

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE  
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO  
POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“Estudio de la expresión de la GTPasa  
Rad en la hipertrofia cardiaca y su  
posible implicación en las corrientes de  
calcio y de compuerta del canal de  
calcio Cav1.2”**

**T E S I S**

**Que presenta**

**LIC. F. RAÚL SAMPIERI CABRERA**

**Para obtener el grado de**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

**Directores de la tesis:**

**Dr. Jorge Alberto Sánchez Rodríguez**

**Dra. María del Carmen García García**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)  
por el apoyo brindado para mis estudios de posgrado.

A los Doctores Jorge Alberto Sánchez y Ma. Del Carmen  
García por brindarme su asesoría, confianza y apoyo para mi  
desarrollo académico.

A la Dra. Elba D. Carrillo por su colaboración en los  
experimentos de PCR tiempo real.

A la QFB. Ascensión Hernández por su asesoramiento en los  
estudios de aislamiento celular.

A la QBP. Ivonne Lezama por su apoyo técnico.

A mis padres por su apoyo y comprensión.

## ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT .....	5
1. INTRODUCCIÓN .....	7
2. MARCO TEÓRICO .....	8
2.1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES .....	8
2.2. CORAZÓN .....	9
2.2.1. LOCALIZACIÓN DEL CORAZÓN .....	9
2.2.2. MORFOLOGÍA EXTERNA .....	9
2.2.3. MORFOLOGÍA INTERNA .....	10
2.3. REMODELACIÓN CARDIACA .....	11
2.4. LA HIPERTROFIA FISIOLÓGICA Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS .....	14
2.4.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN EN HIPERTROFIA CONCÉNTRICA .....	16
2.4.2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN EN HIPERTROFIA EXCÉNTRICA .....	18
2.5. VÍAS IMPLICADAS EN LA HIPERTROFIA PATOLÓGICA .....	19
2.5.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE CALCINEURINA .....	19
2.5.2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA CINASA CALCIO/CALMODULINA (CAMKII) .....	20
2.6. ESTÍMULOS HIPERTROFIANTES .....	22
2.7. CANAL DE CALCIO .....	24
2.7.1. ESTRUCTURA .....	24
2.7.2. PROPIEDADES BIOFÍSICAS Y FARMACOLÓGICAS .....	24
2.8. INHIBIDORES INTRACELULARES DEL CANAL DE CALCIO .....	27
3. HIPÓTESIS .....	29
4. OBJETIVOS .....	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
5.1. ANIMALES .....	29
5.2. GRUPOS EXPERIMENTALES .....	29
5.3. AISLAMIENTO DE CARDIOMICITOS VENTRICULARES .....	30
5.4. PROCESAMIENTO DE VENTRÍCULOS PARA BIOLOGÍA MOLECULAR .....	31
5.4.1. WESTERN BLOT .....	31
5.4.2. ANÁLISIS DEL MENSAJERO DE RAD .....	32

5.5.	ELECTROFISIOLOGÍA .....	32
5.5.1.	CORRIENTES DE CALCIO .....	32
5.5.2.	CORRIENTES DE <i>GATING</i> .....	33
6.	RESULTADOS.....	34
6.1.	ÍNDICE DE HIPERTROFIA.....	34
6.2.	EXPRESIÓN DE LA GTPasa RAD.....	35
6.3.	ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS .....	36
6.3.1.	CORRIENTES DE CALCIO .....	36
6.3.2.	CONDUCTANCIA .....	37
6.3.3.	CORRIENTES DE <i>GATING</i> .....	38
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	40
8.	CONCLUSIONES .....	42
9.	PERSPECTIVAS .....	42
10.	REFERENCIAS .....	43

## RESUMEN

El influjo de calcio a través de los canales de calcio tipo L es uno de los procesos de mayor importancia en el funcionamiento de los cardiomiocitos. Este influjo puede verse afectado en procesos patológicos como la hipertrofia cardiaca y se puede deber a un cambio en la expresión de los canales en la membrana, la expresión funcional de los canales y cambios en la probabilidad de apertura del canal. Además de estos eventos también se pueden ver afectadas por inhibidores intracelulares de los que destacan las GTPasas pequeñas como REM y RAD. En este trabajo evaluaron las corrientes de calcio en cardiomiocitos hipertrofiados con el modelo de isoproterenol a las 12, 24 y 48 h, observándose una disminución de la corriente máxima en todos los casos al compararse con las control (en  $\mu\text{A}/\mu\text{F}$ : 1.4 a las 12 h; 0.58 a las 24 h; 1.1 a las 48 h y 1.72 en condiciones testigo). Para explorar si esta disminución en la corriente de calcio estaba dada por la expresión funcional del canal se midió la carga movilizada relacionada con la apertura del canal (*gating currents*) donde no se encontraron cambios en la carga a las 12 h de exposición al isoproterenol, pero sí un aumento a las 24 h (en fC/pF: 0.9022 a las 12 h; 1.3850 a las 24 h y 1.1070 en condiciones testigo). Además se caracterizó la expresión de la GTPasa RAD a nivel de mensajero y a nivel de proteína encontrándose una disminución significativa a nivel de proteína a las 48 h de exposición al isoproterenol. Dado el papel inhibitorio de Rad sobre el canal de calcio Cav1.2, se esperaría un incremento en la actividad del canal, como en efecto se observó en la *gating*. Sin embargo, las corrientes iónicas a través del canal lejos de aumentar, disminuyeron, lo cual indica que durante la hipertrofia existe un mecanismo compensatorio que sobrepasa los efectos de la disminución de RAD.

## ABSTRACT

Calcium influx through L-type calcium channels is one of the most important processes in cardiomyocyte function. This may be affected in various disease processes such as cardiac hypertrophy due to changes in the expression of the channels in the membrane, functional expression of the channel and in opening probability of the channel. In addition to these events, intracellular inhibitors which include small GTPases such as REM and RAD may also attenuate the channel function. In this work, we evaluated calcium currents in hypertrophied cardiomyocytes induced by isoproterenol at 12, 24 and 48 h and reported a decrease in maximum current in all cases when compared with control (in  $\mu\text{A} / \mu\text{F}$ : 1.4 to 12 h; 0.58 at 24 h; 1.1 at 48 h 1.72 in control conditions). To explore whether this decrease in calcium current which is given as a functional expression of the channel we measured gating currents, where no changes were found at 12 h of exposure to isoproterenol, but it increased at 24 h with isoproterenol (in fC / pF: 0.9022 at 12 h, 24 h 1.3850 1.1070 in testing conditions). Further, we characterized RAD expression at messenger level and protein level and we found a significant decrease in messenger level in all treatment intervals and also a decrease in protein level at 48 h of exposure to isoproterenol. Since it is reported that RAD inhibits calcium channel Cav1.2, we expected an increased channel activity, as observed in *gating currents*. However, the ion current through the channel did not increase as expected, but it decreased indicating that during hypertrophy there is a compensatory mechanism which exceeds the inhibitory effect of RAD.

# 1. INTRODUCCIÓN

La hipertrofia cardiaca (HC) constituye una de las principales formas de respuesta del cardiomiocito a estímulos mecánicos y neurohormonales permitiendo al cardiomiocito generar mayor trabajo, con aumento de la función del corazón. Esta acción compensadora, sin embargo, se ve en algún momento sobrepasada por el estrés biomecánico, lo que da lugar al cuadro de insuficiencia cardiaca, que causa una gran morbilidad y mortalidad. En los complejos procesos moleculares que llevan al crecimiento del cardiomiocito cardiaco intervienen receptores de membrana, segundos mensajeros y factores de transcripción. La vía final común en que convergen estos agentes intracelulares es la expresión génica, cuyos cambios están siendo caracterizados cada vez con más detalle.

Un tipo de estímulo humoral para el crecimiento del cardiomiocito es la estimulación de receptores acoplados a proteínas G, entre los que destacan los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, éstos han sido relacionados con el desarrollo de HC patológica y su eventual progreso a insuficiencia cardiaca. La activación de estos receptores por el isoproterenol, conduce a un aumento en la producción de AMPc y activación de la proteína cinasa A (PKA)<sup>1</sup>. Si bien esta vía de señalización intracelular está principalmente vinculada al control de la contractilidad miocárdica y de la  $[Ca^{2+}]_i$ , también participa en el desarrollo de HC. Ha sido propuesto que su efecto posiblemente sea a través de la activación de calcineurina, de PKC y de la vía del PI3K. En el caso de los receptores acoplados a proteína  $G_i$ , la acción hipertrófica estaría mediada principalmente por vías activadas por la subunidad  $\beta\gamma$ . La mayoría de los estímulos que inducen HC patológica en respuesta a una sobrecarga hemodinámica activan la vía de  $G_q$  y desencadenan un aumento de la corriente de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) activando las vías de señalización intracelular dependientes de este ión. El aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  es uno de los fenómenos más importantes en el desarrollo de la respuesta hipertrófica y esto se ha confirmado provocando el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  por medio de agonistas cálcicos, de ionóforos de  $Ca^{2+}$ , o mediante la elevación del  $Ca^{2+}$  extracelular induciéndose en todos estos casos hipertrofia en cardiomiocitos *in vitro*.

Nuestro grupo de trabajo ha encontrado una disminución en la expresión de la subunidad  $\alpha_{1c}$  en el modelo de hipertrofia con el isoproterenol, en donde a las 48 h de exposición a este fármaco se observó una disminución en la expresión de dicha subunidad de

aproximadamente un 50%, pero una caída del valor máximo de la señal de calcio de apenas un 30% aproximadamente<sup>2</sup>, lo cual puede indicar cambios biofísicos en el canal o la participación de factores moduladores.

Se han descrito a las GTPasas pequeñas como los más potentes inhibidores intracelulares del canal de calcio, ejerciendo su efecto al impedir el anclaje de  $\alpha_{1C}$  a la membrana plasmática, estas proteínas se expresan diferencialmente en los tejidos, encontrándose en el corazón únicamente a REM y RAD. Nuestro grupo de trabajo caracterizó la expresión de REM en el modelo de HC con el isoproterenol, encontrando una disminución en la expresión de esta proteína desde las 12 h hasta las 48 h. Además estudios de la expresión de RAD en la HC por el modelo de obstrucción aórtica (*in vivo*) y la administración de fenilefrina (*in vitro*), mostraron una disminución en la expresión de RAD desde las 24 h en el modelo *in vivo* y desde las 6 h en el modelo *in vitro*. Dada la importancia del canal de calcio tipo L en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos cardiacos, y las GTPasas pequeñas en su modulación, el presente trabajo busca caracterizar la expresión de la GTPasa RAD, las corrientes de calcio y las corrientes de compuerta del canal de calcio tipo L a las 12, 24 y 48 h de exposición al isoproterenol, para conocer los cambios electrofisiológicos producidos en el canal de calcio tipo L en el curso temporal del desarrollo de la hipertrofia cardiaca por el isoproterenol.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES**

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un grupo de desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos. Siguen siendo la causa número uno de mortalidad en el mundo, si bien la hipertensión arterial es la más común de las patologías cardiacas, la progresión de ésta puede desencadenar eventos hipertrofiantes, que a su vez desencadenan en última instancia insuficiencia cardiaca la cual se caracteriza por una tasa de supervivencia a 5 años aproximadamente<sup>3</sup>.

Se calcula que en 2012 murieron por enfermedades cardiovasculares 17.5 millones de personas, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo. Más



de tres cuartas partes de las defunciones por ECV se producen en los países de ingresos bajos y medios<sup>3</sup>.

La mayoría de las ECV pueden evitarse actuando sobre factores de riesgo derivados de los hábitos como el consumo de tabaco, dietas poco sanas y la obesidad, la inactividad física o el consumo nocivo de alcohol, utilizando estrategias que abarquen a toda la población.

La hipertrofia cardíaca juega un papel muy importante en la transición a insuficiencia cardíaca, por lo que la podemos caracterizar como un evento intermedio entre la compensación que realiza el corazón frente a estímulos dañinos el fallo cardíaco producido por estos estímulos en un periodo de tiempo mayor. El estudio de los mecanismos implicados en la generación de hipertrofia cardíaca, favorece ampliar el conocimiento de la patología y su eventual tratamiento, esto sin duda impactaría favorablemente sobre el número de fallecimientos por enfermedades cardiovasculares.

## **2.2. CORAZÓN**

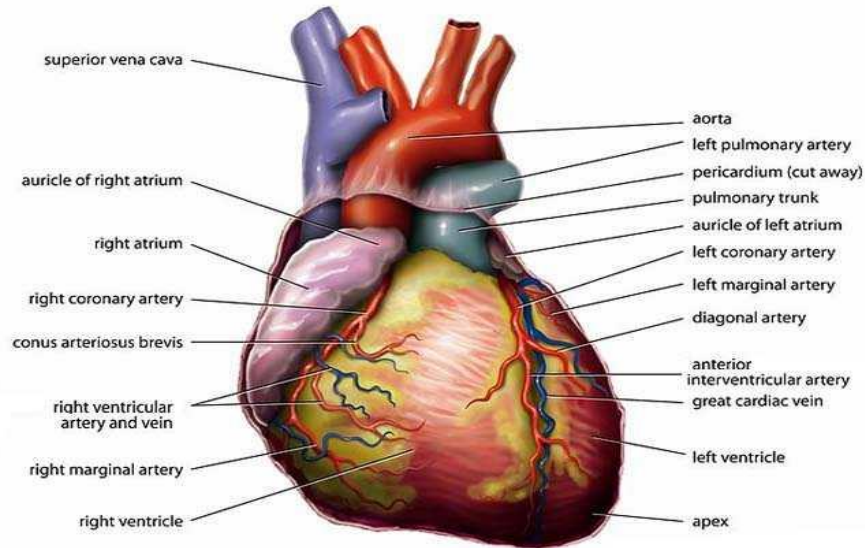
### **2.2.1. LOCALIZACIÓN DEL CORAZÓN**

El corazón está situado en el tórax por detrás del esternón y delante del esófago, la aorta y la columna vertebral. A ambos lados de él están los pulmones. El corazón descansa sobre el diafragma, músculo que separa las cavidades torácica y abdominal. Se encuentra dentro de una bolsa denominada pericardio.

### **2.2.2. MORFOLOGÍA EXTERNA**

El corazón tiene forma de cono invertido con el ápex dirigido hacia la izquierda. En la base se encuentran los vasos sanguíneos que inyectan la sangre al corazón y también la eyectan. Los vasos encargados de llevar la sangre al corazón son las venas cava superior e inferior y las venas pulmonares. Los vasos que se ocupan de eyectarla son la arteria pulmonar y la aorta. Las venas cava, que recogen la sangre venosa de todo el cuerpo, desembocan en la aurícula derecha, y las venas pulmonares, que llevan la sangre oxigenada desde los pulmones, terminan en la aurícula izquierda. También se observan dos estructuras: una a la derecha de la aorta y otra a la izquierda de la arteria pulmonar; se denominan orejuelas y forman parte de las aurículas. El corazón tiene una cara anterior, una posterior y dos bordes: derecho e izquierdo. Las arterias coronarias, llevan sangre al músculo cardíaco, y las venas

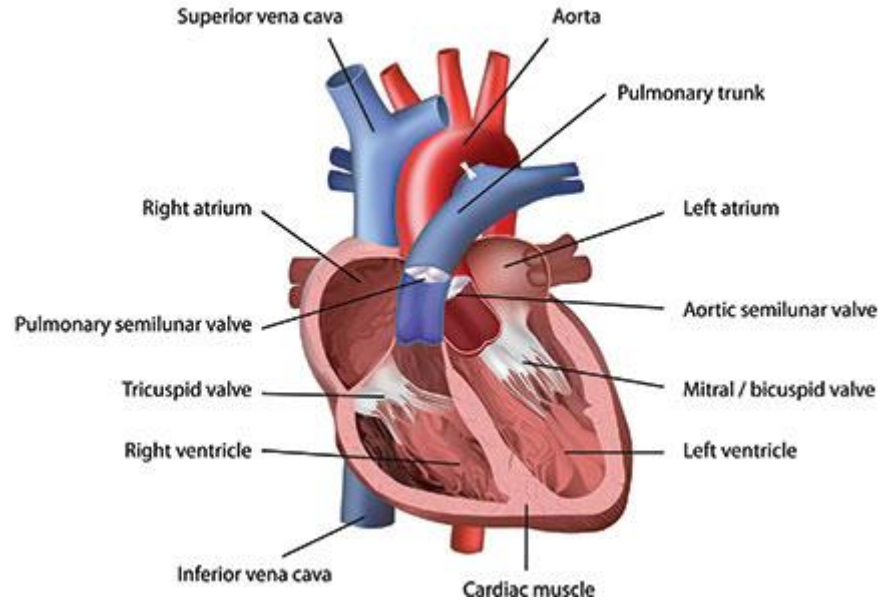
coronarias, que la retiran. El peso del corazón varía según la edad, el tamaño y el propio peso de la persona. Así, se considera que el corazón pesa el 0,45% del peso corporal en el hombre, y el 0,40% del peso corporal en la mujer, de tal modo que en un adulto de estatura media el peso del corazón oscila entre 250-350 g en los hombres y entre 200-300 g en las mujeres. Cuando se trata de deportistas profesionales, habitualmente el corazón muestra un aumento fisiológico o natural de su peso.



**Fig. 1 Anatomía externa del corazón.** A nivel macroscópico, se pueden observar las cavidades superiores (aurículas), vasos sanguíneos principales (arteria pulmonar, aorta, vena cava), así como las arterias coronarias. Disponible en línea en <https://goo.gl/Us05BS>

### 2.2.3. MORFOLOGÍA INTERNA

La parte interna del corazón está constituida por cuatro cavidades: dos en el lado derecho y dos en el izquierdo, de ahí que sea común hablar de corazón derecho y corazón izquierdo. Las cavidades situadas en la parte superior se denominan aurículas, y las dispuestas en la parte inferior, ventrículos. En condiciones normales, las cavidades derechas no se comunican con las izquierdas, pues se hallan divididas por un tabique muscular, denominado tabique interauricular, que separa ambas aurículas; el tabique que distancia ambos ventrículos se llama interventricular. En el tabique interauricular se observa una zona delgada sin músculo, la fosa oval, que está formada por un orificio tapado con una lámina de tejido membranoso, a modo de telón, en el lado de la aurícula izquierda.

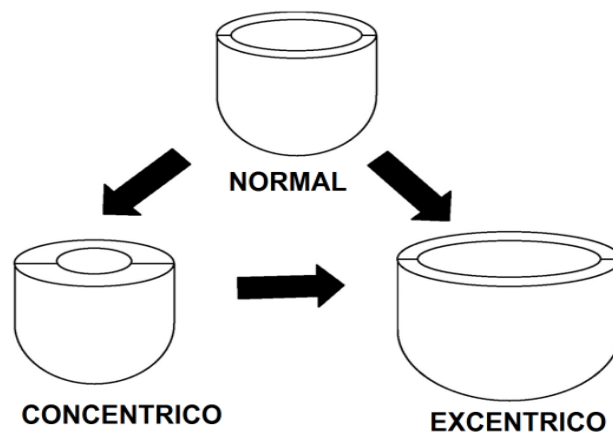


**Fig. 2 Anatomía interna del corazón.** En un corte coronal del corazón se pueden visualizar las cámaras internas superiores e inferiores (aurículas y ventrículos), así como las válvulas tricúspide y mitral y semilunar. Disponible en línea en <https://goo.gl/ly0Zie>

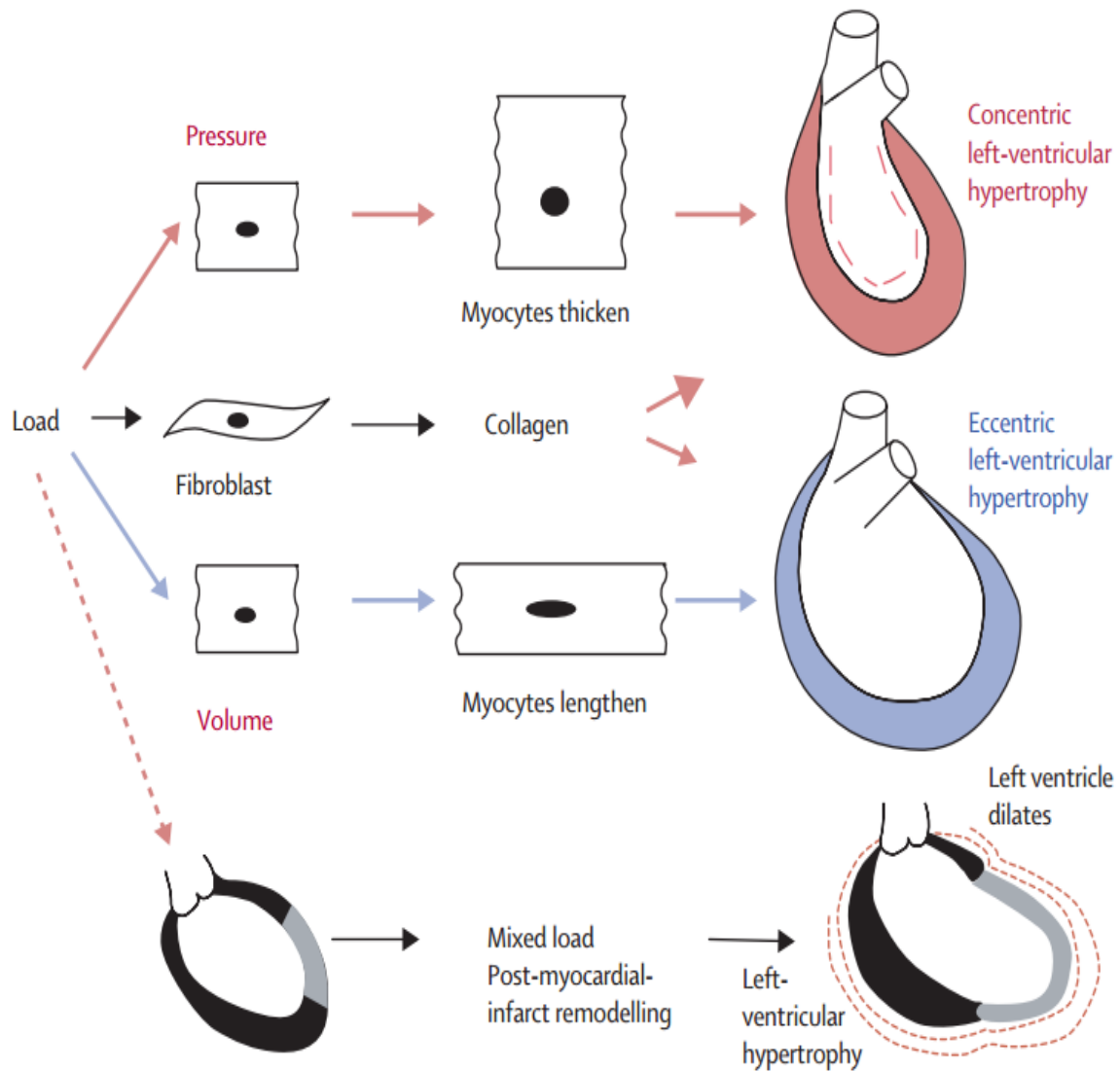
### 2.3. REMODELACIÓN CARDIACA

La remodelación cardíaca se define como la expresión génica que conlleva a cambios moleculares, celulares e intersticiales manifestándose como cambios en el tamaño, forma y función del miocardio como consecuencia de la carga cardíaca o de una lesión. Los factores de los cuales está influenciada la remodelación cardíaca son la sobrecarga hemodinámica y la activación neurohormonal principalmente<sup>4</sup>. La hipertrofia cardíaca es un tipo de remodelación cardíaca producida cuando el corazón se encuentra en un evento de carga de trabajo elevada. Lo que ocasiona un aumento en el tamaño de los miocitos como una manera de reducir el estrés de pared ventricular y del septo. La hipertrofia cardíaca se puede clasificar como "fisiológica" cuando se produce en individuos sanos después del ejercicio o el embarazo y no está asociado con daño cardíaco. Por el contrario, la hipertrofia que resulta de la hipertensión arterial o después de infarto de miocardio se referencia como "patológica". Este nombre puede ser engañoso, debido a que la hipertrofia patológica también puede implicar una fase compensatoria y adaptable, aunque en última instancia, estos aspectos positivos son perdidos y la función ventricular disminuye, a menudo conduce a la insuficiencia cardíaca. Macroscópicamente, el corazón responde a la lesión y

el estrés de diversas formas. Inmediatamente después de un infarto de miocardio, el área de lesión se expande, seguida por la dilatación y adelgazamiento de la zona de infarto regional, esto impacta sobre la geometría de tal manera que se vuelve menos elíptica y más esférica con paredes más delgadas<sup>4</sup>. De manera similar, en la hipertrofia la sobrecarga de volumen resulta en un aumento del radio interior del ventrículo, lo que resulta en hipertrofia excéntrica.<sup>2</sup> Por el contrario, la sobrecarga de presión por lo general produce un aumento de espesor de la pared del ventrículo izquierdo (LV) sin o con poco aumento de tamaño de la cavidad, en un proceso denominado hipertrofia concéntrica. El remodelamiento ventricular se puede clasificar con base de los cambios de forma geométrica y los estímulos patológicos o fisiológicos que evocan los cambios. El ejercicio por lo general resulta en la hipertrofia fisiológica caracterizada por la falta de la fibrosis y la ausencia de la expresión de genes fetales. La sobrecarga de presión por lo general resulta en hipertrofia concéntrica, a menudo acompañada de fibrosis. La sobrecarga de volumen típicamente resulta en hipertrofia excéntrica y se asocia con la aparición de mínima o escasa generación de fibrosis. A excepción de la hipertrofia fisiológica, todos los demás tipos de remodelación hipertrófica pueden progresar a insuficiencia y miocitos disfuncionales. La figura 3 muestra los cambios geométricos del corazón en proceso de hipertrofia cardiaca.



**Fig. 3 Cambios geométricos en el corazón.** A nivel macroscópico, el corazón puede responder al estrés por hipertrofia concéntrica, con un mayor espesor de la pared del VI, sin un aumento asociado en tamaño de la cámara, y por hipertrofia excéntrica, en el que el radio interior del ventrículo aumenta hasta un grado mayor que el espesor de pared (Cohn, et al 2000).



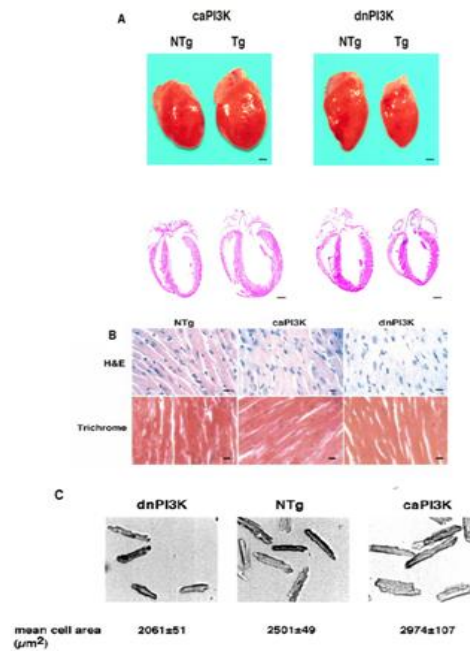
**Figura 4. Patrones de la remodelación ventricular.** Los patrones son: **hipertrofia ventricular izquierda concéntrica**, cuando una carga de presión conduce a un crecimiento en el espesor o anchura de los cardiomiocitos (las líneas punteadas representan el crecimiento del ventrículo izquierdo hacia el interior del mismo); **hipertrofia excéntrica**, cuando una carga de volumen produce el alargamiento de los miocitos; y **post-infarto**, se presentan ambos tipos de hipertrofia concéntrica y excéntrica (Cohn, et al 2000).

## **2.4. LA HIPERTROFIA FISIOLÓGICA Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS**

En los seres humanos, el ejercicio isotónico se ha asociado con un aumento de dimensiones de los ventrículos y ausencia de cambio en el espesor de la pared. Durante mucho tiempo se ha apreciado que la hipertrofia impuesta por la hipertensión u otros estímulos que causan enfermedades es claramente diferente del tipo de la hipertrofia y los efectos subsiguientes asociados con el entrenamiento físico<sup>5</sup>. Por ejemplo, la hipertrofia fisiológica no induce fibrosis o la reactivación de genes fetales<sup>6</sup>, ni es un factor de riesgo para la generación de arritmias, la reducción de la función cardíaca o el desarrollo de insuficiencia cardíaca. Se ha hablado acerca de la hipertrofia patológica y fisiológica como algo aislado, pero una cuestión interesante es saber si los causantes de una hipertrofia patológica son los estímulos que la inducen o la cronicidad de estos. Es decir se sabe que el ejercicio tiene grandes beneficios a la salud, pero que pasaría si el esfuerzo se aplica crónicamente ¿Daría lugar a la patología? Para investigar esto Perrino, et al (2006) realizaron un modelo de sobrecarga de presión intermitente para probar el papel de la duración y la naturaleza de la presión en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca. Dando como resultado anomalías histológicas y celulares con disfunción diastólica, lo que sugiere que es la naturaleza del estímulo y no su duración lo que lleva a hipertrofia patológica.

La hipertrofia cardíaca fisiológica está mediada en gran parte por la señalización a través del de la hormona del crecimiento y por el factor de crecimiento insulínico tipo 1. La acción principal de este factor es mediada por la unión a su receptor específico, el receptor de factor de crecimiento insulínico tipo 1, abreviado como IGF1R, presente en muchos tipos de tejidos. En la unión al IGF1R, un receptor tirosina quinasa, inicia la señalización intracelular; el IGF-1 es uno de los activadores naturales más potentes de la transducción de señal Akt, un estimulador del crecimiento y proliferación celular, y un potente inhibidor de la muerte celular programada. Además el IGF-1 es el mediador principal de los efectos de la hormona del crecimiento. La hormona del crecimiento es producida en la adenohipófisis y liberada al torrente sanguíneo, y luego estimula el hígado a producir IGF-1. El IGF-1 es el responsable del crecimiento del cuerpo de forma sistémica, y tiene efectos promotores del crecimiento en casi todas las células del cuerpo.

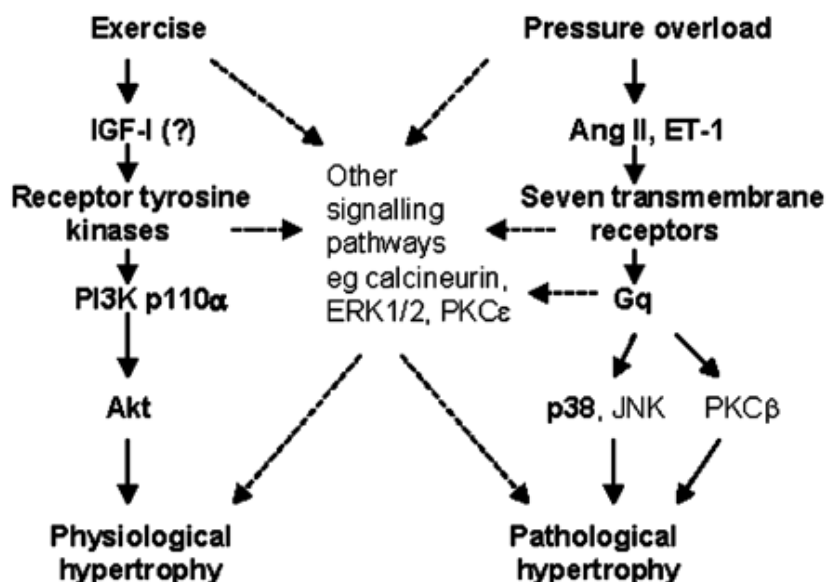
El papel central del IGF-1 en la hipertrofia inducida por el ejercicio lo sugirió Shioi, et al (2000)<sup>7</sup> en ratones que expresan constitutivamente PI3K en su forma activa y una dominante negativa en el corazón. La expresión de la variante activa de PI3K dio como resultado ratones con corazones más grandes, mientras que la dominante negativa resultó en ratones con corazones más pequeños. Como se puede ver en la figura 3 el cambio en el tamaño del corazón se asoció con el tamaño de los miocitos y, no se asoció con fibrosis intersticial o disfunción contráctil ni con la activación de genes fetales.



**Figura 5. Cambios celulares e histológicos producidos a través de la vía PI3K.** El panel A muestra imágenes representativas de corazones transgénicos que expresan la variante activa y la dominante negativa de PI3K y en condiciones control, donde podemos observar crecimiento de las paredes los ventrículos en la variante activa y una disminución de la misma en la variante negativa en comparación con sus controles, este patrón de tamaño se conserva a nivel celular como se puede observar en el panel C. El panel B se muestran cortes representativos del tejido cardíaco, los paneles superiores muestran las secciones teñidas con hematoxilina y eosina, y los paneles inferiores muestran secciones teñidas con tricrómica de Masson sin cambios aparentes a nivel de fibrosis miocárdica (Figura Modificada de Shioi, et al (2000)).

Para estudiar los eventos funcionales producidos por la vía PI3K/Akt McMullen, et al (2003)<sup>6</sup> demostró que la expresión de la dominante negativa de PI3K atenúa la hipertrofia inducida por el ejercicio (natación) pero no la inducida por la sobrecarga de presión, lo que demuestra la especificidad y la importancia de esta vía para la hipertrofia adaptativa. De acuerdo con estos resultados Kim, et al (2008)<sup>8</sup>, comprobó que al suprimir al IGF-1 se bloquea el desarrollo de la hipertrofia cardíaca inducida por el ejercicio. Así mismo

propone una vía de señalización para el desarrollo de la hipertrofia fisiológica y patológica, como se puede ver en la figura 6.



**Figura 6. Modelo de vías de señalización involucrada en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca fisiológica y patológica.** Se representan dos eventos hipertrofiantes diferentes, del lado izquierdo ejercicio y del lado derecho sobre carga de presión, en ambos se desarrolla hipertrofia pero las vías involucradas dan como resultado la hipertrofia fisiológica o la patológica (McMullen, 2003).

### 2.4.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN EN HIPERTROFIA CONCÉNTRICA

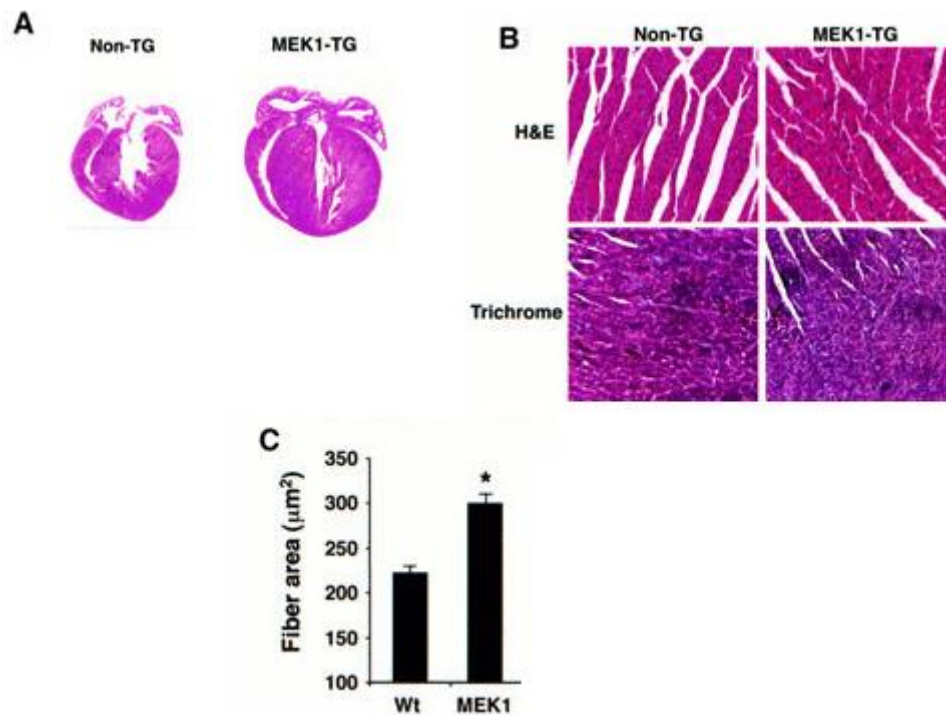
Una de las vías más estudiadas en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca concéntrica es la vía de las MAP cinasas, la cual es una ruta de transducción de señales que se sitúa corriente abajo de los receptores tirosin cinasas así como para la mayoría de receptores de citocinas. La naturaleza de proteína cinasa de estas enzimas implica que el mecanismo de activación sea la adición o eliminación de grupos fosfato (es decir, la actividad cinasa y la fosfatasa), lo cual interviene en la estructura proteica y actúa de interruptor.

El complejo Ras-GTP activo se fija al dominio regulador de Raf (situado en su N terminal), una serin treonín cinasa que, de este modo, queda activa. La hidrólisis del GTP asociado a Ras, dando lugar a GDP, provoca la liberación de Raf, ya activa, que fosforila y en consecuencia activa a MEK. MEK es otra cinasa que fosforila y activa a la MAP cinasa, que es capaz de fosforilar a muchas proteínas diferentes. Los elementos Raf y MEK reciben



también el nombre de MAPKKK y MAPKK, respectivamente, debido a su posición en la ruta de fosforilaciones.

Para estudiar el papel de la vía de las MAP cinasas en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca Bueno, et al (2000)<sup>9</sup>, estudió ratones transgénicos que sobreexpresan una mutante activa de MEK1. Observando a nivel microscópico un patrón de crecimiento hipertrófico concéntrico, así como una mayor anchura y el área superficial de los cardiomiocitos, semejante a los cambios observados con el estrés de sobrecarga de presión (fig 7). Es importante destacar que estos ratones no mostraron signos patológicos de la hipertrofia tales como fibrosis o muerte súbita, lo que sugiere que la vía ERK1 MEK1 puede ser un componente benéfico de la compensación de la respuesta de hipertrofiante concéntrica.

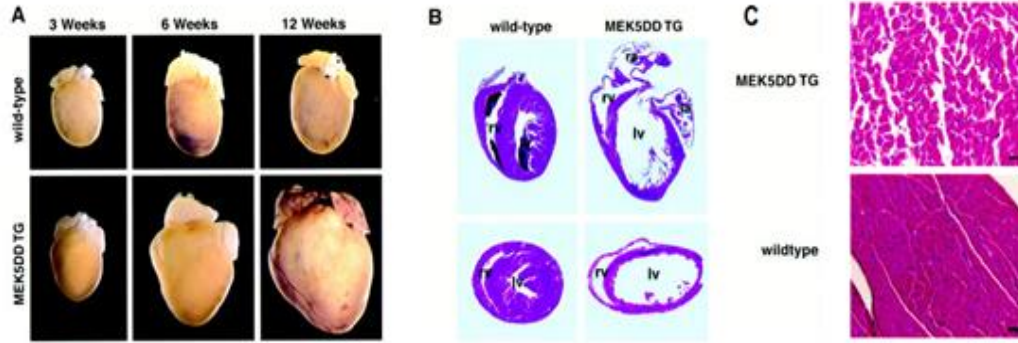


**Figura 7. Análisis histológico cardíaco de ratones transgénicos MEK1.** A) cortes histológicos de corazones que sobreexpresa la mutante activa de MERK1 frente a condiciones testigo. B) El análisis histológico microscópico no reveló ninguna histopatología en los corazones C) se cuantificó el área miofibrilar observándose un incremento de esta en los ratones transgénicos (Figura modificada de Bueno, et al 2000).

## 2.4.2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN EN HIPERTROFIA EXCÉNTRICA

La hipertrofia excéntrica se produce en respuesta a estados de sobrecarga de volumen, como en las valvulopatías. Como se discutió anteriormente, la hipertrofia excéntrica se caracteriza por una adición preferencial de unidades sarcoméricas en serie, que pueden aumentar la capacidad de acortamiento de la miocitos y ayudar a preservar la función ventricular. Sin embargo, la hipertrofia excéntrica en eventos de alargamiento de los miocitos es una característica fundamental de la transición de mecanismos compensadores de hipertrofia a condiciones de sobrecarga de presión que pueden llegar incluso a insuficiencia cardiaca. Es por ello que es muy importante poder diferenciar los mecanismos de alargamiento de los cardiomiocitos en condiciones adaptativas y la elongación asociada con el desarrollo de la insuficiencia cardiaca. Como estudiamos anteriormente en los mecanismos de hipertrofia concéntrica aquí también se asocia el desarrollo de hipertrofia excéntrica con la vía de las MAPK, sin embargo ésta no sigue el mecanismo clásico de la vía, sino que actúa a través de la ruta MEK5-ERK5.

Para investigar la posible participación de MEK5-ERK5 en la hipertrofia cardiaca excéntrica, Nicol, et al (2001)<sup>10</sup> expresó formas constitutivamente activas y dominantes negativos de MEK5 en cardiomiocitos *in vitro*. Donde se observó que MEK5 indujo una forma de hipertrofia en la que los cardiomiocitos adquieren una morfología alargada y los sarcómeros se ensamblan de forma secuencial (hipertrofia excéntrica). Además al colocar el factor inhibidor leucemia (LIF), que estimula la actividad MEK5, se observó una respuesta similar. Por otra parte, en la dominante negativa de MEK5 no se encontró el patrón de crecimiento antes descrito, pero si una reducción en la expresión de genes fetales. Estos resultados revelan un papel específico para MEK5-ERK5 en la inducción de la hipertrofia cardiaca excéntrica.



**Figura 8. Análisis histológico cardiaco de ratones transgénicos MEK5.** A y B cambios morfológicos en corazones que sobre expresan la mutante activa de MERK5 frente a condiciones testigo. C El análisis histológico microscópico no reveló ninguna histopatología en los corazones (Figura modificada de Nicol, et al 2000).

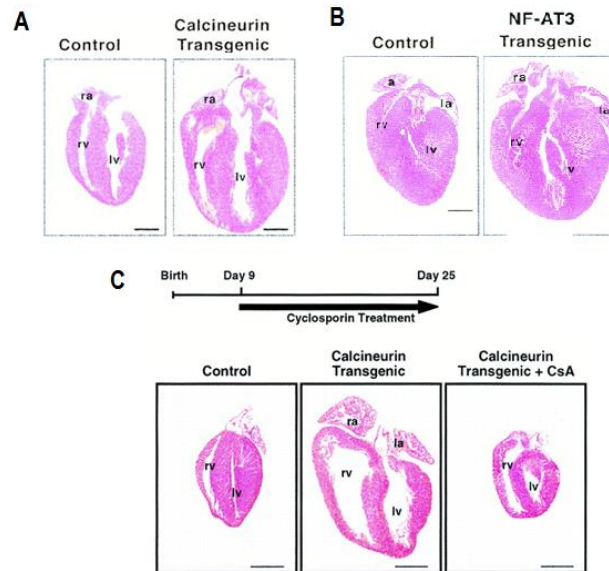
## 2.5. VIÁS IMPLICADAS EN LA HIPERTROFIA PATOLÓGICA

### 2.5.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE CALCINEURINA

Como se describió anteriormente, existen vías de señalización que afectan el crecimiento de los cardiomiocitos de forma excéntrica o concéntrica, pero sin la presencia de signos patológicos. Pero también existen otras vías que desencadenan respuestas estrictamente patológicas, como la mediada por la calcineurina y la CAMKII.

La calcineurina es una enzima dependiente del calcio y una proteína fosfatasa que se activa en respuesta a una elevación sostenida en el calcio intracelular, lo que facilita la unión a su efector, el factor nuclear activador de células T (NFAT). Los factores de transcripción NFAT están implicados en la expresión de genes fetales.

Molkenti, et al (1998)<sup>11</sup> estudió la vía de la calcineurina-NFAT en el corazón, en ratones transgénicos que expresan las formas activas de calcineurina o NF-AT3, el resultado en estas variantes transgénicas fue el desarrollo de hipertrofia cardiaca que evolucionó a insuficiencia cardiaca. Además demostró que la inhibición farmacológica de la calcineurina (con ciclosporina) bloquea el efecto hipertrófico (fig 9). Estos resultados definen una nueva vía de señalización hipertrófica y sugieren enfoques farmacológicos para evitar la hipertrofia cardíaca y con ello la insuficiencia cardíaca.

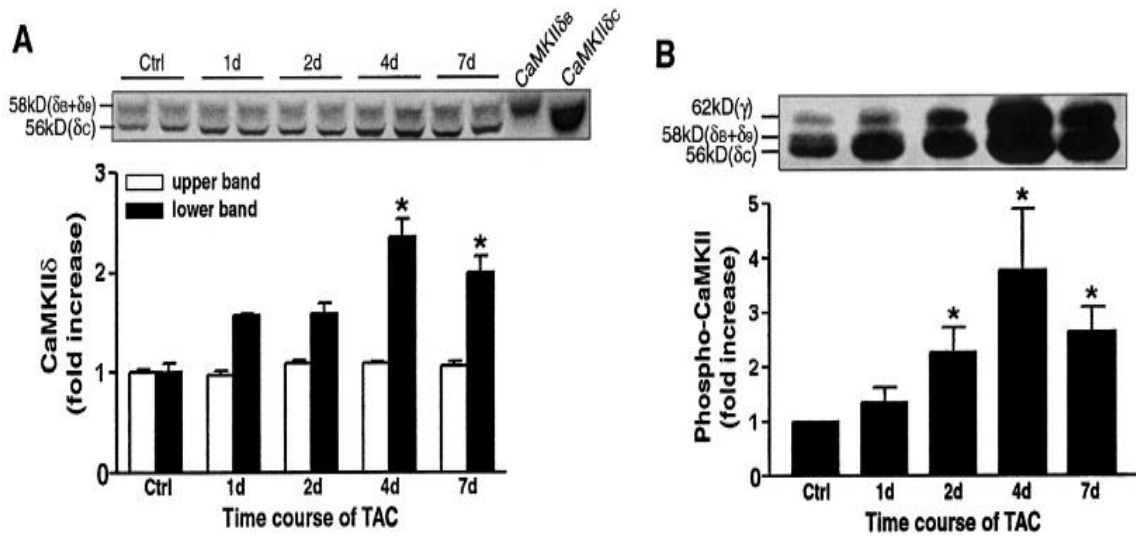


**Figura 9. Análisis histológico cardíaco de ratones transgénicos de calcineurina y NF-AT3.** A) y B) Cambios morfológicos en corazones que sobreexpresan la mutante activa de calcineurina y NF-AT3 respectivamente, frente a condiciones testigo. C) Cambios morfológicos en corazones que sobreexpresan la mutante activa de calcineurina y bajo el tratamiento con ciclosporina (Figura modificada de Molmenti, et al 1998).

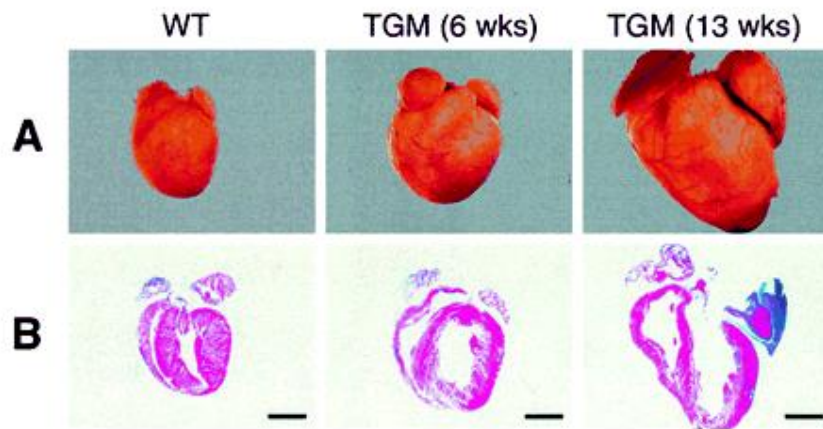
### 2.5.2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA CINASA CALCIO/CALMODULINA (CAMKII)

Una vía que es muy interesante estudiar en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca patológica es la CAMKII. Esta cinasa puede tener hasta 28 isoformas diferentes. Las isoformas de CaMKII provienen de los genes alfa, beta, gamma y delta. Inicialmente, la enzima es activada cuando se acumulan grandes cantidades de calcio y calmodulina, la auto-fosforilación se produce generando una persistente activación de la enzima CaMKII por un corto periodo de tiempo. Sin embargo, el residuo de Treonina 286 eventualmente vuelve a desfosforilar, causando la inactivación de la CaMKII.

Se ha descrito que los niveles de CaMKII aumentan y al igual que su fosforilación después de la hipertrofia cardíaca<sup>12</sup>(fig 10). Además se ha estudiado que ratones transgénicos que sobreexpresan CaMKII desarrollan hipertrofia cardíaca que evoluciona a insuficiencia cardíaca<sup>13</sup> (fig 11).



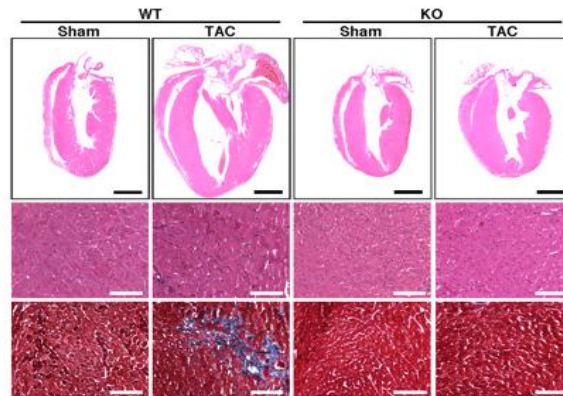
**Figura 10. Cambios en la expresión de CAMKII y pCAMKII en ratones con hipertrofia cardiaca.** A) y B) Curso temporal de la expresión de CAMKII y pCAMKII en ratones después de la inducción de hipertrofia cardiaca por el modelo de obstrucción aortica y en condiciones testigo respectivamente (figura modificada de Backs, et al 2008).



**Figura 11. Órganos completos y cortes histológicos de corazones de ratones transgénicos de CAMKII.** A) y B) Cambios morfológicos en corazones que sobreexpresan la CAMKII (figura modificada de Zhang, et al 2003).

Esta evidencia sugiere que la CAMKII tiene un importante papel en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca, específicamente la CaMKII $\delta$  que cuando se encuentra deletada no se

observa ningún cambio en la morfología del corazón ni a nivel de fibrosis posterior al modelo de sobre carga de presión como lo describe Backs, et al (2008)<sup>12</sup> (fig 12).



**Figura 12. Análisis histológico de corazones de ratones con delección de la CAMKII $\delta$ .** Cortes histológicos de corazones KO frente a condiciones testigo. Se observa que en KO de CaMKII $\delta$  no hay fibrosis ni un crecimiento notorio del corazón (figura modificada de Backs, et al 2008).

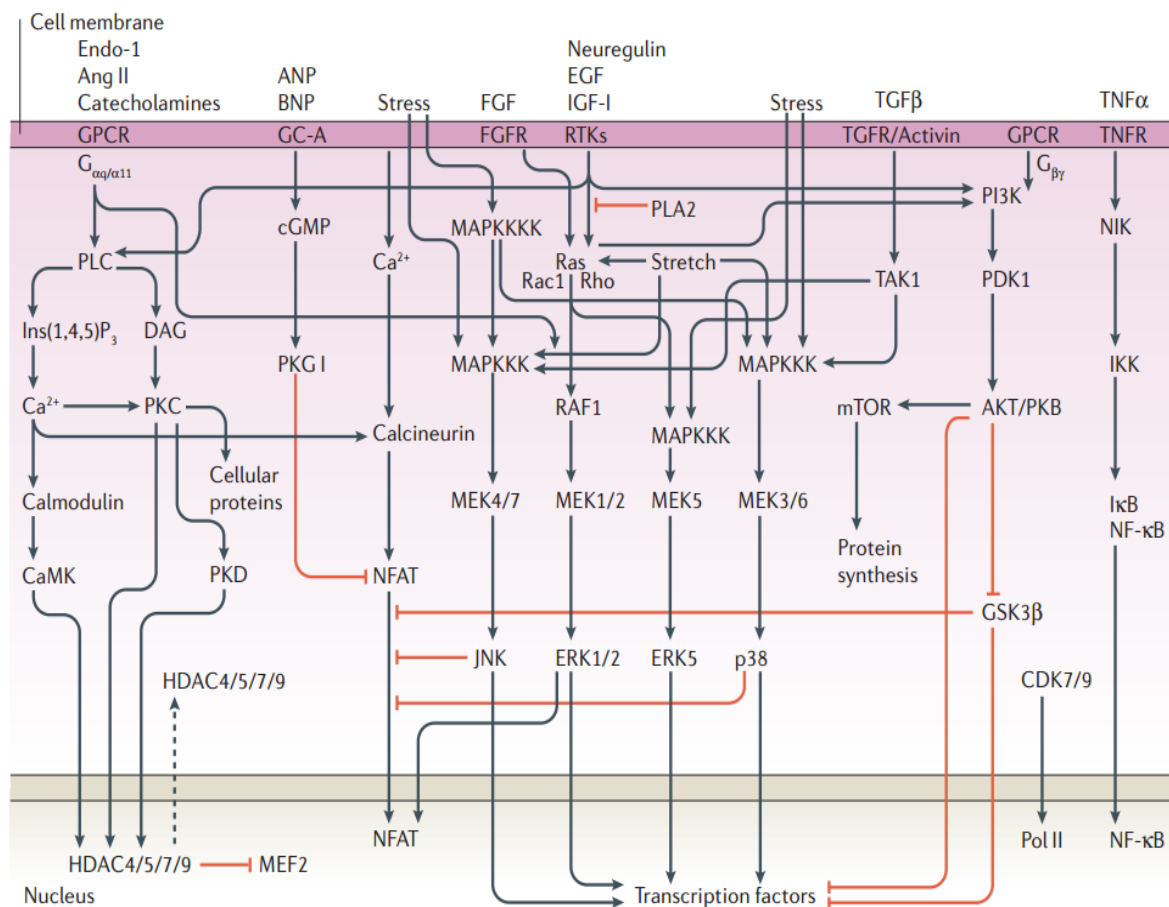
## 2.6. ESTÍMULOS HIPERTROFIANTES

El estrés biomecánico se puede producir en el miocardio por medio de dos tipos de eventos nocivos: el estiramiento mecánico y la liberación de factores neurohormonales. El estiramiento mecánico desencadena diversas señales intracelulares a través de tres tipos de mecanismos: activación de integrinas, deformación del sarcolema y liberación de factores humorales. Las integrinas son una familia de receptores de la superficie celular que se enlazan a la matriz extracelular. Inicialmente, las integrinas se consideraron exclusivamente como moléculas necesarias para las interacciones adhesivas entre las células y la matriz extracelular, así como la regulación de la adhesión celular, el crecimiento celular, y la motilidad celular. Ahora además se sabe que las integrinas también pueden funcionar como transductores de señal y regular la expresión génica y el crecimiento celular<sup>14</sup>.

La deformación del sarcolema causa cambios conformacionales y la activación subsiguiente de las proteínas que están ancladas en la superficie interna de la membrana o de las proteínas transmembranales<sup>15</sup>. Ejemplos de dichas proteínas son algunas enzimas efectoras, como las fosfolipasas C (PLC) y D (PLD) y las isoenzimas de la proteína cinasa C (PKC), canales iónicos activados por el estiramiento, el intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y las

proteínas que se unen al nucleótido de guanina (proteínas G). El estiramiento mecánico de los cardiomiocitos puede dar lugar a la liberación de factores humorales, como la angiotensina II, la endotelina-1 y el factor de crecimiento transformante-beta 1 (TGF-β1), que actúan sobre los propios cardiomiocitos de manera autocrina o sobre otras células próximas de manera paracrina<sup>16</sup>.

Como ya se explicó anteriormente, existen una gran cantidad de ligandos que pueden activar vías de señalización implicadas en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca, mismos que se resumen en la figura 13<sup>17</sup>.



**Figura 13. Integración de las vías de señalización implicadas en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca.** Se muestran en la parte superior los estímulos hipertrofiantes y el tipo de receptores de membrana que activan, desencadenado en vías complejas que se entrelazan entre si y conducen a la expresión génica (Heineke, 2006).

## **2.7. CANAL DE CALCIO**

El paso de iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a través del canal de calcio tipo L es el suceso que inicia el proceso de acople excitación-contracción. Al abrirse el canal, se permite el flujo selectivo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  a través del poro del canal, iniciándose una variedad de procesos intracelulares, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  constituyen el enlace fundamental entre las señales eléctricas de la superficie de la membrana y las respuestas bioquímicas intracelulares.

Sin duda los canales de calcio juegan un papel muy importante en los mecanismos homeostáticos del calcio, sin embargo estos mecanismos pueden verse alterados por diversas patologías que pueden afectar la activación o inhibición de los canales de calcio.

### **2.7.1. ESTRUCTURA**

Los canales de calcio son proteínas oligoméricas, constituidos por una subunidad principal,  $\alpha_{1c}$ , que sirve como poro y sensor del cambio de potencial<sup>18</sup> y diversas subunidades reguladoras o auxiliares tales como la subunidad  $\beta$ , las subunidades  $\alpha_{2s}$  (unidas por puentes disulfuro). Está constituida por 4 dominios, los que a su vez están formados por 6 segmentos transmembranales. El cuarto de estos segmentos, S4, está altamente cargado y se considera que es la zona que actúa como sensor de los cambios de potencial de la membrana<sup>19</sup>.

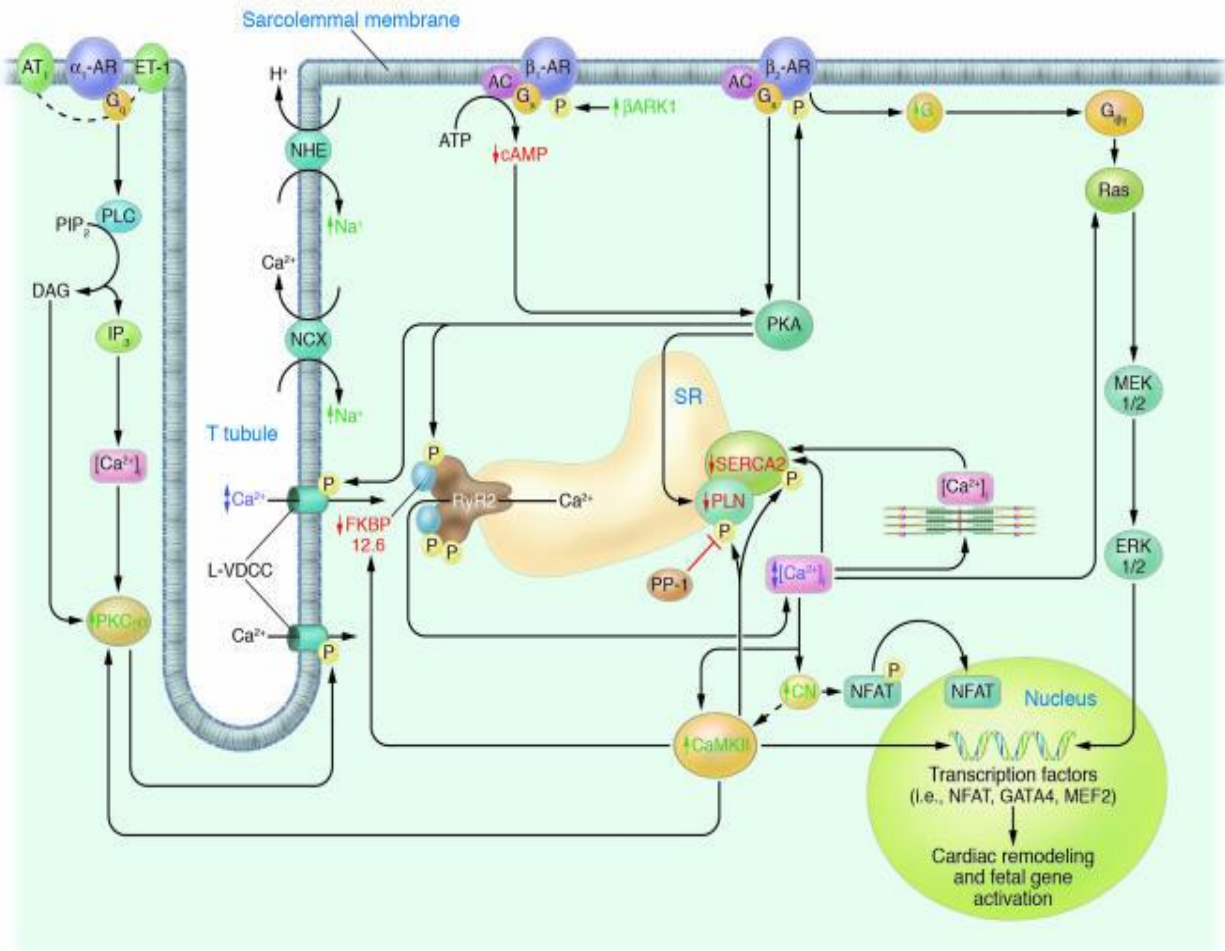
### **2.7.2. PROPIEDADES BIOFÍSICAS Y FARMACOLÓGICAS**

Su activación es voltaje dependiente y el potencial de activación depende del tipo celular; por ejemplo, en las células neuroendocrinas y en el músculo cardíaco se activan a partir de potenciales próximos a -30 mV y la amplitud máxima de la corriente se alcanza en torno a los + 5 mV<sup>20</sup>. La inactivación es más lenta que los canales de tipo T y el curso temporal de dicho proceso tiene una constante de tiempo del orden de segundos y depende de diversos factores: 1) del ion que pasa a través del canal (los iones  $\text{Ca}^{2+}$  la aceleran y los iones  $\text{Ba}^{2+}$  la enlentecen), 2) de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (los quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  la enlentecen) y 3) de la amplitud de la corriente (cuanto mayor es la amplitud de la corriente, más rápida es la inactivación). Estos datos sugieren que la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  desempeña un papel fundamental en el proceso de inactivación de los canales de calcio de tipo L y en general de todos los canales de alto umbral; sin embargo, en células cardíacas se ha observado que la inactivación también depende del



potencial de membrana<sup>21</sup>. Por tanto, la inactivación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral es un fenómeno complejo que depende al menos de dos factores: de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , que a su vez depende de la actividad de los canales; y, del potencial que alcanza la membrana durante su activación.

La farmacología de este tipo de canales es de gran importancia debido al éxito alcanzado en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares con fármacos bloqueantes de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, denominados usualmente "antagonistas del calcio"<sup>22</sup>. Estos fármacos constituyen un grupo heterogéneo de compuestos y han sido clasificados atendiendo a su estructura química en 4 grupos: 1,4-dihidropiridinas (DHP) (nifedipina, nitrendipina, nimodipina, etc.), benzotiazepinas (diltiazem), fenilalquilaminas (verapamil) y piperacinas (flunaricina, cinaricina, etc.). Se unen específicamente a receptores acoplados alostéricamente a la subunidad  $\alpha_{1c}$ , del canal, pero esta unión esta modulada por los estados (activo, inactivo) del mismo; teniendo mayor afinidad por el estado inactivado, que es el que predomina durante la despolarización, produciendo la estabilización de este estado y por lo tanto un bloqueo voltaje dependiente de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las DHP por su especificidad y potencia han sido utilizadas como ligandos para la localización, aislamiento y purificación de los canales de tipo L en músculo esquelético<sup>23, 24</sup>.



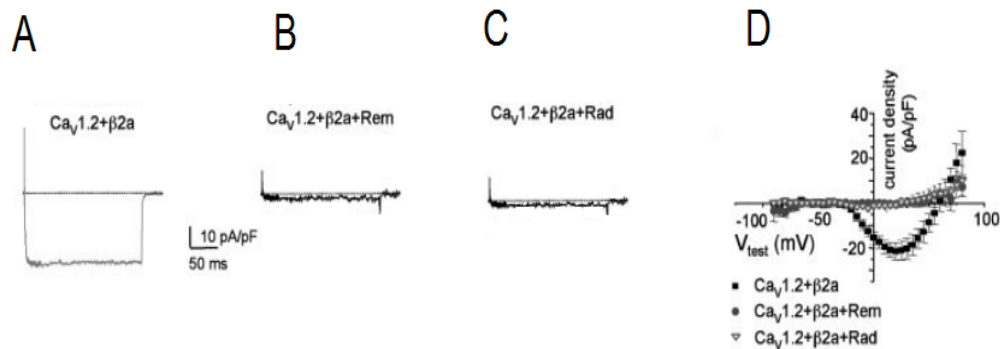
**Figura 14. Modelo de las vías de señalización de involucradas en la apertura del canal de calcio implicadas en la hipertrofia cardíaca.** La estimulación de los receptores  $\beta_1$  adrenérgicos activa a la proteína  $G_s$ , que a su vez activa a la adenilato ciclasa (AC), causando la producción de cAMP. Este AMPc activa a la PKA, que fosforila y altera la función de numerosos sustratos importantes para la regulación de  $Ca^{2+}$  en el canal de calcio. La vía los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos activa la vía de las MAP cinasas que repercute en la expresión de genes de remodelamiento. Por otro lado, los receptores  $\alpha$  adrenérgicos,  $AT_2$  a angiotensina II y ET-1 a endotelina siguen la vía de la PLC-DAG-PKC que puede llevar a la fosforilación del canal de calcio y con ello a su apertura (Bodi, et al 2005).

## 2.8. INHIBIDORES INTRACELULARES DEL CANAL DE CALCIO

Existen moléculas capaces de inhibir a los canales de calcio de forma intracelular: las GRK y además se han descrito como los más potentes inhibidores intracelulares del canal de calcio. Las GRK's son una subfamilia de proteínas G de bajo peso molecular que pertenecen a la superfamilia de Ras. Se activan por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) en respuesta a diversos estímulos extracelulares. Durante esta última década, numerosos estudios moleculares y celulares, así como modelos animales genéticamente modificados, han puesto en evidencia el papel de las GTPasas pequeñas en la regulación de la hipertrofia cardíaca<sup>26</sup>.

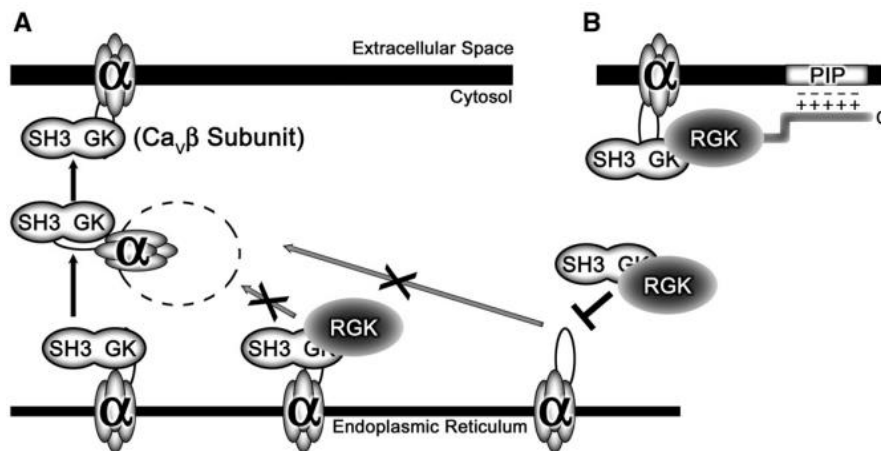
Se han descrito cuatro miembros GEM/KIR, REM, REM 2 y RAD. Las cuales se expresan diferencialmente en los tejidos, encontrándose en corazón únicamente REM y RAD.

En el 2003 Finlin B. y col. Describieron el papel inhibitorio de las GTPasas RAD y REM sobre el Cav 1.2 en una línea celular dónde transflectaron a la subunidad del canal  $\alpha_{1c}$  y la subunidad  $\beta_{2a}$  (fig. 15).



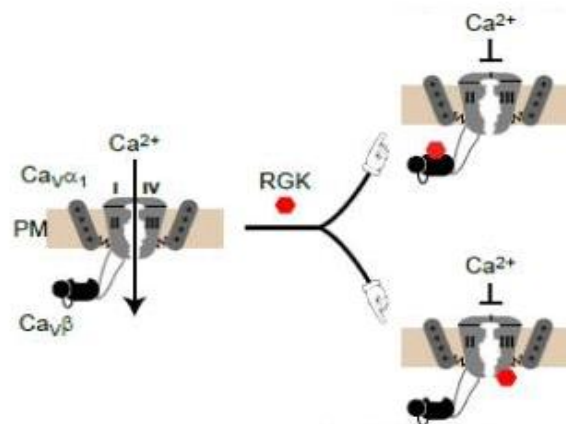
**Figura 15. Implicaciones de las GRK REM y RAD sobre las corrientes de calcio.** El panel A) muestra un trazo representativo de la corriente de  $\text{Ba}^{2+}$  en condiciones testigo (es decir células que expresan la subunidad  $\alpha_{1c}$  y la subunidad  $\beta_{2a}$ ) en los paneles B y C muestra un trazo representativo de la corriente de  $\text{Ba}^{2+}$  con una sobreexpresión de REM y RAD y el panel D se muestra la curva I/V de las condiciones antes mencionadas. En esta figura se puede ver que cuando se sobre expresan REM y RAD la corriente de  $\text{Ba}^{2+}$  se inhibe drásticamente (imagen modificada de Finlin, et al 2003).

La evidencia de la inhibición del Cav 1.2 fue fundamental para que Correll, et al (2008)<sup>28</sup> propusieran un mecanismo de inhibición de las GRK's en donde se describe como las GRK's pueden inhibir el tráfico de  $\alpha_{1c}$  a través de los bloqueos de éstas a la subunidad  $\beta$  que es la responsable de servir como chaperona para llevar a  $\alpha_{1c}$  a la membrana. Además las pueden unirse a  $\alpha_{1c}$  cuando se encuentra anclada a la membrana.



**Figura 16. Implicaciones de las GRK's en el tráfico  $\alpha_{1c}$  a la membrana celular.** En el panel A) se puede ver como las GRK's pueden inhibir el tráfico de  $\alpha_{1c}$  a través de los bloqueos de éstas a la subunidad  $\beta$  que es la responsable de servir como chaperona para llevar a  $\alpha_{1c}$  a la membrana. En el panel B) se describe como las GRK's también se pueden unir a  $\alpha_{1c}$  (Correll, et al 2008).

Yang, et al (2013)<sup>28</sup> describió el mecanismo de inhibición de REM y RAD en células cardíacas (fig. 17), encontrando que ambas realizan su mecanismo de inhibición por unión a las subunidades  $\beta$  y de forma directa en  $\alpha_{1c}$ .



**Figura 17. Mecanismo de inhibición de las GRK en el canal de calcio.** Se muestran dos mecanismos de inhibición del canal, el primero a través de la subunidad  $\beta$  y el segundo de forma directa en la subunidad  $\alpha_{1c}$  (figura modificada de Yang, et al 2013).

### **3. HIPÓTESIS**

Existe una disminución en la expresión de RAD a nivel de proteína y mensajero en el modelo de hipertrofia generado por isoproterenol.

El modelo de hipertrofia por isoproterenol disminuye la carga movilizada asociada con la apertura del canal (*gating currents*) y las corrientes del canal de calcio tipo L.

### **4. OBJETIVOS**

Medir las corrientes de calcio del canal y las corrientes de compuerta Cav1.2 en corazones sanos e hipertrofiados mediante la técnica de *patch clamp* así como la expresión a nivel de la proteína y del mensajero de la GTPasa RAD, para caracterizar los cambios producidos por ésta en la electrofisiología del Cav 1.2 en la hipertrofia cardiaca a las 12, 24 y 48 h de exposición al isoproterenol.

### **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **5.1. ANIMALES**

Los experimentos fueron realizados en ratas Wistar macho (200-250 g) obtenidas del bioterio Harlam UNAM.

#### **5.2. GRUPOS EXPERIMENTALES**

Se utilizaron tres grupos experimentales (tratamiento con Iso 12, 24 y 48 h), a los cuales se les administró isoproterenol a una dosis de 5 mg/Kg/24 h vía subcutánea. Al grupo de 12 h se le administró la misma dosis antes descrita y se sacrificaron a las 12 h de exposición al isoproterenol. Cada grupo experimental contaba con el grupo control al cual se le administró solución salina fisiológica por vía subcutánea. Se consideró un mínimo de 5 animales por grupo experimental.

Para los registros de corrientes de calcio y corrientes de *gating* se utilizaron miocitos cardiacos disociados y para los estudios de expresión de la proteína RAD se utilizaron los ventrículos completos. Como se menciona a continuación.

### **5.3. AISLAMIENTO DE CARDIOMICITOS VENTRICULARES**

Se realizó mediante el aparato de Langerdorff el cual es un sistema constituido por una bomba peristáltica, un baño para mantener la temperatura controlada, serpentín de vidrio, y una serie de mangueras. Por este sistema se hace pasar solución fisiológica de Tyrode (contiene en mM: 136 NaCl, 5.4 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 glucosa) cuya finalidad es mantener el equilibrio electrolítico y el pH. Además la solución Tyrode debe mantenerse con burbujeo de oxígeno constante.

Se anestesiaron a las ratas con pentobarbital sódico (75.6 mg/Kg vía intraperitoneal) y se inyectó además heparina (500 u/ml) como anticoagulante, una vez anestesiada la rata los corazones fueron extirpados rápidamente de la cavidad torácica de la rata y la aorta se canuló en el aparato de Langendorff, teniendo cuidado de no llegar a la válvula aortica, para asegurar que la circulación fuera retrógrada, es decir a través de las arterias coronarias. Una vez canulado el corazón, éste se dejó lavar con solución Tyrode durante 3 min aproximadamente, para eliminar el contenido de sangre y esta solución fue desechada. Después del tiempo de lavado del corazón, se hizo pasar por el sistema una solución Tyrode suplementada con las enzimas colagenasa (tipo II, 3.5 U/ml; Worthington, Lekawood, NJ, USA) y proteasa (tipo XIV, 0.45 U/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri; USA), recirculándola durante 45 minutos aproximadamente; habiendo finalizado el tiempo con las enzimas el corazón fue retirado del sistema separando las aurículas de los ventrículos. Los ventrículos se cortaron en segmentos pequeños para favorecer la liberación de los cardiomicitos del tejido cardiaco posteriormente se colocó en 10 mililitros de solución Tyrode con enzimas durante 2 minutos en agitación de 45 rpm a 37 grados centígrados, se filtró esta porción por una malla de nylon de 100 µm y el sobrenadante se centrifugó a 800 rpm/2 min. El pellet fue resuspendido en solución Tyrode suplementada con 1 % de albúmina y en concentraciones crecientes de calcio (en mM: 0.1, 0.5, 1). Las células aisladas fueron usadas inmediatamente.

## **5.4. PROCESAMIENTO DE VENTRÍCULOS PARA BIOLOGÍA MOLECULAR**

Se utilizaron los mismos tratamientos antes descritos para el análisis de la proteína. Las ratas fueron anestesiadas como ya describió y para el lavado de los corazones se utilizó una bomba peristáltica por la cual se hizo pasar solución PBS (contiene en mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 10.5 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.45 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a través de la vena cava inferior, se cortó la aurícula derecha para drenar la sangre. Al corazón libre de sangre se le retiraron las aurículas y se pesaron los ventrículos, se tomó una pequeña porción de los ventrículos para los estudios de PCR tiempo real la cual se colocó durante 24 horas en el buffer RNAlater a 4 grados centígrados y posteriormente en nitrógeno líquido. La porción para estudio de proteína se guardó directamente en nitrógeno líquido.

### **5.4.1. WESTERN BLOT**

La porción de ventrículos para estudio de proteína fue pulverizada en un mortero utilizando nitrógeno líquido, una vez pulverizado el tejido se agregaron 10 volúmenes de buffer de homogenización (contiene en mM: 250 sacarosa, 50 MOPS, 2 EGTA, pH 7.4) suplementado con inhibidores de proteasas (benzaminida 1 mM, PMSF 0.2 mM, AEBSF 1 mM, aprotinina 800 nM, bestatina 50 nM, E64 15 µM, leupeptina 20 µM, pepstatina A 10 µM), se dejó descongelar gradualmente el homogenizado y se realizó una segunda homegenización con un homegenizador de vidrio utilizando no más de 20 movimientos. El homogenizado fue centrifugado a 1000 g/10 min, el sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 5000 g/10 min, el sobrenadante se separó en alícuotas en tubos Eppendorf y guardado en nitrógeno líquido. Se realizó una curva de calibración con albúmina por el método de Bradford para determinar la concentración de proteínas totales y realizar los cálculos para preparar las muestras en buffer de carga. Se corrieron las muestras en geles de poliacrilamida al 12% en una cámara de electroforesis vertical, cargando 30 µg de muestra. Posterior a la electroforesis se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa por medio de una cámara de transferencia semihúmeda y la membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-Rad (1:1500; Aviva Systems Biology) y con un anticuerpo secundario anti-rabbit (1:100000) y para el normalizador se utilizó un anticuerpo primario anti-GAPDH (1:15000) y un anticuerpo secundario anti-mouse (1:120000). Los anticuerpos

secundarios tienen conjugada una enzima peroxidasa que al contacto con peróxido y luminol emiten luminiscencia lo que permite poder visualizar las bandas de interés. Se analizó la expresión relativa de las proteínas mediante el análisis densitométrico de las bandas.

#### **5.4.2. ANÁLISIS DEL MENSAJERO DE RAD**

El RNA celular fue aislado utilizando el Kit Rneasy Mini (Quagen). La retrotranscripción se realizó con 500 ng de RNA. Utilizando SuperScript III (Invitrogen). Los niveles de expresión relativos del RNAm de RAD se cuantificaron utilizando ensayos TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) utilizando como normalizador la subunidad 18S de RNA ribosomal (rRNA), que no se ve afectada por la administración de ISO. La cuantificación se realizó por el método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Este procedimiento es válido si las eficiencias de amplificación de la molécula diana y el normalizador son aproximadamente iguales, como fue el caso en nuestros experimentos<sup>30</sup>.

### **5.5. ELECTROFISIOLOGÍA**

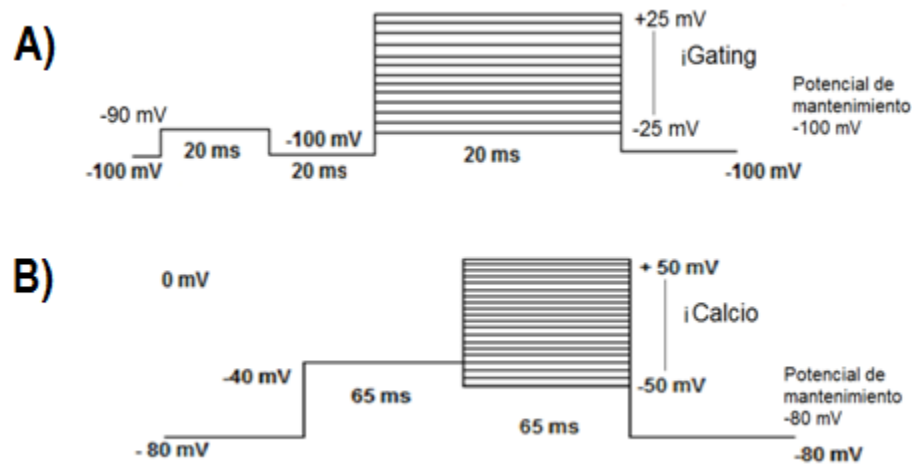
#### **5.5.1. CORRIENTES DE CALCIO**

Para medir las corrientes de calcio de los cardiomiocitos ventriculares se utilizó la técnica de *patch clamp* en la configuración de *whole cell*. Las corrientes fueron registradas con un amplificador Axopatch 200 (Axon Instruments) utilizando un potencial de mantenimiento de -80 mV. El protocolo de pulsos que se utilizó involucra un pulso de -40 mV durante 65 ms para inactivar las corrientes de sodio, después de esto se dio un pulso de -10 mV seguido por 20 pulsos con incrementos de +5 mV hasta +50 mV durante 65 ms para activar las corrientes de calcio del canal de calcio tipo L. Para medir la capacitancia de la membrana y substrar las corrientes lineales se aplicó un pulso de +5 mV durante 62 ms. Las corrientes registradas fueron digitalizadas con un interfaz Digidata (Axon Instruments) con una resolución de 16 bits. Los datos fueron analizados con Sigma Plot 10.0. La solución de la pipeta contenía (en mM): 100 Aspartato de Cesio, 20 CsCl, 20 TEACl, 2 Mg-ATP, 1.8 MgCl<sub>2</sub>, 0.05 EGTA y 5 HEPES, pH 7.2. Para la solución externa se utilizó Tyrode con 1 mM de calcio. Los experimentos fueron llevados a cabo a 18 grados centígrados.



### 5.5.2. CORRIENTES DE GATING

Para medir las corrientes de *gating* de los cardiomicitos ventriculares se utilizó la técnica de *patch clamp* en la configuración de *whole cell*. Las corrientes fueron registradas con un amplificador Axopatch 200 (Axon Instruments) utilizando un potencial de mantenimiento de -100 mV. La solución interna contenía (en mM): 150 Metanosulfonato de Cesio, 5 CsCl, 10 Hepes, 10 EGTA, 1 MgCl<sub>2</sub>, 4 MgATP, 0.5 μM rianodina (pH 7.2, ajustado con CsOH). Los cardiomicitos se colocaron en la cámara de electrofisiología que contienen solución Tyrode típica con 1 mM de calcio, se realiza el sello en esa solución y se registra en una solución que contiene (en mM): 155 N-metil-D-glucamina aspartato (NMG-Asp), 5 BaCl<sub>2</sub>, 10 4-aminopiridina, 10 Hepes (pH 7.4, ajustado con NMG).



**Figura 18. Protocolos de pulsos para los estudios electrofisiológicos.** A) Corrientes de *gating* y B) corrientes de  $[Ca^{2+}]_i$ .

Un parámetro de suma importancia en los estudios de electrofisiología de canales iónicos es la conductancia, la cual se entiende como la facilidad que ofrece un material al paso de la corriente eléctrica; es decir, que la conductancia es la propiedad inversa de la resistencia eléctrica. Ésta se puede obtenerse de las curvas I/V utilizando la siguiente ecuación matemática:

$$G = \frac{I_{ca}}{V_m - E_{ca}}$$

Dónde:

G=conductancia

I<sub>ca</sub>=corriente de calcio

V<sub>m</sub>= voltaje de registro

E<sub>ca</sub>=potencial de inversión

Una vez obteniéndose los valores de conductancia (G) se realiza la curva G/V a la cual se le puede aplicar una función matemática de Boltzman para obtener los parámetros de conductancia máxima (a), Voltaje al cual se obtiene el 50% del valor de la conductancia (V<sub>h</sub>) y la pendiente de la curva (K).

$$y = \frac{a}{1 + \exp\left(\frac{-V + V_h}{K}\right)}$$

## 6. RESULTADOS

### 6.1. ÍNDICE DE HIPERTROFIA

En los corazones tratados con el isoproterenol se observa un mayor índice de hipertrofia (cociente del peso en mg de los ventrículos entre el peso del animal en g) en relación con los corazones control, por lo que el tratamiento con este fármaco induce hipertrofia cardiaca (véase tabla 1).

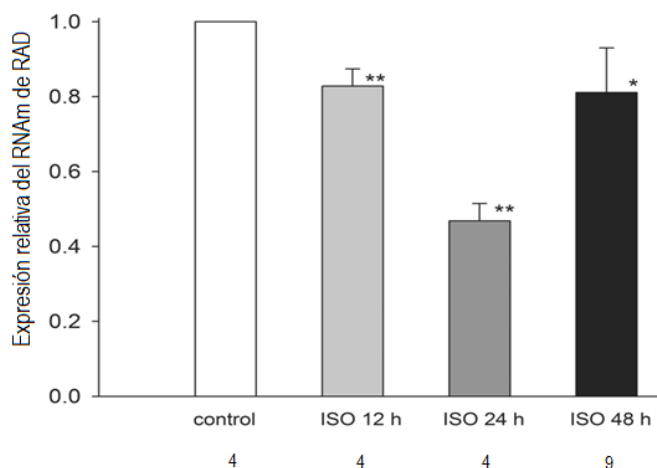
**Tabla 1. Resultados del índice de hipertrofia**

Grupo experimental	Índice de hipertrofia (mg/g)
Control (n=8)	3.2±0.15
Iso 12 h (n=9)	3.8±0.20*
Iso 24 h (n=12)	4.2±0.21*
Iso 48 h (n=12)	4.9±0.18*

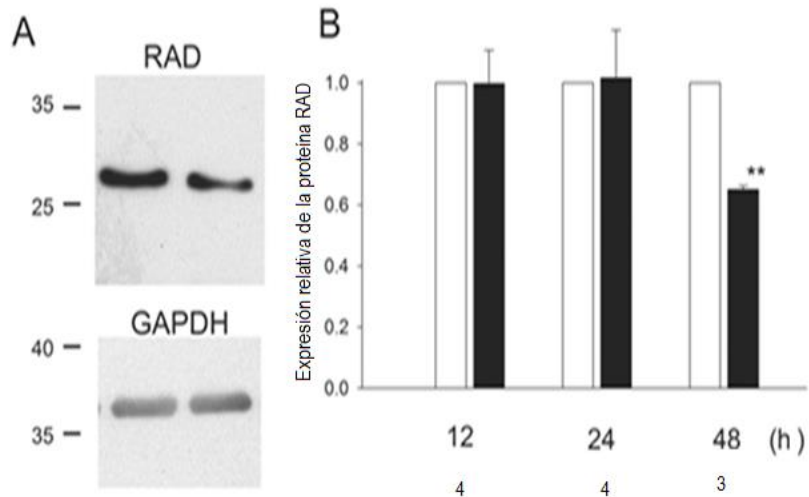
Los resultados se muestran como el promedio de los datos +/- el error estándar \* $p < 0.05$

## 6.2. EXPRESIÓN DE LA GTPasa RAD

Se observó una disminución en la expresión relativa del RNAm de RAD con respecto al control del 15%, 50% y 20% para las 12, 24 y 48 h de exposición al isoproterenol respectivamente (fig. 19). En los experimentos de Western Blot se observa una disminución del 40% de la expresión relativa de la proteína a las 48 h de exposición al isoproterenol, y sin cambio aparente a las 12 y 24 h (fig. 20).



**Figura 19. Expresión relativa de mRNA de Rad.** Se observa un disminución significativa desde las 12 a las 48 h con respecto al control. Los resultados se muestran como el promedio de los datos +/- el error estándar \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . El número de animales por grupo se muestra en la parte inferior de la gráfica.

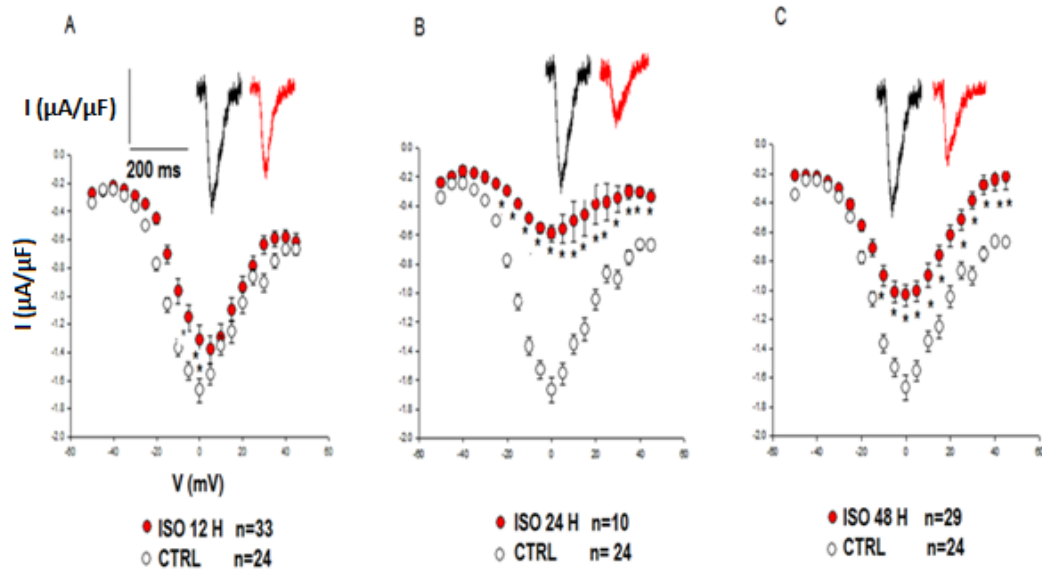


**Figura 20. Expresión relativa de Rad.** A) Blots representativos del grupo de 48 h. B). Se observa una disminución significativa a las 48 h sin cambios significativos a las 12 y 24 h. Los resultados se muestran como el promedio de los datos +/- el error estándar  $**p < 0.01$ . El número de animales por grupo se muestra en la parte inferior de la gráfica.

## 6.3. ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS

### 6.3.1. CORRIENTES DE CALCIO

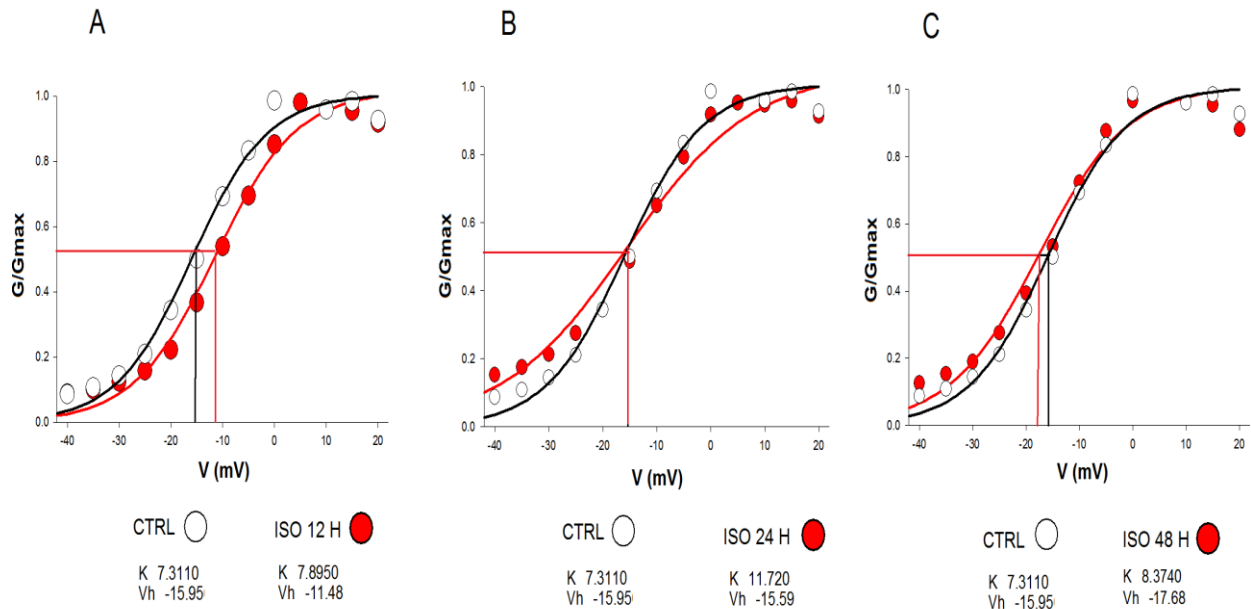
En las curvas de corriente vs voltaje se observó una disminución de la corriente del Cav1.2 durante la exposición al isoproterenol desde las 12 h hasta las 48 h, observándose a las 12 h un valor de corriente máxima de  $-1.4 \mu\text{A}/\mu\text{F}$ , a las 24 horas un valor de corriente máxima de  $-0.58 \mu\text{A}/\mu\text{F}$  y a las 48 h un valor de corriente máxima de  $-1.1 \mu\text{A}/\mu\text{F}$  con respecto al control que presentó un valor de corriente máxima de  $-1.72 \mu\text{A}/\mu\text{F}$ . Los valores de corriente fueron normalizados por el área de los cardiomicitos medida como la capacitancia de la membrana (en pF).



**Figura 21. Registros representativos y Curva I/V de corrientes de Calcio en condiciones testigo y durante la hipertrofia.** A) Curva I/V del grupo de 12 h. B) Curva I/V del grupo de 24 h. C) Curva I/V del grupo de 48 h. en cada gráfica se muestra un inserto de un trazo representativo de la corriente de calcio al valor de 0 de V. Los resultados se muestran como el promedio de los datos +/- el error estándar \* $p < 0.05$ .

### 6.3.2. CONDUCTANCIA

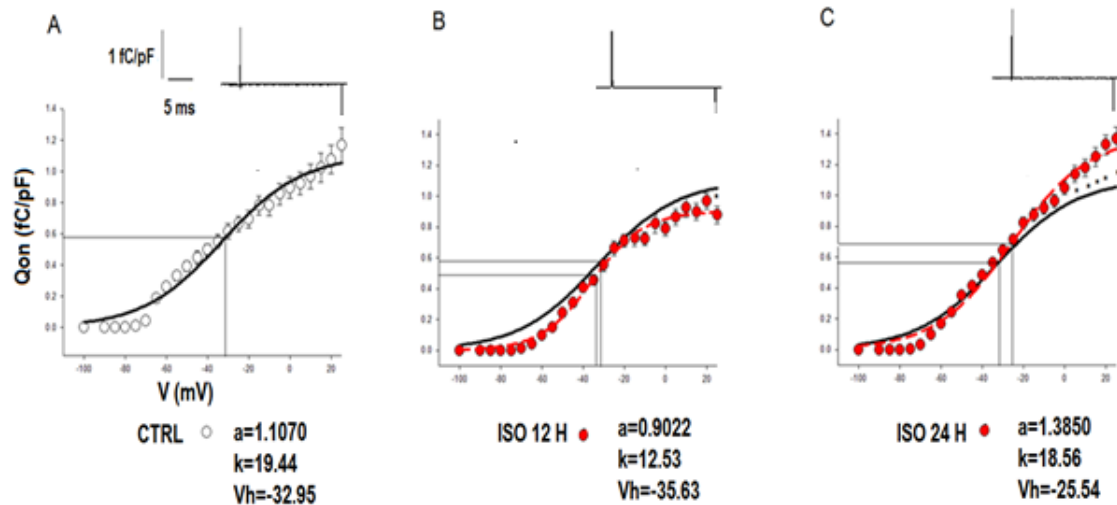
En todos los grupos hay una disminución en el voltaje correspondiente al 50% del valor de conductancia máxima ( $V_h$ ), observándose a las 12 h un  $V_h$  de -11.48 mV, para el grupo de 24 h se observó un valor de  $V_h$  de -15.59 mV y para el grupo de 48 h un  $V_h$  de -17.68 mV, con respecto al grupo control que presentó un valor de  $V_h$  de -15.95 mV



**Figura 22. Curva G/V de corrientes de Calcio a las 12, 24 y 48 h de hipertrofia.** A) Curva de conductancia del grupo de 48 h. B) Curva de conductancia del grupo de 24 h. C) Curva de conductancia del grupo de 12 h. En todos los casos se indica una interpolación que corresponde al Vh.

### 6.3.3. CORRIENTES DE GATING

La carga movilizada, relacionada con la apertura del canal (*gating*) en el grupo de 12 h presentó un valor de carga máxima de 0.9022 fC/pF, y de 1.3850 fC/pF en el grupo de 24 h, con respecto al grupo control que presentó un valor de carga máxima de 1.1070 fC/pF y fue indetectable en el de 48 h.



**Figura 23. Registros representativos y Curva Qon/V de las corrientes de gating en condiciones testigo y durante la hipertrofia** A) Curva Qon/V de gating del grupo control aplicada a una función matemática. B) Curva Qon/V del grupo de 12 h comparada con la función del grupo control. C) Curva Qon/V del grupo de 24 h comparada con la función del grupo control. En todas las gráficas se muestra un inserto de un trazo representativo de la corriente de gating a 20 mV. Los resultados se muestran como el promedio de los datos +/- el error estándar  $p < 0.05$ .

**Tabla 2. Resultados de los registros electrofisiológicos**

	Control	Iso 12 h	Iso 24 h	Iso 48 h
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Máxima (μA/μF)	-1.72±0.021	-1.4±0.061*	-0.58±0.033*	1.1±0.043*
Vh (mV)	-15.95±0.08	-11.48±0.09*	-15.59±0.12	-17.68±0.14*
Qon (fC/pF)	1.1070±0.022	0.9022±0.013	1.3850±0.051*	+

+Indetectable.

Los resultados se muestran como el promedio de los datos +/- el error estándar  $p < 0.05$  con respecto al grupo control.

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Existe una gran cantidad de modelos para inducir la hipertrofia cardiaca tanto de tipo quirúrgicos como farmacológicos, dentro de los primeros se encuentra la oclusión de la arteria coronaria anterior descendente y el modelo de sobrecarga de presión a través de la ligadura parcial de la aorta. Dentro de los modelos farmacológicos tenemos la inducción de hipertrofia cardiaca por la fenilefrina, la Angiotensina II y por el isoproterenol. Si bien tanto los modelos farmacológicos como quirúrgicos inducen a la hipertrofia cardiaca, en los quirúrgicos se requiere de una mayor experiencia y entrenamiento para realizar la cirugía, mientras que los farmacológicos se requiere tomar en cuenta parámetros farmacocinéticos. Clásicamente la evaluación de la hipertrofia se confirmaba con el uso de biomarcadores como el péptido natriurético, troponina, mioglobina, entre otros, actualmente con el desarrollo de las técnicas de biología molecular es posible la evaluación de RNAm y miR's. En el 2012 Ucar y col<sup>31</sup> describieron que la expresión del miR 132 es indispensable y suficiente para el desarrollo de la hipertrofia cardiaca. En el 2015 nuestro grupo de investigación caracterizó la expresión del miR 132 en la hipertrofia cardiaca con el isoproterenol (ISO) encontrando un aumento significativo en su expresión desde las 6 hasta las 12 horas de exposición al ISO<sup>2</sup>, este biomarcador es utilizado como control interno de nuestro laboratorio para confirmar la hipertrofia cardiaca por el modelo de isoproterenol. Un valor muy importante que se correlaciona con la hipertrofia cardiaca es el índice de hipertrofia, que se entiende como el cociente del peso de los ventrículos (mg) entre el peso de corporal (g), en la tabla 1, se puede ver que en los grupos tratados con el ISO se encontró un aumento significativo en el índice de hipertrofia en comparación con el grupo control, lo que confirma el desarrollo de la hipertrofia cardiaca a las 12, 24 y 48 h de exposición al ISO.

Como ya se ha mencionado las GTPasas pequeñas juegan un papel importante en la inhibición del canal de calcio tipo L, por lo que caracterizar su patrón de expresión puede ayudar a comprender los mecanismos electrofisiológicos implicados en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca, en este trabajo se caracterizó la expresión a nivel de proteína y de RNAm de la GTPasa RAD en el modelo de hipertrofia por el ISO, encontrándose una disminución a nivel de mensajero a las 12, 24 y 48 h de exposición al ISO (véase figura 17)



y a nivel de proteína una disminución únicamente a las 48 h de exposición al ISO. Estos resultados son similares a los observados por Chang et al en el 2014 que caracterizó la expresión de RAD en la hipertrofia cardiaca inducida por fenilefrina (*in vitro*) y por el modelo de obstrucción aortica (*in vivo*) quien encontró una disminución en el patrón de expresión de RAD a nivel de proteína desde las 24 h hasta los 14 días de obstrucción aortica y desde las 4 hasta las 24 h de exposición a la fenilefrina. Los patrones de expresión pueden variar dependiendo del modelo que se emplee. Nuestros resultados son los primeros en caracterizar la expresión de RAD en el modelo de hipertrofia cardiaca con el ISO.

Al ser RAD un inhibidor de la corriente del canal de calcio se esperaría que cuando su expresión se encuentra disminuida, la corriente de calcio aumentará en amplitud, sin embargo observamos que lejos de aumentar disminuye en todos los casos de exposición al ISO (véase tabla 2), esto se puede deber a cambios en la eficiencia de las GTPasas, que depende de la relación entre los estados activos e inactivos de la enzima, mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{GTPasa} * \text{GTP}}{\text{GTPasa} * \text{GDP}} = \frac{k_{\text{diss.GDP}}}{k_{\text{cat.GTP}}}$$

en el que  $k_{\text{diss.GDP}}$  es la constante de disociación para el GDP y  $k_{\text{cat.GTP}}$  la constante de hidrólisis del GTP para una GTPasa específica. Ambas constantes pueden ser reguladas por proteínas reguladoras individuales. La cantidad de GTPasa activa puede ser modulada por la aceleración en la disociación del GDP por las GEF's que aumenta la cantidad de GTPasa activa, la inhibición de la disociación de GDP por inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDI) lo cual reduce la acumulación de GTPasa activa y la aceleración en la hidrólisis de GTP por las GAP que reduce la cantidad de GTPasa activa. Por lo que sería interesante estudiar la actividad de RAD en las condiciones experimentales.

Se sabe bien que la corriente de un canal depende del número de canales expresados, de la expresión funcional de un canal y de la probabilidad de apertura del mismo. En nuestro laboratorio anteriormente se comprobó que la expresión del canal de calcio disminuye desde las 12 hasta las 48 h de exposición al ISO<sup>2</sup>, esto podría explicar la caída en

la corriente de calcio, sin embargo en el presente trabajo se exploró a demás la carga movilidad relacionada con la apertura del canal (*gating*), la medición de ésta corriente es un parámetro de la expresión funcional de un canal, nosotros encontramos que la *gating* no presenta cambios en el grupo de 12, pero aumenta en el grupo de 24 h lo cual se puede deber a mecanismos compensatorios que se activan durante la hipertrofia cardiaca.

## **8. CONCLUSIONES**

En nuestro modelo de hipertrofia se presenta una disminución en los niveles de mRNA de Rad desde las 12 horas de exposición al isoproterenol y también en los niveles de RAD como proteína a las 48 h. Dado el papel inhibitorio de Rad sobre el canal de calcio Cav1.2, se esperaría un incremento en la actividad del canal, como en efecto se observó en la carga movilizada, relacionada con la apertura del canal (*gating*). Sin embargo, las corrientes iónicas a través del canal lejos de aumentar, disminuyeron, lo cual indica que durante la hipertrofia existe un mecanismo compensatorio que sobrepasa los efectos de la disminución de RAD.

## **9. PERSPECTIVAS**

Caracterizar las corrientes unitarias del canal de calcio tipo L y la probabilidad de apertura del mismo en la hipertrofia cardiaca a las 12, 24 y 48 h de exposición al isoproterenol.

Medir la actividad de RAD en la hipertrofia cardiaca para correlacionar la disminución en su expresión con la inhibición del canal de calcio.

## 10. REFERENCIAS

1. Madamanchi, A.  $\beta$ -Adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *McGill Journal of Medicine*. 2007 : MJM, 10(2), 99–104.
2. Carrillo E, D, Sampieri R, Hernández A, García M, C, Sánchez J, A, MiR-132 Regulates Rem Expression in Cardiomyocytes During Long-Term  $\beta$ -Adrenoceptor Agonism. *Cell Physiol Biochem* 2015;36:141-154. |
3. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>
4. Cohn J, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol*.2000;35(3):569-582.
5. Scheuer J, Malhotra A, Hirsch C, Capasso J, Schaible T, F. Physiologic cardiac hypertrophy corrects contractile protein abnormalities associated with pathologic hypertrophy in rats. *J Clin Invest*. 1982;70:1300–1305.
6. Beisvag V, Kemi O, J, Arbo I, Loennechen J, P, Wisloff U, Langaas M, Sandvik A, K, Ellingsen O. Pathological and physiological hypertrophies are regulated by distinct gene programs. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2009;16:690–697.
7. Tetsuo S, Kang P,M, Douglas P, S, Hampe J, Yballe C, M, Lawitts J, Cantley L, C, Izumo, S. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice *The EMBO Journal*. 2000;19:2537-2548.
8. Wende J, K, Sena A, R, Theobald H, A, Soto J, Sloan C, Abel E, D. (2008). Insulin-like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy. *Molecular endocrinology*, 22(11), 2531-2543.
9. Bueno O, F, De Windt L, J, Tymitz K, M, Witt S, A, Kimball T, R, Klevitsky R, Hewett T, E, Jones S, P, , Lefer D, J, Chang-FuPeng, Kitsis R,N, Molkenin J, D. The MEK1–ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *The EMBO Journal* (2000) 19, 6341-6350.
10. Nicol R, L, Frey N, Pearson G, Cobb M, Richardson J, Olson E, N. MEK5 activado induce el montaje en serie de sarcómeros y la hipertrofia cardiaca excéntrica. *The EMBO Journal* (2001) 20, 2757-2767.
11. Molkenin J, D, Lu J, Antos C, L, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant S, R, Olson E, N. A Calcineurin-Dependent Transcriptional Pathway for Cardiac Hypertrophy. *Cell*. 1998;93(2):215-28.
12. Backs J, Backs T, Neef S, Kreusser M, M, Lehmann L, H, Patrick D, M, Grueter C, E, Qi X, James A. Richardson, Hill J, A, Katus H, A, Maier L,S, Olson E, N. The  $\delta$  isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *PNAS*.2008. 2342–2347.

13. Zhang T, Maier L, S, Dalton N, D, Miyamoto S, Ross J, Bers D, M, Brown J. The  $\delta_C$  Isoform of CaMKII Is Activated in Cardiac Hypertrophy and Induces Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure. *Circulation Research*. 2003;92:912-919.
14. Ling H, Zhang T, Pereira L, Means C, K, Cheng H, Gu Y, Dalton N, D, Peterson K, L, Chen J, Brown J, H. Integrins as mechanochemical transducers. *Cell Biol*. 1991;(5):841-8.
15. Von Harsdorf R, Lang R, E, Fullerton M, Woodcock E, A. Myocardial stretch stimulates phosphatidylinositol turnover. *Circ Res* 1989; 65: 494-501.
16. Sadoshima J, Izumo S. Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *EMBO J* 1993; 12: 1681-1692.
17. Heineke J, Molkenin. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signaling pathways, *JD. Nature reviews molecular cell biology*; 2006; 7; 8; 589-600.
18. Catterall W, A. Functional Subunit Structure of Voltage-Calcium channels. *Science* 1991; 253,1499-1500.
19. McCleskey E, W. Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr. Opin. New obiol*. 1994; 4, 304-312.
20. Bean B, P. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. *J. Gen. Physiol* 1985; 86, 1-30.
21. Lee K, S, Marban E, Tsien R, W. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J. Physiol*. 1985; 364, 395-411.
22. Fleckenstein-Grün G, Fleckenstein G, M. Calcium antagonist: mechanisms and therapeutic uses. *Trends Pharmacol. Sci*. 1984; 283-286.
23. Curtis B, M, Catterall W, A. Purification of the Calcium Antagonist Receptor of the Voltage-Sensitive Calcium Channel from Skeletal Muscle Transverse Tubules. *Biochemistry* 1984; 23(10), 2113-2117.
24. Tanabe T, Takeshima I, L, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Koema M, Matsuo H, Hirose T, Numa S. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 1987; 328, 313-318.
25. Ilona Bodi, Gabor Mikala, Sheryl E. Koch, Shahab A. Akhter, and Arnold Schwartz J. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on *Clin Invest*. 2005; 115(12): 3306–3317.
26. Yang T, Colecraft H, M. Regulation of voltage-dependent calcium channels by RGK proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1828(7):1644-1654.

27. Finlin B, S, Crump S, M, Satin J, Andres D, A. (). Regulation of voltage-gated calcium channel activity by the Rem and Rad GTPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*;2003;100(24),14469–14474.
28. Correll R, N, Pang C, Niedowicz D, M, Finlin B, S, Andres D, A. The RGK family of GTP-binding proteins: Regulators of voltage-dependent calcium channels and cytoskeleton remodeling. *Cellular Signalling*;2008;292–300.
29. Lezoualc'h F, Metrich M, Hmitou I, Duquesnes N, Morel E. Small GTP-binding proteins and their regulators in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44 (4): 623-32.
30. Kenneth J, Schmittgen T, D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2<sup>-2DDCT</sup> Method. College of Pharmacy, Washington State University, Pullman, Washington 99164-6534.
31. Ucar A, Gupta S, K, Fiedler J, Erikci E, Kardasinski M, Batkai S, Thum T). The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. *Nature Communications*;2012;3:1078.
32. Chang L, Zhang J, Tseng Y, Xie C, Ilany J, Brüning J, Chen Y, E. (). Rad GTPase Deficiency Leads to Cardiac Hypertrophy. *Circulation*, 116; 2007 (25), 2976–2983.