciones del entorno, los cuales son: estado abierto, el canal deja pasar iones por su estructura y procede de un estado cerrado; estado cerrado, el canal no deja pasar los iones por su estructura, el cual procede del estado abierto o inactivo; estado inactivo, el canal iónico se encuentra en una conformación abierta pero con un bloqueo del poro, lo que provoca que no haya pasaje de iones, este estado procede del estado abierto. Los cambios

conformacionales dependen exclusivamente de varios factores del entorno del canal, como cambios en el potencial de membrana, ligando químicos y cambios físicos.

La importancia de los estados de los canales no solo radica en el hecho de que si se encuentra en estado abierto se va a generar una corriente, es decir un flujo iónico a través del canal, sino que depende del tiempo en que se mantiene en dicho estado. Por lo tanto, se define un término que se involucra de forma directa en la generación de la corriente, la probabilidad de apertura (P_o). La P_o expresa la probabilidad de que el canal se encuentre en el estado abierto en un intervalo de tiempo determinado. Por lo tanto:

$$\text{Probabilidad de apertura: } P_o = \frac{\text{Tiempo Abierto}}{\text{Tiempo Abierto} + \text{Tiempo Cerrado}}$$

Por lo tanto, P_o contribuye a que la corriente se establezca a través de la membrana, sin embargo, no es el único término que permite establecer que la corriente se genere o no. Entra en juego también la cantidad de canales iónicos presentes en la membrana plasmática (N) y la facilidad con la que el canal iónico deja pasar los iones, término denominado conductancia unitaria del canal (g). Desde el punto de vista de la física de circuitos g es la inversa de la resistencia (R) y por lo tanto g implica facilidad para atravesar el circuito (R sería la dificultad de atravesar el mismo circuito). Como en la membrana celular hay un gran número de canales presentes, se determina entonces la conductividad global (G), siendo esta la facilidad del ion de atravesar la membrana plasmática a través del canal iónico. G se determina como:

$$\text{Conductividad global: } G = g * P_o * N$$

Siendo g la conductancia unitaria del canal, P_o la probabilidad de apertura del canal y N el número de canales presentes en la membrana plasmática. Por lo tanto, conociendo G , el E_x y el potencial de membrana (E_m), se puede establecer una relación con la corriente, conocida como la Ley de Ohm. Esta ley establece que la corriente es proporcional a la conductancia y a la fuerza electromotriz que, en el caso de la fisiología, es la diferencia entre E_m y el E_x . Por lo tanto, la corriente I_x , será:

$$\text{Corriente iónica del ión } X: \quad I_x = G_x * (E_m - E_x)$$

Puede decirse entonces que la corriente iónica depende de varios factores además de los gradientes como se vio anteriormente. Por lo tanto, para que un ion pueda moverse a través de la membrana es necesario que: exista un gradiente electroquímico, que haya canales para ese ion y que esos canales estén abiertos por un determinado intervalo de tiempo.

5.1.1 Canal de calcio tipo-L

Durante la fase dos del potencial de acción cardíaco, denominada meseta, se presenta un balance entre la baja permeabilidad de las corrientes repolarizantes y al inicio de la corriente de Ca^{2+} ⁶⁶, siendo esta una corriente despolarizante clave como enlace entre la excitación y la contracción. Por lo tanto, las propiedades biofísicas del canal otorgarán el correcto funcionamiento del AEC. A continuación, se describirá la estructura y funcionabilidad del canal de calcio tipo L (CaL).

CaL se encuentra ubicado en gran cantidad en las invaginaciones de las células cardíacas, los túbulos T y, aproximadamente, un 75% de la cantidad total se encuentran ubicadas de tal forma que permite el acople con los receptores de rianodina (RyR2) ⁶⁷⁻⁷⁰ complejo denominado diada. El canal se encuentra codificado en tejido cardíaco por el gen CACNA1C que codifica a la subunidad $\alpha 1C$ del canal $CaV 1.2$ ⁷¹. La subunidad $\alpha 1C$ forma el poro del canal en conjunto con el filtro de selectividad a Ca^{2+} , el control de la conductividad del canal,

el umbral de activación del canal y alberga diferentes sitios para bloqueantes de CaL ^{72, 73}. La proteína consiste en cuatro repeticiones homologas (motivo I a IV) con cada una albergando seis segmentos α hélice transmembrana, interconectados por loops tanto intracelulares como extracelulares otorgando en conjunto un peso molecular de aproximadamente 240 kDa (**Figura 11**) ⁷⁴.

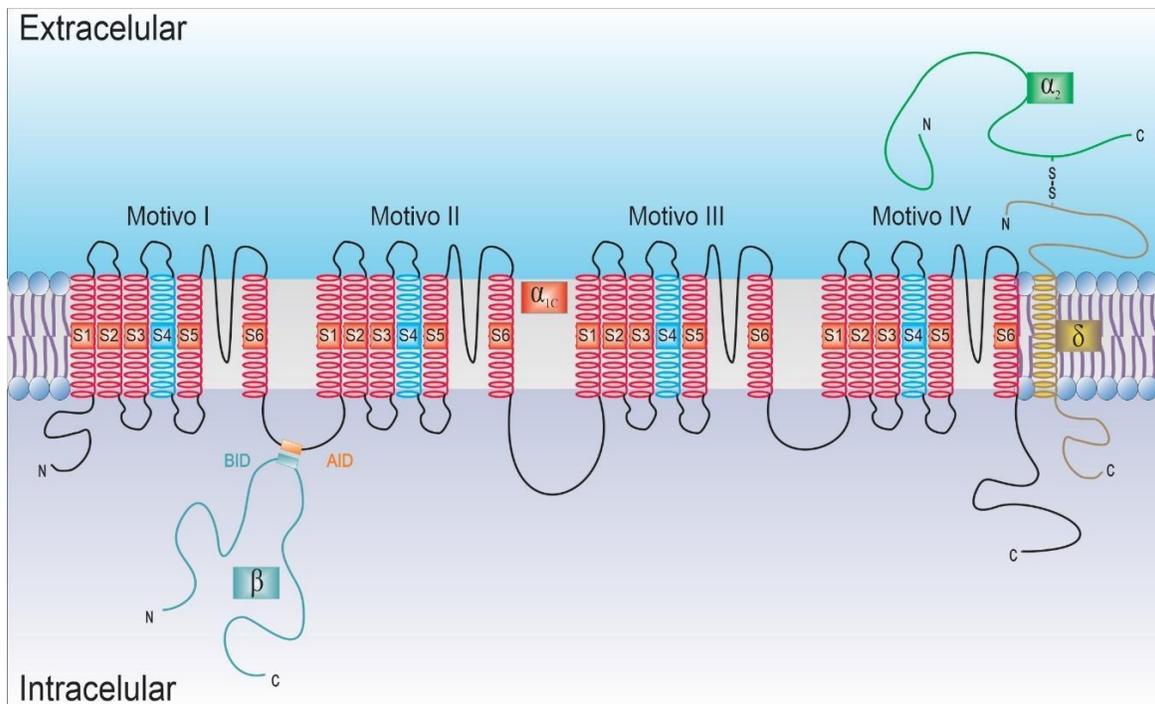


Figura 11 – Esquema representativo del canal de calcio tipo L (CaL) cardíaco junto a las subunidades que la componen y la regulan.

Los segmentos α hélice otorgan varias de las funciones presentes en el canal. El segmento cuatro (S4), donde se albergan una gran cantidad de aminoácidos cargados positivamente (como arginina o lisina) permite al segmento ser el sensor de voltaje ⁷⁵⁻⁷⁷. El poro y el filtro de selectividad se encuentran situados entre los segmentos cinco y seis (S5 y S6) de cada motivo ⁷⁸⁻⁸¹.

Además de la subunidad $\alpha 1C$, CaL presenta tres subunidades que van a estar regulando la actividad del canal y son estructuras vitales para el correcto funcionamiento.

La subunidad $\beta 2b$, codificada en el tejido cardíaco por el gen CACNA1B ⁷¹, es una proteína de aproximadamente 70 kDa, localizada en citoplasma unida a la subunidad $\alpha 1C$ entre los segmentos S6 del dominio I y S1 del dominio II, con el dominio de interacción α (AID de sus siglas en inglés – *α interaction domain*-) por su dominio de interacción β (BID de sus siglas en inglés – *β interaction domain*-) ^{82, 83}. Las principales funciones de la subunidad β son: regular la amplitud de la corriente por aumento del número de canales y por cambios en la dependencia de voltaje y cinética de activación así como la inactivación del canal ^{72, 84, 85}; actuar como chaperona de $\alpha 1C$ evitando su degradación ⁸⁶; participar en la inactivación dependiente de Ca^{2+} al ser fosforilado ⁸⁷; y es indispensable para la modulación de CaL por proteínas quinasas, proteína G, ubiquitinación y proteínas RGK pequeñas ^{85, 88}.

La siguiente subunidad importante para la actividad de CaL es la subunidad $\alpha 2\delta$ -2, codificada por CACNA2D1 en tejido cardíaco ^{71, 89}, siendo una proteína de aproximadamente 175 kDa que presenta glicosilación ⁹⁰. La estructura $\alpha 2$ se encuentra en el espacio extracelular unida a la estructura δ por puentes disulfuro, la cual se ancla a la membrana plasmática. Ambas proteínas son codificadas por el mismo gen, pero presentan clivajes diferentes ⁸⁹. Las funciones principales son: facilitar y acelerar la activación del canal ^{91, 92}; y, junto con la subunidad β , permitir la correcta inserción de $\alpha 1C$ a la membrana ⁹³.

Debido a que el canal CaL presenta un papel importante en el AEC, es necesario que su actividad presente una alta regulación en diferentes eventos que afecten la funcionalidad del tejido cardíaco. Para lograr este cometido, varias vías de señalización intracelular y estructuras diferentes regulan al canal.

Se sabe que la actividad del canal se ve modificada por vías extrínsecas cardíacas, como la liberación de noradrenalina (NA) por vías eferentes nerviosas autónomas simpáticas, que

promueve el aumento de la intensidad de corriente sin cambiar las cinéticas del canal ⁹⁴⁻⁹⁷. Para ello, NA actúa sobre sus receptores β , activando el receptor acoplado a proteína Gs, aumentando AMPc y activando PKA, quinasa que fosforila CaL en su subunidad $\alpha 1C$ en su cola C-terminal. Los sitios fosforilables son serina 1700 y serina 1928 (S1700 y S1928, respectivamente), siendo S1928 el predominante respecto al otro sitio en tejido cardíaco ⁹⁸. Sin embargo, el sitio que presenta mayor actividad es el S1700, dando mayor regulación del canal por estímulo β ⁹⁹, sin cambios en el S1928.

Además de encontrar modulación por PKA sobre CaL, se conocen otras quinasas que alteran la actividad del canal. Podemos encontrar PKC, que en principio presentaba sitios de fosforilación en CaL en su N-terminal, específicamente en treonina 27 y 31 (T27 y T31, respectivamente), promoviendo la inhibición del canal ¹⁰⁰. Sin embargo, la activación de PKC mejora la actividad de Cav1.2 cuando T27 y T31 presentan mutación ¹⁰¹, por lo que su actividad no sería en el N-terminal. Se sabe que PKC fosforila S1928 y aumenta la expresión del canal en la membrana ^{102, 103}. La otra quinasa capaz de fosforilar CaL es PKG que, en menor medida, se conoce que fosforila S1928 promoviendo la disminución de la corriente de calcio. Con una disminución en la expresión de PKG, la corriente aumenta ^{104, 105}.

Finalmente, siguiendo con quinasas, se presenta la enzima calcio calmodulina quinasa II (CaMKII) como reguladora de CaL. Al igual que PKA, CaMKII actúa fosforilando el C-terminal ¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. Frente a aumentos de Ca^{2+} intracelular (Ca^{2+}_i), la actividad de CaMKII aumenta y provoca aumentos en la fosforilación de la subunidad $\alpha 1C$ ¹⁰⁶ en los sitios de fosforilación serina 1512 y serina 1570 (S1512 y S1570, respectivamente) en el extremo C-terminal cercano al dominio IQ ^{106, 110}, y además fosforila la subunidad $\beta 2a$ en treonina 98 y en lisina 493 (T98 y L493, respectivamente) ¹¹¹, provocando aumentos tanto en la expresión de CaV 1.2 como en la intensidad de corriente ¹¹².

El canal no solamente se modula por fosforilación, existen otros tipos de modificaciones por compuestos que permite regularlo. Entre estos compuestos se encuentran: las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales promueven el aumento de la actividad del canal ¹¹³⁻¹¹⁸ por poseer en su dominios intracelulares cisteínas que se reducen en presencia de ROS ¹¹⁹. También el canal es modulado por: óxido nítrico (NO), donde la nitrosilación disminuye la actividad del canal ¹²⁰, siendo los posibles sitios de nitrosilación los sitios de cisteína seguidos de glutamina o aspártico (sitios C(D/E)) ¹²¹ y se estima que sean 3 en el canal CaV ¹²²⁻¹²⁴.

5.1.2 Canales de potasio

Durante el desarrollo del PAC, numerosos canales de potasio participan de manera ordenada, manteniendo su forma y duración ¹²⁵. De esta manera la despolarización de células musculares cardíacas da pie a la activación de los canales de potasio para retornar el Em hacia el reposo. Sin embargo, no todos los canales responden de la misma manera a cambios en el Em, debido a las diferencias tanto en las cinéticas como en las regulaciones de los canales, otorgando el correcto funcionamiento en las diferentes fases del PAC. Por lo tanto, en esta sección se describirá la estructura y regulación de los distintos canales de potasio presentes en el tejido cardíaco ventricular de ratones.

Se encuentran varios tipos canales de potasio, los cuales pueden ser agrupados en dependiente de voltaje (Kv) y los independientes de voltaje, denominados rectificadores entrantes (Kir, de sus siglas en inglés, *inwardly rectifying*) ¹²⁶. Estructuralmente, los Kv y los Kir presenta grandes diferencias en sus subunidades α (**Figura 12**). Los Kv presentan seis

estructuras transmembrana, denominados segmentos (S). Entre el S5 y S6 se encuentra situado el poro junto con el filtro de selectividad del canal, mientras que el S4 forma el sensor de voltaje, otorgando así su sensibilidad a cambios en el E_m ¹²⁷⁻¹³⁰. Los Kir presenta una estructura más simple en comparación con los Kv, ya que presentan dos segmentos transmembrana, entre los cuales se forma el poro y el filtro de selectividad.

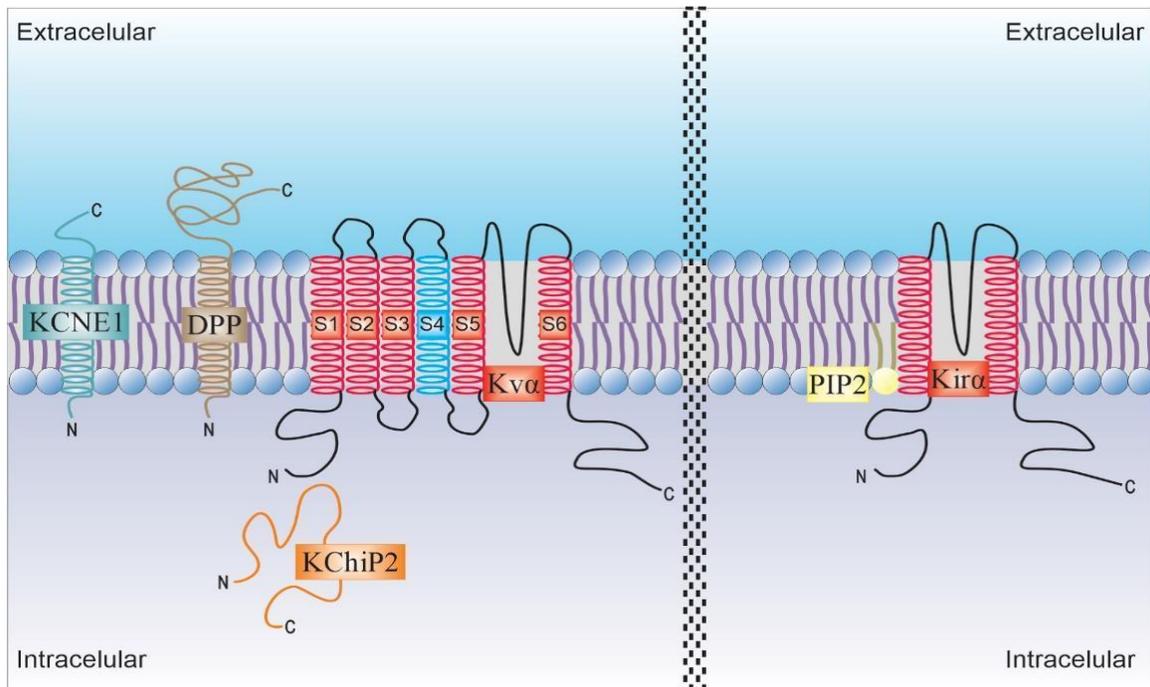


Figura 12 – Esquema representativo de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv, izquierda) y canales de potasio rectificadores entrantes (Kir, derecha), junto a las subunidades y elementos que la regulan.

A pesar de su gran diferencia en su estructura, ambos canales presentan cuatro subunidades α para poder formar el canal, sin embargo, los Kv forman homotetrámeros, es decir, cuatro subunidades α idénticas provenientes del mismo gen ¹³¹⁻¹³³; mientras que los Kir forman homotetrámeros y heterotetrámeros, es decir, cuatro subunidades α no idénticas provenientes de diferentes genes ¹³⁴⁻¹³⁶. A continuación, se describirán por separado ambos tipos de canales.

5.1.2.1. Canales Kv

Los canales Kv presentan subdivisiones en sus corrientes, que permiten regular el PAC, de las cuales encontramos: las corrientes de K^+ salientes transitorias (I_{to} , de sus siglas en inglés, *transients outward*) y corrientes de K^+ rectificadores salientes tardías (I_{Kv} , de sus siglas en inglés, *delayed outwardly rectifying*). Las corrientes I_{to} actúan durante la fase uno del PAC y los I_{Kv} actúan durante la fase tres y comienzo de la fase cuatro ¹³⁷.

Las canales I_{to} se dividen en rápidos ($I_{to, fast}$) codificados en tejido cardíaco por KCND3 y KCND2, expresando la subunidad α Kv4.3 y Kv4.2, respectivamente ^{70, 126, 138-141}, siendo esta última expresada en poca cantidad en ventrículo de ratones ^{142, 143}, y lentos ($I_{to, slow}$) ^{144, 145}, codificado en tejido cardíaco por KCNA4, expresando la subunidad α Kv1.4 ^{146, 147}. Ambos tipos de I_{to} se activan a potenciales por encima -30 mV denotando diferencias en su cinética de inactivación y la velocidad a la cual se recupera de dicha inactivación ^{139, 141, 144, 145}. $I_{to, fast}$ presenta cinéticas de recuperación de la inactivación de entre veinte a cien milisegundos, mientras que $I_{to, slow}$ presenta cinéticas de segundos ^{126, 138-141}. Finalmente, ambas corrientes presentan una expresión diferencial a lo largo de las paredes ventriculares, siendo el epicardio la sección con mayor expresión del canal y el endocardio la sección de menor expresión, lo que permite un correcto funcionamiento del corazón ¹⁴⁸⁻¹⁵⁰.

El otro contribuyente al PAC dentro de esta categoría de canales Kv en ratón es I_{Ks} , codificado en tejido cardíaco por el gen KCNQ1 expresando la subunidad α Kv7.1 ^{151, 152}. Se conoce que el canal presenta diferencias en su expresión en el ventrículo ^{126, 153}. Presenta una activación lenta comparado con I_{to} , a voltaje mayores a -20 mV y no presenta una inactivación considerable ^{154, 155}. Estas propiedades del canal le permiten participar para regular la fase tres, ya que presenta activación durante la fase dos, tomando mayor peso, por su baja velocidad de activación, en fase tres del PAC ¹⁵⁶.

Además de presentar la subunidad α , los canales Kv presentan subunidades accesorias. Estas subunidades, conocidas como Kv β , son proteínas que regulan desde la expresión del canal hasta la actividad de estos, interactuando desde el citosol, aunque algunos lo hacen desde el medio extracelular¹⁵⁷⁻¹⁶⁶. Debido a la gran cantidad de subunidades β presentes en los canales Kv, a continuación, se nombrarán algunos de los más importantes.

Para los canales Kv I_{to} se asocian las subunidades β KChIP (de sus siglas en inglés: *the Kv channel-interaction protein*) y DPP (de sus siglas en inglés: *dipeptidyl peptidase-like protein*), ambas subunidades son necesarias para la expresión y actividad de la corriente de estos canales. KChIP son proteínas intracelulares que se asocian a la subunidad α a través del extremo N-terminal, y existen gran variedad de esta subunidad en diversos tejidos, sin embargo, en corazón abunda la expresión de KChIP2^{148, 167-169}.

Esta subunidad presenta la particularidad de que su expresión condiciona la expresión de los canales Kv4.x, es decir, es necesario su presencia para que la subunidad α se exprese; y, además, coinmunoprecipita con Kv4.x en muestras de corazones de ratones adultos lo que indica que se encuentra asociada a la subunidad α del canal¹⁷⁰.

Una de las características de la expresión en ventrículo de la subunidad KChIP2, es que se encuentra conformando un gradiente de expresión en este tejido, lo que supone que la expresión diferencial de los canales Kv4.x en ventrículo podría deberse a la expresión de esta subunidad accesoria^{148, 149, 169, 171}. Sin embargo, esta expresión diferencial de KChIP2 no es notable en ventrículos de ratones^{142, 172} por lo que, una de las hipótesis propuestas, es que la expresión de Kv4.x de forma diferencial se debe a heterogeneidad del canal entre su forma fast y slow^{172, 173}.

Aparte de contribuir en la expresión de los canales Kv4.x, la subunidad β KChIP2 altera la cinética de inactivación, la recuperación de la inactivación y la dependencia de voltaje de la activación. Frente a la disminución de la expresión de KChIP2, por ejemplo, por un

“knockeo” de la subunidad, la intensidad de corriente de $I_{to, fast}$ disminuye^{174, 175}, sin embargo, se ve compensada la falta de $I_{to, fast}$ con un aumento de $I_{to, slow}$ ^{175, 176}. Al contrario, con aumentos de KChIP2, la intensidad de corriente de I_{to} aumenta, así como aumenta la velocidad de inactivación del canal, aumento de la velocidad de recuperación de la inactivación y genera cambios en la dependencia de voltaje de la activación¹⁶⁸.

El otro contribuyente que regula la actividad de los canales Kv4.x es la subunidad DPP. Al igual que la subunidad KChIP, existen varios DPP, los más importantes en la regulación de la subunidad Kv4 α son DPP6 y DPP10. Estas proteínas actúan regulando positivamente la expresión de Kv4.x en corazón¹⁷⁷. Además, contribuye al tráfico del canal hasta la membrana plasmática¹⁷⁸. Desde el punto de vista de la actividad del canal, contribuye a la restitución de la inactivación¹⁷⁰ acelerando dicha actividad y la cinética de inactivación del canal^{177, 179-187}. Frente a “knockeos” de DPP, disminuye la expresión de KChIP, pero aumenta la intensidad de corriente de I_{to} al igual que sus cinéticas¹⁸⁸, sugiriendo que ambas subunidades regularían los canales Kv4.x en simultaneo.

El siguiente canal Kv, I_{Ks} , presenta una subunidad β asociada, conocida como KCNE1^{151, 189, 190}. La expresión de esta subunidad está descrita en tejido cardíaco y KCNE1 se co-ensambla con I_{Ks} . Estructuralmente es una proteína transmembrana, con su extremo amino hacia el citoplasma y el carboxilo hacia el espacio extracelular^{141, 191}. La principal función de esta proteína transmembrana es evitar la rápida activación de I_{Ks} ^{156, 191}, permitiendo su acción en la fase tres del PAC.

5.1.2.2. Canales Kir

El canal Kir presentan una mecánica y regulación diferente respecto a los canales Kv. La subunidad α se encuentra codificada por los genes KCNJx, codificando la subunidad α Kir2.x¹⁹²⁻¹⁹⁷, la cual da origen a las corrientes I_{K1} . En tejido ventricular de ratones, la expresión más

significativa es de KCNJ2 y KCNJ12, codificando la subunidad α Kir2.1 y Kir2.2 ¹³⁴. A diferencia de I_{to} , los Kir2.x no presenta gradientes de expresión en el ventrículo ¹²⁶, sin embargo, la expresión cambia dependiendo el tipo de célula cardíaca estudiada ¹³⁷.

I_{K1} no presenta dependencia de voltaje ¹⁹⁸ debido a su estructura sencilla de únicamente dos segmentos transmembrana. Sin embargo, presenta una dependencia de voltaje de forma indirecta. Frente a cambios de E_m mayores a -20 mV, el poro del canal Kir2.x se encuentra taponado por magnesio y poliaminas (entre ellas, principalmente, espermina), perdiendo así conductividad a potenciales mayores a -20 mV ¹⁹⁹⁻²⁰³. El canal retoma su actividad cuando la espermina y/o el magnesio liberan el poro a potenciales menores a -40 mV, permitiendo la acción de I_{K1} en el final de la fase tres del PAC y su mantenimiento en la fase cuatro manteniendo el PMR ²⁰¹.

La estructura de Kir2.x no presenta subunidades accesorias, por lo que uno pensaría que no estaría regulado el canal. Sin embargo, la presencia de lípidos de membrana evita que la corriente pierda conductividad. Se sabe que PIP2 (de sus siglas en inglés *phosphatidyl inositol – 4,5 – bisphosphate*) ²⁰⁴, evita dicha pérdida de conductividad del canal al unírsele entre en sus dominios transmembrana-citosólico ²⁰⁵. No solo evita la pérdida de conductividad, si no que otorga dependencia del canal por el pH ²⁰⁶ y permite el bloqueo reversible por magnesio ²⁰⁷.

5.1.2.3 Regulación de canales de K^+

A pesar de presentar subunidades capaces de regular la actividad del canal, o estructuras de membrana (como el PIP2), los canales de potasio se encuentran regulados por vías de señalización celular para su correcto funcionamiento. A continuación, se describirá brevemente dichas regulaciones.

Se ha descrito que los canales de K^+ pueden ser regulados por fosforilaciones. I_{to} se regula mediante fosforilaciones por PKC en treonina 503²⁰⁸ y por CaMKII en treonina 503 y serina 550^{209, 210}. I_{Ks} es fosforilado por PKA en S27²¹¹ y por PKC en S409, T513, S464 y S577²¹²; y es desfosforilado por PP1 en S27²¹¹. I_{K1} presenta acetilación²¹³, nitrosilación en C76²¹⁴ y fosforilación por PKA en S425^{215, 216} y en Y242 por PTK²¹⁷. I_{to} presenta inhibición frente a aumentos de NO intracelular²¹⁸.

I_{to} regula la actividad de CaMKII, ya que se ha demostrado que una disminución de la expresión de I_{to} genera un aumento de la actividad de CaMKII. Además, se ha demostrado que I_{to} y CaMKII se encuentran acoplados físicamente, inhibiéndose así CaMKII²¹⁹ influenciando entonces la ubicación de esta enzima en el sarcolema²²⁰. CaMKII disminuye $I_{to, fast}$ pero aumenta $I_{to, slow}$ y, en general, CaMKII acelera la recuperación de la inactivación de I_{to} ²²¹. En $I_{to, slow}$ fosforila en S123 y en $I_{to, fast}$ fosforila en S550^{209, 222}.

CaMKII acelera la recuperación y aumenta la densidad de corriente de I_{to} ^{209, 221, 223}, por mecanismo de fosforilación directa de $I_{to, fast}$ e $I_{to, slow}$ ^{222, 224}. CaMKII coimmunoprecipita con Kv 4.2/4.3²¹⁰, sugiriendo que forma un complejo junto con $I_{to, fast}$ y sus subunidades β , por lo que CaMKII puede fosforilar cualquiera de estas estructuras^{141, 225}. CaMKII regula I_{K1} ya que se determinó que disminuye su actividad y expresión²²¹. I_{Ks} es regulado por Ca^{2+} dependiendo de la actividad de calmodulina^{226, 227}. Nitrosilación directa de Kir 2.1 en C76 incrementa la probabilidad de apertura del canal²¹⁴ disminuyendo así la duración del PAC y aumentando el PMR.

5.1.3 Canales e hipertrofia

Como se ha mencionado en puntos anteriores, la hipertrofia cardíaca se puede dividir en dos, la fisiológica y la patológica. Para esta sección, nos centraremos en esta última e indicaremos brevemente qué sucede con la actividad de los canales iónicos anteriormente descritos.

Se han publicado resultados variados y controversiales respecto a la corriente de calcio tipo L en la HC. Se describió que el desarrollo de hipertrofia en humanos genera un aumento en la expresión de subunidades alfa y beta del canal ²²⁸. En la falla cardiaca frente a injurias producidas por la hipertrofia, se genera aumento de la probabilidad de apertura del canal L estudiado en la configuración de canal único ²²⁹. Sin embargo, frente a estudios de la corriente macroscópica, no se observan cambios en la corriente, atribuyendo esto a una disminución en la expresión del canal ²²⁹⁻²³¹. Otros trabajos postulan que, frente a hipertrofias cardiacas leves, I_{CaL} aumenta, mientras que no cambia en hipertrofia moderada y se reduce en hipertrofia severa con falla cardíaca ²³².

En cuanto a las corrientes de potasio, tanto I_{K1} , I_{to} e I_{Ks} , presentan disminución en su actividad frente a hipertrofias moderadas y disminuye aún más frente a hipertrofias severas ^{149, 233-240}. En hipertrofia leve, I_{K1} no se vio alterada ⁵⁴. Frente a hipertrofias con falla cardiaca, el gradiente establecido de I_{to} en el miocardio, se ve alterada promoviendo aumentos en eventos arritmogénicos severos ^{238, 239, 241-247}. Al presentar disminución en la actividad de I_{to} , se ve alterado el acoplamiento excito-contráctil, debido a que la apertura del canal de calcio, que depende de la repolarización provocada por I_{to} , se ve retrasado y por lo tanto el AEC ²⁴⁸.

HIPÓTESIS

La hipótesis general del presente trabajo de tesis Doctoral es que la activación selectiva de GPER en los miocitos ventriculares aislados de corazones normotróficos regula las corrientes iónicas involucradas en la determinación de la morfología y duración del PAC, de tal forma que establece su acortamiento; mientras que en los corazones hipertróficos este efecto protector del GPER se encuentra disminuido o se ve superado por las vías pro- hipertróficas, generando el alargamiento en la duración del PAC y consecuentemente la producción de los eventos arritmogénicos típicos de esta patología. Proponemos que la estimulación aguda del GPER en ratones con HC revertirá las alteraciones electrofisiológicas de esta patología, evidenciando su rol cardioprotector.

OBJETIVO GENERAL

Investigar el rol fisiopatológico de la activación del GPER en la regulación de la actividad eléctrica cardíaca en condiciones de normotrofia e hipertrofia cardíaca patológica. Específicamente, en este trabajo de tesis se estudió la regulación de las corrientes involucradas en la configuración y duración del potencial de acción cardíaco a través de la activación del GPER por su agonista específico G1 de forma aguda.

Objetivos Específicos

1. Determinación de la actividad de GPER en ratas Normotróficas.

- a. Investigar el efecto de la activación del GPER por G1 sobre la contractilidad y transitorios de calcio, y su señalización involucrada en miocitos ventriculares aislados de corazones normotróficos de ratas macho.
- b. Investigar el efecto de la activación aguda del GPER por G1 sobre I_{CaL} y su señalización involucrada en miocitos ventriculares aislados de corazones normotróficos de ratas macho.

2. Determinación de la actividad de GPER en ratones Normotróficos (SHAM) e Hipertroficados (TAC).

- a. Investigar el efecto de la activación aguda del GPER por G1, sobre la morfología y duración del potencial de acción en miocitos ventriculares aislados de corazones normotróficos e hipertroficados.

- b. Investigar el efecto de la activación aguda del GPER por G1 sobre I_{CaL} en miocitos ventriculares aislados de corazones normotróficos e hipertróficos.

- c. Investigar el efecto de la activación aguda de GPER por G1 sobre las corrientes de K^+ transitoria saliente (I_{to}) y rectificadora entrante (I_{K1}) en miocitos ventriculares aislados de corazones normotróficos e hipertróficos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) C57Bl/6 machos y ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar macho, de entre 12 y 14 semanas de edad criados en el bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas de La Plata. Los procedimientos llevados a cabo durante la investigación fueron realizados de acuerdo con la Guía de Cuidado y uso de Animales de Laboratorio, publicado 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.

Generación de Hipertrofia Cardíaca

Para el desarrollo de HC, se realizó coartación aórtica transversa mediante la implementación de clip de titanio. Este procedimiento generó un aumento hemodinámico permitiendo forzar la actividad contráctil cardíaca y por lo tanto inducir la hipertrofia. El procedimiento se describe a continuación.

Los ratones fueron anestesiados con una única inyección intraperitoneal (i.p) de solución salina que contiene ketamina (70-80 mg/Kg) y xilasina (3.5 mg/Kg). Una vez anestesiados y observando que no haya reflejo alguno por parte del ratón, ya sea por punción en la cola o la planta del pie, se realizó un corte en el segmento superior al manguito externo de aproximadamente 1 cm, con el fin de poder despejar la musculatura hasta visualizar la tráquea. Se realiza un pequeño corte del esternón de forma longitudinal, de entre 6 y 7 milímetros, con sumo cuidado, para luego separar ambos sectores y visualizar la aorta. Se prosiguió a insertar un clip de titanio (HemoClipPlus y Hemoclip Horizon, Teleflex) para

realizar la coartación aórtica transversa en aproximadamente un 60% de oclusión, obteniendo así el grupo TAC (**Figura 14**).

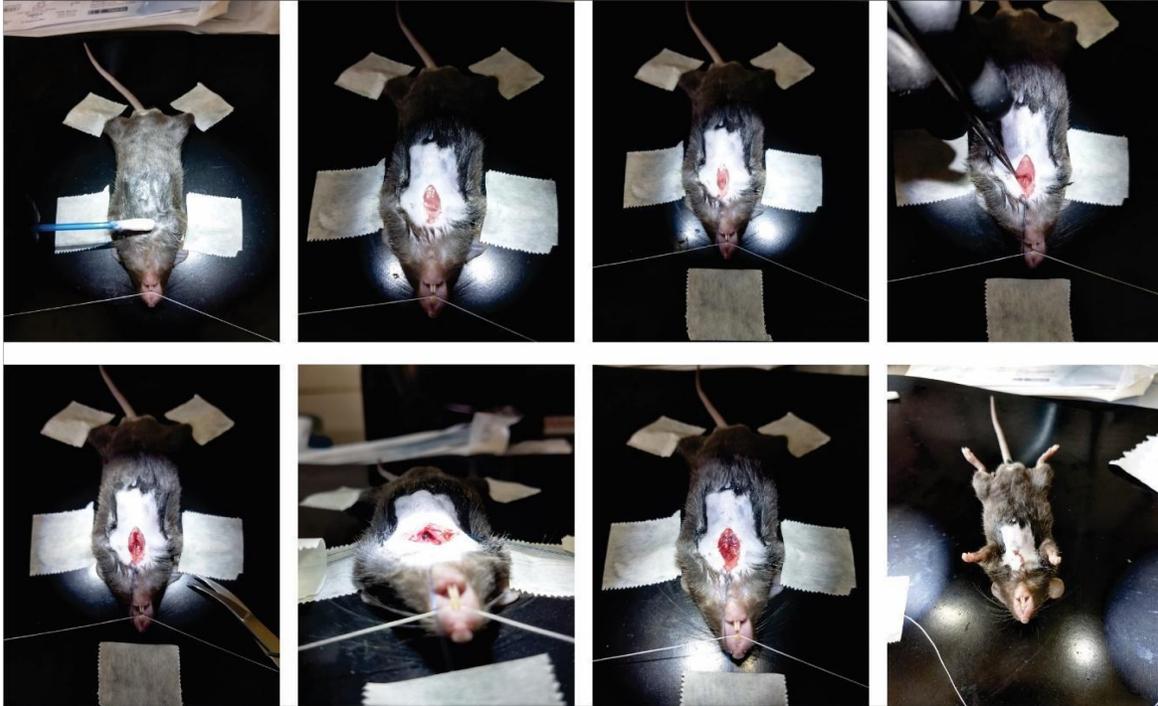


Figura 14 – Procedimiento secuencial para el desarrollo de coartación aórtica transversa (TAC, secuencia de arriba debajo de izquierda a derecha).

Posteriormente se realizó el cierre del esternón (con sutura 6/0 de polipropileno) y del tejido despejado (con supralon 6/0 de nylon). Finalmente se aplicó i.p solución salina con dexametasona (1 mg/Kg) y tramadol (10 mg/Kg) una vez que el efecto de la anestesia se haya ido. A otro grupo de ratones se le realizó el mismo procedimiento sin generar la coartación aórtica (Grupo SHAM).

Ecografía Cardíaca

Para establecer si la TAC generada fue eficiente para la generación de HC, se realizaron estudios ecocardiográficos a ambos grupos de ratones pre-cirugía y veintiocho días post-

cirugía de la siguiente manera (los ratones no fueron anestesiados para este procedimiento): se realizó la sujeción del ratón exponiendo la cavidad torácica para la colocación del transductor (velocidad de muestreo 15 MHz) realizando así la ecografía bidimensional en modo M, útil para determinar las dimensiones y estructuras de la cavidad ventricular. Las medidas fueron realizadas de acuerdo con los protocolos propuestos por la *American Society of Echocardiography*.

Determinación de colágeno

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

Registro de acortamiento sarcomérico y transitorio de calcio

Utilizando microscopio invertido de epifluorescencia se ha determinado, mediante la utilización de indicador Fura2-AM (3 μM , Molecular Probes, Invitrogen), el desarrollo de transitorios de calcio (CaT) en miocitos aislados en las condiciones estudiadas. Para el desarrollo del CaT, fue necesario la estimulación de campo en la cámara a una frecuencia de 0.5 Hz. En las células que lo permitían, se ha registrado la contractilidad de la célula al promediar el acortamiento sarcomérico (AS) a lo largo de la célula en cuestión, utilizando videocámara IonOptix (IonOptix System). Las soluciones utilizadas (solución extracelular

para la medida del PA con 1 mM de CaCl₂, ver más adelante) se perfundieron a velocidad constante de flujo de 1 ml/min, a temperatura ambiente (22-25°C). Una vez obtenido los registros, se utilizó el software IonWizard para analizarlos.

Obtención de miocitos de corazón de ratón

Los ratones fueron inyectados con heparina sódica (i.p, 200 u/ml) para evitar la generación de coágulos dentro de los vasos que irrigan el corazón, y sacrificados con dislocación cervical luego de 10 minutos. Posteriormente se canula la aorta *in situ*, se extrae el corazón y se lo coloca en un sistema de Langerdorff para realizar la perfusión retrógrada *ex vivo* (**Figura 15 A**) con solución buffer HEPES (HEPES, conformada por –en mmol/L-: 146.2 NaCl, 4.69 KCl, 11 Glucosa, 10 HEPES, 0.35 NaH₂PO₄, 1.05 MgSO₄.7H₂O, pH 7.4 con NaOH) libre de Ca²⁺ con 100 μM de EGTA durante 3 minutos, esto genera relajación del corazón permitiendo la circulación de la solución por los vasos sanguíneos. Posterior al tiempo establecido, se perfunde el corazón con solución enzimática (conformada por: solución HEPES, 50 μM CaCl₂ y 0.5 mg/ml de Colagenasa tipo II -aproximadamente 95 U/ml-) durante 5-7 minutos, permitiendo disgregar la red de colágeno y así liberar los miocitos del tejido. Una vez concluido el tiempo de digestión, el corazón se desmonta y el tejido ventricular se disocia mecánicamente con tijeras de las cavidades auriculares y posteriormente se disgrega con pinzas liberando los cardiomiocitos en la solución HEPES (50 μM CaCl₂) libre de colágeno.

Los miocitos obtenidos se centrifugan para descartar la solución enzimática remanente y se les restituye progresivamente, y lentamente, el Ca²⁺ hasta la concentración de 1 mM para evitar la muerte por recalcificación abrupta (**Figura 15 B**). Así mismo los lavados permiten despejar la solución de células muertas. Los cardiomiocitos se mantienen en solución HEPES 1 mM CaCl₂ hasta y durante su uso experimental.



Figura 15 – Aislamiento de cardiomiocitos de ratón. **A.** Procedimiento de canulación de la aorta para posterior colocación del corazón en equipo Langendorff. **B.** Recalcificación de Ca^{2+} de los miocitos obtenidos durante el aislamiento desde 0.05 a 1 mM.

Obtención de miocitos de corazón de rata

Las ratas fueron sacrificadas con inyección i.p. de Uretano (1.5 gr/kg) y posterior apertura de la caja torácica. Rápidamente, la aurícula izquierda fue inyectada con heparina sódica (i.p, 200 u/ml) para evitar la generación de coágulos dentro de los vasos que irrigan el corazón. Posteriormente, se canula la aorta *in situ*, se extrae el corazón y se lo coloca en un Sistema de Langerdorff para realizar la perfusión retrógrada *ex vivo* con solución buffer HEPES (HEPES, conformada por –en mmol/L-: 146.2 NaCl, 4.69 KCl, 11 Glucosa, 10 HEPES, 0.35 NaH_2PO_4 , 1.05 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4 con NaOH) con 1 mM de Ca^{2+} durante 3-5 minutos

para el lavado de sangre remanente en el corazón. Luego al corazón se le hace circular la solución HEPES libre de Ca^{2+} con 100 μM de EGTA por 3 minutos, generando relajación del corazón permitiendo la circulación de la solución por los vasos sanguíneos. Posterior al tiempo establecido, se perfunde el corazón con solución enzimática (conformada por: solución HEPES, 50 μM CaCl_2 y 0.5 mg/ml de Colagenasa tipo II -aproximadamente 95 U/ml-) durante 7-10 minutos, permitiendo disgregar la red de colágeno y así liberar los miocitos del tejido. Una vez concluido el tiempo de digestión, el corazón se desmonta y el tejido ventricular se disocia mecánicamente con tijeras de las cavidades auriculares y posteriormente se disgrega con pinzas liberando los cardiomiocitos en la solución HEPES (50 μM CaCl_2) libre de colágeno. Los miocitos obtenidos se centrifugan para descartar la solución enzimática remanente y se les restituye progresivamente, y lentamente, el Ca^{2+} hasta la concentración de 1 mM para evitar la muerte por recalcificación abrupta (**Figura 15 B**). Así mismo los lavados permiten despejar la solución de células muertas. Los cardiomiocitos se mantienen en solución HEPES 1 mM CaCl_2 hasta y durante su uso experimental.

Determinación de área aparente de cardiomiocitos de ratón

Posterior a los aislamientos de cardiomiocitos de ratón, se tomaron fotografías en microscopio invertido Nikon con objetivo 10X. Una vez adquiridas las fotos, fueron analizadas a ciegas con ImageJ, utilizando el campo total como escala para la determinación del área de los miocitos. Utilizando una cámara de Neubauer, y considerando que la sección cuadrada mayor de la cámara mide aproximadamente 1 mm, se consideró que el diámetro del campo de visión es de aproximadamente 1.8 mm (**Figura 16**).

Una vez seteada la escala, se prosiguió a medir el área celular con la función de mano alzada para dibujar el contorno de la célula en cuestión, determinando así el área aparente de las células cardíacas de ambos grupos de ratones.

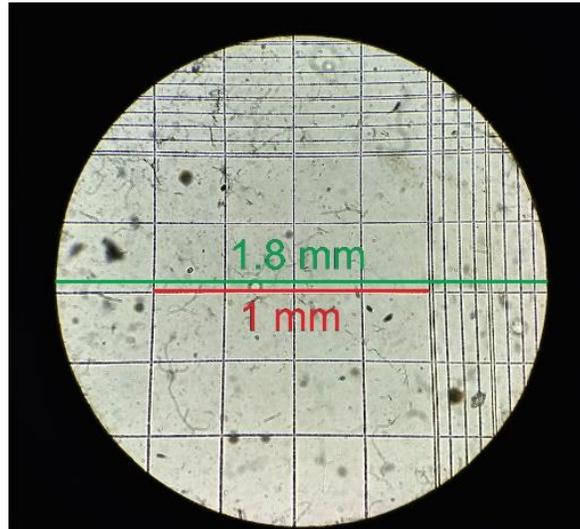


Figura 16 – Seteo de escala para la determinación de área de cardiomiocitos SHAM y TAC.

Determinación de Óxido Nítrico

La producción de óxido nítrico (NO) se determinó por microcopia de epifluorescencia (Microscopio Zeiss 410) en miocitos aislados de ratas Wistar pre-incubados con 5 μ M del indicador fluorescente 4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína Diacetato (DAF-FM Diacetato, Invitrogen). Los miocitos fueron excitados cada treinta segundos a 488 nm de longitud de onda. La fluorescencia emitida se registró entre 500-550 nm y la intensidad de emisión depende de las fuentes de NO intracelulares, como las NOS. Se estimó la producción de NO a partir de las pendientes obtenidas en la relación entre emisión de fluorescencia y fluorescencia inicial (F/F₀) de cada tratamiento. La fluorescencia de cada célula se registró por cinco minutos pre-acondicionando las células con DMSO o Wortmanina, para luego perfundirlas por quince minutos con G1 o Wortmanina con G1, respectivamente. Las soluciones utilizadas (solución extracelular para la medida del PA con 1 mM de CaCl₂, ver más adelante) se perfundieron a velocidad constante de flujo de 1 ml/min, a temperatura ambiente (22-25°C). Finalmente, los registros obtenidos fueron analizados por ImageJ.

Patch Clamp

Mediante la técnica de Patch Clamp se puede llevar a cabo el registro de corriente iónica o de voltaje de membrana. Hay dos modos entonces para realizarlos: el de clampeo de voltaje (*Voltage Clamp* -VC-) y el de clampeo de corriente (*Current Clamp* -IC-). En el método de VC, se mantiene una diferencia de potencial establecida por un circuito de retroalimentación implementando amplificadores diferenciales rápidos y de bajo ruido eléctrico, con ello, se puede leer entonces en simultaneo (es decir, mientras se aplica la diferencia de voltaje) la corriente a través de la membrana. Según la ley de Ohm, el voltaje es proporcional a la corriente y a la resistencia del sistema. En el caso de una célula, la resistencia se debe a los canales presentes en la membrana celular, o a la conductividad de estos, siendo la inversa de la resistencia. Por lo tanto, cambios en el voltaje permitirán establecer una determinada intensidad de corriente a través de estas resistencias (o canales iónicos). En el método de IC no se mantiene una diferencia de potencial, si no que se deja libre la lectura de corriente y se “traduce” a voltaje. Se aplica ahora la ley de Ohm, solo que se altera la corriente para obtener entonces voltajes provenientes de la célula.

Dependiendo entonces qué se quiere registrar (si corriente por VC o voltaje por IC), es necesario establecer un circuito entre las soluciones utilizadas y la célula. Para ello se implementan electrodos de referencias. Uno, el de la solución extracelular o de “baño”, y otro el de la solución intracelular o de “pipeta”, siendo ambas de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl). Finalmente, para cerrar el circuito se debe colocar la membrana de la célula entre ambos electrodos. Para ello, se toca la membrana manipulando el electrodo de la pipeta con un macro y micromanipulador (**Figura 17 A**), posteriormente se realiza una pequeña succión para establecer la configuración de célula sujeta (*Cell Attached, CA*), generando así un aumento gigantesco de la resistencia entre ambos líquidos (se genera el Gigasello).

Finalmente, y a partir de esta configuración, se pueden establecer varias configuraciones, siendo la de uso en esta tesis, la configuración de célula entera (*Whole Cell*, WC, **Figura 17 B**). Para ello, se debe realizar una succión más intensa y rápida para poder mantener el gigasello y acceder a la membrana celular. Permitiendo ahora cerrar el circuito siendo en este momento la célula un capacitor en este sistema, cuya característica eléctrica es de cargarse y descargarse eléctricamente frente a cambios en el voltaje del circuito, capacidad útil para estimar el área celular (ver más adelante).

Entonces, se utilizó la técnica de Patch Clamp en su configuración de WC (**Figura 17**) para la obtención de registro de Potencial de Acción (PA) y corrientes iónicas. Las células fueron colocadas en cámaras vistas en microscopio invertido y perfundidas en soluciones (tanto la solución del baño como la de la pipeta), pertinentes a cada registro (composición de las soluciones descritas más adelante). En todos los casos, las soluciones del baño y de la pipeta se encuentran conectadas al circuito de medida con un electrodo de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl). Los registros fueron realizados con un amplificador AxoPatch 200B y digitalizada por Digidata 1200 (Molecular Devices) para su registro. El análisis de datos de todos los registros fue analizado por ClampFit10.3. Todas las soluciones se perfundieron a un flujo de 1 ml/min, a temperatura ambiente (22-25°C).

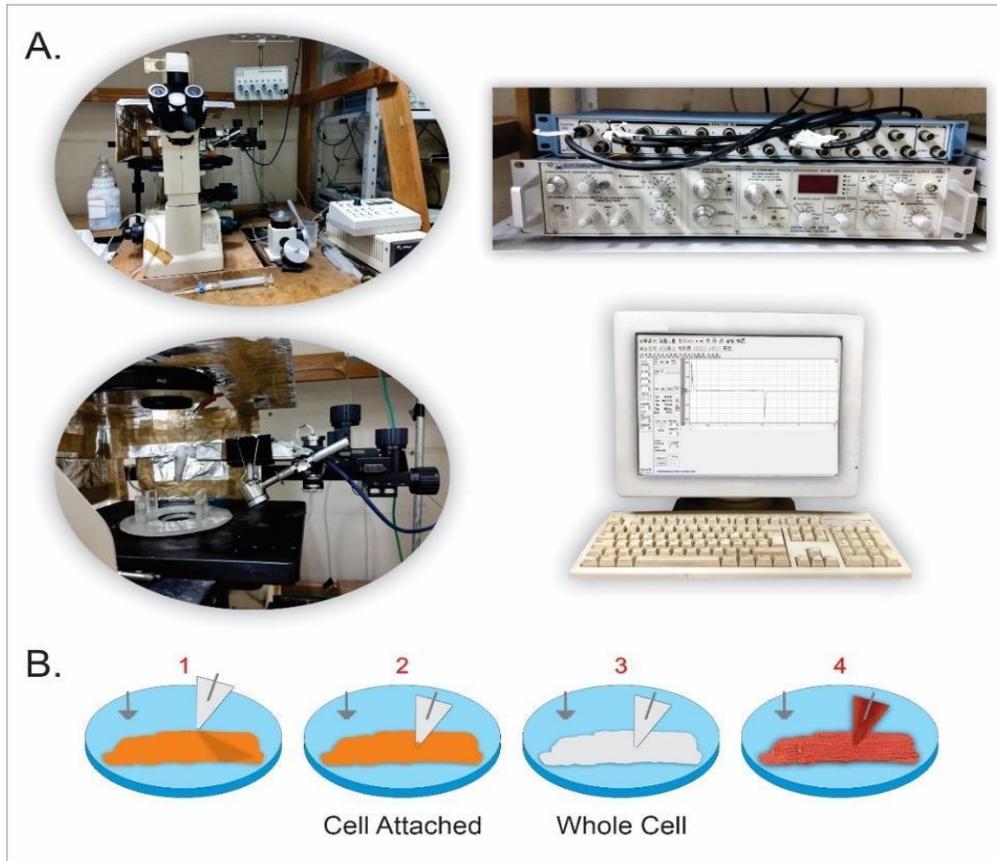


Figura 17 – A. Foto representativo de set up de Patch Clamp, con microscopio invertido, amplificador, digitalizador y computador. B. Esquema representativo para acceder a la configuración WC (3), transitando anteriormente por la configuración de *Cell Attached* (CA, 2).

Los registros se realizaron de la siguiente manera:

Registro de Potencial de Acción

Utilizando la configuración IC se registraron PAs de cardiomiocitos ventriculares aislados utilizando la siguiente solución de perfusión (en mmol/L): 5 KCl, 133 NaCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 2 CaCl₂, 5 Glucosa (pH 7.4 con NaOH). La solución de pipeta contiene (en mmol/L): 125 K-Gluconato, 10 KCl, 8 NaCl, 3 MgATP, 1 EGTA, 10 HEPES (pH 7.2 con KOH). El siguiente protocolo fue aplicado para determinar la intensidad de corriente aplicada para

poder obtener el PA: pulsos de corrientes de 1 nA por 2 milisegundos (ms) a 1 Hz aumentando de a 1 nA por pulso (**Figura 18**).

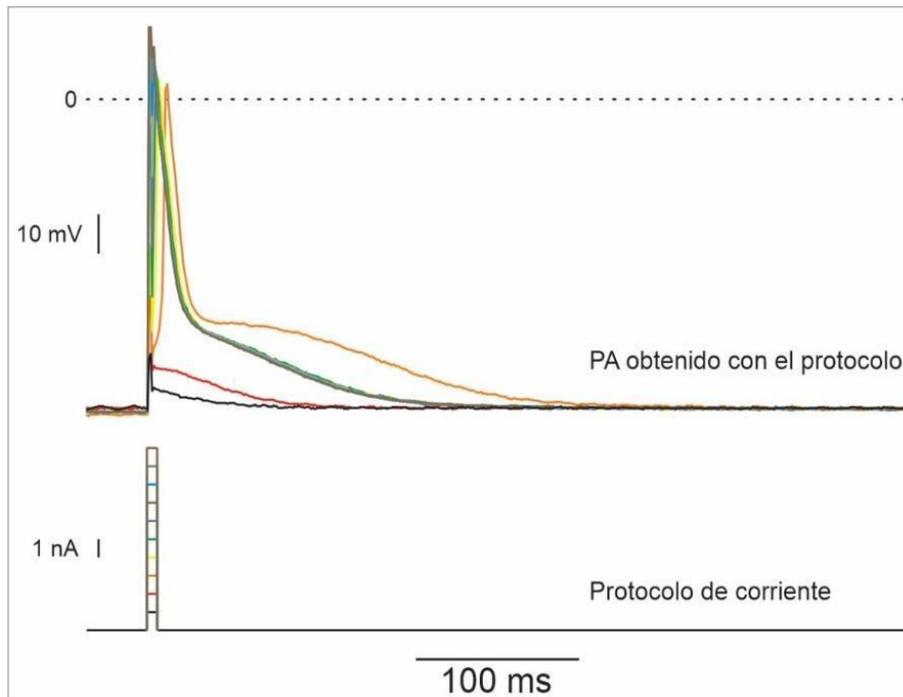


Figura 18 – Esquema de protocolo para la determinación del potencial de acción adecuado para el registro. Arriba, potenciales de acción registrados a diferentes intensidades de corriente. Abajo, protocolo de corriente.

Una vez obtenida la intensidad de corriente al cual se generó un PA estable y repetido en los siguientes pulsos, se lo utilizó para registrar 60 pulsos a esa intensidad de corriente, analizando los últimos 10 estables para establecer los datos a analizar. A cada registro de PA se le sustrajo 14.8 mV de potencial de junta líquida, calculado por el programa Clampex 10.3.

Para la obtención de los parámetros de amplitud, potencial de membrana en reposo (PMR), tiempo al 50% y 90% de la repolarización (APD_{50} y APD_{90} , respectivamente) los registros fueron analizados con la función de estadística de ClampFit.

Registro de Corriente de Calcio

Utilizando la configuración de VC se registró la corriente de Calcio tipo L (I_{CaL}) utilizando la siguiente solución de perfusión para ratones (en mmol/L): 5 CsCl, 120 NaCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 tetraetilamonio cloruro (TEA-Cl, para inhibir la corriente I_{K1}), 5 4-aminopiridina (4-AP, para inhibir la corriente I_{to}), 2 CaCl₂, 5 Glucosa (pH 7.4 con NaOH), y para ratas, la solución es similar a la de ratón con el cambio de las concentraciones de NaCl y CaCl₂ (122 y 1 mM, respectivamente). La solución de pipeta contiene (en mmol/L): 135 CsCl, 1 MgCl₂, 4 Na₂ATP, 5 EGTA, 10 HEPES (pH 7.2 con CsOH).

A los cardiomiocitos aislados se aplicó el siguiente protocolo de voltaje para la obtención de la curva densidad de corriente vs voltaje (curva I.V): con un voltaje de mantenimiento (o de Holding, V_H) de -80 mV, las células fueron sometidas a un prepulso de -40 mV por 150 ms, permitiendo así inactivar la corriente de sodio (I_{Na}). Posteriormente, se aplicaron pulsos desde -50 a +70 mV por 500 ms con aumentos de voltaje cada 5 mV para miocitos de ratón o cada 10 mV para miocitos de rata, a una frecuencia de 0,1 Hz. Las corrientes al pico negativo obtenidos de los registros a cada voltaje le fueron sustraídas las corrientes en el estado estacionario (EE) y normalizadas por la capacitancia, obteniéndose así densidad de corriente a cada voltaje aplicado permitiendo obtener la curva I.V de las células para su análisis.

A partir del protocolo para la obtención de la curva I.V, se determinó la activación de la corriente dependiente de voltaje tanto para ratones como para ratas. Para ello, se dividió cada densidad de corriente obtenida por la densidad de corriente máxima (I / I_{Max}), obteniéndose así, una curva sigmoidea en función del voltaje. Se consideraron los voltajes desde -50 hasta 5 mV para su determinación. Utilizando la función de fiteo de ClampFit, se utilizó la ecuación de Boltzmann carga-voltaje como se muestra a continuación:

$$f(V) = \frac{IMax}{1 + e^{\frac{(Em1/2 - V)}{Vc}}} + C$$

Siendo $E_{m1/2}$ el potencial al 50% de la curva ($E_{m1/2}$ de activación), siendo este un valor característico del comportamiento de la curva, y utilizado en el presente trabajo.

A los registros a 0 mV se les ha determinado la cinética de inactivación utilizando la ecuación biexponencial para determinar la constante al 70% de la inactivación (τ) para la inactivación rápida (Tau rápida, dependiente de calcio) y la lenta (Tau lenta, dependiente de voltaje):

$$f(t) = A1 * e\left(-\frac{t}{\tau_{rápida}}\right) + A2 * e\left(-\frac{t}{\tau_{lenta}}\right) + C$$

Finalmente, se realizaron protocolos de Inactivación dependiente de voltaje para los grupos de ratones, de la siguiente manera. Aplicando de forma similar para la obtención de la curva IV, los pulsos de voltaje aplicados desde -50 a +5 mV cada 5 mV ahora fueron aplicados durante 1600 ms. Posteriormente se aplicó un pulso de 2 ms a -80 mV, evitando así cambios de corrientes generado por los pulsos anteriores, y aplicando consecutivamente un pulso a 0 mV durante 500 ms. Para obtener la curva de Inactivación dependiente de voltaje se le sustrajo la corriente en EE a las corrientes del pulso a 0 mV, normalizando esta por la capacitancia y dividiendo cada corriente por la corriente máxima obtenida en este pulso de voltaje (I / I_{Max}). Utilizando la ecuación de Boltzmann descrita anteriormente, se obtuvo el $E_{m1/2}$ de inactivación.

Registro de Corriente de Potasio

Utilizando la configuración de VC se registraron las corrientes de potasio, utilizando la siguiente solución de perfusión (en mmol/L): 133 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 2 CaCl₂, 5 Glucosa (pH 7.4 con NaOH). La solución de pipeta contiene (en mmol/L): 125 K-Gluconato, 10 KCl, 1 MgCl₂, 4 Na₂ATP, 1 EGTA, 10 HEPES (pH 7.2 con KOH). Para la medida de I_{K1} , se suministró a la solución de perfusión 2 mM de 4-aminipiridina para la

inhibición de la corriente I_{to} . El protocolo de voltaje utilizado fue el siguiente: se aplicaron un prepulso a -40 mV por 150 ms, para inactivar I_{Na} , y posteriormente pulsos desde -120 a -20 mV por 500 ms. Para la medida de I_{to} , se suministró a la solución de perfusión 0.3 CoCl₂ para la inhibición de la corriente I_{K1} . El protocolo de voltaje utilizado fue el siguiente: se aplicó un prepulso a -40 mV por 100 ms, para inactivar I_{Na} , y posteriormente pulsos desde -50 a +80 mV por 260 ms cada 10 mV. A cada registro se le sustrajo 14.8 mV de potencial de junta líquida, calculado por el programa Clampex 10.3.

Para los registros de I_{K1} , las corrientes fueron analizadas en el estado estacionario, mientras que las de I_{to} , fueron analizadas las corrientes al pico. Para determinar si efectivamente registrábamos I_{to} , algunas células fueron sometidas a 4-AP, obteniendo una reducción de la corriente al pico, indicando que efectivamente estábamos obteniendo I_{to} (a +5 mV; control: 4.08 ± 0.97 pA/pF vs 4-AP: 1.6 ± 0.28 pA/pF, N/n = 2/6, $p < 0.05$).

Registro de Capacitancia

Una vez que se accede a la configuración de WC, en cada caso de registro de corriente iónica, se somete a las células a un pequeño pulso negativo de 10 mV desde el V_H . Obteniéndose un gráfico similar a la **Figura 19**. Se calcula el área del registro capacitivo y se divide por la diferencia de voltaje aplicado, obteniéndose así la capacitancia de la célula, siendo este valor un indicador proporcional del área celular y normalizador de todos los registros de corrientes en el presente trabajo de Tesis.

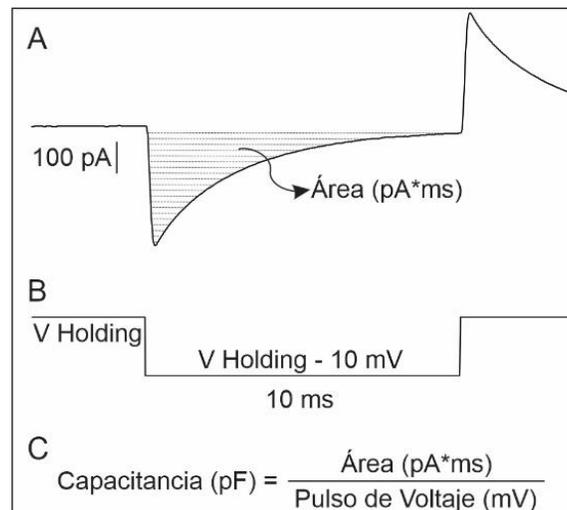


Figura 19 – A. Gráfico representativo de carga y descarga de la membrana celular, comportándose como un capacitor. **B.** Protocolo para obtener la capacitancia de la célula. **C.** Cuenta matemática para la obtención de la capacitancia de la célula.

Western Blot

Los corazones de los ratones de ambos grupos fueron molidos en nitrógeno líquido y homogenizados en una solución buffer RIPA con inhibidores de proteasa como aditivo. Posteriormente, se realizó la cuantificación de proteína total mediante la técnica de Bradford y las muestras se diluyeron en buffer de carga SDS/PAGE [10%(v/v) de glicerol, 1-3% (v/v) 2-mercaptoetanol, 2% (p/v) SDS, 0.5% de azul de bromofenol, 75 mM de TRIS, pH 6.8]. Luego fueron resueltas en 7.5-12% de poliacrilamida, dependiendo del peso molecular de la proteína en cuestión. Al finalizar la corrida, se transfirieron a membrana PVDF por electroforesis (SDS-PAGE). Las membranas fueron bloqueadas con una solución al 5% de leche para luego incubarlas *overnight* con los anticuerpos específicos a cada proteína. Al finalizar, se incubaron por 1 hora con los anticuerpos secundarios, conjugados con una peroxidasa de rábano, realizando así la detección quimioluminiscencia, cuantificando la señal por análisis densitométricos con el software ImageLab (Bio-Rad).

Anticuerpos utilizados:

Anti-GPER Policlonal; 1:500; 1%BSA en TTBS (*Invitrogen; PA5-87717*).

Anti-Na/K/ATPasa Monoclonal; 1:1000; 1%BSA en TTBS (Thermofisher)

Anti-Rabbit; 1:10000, 1% leche en TTBS (*Santa Cruz Biotechnology, sc-2004*).

Reactivos utilizados

Se utilizaron los siguientes reactivos junto a sus respectivas concentraciones: G1, agonista de GPER, 1 μ M (Cayman Chemical Company); G36, antagonista de GPER, 1 μ M (Cayman Chemical Company); L-NAME, inhibidor de NOS general, 100 nM (Sigma Aldrich); Wortmanina, inhibidor de PI3K, 100 nM (Invitrogen); DMSO, solvente de los reactivos, 0.01% v/v (Sigma Aldrich).

Análisis Estadístico

Todos los resultados obtenidos se expresan como promedio \pm error estándar (SEM). En todos los casos se ha utilizado GraphPad Prims 8 para el análisis estadístico. Para comparar los grupos se utilizó Test de Student apareado o desapareado, según corresponda. Un $p < 0.05$ implica diferencia significativa. N/n indica número de animales y número de células, respectivamente.

RESULTADOS

1. Determinación de la señalización de GPER en corazones de ratas Normotróficos.

Con el objetivo de determinar los efectos generados por GPER en tejido cardíaco en condiciones fisiológicas (en este caso, normotrofia), recurrimos al estudio del receptor en cardiomiocitos aislados de ratas.

Datos preliminares realizados en nuestro laboratorio e incluidos en la tesis de la Dra. Sofía Espejo (aún no publicados), mostraron que tanto el estradiol como la aldosterona, actuando sobre el GPER, disminuye la contractilidad y el transitorio de Ca^{2+} (CaT). Estos efectos se encontraron asociados a una disminución de la corriente de calcio tipo L (I_{CaL}). En el presente trabajo de tesis, se realizaron experimentos adicionales, activando selectivamente GPER con su agonista sintético G1, que confirmaron los resultados previos. Se administró buffer HEPES + DMSO (0.01%, solvente utilizado para disolver G1) hasta lograr la estabilidad del AS y el CaT. Posteriormente, se administró G1 (1 μM) por 15 minutos. El AS se midió en modo continuo, mientras que el CaT se registró a intervalos regulares (2, 5, 10 y 15 min), para evitar pérdida del indicador por exposición constante a la luz de excitación. La **Figura 20** muestra el efecto producido por el agonista de GPER en miocitos ventriculares aislados de rata Wistar macho. Se observa que en presencia de G1 se produce un efecto inotrópico negativo rápido. Dicho efecto se ve acompañado por una disminución del CaT, registrado con el indicador fluorescente Fura-2 AM. Debido a que los efectos observados se pueden deber no solo a la administración de G1, si no al efecto prolongado del DMSO, se realizaron controles de tiempo pertinentes para descartar dicha posibilidad. No se encontraron diferencias significativas a los mismos tiempos determinados en los protocolos con G1 (AS en DMSO: $5.21 \pm 1.46\%$; DMSO 15 min: $4.20 \pm 1.17\%$, $p > 0.05$, t-Student apareados. CaT

en DMSO: 0.30 ± 0.07 u.a; DMSO 15 min: 0.29 ± 0.07 u.a, $p > 0.05$, t-Student apareado. $N/n = 3/8$), indicando que lo observado anteriormente se debe al G1 y no al tiempo de exposición del solvente.

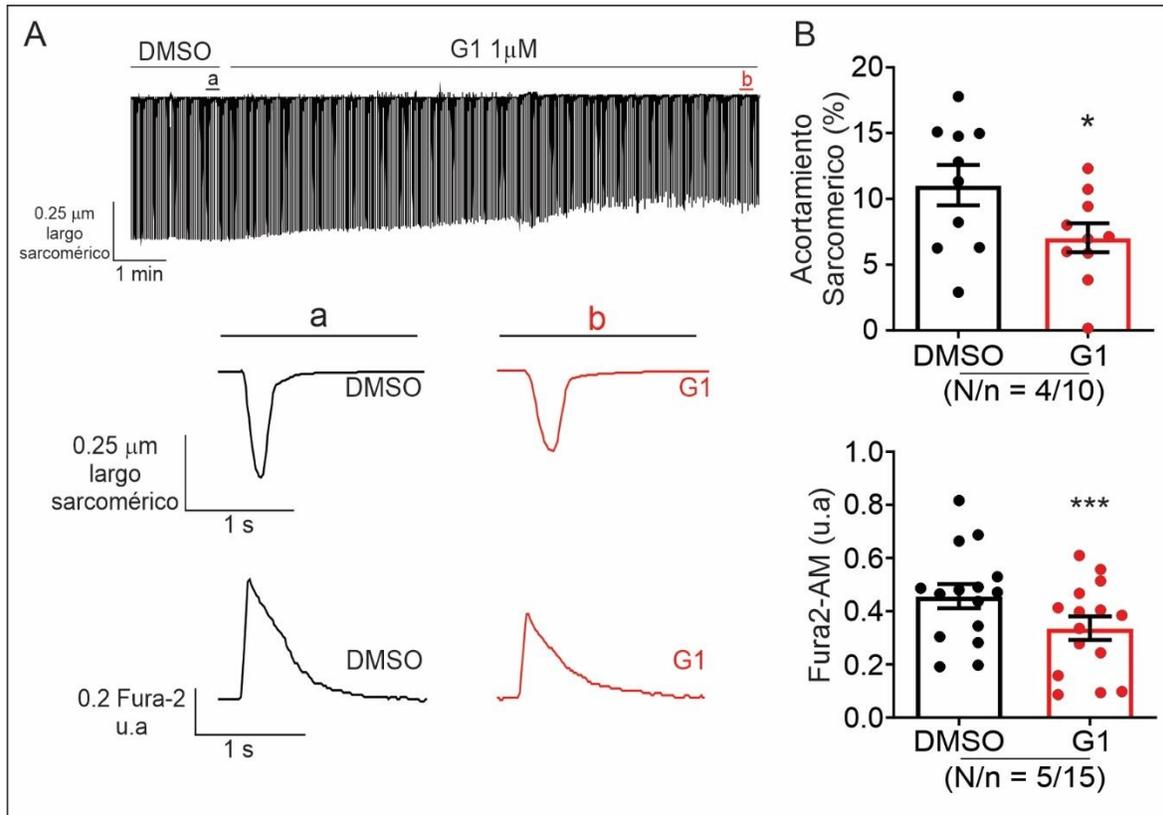


Figura 20 - A. Trazo representativo de acortamiento sarcomérico (AS, arriba) y promedios de AS y transitorios de calcio (CaT) de los segmentos a y b (abajo), de cardiomiocitos de ratas antes y durante el tratamiento con $1 \mu\text{M}$ de G1, en el sistema *IonOptix*, (a y b indican los trazos correspondientes para su análisis). **B.** Gráficas de barras del efecto de G1 sobre el AS (arriba) y el CaT (abajo). Se observa disminución del AS y del CaT en presencia de $1 \mu\text{M}$ de G1. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ indican diferencia significativa respecto a DMSO. Análisis estadístico implementando t-Student apareados. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos de barra. El N/n adicional para el registro de CaT se debe a un experimento en el que no se pudo medir la contractilidad.

Recordando que el aumento del CaT durante la sístole se asocia al mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio, es importante determinar si la corriente de calcio se ve afectada

en presencia de G1. Recurriendo así a la implementación de la técnica de Patch-Clamp, se realizaron medidas de I_{CaL} en cardiomiocitos ventriculares aislados mediante el mismo protocolo de administración de soluciones utilizado en los registros de AS y CaT, es decir, DMSO hasta lograr la estabilidad de la corriente con posterior administración de G1 por 15 minutos. De manera consistente, el efecto observado de G1 sobre la contractilidad y el calcio intracelular, se registró una reducción de I_{CaL} por el agonista de GPER (**Figura 21**).

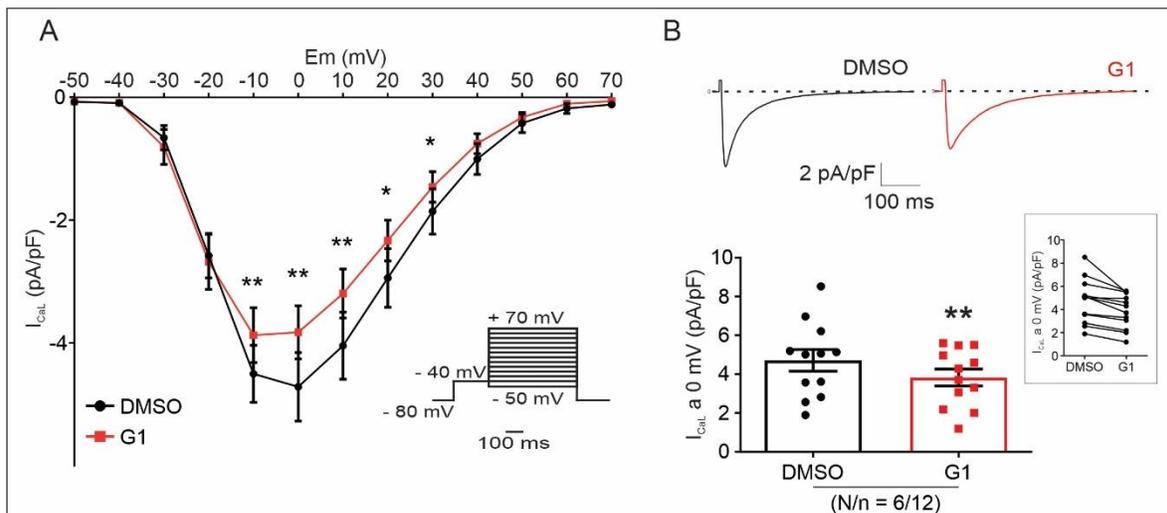


Figura 21 - A. Curva de densidad de corriente en función del voltaje (curva IV) de cardiomiocitos ventriculares tratados antes y después de $1 \mu\text{M}$ de G1 (inset: protocolo de voltaje aplicado), utilizando la técnica de Patch Clamp. **B.** Trazo representativo de I_{CaL} a 0 mV (arriba) y gráfico de barras de la densidad de corriente junto su inset de gráficos de puntos unidos (abajo). Se observa que la presencia del agonista sintético de GPER produce una disminución de la densidad de corriente de CaL. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ indican diferencias significativas respecto a DMSO. Análisis estadístico implementando t-Student apareados. El número estadístico de cada tratamiento se encuentran en la base de los gráficos de barra.

Se observa en la **Figura 21**, que I_{CaL} disminuye significativamente su actividad a potenciales cercanos a su máxima corriente en presencia de G1. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la reducción de I_{CaL} por G1, es responsable, al menos en parte, de la reducción del calcio intracelular y la contractilidad, pudiendo la activación de GPER mediar efectos en el AEC.

Debido a que la biofísica del canal podría verse alterada en presencia de G1, y por lo tanto alterar así la densidad I_{CaL} , se han realizado medidas de cinética de inactivación y dependencia de voltaje de la activación. No se observaron cambios significativos en la velocidad de inactivación del canal en presencia de G1 (Tau lento a 0 mV: DMSO: 105.0 ± 5.3 ms; G1: 122.2 ± 9.3 ms, N/n = 5/10. Tau rápido a 0 mV: DMSO: 21.78 ± 2.67 ms; G1: 30.39 ± 3.42 ms, N/n = 5/10, análisis estadístico t-Student apareados, $p > 0.05$). Por otro lado, aunque se ha obtenido una leve tendencia a hiperpolarizar el voltaje al 50% de la activación del canal, tampoco se encontraron diferencias significativas en la dependencia al voltaje de la activación entre DMSO y G1 (Em_{50} de activación: DMSO: -21.48 ± 1.51 mV; G1: -23.11 ± 1.57 mV; N/n = 5/13; análisis estadístico t-Student apareado, $p = 0.0516$). Resta determinar si cambios en la dependencia al voltaje de la inactivación pueden explicar la reducción de I_{CaL} inducida por la activación de GPER.

Aunque G1 es un agonista específico de GPER, para confirmar definitivamente si el efecto de G1 se produce a través de la activación de GPER fue necesario la utilización de su antagonista selectivo (G36, 1 μ M). Para ello, los registros de AS, CaT e I_{CaL} , se llevaron a cabo con la presencia de G36 hasta lograr la estabilidad del registro, con posterior administración de G1 junto con el antagonista. El efecto observado de G1 sobre la contractilidad, el transitorio de calcio y la corriente CaL, fue prevenido por G36 (**Figura 22**), confirmando que la activación de GPER media dichos efectos.

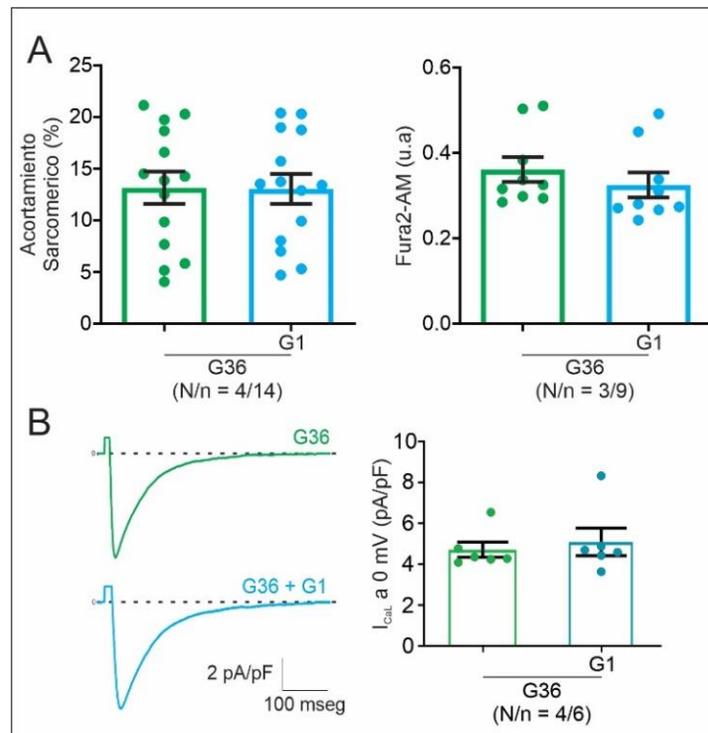


Figura 22 - A. Efecto en AS (izquierda) y CaT (derecha) en presencia del antagonista de GPER, G36, antes y después del tratamiento con G1. **B.** Trazo representativo de I_{CaL} a 0 mV (izquierda) y gráfico de barras de la densidad de corriente de calcio (derecha) en presencia de G36, antes y después de G1. Se observa que al inhibir el GPER con G36 el efecto producido por G1 sobre el AS, CaT e I_{CaL} se evita. Análisis estadístico implementado t-Student apareados. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos de barra. El N/n adicional para el registro de AS se debe a un experimento en el que no se pudo medir el CaT.

Observando que la activación de GPER produce un efecto inotrópico negativo, producto de disminución de la corriente y del transitorio de calcio, se decidió investigar la vía de señalización involucrada en este mecanismo.

De acuerdo con los conceptos vertidos en la introducción, una de las vías responsables de la señalización disparada por la activación del GPER es la que involucra a PI3K con la consecuente activación de NOS. Por este motivo, nos dispusimos a investigar esta vía intracelular inhibiendo PI3K con Wortmanina (100 nM) o la producción de NO con L-Name (100 nM). La **Figura 23** muestran que tanto Wortmanina como L-Name previenen el efecto

de G1 sobre el AS, el CaT e I_{CaL} , indicando que ambos intermediarios participan de la vía de señalización tras la activación del GPER.

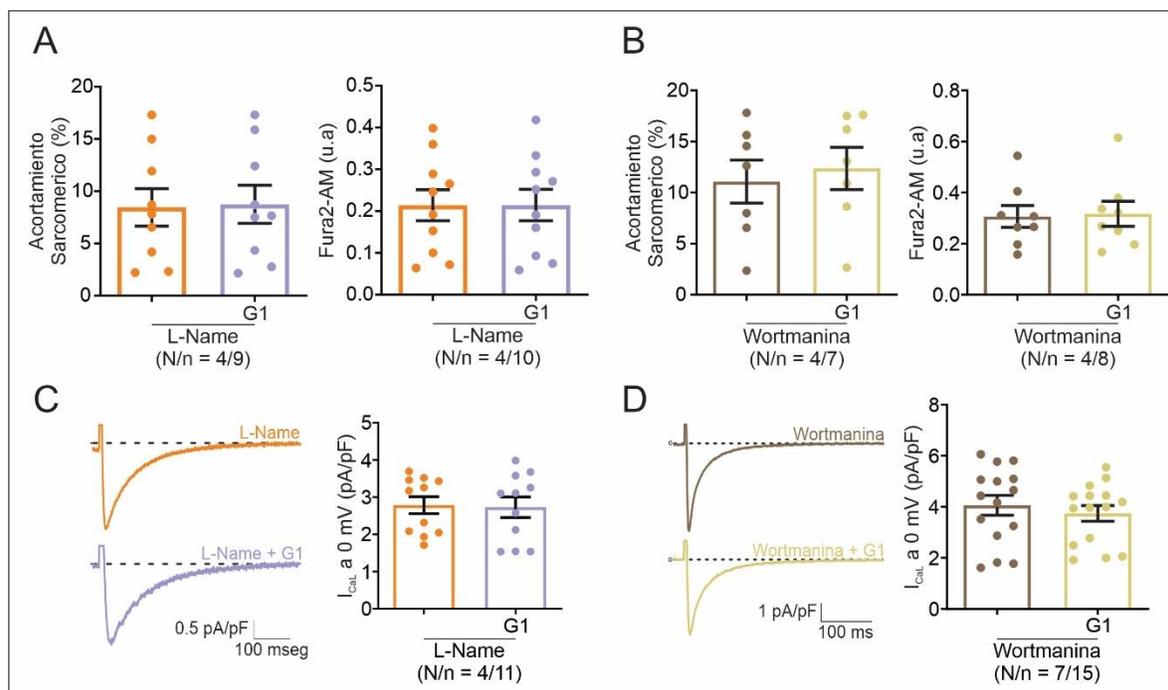


Figura 23 - **A.** AS y CaT en presencia de L-Name, antes y después de G1. **B.** AS y CaT en presencia de Wortmanina, antes y después de G1. **C.** Trazo representativo (izquierda) y gráfico de barras (derecha) de I_{CaL} a 0 mV en presencia de L-Name antes y después de G1. **D.** Trazo representativo (izquierda) y gráfico de barras (derecha) de I_{CaL} a 0 mV en presencia de Wortmanina antes y después de G1. La presencia del inhibidor de NOS o PI3K previnieron la acción de G1 tanto en la contractilidad del cardiomiocito como en el transitorio y corriente de calcio. Análisis estadístico implementado t-Student apareados. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos de barra.

Finalmente, para dilucidar si el efecto de GPER se inicia con la activación de NOS o con la activación de PI3K, se realizaron medidas de NO mediante fluorescencia utilizando el indicador DAF-diacetato en presencia de G1 o Wortmanina con G1. La **Figura 24** describe que la producción de NO aumenta con G1, efecto observado con el aumento de la pendiente respecto a su condición control (**Figura 24 A**), fenómeno que no ocurre con la preincubación

de las células con Wortmanina (**Figura 24 B**), indicando que GPER actúa activando PI3K y posterior a ello, se activa NOS, estimulando la producción de NO.

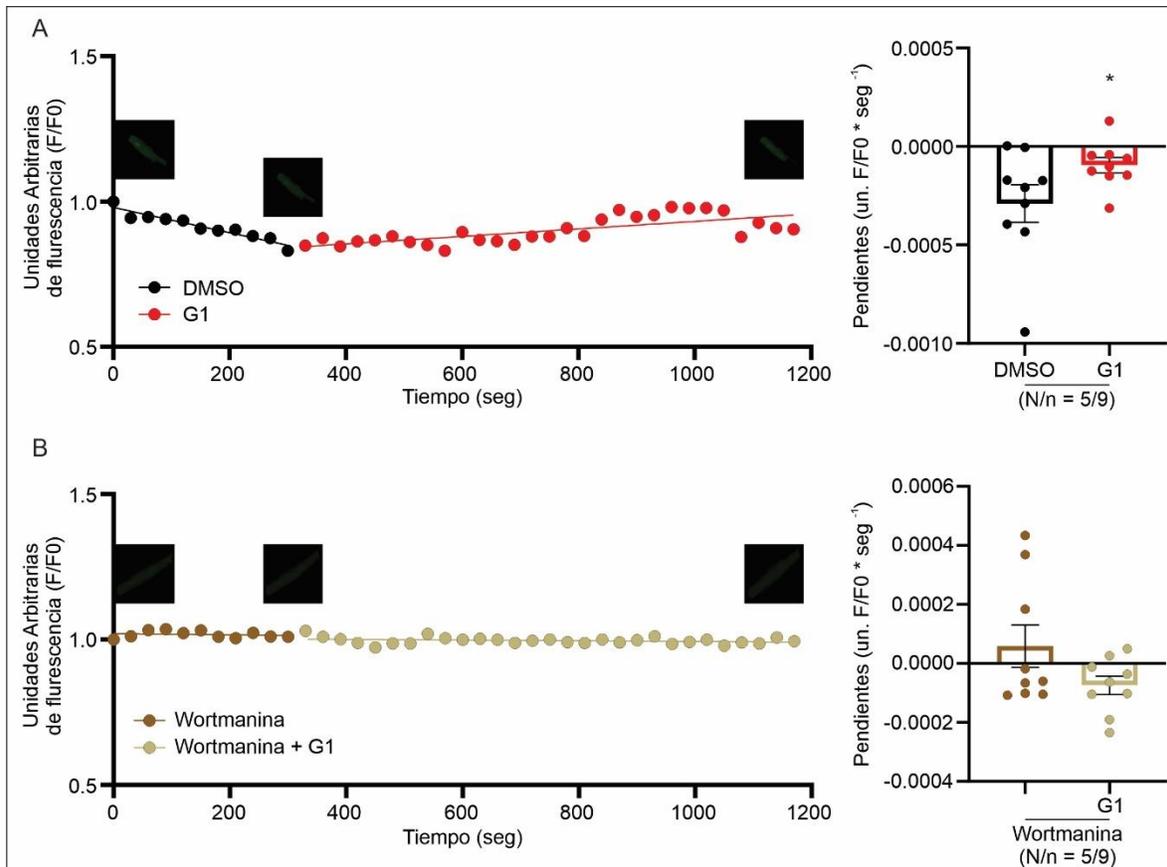


Figura 24 - A. Curva de fluorescencia sobre fluorescencia inicial (F/F0) en función del tiempo (izquierda) y sus respectivos valores de pendientes (derecha) obtenidas en ausencia y presencia de G1. **B.** F/F0 en función del tiempo (izquierda) y sus respectivos valores de pendientes (derecha) obtenidas en ausencia y presencia de G1 con pretratamiento con Wortmanina. Se observa que el tratamiento con 1 μ M de G1 provoca un aumento de la producción de NO, indicado por su aumento en la pendiente obtenida, efecto evitado pretratando las células con Wortmanina 100 nM. * $p < 0.05$ indica diferencia significativa respecto a DMSO. Análisis estadístico implementado t-Student apareados. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos de barra.

Concluimos que la activación selectiva de GPER con G1 en cardiomiocitos aislados de ratas macho provoca una disminución en I_{CaL} , alterando el acoplamiento excito-contráctil del cardiomiocito, y generando así un efecto inotrópico negativo por reducción de la amplitud

del transitorio de calcio. Además, se ha podido dilucidar que la vía intracelular implicada en dicho efecto es PI3K-NOS-NO.

2. Determinación de actividad de GPER en ratones Normotróficos (SHAM) e Hipertrofos (TAC).

Desarrollo de hipertrofia

Con la finalidad de determinar los efectos generados por GPER en tejido cardíaco en condiciones patológicas (en este caso, hipertrofia), indujimos una sobrecarga de presión a través de la técnica de coartación aórtica transversa (TAC) en ratones macho.

Como se ha descrito anteriormente (en Materiales y Métodos), el desarrollo de hipertrofia cardíaca se llevó a cabo con la utilización de clips quirúrgicos. Los clips permitieron generar un cierre de la aorta de aproximadamente 60%, determinado por área de cierre de los clips (se consideró el área aproximado estándar utilizado en ratones -una aguja 27G- y considerando que la aorta posee un diámetro de 1 mm).

La utilización de métodos ecocardiográficos ha permitido estudiar las dimensiones cardíacas de ambos grupos de ratones. En la **Figura 25 A** se observan los valores de la masa ventricular izquierda normalizada por el peso de los ratones (índice de masa ventricular izquierda, IMVI), anterior y veintiocho días posterior de la cirugía.

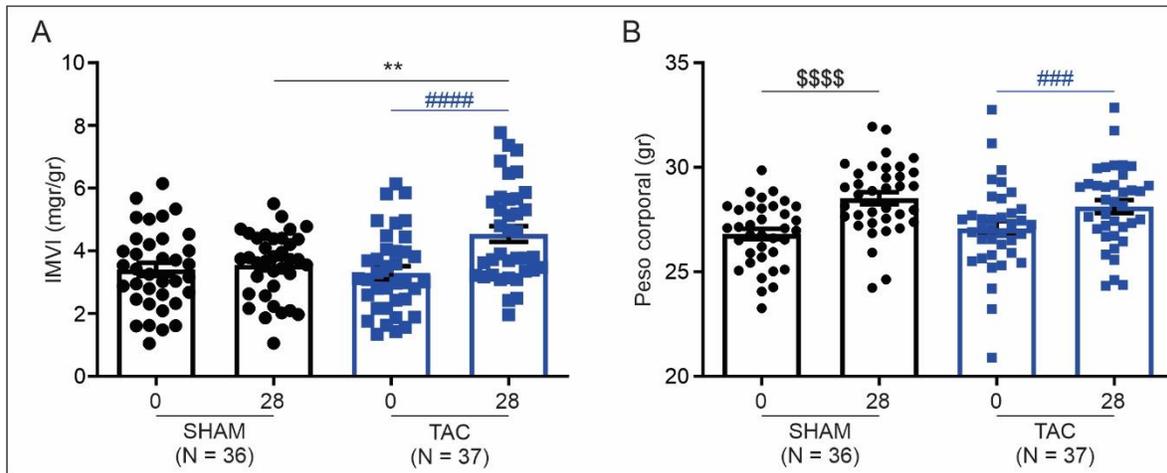


Figura 25 – A. Índice de masa ventricular izquierda normalizado por peso corporal (IMVI) de ratones SHAM y TAC, al día cero (0) y veintiocho (28) posterior a la cirugía. **B.** Peso corporal de ratones SHAM y TAC al día cero (0) y veintiocho (28) posterior a la cirugía. Se observa aumento significativo del índice de masa ventricular izquierda, sin cambios en el peso de los animales tratados TAC, respecto a los SHAM. ** $p < 0.05$ indica diferencia significativa respecto a SHAM 28. ### $p < 0.0005$ y ##### $p < 0.0001$, indica diferencias significativas respecto a TAC 0. \$\$\$\$ $p < 0.0001$ indica diferencia significativa respecto a SHAM 0. Análisis estadístico implementado t-Student apareados (entre un mismo grupo) y desapareado (SHAM vs TAC). El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos de barra.

Mientras no se observaron cambios en los ratones SHAM, se detectó un aumento en el IMVI de aproximadamente 40% en los ratones TAC luego de 28 días de realizada la coartación. Además, el peso corporal aumentó significativamente y en la misma proporción en cada grupo experimental y no fue diferente entre TAC y SHAM (**Figura 26 B**). También se determinó la masa ventricular izquierda normalizada por la longitud de la tibia luego de 28 días de la cirugía. Como se puede observar en la **Figura 26 A**, se detectó en este caso un aumento en el IMVI de aproximadamente 30% en los TAC respecto de los SHAM. Los valores de longitud de la tibia no fueron diferentes entre los grupos (**Figura 26 B**).

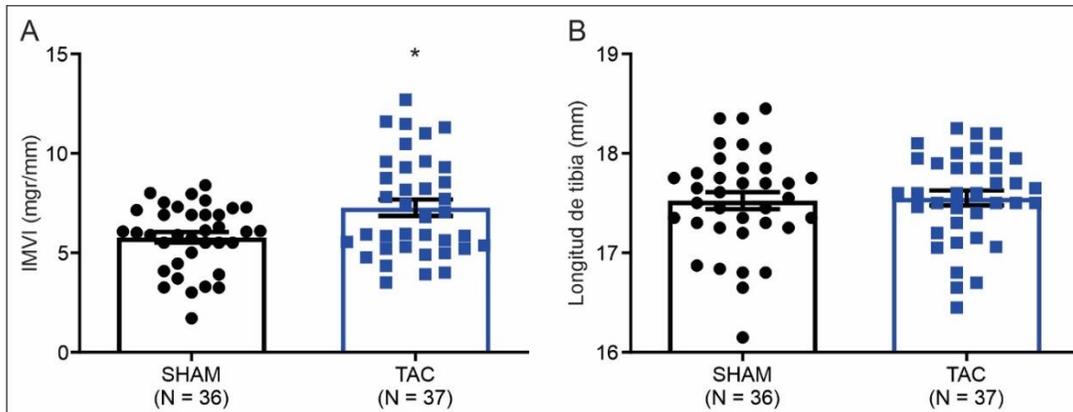


Figura 26 – **A.** Índice de masa ventricular izquierda normalizado por longitud de tibia (IMVI) de Ratones SHAM y TAC a 28 días posterior a la cirugía. **B.** Longitud de tibia. Se observa aumento significativo de la masa ventricular izquierda al normalizarlo por la tibia, sin cambios en este parámetro normalizador. * $p < 0.05$ indica diferencia significativa respecto a SHAM. Análisis estadístico implementado t-Student desapareado, con corrección con Test de Mann Whitney. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos de barra.

En algunas de las preparaciones se ha realizado la medida del peso del corazón de los ratones con balanza y se la ha normalizado por el peso corporal o la longitud de la tibia. Como se observa en la **Figura 27**, se ha obtenido un aumento significativo del peso de corazón de los ratones TAC respecto al grupo SHAM al normalizar por ambos parámetros. En conjunto, todos los resultados indican que el procedimiento implementado fue efectivo para generar HC.

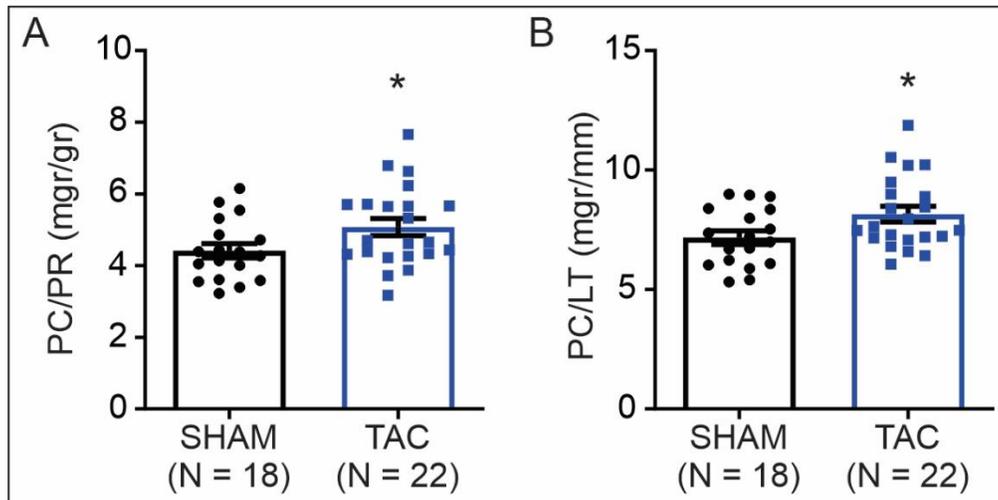


Figura 27 – A. Peso de corazón normalizado por peso de ratón (PC/PR) de ratones SHAM y TAC al día 28 post cirugía. **B.** Peso de corazón normalizado por longitud de tibia (PC/LT) de ratones SHAM y TAC al día 28 post cirugía. Se observa un aumento significativo de la masa cardíaca de los ratones TAC respecto a los SHAM. * $p < 0.05$ indica diferencia significativa respecto a SHAM. Análisis estadístico implementado t-Student desapareado. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos de barra.

Adicionalmente, el área celular de los cardiomiocitos puede ser estimada a través de la capacitancia registrada por Patch-Clamp o midiendo el área aparente de células fotografiadas luego de los aislamientos de cada grupo de ratones. En la **Figura 28** se puede observar que la coartación aórtica con clip produjo un aumento significativo del área celular aparente de cardiomiocitos TAC respecto a los SHAM. Sin embargo, no se observó diferencia alguna en la capacitancia celular. Estos resultados sugieren que, a pesar de que el área aparente esté aumentada, posibles alteraciones en los túbulos T de los cardiomiocitos TAC no permiten que esto se vea reflejado en la capacitancia. Consistentemente, se ha reportado que los miocitos de los corazones hipertróficos presentan detubulación²⁴⁹⁻²⁵¹.

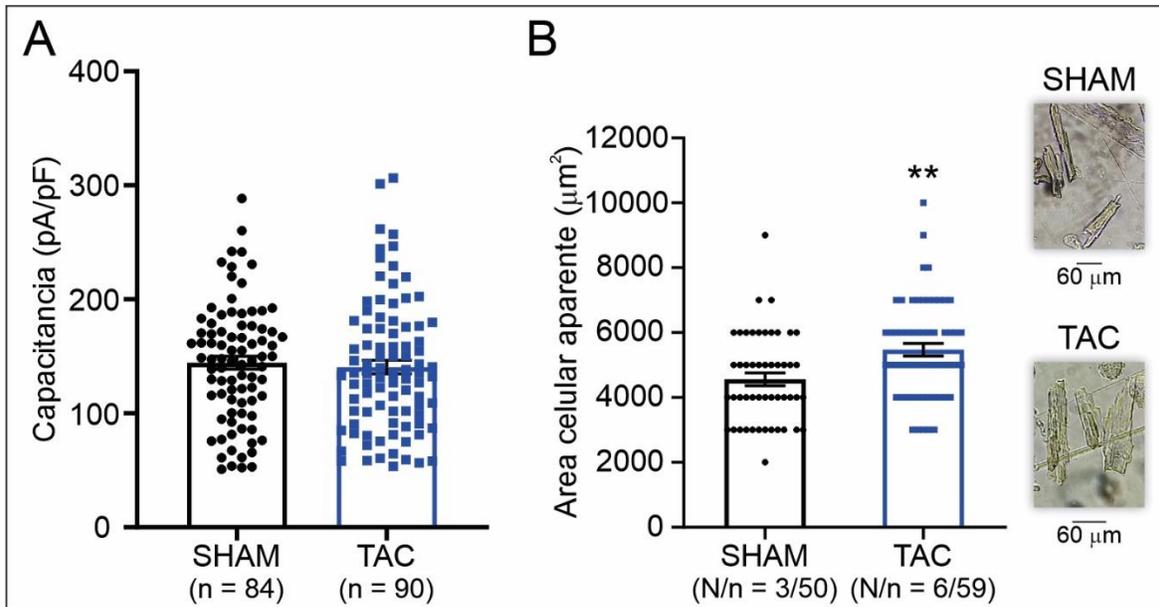


Figura 28 – **A.** Capacitancia de cardiomiocitos SHAM y TAC. **B.** Área celular aparente de cardiomiocitos aislados SHAM y TAC junto a fotos representativas. Se observa aumento significativo del área de células TAC respecto a SHAM, sin cambios en la capacitancia celular. ** $p < 0.005$ indica diferencia significativa respecto a SHAM. Análisis estadístico implementado t-Student desapareado con corrección de Test de Mann-Whitney. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos de barra.

Debido a que el modelo estudiado presenta aumentos significativos de la masa ventricular, nos enfocamos en ver como se encontraba la función cardíaca para así poder establecer si estábamos frente a una hipertrofia con falla cardíaca o no. Para ello, y como índice de la función sistólica, determinamos el valor de la fracción de acortamiento endocárdico (FAEn) obtenido de las ecografías. El modelo no presenta cambios en la FAEn, indicando que es un modelo de hipertrofia cardíaca patológica con fracción de eyección conservada (**Figura 29**).

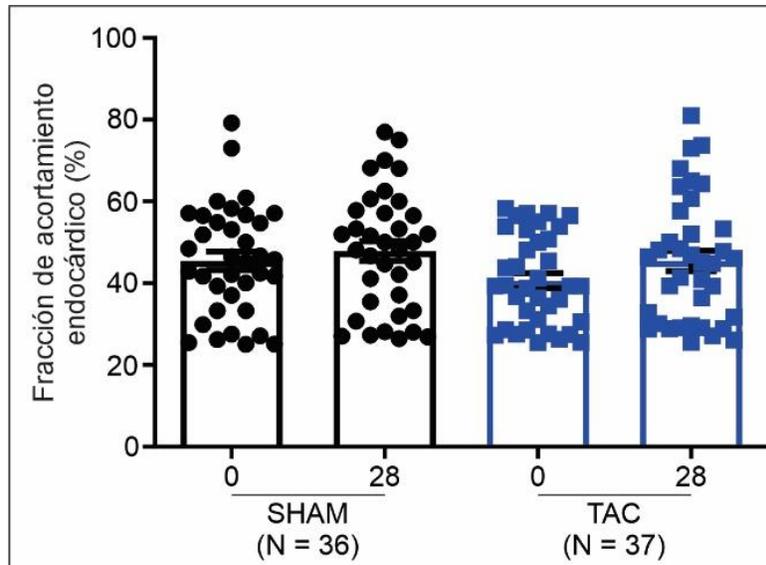


Figura 29 – Fracción de acortamiento endocárdico en porcentaje de ratones SHAM y TAC, al día cero (0) y al día veintiocho (28) posterior a la cirugía. No se encontraron diferencias significativas entre grupos y entre tratamientos. Análisis estadístico implementado t-Student desapareado entre grupos y apareados en un mismo grupo. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos de barra.

Considerando que el remodelamiento cardíaco se acompaña con alteraciones del tejido, consideramos pertinente el estudio histológico de los corazones normo e hipertróficos. En los corazones de ratones TAC se encontró un aumento significativo del colágeno tipo I y una disminución del colágeno tipo III, sin cambios en el colágeno total (utilizado para realizar la normalización). Consistentemente, el cociente colágeno tipo I/colágeno tipo III fue mayor en TAC que en SHAM, resultado característico de la HC patológica (**Figura 30**)²⁵²⁻²⁵⁴.

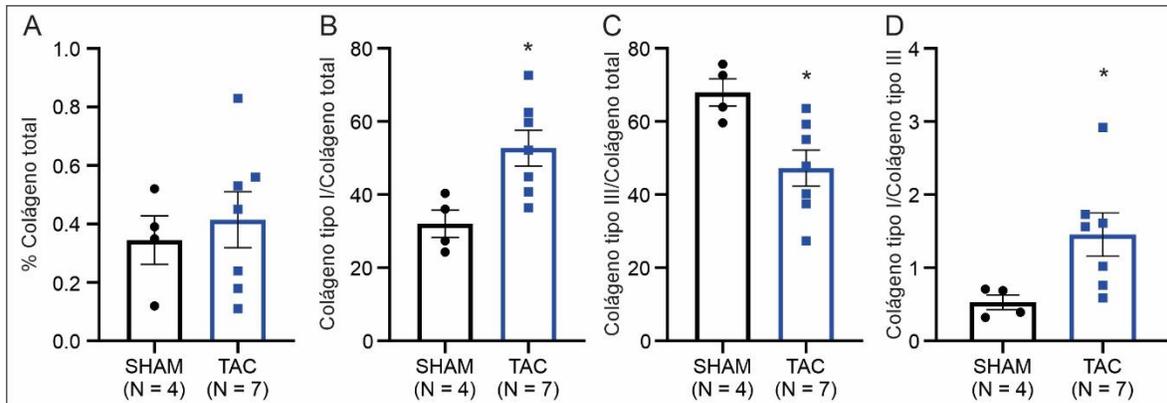


Figura 30 – **A.** Porcentaje de colágeno total. **B.** Colágeno tipo I normalizado por colágeno total. **C.** Colágeno tipo III normalizado por colágeno total. **D.** Relación entre colágeno I y III. Se observa que el grupo TAC presenta un aumento significativo respecto al grupo SHAM del colágeno tipo I y una relación colágenoI/colágenoIII característico de este modelo. * $p < 0.05$ indica diferencia significativa respecto a SHAM. Análisis estadístico utilizado t-Student despareado. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos de barra.

Concluimos que el modelo establecido mediante coartación aórtica transversa mediante el uso de clips fue exitoso para la generación de hipertrofia cardíaca, útil para nuestros objetivos en el presente trabajo de tesis.

Cambios en el potencial de acción cardíaco (PAC) inducidos por TAC

Con el modelo ya establecido de hipertrofia cardíaca, proseguimos con los estudios electrofisiológicos. Se sabe que en la hipertrofia cardíaca es característica la presencia de potenciales de acción prolongados. Consistentemente, en nuestros registros, las medidas de los potenciales de acción indican que los ratones TAC presentan un aumento significativo de la duración del PAC respecto a los SHAM (**Figura 31**). Este fenómeno, característico de esta patología, valida aún más el modelo de hipertrofia cardíaca utilizado en el presente trabajo de Tesis. Como puede observarse en la **Figura 31 E**, la duración del PAC al 90% de la repolarización (APD_{90}) aumentó más de un 50% en ratones TAC respecto a los SHAM. Adicionalmente, se detectó una disminución significativa en el valor del potencial de

membrana en reposo (PMR) en los TAC con respecto a SHAM (**Figura 31 C**). En contraste, no se observaron cambios en el APD_{50} y en la amplitud del potencial de acción entre ambos grupos.

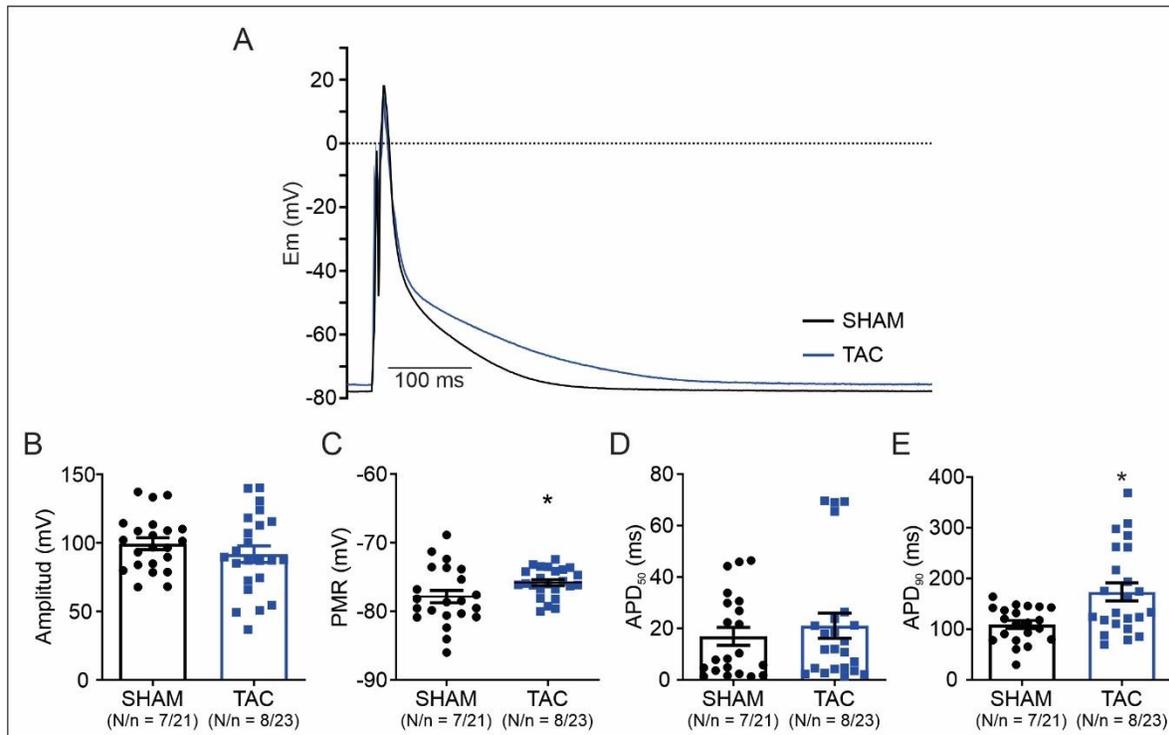


Figura 31 – **A.** Trazo promedio de potenciales de acción cardíacos (PAC) de los grupos SHAM y TAC. **B.** Gráfico de amplitud del PAC de ratones SHAM y TAC. **C.** Potencial de membrana en reposo (PMR) del PAC de ratones SHAM y TAC. **D.** Duración del PAC al 50% de la repolarización (APD_{50}) de ratones SHAM y TAC. **E.** Duración del potencial de acción al 90% de la repolarización (APD_{90}) de ratones SHAM y TAC. Se observa una disminución significativa del PMR y un aumento significativo del APD_{90} respecto al grupo SHAM, evento característico de esta patología. Análisis estadístico utilizado t-Student desapareado, con corrección de Mann-Whitney test para el APD_{50} y APD_{90} . * $p < 0.05$ indica diferencia significativa respecto a SHAM. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos de barra.

Concluimos que el modelo establecido mediante la utilización de clip permite reproducir los eventos electrofisiológicos característicos que conlleva la hipertrofia cardíaca.

Efecto de la activación aguda del GPER por G1 sobre la morfología y duración del PAC en miocitos ventriculares aislados de corazones normotróficos e hipertróficos

Debido a cambios en la duración del PAC que podrían conllevar a alteraciones en la respuesta contráctil, nos dispusimos a determinar si la morfología del PAC cambia frente a la activación de GPER por su agonista selectivo G1. Para ello, miocitos ventriculares de ambos grupos de ratones, pre-perfundidos con la solución de DMSO, solvente utilizado para disolver el compuesto (concentración final 0.01% v/v), fueron expuestos 15 minutos a G1 (1 μ M).

En la **Figura 32** se observa que en los cardiomiocitos SHAM, G1 provoca un aumento significativo del PMR (**Figura 32 B**) mientras que disminuye significativamente el APD₉₀ (**Figura 32 D**).

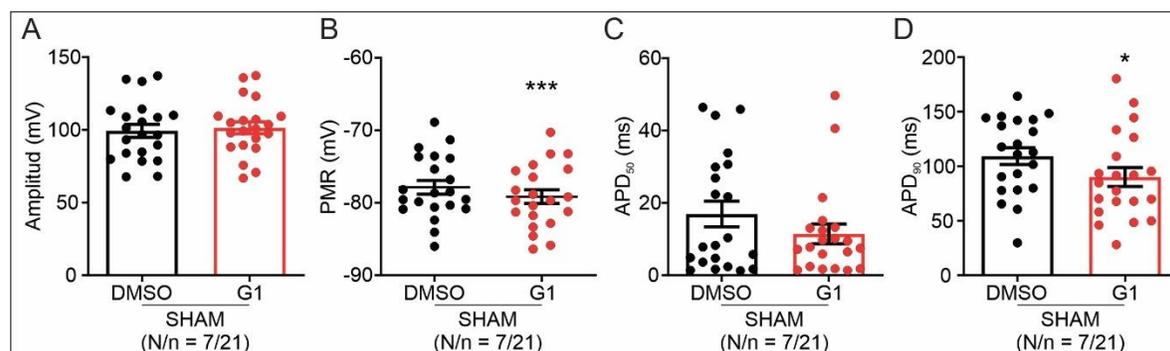


Figura 32 – **A.** Amplitud del PAC de cardiomiocitos SHAM antes y después de G1. **B.** PMR del PAC de cardiomiocitos SHAM antes y después de G1. **C.** APD₅₀ del PAC de cardiomiocitos SHAM antes y después de G1. **D.** APD₉₀ del PAC de cardiomiocitos SHAM antes y después de G1. Se observa que la presencia de G1 induce aumento significativo del PMR y disminución significativa de APD₅₀ y APD₉₀ del PAC de cardiomiocitos SHAM. Análisis estadístico utilizado t-Student apareado, con corrección de Wilcoxon para APD₅₀. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.0001$ indica diferencia significativa respecto a DMSO. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos de barra.

Asimismo, para determinar si estos efectos se observan también en cardiomiocitos TAC, se sometieron las células al mismo procedimiento. En la **Figura 33** se observa que el G1 genera

una disminución significativa de la amplitud y el APD₉₀ (**Figura 33 A y D**, respectivamente), y un aumento significativo del PMR (**Figura 33 B**), pero sin alterar el APD₅₀ (**Figura 33 C**).

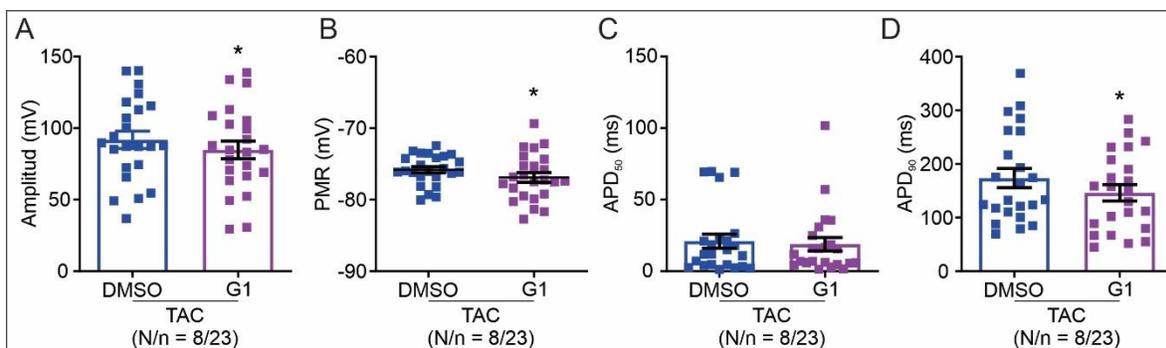


Figura 33 – **A.** Amplitud del PAC de cardiomiocitos TAC antes y después de G1. **B.** PMR del PAC de cardiomiocitos TAC antes y después de G1. **C.** APD₅₀ del PAC de cardiomiocitos TAC antes y después de G1. **D.** APD₉₀ del PAC de cardiomiocitos TAC antes y después de G1. Se observa que la presencia de G1 induce aumento significativo del PMR y disminución significativa de la amplitud y APD₉₀ del PAC de cardiomiocitos TAC. Análisis estadístico utilizado t-Student apareado, con corrección de Wilcoxon para APD₅₀ y APD₉₀. * $p < 0.05$ indica diferencia significativa respecto a DMSO. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos de barra.

Al observar efectos similares con G1 en ambos grupos de ratones, se decidió determinar la expresión del GPER, ya que misma cantidad de receptores podrían determinar una respuesta de la misma magnitud. Para nuestra sorpresa, como se puede observar en la **Figura 34**, existe una disminución significativa de la expresión de GPER en ratones TAC respecto a SHAM. Interesantemente, se ha descrito que en un modelo de ratón KO de GPER, se desarrolla disfunción cardíaca con grados elevados de dilatación de la cavidad ventricular y alteraciones de la masa ventricular^{46, 48, 255, 256}. Por lo tanto, en referencia a los resultados del presente estudio restaría evaluar si la disminución del GPER es causa o consecuencia de la HC generada por TAC.

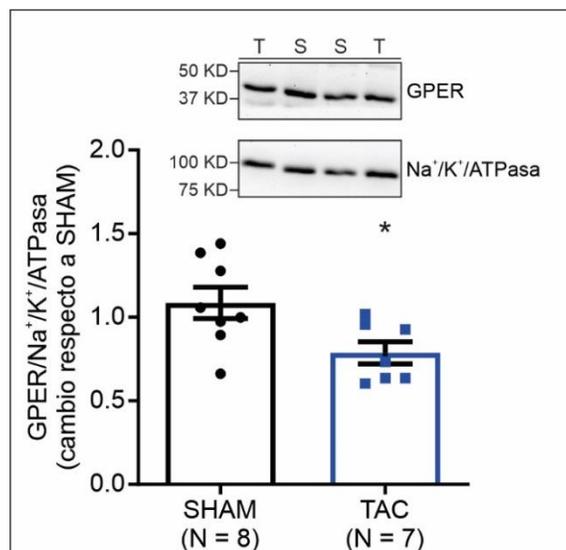


Figura 34 – Blot representativo (arriba) y gráficos de expresión de GPER de ventrículos de ratones SHAM (S) y TAC (T). Se observa una disminución significativa de GPER en ratones TAC respecto a SHAM. Análisis estadístico utilizado t-Student desapareado. * $p < 0.05$ indica diferencia significativa respecto a SHAM. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos de barra.

Observamos entonces, que la activación de GPER en ambos grupos de cardiomiocitos tiene efectos significativos en el PAC, indicando que posiblemente esté modificándose la actividad de los canales iónicos encargados de la duración del PAC y su morfología.

Efecto de la hipertrofia cardíaca inducida por TAC sobre I_{CaL}

La determinación de I_{CaL} permite indicar, de cierta manera, si el acoplamiento excito-contráctil se encuentra alterado, ya que la unión de ambos eventos (la excitación y la contracción del músculo cardíaco) se debe en principio a la entrada de Ca^{2+} por dichos canales. A su vez, un alargamiento del PAC, como el observado en TAC, se puede deber a un incremento de I_{CaL} , en la fase dos del potencial de acción. Sin embargo, se observó al medir I_{CaL} que la misma no se ve aumentada en los grupos TAC. Por lo contrario, se observa

una disminución significativa de I_{CaL} en los ratones TAC con respecto a los SHAM, como se puede apreciar tanto en los trazos representativos de las corrientes registradas a 0 mV como en la curva corriente-voltaje (**Figura 35**).

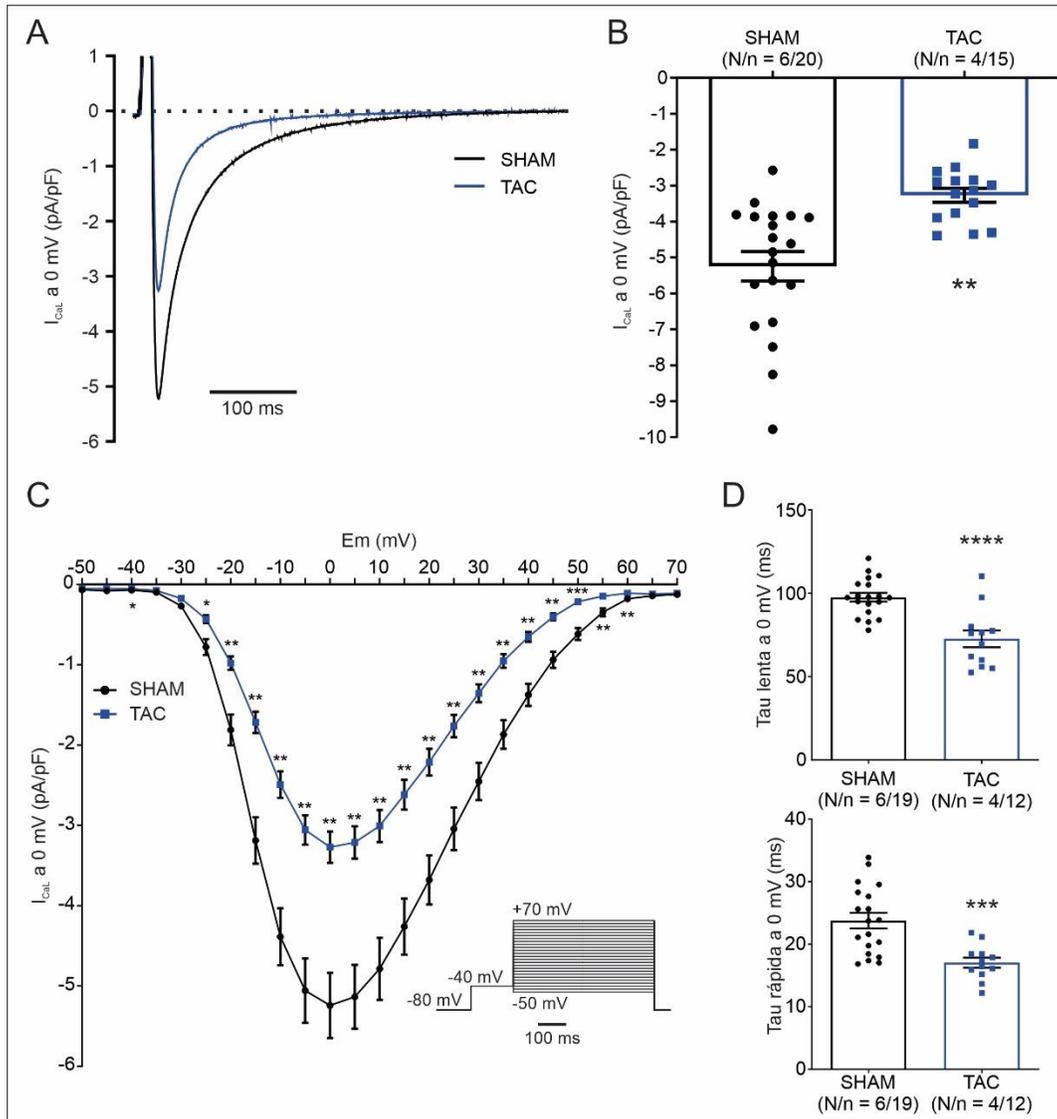


Figura 35 – **A.** Trazos promedio representativos de corriente CaL a 0 mV de los grupos SHAM y TAC. **B.** Gráfico de barras de densidad de corriente a 0 mV. **C.** Curva de densidad de corriente en función del voltaje (Curva IV), junto a su protocolo de voltaje aplicado (inset). **D.** Gráficos de barra de cinética de inactivación rápida y lenta (abajo y arriba, respectivamente) de CaL a 0 mV. Se observa que la inducción de hipertrofia cardíaca utilizando la técnica desarrollada durante esta tesis, produce disminución significativa de I_{CaL} , con aumentos en la velocidad de inactivación del canal, en el grupo TAC comparado con el SHAM. Análisis estadístico utilizado t-Student desapareado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$ indican diferencias significativas respecto a SHAM. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos de barra.

Para comprender este cambio encontrado en los ratones TAC, se decidió estudiar si la biofísica del canal se encontraba alterada. Para ello se determinaron la cinética de inactivación y la dependencia del voltaje de la activación e inactivación del canal.

Comparando la cinética de inactivación entre ambos grupos de miocitos, se observó que el grupo TAC presentó un aumento significativo de la velocidad de inactivación, tanto en el componente rápido (inactivación dependiente de calcio) como en el lento (inactivación dependiente de voltaje), frente al grupo SHAM (**Figura 36 D**). Esto indica que I_{CaL} de los ratones TAC se inactiva más rápidamente que los SHAM, lo cual disminuye la corriente total que fluye durante el pulso aplicado, como puede observarse en el registro de la corriente provocada por el pulso de 0 mV (**Figura 35 A**).

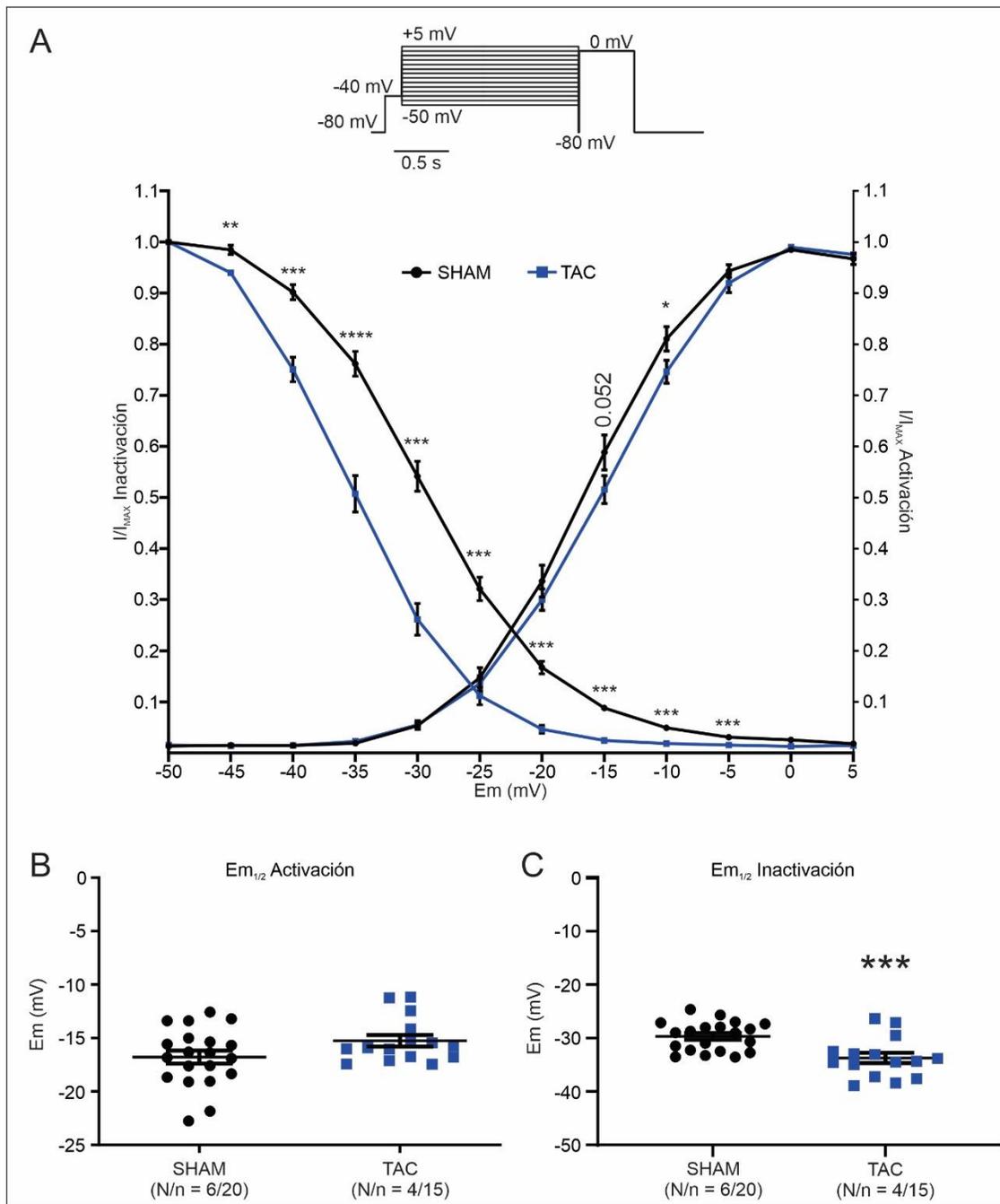


Figura 36 – A. Protocolo de voltaje para la inactivación (arriba) y curvas de Activación e Inactivación dependiente de voltaje (abajo) de cardiomiocitos SHAM y TAC. **B.** Gráfico de barras de voltaje al 50% de la activación. **C.** Gráfico de barras de voltaje al 50% de la inactivación. Se observa que los cardiomiocitos de ratones TAC presenta un aumento significativo de la inactivación dependiente de voltaje, respecto al grupo SHAM, indicando un corrimiento de la curva de inactivación hacia valores más negativos. Análisis estadístico utilizado t-Student desapareado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$ indican diferencias significativas respecto a SHAM. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos.

En la dependencia del voltaje de la activación del canal, aunque se observó una disminución significativa entre TAC respecto a SHAM solo a -10 mV (**Figura 36 A**), no se observaron diferencias significativas entre TAC y SHAM en el voltaje promedio al cual se logra el 50% de la activación del canal (**Figura 36 B**). Sin embargo, la dependencia del voltaje de la inactivación del canal presenta cambios significativos entre grupos, observando que los miocitos de ratones TAC presentan un mayor grado de inactivación a la mayor parte de los voltajes aplicados en relación con los SHAM (**Figura 36 A y C**), quedando evidenciado claramente en la negativización del voltaje promedio al cual se logra el 50% de la inactivación del canal (**Figura 36 C**).

Estos resultados indican que la disminución de I_{CaL} en los ratones TAC puede deberse, al menos en parte, al cambio de la cinética de inactivación y al cambio de su inactivación dependiente de voltaje. Sin embargo, para descartar que la intensidad de corriente puede depender también de la cantidad de canales presentes en la membrana celular, restaría medir la expresión proteica de la subunidad alfa del canal CaL , experimentos que no se han realizado hasta el momento.

Efecto de la activación aguda del GPER por G1 sobre I_{CaL} en miocitos ventriculares aislados de corazones normotróficos e hipertróficos.

Nos preguntamos entonces, si la condición observada en los miocitos TAC, podría alterarse activando GPER con G1. Interesantemente, encontramos que en presencia de G1, la actividad de I_{CaL} disminuye significativamente únicamente en el grupo TAC (**Figura 38**), respecto a su condición control. No se observaron efectos de G1 en el grupo SHAM (**Figura 37**).

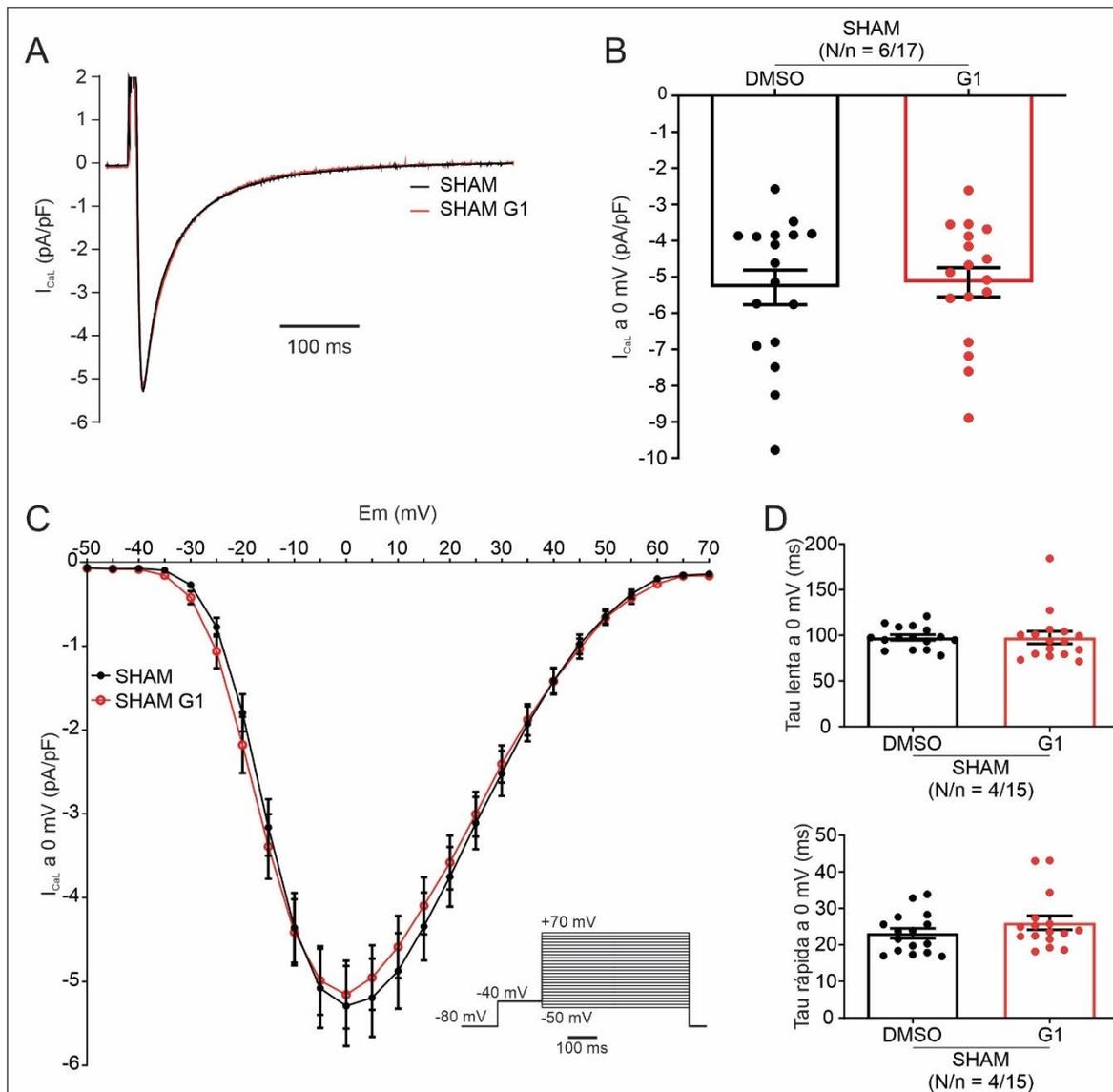


Figura 37 – **A.** Trazos promedio representativos de corriente CaL a 0 mV del grupo SHAM en ausencia y presencia de G1. **B.** Gráfico de barras de densidad de corriente a 0 mV. **C.** Curva de densidad de corriente en función del voltaje (Curva IV), junto a su protocolo de voltaje aplicado (inset). **D.** Gráficos de barra de cinética de inactivación rápida y lenta (abajo y arriba, respectivamente) de CaL a 0 mV. Se observa que la presencia de 1 μ M de G1 no afecta la actividad de CaL en ratones SHAM. Análisis estadístico utilizado t-Student apareado. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos.

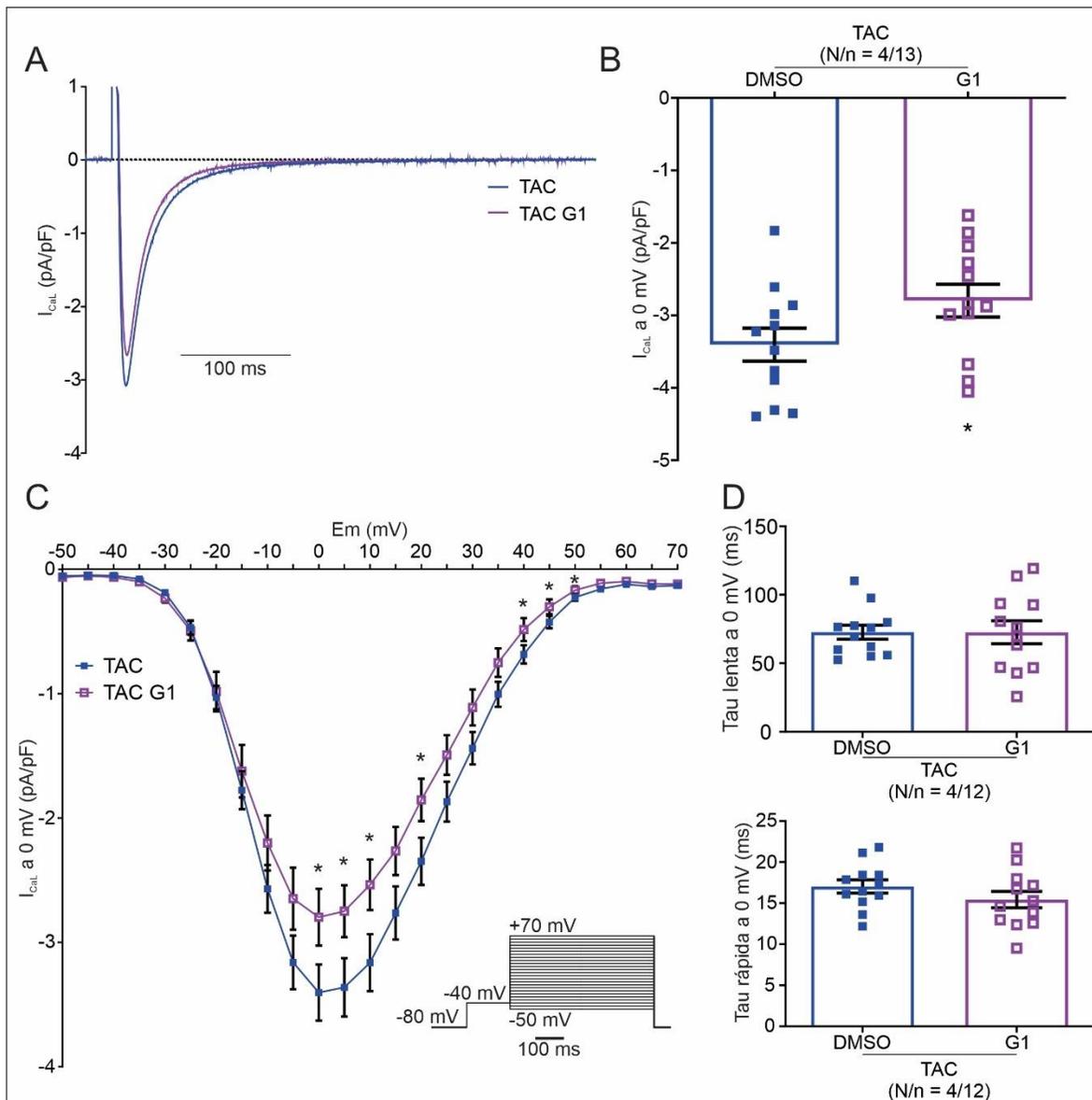


Figura 38 – **A.** Trazos promedio representativos de corriente CaL a 0 mV del grupo TAC en ausencia y presencia de G1. **B.** Gráfico de barras de densidad de corriente a 0 mV. **C.** Curva de densidad de corriente en función del voltaje (Curva IV), junto a su protocolo de voltaje aplicado (inset). **D.** Gráficos de barra de cinética de inactivación rápida y lenta (abajo y arriba, respectivamente) de CaL a 0 mV. Se observa que la presencia de 1 μ M de G1 afecta significativamente la actividad de CaL en ratones TAC, provocando una disminución en la actividad del canal. Análisis estadístico utilizado t-Student apareado. * $p < 0.05$ indica diferencia significativa respecto a DMSO. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos.

Estudiando un poco más a fondo la biofísica del canal en ambos grupos de miocitos en presencia del agonista sintético de GPER, en la dependencia del voltaje de la activación del

canal, 1 μ M de G1 solamente produjo un pequeño corrimiento a valores más negativos de potencial de membrana en la activación dependiente de voltaje del canal en el grupo SHAM (Figura 39).

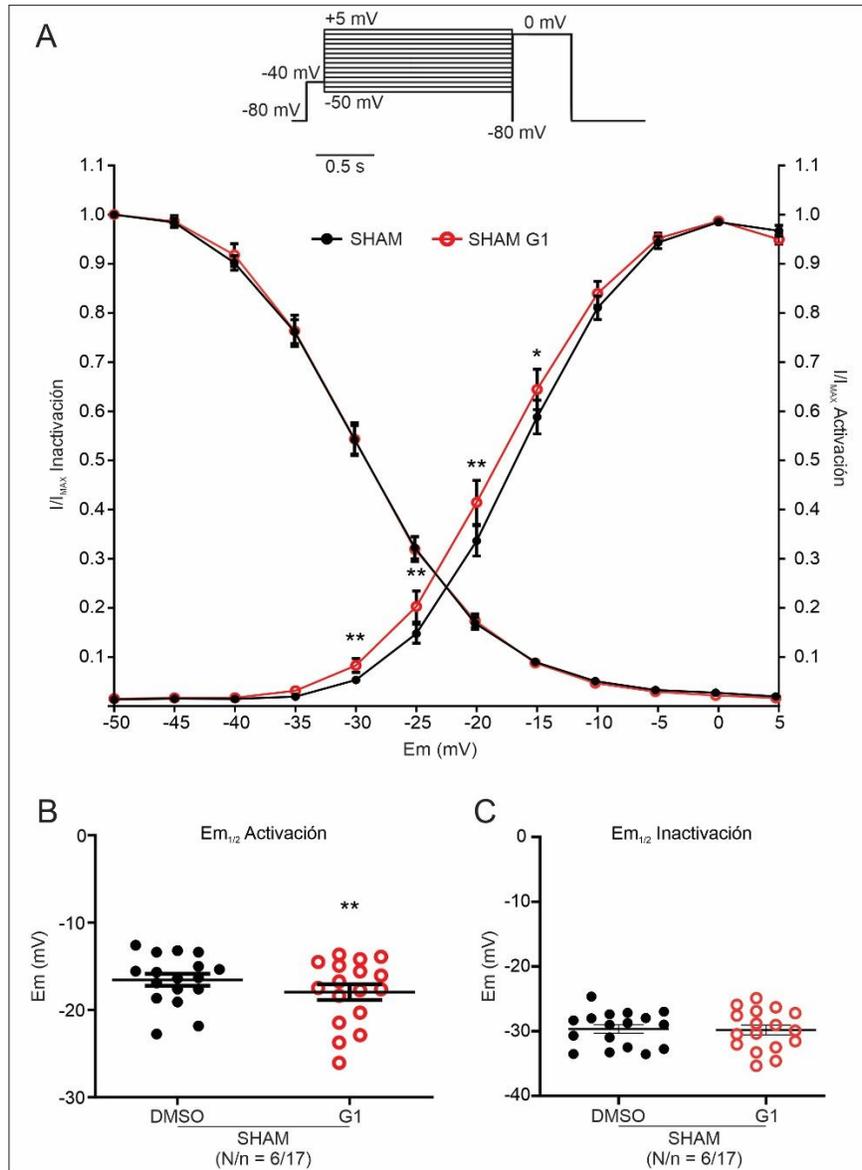


Figura 39 – A. Protocolo de voltaje para la inactivación (arriba) y gráficos de Activación e Inactivación dependiente de voltaje (abajo). B. Gráfico de barras de voltaje al 50% de la activación. C. Gráfico de barras de voltaje al 50% de la inactivación. Se observa un pequeño corrimiento significativo hacia valores negativos de la activación dependiente de voltaje del canal CaL en cardiomiocitos SHAM expuestos a G1. Análisis estadístico utilizado t-Student apareado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ indican diferencias significativas respecto a DMSO. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos.

De igual modo que ocurrió con la amplitud de la corriente, G1 solamente produjo cambios en la dependencia del voltaje de la inactivación en TAC, en los cuales se observó un corrimiento hacia valores aún más negativos de la inactivación voltaje-dependiente (**Figura 40**).

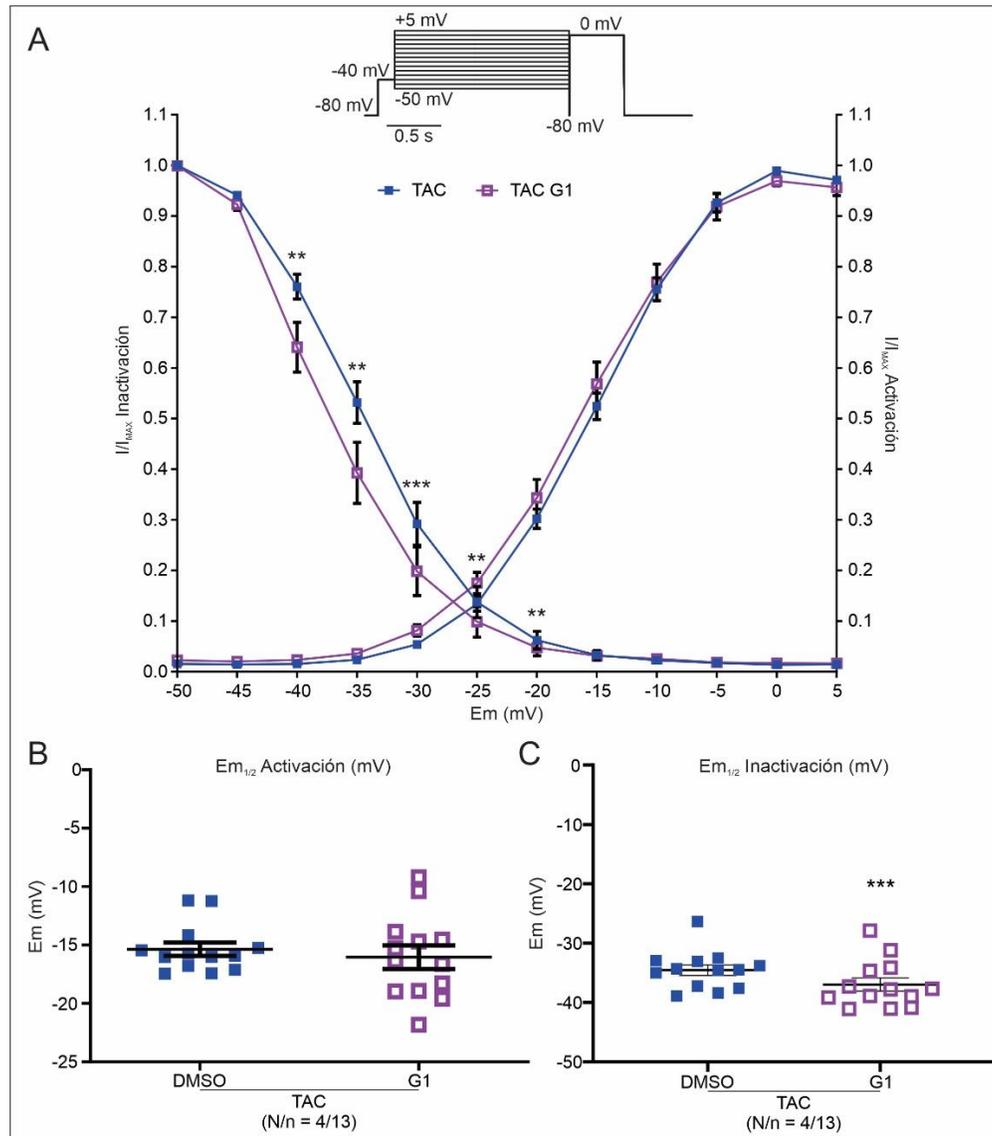


Figura 40 – **A.** Protocolo de voltaje para la inactivación (arriba) y gráficos de Activación e Inactivación dependiente de voltaje (abajo). **B.** Gráfico de barras de voltaje al 50% de la activación. **C.** Gráfico de barras de voltaje al 50% de la inactivación. Se observa un corrimiento de la curva de inactivación dependiente de voltaje hacia valores más negativos en cardiomiocitos expuestos a G1. Análisis estadístico utilizado t-Student apareado. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.0005 indican diferencias significativas respecto a DMSO. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos.

En conjunto estos resultados indican que I_{CaL} en los ratones TAC presenta una disminución de la corriente respecto a los SHAM, atribuyendo dicho cambio a alteraciones en la cinética de inactivación y en la dependencia de voltaje de la inactivación del canal en este grupo de ratones. Además, observamos que en presencia del agonista de GPER la actividad del canal presenta una disminución de la intensidad de corriente, con aumentos en los parámetros de inactivación.

Efecto de la activación aguda de GPER por G1 sobre la corriente de K^+ rectificadora hacia adentro o rectificador anómalo (I_{K1}) en miocitos ventriculares aislados de corazones normotróficos e hipertróficos.

Debido a que el PMR en los cardiomiocitos TAC presenta una despolarización respecto de los SHAM, se ha decidido registrar la corriente de potasio I_{K1} , responsable de mantener el PMR en células cardíacas. La **Figura 41** muestra trazos representativos de I_{K1} en cardiomiocitos de ratones SHAM y TAC. En el panel C se muestran datos promedio de esta corriente. Como se puede observar en el gráfico de corriente-voltaje, I_{K1} se encontró disminuida en los cardiomiocitos de los ratones TAC en comparación con los SHAM. Esto se puede observar tanto en las corrientes de K^+ hacia adentro, como en el rango de voltaje donde el canal es activo extruyendo K^+ hacia afuera de la célula (ver ampliación de la **Figura 41 B**). Esta reducción de I_{K1} de los ratones TAC en el rango de potenciales entre los que se encuentra el potencial de reposo de la célula y los potenciales de repolarización de fase tres del PAC, explica la despolarización del RMP y, en parte, el alargamiento del PAC observado en los ratones TAC en la **Figura 31**.

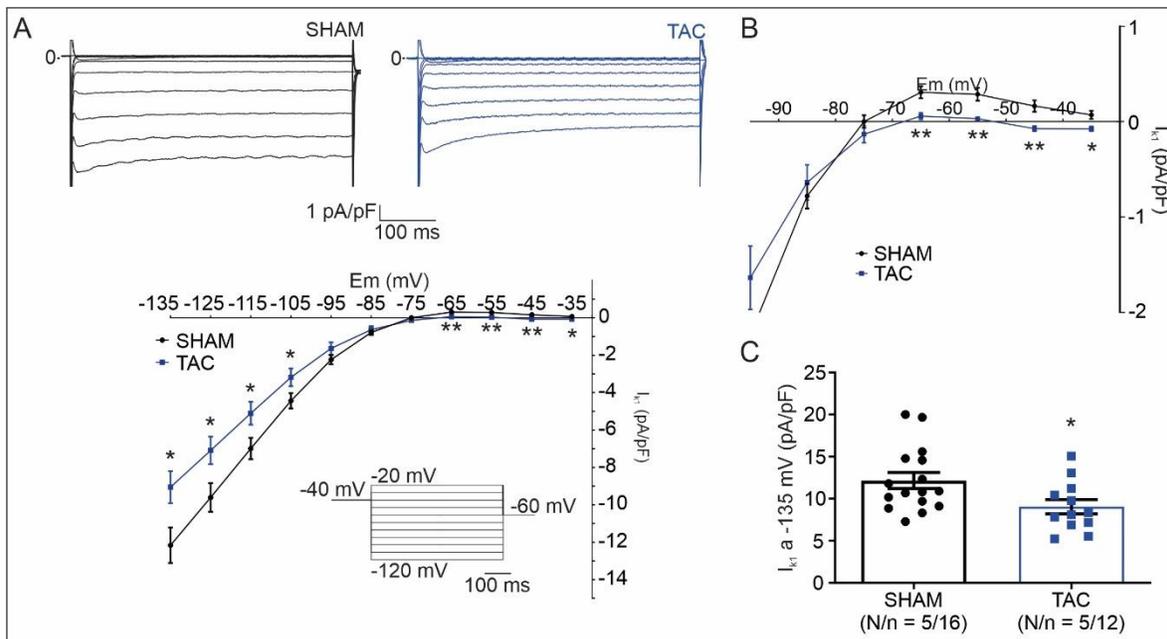


Figura 41 – **A.** Gráficos representativos de la corriente I_{K1} para los grupos SHAM y TAC (arriba) y curva IV (abajo) para la corriente de potasio I_{K1} (inset: Protocolo de voltaje aplicado). **B.** Aumento de la curva IV en la región entre -95 y -35 mV. **C.** Gráfico de barras de densidad de corriente a -135 mV. Se observa que los cardiomiocitos TAC presentan una disminución significativa de la densidad de corriente respecto al grupo SHAM. Análisis estadístico utilizado t-Student desapareado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ indican diferencias significativas respecto a SHAM. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos.

Posteriormente, al igual que se ha planteado para I_{CaL} , se decidió registrar I_{K1} presencia del agonista de GPER, para determinar si presenta cambio alguno en su actividad. Interesantemente, de igual modo que ocurrió con I_{CaL} , la activación del GPER por G1 solo tuvo un efecto significativo sobre I_{K1} de los ratones TAC (**Figura 42**). Sin embargo, en contraste con lo observado con I_{CaL} , en este caso G1 activó I_{K1} , consistente con un efecto acelerador de la repolarización, y por lo tanto posiblemente cardioprotector al oponerse al alargamiento producido por la hipertrofia mal adaptativa.

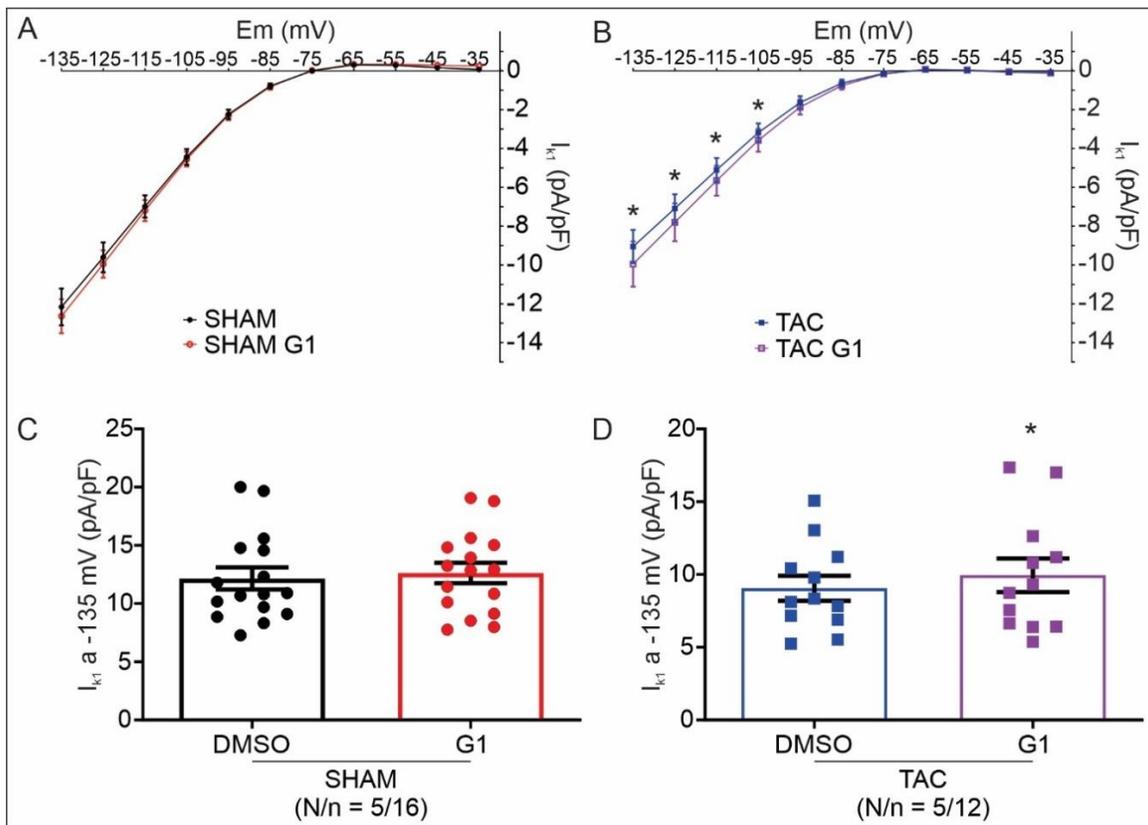


Figura 42 – **A y B.** Curva IV para I_{K1} antes y después del tratamiento con G1 de ratones SHAM (A) y TAC (B). **C y D.** Gráfico de barras de I_{K1} a -135 mV de los grupos SHAM (C) y TAC (D) antes y después de G1. La presencia de G1 (1 μ M) produce un aumento significativo de la corriente I_{K1} en cardiomiocitos de ratones TAC y no así en los SHAM. Análisis estadístico utilizado t-Student apareado. * $p < 0.05$ indica diferencia significativa respecto a DMSO TAC. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos.

Efecto de la activación aguda de GPER por G1 sobre las corrientes de K^+ transitoria saliente (I_{t0}) en miocitos ventriculares aislados de corazones normotróficos e hipertróficos.

Otro gran contribuyente en la actividad eléctrica cardíaca en el modelo de ratones es la corriente I_{t0} . La **Figura 43** muestra registros de I_{t0} en cardiomiocitos SHAM y TAC. En este caso no se observaron cambios entre los dos grupos, concordando con los datos no

significativos de la duración del potencial de acción a 50% de la repolarización (APD_{50}) mencionados en la sección del potencial de acción obtenido.

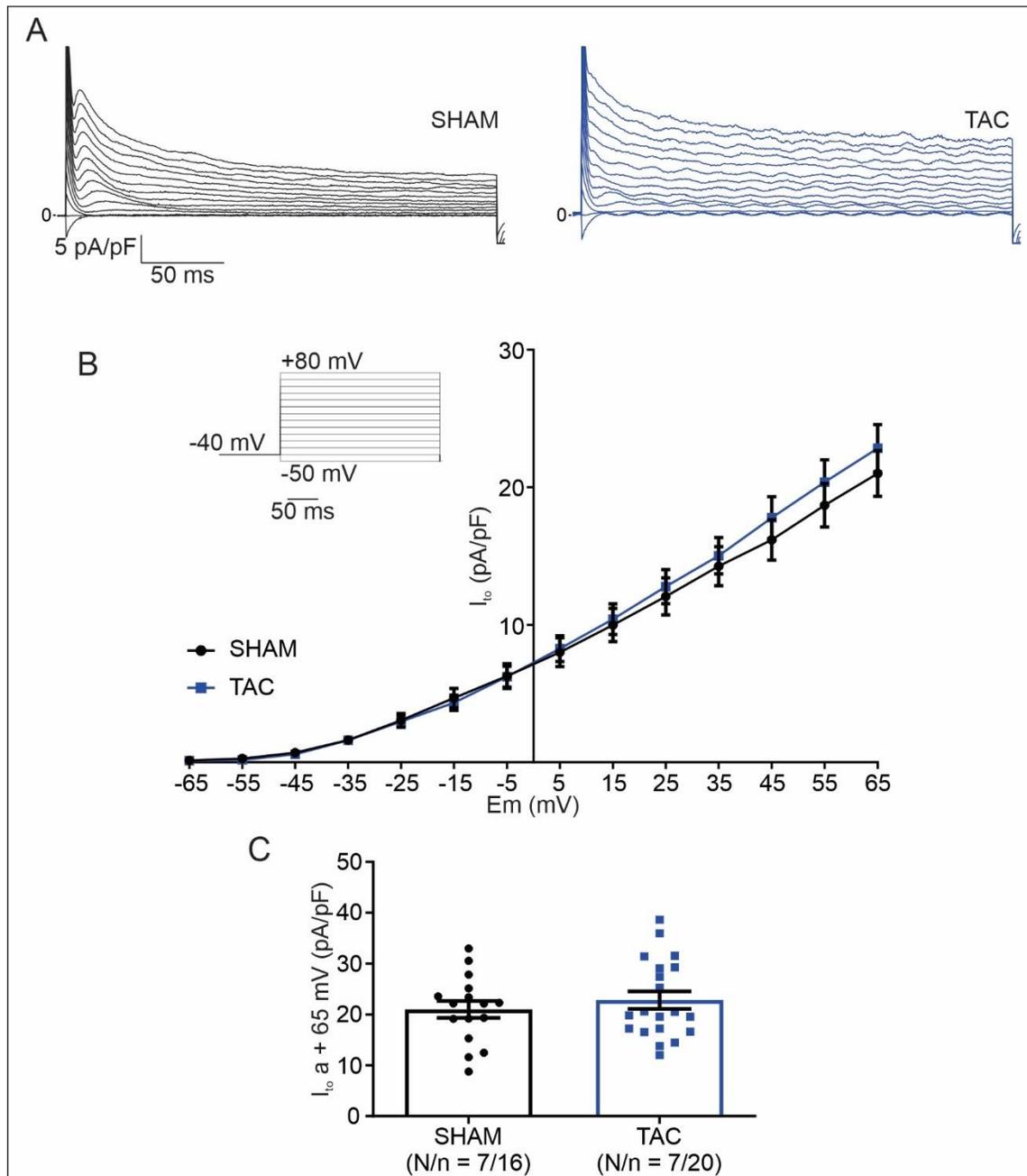


Figura 43 – **A.** Figuras representativas de la corriente transitoria hacia afuera (I_{to}) de los grupos SHAM y TAC. **B.** Curva IV de I_{to} de cardiomiocitos SHAM y TAC, junto a su protocolo de voltaje aplicado (inset). **C.** Gráficos de barra de I_{to} a +65 mV. No se observan diferencias significativas entre ambos grupos. Análisis estadístico utilizado t-Student desapareado. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos.

Sin embargo, nuevamente, G1 solo tuvo efecto sobre I_{to} en los miocitos provenientes de los ratones TAC. La **Figura 44** muestra la curva corriente-voltaje promedio donde se observa que la activación de GPER estimula las corrientes a través de I_{to} a voltajes mayores a -35 mV. Estos resultados también indican una potencial acción cardioprotectora del GPER.

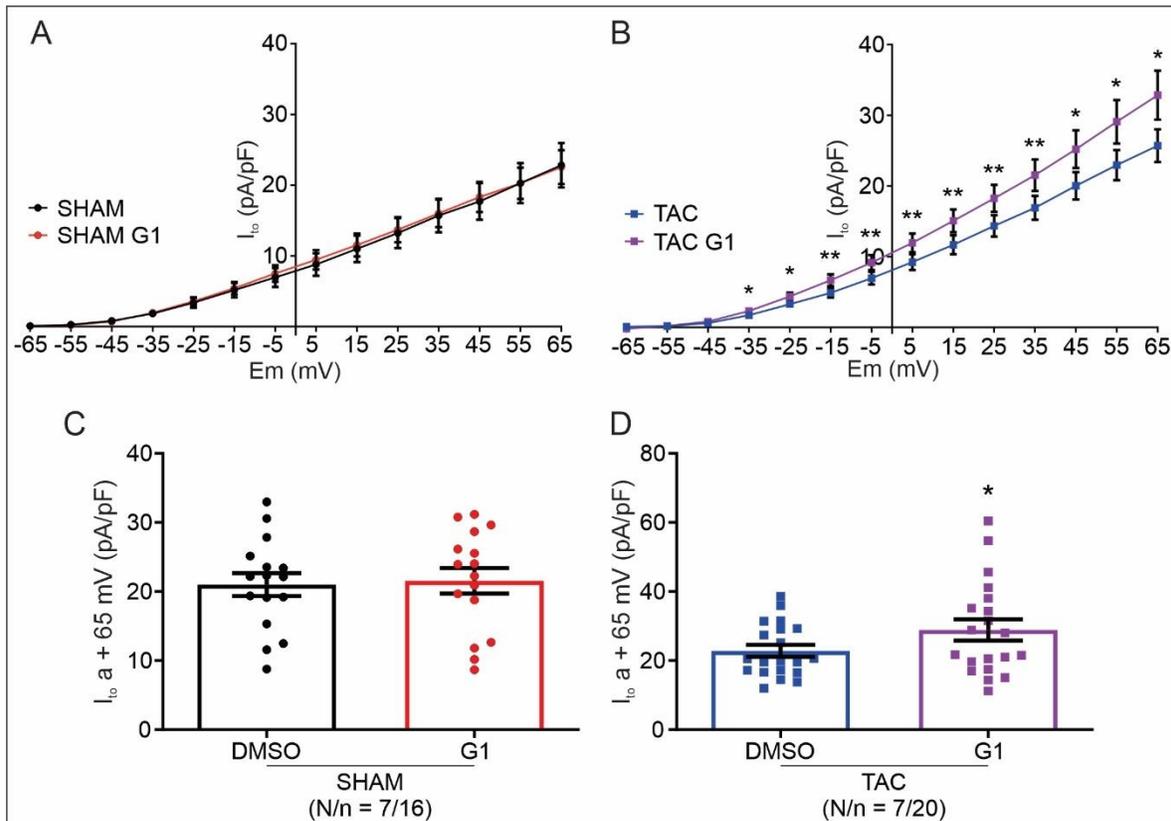


Figura 44 – **A y B.** Curvas IV de I_{to} para los grupos SHAM (A) y TAC (B) en ausencia y presencia de G1. **C y D.** Gráficos de barra de la corriente de I_{to} a +65 mV para SHAM (C) y TAC (D) en ausencia y presencia de G1. Se observa que los cardiomiocitos de ratones TAC presenta un aumento significativo de I_{to} en presencia de 1 μ M de G1, no así en el grupo SHAM. Análisis estadístico t-Student apareados. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ indican diferencias significativas respecto a DMSO. El número estadístico de cada tratamiento se encuentra en la base de los gráficos.

En conjunto estos resultados indican que la actividad eléctrica cardíaca de los ratones TAC se ve modificada en presencia de G1, produciendo posibles efectos cardioprotectores, como los descritos para la señalización de GPER.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Discusión Objetivo específico 1. Determinación de la actividad de GPER en ratas Normotróficas.

Alteraciones en el manejo de calcio, como aumentos en la liberación de calcio del retículo, aumentos de pérdidas de calcio a través de los canales de RyR o aumentos en la entrada de Ca^{2+} por CaL, son factores que promueven eventos arritmogénicos y, por lo tanto, inducen a alteraciones en las funciones fisiológicas mediando una respuesta patológica. Asimismo, alteraciones en la hemodinamia del organismo, promueve alteraciones cardíacas que ocasionan cambios no favorables para el correcto funcionamiento del corazón. Por ejemplo, aumentos crónicos de la presión arterial desencadenan remodelamiento y aumento de la masa ventricular, induciendo hipertrofia cardíaca. Sin intervención terapéutica alguna, la hipertrofia cardíaca sigue su curso hasta alcanzar cuadros clínicos desfavorables para la vida, como la insuficiencia cardíaca o incluso la muerte.

La idea de utilizar la activación del GPER como terapia para combatir las enfermedades cardiovasculares es bastante reciente. Se sabe que la activación selectiva de GPER, en condiciones de administración crónica de G1, promueve efectos cardioprotectores como disminución de la presión arterial, disminución de eventos arritmogénicos y regresión de la hipertrofia cardíaca ²⁵⁷. En el presente trabajo de tesis doctoral, se ha determinado que la administración de G1 de forma aguda, promueve la activación de GPER y este media respuestas tales que modifican el acoplamiento excito-contráctil del tejido cardíaco de ratas. Esta respuesta se observa de manera rápida (entre 5 y 15 minutos), por lo que estaría siendo producida por mecanismos no-genómicos.

Como fue mencionado en la introducción, es interesante resaltar nuevamente que en un trabajo previo de nuestro grupo de trabajo se determinó la localización de este receptor en los túbulos T de los cardiomiocitos, sugiriendo que su señalización podría ser relevante para el acoplamiento excito-contráctil ²⁴. Consistentemente, dentro de los efectos producidos por la activación de GPER, encontramos un efecto inotrópico negativo en los cardiomiocitos aislados, asociado a una disminución de CaT. Estos cambios se vieron acompañados por disminución de la corriente de CaL, lo que indica que este efecto sería, al menos en parte, responsable de la disminución del CaT y la contractilidad. No queda claro al momento si este efecto de G1 es cardioprotector. Sin duda podría serlo en ciertas condiciones patológicas, como la reperfusión después de isquemia, debido a la repentina sobrecarga de Ca²⁺ intracelular asociada a este efecto. Estudios previos mostraron resultados favorables usando diferentes bloqueantes de CaL ²⁵⁸⁻²⁶⁰, sugiriendo la importante contribución del influjo de Ca²⁺ a través de estos canales a la sobrecarga de Ca²⁺ durante la reperfusión. Consistentemente, nosotros acabamos de reportar la acción cardioprotectora del compuesto N-metilacetoasolamida durante la reperfusión post-isquémica actuando a través del bloqueo de CaL ²⁶¹. Adicionalmente, nuestro grupo de trabajo también reportó recientemente que el tratamiento crónico con G1 disminuyó significativamente el daño post-isquémico en ratas ovariectomizadas, aunque no se demostró si este efecto fue producido por bloqueo de CaL ⁴⁵. En conjunto, estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio de la señalización de GPER sobre I_{CaL} podría funcionar como un mecanismo cardioprotector.

Se ha mencionado que la activación de GPER media vías que involucran el aumento de actividad de PI3K y NOS ^{12, 23, 39, 40}. Para determinar si estas vías pueden mediar la respuesta obtenida en la contractilidad y manejo de calcio registrado, se ha implementado el uso de inhibidores de estos posibles candidatos a la vía de GPER. Por ello se ha utilizado L-NAME para poder inhibir NOS. Se ha obtenido que la activación de GPER no genera efecto alguno sobre los mecanismos excito-contráctiles estudiados al inhibir NOS, indicando que NOS es

un protagonista en la vía de acción de GPER. Sin embargo, debido a que L-NAME es un bloqueante general de la producción de NO, no podemos dilucidar de qué NOS se trataría.

Como se ha mencionado en la introducción, se ha descrito que la actividad del canal puede ser modulada por NO¹²⁰. Además, la subunidad $\alpha 1C$ posee sitios de nitrosilación que modulan negativamente al canal¹²¹, lo que promovería la disminución de la intensidad de corriente, evento que observamos al activar GPER y constatar que la vía involucra estimulación de NOS. Consistentemente, se ha reportado que la inhibición de nNOS promueve aumentos de CaL²⁶². Adicionalmente, en ratones transgénicos con sobreexpresión de nNOS se encontró un efecto inotrópico negativo asociado a un bloqueo de CaL²⁶³. Sin embargo, también se ha publicado que aumentos de NO, producto de dadores de este, promueve el aumento de la corriente de calcio²⁶⁴. Una posibilidad para explicar esta controversia es que el efecto final del NO sobre el canal dependa de la dosis de este gas. Hasta aquí, de acuerdo con estos antecedentes, podríamos sugerir que la vía establecida en este trabajo de tesis podría medirse por aumento de la actividad de NOS y el NO producido por él podría mediar la posible nitrosilación del canal, disminuyendo así su actividad. Sin embargo, no podemos descartar que el NO producido mediante la señalización de GPER active la vía de la guanilato ciclasa/GMPc/PKG y que esta quinasa fosforile al canal y lo inhiba, tal cual fue propuesto previamente²⁶⁴. Experimentos bloqueando esta última vía son necesarios para dilucidar este mecanismo.

Para el siguiente protagonista de esta vía, PI3K, se ha planteado utilizar Wortmanina, inhibidor de esta quinasa. Durante los registros tanto de AS/CaT e I_{CaL}, se ha obtenido que la inhibición de PI3K evita el efecto de la activación selectiva de GPER. Por lo tanto, la activación de PI3K media efectos de fosforilación que alteran la actividad de los mecanismos de AS/CaT y I_{CaL}. Debido a que es conocido que PI3K fosforila AKT y que esta quinasa estimula la NOS^{40,265}, nos propusimos evaluar si esta secuencia de eventos tenía lugar en la

señalización disparada por GPER. Para ello determinamos la producción de NO mediante el indicador DAF-diacetato para estudiar la actividad de NOS en presencia de G1 con el agregado o no de Wortmanina. Detectamos que G1 aumenta la producción de NO, mientras que la inhibición de PI3K previene dicho efecto. Este resultado nos indica que la secuencia de la vía implicada en la actividad de GPER es de PI3K/NOS/NO.

Por lo tanto, concluimos que la activación selectiva de GPER disminuye la amplitud del CaT y por lo tanto la contractilidad de cardiomiocitos aislados de ratas macho Wistar. Este efecto es secundario al bloqueo de I_{CaL} . Para ello, GPER activa la vía de PI3K/NOS/NO, disminuyendo la actividad de la corriente CaL , y así alterando la mecánica contráctil del cardiomiocito (**Figura 45**). Sin embargo, no se descarta que haya cambios en la mecánica contráctil promovido por vías similares a las descritas en este trabajo de tesis u otras posibles vías activadas o desactivadas por activación de GPER.

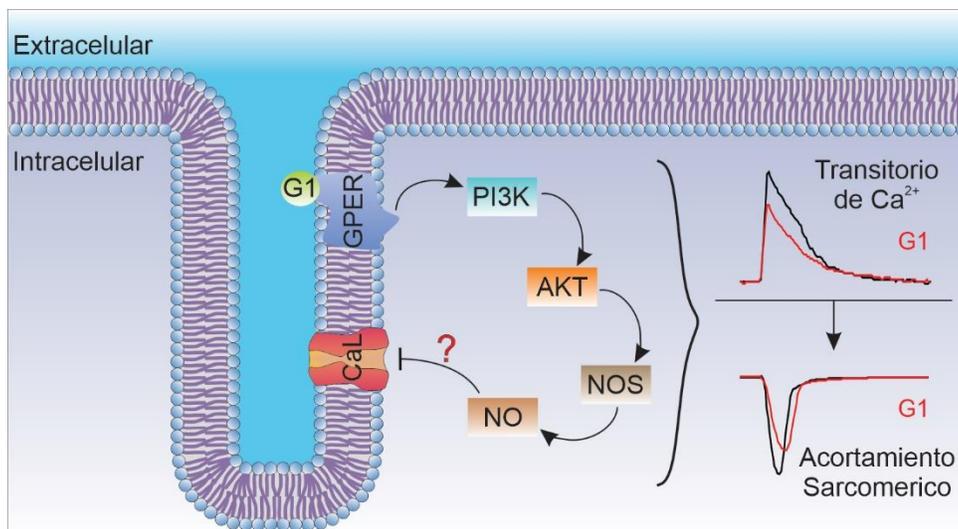


Figura 45 – Vía intracelular de GPER para la modulación de la actividad de CaL en cardiomiocitos de rata, alterando así la mecánica contráctil y el manejo de calcio. Las puntas de flecha indican activación y el extremo plano indica inhibición.

Discusión Objetivo específico 2. Determinación de actividad de GPER en ratones Normotróficos (SHAM) e Hipertroáficos (TAC).

El presente trabajo de tesis doctoral se ha utilizado el modelo de constricción aórtica transversa (TAC), generando un aumento de la masa ventricular izquierda en los ratones TAC, utilizando como generador de resistencia vascular un clip de titanio. La utilización del clip permite generar un cierre del 60% de la aorta similar al generado por la aguja 27 G. En este punto, es importante aclarar que el uso de la aguja es ampliamente empleado por la comunidad científica ²⁶⁶⁻²⁶⁹ y la utilización de los clips es escasa ²⁷⁰. Debido a que el cierre del hilo sobre la aorta utilizando la aguja presenta un cierre “circular”, respecto al clip que presenta un cierre más “elíptico”, el hilo proporciona el cierre más homogéneo sobre la aorta en relación con el clip. Sin embargo, en el presente trabajo, se ha obtenido un 40% de hipertrofia inducida con esta metodología, grados similares a los publicados en diversos trabajos previos utilizando el método de TAC por cierre con hilo ²⁶⁸, por lo que el uso del clip para el desarrollo de hipertrofia es eficiente para generar HC en nuestro modelo de TAC. La técnica implementada también ayuda a la hora de generar la sobrecarga hemodinámica debido a que es un evento rápido, a diferencia del hilo y la aguja, y con ello la exposición de la cavidad torácica disminuye, promoviendo un aumento en la sobrevida de los animales.

Diversos grupos de trabajo han establecido que la hipertrofia cardíaca inducida por sobrecarga hemodinámica promueve el remodelamiento cardíaco promoviendo la insuficiencia cardíaca ²⁷¹. El tiempo de generación de hipertrofia por TAC del presente trabajo de tesis es de 28 días, tiempo que fue suficiente para el desarrollo de insuficiencia mecánica en el tejido cardíaco en trabajos previos ²⁷²⁻²⁷⁴. Sin embargo, la fracción de acortamiento endocárdico (como parámetro ecocardiográfico de función sistólica) no se vio modificada transcurrido los 28 días post-cirugía ni tampoco hubo diferencias entre ambos grupos de ratones. Esto podría deberse al tipo de cierre generado con el clip, como se ha

descrito anteriormente, permitiendo mantener la mecánica contráctil, posiblemente, inalterada. Sin embargo, nuestro modelo presenta aumentos en la cantidad de colágeno I presente en el tejido, por lo que posiblemente sean los primeros pasos hacia la insuficiencia del tejido. El cierre de la aorta con el clip, por lo tanto, produce aumento de la masa ventricular, sin inducir significancias en el remodelamiento hacia la insuficiencia del órgano estudiado, al menos en el lapso de 28 días postcirugía. Tiempos más prolongados podrían generar insuficiencia sistólica o diastólica, siendo esta una propuesta interesante para investigar en el futuro. De todos modos, nuestro modelo es útil para estudiar los cambios electrofisiológicos precoces durante el remodelado inicial cardíaco característico inducido por la sobrecarga de presión.

Se sabe que el corazón depende estrictamente de la excitabilidad brindada por las despolarizaciones autónomas del sistema cardionector, permitiendo la contracción de los cardiomiocitos. Sin embargo, alteraciones crónicas en la funcionalidad del tejido cardíaco promueve el remodelamiento de la actividad eléctrica. En este trabajo de tesis se han observado varios cambios desde el punto de vista eléctrico. Unos de estos cambios, el cual se acompaña con el modelo patológico utilizado, es la duración del potencial de acción. Se ha obtenido un aumento significativo del APD₉₀ en los ratones TAC respecto a la condición control, y además un cambio del PMR, presentado un valor menor (despolarización) al de los ratones SHAM. Interesantemente, en presencia de G1, tanto los grupos SHAM como TAC presentaron disminución del APD₉₀ y aumentos en el PMR. De todos modos, es importante remarcar que la señalización por activación del GPER revierte en parte las modificaciones electrofisiológicas producidas por la TAC, indicando una vez más que la estimulación de este receptor genera un posible efecto cardioprotector.

El estudio individual de las corrientes que componen las fases del potencial de acción podría explicar dichos cambios. Dentro de las corrientes estudiadas, el más notorio fue sobre la

actividad del canal CaL. Se observó que los ratones TAC presentan una disminución significativa de la densidad de corriente. Este efecto no podría explicar el aumento del APD₉₀ en los ratones TAC, ya que disminución de la corriente de calcio disminuiría el tiempo de repolarización y, por lo tanto, la duración del PAC. Sin embargo, este efecto debiera ser más notorio a potenciales cercanos al APD₅₀, momento en el que CaL se encuentra más activo, y no se encontraron diferencias a este tiempo de repolarización entre SHAM y TAC.

En la introducción del presente trabajo de tesis, se ha mencionado que hipertrofia cardíaca mal adaptativa se ha asociado tanto al aumento, a la ausencia de cambio o a la disminución de la intensidad de la densidad de corriente macroscópica del canal CaL²²⁸⁻²³². En el presente trabajo hemos detectado una disminución significativa de la densidad de corriente en este modelo de hipertrofia patológica. Se ha demostrado que, durante el desarrollo de hipertrofia con insuficiencia cardíaca establecida o bajo nivel de insuficiencia, la expresión del canal puede disminuir, provocando la reducción de la conductancia global de la corriente^{90, 231}. En el presente trabajo no se ha medido la abundancia de la proteína de la subunidad alfa formadora del poro del canal, quedando pendiente este experimento. Sin embargo, sí hemos estudiado algunas propiedades biofísicas del canal que pueden explicar, al menos en parte, la reducción de I_{CaL} en TAC, observando un aumento en la velocidad a la que se inactiva el canal y un incremento en el porcentaje de canales que se encuentran inactivos a diferentes potenciales de membrana (corrimiento hacia la izquierda de la curva de inactivación). Se ha reportado que corrimientos de la curva de inactivación dependiente de voltaje a valores más negativos, produce una disminución de la densidad de I_{CaL} ²⁷⁵. Por lo tanto, los resultados obtenidos con nuestro modelo de HC generado por TAC, indican que CaL va a estar más propenso a inactivarse, lo que no permitiría una intensidad de corriente normal.

En presencia de G1, la corriente CaL solo se ve alterada en los cardiomiocitos TAC, provocando una disminución de esta, lo cual nos podría dar la pauta de que la disminución

en el APD₉₀ obtenido de los PAs de los ratones TAC pueda deberse a este efecto. Además, la disminución de la corriente se vio acompañada de un corrimiento hacia valores más negativos de la curva de inactivación dependiente de voltaje, evento que también explica la reducción de I_{CaL} en TAC en presencia de G1. De acuerdo con estos resultados, se reportó recientemente que el G1 también negativiza la inactivación dependiente del voltaje de CaL en un modelo de cobayas con ovariectomía²⁷⁶, disminuyendo el área entre la curva de activación e inactivación (ventana de corriente o *windows current*), efecto que también se observa al exponer los cardiomiocitos de ratones TAC a G1 en el presente trabajo.

Aunque no se han estudiado las vías de señalización en este caso, una explicación para este fenómeno podría ser por aumento en la concentración de NO o actividad de NOS sobre el canal, descrita para la actividad de GPER en ratas Wistar. Consistentemente, se ha descrito que el NO modula a CaL de tal manera que permite la disminución de la corriente^{120, 121}. Además, se ha reportado que la HC producida por TAC genera aumentos de la actividad de eNOS, sin alterar su expresión^{277, 278}. Sin embargo, este aumento de actividad de eNOS se ve acompañada con aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) con disminución de la producción de NO, por parte de esta enzima (desacople de NOS). Es probable que aumentos rápidos de la actividad de NOS, producto de la activación de GPER por su agonista selectivo G1, reduzca el desacople de NOS y reestablezca la producción de NO, promoviendo así la disminución de I_{CaL}.

No solo se han obtenido alteraciones en la corriente de calcio con el modelo de hipertrofia, sino que también se han observado cambios en la corriente de potasio a través del rectificador anómalo, I_{K1}. Se ha descrito que la disminución de las corrientes de potasio va acompañada de hipertrofia⁵⁷. Este fenómeno se ha observado en el presente trabajo, es decir el modelo utilizado también presenta dicho cambio a nivel de la actividad del canal, lo que promueve aumentos de la duración del PAC. Sin embargo, la duración del PA no depende únicamente

de I_{K1} , por lo que otras corrientes presentes en el miocito, podrían estar alteradas para permitir este aumento en el tiempo de la repolarización. Además, el PAC de los ratones TAC presenta una despolarización del PMR y observando que I_{K1} es el principal contribuyente para el mantenimiento del PMR, la disminución de su actividad inducirá inestabilidad del PMR.

Además, se ha determinado que en presencia de G1, la actividad de I_{K1} se ve aumentada en los ratones TAC, siendo este aumento un posible efecto cardioprotector. Se sabe que el aumento de la actividad de I_{K1} previene el desarrollo de hipertrofia cardíaca²⁷⁹. Trabajos previos han postulado que la nitrosilación de I_{K1} aumenta la probabilidad de apertura del canal²¹⁴. Por ello, la actividad de GPER al aumentar NO intracelular, podría aumentar la Po del canal y mediar así un efecto protector a través de I_{K1} . Estos resultados, conducen a pensar que el aumento en el PMR de los ratones TAC por G1 sea debido a la actividad aumentada de I_{K1} .

Otro canal de potasio que se ha estudiado es el transitorio saliente, I_{to} . Este canal, al igual que I_{K1} , presenta baja actividad en la hipertrofia cardíaca⁵⁷. Sin embargo, en el presente trabajo no se ha encontrado diferencia significativa entre los grupos de ratones TAC y SHAM. Esto, posiblemente, podría deberse a diferencias en los modelos utilizados para generar la HC o a la ausencia de alteraciones en la función sistólica que observamos en el presente trabajo. Interesantemente, al exponer a las células cardíacas a G1, se observa un aumento significativo de la actividad del canal en los miocitos provenientes de los ratones TAC. Aunque no se han encontrado alteraciones en el APD₅₀ en ratones TAC en presencia de G1, zona del PAC en la que I_{to} presenta cierta relevancia, sí se ha obtenido una disminución significativa de la amplitud del PAC, evento que la activación de I_{to} por G1 podría estar mediando.

La mecánica de regulación de I_{to} en presencia de G1 podría también deberse al incremento de la actividad de NOS. Sin embargo, la actividad de I_{to} se ha reportado disminuida en presencia de dadores de NO²¹⁸. Una posible vía intracelular alternativa para explicar nuestros

resultados es que la actividad de GPER genere alteraciones de CaMKII, debido a que se ha reportado que CaMKII colocaliza con I_{to} , modulando negativamente la actividad del componente rápido (corriente pico) ^{209, 220-223}. De manera análoga, al disminuir I_{CaL} por GPER el influjo de Ca^{2+} es menor, disminuyendo la actividad de CaMKII, pudiendo explicar el aumento de la actividad de I_{to} .

Algo sorprendente fue observado en los ratones SHAM. Se ha obtenido disminución del APD_{90} y aumento del PMR en presencia de G1 en el PAC, pero no se han encontrado efectos sobre la actividad de los canales estudiados. Por lo tanto, estos efectos de G1 en SHAM deberían ser secundarios a la modificación de otras corrientes, como podrían ser I_{CaT} , I_{Ks} , I_{NCX} , etc.

Consideramos de gran relevancia el hallazgo de que tanto el efecto inhibitorio sobre I_{CaL} , como el efecto estimulador sobre I_{K1} e I_{to} inducido por la activación de GPER, solo fue observado en los ratones que desarrollaron hipertrofia cardíaca patológica inducida por TAC (**Figura 46**), permitiendo la cardioprotección por activación de este receptor.

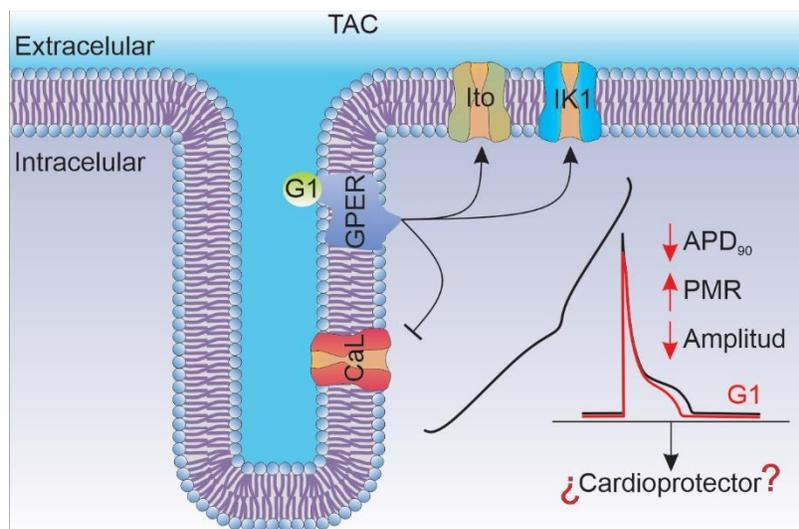


Figura 46 – Efecto de GPER sobre la actividad de CaL , I_{K1} e I_{to} , en cardiomiocitos de ratones TAC y su efecto sobre el PAC. Las puntas de flecha indican activación y el extremo plano indica inhibición.

CONCLUSIÓN GENERAL

Las patologías cardiovasculares constituyen unas de las principales causas de muertes en el mundo, siendo la hipertrofia cardíaca una de ellas. La HC puede ser promovida por eventos genéticos o por aumentos de la sobrecarga hemodinámica, como puede ser la hipertensión arterial. Estos eventos promueven el mal funcionamiento y el mal remodelamiento del tejido cardíaco, con lo que el efecto crónico promueve un déficit en la actividad del tejido y, sin un tratamiento adecuado, promueve la muerte. Hoy en día, el tratamiento de enfermedades cardiovasculares presenta un desafío a la hora de medicar evitando el progreso de la enfermedad, debido a los múltiples fármacos establecidos para su control.

En el presente trabajo de tesis doctoral, se ha propuesto estudiar la actividad del receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER) en un modelo de normotrofia cardíaca postulando la posible vía de señalización de GPER en su actividad rápida no-genómica; y un modelo de hipertrofia cardíaca patológica y su contribución en el estudio electrofisiológico de esta patología, en un modelo de ratones sometidos a sobrecarga hemodinámica, promoviendo el remodelamiento cardíaco y su mal adaptación frente a este evento.

Estos procedimientos nos permitieron determinar que GPER media efectos rápidos para poder realizar un posible remodelamiento al alterar la electrofisiología cardíaca. En corazones normotróficos, GPER activa vías descritas como cardioprotectoras, como la interacción de PI3K y la producción de NO por NOS^{280, 281}. Así mismo, se ha determinado que dicha vía interviene en la actividad de I_{CaL} , promoviendo su disminución. Se ha demostrado que alteraciones en el manejo de calcio, alteran la fisiología del corazón²⁸². Aumentos en la intensidad de corriente de CaL , por ejemplo, con aumentos de la estimulación simpática, promueve la desregulación y por lo tanto el desarrollo de patologías, entre ellas la hipertrofia. Por ello, una disminución de I_{CaL} , como la observada al activar GPER mediante

su agonista G1 en el modelo de hipertrofia patológica establecido en los ratones sometidos a TAC, evitaría la activación de efectores pro-hipertroficantes dependientes de calcio, como CaMKII, pudiendo explicar un posible efecto cardioprotector de este receptor.

Es conocido que la disminución de la actividad de los canales de K^+ favorece la generación de eventos arritmogénicos. Observamos que los ratones TAC presentan baja intensidad de corriente I_{K1} , lo que pudo haber alterado al PMR en estos ratones. Estos cambios, podrían mediar alteraciones tales como eventos arritmogénicos, promoviendo el mal manejo de calcio y por lo tanto al remodelamiento del tejido. La activación de GPER evitaría efectos arritmogénicos al aumentar la actividad de I_{K1} para mantener estable el PMR. Además, se ha observado que promueve al aumento de I_{to} , otro canal de potasio importante para el correcto manejo del calcio, ya que se ha postulado que su actividad modula la actividad de CaL y además modula a CaMKII ^{219, 220}. Aumentos en I_{to} , favorecen el efecto cardioprotector de GPER, evitando la formación de potenciales de acción ectópicos y evitar eventos arritmogénicos.

Por último, la expresión de proteína del GPER se vio disminuida en los ratones TAC en comparación con sus controles SHAM. Se ha demostrado en algunos modelos patológicos un aumento compensador del GPER ²⁷⁶, posiblemente de algún modo intentando prevenir el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, frente a aumentos en la estimulación con endotelina 1, la expresión de GPER ha sido reportada disminuida ²⁸³. Además, se ha descrito que células cardíacas neonatales o adultas tratadas con endotelina 1 generan hipertrofia cardíaca ^{284, 285}. Por lo tanto, sería interesante explorar si en este modelo de sobrecarga hemodinámica producida por la TAC existen aumentos de la concentración de endotelina 1, que pudiesen explicar la disminución de la expresión de GPER, disminuyendo así sus efectos cardioprotectores. De todos modos, es importante destacar que, en los corazones hipertroficantes estudiados en el presente trabajo, se encontró un posible efecto cardioprotector

de la activación de GPER a pesar de que su expresión se encontró disminuida, sugiriendo que la vía intracelular permanece inalterada o incluso activada.

En resumen, este trabajo de tesis ha investigado la participación del GPER en las propiedades eléctricas cardíacas en condiciones fisiológicas y patológicas. Se ha demostrado que la señalización de este receptor inhibe I_{CaL} , induciendo una reducción del CaT y la contractilidad. De modo quizá aún más relevante, se ha descrito por primera vez la acción excitatoria de GPER sobre las corrientes repolarizantes I_{K1} y I_{to} , sugiriendo la producción de efectos electrofisiológicos cardioprotectores. Entender de modo más profundo las vías de señalización involucradas en estos efectos representa un desafío interesante para el futuro.

Finalmente, podemos especular que modulaciones de GPER por nuevos fármacos, podrían mediar efectos rápidos cardioprotectores que eviten el avance de posibles patologías, como la hipertrofia cardíaca. De esta forma, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis podrían abrir las fronteras en la búsqueda de nuevas estrategias farmacológicas para fortalecer la cardioprotección mediante un único fármaco que realice la activación de GPER de forma selectiva y segura.

REFERENCIAS

1. Kvingedal AM, Smeland EB. A novel putative G-protein-coupled receptor expressed in lung, heart and lymphoid tissue. *FEBS Lett.* 1997;407(1):59-62.
2. WF B, Boulpaep E. *Fisiología médica -3° ed-*. 2017.
3. Marchese A, Paing MM, Temple BR, et al. G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:601-629.
4. Scita G, Di Fiore PP. The endocytic matrix. *Nature.* 2010;463(7280):464-473.
5. Jean-Alphonse F, Hanyaloglu AC. Regulation of GPCR signal networks via membrane trafficking. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;331(2):205-214.
6. Rask-Andersen M, Masuram S, Schioth HB. The druggable genome: Evaluation of drug targets in clinical trials suggests major shifts in molecular class and indication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014;54:9-26.
7. Civelli O, Reinscheid RK, Zhang Y, et al. G protein-coupled receptor deorphanizations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013;53:127-146.
8. Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, et al. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics.* 1997;45(3):607-617.
9. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, et al. 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.* 2000;14(10):1649-1660.
10. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.* 2005;307(5715):1625-1630.
11. Bologna CG, Revankar CM, Young SM, et al. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol.* 2006;2(4):207-212.
12. Filice E, Recchia AG, Pellegrino D, et al. A new membrane G protein-coupled receptor (GPR30) is involved in the cardiac effects of 17beta-estradiol in the male rat. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60(4):3-10.
13. Prossnitz ER, Barton M. Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009;89(3-4):89-97.
14. Filardo E, Quinn J, Pang Y, et al. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology.* 2007;148(7):3236-3245.
15. Revankar CM, Mitchell HD, Field AS, et al. Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30. *ACS Chem Biol.* 2007;2(8):536-544.
16. Gether U, Kobilka BK. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem.* 1998;273(29):17979-17982.
17. Meyer MR, Fredette NC, Sharma G, et al. GPER is required for the age-dependent upregulation of the myocardial endothelin system. *Life Sci.* 2016;159:61-65.
18. Tica AA, Dun EC, Tica OS, et al. G protein-coupled estrogen receptor 1-mediated effects in the rat myometrium. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;301(5):C1262-1269.
19. Maiti K, Paul JW, Read M, et al. G-1-activated membrane estrogen receptors mediate increased contractility of the human myometrium. *Endocrinology.* 2011;152(6):2448-2455.
20. Cheng SB, Dong J, Pang Y, et al. 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.* 2014;382(2):950-959.

21. Akama KT, Thompson LI, Milner TA, et al. 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.* 2013;288(9):6438-6450.
22. Prossnitz ER, Oprea TI, Sklar LA, et al. The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;109(3-5):350-353.
23. Deschamps AM, Murphy E. Activation of a novel estrogen receptor, GPER, is cardioprotective in male and female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(5):H1806-1813.
24. Orłowski A, De Giusti VC, Ciancio MC, et al. The cardiac electrogenic sodium/bicarbonate cotransporter (NBCe1) is activated by aldosterone through the G protein-coupled receptor 30 (GPR 30). *Channels (Austin).* 2016;10(5):428-434.
25. Anstead GM, Carlson KE, Katzenellenbogen JA. The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids.* 1997;62(3):268-303.
26. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 1997;138(3):863-870.
27. Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, et al. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology.* 2005;146(2):624-632.
28. Thomas P, Dong J. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;102(1-5):175-179.
29. Mendez-Luna D, Martinez-Archundia M, Maroun RC, et al. Deciphering the GPER/GPR30-agonist and antagonists interactions using molecular modeling studies, molecular dynamics, and docking simulations. *J Biomol Struct Dyn.* 2015;33(10):2161-2172.
30. Dennis MK, Burai R, Ramesh C, et al. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat Chem Biol.* 2009;5(6):421-427.
31. Dennis MK, Field AS, Burai R, et al. Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;127(3-5):358-366.
32. DeLeon C, Wang HH, Gunn J, et al. A novel GPER antagonist protects against the formation of estrogen-induced cholesterol gallstones in female mice. *J Lipid Res.* 2020;61(5):767-777.
33. Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Jr., et al. 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.* 2002;16(1):70-84.
34. Dun SL, Brailoiu GC, Gao X, et al. Expression of estrogen receptor GPR30 in the rat spinal cord and in autonomic and sensory ganglia. *J Neurosci Res.* 2009;87(7):1610-1619.
35. Broselid S, Berg KA, Chavera TA, et al. 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.* 2014;289(32):22117-22127.
36. Yu X, Ma H, Barman SA, et al. Activation of G protein-coupled estrogen receptor induces endothelium-independent relaxation of coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;301(5):E882-888.
37. Yu X, Li F, Klussmann E, et al. G protein-coupled estrogen receptor 1 mediates relaxation of coronary arteries via cAMP/PKA-dependent activation of MLCP. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;307(4):E398-407.

38. Holm A, Hellstrand P, Olde B, et al. The G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER1/GPR30) agonist G-1 regulates vascular smooth muscle cell Ca²⁺(+) handling. *J Vasc Res.* 2013;50(5):421-429.
39. Lindsey SH, Liu L, Chappell MC. Vasodilation by GPER in mesenteric arteries involves both endothelial nitric oxide and smooth muscle cAMP signaling. *Steroids.* 2014;81:99-102.
40. De Giusti VC, Orlowski A, Ciancio MC, et al. Aldosterone stimulates the cardiac sodium/bicarbonate cotransporter via activation of the g protein-coupled receptor gpr30. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;89(Pt B):260-267.
41. Gao B, Chen P, Jiang Q. G Protein-Coupled Estrogen Receptor Is a Critical Regulator in Metastasis of Breast Cancer Cells. *Journal of Biosciences and Medicines.* 2017;05(08):127-140.
42. Lindsey SH, Cohen JA, Brosnihan KB, et al. Chronic treatment with the G protein-coupled receptor 30 agonist G-1 decreases blood pressure in ovariectomized mRen2.Lewis rats. *Endocrinology.* 2009;150(8):3753-3758.
43. Jessup JA, Lindsey SH, Wang H, et al. Attenuation of salt-induced cardiac remodeling and diastolic dysfunction by the GPER agonist G-1 in female mRen2.Lewis rats. *PLoS One.* 2010;5(11):e15433.
44. Lenhart PM, Broselid S, Barrick CJ, et al. G-protein-coupled receptor 30 interacts with receptor activity-modifying protein 3 and confers sex-dependent cardioprotection. *J Mol Endocrinol.* 2013;51(1):191-202.
45. Ibanez AM, Gonzalez Arbelaez LF, Ciocci Pardo A, et al. Chronic GPER activation prevents ischemia/reperfusion injury in ovariectomized rats. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2022;1866(2):130060.
46. Wang H, Sun X, Chou J, et al. Cardiomyocyte-specific deletion of the G protein-coupled estrogen receptor (GPER) leads to left ventricular dysfunction and adverse remodeling: A sex-specific gene profiling analysis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(8):1870-1882.
47. Wang H, Sun X, Lin MS, et al. G protein-coupled estrogen receptor (GPER) deficiency induces cardiac remodeling through oxidative stress. *Transl Res.* 2018;199:39-51.
48. Wang H, Sun X, Hodge HS, et al. NLRP3 inhibition improves heart function in GPER knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;514(3):998-1003.
49. Ogola BO, Zimmerman MA, Sure VN, et al. G Protein-Coupled Estrogen Receptor Protects From Angiotensin II-Induced Increases in Pulse Pressure and Oxidative Stress. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:586.
50. Huang CL. Murine Electrophysiological Models of Cardiac Arrhythmogenesis. *Physiol Rev.* 2017;97(1):283-409.
51. Katholi RE, Couri DM. Left ventricular hypertrophy: major risk factor in patients with hypertension: update and practical clinical applications. *Int J Hypertens.* 2011;2011:495349.
52. Ennis IL, Yeves AM. FISIOPATOLOGÍA DE LA HIPERTROFIA CARDÍACA: HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA Y PATOLÓGICA. SAHA.
53. Schoepe M, Schrepper A, Schwarzer M, et al. Exercise can induce temporary mitochondrial and contractile dysfunction linked to impaired respiratory chain complex activity. *Metabolism.* 2012;61(1):117-126.
54. Nabauer M, Kaab S. Potassium channel down-regulation in heart failure. *Cardiovasc Res.* 1998;37(2):324-334.
55. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999;79(1):215-262.
56. Boyden PA, Jeck CD. Ion channel function in disease. *Cardiovasc Res.* 1995;29(3):312-318.

57. Chen X, Qin M, Jiang W, et al. Electrophysiological characteristics of pressure overload-induced cardiac hypertrophy and its influence on ventricular arrhythmias. *PLoS One*. 2017;12(9):e0183671.
58. Toib A, Zhang C, Borghetti G, et al. Remodeling of repolarization and arrhythmia susceptibility in a myosin-binding protein C knockout mouse model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017;313(3):H620-H630.
59. Shi C, Wang X, Dong F, et al. Temporal alterations and cellular mechanisms of transmural repolarization during progression of mouse cardiac hypertrophy and failure. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013;208(1):95-110.
60. Ming Z, Nordin C, Siri F, et al. Reduced calcium current density in single myocytes isolated from hypertrophied failing guinea pig hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1994;26(9):1133-1143.
61. Gomez AM, Valdivia HH, Cheng H, et al. Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science*. 1997;276(5313):800-806.
62. Li C, Huang D, Tang J, et al. CIC-3 chloride channel is involved in isoprenaline-induced cardiac hypertrophy. *Gene*. 2018;642:335-342.
63. Sirish P, Ledford HA, Timofeyev V, et al. Action Potential Shortening and Impairment of Cardiac Function by Ablation of Slc26a6. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2017;10(10).
64. Yang KC, Foeger NC, Marionneau C, et al. Homeostatic regulation of electrical excitability in physiological cardiac hypertrophy. *J Physiol*. 2010;588(Pt 24):5015-5032.
65. Medina AJ, Ibanez AM, Diaz-Zegarra LA, et al. Cardiac up-regulation of NBCe1 emerges as a beneficial consequence of voluntary wheel running in mice. *Arch Biochem Biophys*. 2020;694:108600.
66. Coetzee WA. Channel-mediated calcium current in the heart. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1988;1(5):447-459.
67. Carl SL, Felix K, Caswell AH, et al. Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium. *J Cell Biol*. 1995;129(3):673-682.
68. Kawai M, Hussain M, Orchard CH. Excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes after formamide-induced detubulation. *Am J Physiol*. 1999;277(2):H603-609.
69. Scriven DR, Dan P, Moore ED. Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J*. 2000;79(5):2682-2691.
70. Asghari P, Scriven DR, Hoskins J, et al. The structure and functioning of the couplon in the mammalian cardiomyocyte. *Protoplasma*. 2012;249 Suppl 1:S31-38.
71. Hofmann F, Flockerzi V, Kahl S, et al. L-type CaV1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function. *Physiol Rev*. 2014;94(1):303-326.
72. Hofmann F, Lacinova L, Klugbauer N. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1999;139:33-87.
73. Hullin R, Biel M, Flockerzi V, et al. Tissue-specific expression of calcium channels. *Trends Cardiovasc Med*. 1993;3(2):48-53.
74. Schultz D, Mikala G, Yatani A, et al. Cloning, chromosomal localization, and functional expression of the alpha 1 subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(13):6228-6232.
75. Bezanilla F. Voltage sensor movements. *J Gen Physiol*. 2002;120(4):465-473.
76. Jiang Y, Ruta V, Chen J, et al. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*. 2003;423(6935):42-48.
77. Starace DM, Bezanilla F. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature*. 2004;427(6974):548-553.

78. Cataldi M, Perez-Reyes E, Tsien RW. Differences in apparent pore sizes of low and high voltage-activated Ca²⁺ channels. *J Biol Chem.* 2002;277(48):45969-45976.
79. Klockner U, Mikala G, Schwartz A, et al. Molecular studies of the asymmetric pore structure of the human cardiac voltage- dependent Ca²⁺ channel. Conserved residue, Glu-1086, regulates proton-dependent ion permeation. *J Biol Chem.* 1996;271(37):22293-22296.
80. Mikala G, Bahinski A, Yatani A, et al. Differential contribution by conserved glutamate residues to an ion-selectivity site in the L-type Ca²⁺ channel pore. *FEBS Lett.* 1993;335(2):265-269.
81. Koch SE, Bodi I, Schwartz A, et al. Architecture of Ca²⁺ channel pore-lining segments revealed by covalent modification of substituted cysteines. *J Biol Chem.* 2000;275(44):34493-34500.
82. De Waard M, Pragnell M, Campbell KP. Ca²⁺ channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron.* 1994;13(2):495-503.
83. Pragnell M, De Waard M, Mori Y, et al. Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature.* 1994;368(6466):67-70.
84. Hüllin R, Singer-Lahat D, Freichel M, et al. Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J.* 1992;11(3):885-890.
85. Buraei Z, Yang J. The ss subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Physiol Rev.* 2010;90(4):1461-1506.
86. Pragnell M, Sakamoto J, Jay SD, et al. Cloning and tissue-specific expression of the brain calcium channel beta-subunit. *FEBS Lett.* 1991;291(2):253-258.
87. Brunet S, Emrick MA, Sadilek M, et al. Phosphorylation sites in the Hook domain of Ca_vbeta subunits differentially modulate Ca_v1.2 channel function. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;87:248-256.
88. Rougier JS, Albesa M, Abriel H, et al. Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4-1 (NEDD4-1) controls the sorting of newly synthesized Ca_v1.2 calcium channels. *J Biol Chem.* 2011;286(11):8829-8838.
89. De Jongh KS, Warner C, Catterall WA. Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. *Journal of Biological Chemistry.* 1990;265(25):14738-14741.
90. Hersel J, Jung S, Mohacsi P, et al. Expression of the L-type calcium channel in human heart failure. *Basic Res Cardiol.* 2002;97 Suppl 1:14-10.
91. Platano D, Qin N, Noceti F, et al. Expression of the alpha(2)delta subunit interferes with prepulse facilitation in cardiac L-type calcium channels. *Biophys J.* 2000;78(6):2959-2972.
92. Singer D, Biel M, Lotan I, et al. The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science.* 1991;253(5027):1553-1557.
93. Bodi I, Mikala G, Koch SE, et al. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3306-3317.
94. Reuter H. The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration. *J Physiol.* 1967;192(2):479-492.
95. Carmeliet E, Vereecke J. Adrenaline and the plateau phase of the cardiac action potential. Importance of Ca⁺⁺, Na⁺ and K⁺ conductance. *Pflugers Arch.* 1969;313(4):300-315.
96. Vassort G, Rougier O, Garnier D, et al. Effects of adrenaline on membrane inward currents during the cardiac action potential. *Pflugers Arch.* 1969;309(1):70-81.
97. Reuter H, Scholz H. The regulation of the calcium conductance of cardiac muscle by adrenaline. *J Physiol.* 1977;264(1):49-62.
98. Lemke T, Welling A, Christel CJ, et al. Unchanged beta-adrenergic stimulation of cardiac L-type calcium channels in Ca_v 1.2 phosphorylation site S1928A mutant mice. *J Biol Chem.* 2008;283(50):34738-34744.

99. Lundby A, Andersen MN, Steffensen AB, et al. In vivo phosphoproteomics analysis reveals the cardiac targets of beta-adrenergic receptor signaling. *Sci Signal*. 2013;6(278):rs11.
100. McHugh D, Sharp EM, Scheuer T, et al. Inhibition of cardiac L-type calcium channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(22):12334-12338.
101. Weiss S, Keren-Raifman T, Oz S, et al. 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)*. 2012;6(6):426-437.
102. Birks EJ, Latif N, Enesa K, et al. Elevated p53 expression is associated with dysregulation of the ubiquitin-proteasome system in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2008;79(3):472-480.
103. Yang L, Liu G, Zakharov SI, et al. Ser1928 is a common site for Cav1.2 phosphorylation by protein kinase C isoforms. *J Biol Chem*. 2005;280(1):207-214.
104. Franssen C, Chen S, Unger A, et al. Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC Heart Fail*. 2016;4(4):312-324.
105. Paulus WJ, Tschope C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(4):263-271.
106. Hudmon A, Schulman H, Kim J, et al. CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation. *J Cell Biol*. 2005;171(3):537-547.
107. Lory P, Nargeot J. Cyclic AMP-dependent modulation of cardiac Ca channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;182(3):1059-1065.
108. Fuller MD, Fu Y, Scheuer T, et al. Differential regulation of CaV1.2 channels by cAMP-dependent protein kinase bound to A-kinase anchoring proteins 15 and 79/150. *J Gen Physiol*. 2014;143(3):315-324.
109. Soltis AR, Saucerman JJ. Synergy between CaMKII substrates and beta-adrenergic signaling in regulation of cardiac myocyte Ca(2+) handling. *Biophys J*. 2010;99(7):2038-2047.
110. Blaich A, Welling A, Fischer S, et al. Facilitation of murine cardiac L-type Ca(v)1.2 channel is modulated by calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of S1512 and S1570. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(22):10285-10289.
111. Koval OM, Guan X, Wu Y, et al. CaV1.2 beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(11):4996-5000.
112. Wu Y, Temple J, Zhang R, et al. Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation*. 2002;106(10):1288-1293.
113. Viola HM, Arthur PG, Hool LC. Transient exposure to hydrogen peroxide causes an increase in mitochondria-derived superoxide as a result of sustained alteration in L-type Ca²⁺ channel function in the absence of apoptosis in ventricular myocytes. *Circ Res*. 2007;100(7):1036-1044.
114. Hool LC. Hypoxia increases the sensitivity of the L-type Ca(2+) current to beta-adrenergic receptor stimulation via a C2 region-containing protein kinase C isoform. *Circ Res*. 2000;87(12):1164-1171.
115. Hool LC. Hypoxia alters the sensitivity of the L-type Ca(2+) channel to alpha-adrenergic receptor stimulation in the presence of beta-adrenergic receptor stimulation. *Circ Res*. 2001;88(10):1036-1043.
116. Sims C, Harvey RD. Redox modulation of basal and beta-adrenergically stimulated cardiac L-type Ca(2+) channel activity by phenylarsine oxide. *Br J Pharmacol*. 2004;142(4):797-807.
117. Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, et al. Hydrogen peroxide modulates whole cell Ca²⁺ currents through L-type channels in cultured rat dentate granule cells. *Neurosci Lett*. 2004;356(1):25-28.

118. Fearon IM, Palmer AC, Balmforth AJ, et al. Modulation of recombinant human cardiac L-type Ca²⁺ channel α 1C subunits by redox agents and hypoxia. *J Physiol*. 1999;514 (Pt 3)(Pt 3):629-637.
119. Viola HM, Macdonald WA, Tang H, et al. The L-type Ca(2+) channel as a therapeutic target in heart disease. *Curr Med Chem*. 2009;16(26):3341-3358.
120. Carnes CA, Janssen PM, Ruehr ML, et al. Atrial glutathione content, calcium current, and contractility. *J Biol Chem*. 2007;282(38):28063-28073.
121. Liu C, Zhang CW, Lo SQ, et al. S-Nitrosylation of Divalent Metal Transporter 1 Enhances Iron Uptake to Mediate Loss of Dopaminergic Neurons and Motoric Deficit. *J Neurosci*. 2018;38(39):8364-8377.
122. Zuhlke RD, Pitt GS, Tsien RW, et al. Ca²⁺-sensitive inactivation and facilitation of L-type Ca²⁺ channels both depend on specific amino acid residues in a consensus calmodulin-binding motif in the(α)1C subunit. *J Biol Chem*. 2000;275(28):21121-21129.
123. Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, et al. Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺ - dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron*. 1999;22(3):549-558.
124. Liu Z, Vogel HJ. Structural basis for the regulation of L-type voltage-gated calcium channels: interactions between the N-terminal cytoplasmic domain and Ca(2+)-calmodulin. *Front Mol Neurosci*. 2012;5:38.
125. Bartos DC, Grandi E, Ripplinger CM. Ion Channels in the Heart. *Compr Physiol*. 2015;5(3):1423-1464.
126. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*. 2005;85(4):1205-1253.
127. Biggin PC, Roosild T, Choe S. Potassium channel structure: domain by domain. *Curr Opin Struct Biol*. 2000;10(4):456-461.
128. !!! INVALID CITATION !!! {}.
129. Pongs O. Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol Rev*. 1992;72(4 Suppl):S69-88.
130. Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, et al. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;868:233-285.
131. MacKinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature*. 1991;350(6315):232-235.
132. Jan LY, Jan YN. Structural elements involved in specific K⁺ channel functions. *Annu Rev Physiol*. 1992;54:537-555.
133. Snyders DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res*. 1999;42(2):377-390.
134. Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL, et al. The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K(+) current (I(K1)) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol*. 2001;533(Pt 3):697-710.
135. Anumonwo JM, Lopatin AN. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(1):45-54.
136. Panama BK, McLerie M, Lopatin AN. Heterogeneity of IK1 in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(6):H3558-3567.
137. Nerbonne JM. Molecular Basis of Functional Myocardial Potassium Channel Diversity. *Card Electrophysiol Clin*. 2016;8(2):257-273.
138. Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, et al. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I(to)) in normal and diseased myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33(5):851-872.

139. Patel SP, Campbell DL. Transient outward potassium current, 'I_{to}', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol.* 2005;569(Pt 1):7-39.
140. van der Heyden MA, Wijnhoven TJ, Opthof T. Molecular aspects of adrenergic modulation of the transient outward current. *Cardiovasc Res.* 2006;71(3):430-442.
141. Niwa N, Nerbonne JM. Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (I_{to}) expression and regulation. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(1):12-25.
142. Guo W, Jung WE, Marionneau C, et al. Targeted deletion of Kv4.2 eliminates I_{to,f} and results in electrical and molecular remodeling, with no evidence of ventricular hypertrophy or myocardial dysfunction. *Circ Res.* 2005;97(12):1342-1350.
143. Niwa N, Wang W, Sha Q, et al. Kv4.3 is not required for the generation of functional I_{to,f} channels in adult mouse ventricles. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44(1):95-104.
144. Xu H, Guo W, Nerbonne JM. Four kinetically distinct depolarization-activated K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol.* 1999;113(5):661-678.
145. Brunet S, Aimond F, Li H, et al. Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K⁺ currents in adult mouse ventricles. *J Physiol.* 2004;559(Pt 1):103-120.
146. Gaborit N, Varro A, Le Bouter S, et al. Gender-related differences in ion-channel and transporter subunit expression in non-diseased human hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49(4):639-646.
147. Tamkun MM, Knoth KM, Walbridge JA, et al. Molecular cloning and characterization of two voltage-gated K⁺ channel cDNAs from human ventricle. *FASEB J.* 1991;5(3):331-337.
148. Rosati B, Pan Z, Lypen S, et al. Regulation of KChIP2 potassium channel beta subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol.* 2001;533(Pt 1):119-125.
149. Soltysinska E, Olesen SP, Christ T, et al. Transmural expression of ion channels and transporters in human nondiseased and end-stage failing hearts. *Pflugers Arch.* 2009;459(1):11-23.
150. Wang Y, Hill JA. Electrophysiological remodeling in heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(4):619-632.
151. Lundby A, Tseng GN, Schmitt N. Structural basis for K(V)7.1-KCNE(x) interactions in the I(Ks) channel complex. *Heart Rhythm.* 2010;7(5):708-713.
152. Lundby A, Ravn LS, Svendsen JH, et al. KCNE3 mutation V17M identified in a patient with lone atrial fibrillation. *Cell Physiol Biochem.* 2008;21(1-3):47-54.
153. Anumonwo JMB, Freeman LC, M. KW, et al. Potassium Channels in the Heart: Electrophysiology and Pharmacological Regulation. *Cardiovasc Drugs Reviews.* 1991;9(3):299-316.
154. Jespersen T, Grunnet M, Olesen SP. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology (Bethesda).* 2005;20:408-416.
155. Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, et al. Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress I_{Ks} function. *Nat Genet.* 1997;17(3):338-340.
156. Schmitt N, Grunnet M, Olesen SP. Cardiac potassium channel subtypes: new roles in repolarization and arrhythmia. *Physiol Rev.* 2014;94(2):609-653.
157. England SK, Uebele VN, Kodali J, et al. A novel K⁺ channel beta-subunit (hKv beta 1.3) is produced via alternative mRNA splicing. *J Biol Chem.* 1995;270(48):28531-28534.
158. England SK, Uebele VN, Shear H, et al. Characterization of a voltage-gated K⁺ channel beta subunit expressed in human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(14):6309-6313.
159. Morales MJ, Castellino RC, Crews AL, et al. A novel beta subunit increases rate of inactivation of specific voltage-gated potassium channel alpha subunits. *J Biol Chem.* 1995;270(11):6272-6277.

160. Rettig J, Heinemann SH, Wunder F, et al. Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature*. 1994;369(6478):289-294.
161. Nagaya N, Papazian DM. Potassium channel alpha and beta subunits assemble in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1997;272(5):3022-3027.
162. Shi G, Nakahira K, Hammond S, et al. Beta subunits promote K⁺ channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron*. 1996;16(4):843-852.
163. Fink M, Duprat F, Lesage F, et al. A new K⁺ channel beta subunit to specifically enhance Kv2.2 (CDRK) expression. *J Biol Chem*. 1996;271(42):26341-26348.
164. Trimmer JS. Regulation of ion channel expression by cytoplasmic subunits. *Curr Opin Neurobiol*. 1998;8(3):370-374.
165. Pongs O, Leicher T, Berger M, et al. Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel beta subunits. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;868:344-355.
166. Aimond F, Kwak SP, Rhodes KJ, et al. Accessory Kvbeta1 subunits differentially modulate the functional expression of voltage-gated K⁺ channels in mouse ventricular myocytes. *Circ Res*. 2005;96(4):451-458.
167. Pruunsild P, Timmusk T. Structure, alternative splicing, and expression of the human and mouse KCNIP gene family. *Genomics*. 2005;86(5):581-593.
168. An WF, Bowlby MR, Betty M, et al. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature*. 2000;403(6769):553-556.
169. Patel SP, Campbell DL, Morales MJ, et al. Heterogeneous expression of KChIP2 isoforms in the ferret heart. *J Physiol*. 2002;539(Pt 3):649-656.
170. Guo W, Li H, Aimond F, et al. Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K⁺ currents. *Circ Res*. 2002;90(5):586-593.
171. Calloe K, Soltysinska E, Jespersen T, et al. Differential effects of the transient outward K(+) current activator NS5806 in the canine left ventricle. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(1):191-200.
172. Teutsch C, Kondo RP, Dederko DA, et al. Spatial distributions of Kv4 channels and KChip2 isoforms in the murine heart based on laser capture microdissection. *Cardiovasc Res*. 2007;73(4):739-749.
173. Dixon JE, McKinnon D. Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats. *Circ Res*. 1994;75(2):252-260.
174. Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, et al. A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I(to) and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell*. 2001;107(6):801-813.
175. Foeger NC, Wang W, Mellor RL, et al. Stabilization of Kv4 protein by the accessory K(+) channel interacting protein 2 (KChIP2) subunit is required for the generation of native myocardial fast transient outward K(+) currents. *J Physiol*. 2013;591(17):4149-4166.
176. Grubb S, Speerschneider T, Occhipinti D, et al. Loss of K⁺ currents in heart failure is accentuated in KChIP2 deficient mice. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2014;25(8):896-904.
177. Radicke S, Cotella D, Graf EM, et al. Expression and function of dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6 as a putative beta-subunit of human cardiac transient outward current encoded by Kv4.3. *J Physiol*. 2005;565(Pt 3):751-756.
178. Lundby A, Jespersen T, Schmitt N, et al. Effect of the I(to) activator NS5806 on cloned K(V)4 channels depends on the accessory protein KChIP2. *Br J Pharmacol*. 2010;160(8):2028-2044.
179. Nadal MS, Ozaita A, Amarillo Y, et al. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels. *Neuron*. 2003;37(3):449-461.
180. Jerng HH, Qian Y, Pfaffinger PJ. Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophys J*. 2004;87(4):2380-2396.

181. Jerng HH, Kunjilwar K, Pfaffinger PJ. Multiprotein assembly of Kv4.2, KChIP3 and DPP10 produces ternary channel complexes with ISA-like properties. *J Physiol*. 2005;568(Pt 3):767-788.
182. Ren X, Hayashi Y, Yoshimura N, et al. Transmembrane interaction mediates complex formation between peptidase homologues and Kv4 channels. *Mol Cell Neurosci*. 2005;29(2):320-332.
183. Zagha E, Ozaita A, Chang SY, et al. DPP10 modulates Kv4-mediated A-type potassium channels. *J Biol Chem*. 2005;280(19):18853-18861.
184. Amarillo Y, De Santiago-Castillo JA, Dougherty K, et al. Ternary Kv4.2 channels recapitulate voltage-dependent inactivation kinetics of A-type K⁺ channels in cerebellar granule neurons. *J Physiol*. 2008;586(8):2093-2106.
185. Kim J, Nadal MS, Clemens AM, et al. Kv4 accessory protein DPPX (DPP6) is a critical regulator of membrane excitability in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol*. 2008;100(4):1835-1847.
186. Maffie J, Blenkinsop T, Rudy B. A novel DPP6 isoform (DPP6-E) can account for differences between neuronal and reconstituted A-type K(+) channels. *Neurosci Lett*. 2009;449(3):189-194.
187. Foeger NC, Norris AJ, Wren LM, et al. Augmentation of Kv4.2-encoded currents by accessory dipeptidyl peptidase 6 and 10 subunits reflects selective cell surface Kv4.2 protein stabilization. *J Biol Chem*. 2012;287(12):9640-9650.
188. Nadin BM, Pfaffinger PJ. Dipeptidyl peptidase-like protein 6 is required for normal electrophysiological properties of cerebellar granule cells. *J Neurosci*. 2010;30(25):8551-8565.
189. Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, et al. K(V)LQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature*. 1996;384(6604):78-80.
190. Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, et al. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature*. 1996;384(6604):80-83.
191. Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science*. 1988;242(4881):1042-1045.
192. Bond CT, Pessia M, Xia XM, et al. Cloning and expression of a family of inward rectifier potassium channels. *Recept Channels*. 1994;2(3):183-191.
193. Brecht DS, Wang TL, Cohen NA, et al. Cloning and expression of two brain-specific inwardly rectifying potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(15):6753-6757.
194. Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, et al. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*. 1993;362(6416):127-133.
195. Takahashi N, Morishige K, Jahangir A, et al. Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding a second class of inward rectifier potassium channels in the mouse brain. *J Biol Chem*. 1994;269(37):23274-23279.
196. Topert C, Doring F, Wischmeyer E, et al. Kir2.4: a novel K⁺ inward rectifier channel associated with motoneurons of cranial nerve nuclei. *J Neurosci*. 1998;18(11):4096-4105.
197. Nichols CG, Lopatin AN. Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:171-191.
198. Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, et al. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J*. 1994;66(4):1061-1067.
199. Fakler B, Brandle U, Glowatzki E, et al. Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K⁺ channels is caused by intracellular spermine. *Cell*. 1995;80(1):149-154.
200. Guo D, Lu Z. Mechanism of IRK1 channel block by intracellular polyamines. *J Gen Physiol*. 2000;115(6):799-814.
201. Lopatin AN, Nichols CG. Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1). *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33(4):625-638.

202. Vandenberg CA. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(8):2560-2564.
203. Matsuda H, Cruz Jdos S. Voltage-dependent block by internal Ca²⁺ ions of inwardly rectifying K⁺ channels in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol*. 1993;470:295-311.
204. Huang CL, Feng S, Hilgemann DW. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilization by Gbetagamma. *Nature*. 1998;391(6669):803-806.
205. Hansen SB, Tao X, MacKinnon R. Structural basis of PIP₂ activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir2.2. *Nature*. 2011;477(7365):495-498.
206. Du X, Zhang H, Lopes C, et al. Characteristic interactions with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate determine regulation of kir channels by diverse modulators. *J Biol Chem*. 2004;279(36):37271-37281.
207. Reilly L, Eckhardt LL. Cardiac potassium inward rectifier Kir2: Review of structure, regulation, pharmacology, and arrhythmogenesis. *Heart Rhythm*. 2021;18(8):1423-1434.
208. Po SS, Wu RC, Juang GJ, et al. Mechanism of alpha-adrenergic regulation of expressed hKv4.3 currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(6):H2518-2527.
209. Sergeant GP, Ohya S, Reihill JA, et al. Regulation of Kv4.3 currents by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;288(2):C304-313.
210. Colinas O, Gallego M, Setien R, et al. Differential modulation of Kv4.2 and Kv4.3 channels by calmodulin-dependent protein kinase II in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(4):H1978-1987.
211. Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, et al. Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science*. 2002;295(5554):496-499.
212. Kathofer S, Rockl K, Zhang W, et al. Human beta(3)-adrenoreceptors couple to KvLQT1/MinK potassium channels in *Xenopus* oocytes via protein kinase C phosphorylation of the KvLQT1 protein. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2003;368(2):119-126.
213. Umigai N, Sato Y, Mizutani A, et al. Topogenesis of two transmembrane type K⁺ channels, Kir 2.1 and KcsA. *J Biol Chem*. 2003;278(41):40373-40384.
214. Gomez R, Caballero R, Barana A, et al. Nitric oxide increases cardiac IK1 by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circ Res*. 2009;105(4):383-392.
215. Leonoudakis D, Mailliard W, Wingerd K, et al. Inward rectifier potassium channel Kir2.2 is associated with synapse-associated protein SAP97. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 5):987-998.
216. Wischmeyer E, Karschin A. Receptor stimulation causes slow inhibition of IRK1 inwardly rectifying K⁺ channels by direct protein kinase A-mediated phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(12):5819-5823.
217. Zhang DY, Wu W, Deng XL, et al. Genistein and tyrphostin AG556 inhibit inwardly-rectifying Kir2.1 channels expressed in HEK 293 cells via protein tyrosine kinase inhibition. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1808(8):1993-1999.
218. Gomez R, Nunez L, Vaquero M, et al. Nitric oxide inhibits Kv4.3 and human cardiac transient outward potassium current (Ito1). *Cardiovasc Res*. 2008;80(3):375-384.
219. He Q, Feng Y, Wang Y. Transient outward potassium channel: a heart failure mediator. *Heart Fail Rev*. 2015;20(3):349-362.
220. Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998;93(2):215-228.
221. Wagner S, Hacker E, Grandi E, et al. Ca/calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2009;2(3):285-294.

222. Roeper J, Lorra C, Pongs O. Frequency-dependent inactivation of mammalian A-type K⁺ channel KV1.4 regulated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *J Neurosci*. 1997;17(10):3379-3391.
223. Zhang XD, Lieu DK, Chiamvimonvat N. Small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and cardiac arrhythmias. *Heart Rhythm*. 2015;12(8):1845-1851.
224. Varga AW, Yuan LL, Anderson AE, et al. Calcium-calmodulin-dependent kinase II modulates Kv4.2 channel expression and upregulates neuronal A-type potassium currents. *J Neurosci*. 2004;24(14):3643-3654.
225. Nerbonne JM. Repolarizing cardiac potassium channels: multiple sites and mechanisms for CaMKII-mediated regulation. *Heart Rhythm*. 2011;8(6):938-941.
226. Tohse N. Calcium-sensitive delayed rectifier potassium current in guinea pig ventricular cells. *Am J Physiol*. 1990;258(4 Pt 2):H1200-1207.
227. Ghosh S, Nunziato DA, Pitt GS. KCNQ1 assembly and function is blocked by long-QT syndrome mutations that disrupt interaction with calmodulin. *Circ Res*. 2006;98(8):1048-1054.
228. Haase H, Kresse A, Hohaus A, et al. Expression of calcium channel subunits in the normal and diseased human myocardium. *J Mol Med (Berl)*. 1996;74(2):99-104.
229. Schroder F, Handrock R, Beuckelmann DJ, et al. Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation*. 1998;98(10):969-976.
230. Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation*. 1992;85(3):1046-1055.
231. Ouadid H, Albat B, Nargeot J. Calcium currents in diseased human cardiac cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;25(2):282-291.
232. Hart G. Cellular electrophysiology in cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*. 1994;28(7):933-946.
233. Furukawa T, Myerburg RJ, Furukawa N, et al. Metabolic inhibition of I_{Ca,L} and I_K differs in feline left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol*. 1994;266(3 Pt 2):H1121-1131.
234. Akar FG, Wu RC, Juang GJ, et al. Molecular mechanisms underlying K⁺ current downregulation in canine tachycardia-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(6):H2887-2896.
235. Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, et al. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev*. 2007;87(2):425-456.
236. Rose J, Armoundas AA, Tian Y, et al. Molecular correlates of altered expression of potassium currents in failing rabbit myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(5):H2077-2087.
237. Rozanski GJ, Xu Z, Whitney RT, et al. Electrophysiology of rabbit ventricular myocytes following sustained rapid ventricular pacing. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(2):721-732.
238. Tsuji Y, Opthof T, Kamiya K, et al. Pacing-induced heart failure causes a reduction of delayed rectifier potassium currents along with decreases in calcium and transient outward currents in rabbit ventricle. *Cardiovasc Res*. 2000;48(2):300-309.
239. Zicha S, Xiao L, Stafford S, et al. Transmural expression of transient outward potassium current subunits in normal and failing canine and human hearts. *J Physiol*. 2004;561(Pt 3):735-748.
240. Marionneau C, Brunet S, Flagg TP, et al. Distinct cellular and molecular mechanisms underlie functional remodeling of repolarizing K⁺ currents with left ventricular hypertrophy. *Circ Res*. 2008;102(11):1406-1415.
241. Li GR, Lau CP, Ducharme A, et al. Transmural action potential and ionic current remodeling in ventricles of failing canine hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(3):H1031-1041.

242. Wettwer E, Amos GJ, Posival H, et al. Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res.* 1994;75(3):473-482.
243. Nabauer M, Beuckelmann DJ, Uberfuhr P, et al. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation.* 1996;93(1):168-177.
244. Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res.* 1993;73(2):379-385.
245. Kaab S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, et al. Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res.* 1996;78(2):262-273.
246. Kaab S, Dixon J, Duc J, et al. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation.* 1998;98(14):1383-1393.
247. Li GR, Lau CP, Leung TK, et al. Ionic current abnormalities associated with prolonged action potentials in cardiomyocytes from diseased human right ventricles. *Heart Rhythm.* 2004;1(4):460-468.
248. Sah R, Ramirez RJ, Backx PH. Modulation of Ca²⁺ release in cardiac myocytes by changes in repolarization rate: role of phase-1 action potential repolarization in excitation-contraction coupling. *Circ Res.* 2002;90(2):165-173.
249. Ferrantini C, Coppini R, Sacconi L, et al. Impact of detubulation on force and kinetics of cardiac muscle contraction. *J Gen Physiol.* 2014;143(6):783-797.
250. Lyon AR, MacLeod KT, Zhang Y, et al. Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(16):6854-6859.
251. Horiuchi-Hirose M, Kashihara T, Nakada T, et al. Decrease in the density of t-tubular L-type Ca²⁺ channel currents in failing ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(3):H978-988.
252. Syed AM, Kundu S, Ram C, et al. Up-regulation of Nrf2/HO-1 and inhibition of TGF-beta1/Smad2/3 signaling axis by daphnetin alleviates transverse aortic constriction-induced cardiac remodeling in mice. *Free Radic Biol Med.* 2022;186:17-30.
253. Nagalingam RS, Chattopadhyaya S, Al-Hattab DS, et al. Scleraxis and fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Eur Heart J.* 2022;43(45):4739-4750.
254. Liu ZY, Lu M, Liu J, et al. MicroRNA-144 regulates angiotensin II-induced cardiac fibroblast activation by targeting CREB. *Exp Ther Med.* 2020;20(3):2113-2121.
255. Meyer MR, Fredette NC, Daniel C, et al. Obligatory role for GPER in cardiovascular aging and disease. *Sci Signal.* 2016;9(452):ra105.
256. Delbeck M, Golz S, Vonk R, et al. Impaired left-ventricular cardiac function in male GPR30-deficient mice. *Mol Med Rep.* 2011;4(1):37-40.
257. Di Mattia RA, Mariangelo JIE, Blanco PG, et al. The activation of the G protein-coupled estrogen receptor (GPER) prevents and regresses cardiac hypertrophy. *Life Sci.* 2020;242:117211.
258. Moreyra AE, Gelpi RJ, Mosca SM, et al. Chronic administration of nicardipine attenuates myocardial stunning in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1994;26(8):979-984.
259. de Cingolani GE, Mosca SM, Moreyra AE, et al. Chronic nifedipine treatment diminishes cardiac inotropic response to nifedipine: functional upregulation of dihydropyridine receptors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996;27(2):240-246.
260. Simonovic N, Jeremic J. Role of Calcium Channel Blockers in Myocardial Preconditioning. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research.* 2017;18(4):281-287.

261. Pardo AC, Diaz Zegarra LA, Gonzalez Arbelaez LF, et al. Cardioprotective effects of N-methylacetazolamide mediated by inhibition of L-type Ca²⁺ channel current. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2022;1866(5):130098.
262. Wang Y, Youm JB, Jin CZ, et al. Modulation of L-type Ca²⁺ channel activity by neuronal nitric oxide synthase and myofilament Ca²⁺ sensitivity in cardiac myocytes from hypertensive rat. *Cell Calcium.* 2015;58(3):264-274.
263. Burkard N, Rokita AG, Kaufmann SG, et al. Conditional neuronal nitric oxide synthase overexpression impairs myocardial contractility. *Circ Res.* 2007;100(3):e32-44.
264. Gonzalez DR, Treuer A, Sun QA, et al. S-Nitrosylation of cardiac ion channels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009;54(3):188-195.
265. Qin W, Cao L, Massey IY. Role of PI3K/Akt signaling pathway in cardiac fibrosis. *Mol Cell Biochem.* 2021;476(11):4045-4059.
266. Eichhorn L, Weisheit CK, Gestrich C, et al. A Closed-chest Model to Induce Transverse Aortic Constriction in Mice. *J Vis Exp.* 2018(134).
267. Zaw AM, Williams CM, Law HK, et al. Minimally Invasive Transverse Aortic Constriction in Mice. *J Vis Exp.* 2017(121).
268. Tavakoli R, Nemska S, Jamshidi P, et al. Technique of Minimally Invasive Transverse Aortic Constriction in Mice for Induction of Left Ventricular Hypertrophy. *J Vis Exp.* 2017(127).
269. deAlmeida AC, van Oort RJ, Wehrens XH. Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp.* 2010(38).
270. Volk T, Ehmke H. Conservation of L-type Ca²⁺ current characteristics in endo- and epicardial myocytes from rat left ventricle with pressure-induced hypertrophy. *Pflugers Arch.* 2002;443(3):399-404.
271. Weisheit CK, Kleiner JL, Rodrigo MB, et al. CX3CR1 is a prerequisite for the development of cardiac hypertrophy and left ventricular dysfunction in mice upon transverse aortic constriction. *PLoS One.* 2021;16(1):e0243788.
272. Lao Y, Zheng C, Zhu H, et al. Operating Transverse Aortic Constriction with Absorbable Suture to Obtain Transient Myocardial Hypertrophy. *J Vis Exp.* 2020(163).
273. Zhang Y, Zhang L, Fan X, et al. Captopril attenuates TAC-induced heart failure via inhibiting Wnt3a/beta-catenin and Jak2/Stat3 pathways. *Biomed Pharmacother.* 2019;113:108780.
274. Wang J, Shi Q, Wang Y, et al. Gene Therapy With the N-Terminus of Junctophilin-2 Improves Heart Failure in Mice. *Circ Res.* 2022;130(9):1306-1317.
275. Dizayee S, Kaestner S, Kuck F, et al. Galphai2- and Galphai3-specific regulation of voltage-dependent L-type calcium channels in cardiomyocytes. *PLoS One.* 2011;6(9):e24979.
276. Francis AJ, Firth JM, Sanchez-Alonso JL, et al. GPER limits adverse changes to Ca²⁺ signalling and arrhythmogenic activity in ovariectomised guinea pig cardiomyocytes. *Front Physiol.* 2022;13:1023755.
277. Wang B, Xu M, Li W, et al. Aerobic exercise protects against pressure overload-induced cardiac dysfunction and hypertrophy via beta3-AR-nNOS-NO activation. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179648.
278. Moens AL, Leyton-Mange JS, Niu X, et al. Adverse ventricular remodeling and exacerbated NOS uncoupling from pressure-overload in mice lacking the beta3-adrenoreceptor. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47(5):576-585.
279. Liu QH, Qiao X, Zhang LJ, et al. I(K1) Channel Agonist Zacopride Alleviates Cardiac Hypertrophy and Failure via Alterations in Calcium Dyshomeostasis and Electrical Remodeling in Rats. *Front Pharmacol.* 2019;10:929.

280. Chen T, Zhang Y, Chen M, et al. Tongmai Yangxin pill alleviates myocardial no-reflow by activating GPER to regulate HIF-1alpha signaling and downstream potassium channels. *Pharm Biol.* 2023;61(1):499-513.
281. Alvin ZV, Laurence GG, Coleman BR, et al. Regulation of the instantaneous inward rectifier and the delayed outward rectifier potassium channels by Captopril and Angiotensin II via the Phosphoinositide-3 kinase pathway in volume-overload-induced hypertrophied cardiac myocytes. *Med Sci Monit.* 2011;17(7):BR165-172.
282. Cely-Ortiz A, Felice JI, Diaz-Zegarra LA, et al. Determinants of Ca²⁺ release restitution: Insights from genetically altered animals and mathematical modeling. *J Gen Physiol.* 2020;152(11).
283. Goncalves GK, Scalzo S, Alves AP, et al. Neonatal cardiomyocyte hypertrophy induced by endothelin-1 is blocked by estradiol acting on GPER. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2018;314(3):C310-C322.
284. Sakai S, Kimura T, Wang Z, et al. Endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy is partly regulated by transcription factor II-F interacting C-terminal domain phosphatase of RNA polymerase II. *Life Sci.* 2012;91(13-14):572-577.
285. Jen HL, Yin WH, Chen JW, et al. Endothelin-1-Induced Cell Hypertrophy in Cardiomyocytes is Improved by Fenofibrate: Possible Roles of Adiponectin. *J Atheroscler Thromb.* 2017;24(5):508-517.