



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL IPN

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Acople excitación-contracción, NCX, NOS y ROS en  
miocitos cardiacos crónicamente expuestos a aldosterona

Tesis que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

Presenta:

M. en C. María Guadalupe Montiel Jaen

Director de tesis:

Dr. Guillermo Ávila Flores

Ciudad de México

Septiembre 2021

*A mis padres,  
por enseñarme a perseverar  
y jamás renunciar*

## Agradecimientos

Espero que estas breves palabras sirvan para expresar mi profundo agradecimiento:

A mi tutor, el Dr. Guillermo Ávila Flores, por abrirme las puertas de su laboratorio donde he aprendido tanto, por permitirme ser parte de su equipo, por ser un pilar y un ejemplo para mí a nivel profesional y personal, gracias por permitirme tener el privilegio y la felicidad de dedicar estos años al estudio de los canales; su guía me ha permitido darme cuenta que gustaría dedicar a ello el resto de mi vida. Gracias Doctor por su confianza y apoyo en los momentos más complicados durante el desarrollo de este proyecto y también por todos los momentos gratos que como equipo de laboratorio pudimos compartir y por siempre motivarme a seguir adelante y aprender más, si he llegado a éste punto es indiscutiblemente gracias a usted.

A mis asesores: Dr. Agustín Guerrero, por sus valiosas aportaciones a mi trabajo de tesis tanto de maestría como de doctorado y por guiarme también en «el camino del Calcio»; al Dr. Alberto Olivares porque las puertas de su laboratorio siempre estuvieron abiertas y siempre encontré apoyo y conocimientos con usted y su equipo; al Dr. Ricardo Mondragón porque desde el principio en mi camino del posgrado me hizo sentir bienvenida y siempre tuvo tiempo para apoyarme como coordinador, como profesor y finalmente como mi asesor; al Dr. Ramón Alvarado por sus valiosas aportaciones durante el desarrollo de mi trabajo de tesis, por su tiempo y su disposición a apoyarme en todo momento, aún cuando el viaje desde la UNAM es largo.

A la Dra. Teresa Mancilla Percino, por su invaluable apoyo y confianza, por el tiempo, conocimientos y consejos que compartió conmigo, gracias por la oportunidad y el honor de trabajar con usted.

Al Dr. Julián Torres Jácome, quién me hizo ver las maravillas que nos aguarda el explorar la fisiología cardiovascular, por todo lo que ha brindado a mi vida académica y personal y por quien tengo y tendré siempre un profundo respeto y cariño.

A mis compañeros de laboratorio: Maricela García Castañeda y Erick Ríos Pérez, porque aún después de tantos años y mediando tantos kilómetros de distancia entre nosotros siempre he podido contar con su apoyo y amistad; a Adrián Monsalvo Villegas y Juan de la Rosa Vázquez por todos los momentos y conocimientos que hemos compartido; a nuestros técnicos Marcelino Flores y Salvador Carrasco por el apoyo diario en las labores rudas del hacer ciencia.

A mis padres, Teodoro y Julia; por todo su apoyo durante estos años para continuar en el camino que elegí, por llevarme por el camino de la perseverancia para alcanzar aquellas metas que me impuse en la vida. A mi hermanita Esmeralda y a mi sobrino Dylan por animarme siempre, por acompañarme, abrazarme y quererme siempre.

A mi familia: el amor de mi vida, mi esposo Enrique Morales Hernández por acompañarme en esta etapa y enseñarme a ser valiente, darme fuerza, acompañarme en los desvelos, impulsar mis sueños, escucharme en mis problemas y dificultades y cada vez ayudarme a encontrar soluciones. Gracias por tu confianza, amor y paciencia.

A mi nueva familia: mis suegros Enrique y Leti, mi cuñada Sofía y tía Elo por escucharme y apoyarme, por los buenos y divertidos momentos que hemos compartido, por enseñarme cosas nuevas, apapacharme y permitirme sentir el abrazo y el calor familiar, gracias por escuchar con interés y paciencia todo acerca de este proyecto. Con ustedes las dificultades se han convertido en posibilidades y las alegrías en regocijos.

A mis compañeras de generación y amigas muy queridas: Melissa Morales Tovar, Karina Parra Mercado y Rosalba Cruz Mirón; por su apoyo, compañía, amistad y afecto, así como por los conocimientos que han compartido conmigo durante estos años. No pude encontrar mejores compañeras para vivir, sobrevivir, disfrutar y (a veces) sufrir la incomparable aventura de la maestría y el doctorado.

A mis grades y queridos amigos: Gerardo Osorio, Belén Velázquez, Ana Laura Marín, Dulce María Muñoz, Víctor Hernández, Ana Laura López, Alondra Albarado, Rosa Elena Arroyo y Armando Reyna; por apoyarme y acompañarme por casi dos décadas en las que nuestras vidas han tomado cursos diversos pero ello nunca ha significado alejarnos, gracias por ser mis compañeros de vida, de aventuras y de café.

A los profesores del Departamento de Bioquímica que son parte vital de mi formación académica y al personal administrativo y de servicios del Departamento de Bioquímica que nos apoyan, incluso antes de nuestro ingreso al departamento y constantemente en el día a día de forma muy diversa, especialmente a Pris, Angie, Leti y Oscar que siempre con la mejor disposición nos apoyan, no solamente con todos los trámites y en la logística de los seminarios, clases, exámenes e infinitas actividades académico administrativas; sino también en los pequeños, pero gratos momentos en los que nos escuchan, nos alientan y salvan nuestros experimentos al lograr que los reactivos y materiales lleguen pronto al laboratorio.

De quien tanto les debe, Guadalupe Montiel Jaen

***Un agradecimiento especial:***

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado para realizar éste trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) por generar espacios que permiten desarrollar proyectos de investigación esenciales para el desarrollo científico y tecnológico de nuestro país.

A los profesores-investigadores del Departamento de Bioquímica de este instituto, que con sus conocimientos, experiencia e indudable compromiso con el quehacer científico, hoy son parte de mi formación académica.

## Índice

1	Introducción	3
1.1	Sistema Renina- Angiotensina- Aldosterona (RAAS)	3
1.2	El receptor a mineralocorticoides (MR) y enfermedad cardiovascular	4
1.3	Aldosterona y fibrilación auricular (FA)	6
1.4	Estrés oxidativo y aldehído deshidrogenasas (ALDHs)	8
1.5	Efectos del estrés oxidativo en proteínas relacionadas con el manejo de calcio intracelular (RyR, SERCA, CaMKII)	14
2	Antecedentes	17
2.1	Acople excitación-contracción (ECC) y homeostasis de calcio ( $Ca^{2+}$ ) en cardiomiocitos	17
2.2	Aldosterona provoca cambios electrofisiológicos en miocitos auriculares	22
2.3	Aldosterona induce estrés oxidativo en cardiomiocitos	27
3	Justificación	32
4	Hipótesis	33
5	Objetivos	33
5.1	Objetivo General	33
5.2	Objetivos particulares	34
6	Materiales y métodos	35
6.1	Cultivo primario de cardiomiocitos auriculares de rata adulta	35
6.2	Modelo celular	37
6.3	Registro simultáneo de corriente de $Ca^{2+}$ tipo L ( $I_{Ca}$ ) y transitorios de $Ca^{2+}$	38

6.4	Análisis de proteínas por Western-Blot.	40
6.5	Medición de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO)	41
6.6	Medición del diámetro celular	42
6.7	Registro de transitorios de $\text{Ca}^{2+}$ en células intactas	42
7	Resultados	44
7.1	Aldosterona aumenta la $C_m$ y el diámetro celular	44
7.2	Aldosterona estimula la liberación de $\text{Ca}^{2+}$ del retículo sarcoplásmico sin afectar a $I_{\text{Ca}45}$	
7.3	Ganancia del acople Excitación-Constracción (ECC)	46
7.4	Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la producción y eliminación de ROS	48
7.5	Niveles de expresión de las sintasas de óxido nítrico (eNOS y nNOS)	49
7.6	Efecto de aldosterona en los niveles de expresión del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)	50
7.7	Comportamiento de los niveles de ROS en células control y tratadas con aldosterona en función del tiempo en cultivo.	51
7.8	El efecto en la producción de ROS es dependiente de la concentración de aldosterona	53
7.9	La tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ) previene los efectos de aldosterona en NO y ROS	54
7.10	ALDH2 interfiere en los efectos de aldosterona, a nivel de hipertrofia y producción de ROS y NO.	55
7.11	Los moduladores de ALDH no interfieren con la regulación de la homeostasis de $\text{Ca}^{2+}$ por aldosterona	58

8	Discusión	63
9	Conclusiones	71
10	Perspectivas	73
11	Bibliografía	74



## Abreviaturas

<b>4-HNE</b>	4- hidroxil-2-nonenal
<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotrópica
<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ADP</b>	Difosfato de adenosina
<b>ALDH</b>	Aldehído deshidrogenasa
<b>AngI</b>	Angiotensina I
<b>AngII</b>	Angiotensina II
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BH2</b>	Dihidrobiopterina
<b>BH4</b>	Tetrahidrobiopterina
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>CaMKII</b>	Cinasa de Ca <sup>2+</sup> -Calmodulina tipo II
<b>CICR</b>	Liberación de Ca <sup>2+</sup> inducida por Ca <sup>2+</sup>
<b>Cm</b>	Capacitancia membranar
<b>DBD</b>	Dominio de unión a ADN (DNA binding domain)
<b>ECA</b>	Enzima convertidora de angiotensina
<b>ECC</b>	Acople excitación-contracción
<b>eNOS</b>	Sintasa de óxido nítrico tipo endotelial
<b>FA</b>	Fibrilación auricular
<b>FAD</b>	Dinucleótido de flavina y adenina
<b>FMN</b>	Mononucleotido de flavina
<b>G-Px</b>	Glutatión peroxidasa
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogeno
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración que produce el 50 % de inhibición
<b>I<sub>CRAC</sub></b>	Corriente de calcio activada por la liberación de calcio (Calcium release activated calcium current)
<b>iNOS</b>	Sintasa de óxido nítrico tipo inducible
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol 1,4,5-trifosfato
<b>K<sup>+</sup></b>	Potasio
<b>LBD</b>	Dominio de unión a ligando (ligand binding domain)

<b>MR</b>	Receptor a mineralocorticoides
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodio
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
<b>NADP</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NCX</b>	Intercambiador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
<b>nNOS</b>	Sintasa de óxido nítrico tipo neuronal
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Sintasa de óxido nítrico
<b>NOX</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa)
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>OH<sup>-</sup></b>	Radicales hidroxilos
<b>PA</b>	Potencial de acción
<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>PLN</b>	Fosfolamban
<b>PMCA</b>	Bomba de calcio de la membrana plasmática
<b>RAAS</b>	Sistema Renina- Angiotensina-Aldosterona
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>Ren</b>	Renina
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RS</b>	Retículo sarcoplásmico
<b>RyR</b>	Receptor a rianodina tipo 2
<b>SERCA</b>	ATPasa de calcio del retículo
<b>SOCE</b>	Entrada de calcio operada por depósitos intracelulares (Store operated calcium entry)
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TM</b>	Transmembrana
<b>XO</b>	Xantina oxidasa
<b>XOR</b>	Xantina oxidoreductasa

La aldosterona es una hormona esteroidea cuyos efectos son mediados por su interacción con el receptor a mineralocorticoides (MR). El papel de aldosterona en la fisiología cardiovascular no se ha dilucidado completamente. Diversos reportes en la literatura señalan la existencia de una relación entre los niveles elevados de aldosterona (aldosteronismo) y patologías como hipertrofia, arritmia, diabetes, insuficiencia cardiaca, fibrosis cardiaca y fibrilación auricular, por mencionar algunos ejemplos.

Se tiene evidencia de que, en cardiomiocitos auriculares adultos de rata, el tratamiento crónico con aldosterona promueve entre otros efectos una menor tasa de síntesis de óxido nítrico (NO), mayor actividad de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}_v1.2$ , principalmente) y un aumento en la capacitancia membranal ( $\text{C}_m$ ) lo cual sugiere el desarrollo de hipertrofia. El mecanismo por el cual se producen dichos efectos aún no es claro. Sin embargo, se piensa que los principales intermediarios moleculares relacionados con esos efectos podrían ser el ion  $\text{Ca}^{2+}$  y las especies reactivas de oxígeno (ROS). Por lo que decidimos investigar los posibles efectos del tratamiento con aldosterona en el tamaño celular, homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , producción de ROS y óxido nítrico (NO), así como una posible participación de la enzima aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2, que contribuye a la eliminación de aldehídos reactivos) en los efectos de aldosterona. Para ello se utilizó como modelo experimental el cultivo primario de cardiomiocitos auriculares de rata adulta.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con aldosterona provoca un incremento en el tamaño celular ( $\text{C}_m$  y diámetro celular); no provoca cambios en los niveles de expresión de enzimas relacionadas con la producción de ROS (NADPH oxidasas 2 y 4) y NO (eNOS y nNOS), ni ALDH2. Adicionalmente se investigó un posible cambio en los niveles de expresión del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), y se observó que aldosterona provoca un incremento del 100 % sin que se observaran cambios en la actividad del intercambiador. Respecto a la producción de ROS y NO, se observó que aldosterona estimula e inhibe respectivamente su producción. El efecto en la producción de ROS fue evidente a partir de las 24 horas, alcanzó un máximo los días 4-6 de cultivo y fue dependiente de la concentración con una  $\text{EC}_{50}$  de 1.2 nM. El efecto de aldosterona en los niveles de NO y ROS fue abatido por la administración de un cofactor de NOS, tetrahidrobiopterina (BH4), lo cual sugiere que existe una vía de retroalimentación entre los niveles de NO y ROS.

Al investigar los efectos en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  se observó que aldosterona provoca un incremento en la magnitud de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  y un incremento en el porcentaje de células que presentan eventos de liberación espontánea de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Para investigar la posible participación de ALDH2 se utilizó un activador (Alda-1) y un inhibidor (Daidzina) de esta enzima y se observó que el tratamiento con estos fármacos previene y mimetiza respectivamente los efectos de aldosterona en la producción de NO y ROS así como en el tamaño celular. Algo diferente ocurre con respecto a la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  ya que Alda-1 y Daidzina no previnieron ni mimetizaron los cambios en la magnitud de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  ni en la incidencia de eventos de liberación espontánea de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual sugiere que las alteraciones en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  no dependen del incremento en la producción de ROS. Por el contrario, es muy probable que la mayor liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  sea la que promueva el incremento en ROS y estas últimas, a su vez, generen hipertrofia. Estos resultados y secciones importantes de la tesis se publicaron recientemente, como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctora en Ciencias (Montiel-Jaen *et al.*, 2021).

Aldosterone is a steroid hormone whose effects are mediated by its interaction with the mineralocorticoid receptor (MR). The role of aldosterone in cardiovascular physiology has not been fully elucidated. Numerous reports in the literature indicate the existence of a relationship between elevated aldosterone levels and pathologies such as hypertrophy, arrhythmia, diabetes, heart failure, cardiac fibrosis, and atrial fibrillation, to name some examples.

There is evidence that in rat adult atrial cardiomyocytes, chronic treatment with aldosterone promotes, among other effects, a lower rate of synthesis of nitric oxide (NO), higher activity of  $\text{Ca}^{2+}$  channels ( $\text{Ca}_v1.2$ , mainly) and an increase in membrane capacitance ( $C_m$ ) which suggests the development of hypertrophy. The mechanism by which these effects occur is not yet clear; however, it is possible that the main molecular intermediates related to these effects could be the  $\text{Ca}^{2+}$  ion and reactive oxygen species (ROS). Therefore, we decided to investigate the possible effects of chronic aldosterone treatment on cell size,  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, ROS, and nitric oxide (NO) production, as well as a possible participation of the enzyme aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2, which contributes to the elimination of reactive aldehydes) in the aldosterone effects. Our experimental model was the primary culture of adult rat atrial cardiomyocytes.

Our results show that chronic aldosterone treatment promotes an increase in cell size ( $C_m$  and cell diameter); It does not cause changes in the expression levels of enzymes related to the ROS (NADPH oxidases 2 and 4) and NO (eNOS and nNOS) production, nor ALDH2. A possible change in the expression levels of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX) was also investigated, and it was observed that aldosterone causes a 100 % increase without changing the exchanger's activity. Regarding the production of ROS and NO, it was observed that aldosterone stimulates and inhibits their production, respectively. The effect on ROS production was evident after 24 hours, reached a maximum on days 4-6 of culture, and was concentration-dependent (with an  $\text{EC}_{50}$  of 1.2 nM). The effects of aldosterone on NO and ROS levels were prevented by administrating a NOS cofactor (tetrahydrobiopterin, or BH4), which suggests the presence of a feedback pathway between NO and ROS levels.

When investigating the effects on  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, it was observed that aldosterone causes an increase in the amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  transients and an increase in the percentage of cells that present spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  release events.

To investigate whether ALDH2 participates in aldosterone effects, an activator (Alda-1) and an inhibitor (Daidzin) of this enzyme were used and it was observed that the treatment with these drugs prevented and mimicked, respectively, the effects of aldosterone in ROS and NO production, as well as on cell size. Something different happened with regard to  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis since Alda-1 and Daidzin did not prevent or mimic the changes in the magnitude of  $\text{Ca}^{2+}$  transients or the incidence of spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  release events. This suggests that the modifications in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis do not depend on the increase in ROS production. Instead, most likely the increase in SR  $\text{Ca}^{2+}$  release gives rise to enhanced ROS production, which in turn, generates hypertrophy. The results and important sections of this work were published recently in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy (Montiel-Jaen *et al.*, 2021).

# 1 Introducción

## 1.1 Sistema Renina- Angiotensina- Aldosterona (RAAS)

La aldosterona es una hormona esteroidea que forma parte del sistema Renina- Angiotensina- Aldosterona (RAAS, por sus siglas en inglés). Se sintetiza en la zona glomerulosa de la corteza adrenal y su función principal es regular la homeostasis del agua y electrolitos (sodio y potasio). La síntesis de aldosterona está regulada principalmente por Angiotensina II (AngII) y los niveles de potasio sérico.

La síntesis de AngII es activada, entre otros factores, por una disminución en la presión de perfusión detectada en los capilares glomerulares localizados en las nefronas, lo cual estimula la liberación de la proteasa denominada renina (Ren), producida en el complejo yuxtaglomerular del riñón. La Ren escinde el angiotensinógeno sérico (una alfa globulina sintetizada en el hígado, precursor de AngII) dando lugar a la angiotensina I (AngI), un decapeptido que al pasar por la circulación pulmonar y renal es escindido nuevamente (por efecto de la enzima convertidora de angiotensina, ECA) para obtener el octapeptido AngII. La Figura 1 muestra un esquema general de los órganos y moléculas que forman parte del RAAS (Williams, 2005).

La AngII tiene diversos efectos, que incluyen: vasoconstricción, producción de hormona adrenocorticotrópica (ACTH), incremento de la sensación de sed y secreción de aldosterona de la corteza adrenal. En las nefronas del riñón, particularmente en el túbulo colector y el túbulo contorneado distal de la nefrona, la aldosterona provoca varios efectos tales como un incremento en la eliminación de potasio (a través de una mayor actividad de la ATPasa de  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ) una activación del canal de  $\text{Na}^+$  epitelial sensible a amilorida, y una concomitante retención de  $\text{Na}^+$  (Wang, W. H. y Giebisch, 2009).

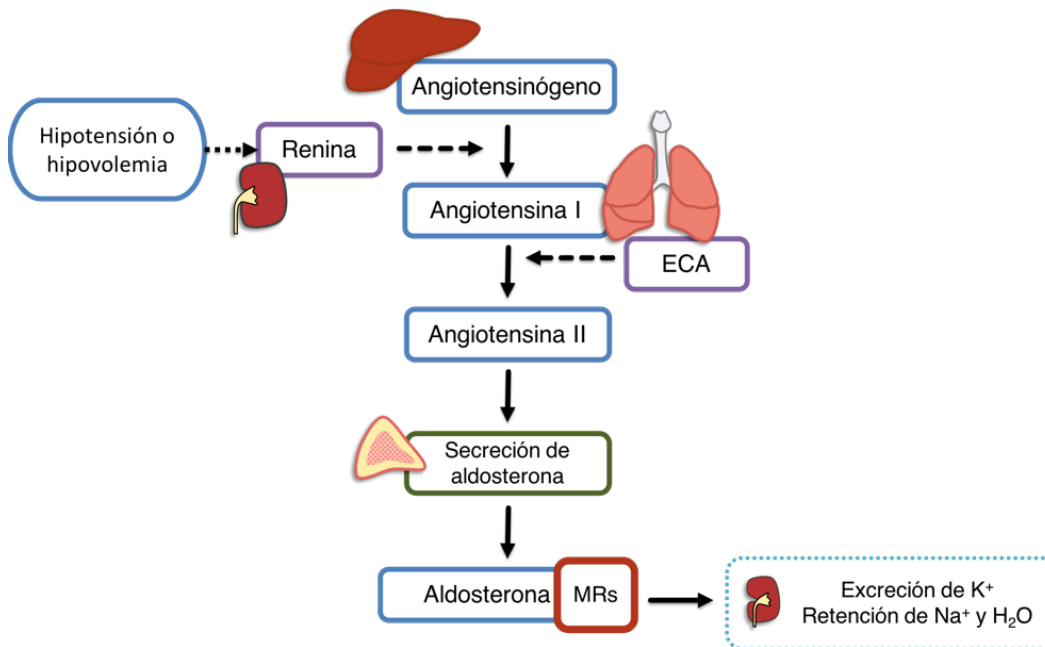


Figura 1. Esquema general de los órganos y moléculas que forman parte del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). Basada en Williams, 2005 y Fournier et al., 2012.

## 1.2 El receptor a mineralocorticoides (MR) y enfermedad cardiovascular

Los efectos de aldosterona están mediados por receptores a mineralocorticoides (MR), un grupo de receptores intracelulares que se localizan en el citosol y tras la unión de su ligando forman dímeros y se translocan al núcleo donde, junto con una serie de proteínas reguladoras asociadas, se unen a elementos de respuesta que regulan la transcripción de genes específicos (Rogerson *et al.*, 2004).

El MR presenta varios dominios, los cuales se ilustran en la Figura 2. El dominio amino terminal, que tiene dos regiones de activación de función, conocidas como AF1a y AF1b las cuales están relacionadas con la unión de co-reguladores. El dominio central, que constituye

el dominio de unión a ADN (DBD, DNA binding domain) y está unido al dominio carboxilo terminal por una pequeña región de bisagra. El dominio carboxilo terminal constituye el sitio de unión a ligando (LBD, ligand binding domain) y contiene una región de activación de función denominada AF2, que se regula por la unión del ligando. El dominio LBD también participa en la unión de co-reguladores y en interacciones con el dominio N-terminal. Esta última interacción es dependiente de aldosterona y se potencia con la activación de AF2, sugiriendo cooperatividad entre AF1 y AF2 (Huyet *et al.*, 2012)

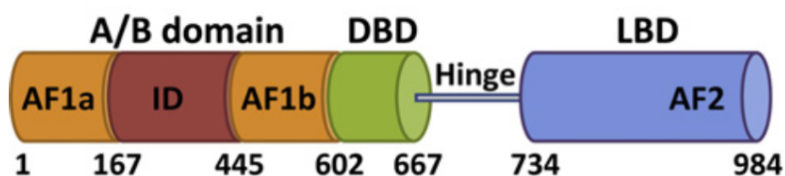


Figura 2. Esquema de los dominios funcionales del receptor a mineralocorticoides. En el esquema se muestran: la porción N-terminal contiene un dominio A/B (*A/B domain*), el cual tiene dos regiones de activación de función, AF1a y AF1b; el dominio de unión a ADN (DBD); el segmento de bisagra (Hinge) que une el N-terminal con el C-terminal y el extremo C-terminal que incluye un dominio de unión a ligando (LBD) y presenta una región de activación de función, AF2. Los números en la parte inferior corresponden al número de aminoácidos. Imagen modificada de Huyet *et al.*, 2012

El receptor a mineralocorticoides se expresa en una gran variedad de tejidos que incluyen el túbulo distal de las nefronas del riñón, el colon distal, glándulas salivales, tejido adiposo, sistema nervioso central, piel, placenta, células de músculo liso vascular y cardiomiocitos (Zennaro *et al.*, 1997). En los epitelios la activación del MR por aldosterona se ha relacionado principalmente con la regulación del transporte de Na<sup>+</sup> (Ebata *et al.*, 1999; Palmer, L. G., 1993; Palmer, Lawrence G. *et al.*, 1982; Winter *et al.*, 1999)

En condiciones fisiológicas la concentración de aldosterona en plasma es < 0.3 nM; sin embargo, en condiciones patológicas se han registrado concentraciones superiores a 1.4 nM. En el sistema cardiovascular, niveles elevados de esta hormona (aldosteronismo) se asocian

con el desarrollo de fibrosis, hipertrofia, arritmias ventriculares, y fibrilación auricular (FA; Aydin *et al.*; 2005; Milliez *et al.*; 2005; Reil *et al.*; 2012; Rossier *et al.*; 2010; Watson *et al.*; 2009).

### **1.3 Aldosterona y fibrilación auricular (FA)**

La fibrilación auricular (FA) es la arritmia cardiaca con mayor prevalencia entre la población. Se caracteriza por una frecuencia de despolarización auricular elevada que resulta en una contracción asincrónica y despolarización irregular de los ventrículos. Aunque la FA se puede presentar en ausencia de anomalías estructurales o electrofisiológicas conocidas, diversos estudios han establecido una serie de factores de riesgo, los cuales inducen remodelación estructural y eléctrica de la aurícula. Entre ellos destacan: obesidad, diabetes mellitus e hipertensión (revisado en Staerk *et al.*, 2017).

La FA es una patología grave que puede ocasionar complicaciones como formación de coágulos sanguíneos en el corazón, debido a las alteraciones en el flujo y en la contracción cardiaca. Los coágulos pueden circular a otros órganos bloqueando el flujo sanguíneo y provocando isquemia (trombosis y embolismo; Stoddard, 2000).

En 2009 Watson y colaboradores reportaron que los pacientes con aldosteronismo primario presentan una alta incidencia de FA (Watson *et al.*, 2009). De aquí se desprende una posibilidad muy interesante, que aldosterona sea capaz de inducir el desarrollo de FA. Existen varias evidencias experimentales a favor de esa posibilidad. Por ejemplo, Reil y colaboradores en 2012 compararon la susceptibilidad de desarrollar FA entre ratas control y aquellas expuestas a aldosterona durante 8 semanas. De manera interesante, encontraron que los animales expuestos a aldosterona fueron más susceptibles de desarrollar FA (Figura 3A).



Entre otros efectos, la hormona también provocó hipertensión, fibrosis cardiaca e hipertrofia de cardiomiocitos (Figura 3B-E; Reil *et al.*, 2012).

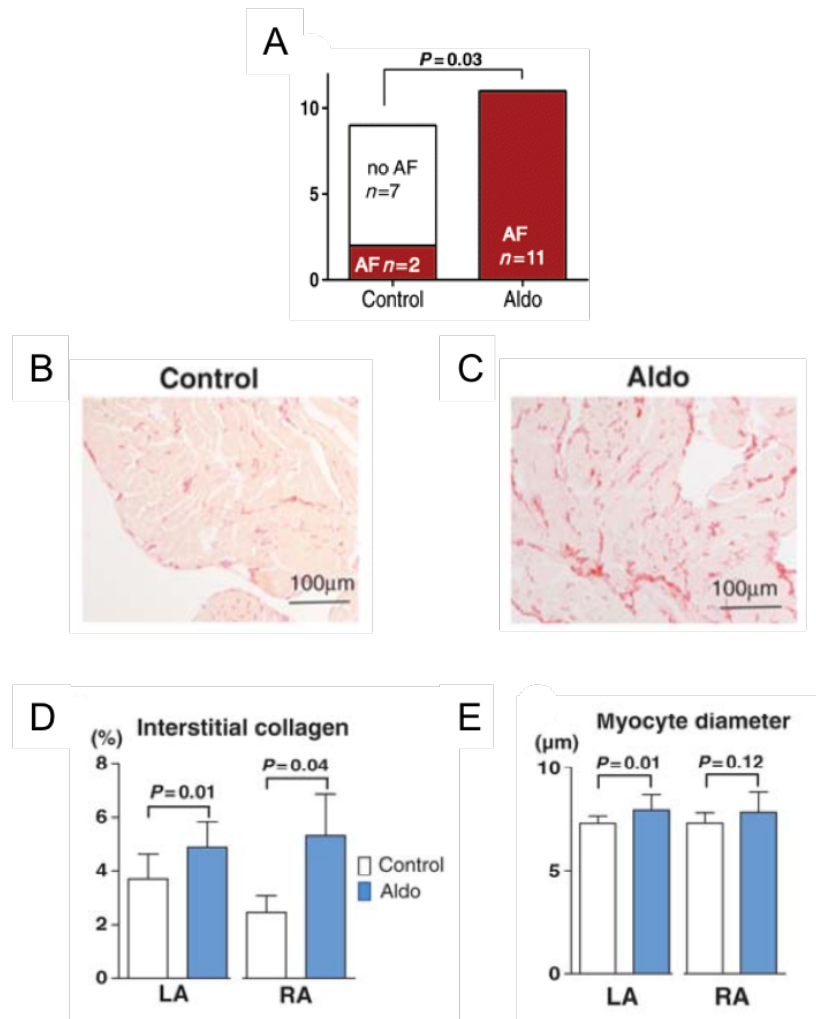


Figura 3. Diferencias a nivel de aurícula, entre ratas adultas mantenidas en condiciones testigo (Control) y aquellas tratadas durante 8 semanas con aldosterona (Aldo). A) Comparación de la susceptibilidad a desarrollar FA. B, C) Micrografía de secciones de aurícula derecha que fueron teñidas con rojo Sirius para identificar colágeno. D) contenido relativo de colágeno intersticial en aurícula derecha (RA) e izquierda (LA). E, Diámetro promedio de cardiomiocitos en aurícula izquierda (LA) y derecha (RA). Modificada de Reil *et al.*, 2012.

## 1.4 Estrés oxidativo y aldehído deshidrogenasas (ALDHs)

El estrés oxidativo es un estado en el cual hay una producción descompensada de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), y radicales hidroxilos ( $OH^{\cdot}$ ). Dicho estrés ejerce efectos importantes en diversos procesos patológicos, y está íntimamente relacionado con el sistema cardiovascular (por ejemplo, participa en insuficiencia cardíaca, hipertrofia y fibrilación auricular (Bonilla *et al.*, 2013; Choudhary *et al.*, 2002; Kurt y Vickas, 2013; Maulik y Kumar, 2012; Seddon *et al.*, 2007; Tsutsui *et al.*, 2011; Youn *et al.*, 2013).

La generación de ROS se presenta como resultado de varios procesos bioquímicos, tales como la actividad de las siguientes enzimas: xantina oxidasa (XO; Kuppusamy y Zweier, 1989; Thompson-Gorman y Zweier, 1990), NADPH oxidasas (NOX; Kim *et al.*, 2005; Kuroda *et al.*, 2010; Nabeebaccus *et al.*, 2011), sintasas de óxido nítrico desacopladas (*uncoupled* NOS; Förstermann, 2010; Moris *et al.*, 2017), entre otras; sin embargo, la mayoría de las ROS se producen en la mitocondria, particularmente en el complejo III mitocondrial, como subproducto del proceso de fosforilación oxidativa (Chen, Q. *et al.*, 2003; Guzy y Schumacker, 2006).

La XO es una metaloflavoproteína formada por dos subunidades idénticas cada una, de aproximadamente 145 kDa. En condiciones fisiológicas, esta enzima se comporta como xantina oxidoreductasa (XOR); sin embargo, en condiciones patológicas cambia su funcionamiento, de su forma reductasa a la forma oxidasa (XO). Dicho cambio puede ser reversible, cuando obedece a una oxidación de grupos sulfhidrilo (C535 y C992) e irreversible por un mecanismo de escisión proteolítica de los residuos G423-L433 que depende de  $Ca^{2+}$  (Hille y Nishino, 1995; Kuwabara *et al.*, 2003; McNally *et al.*, 2005; Nishino *et al.*, 2005).

Ambas formas (XOR y XO) son responsables de los últimos dos pasos del catabolismo de purinas; es decir, la oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico. En la reacción se reduce  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ , en el caso de XOR en tanto que en el caso de XO se reduce oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ), dando lugar a la generación de iones superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a través de una o dos reducciones respectivamente (Cantu-Medellin y Kelley, 2013; D’Oria *et al.*, 2020; Di Meo *et al.*, 2016; Glantzounis *et al.*, 2005).

La distribución de XO en los tejidos, así como su localización subcelular son aún controversiales. Sin embargo, se ha reportado que la XO se encuentra circulante en el plasma y su expresión se ha observado en hígado, intestino delgado, la glándula mamaria, endotelio capilar y el corazón. Respecto a la localización subcelular, se ha observado la presencia de XO en el citoplasma y la membrana de peroxisomas, retículo endoplásmico liso y rugoso así como en vesículas endocíticas (Battelli *et al.*, 2016; Berry y Hare, 2004). En el corazón, en condiciones patológicas como aterosclerosis, isquemia e insuficiencia cardíaca se ha observado que XO contribuye a la acumulación de ROS (Berry y Hare, 2004; Seddon *et al.*, 2007; Touyz, 2004).

Otra fuente de ROS es la NADPH oxidasa (NOX), esta enzima se expresa en mitocondria y su actividad consiste en promover la oxidación de la forma reducida de NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), reducir oxígeno molecular, y por ende generar  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Ide *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2005; Nabeebaccus *et al.*, 2011; Nakamura *et al.*, 1998).

Existen varias isoformas de NOX (Nox1-5, DUOX1/2) y al menos tres variantes han sido detectadas en corazón (NOX1, 2 y 4, Sorescu y Griendling, 2002). En 2005 Kim y colaboradores reportaron que en pacientes con FA existe un mayor nivel de estrés oxidativo mediado por NOX (Kim *et al.*, 2005). También se ha reportado que la actividad de las NOX puede ser regulada por aldosterona y angiotensina (Lassègue *et al.*, 2001; Murdoch *et al.*, 2006; Nabeebaccus *et al.*, 2011) por lo que resulta de gran interés comprender la interacción entre estos sistemas en el contexto de FA.

Como su nombre lo indica, las óxido nítrico sintasas (NOS, por sus siglas en inglés) sintetizan NO, un segundo mensajero que participa en varias vías de señalización. Existen tres isoformas de NOS, neuronal (NOS1 o nNOS), endotelial (NOS 3 o eNOS) e inducible (NOS 2 o iNOS). En miocitos cardiacos se expresan principalmente las dos primeras, aunque en ciertas condiciones patológicas se reporta mayor cantidad de iNOS, tal es el caso de FA (Han *et al.*, 2008). No obstante, este punto todavía es controversial ya que por el contrario, ciertos modelos de FA presentan niveles bajos de iNOS y eNOS (Bukowska *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2002).

La reacción por la cual las NOS producen NO consiste en una oxidación de L-arginina por oxígeno molecular utilizando como cofactores NADP, dinucleótido de flavina y adenina (FAD), mononucleótido de flavina (FMN), calmodulina y tetrahidrobiopterina (BH4) entre otros, dando como resultado la producción de L-citrulina y NO (Figura 4; Andrew y Mayer, 1999; Crabtree *et al.*, 2008; Sugiyama *et al.*, 2009).

El BH4 es de gran interés ya que en condiciones de estrés oxidativo puede ser oxidado a dihidrobiopterina (BH2), el cual no tiene actividad como cofactor. Cuando existe una baja biodisponibilidad de BH4 respecto a la concentración de BH2, la activación de las NOS por oxígeno está desacoplada de la oxidación de L-arginina y estas enzimas producen  $O_2^{\cdot-}$  en lugar de NO, como se ilustra en la Figura 4. En este caso se dice que las NOS están desacopladas (*Uncoupled NOS*; Förstermann y Sessa, 2012).

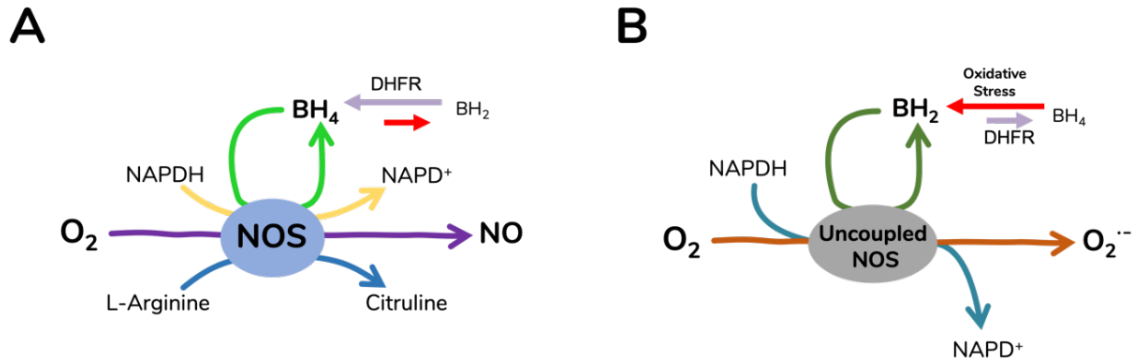


Figura 4. A) Las sintasas de óxido nítrico (NOS) catalizan la oxidación de L- Arginina por oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) y producen NO y citrulina. Esta reacción requiere diversos cofactores, entre ellos NADPH y tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ). El  $\text{BH}_4$  puede oxidarse a dihidrobiopterina ( $\text{BH}_2$ ) y reducirse nuevamente a  $\text{BH}_4$  por acción de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). B) El estrés oxidativo promueve la transformación por oxidación de  $\text{BH}_4$  a  $\text{BH}_2$  y este último es incapaz de mimetizar la actividad de cofactor de  $\text{BH}_4$ . En consecuencia, una baja biodisponibilidad de  $\text{BH}_4$  provoca que la activación de la enzima por oxígeno se desacople de la oxidación de L-arginina, produciéndose  $\text{O}_2^{\cdot -}$  en lugar de NO y citrulina (Modificado de Alkaitis y Crabtree, 2012).

Las ROS pueden reaccionar con NO generando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), una especie reactiva de nitrógeno que a su vez oxida a otras moléculas, incluyendo a  $\text{BH}_4$ . Estos eventos generan un círculo de retroalimentación que promueve el desacople de las NOS (Alkaitis y Crabtree, 2012; Crabtree y Channon, 2011; Kuzkaya *et al.*, 2003).

El estrés oxidativo induce peroxidación lipídica y esto a su vez tiene varias consecuencias, tales como: acumulación de aldehídos reactivos, oxidación de residuos de aminoácidos, y alteraciones covalentes en la estructura del DNA. A nivel cardiaco, el estrés oxidativo está asociado con ciertas condiciones patológicas tales como daño isquémico y fibrilación auricular. Por ejemplo, en modelos de isquemia y reperfusión, promueve una acumulación de 4- hidroxí-2-nonenal (4-HNE). Es decir, un subproducto de peroxidación lipídica cuyos efectos citotóxicos involucran alteraciones covalentes en la estructura de DNA, proteínas, y fosfolípidos que contienen grupos amino (revisado en Cadenas, 2018; Schieber y Chandel, 2014; Xie *et al.*, 2015).

La defensa natural contra el estrés oxidativo es un sistema antioxidante que incluye, entre otros factores, enzimas como catalasa, superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (G-Px) y aldehído deshidrogenas (ALDHs), las cuales se encuentran distribuidas en compartimentos subcelulares específicos y tienen sustratos particulares (Nimse y Pal, 2015)

Las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) son enzimas que catalizan la eliminación de aldehídos. Se trata de una familia de 19 isoenzimas (en humano) dependientes de la forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP<sup>+</sup>). Básicamente, las ALDHs catalizan la oxidación de aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos, los cuales son menos tóxicos (Koppaka *et al.*, 2012). La actividad de estas enzimas se puede regular farmacológicamente; por ejemplo, mediante activadores como Alda-1 (N-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)-2,6-diclorobenzamida) e inhibidores como la Daidzina (4',7-Dihidroxi isoflavona 7-glucosido), y uno de sus derivados, el CVT-10216 (Arolfo *et al.*, 2009; Keung y Vallee, 1993; Zhong *et al.*, 2015). Las estructuras químicas de Alda-1 y Daidzina se muestran en la Figura 5

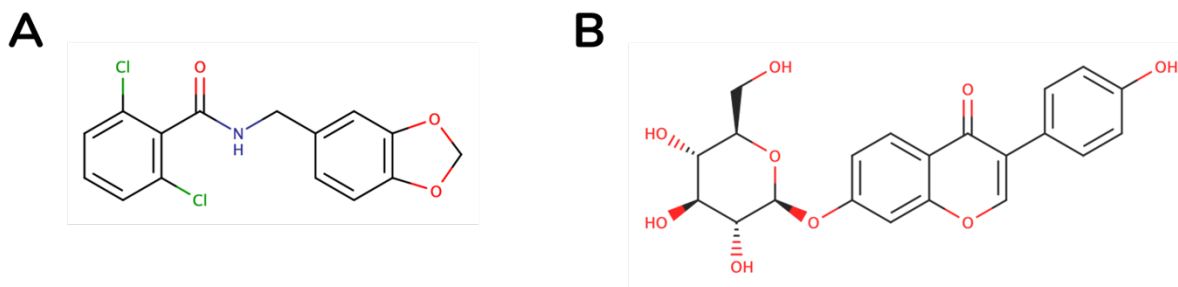


Figura 5. Estructuras químicas de los moduladores de ALDH2; Alda-1 (N-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)-2,6-diclorobenzamida) y Daidzina (4',7-Dihidroxi isoflavona 7-glucosido). Para dibujar las estructuras químicas de los compuestos se utilizó el Software Marvin Sketch de ChemAxon (<https://www.chemaxon.com>)

En el corazón, la isoforma más abundante de las ALDHs es la ALDH2 (Alnouti y Klaassen, 2008). Esta enzima se localiza en la matriz mitocondrial y se ha reportado que su actividad se relaciona con efectos cardioprotectores (como revisiones, véanse Budas *et al.*, 2009; Chen,

C.-H. *et al.*, 2014). Por ejemplo, en un estudio reciente, realizado en ratas que fueron sometidas a episodios de isquemia y reperfusión (I/R), se observó que el daño al miocardio puede ser ya sea exacerbado o inhibido, mediante tratamientos con Daidzina o Alda-1, respectivamente (Figura 6A; Ji *et al.*, 2016).

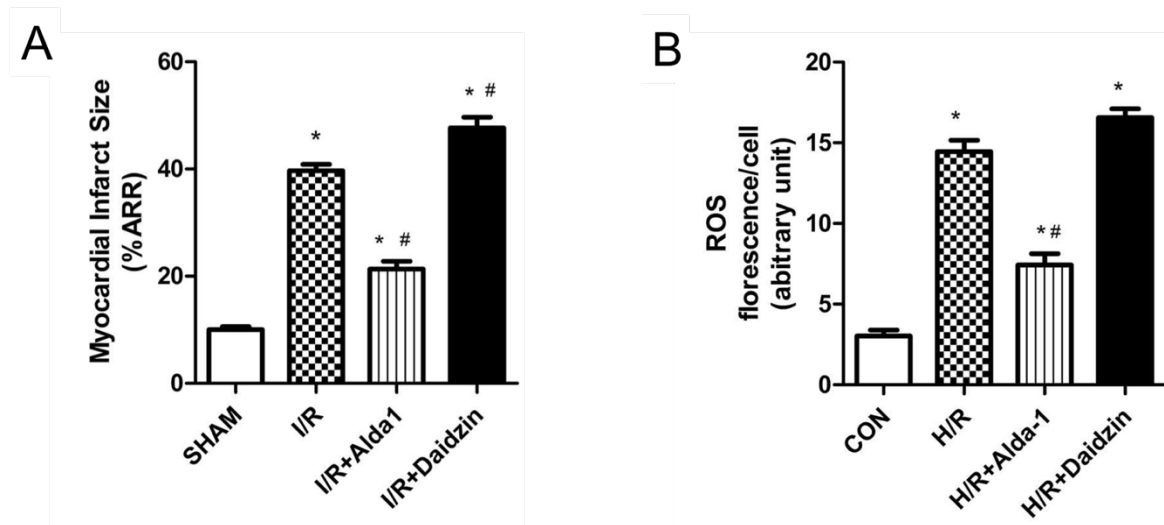


Figura 6. ALDH2 protege al ventrículo del daño isquémico. A) Porcentaje de área infartada en corazones de rata sujetas (I/R) o no (SHAM) a isquemia y reperfusión. Algunas ratas sujetas a I/R también se trataron con Alda-1 (10 mg/Kg) o Daidzina (100 mg/Kg, 5 min antes de inducir isquemia). "ARR" significa área que se puso en riesgo (del inglés *Area at Risk*, AAR). B) Niveles de fluorescencia emitida por un compuesto sensible a ROS (*dichloro-dihydro-fluorescein diacetate*, DCFH-DA), en miocitos ventriculares H9C2. Previamente, los miocitos se expusieron o no (CON) a hipoxia y re-oxigenación (H/R). Algunos de los miocitos expuestos a H/R también se incubaron con Alda-1 (20  $\mu$ M) o Daidzina (50  $\mu$ M), 30 min antes de iniciar la hipoxia. Modificada de Ji *et al.*, 2016.

Además, tal como se puede apreciar en la Figura 6B, dichos efectos se correlacionan con sendos cambios en niveles de ROS (elevados con Daidzina y disminuidos con Alda-1), los cuales fueron investigados en un modelo *in vitro* de I/R (miocitos ventriculares de la línea celular H9C2, expuestos a hipoxia y re-oxigenación; Ji *et al.*, 2016).

Los datos de la Figura 6 fueron obtenidos en tejido ventricular (Figura 6A) y una línea celular derivada de cardiomiocitos ventriculares (Figura 6B). Sin embargo, aún no se conoce el

posible impacto funcional que ALDH2 ejerce en los miocitos auriculares. Lo que sí se sabe, a nivel auricular, es que existe una relación inversa entre el nivel de expresión del gene que codifica para ALDH2 (en aurícula derecha) y pacientes con FA (Kharlap *et al.*, 2008).

Un trabajo más reciente (Hsu *et al.*, 2020), reporta que ratones transgénicos que expresan un polimorfismo disfuncional de ALDH2 (ALDH2\*2) y que son sometidos a consumo de alcohol, resultan ser más susceptibles de desarrollar FA. Un aspecto interesante, es que estas alteraciones se asocian con altos niveles de fibrosis y 4- hidroxy 2-nonenal (4-HNE). Quizás más importante, la administración de un activador selectivo de ALDH2 (Alda-1) logra atenuar no sólo los niveles elevados de fibrosis y 4-HNE, sino también la mayor incidencia de FA (Hsu *et al.*, 2020).

Aunado a lo anterior, es ampliamente aceptado que el estrés oxidativo y niveles elevados de NOX se encuentran asociados con FA (Youn *et al.*, 2013). Todo esto sugiere que, al igual que sucede con el ventrículo, la actividad de ALDH2 podría ser benéfica para el miocito auricular.

## **1.5 Efectos del estrés oxidativo en proteínas relacionadas con el manejo de calcio intracelular (RyR, SERCA, CaMKII)**

En condiciones de estrés oxidativo, las ROS pueden modificar directamente (oxidar) residuos de aminoácidos (metionina, cisteína, fenilalanina, triptófano, tirosina e histidina principalmente) en una gran cantidad de proteínas (Berlett y Stadtman, 1997; Cecarini *et al.*, 2007) y eso provoca cambios funcionales importantes. Véanse por ejemplo los casos reportados en la Tabla 1.



Tabla 1. Efectos de la oxidación de residuos de aminoácidos de proteínas relacionadas con el acople excitación-contracción (ECC).

PROTEÍNA	EFFECTOS DE LA OXIDACIÓN	REFERENCIAS.
Canales de Ca <sup>2+</sup> tipo L	↑ Corriente de calcio	(Johnstone y Hool, 2014; Muralidharan <i>et al.</i> , 2017)
RyR	↑ Liberación de Ca <sup>2+</sup> del RE [Incremento de la probabilidad de apertura (Po)]	(Eager y Dulhunty, 1998; Marengo <i>et al.</i> , 1998; Terentyev <i>et al.</i> , 2008)
SERCA	↓ Recaptura de Ca <sup>2+</sup>	(Kukreja <i>et al.</i> , 1988; Morris y Sulakhe, 1997)
NCX	↑ Actividad	(Goldhaber, 1996; Reeves, J. P. <i>et al.</i> , 1986; Santacruz-Tolozza <i>et al.</i> , 2000)
PKC	↑ Actividad (dosis elevadas) ↓ Actividad (dosis bajas)	(Knapp y Klann, 2000; Steinberg, 2015)
PKA	↑ Actividad	(Brennan <i>et al.</i> , 2006)
PMCA	↓ Actividad	(Gutiérrez-Martín <i>et al.</i> , 2002; Kaneko <i>et al.</i> , 1989)

Tal como se puede apreciar, la oxidación afecta a varias proteínas relacionadas con el manejo de Ca<sup>2+</sup>, tales como el intercambiador sodio/calcio (NCX), los receptores de rianodina (RyRs) y la bomba ATPasa de calcio del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA). Particularmente, sabemos que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede provocar un incremento en la actividad del NCX (Goldhaber y Liu, 1994; Reeves, John P. y Condrescu, 2008; Santacruz-Tolozza *et al.*, 2000).

Adicionalmente las ROS pueden regular de manera indirecta la función de diversas proteínas que participan en el acople excitación-contracción (ECC, por sus siglas en inglés). Esta vía indirecta frecuentemente involucra a una activación sostenida de la cinasa de Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina tipo II (CaMKII), por oxidación de sus residuos de metionina 281/282 (Anderson *et al.*, 2011; Erickson *et al.*, 2008). Una vez activa, la CaMKII puede fosforilar (y

por ende modular) diversas proteínas, entre ellas los canales de calcio tipo L ( $Ca_v1.2$ ), RyRs y fosfolamban (PLN), así como canales de sodio y potasio (Ashpole *et al.*, 2012; Bers y Morotti, 2014; Camors y Valdivia, 2014). De hecho, se ha sugerido que los daños mediados por ROS en patologías como cáncer, daño vascular, isquemia/reperfusión, insuficiencia cardíaca, arritmias y fibrilación auricular involucran a la activación de la CaMKII (Bell *et al.*, 2014; Foteinou *et al.*, 2015; Luczak y Anderson, 2014; Purohit *et al.*, 2013; Wang, Y. Y. *et al.*, 2015; Yoo *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2014).

La activación de la CaMKII también ha sido implicada en la regulación de factores de transcripción como la proteína de activación 1 (AP-1), el factor de activación de transcripción 1 (ATF-1), factor de respuesta a suero (SRF), proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB), el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y el factor mejorador de miocitos 2 (MEF2; Luczak y Anderson, 2014). En cardiomiocitos, por ejemplo, la activación de MEF2 por CaMKII oxidada está implicada en el desarrollo de hipertrofia (Anderson *et al.*, 2011; Passier *et al.*, 2000).

## 2 Antecedentes

### 2.1 Acople excitación-contracción (ECC) y homeostasis de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en cardiomiocitos

El acople excitación-contracción (ECC) cardiaco comienza con el disparo de un potencial de acción (PA), que a su vez depende de una actividad coordinada de varias clases de canales iónicos. La despolarización de la membrana provoca la apertura de canales de calcio tipo L (canales L, cuya subunidad principal es  $\text{Ca}_v1.2$ ). La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un sólo canal L provoca un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la vecindad del RS que activa a los receptores de rianodina o RyR2 aledaños los cuales liberan  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (RS), proceso conocido como liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR, por sus siglas en inglés). A ese fenómeno se le conoce como “control local” de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wier, W. G. et al., 1994). Esto es posible gracias a que ambas clases de canales ( $\text{Ca}_v1.2$  y RyR2) y organelos (sarcolema y RS) coexisten en regiones especializadas, conocidas como unidades liberadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  (Avila *et al.*, 2019; Bers, 2002; Voigt *et al.*, 2012).

El influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos canales ( $I_{\text{CaL}}$ ) y la liberación de calcio del RS a través de los RyR2, resulta en la elevación la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) con lo cual se activa la maquinaria contráctil. La  $I_{\text{CaL}}$  y la CICR son también responsables de la fase de meseta del PA en los miocitos auriculares. La relajación del músculo cardiaco se produce tras la repolarización de la membrana y la remoción de calcio citosólico que ocurre mediante los sistemas de recaptura (ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS o SERCA y el uniportador de calcio mitocondrial o MCU) y extrusión del ion (intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  o NCX; Korzick, 2003; Muralidharan et al., 2017; Wier, Withrow Gil, 2007).

El incremento de la concentración de calcio citosólico ocurre rápidamente y por un periodo breve de tiempo y posteriormente, el mismo incremento de calcio estimula la remoción de este, en consecuencia, el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  es transitorio y por eso también se le denomina simplemente, transitorio de  $Ca^{2+}$  (Korzick, 2003; Muralidharan et al., 2017; Wier, Withrow Gil, 2007).

A las células de trabajo cardiacas también se les conoce como cardiomiocitos. Dichas células presentan diferencias dependiendo de si provienen de ventrículo o aurícula. Por ejemplo, las invaginaciones del sarcolema conocidas como túbulos transversos (o túbulos T) están presentes en una red bien organizada que está orientada tanto transversalmente (de ahí que se denominan túbulos transversos) como longitudinalmente en los cardiomiocitos; por otro lado, en las células auriculares generalmente esta red se encuentra menos desarrollada y es más variable entre las células. En ratas, por ejemplo, se ha observado que sólo 1 de cada 3 células auriculares, aproximadamente, están tubuladas y, cuando están presentes, la disposición de los túbulos es a menudo predominantemente longitudinal (Frisk et al., 2014; Glukhov et al., 2015). Eso implica que los miocitos ventriculares pueden presentar unidades liberadoras de  $Ca^{2+}$  no sólo a nivel de superficie, sino también en sus regiones más centrales.

En el caso de los miocitos auriculares sólo presentan dichas unidades en la superficie y eso provoca que sus RyR2s ubicados en partes centrales se activen asincrónicamente. Concretamente, se activan hasta después de un cierto retardo, puesto que no presentan control local, sino que más bien dependen de la difusión del  $Ca^{2+}$  proveniente de regiones sub-membranales. En pocas palabras, en miocitos ventriculares el transitorio de  $Ca^{2+}$  es más homogéneo, espacialmente hablando, con respecto a lo que sucede en miocitos los auriculares (Blatter *et al.*, 2003; Bootman *et al.*, 2011)

Los transitorios de  $Ca^{2+}$  se pueden investigar mediante el uso de colorantes fluorescentes sensibles a las concentraciones del ion. En la configuración *whole-cell*, de la técnica *patch-clamp*, el fluoróforo simplemente se añade a la solución interna de registro. Otra opción es

exponer a los cardiomiocitos a una versión del fluoróforo que permea a través de la membrana (forma acetoximetil éster o AM). Ambas técnicas se pueden considerar invasivas, puesto que se introduce un amortiguador externo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Adicionalmente, en *whole-cell patch-clamp* se presenta una diálisis del citosol. El usar la forma AM del fluoróforo representa una ventaja, y es que permite investigar transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en “células intactas”; es decir, no sujetas a *patch-clamp*, mediante estimulación de campo extracelular. Por otra parte, la ventaja de usar *whole-cell patch-clamp* es que permite conocer no sólo los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  sino también los valores de corriente y potencial de membrana ( $I_m$  y  $V_m$ , respectivamente).

Esto último es muy importante, ya que esas tres variables están asociadas y es difícil entender cuál es el origen de un cambio en una de ellas sin conocer el comportamiento de las otras. Un ejemplo en el que se requiere conocer estas variables es cuando se determina lo que conocemos como “ganancia del acople EC”, medida como el cociente de el flujo de calcio a través de los canales de liberación de calcio del RS (RyRs) y el flujo de calcio a través de los canales de calcio tipo L. Lo cual indica qué tan eficiente es la corriente macroscópica de  $\text{Ca}^{2+}$ , o  $I_{\text{CaL}}$ , para generar CICR (Wier, W. G. et al., 1994).

La Figura 7A muestra un experimento de fijación de voltaje, en *whole-cell patch-clamp*. Las soluciones de registro fueron diseñadas para aislar corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  y se incluyó Fluo-4 en la solución interna, para monitorear los niveles del ion. La aplicación de pulsos despolarizantes breves de voltaje ( $V_m$ ) genera una corriente entrante de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{CaL}}$ , trazos hacia abajo de la basal) que precede al transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  (trazos hacia arriba de la basal). La ganancia del acople, estimada a partir de este tipo de experimentos se puede ver en la Figura 7B. Tal como se puede apreciar, este parámetro es mayor a voltajes más negativos y eso refleja el fenómeno conocido como control local ya que la corriente unitaria de los canales L también crece a voltajes más negativos (Osornio-Garduño, 2013, tesis de maestría).

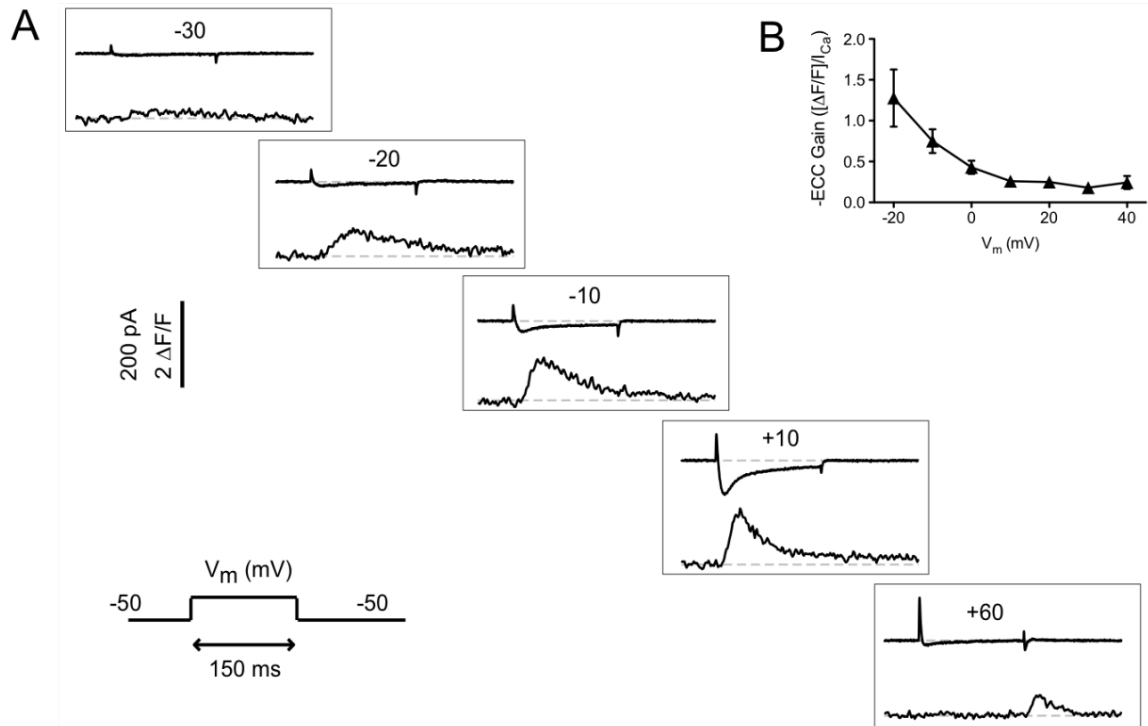


Figura 7. Acople excitación-contracción. A) Trazos representativos de  $I_{CaL}$  y transitorios de  $Ca^{2+}$ . En un miocito auricular de rata adulta se registró simultáneamente los niveles de fluorescencia ( $\Delta F/F$ ) e  $I_{CaL}$  (pA) en función del tiempo. Los registros se obtuvieron mediante la aplicación de pulsos de voltaje ( $V_m$ ) a varios niveles tal como se indica en el inserto (abajo a la izquierda). En cada uno de los registros, el valor de  $V_m$  se indica en la parte superior del recuadro. B) Ganancia del acople excitación-contracción estimada a partir de datos como los que se muestran en A. Modificada de Osornio-Garduño; 2013

En la Figura 8 se pueden apreciar transitorios de  $Ca^{2+}$  inducidos mediante estimulación de campo extracelular (izquierda), en miocitos auriculares intactos. Les sigue otro transitorio de  $Ca^{2+}$ , pero provocado por una aplicación de cafeína (derecha). La cafeína es un agonista de los RyR2, por lo que su presencia vacía rápidamente a los depósitos de  $Ca^{2+}$  del RS. De hecho, la magnitud del incremento que provoca este compuesto, en los niveles de  $Ca^{2+}$ , se considera una estimación del contenido de  $Ca^{2+}$  disponible para ser liberado. El valor máximo de  $[Ca^{2+}]_i$  disminuye gradualmente, aún en presencia de cafeína. Esta disminución no obedece a recaptura de  $Ca^{2+}$  al RS, ya que la actividad de SERCA es despreciable comparada con la fuga de  $Ca^{2+}$  provocada por cafeína. De hecho, la disminución obedece primordialmente a la extrusión del  $Ca^{2+}$  por el NCX. En contraste, la caída del transitorio evocado eléctricamente sí refleja la actividad de SERCA, principalmente.

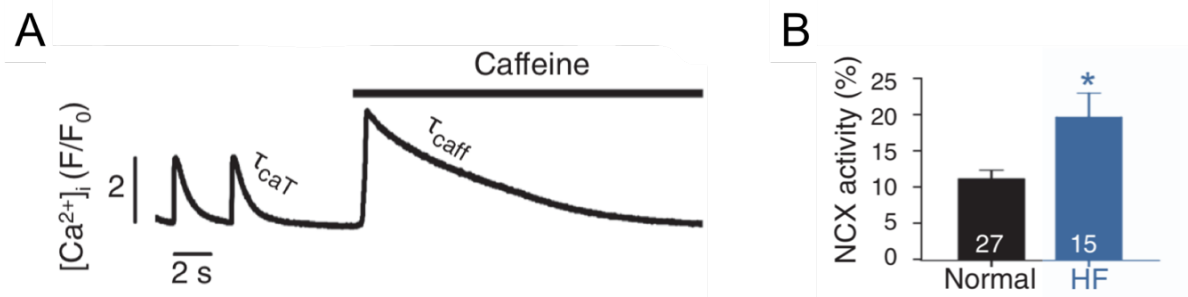


Figura 8. Transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  y actividad del NCX en un miocito de aurícula de conejo. A) La célula se cargó con un fluoróforo permeable sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  (Fluo-4 AM) y los transitorios se evocaron por estimulación eléctrica de campo extracelular ( $\tau_{\text{caT}}$ ) o cafeína (10 mM,  $\tau_{\text{caff}}$ ). Los símbolos  $\tau_{\text{caT}}$  y  $\tau_{\text{caff}}$  hacen referencia a un procedimiento que se utilizó para medir la tasa de decaimiento, la cual se ajustó a una función exponencial y de ahí se obtuvieron las respectivas constantes de tiempo, generalmente conocidas como tau ( $\tau$ ). B) Actividad del NCX de miocitos obtenidos de animales sanos (Normal) y de miocitos de animales con insuficiencia cardiaca (HF, heart failure). Figura tomada Hohendanner *et al.*, 2015.

Mediante una operación algebraica, relativamente sencilla (que involucra a las constantes de tiempo del decaimiento de ambos transitorios), Hohendanner y colaboradores (2015) lograron descifrar la contribución del NCX a la disminución del transitorio evocado eléctricamente (Figura 8). Concretamente, descubrieron que en miocitos de animales sanos dicha contribución es cercana a un 10 %. No obstante, en miocitos de animales con insuficiencia cardiaca ese valor se eleva casi al doble (Figura 8B). Un aspecto interesante, es que la mayor actividad del NCX se asoció con una mayor incidencia de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  fuera del ritmo de estimulación eléctrica, lo cual a su vez podría contribuir a explicar la mayor susceptibilidad de desarrollar fibrilación auricular (FA) en pacientes con insuficiencia cardiaca (Hohendanner *et al.*, 2015).

## 2.2 Aldosterona provoca cambios electrofisiológicos en miocitos auriculares

Varios estudios describen efectos de aldosterona en miocitos cardiacos. La mayoría de ellos se han enfocado a miocitos ventriculares (e.g. Benitah *et al.*, 2001; Benitah y Vassort, 1999; Gómez *et al.*, 2009; Lalevéé *et al.*, 2005; Lv *et al.*, 2015)

A nivel auricular se ha reportado que, en ratas, una aplicación de aldosterona durante 8 semanas provoca susceptibilidad de desarrollar FA e hipertrofia de los miocitos (Figura 3; Reil *et al.*; 2012). Estos efectos podrían involucrar tanto acciones directas (de la hormona en el miocito), como indirectas (es decir, mediadas por otros tipos de células, hormonas o neurotransmisores). Existen tres estudios en los que se ha tratado de investigar acciones directas.

En el primero se usaron miocitos de rata neonata y no se encontraron cambios a nivel de actividad de canales de calcio, después de 1 día de tratamiento (Lalevéé *et al.*, 2005). El segundo estudio se llevó a cabo en una línea celular derivada de miocitos auriculares de ratón, denominada HL-1 (Tsai *et al.*, 2010). Finalmente, Ríos-Pérez y cols. (2016) llevaron a cabo el primer estudio de dichas acciones en miocitos auriculares primarios de animales adultos (Ríos-Pérez *et al.*, 2016). Los datos obtenidos en miocitos de animales neonatos y adultos son congruentes. Concretamente, al cabo de 1 día de tratamiento aldosterona no provoca cambios en la actividad de canales de calcio en ambos sistemas (Lalevéé *et al.*, 2005; Ríos-Pérez *et al.*, 2016). No obstante, en miocitos de adulto la búsqueda de efectos se extendió llegando a incluir tratamientos de hasta 6 días (Figura 9).



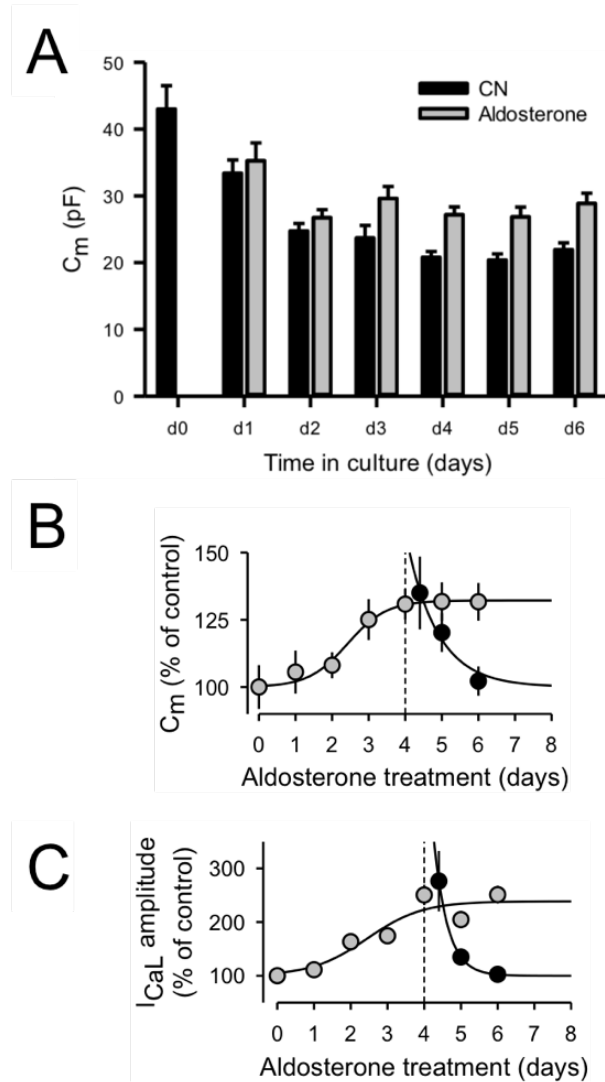


Figura 9. Aldosterona regula canales de calcio y  $C_m$ . A) Valores de  $C_m$  que fueron obtenidos en función del tiempo en cultivo en células expuestas o no a aldosterona. B) Mismos datos de A, pero expresados como porcentaje (círculos grises) de la media observada en células control, en cada día de registro. Adicionalmente se muestran datos de células expuestas 4 días a la hormona y luego cultivadas en condiciones control para investigar la reversibilidad del efecto (círculos negros). C) Curso temporal de los cambios que provoca aldosterona en  $I_{CaL}$  (círculos grises) así como de su respectiva reversibilidad (círculos negros). En todos los paneles se utilizó  $1 \mu M$  de aldosterona. Datos de Ríos-Pérez *et al.*; 2016.

A nivel de canales de calcio y superficie membranal (estimada como capacitancia de membrana o  $C_m$ ), se encontró que a partir de 2 días la hormona comienza a incrementar tanto  $C_m$  como la densidad de  $I_{CaL}$  y ambos efectos alcanzan un valor máximo entre los días 4 y 6 (Figura 9).

Los efectos mostrados en la Figura 9 dependen de la concentración de aldosterona y la dosis a la que se observó el efecto máximo tanto en  $I_{CaL}$  como en  $C_m$  fue  $\sim 1 \mu M$  en tanto que dosis efectivas medias fueron 130 nM ( $I_{CaL}$ ) y 20 nM ( $C_m$ ). Con base en esta información, Ríos-Pérez y colaboradores continuaron el estudio utilizando exposiciones de 4-6 días y  $1 \mu M$  de aldosterona, como tratamiento estándar. Así, compararon la amplitud del transitorio de  $Ca^{2+}$  en células intactas (es decir, no sujetas a *patch-clamp*; véase la Figura 10), encontrando que dicho tratamiento aumenta significativamente dicha amplitud (Figura 10, A y B). La mayor amplitud del transitorio se asoció con un mayor contenido de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico.

Otro hallazgo interesante fue que células expuestas al esteroide también presentaron mayor incidencia de oscilaciones de  $Ca^{2+}$  que no estaban en sincronía con el ritmo de estimulación eléctrica (Figura 10C), lo cual podría contribuir a explicar la mayor incidencia de FA que se observa tras aplicaciones *in vivo* de aldosterona (Figura 10).

Aquí conviene resaltar que a la fecha no se sabe si la amplitud exacerbada de los transitorios de  $Ca^{2+}$  (Figura 10, A y B) involucra cambios a nivel de la ganancia del acople EC y eso algo de lo que se planea investigar en este proyecto.

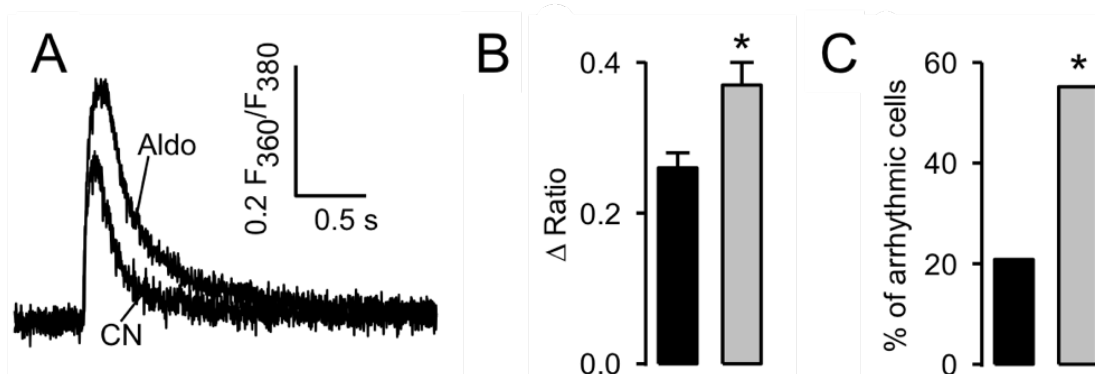


Figura 10. Aldosterona aumenta la amplitud del transitorio de  $Ca^{2+}$  (A, B) y provoca un incremento en el porcentaje de células que presentan eventos de liberación espontánea de  $Ca^{2+}$  (C) Modificada de Ríos-Pérez *et al.* 2016.

Ríos-Pérez y colaboradores también investigaron la forma de los PA, y encontraron que el tratamiento con aldosterona resulta en un alargamiento significativo de la duración de estos (a nivel del 90 % de repolarización o APD<sub>90</sub>; Figura 11).

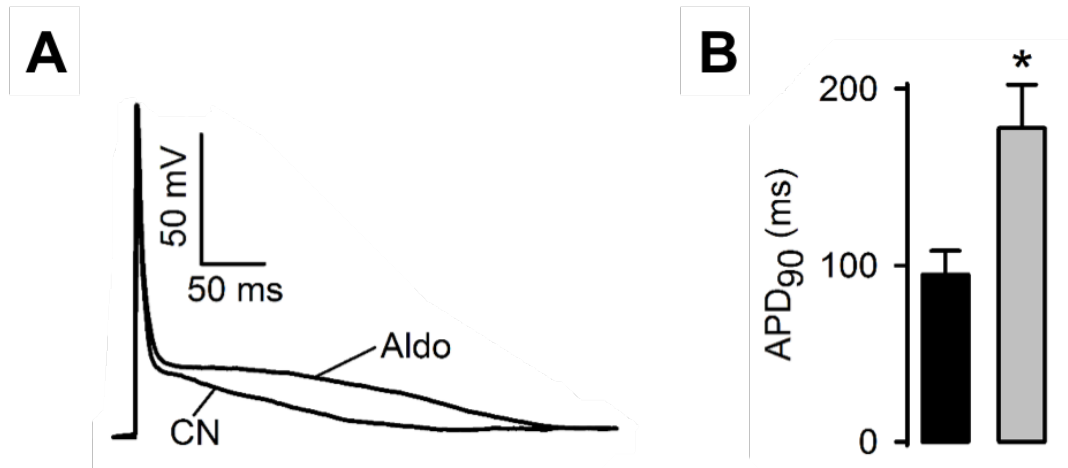


Figura 11. Miocitos auriculares tratados crónicamente con aldosterona presentan PAs de mayor duración. A) PAs representativos que fueron registrados en un cardiomiocito control (CN) y uno tratado con aldosterona (Aldo). B) Duración promedio de los PAs estimada al 90 % de repolarización (APD<sub>90</sub>). Modificada de Ríos-Pérez *et al.* 2016.

A la fecha no está claro a qué se debe el alargamiento del PA (Figura 11). En teoría, la mayor densidad de  $I_{CaL}$  (Figura 11) podría estar contribuyendo, pues representa un factor despolarizante; sin embargo, también habría que considerar la actividad de canales de  $K^+$  dependientes de voltaje ya que provocan repolarización y del intercambiador  $Na^+ /Ca^{2+}$  (NCX) ya que cuando éste último funciona en modo directo, expulsa un ion de  $Ca^{2+}$  e introduce tres de  $Na^+$ , por ciclo de actividad (Bers, 2002; Voigt *et al.*, 2012). En términos eléctricos, eso significa una entrada neta de cargas positivas, la cual de estar exacerbada podría contribuir no sólo a entender el mayor tiempo que las células se mantienen despolarizadas (Figura 11), sino también a explicar la mayor incidencia de oscilaciones de  $Ca^{2+}$  fuera de ritmo.

La posibilidad de que aldosterona, además de estimular a  $Ca_v1.2$ , podría estar inhibiendo la actividad de canales de  $K^+$  fue investigada previamente y se estudiaron tres tipos de corrientes de  $K^+$ : transitoria ( $I_{Kto}$ ), sostenida ( $I_{Ksus}$ ) y de rectificación entrante ( $I_{Kin}$ ); sin embargo, contrario a lo esperado la hormona no disminuyó la densidad de dichas corrientes. Al contrario, ejerció una regulación positiva en  $I_{Ksus}$  (Figura 12; Ríos-Pérez *et al.*; 2016). En teoría, una mayor salida de  $K^+$  (vía  $I_{Ksus}$ , Figura 12) tendería a anular la mayor entrada de  $Ca^{2+}$  (a través de  $Ca_v1.2$ , Figura 9C) lo que deja sin explicación al efecto en el PA.

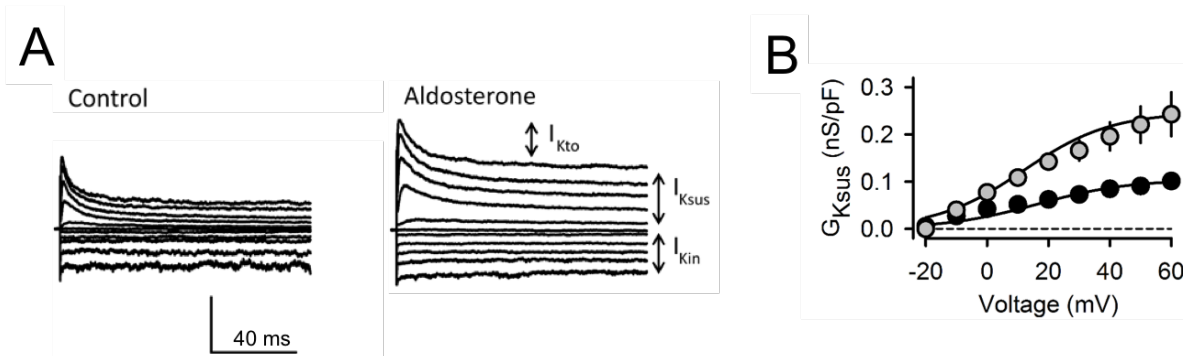


Figura 12. Aldosterona regula canales de  $K^+$  en miocitos auriculares. A) Familias de corrientes de  $K^+$  que se registraron en una célula control (izquierda) y una célula tratada con aldosterona (derecha). Las corrientes se dividieron en tres tipos: transitoria ( $I_{Kto}$ ), sostenida ( $I_{Ksus}$ ) y de rectificación entrante ( $I_{Kin}$ ). B) Curvas de activación promedio (también conocidas como curvas conductancia-voltaje) que fueron obtenidas a partir de trazos como en A, para el caso de  $I_{Ksus}$ . Los datos fueron obtenidos a partir de 8 células control (círculos negros) y 7 tratadas con aldosterona (círculos grises). Datos de Ríos-Pérez *et al.*, 2016.

La posibilidad de que aldosterona promueva una mayor actividad del NCX aún debe ser estudiada y resulta de interés ya que una corriente exacerbada del NCX durante el disparo de un PA evocado puede resultar en el disparo de otro PA subsiguiente fuera de ritmo; lo cual tiene relación con lo que se conoce como despolarizaciones posteriores tardías (DADs, del inglés *delayed afterdepolarizations*), un sustrato importante de arritmias (Bers, 2002; Voigt *et al.*, 2012).

### 2.3 Aldosterona induce estrés oxidativo en cardiomiocitos

En miocitos ventriculares, tanto de rata adulta (De Giusti *et al.*, 2011) como neonata (Hayashi *et al.*, 2008), aldosterona incrementa el nivel de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este efecto se desarrolla rápidamente, en el transcurso de 5-30 minutos, y no depende de cambios a nivel genómico. Un aspecto interesante, es que el efecto no presenta desensibilización, ya que también se observa en respuesta a tratamientos crónicos, de hasta por lo menos 2 días (Figura 13, Hayashi *et al.*; 2008).

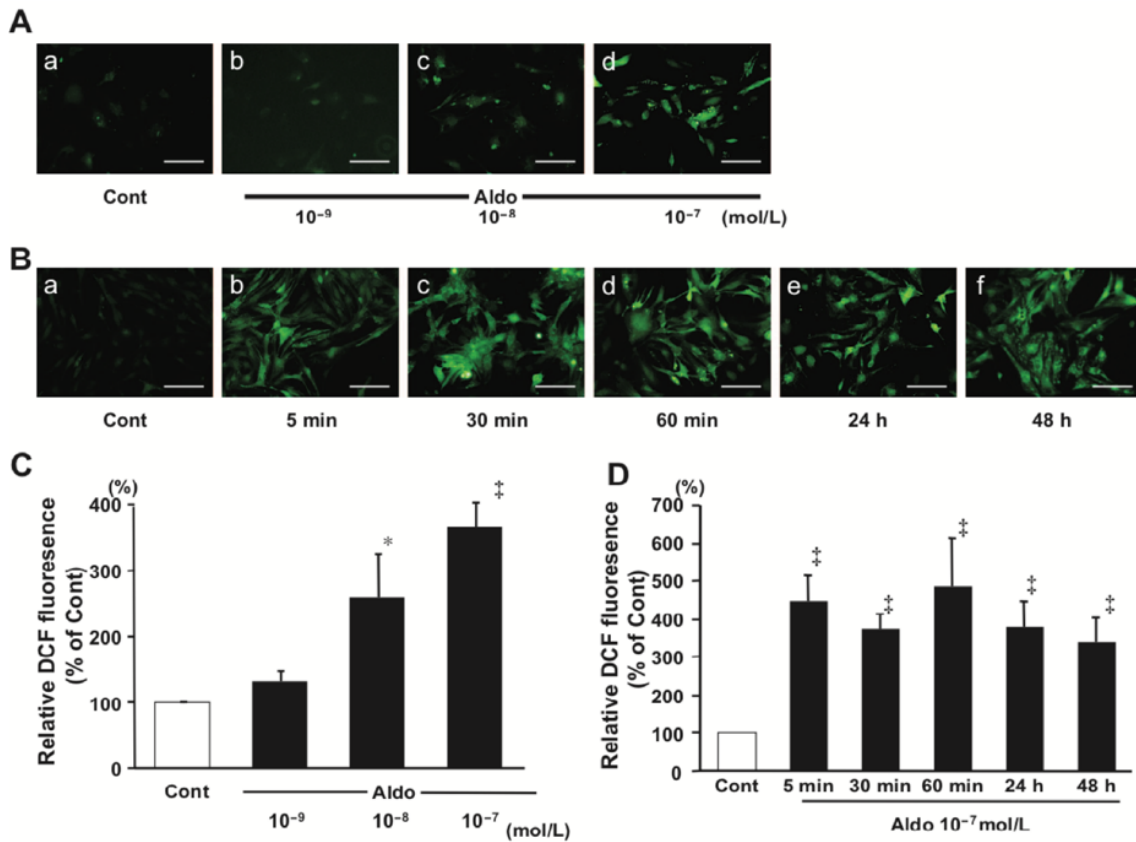


Figura 13. Aldosterona provoca niveles elevados de ROS en miocitos ventriculares de rata neonata. A) Imágenes de epifluorescencia que ilustran los niveles de ROS reportados por un sensor denominado 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA-AM), en células control y aquellas que fueron expuestas a diferentes concentraciones de aldosterona (Aldo). B) Imágenes similares a las que se muestran en A, pero en células tratadas durante diferentes periodos de tiempo con 100 nM de aldosterona. C, D) Valores promedio de fluorescencia estimados a partir de microfotografías como las que se ilustran en A y B. Tomada de Hayashi *et al.*; 2008.

En la clona celular HL-1, derivada de miocitos auriculares de ratón, aldosterona también incrementa los niveles de producción de ROS (Figura 14), con un curso temporal similar al observado en miocitos ventriculares de neonato (Figura 13).

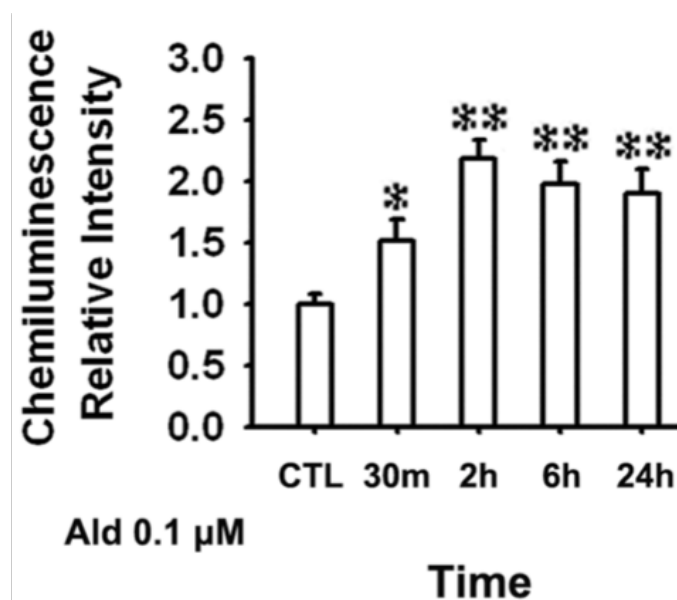


Figura 14 Aldosterona provoca estrés oxidativo en la línea celular HL-1. Se presentan niveles de quimioluminiscencia emitida por lucigenina (un sensor de superóxido), en células que fueron tratadas durante varios periodos de tiempo con aldosterona (Ald). Datos de Tsai *et al.*, 2007.

Para determinar si las ROS se encuentran involucradas en los efectos de la Figura 9, Ríos-Pérez y colaboradores (2016) utilizaron N-acetilcisteína (NAC, Figura 15), el cual atenúa el estrés oxidativo puesto que es un precursor del glutatión (e.g., Tsai *et al.*, 2007).

Como resultado se encontró que una preincubación con NAC previene el aumento que provoca aldosterona en el valor de  $C_m$ . Otro aspecto interesante es que un efecto similar se observa al utilizar el quelante de  $Ca^{2+}$  EGTA. En contraste, ambos compuestos (NAC y EGTA) fueron incapaces de modificar la regulación positiva en  $Ca_v1.2$  (Figura 15; Ríos-Pérez *et al.*, 2016).

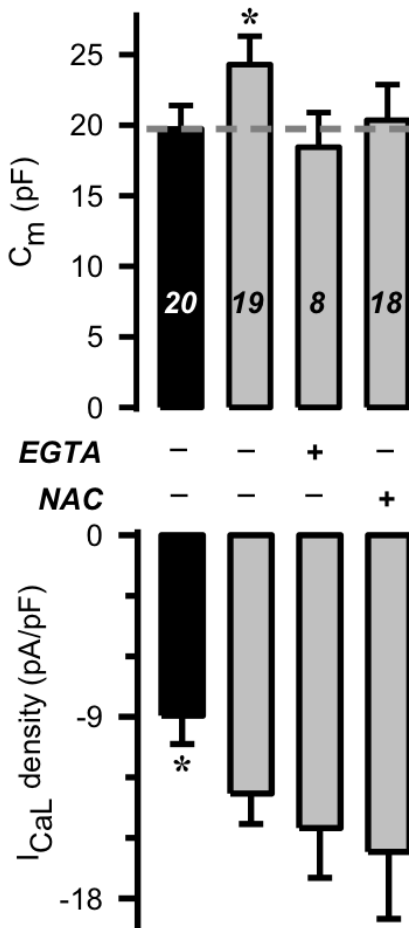


Figura 15. Las especies reactivas de oxígeno y  $Ca^{2+}$  participan en la regulación de  $C_m$  por aldosterona, pero no en la correspondiente a  $Ca_v1.2$ . Se grafican datos promedio de  $C_m$  (barras hacia arriba) e  $I_{CaL}$  (barras hacia abajo) que fueron obtenidos en miocitos auriculares de rata adulta, expuestos (gris) o no (negro) a aldosterona ( $1 \mu M$ , durante 4-6 d). El signo + indica que las células también fueron incubadas ya sea con EGTA ( $1.7 \text{ mM}$ ) o NAC ( $10 \text{ mM}$ ). Tomada de Ríos-Pérez et al., 2016.

Los datos de la Figura 15 sugieren, indirectamente, que en miocitos auriculares de rata adulta aldosterona incrementa la disponibilidad de ROS, algo similar a lo observado previamente en miocitos ventriculares de rata neonata y células HL-1. Sin embargo, a la fecha no existen evidencias directas al respecto. Lo que sí se ha visto en dichas células es que la hormona provoca una marcada disminución en los niveles de NO (Figura 16).

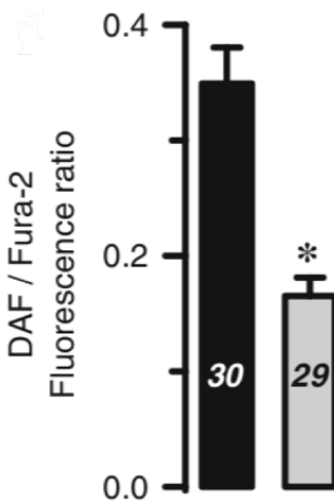


Figura 16. Aldosterona regula la producción de NO en miocitos auriculares de rata adulta. Los niveles de NO se estimaron cargando a las células con una mezcla de Fura2-AM y DAF-FM diacetato (un sensor fluorescente de NO). Subsecuentemente, en cada célula se midió la fluorescencia del DAF-FM diacetato y se normalizó por la correspondiente a Fura2 (excitado en su punto isobéptico, o insensible a  $Ca^{2+}$ ). La barra gris corresponde a células tratadas con aldosterona y la negra a los respectivos controles, tal como se cómo se indica en la figura anterior. Tomada de Ríos-Pérez *et al.*, 2016.

Actualmente se desconocen las bases moleculares que subyacen el efecto de aldosterona en los niveles de NO. Sin embargo, es posible que involucren una regulación negativa de la expresión de enzimas que sintetizan a esa molécula en cardiomiocitos (nNOS y eNOS primordialmente). Al respecto, es importante mencionar que en la línea celular HL-1, una exposición crónica a altos niveles de ROS provoca una menor expresión de nNOS ( Figura 17)

Con base en lo anterior, se puede especular que los niveles bajos de NO observados en la Figura 16 obedecen a que una probable sobreproducción de ROS (véanse los efectos del antioxidante NAC, Figura 15) estaría inhibiendo el nivel de expresión de nNOS (Figura 17) y en consecuencia la tasa de síntesis de NO (Figura 16). Obviamente, falta demostrar que todo esto efectivamente sucede, en miocitos auriculares de animales adultos.



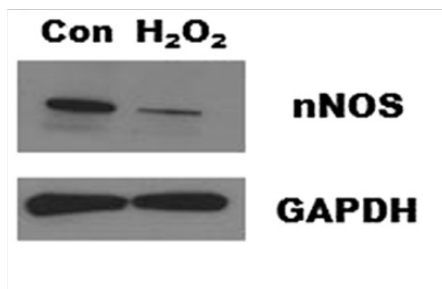
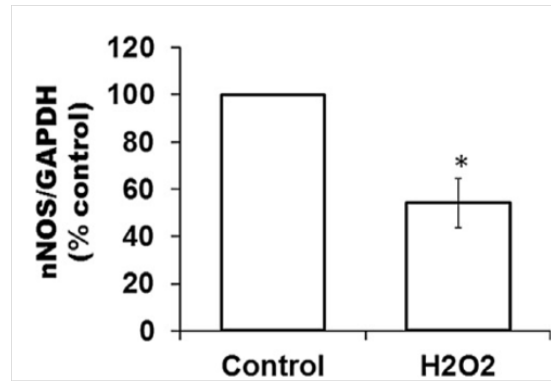
**A****B**

Figura 17. La incubación con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) inhibe a largo plazo la expresión de nNOS en células HL-1. A) Inmunoblots representativos que muestran la presencia de nNOS y su respectivo control de carga (GAPDH) en células expuestas ( $H_2O_2$ ) o no (Con) a  $200 \mu M$  de  $H_2O_2$ , durante 24 h. B) Promedio de intensidad de bandas estudiadas como se ilustra en A, debidamente normalizadas. Los datos fueron obtenidos a partir de 3 experimentos. Tomada de Kar *et al.*, 2015.

### 3 Justificación

La información que tenemos acerca de los efectos de aldosterona en miocitos auriculares primarios es limitada. La mayoría de la información proviene de líneas celulares o es una extensión de lo que sucede en miocitos ventriculares. Lo anterior es sorprendente, dado que el aldosteronismo está directamente asociado con la incidencia de fibrilación auricular.

Lo que sabemos es que, en miocitos auriculares de rata adulta, un tratamiento crónico con aldosterona provoca varios efectos, tales como: mayor duración del PA, alta densidad de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y de  $\text{K}^+$  sostenida ( $I_{\text{Ksus}}$ ), mayor valor de  $C_m$ , transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  de magnitud exacerbada, incidencia elevada de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  fuera de ritmo, y bajos niveles de NO.

En teoría, una mayor actividad del NCX podría contribuir a explicar no sólo la mayor duración del PA, sino también la generación de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  fuera de ritmo. De igual forma, un aumento en la ganancia del acople EC podría contribuir a entender la magnitud exacerbada de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Por otra parte, datos obtenidos no sólo en estas células sino también en otros modelos de cardiomiocitos (ventriculares y HL-1) sugieren que las ROS podrían ejercer un papel intermediario en algunos de los efectos crónicos del esteroide (concretamente, en  $C_m$  y nNOS).

En consecuencia, surge la necesidad de investigar posibles efectos crónicos de aldosterona en la ganancia del acople EC, niveles de ROS y expresión de NCX y NOS.

## **4 Hipótesis**

Aldosterona regula propiedades electrofisiológicas en miocitos auriculares de adultos, mediante cambios en la disponibilidad de especies reactivas de oxígeno, la actividad o expresión del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , y nivel de expresión de óxido nítrico sintasas.

## **5 Objetivos**

### **5.1 Objetivo General**

Investigar si aldosterona regula a largo plazo la expresión o actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , el nivel de expresión de óxido nítrico sintasas y niveles de especies reactivas de oxígeno.

## 5.2 Objetivos particulares

Cultivar miocitos auriculares de rata adulta en condiciones control y presencia de aldosterona, durante 4-6 días, e investigar:

- a. Valores de  $C_m$  y diámetro celular
- b. La ganancia del acople EC
- c. Si aldosterona modifica la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
- d. Cantidad proteica de NOX2, NOX4, ALDH2, NCX, eNOS y nNOS
- e. Niveles de producción de NO y ROS
- f. Si un activador de la enzima ALDH2 (Alda-1) previene las consecuencias de la producción elevada de ROS (alteraciones en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , hipertrofia y posibles cambios en NOS).
- g. Si un inhibidor de la ALDH2 (Daidzina) mimetiza efectos de aldosterona y ROS.
- h. El curso temporal en el que se establecen los posibles cambios en los niveles de ROS, así como la correspondiente curva dosis-respuesta.
- i. Si un cofactor de la NOS ( $\text{BH}_4$ ) previene los cambios observados a nivel de NO y ROS.

## 6 Materiales y métodos

### 6.1 Cultivo primario de cardiomiocitos auriculares de rata adulta

Para la obtención de cardiomiocitos auriculares se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de entre 220-250 gramos y una edad de 10-12 semanas. Previo a extraer el corazón las ratas se anestesiaron vía intraperitoneal, utilizando una mezcla de Ketamina (10 mg/Kg) y Xilazina (100 mg/Kg). Una vez que la rata fue anestesiada se verificó la ausencia de reflejos y se extrajo el corazón de la cavidad torácica, el cual se colocó en un sistema de perfusión retrograda (sistema de Langendorff), el cual permitió perfundir soluciones a temperatura constante a través del corazón aislado (Figura 18). Este protocolo cuenta con la aprobación de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio del Cinvestav (UPEAL, protocolo # 0199-16).

Mediante el sistema de Langendorff se perfundió una solución DB (*digestion buffer*) la cual contiene (en mM): NaCl 130, KCl 5.4, HEPES ácido 25, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.28, MgCl<sub>2</sub> 0.5, ácido láctico 1, ácido pirúvico 3, glucosa 22 e insulina 5 nM, esta solución se suplementó con 0.2 mM de EGTA y se mantuvo a una temperatura de 37°C, lo cual permitió eliminar los restos de sangre del corazón. Posteriormente se procedió a realizar la digestión enzimática del corazón, para ello se perfundió en primer lugar la solución de digestión I (DB suplementado con 1.5 mg/ml de Colagenasa Tipo II, 0.04 mg/ml de Proteasa y CaCl<sub>2</sub> 50 µM) a 37 °C a través del corazón por 5-7 min. Después de la digestión enzimática se procedió a realizar la disección de la aurícula derecha del corazón, la cual se sumergió en solución I a 37 °C por 1-2 min para posteriormente realizar el proceso de dispersión mecánica con la finalidad de obtener cardiomiocitos individuales.

Una vez dissociadas, las células se filtraron, utilizando una tela de nylon estéril para eliminar el tejido remanente. Posteriormente se transfirieron a un tubo cónico con 15 ml de la solución II (DB suplementado con 0.86 mg/ml de Colagenasa Tipo II, 0.04 mg/ml de proteasas, 0.017% de BSA y  $\text{CaCl}_2$  83.3  $\mu\text{M}$ ). La suspensión celular se centrifugó durante 1 min a 500 rpm y se dejó reposar durante 20 min, para permitir que las células se precipiten. Posteriormente se retiró el sobrenadante y el paquete celular se re-suspendió en 10 ml de solución III (DB suplementado con 0.01 % de BSA, y 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ ). Nuevamente se dejaron en reposo 20 min, para que las células precipitaran. Subsecuentemente, el sobrenadante se eliminó y el paquete celular se re-suspendió en 10 ml de solución IV (DB suplementado con 0.01 % de BSA y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  y se dejó reposar durante 20 min.

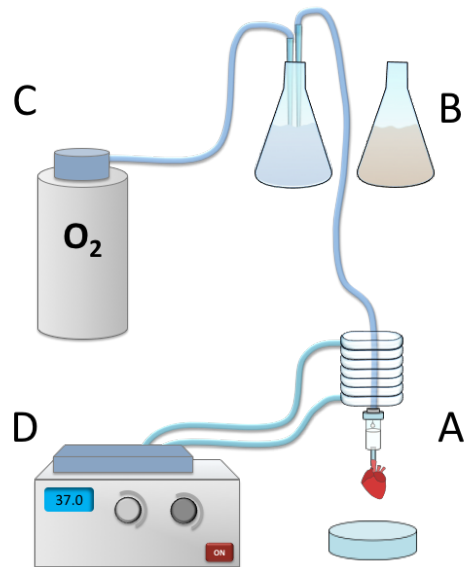


Figura 18. Esquema del sistema de Langendorff que se utilizó para la extracción de cardiomiocitos auriculares. A) En este sistema el corazón se canula a través de la aorta. B) Mediante una perfusión retrógrada se hace pasar por el corazón una solución que contiene enzimas de digestión (colagenasa tipo II y proteasas). C, D) La temperatura de la solución de digestión se mantiene con oxigenación constante y a una temperatura de 37 °C. Modificada de Louch *et al.*, 2011.

Las células obtenidas fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio recubiertos con laminina (0.1 mg/ml) y se incubaron durante 10 min, con la finalidad de que se fijen al sustrato. Posteriormente se colocaron en cajas Petri de 35 mm y se mantuvieron en medio de cultivo

Eagle's modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), 4 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomicina, a 37° C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas.

Al término de la incubación anterior, el medio de cultivo fue remplazado por otro con una composición similar pero cuyo FBS había sido previamente inactivado (a 56°C, por 30 min). Aquí las cajas se dividieron en al menos dos condiciones experimentales: "Control" y "Aldosterona". En el caso de ésta, al medio de cultivo se le adicionó aldosterona a las concentraciones que se indican en la sección de resultados. Las células se mantuvieron en incubación y el medio de cultivo se reabasteció cada tercer día. Los experimentos se llevaron a cabo 4-6 días posteriores al inicio del tratamiento, excepto para la determinación del curso temporal del efecto en ROS, que abarcó desde el día 1 al día 6 de cultivo.

## 6.2 Modelo celular

El objetivo del proyecto fue investigar efectos crónicos de aldosterona, tales como los que se revisaron en la sección denominada Antecedentes. Lo que esto implica es que dichos efectos no se presentan en cardiomiocitos frescos o "recién disociados". De hecho, los efectos comienzan a ser perceptibles hasta después de 1 día de haber iniciado el tratamiento y su valor máximo se observa entre los días 4 y 6 (Figura 9 y Figura 10). En otras palabras, los cardiomiocitos se mantienen en cultivo durante varios días, alejándose de la situación *in vivo* (Bistola *et al.*, 2008; Hammer *et al.*, 2010; Louch *et al.*, 2011; Mitcheson *et al.*, 1998). Además de cambios electrofisiológicos, los miocitos auriculares sufren una drástica transformación morfológica, adoptando una forma casi esférica en vez de alargada (Figura 19).

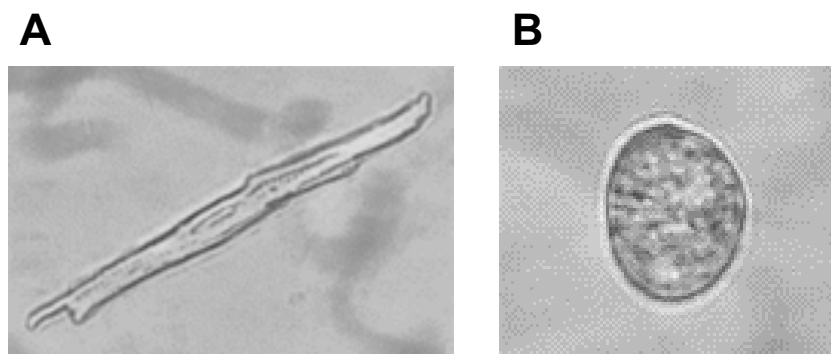


Figura 19. Imágenes representativas de miocitos auriculares recién extraídos (A) y cultivados 6 días bajo condiciones control (B). Las imágenes fueron obtenidas con objetivos de 25X (A) y 40X (B), Tomada de tesis de Doctorado Ríos-Pérez, 2015; véase también Judd *et al.*, 2016.

Para eliminar como variable los cambios que suceden bajo condiciones control y en función del tiempo (“espontáneos”), los datos derivados de células expuestas a aldosterona sólo se cotejaron con aquellos obtenidos el mismo día de cultivo en células control. También es importante subrayar que la mayoría de los experimentos se llevaron a cabo a los días 4-6, tiempo al cual saturan no solo los cambios “espontáneos” sino también los efectos de aldosterona (por ejemplo, en  $C_m$ , y canales de calcio; Figura 9 y Figura 10).

### 6.3 Registro simultáneo de corriente de $Ca^{2+}$ tipo L ( $I_{Ca}$ ) y transitorios de $Ca^{2+}$

Mediante experimentos de fijación de voltaje con la técnica de *patch-clamp*, en su configuración *whole-cell* se realizaron mediciones de corriente ( $I_{Ca}$ ) y transitorios de calcio. Para ello los cardiomiocitos se colocaron en solución externa de registro la cual contiene (en mM): Acido Metasulfónico 140, HEPES ácido 10,  $CaCl_2$  5,  $MgSO_4$  2, 4-Aminopiridina (4-AP) 5, ácido antraceno 9-carboxílico (9-AC) 1, 2,3-Butanediona monoxima (2,3-BDM) 2, TEA-OH 115 y Glucosa 10. El pH se ajustó a 7.3 con hidróxido de tetraetilamonio (TEA), y



la osmolaridad fue de  $\sim 300$  mOsm/kg. El 2,3-BDM se utilizó como inhibidor de la actividad de ATPasa de las miocinas y de esa manera se disminuye la probabilidad de que las células se contraigan y agoten sus niveles de ATP.

El registro de  $I_{Ca}$  se realizó utilizando electrodos de vidrio de borosilicato con resistencia de 3-5  $M\Omega$ , los cuales se llenaron previamente con solución interna de registro la cual contenía en (mM): Cs-Aspartato 100, Cs-EGTA 1, CsCl 10, HEPES ácido 10,  $CaCl_2$  0.2, glucosa 10, GTP-Tris 0.05, ATP-Mg 5, TEA-Cl 20,  $MgCl_2$  1 y Fluo-4 K5 0.2. El pH se ajustó a 7.3 con hidróxido de cesio (CsOH) y la osmolaridad fue de  $\sim 290$  mOsm/kg.

Una vez que el electrodo se posicionó en la membrana plasmática se aplicó succión leve, con la intención de obtener una alta resistencia eléctrica ( $> 1 G\Omega$ , o giga sello). Se aplicó un pulso de voltaje de -10 mV y se estimó la capacitancia asociada a esta configuración (*cell-attached*).

Luego se aplicó una succión más fuerte, para romper el parche de membrana debajo del electrodo, alcanzándose la configuración de *whole-cell*. Se instaló un potencial de mantenimiento (o HP, del inglés *holding potential*) de -50 mV, y se aplicó otro pulso de -10 mV. Los trazos de corriente obtenidos en estas dos configuraciones se restaron entre sí ( $I_{whole-cell} - I_{cell-attached}$ ), el resultado se dividió entre el cambio de voltaje (-10 mV) y se calculó la integral de la corriente capacitiva resultante. El resultado es lo que conocemos como capacitancia membranal ( $C_m$ ), la cual es proporcional al tamaño de la superficie membranal.

Para activar a los canales de  $Ca^{2+}$  y en consecuencia generar  $I_{CaL}$  y transitorio de  $Ca^{2+}$ , se aplicaron pulsos despolarizantes, de 30 ms a + 10 mV. Para eliminar contaminación por corrientes lineales, la corriente de membrana se sometió a un protocolo de resta, denominado p/N (integrado en el programa Clampfit v.10.3.1.4).

El fluoróforo (Fluo-4) se excitó utilizando una lámpara de mercurio de 100 W y longitudes de onda que van de 470 a 490 nm. Por su parte, la emisión de fluorescencia ( $F$ ) se registró utilizando un filtro de 515-550 nm. Dicha emisión ( $F$ ) se cuantificó utilizando un fotomultiplicador Hamamatsu (R1527P). Los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron calculados conforme a la siguiente ecuación:

$$\frac{\Delta F}{F} = \frac{F_{(t)} - Fb}{Fb}$$

donde  $F_{(t)}$  significa el nivel de fluorescencia en función del tiempo, y  $Fb$  su basal registrada justo antes de la aplicación del pulso de voltaje.

Para calcular la ganancia en el acople EC (*ECC gain*), en cada uno de los voltajes de prueba utilizados se dividió el valor máximo de la amplitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  por la respectiva magnitud de  $I_{\text{Ca}}$ .

## 6.4 Análisis de proteínas por Western-Blot.

Los niveles de expresión de las proteínas NOX2, NOX4, ALDH2, NCX, eNOS y nNOS fueron evaluados como se describe a continuación. Los cardiomiocitos se lavaron con PBS frío, para después ser lisados añadiendo un volumen equivalente a 2X de buffer RIPA (en mM: EGTA 1,  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  1, NaCl 150, Tris-HCl 20 a un pH de 7.5, pirofosfato de sodio 2.5,  $\beta$ -glicerofosfato 1,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1, NaF 10, deoxicolato de sodio 1% y NP-40 1%).

El lisado celular se recolectó en un tubo eppendorf y se sometió a sonicación, posteriormente se cuantificó la concentración de proteínas totales (mg/ml), mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

Subsecuentemente, las muestras de proteína (25  $\mu\text{g}$ ) se cargaron en geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS) y se separaron electroforéticamente (PAGE). Una vez separadas las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), las cuales posteriormente se sometieron a un proceso de bloqueo con BSA al 3 % por alrededor de 10 horas (*overnight*).

Tras el proceso de bloqueo las membranas se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente, con uno de los siguientes anticuerpos primarios (dilución cercana a 1:1000): anti-NCX (R3F1, Swant), anti-eNOS (610296, BD Bioscience), anti-nNOS (610308, BD Bioscience), anti-NOX2/gp91phox (ab129068, ABCAM), anti-NOX4 (ab133303, ABCAM), anti-ALDH2 (ab108306, ABCAM), and anti- $\beta$ -*tubulin* (322600, Invitrogen).

Posteriormente las membranas se lavaron 4 veces (8 min, cada vez) utilizando PBS-Tween y luego se incubaron con un anticuerpo secundario, durante 1 h y utilizando una dilución de 1:12000. Al concluir el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario se realizaron 3 lavados (de 10 min cada uno) con PBS-Tween. Finalmente se adicionó luminol a la membrana de PVDF y se procedió a revelar en una placa fotográfica.

Los resultados obtenidos para cada proteína se normalizaron utilizando la señal de  $\beta$ -*tubulin*, detectada en la misma membrana en la cual se analizó la señal de las otras proteínas. El análisis densitométrico se realizó utilizando el software ImageJ de NIH.

## **6.5 Medición de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO)**

Los niveles de producción de ROS y NO se midieron utilizando dos sensores fluorescentes permeables CM-H<sub>2</sub>DCFDA y DAF-FM DA, respectivamente. Brevemente, las células se

incubaron con uno de los sensores y Fura-2 AM ( $3 \mu\text{M}$  de c/u). Subsecuentemente, se registró el nivel de fluorescencia de cada uno, y la correspondiente al sensor se normalizó por la de Fura-2, para cada célula. Ambos sensores CM-H<sub>2</sub>DCFDA y DAF-FM DA fueron excitados a longitudes de onda centradas en 485 nm, mientras que la emisión de fluorescencia ( $F$ ) se registró utilizando un filtro centrado en 538 nm.

Es importante enfatizar que el Fura-2 se utilizó únicamente como referencia, y se excitó a una longitud de onda que corresponde a su punto isobéptico o insensible a  $\text{Ca}^{2+}$  (360 nm). Dicha referencia es necesaria, puesto que sirve para eliminar como variables la actividad de esterasas y el volumen celular.

## 6.6 Medición del diámetro celular

Con la finalidad de determinar posibles cambios en el tamaño celular, los cardiomiocitos fueron transferidos de la incubadora a una cámara de registro con solución DB (véase cultivo celular), misma que se encuentra acoplada a un microscopio de objetivo invertido y a una cámara de video con sensor CCD (MyoCam-S) que forma parte del equipo IonOptix (IonOptix, Milton, MA-EE.UU; (Santamaria-Herrera *et al.*, 2016) el cual mediante un sistema de detección del contraste en los bordes celulares permite realizar la medición del diámetro celular de manera individual.

## 6.7 Registro de transitorios de $\text{Ca}^{2+}$ en células intactas

Para estimar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en células intactas, los cardiomiocitos se cargaron con el indicador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$ , Fluo-4 AM por 15 min. Posteriormente se lavaron utilizando

solución DB (véase cultivo celular) suplementada con 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  por 15 minutos con la finalidad de eliminar residuos del fluoróforo. Una vez cargadas, las células se sometieron a un protocolo similar al reportado por Hohendanner y colaboradores ( Figura 8; Hohendanner *et al.*, 2014).

Brevemente, las células se estimularon eléctricamente (3 pulsos de 20 ms, a 0.5 Hz), utilizando el sistema MyoPacer Field Stimulator de la marca IonOptix (Santamaria-Herrera *et al.*, 2016) y después del último estímulo se aplicó cafeína (10 mM) por 25 s, utilizando un sistema de perfusión rápido (VC-6M Mini-Valve System, Warner Instruments). Los cambios en la fluorescencia del indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-4 se registraron utilizando un filtro de 470 - 490 nm (excitación), un espejo dicróico centrado a 505 nm y un filtro de emisión de 515-550 nm. Dicha emisión ( $F$ ) se cuantificó utilizando un fotomultiplicador Hamamatzu (R1527P).

La fase de caída de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  evocados por estimulación eléctrica y por cafeína se ajustaron a una función exponencial y la constante de tiempo obtenida en presencia de este alcaloide ( $\tau_{\text{CAFF}}$ ) se consideró como indicador de la actividad del NCX.

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ( $\sim 22$  °C), en presencia de una solución DB suplementada con 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (exceptuando los ensayos de *patch-clamp* en donde se utilizó una solución externa de registro). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SE y fueron analizados con el software PClamp y SigmaPlot. A menos que se indique lo contrario, las comparaciones estadísticas (tratamientos versus control) se realizaron mediante pruebas t de Student.

## 7 Resultados

### 7.1 Aldosterona aumenta la $C_m$ y el diámetro celular

Se ha reportado que un tratamiento crónico con aldosterona incrementa la capacitancia de membrana ( $C_m$ ), la cual se considera directamente proporcional a la cantidad de superficie membranal (Ríos-Pérez *et al.*, 2016). En este trabajo se decidió investigar si el aumento en  $C_m$  se acompaña de un mayor tamaño celular. Inicialmente se trató de corroborar el efecto en  $C_m$ , encontrándose que efectivamente, el tratamiento con aldosterona ( $1 \mu\text{M}$  por 4-6 días) incrementa significativamente su valor (en aproximadamente un 20 %). Esto se puede observar en la Figura 20A.

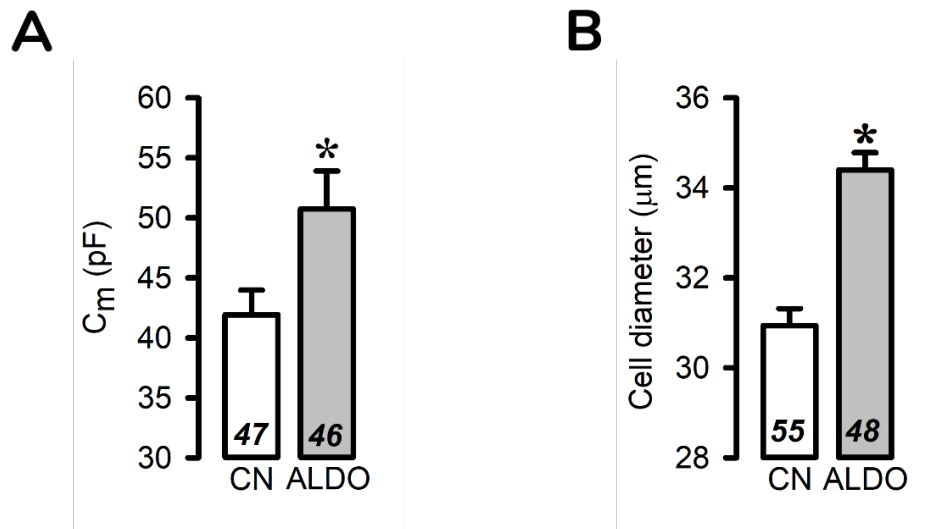


Figura 20. Efectos de la aldosterona en  $C_m$  y el diámetro celular. En los mocitos auriculares tratados crónicamente con aldosterona por 4-6 días (ALDO) se observó un aumento significativo (~20%) en  $C_m$  (A) utilizando  $1 \mu\text{M}$  de aldosterona con respecto a la condición de control (CN). Aldosterona ( $100 \text{ nM}$ ) también provocó un aumento en el tamaño celular (B). Los datos se obtuvieron a partir de un mínimo de 46 células (números al interior de las barras). \*  $p < 0.05$ .

En la Figura 20B se muestran los datos que obtuvimos de la medición del diámetro celular. En diámetro promedio fue cercano a  $31 \mu\text{m}$  y  $34 \mu\text{m}$ , para células control y tratadas con aldosterona, respectivamente. La diferencia es pequeña ( $\sim 3 \mu\text{m}$ ), pero estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Estos datos indican que el tratamiento con aldosterona ( $100 \text{ nM}$  por 5 días) sí provoca un aumento significativo en el tamaño celular (alrededor de  $10 \%$ ; Figura 20B).

## 7.2 Aldosterona estimula la liberación de $\text{Ca}^{2+}$ del retículo sarcoplásmico sin afectar a $I_{\text{Ca}}$

Nuestro siguiente objetivo fue investigar si aldosterona además de incrementar la densidad de la  $I_{\text{Ca}}$  (Ríos-Pérez *et al.*, 2016), provoca cambios en la liberación de calcio intracelular asociado con el acople excitación-contracción (Figura 21).

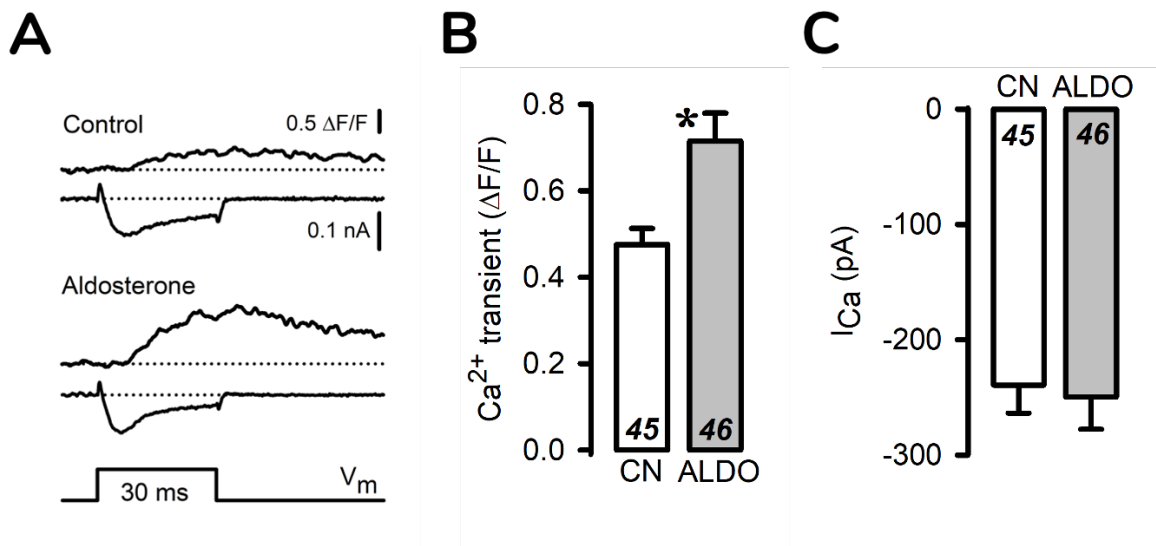


Figura 21. Registro simultáneo de  $I_{\text{CaL}}$  y transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$ . A) Ejemplos de  $I_{\text{CaL}}$  y transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  registrados en células control y tratadas con aldosterona  $1 \mu\text{M}$ . El pulso de voltaje (a +10 mV) se aplicó a partir de un HP de -50 mV ( $V_m$ ). B, C) Las graficas de barras muestran los valores promedio obtenidos a partir de trazos como los que se grafican en A) así como el número de células investigadas en cada condición. \*  $p < 0.05$ .

Tal como se puede apreciar en la Figura 21A, en este trabajo fuimos capaces de registrar simultáneamente a  $I_{CaL}$  y su respectivo impacto en el  $Ca^{2+}$  intracelular (transitorio de  $Ca^{2+}$ ). Más precisamente, la Figura 21A muestra ejemplos representativos de los registros obtenidos en una célula cultivada en condiciones estándar de registro (**Control**; trazos del panel superior) o en presencia de aldosterona (**Aldosterone**; trazos del panel inferior). Las líneas horizontales representan ya sea el nivel basal de calcio citosólico o el nivel cero de  $I_{CaL}$ .

Al observar los trazos representativos da la impresión de que aldosterona induce la presencia de transitorios de  $Ca^{2+}$  de mayor amplitud; y efectivamente, los datos obtenidos a partir de  $\sim 90$  células indican que la hormona induce un incremento cercano al 50 % en la magnitud de dichos transitorios (Figura 21B).

Quizás más interesante, la mayor amplitud del transitorio no se acompañó del incremento en  $I_{CaL}$  previamente reportado (Ríos-Pérez et al., 2016). Más precisamente, en las presentes condiciones de registro no se observaron cambios significativos en la magnitud máxima (o al pico) de  $I_{CaL}$  (Figura 21A y C). En la sección de Discusión se expone una posible explicación para esta aparente contradicción.

### 7.3 Ganancia del acople Excitación-Constracción (ECC)

Para investigar si aldosterona induce cambios en la ganancia del acople EC, se dividió la magnitud del transitorio de  $Ca^{2+}$  entre su respectiva  $I_{CaL}$ , de cada célula presentada en las Figura 21B y 21C. Los valores promedio obtenidos se muestran en la Figura 22.



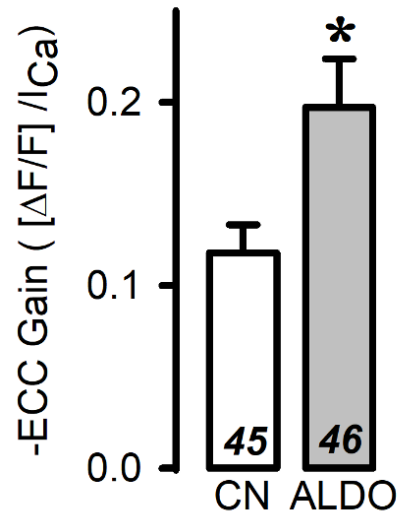


Figura 22. Ganancia del acople EC (-ECC Gain). Las graficas muestran los valores promedio del cociente de los valores de la magnitud del transitorio de  $Ca^{2+}$  entre  $I_{Ca}$ , a partir de los datos mostrados en la figura previa. \*  $p < 0.05$ .

Tal como se puede apreciar, en las células expuestas a aldosterona los valores calculados de ganancia son aproximadamente un 70 % mayores que sus respectivos controles. Esto sugiere que el tratamiento con la hormona provoca mayor liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por  $Ca^{2+}$  (CICR) como se puede observar en la Figura 22.

El incremento en CICR podría estar relacionado con un mayor contenido de  $Ca^{2+}$  del RE disponible para ser liberado o quizás con cambios en la actividad de los RyRs, por lo que resulta de interés investigar si el tratamiento con aldosterona promueve cambios en la homeostasis de  $Ca^{2+}$ . Este punto se retomará más adelante.

## 7.4 Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la producción y eliminación de ROS

Las principales enzimas relacionadas con la modulación de los niveles de ROS en cardiomiocitos son NOX2, NOX4 y ALDH2 (Gomes *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2005; Lassègue *et al.*, 2012; Nabeebaccus *et al.*, 2011; Zhang, J. *et al.*, 2012). Por lo tanto, el siguiente objetivo fue investigar si aldosterona provoca cambios en la expresión de estas enzimas.

Respecto a los niveles de expresión de NOX2 resultaron ser prácticamente idénticos, entre ambas condiciones experimentales, como se observa en la gráfica de la Figura 23A; mientras que aquellos correspondientes a NOX4 (Figura 23B) y ALDH2 (Figura 23C), si bien mostraron una tendencia a ser mayores en células expuestas a la hormona, no presentaron cambios estadísticamente significativos ( $p= 0.196$ , NOX4;  $p= 0.194$ , ALDH2). Estos datos nos indican que aldosterona no promueve alteraciones en la expresión de estas enzimas.

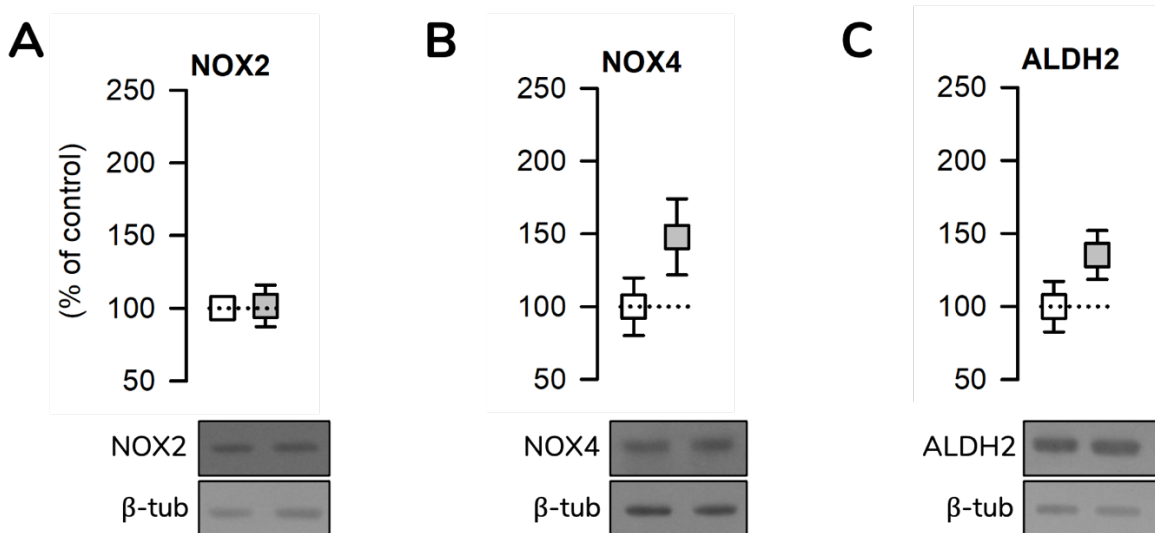


Figura 23. Niveles de expresión de NOX2, NOX4 y ALDH2. Se grafican datos de densitometría (normalizados por la señal de  $\beta$ -tubulina) que reflejan el nivel de expresión de NOX2 (A), NOX4 (B) y ALDH2 (C). En la parte inferior de las gráficas de densitometría se muestran fotografías representativas de los *Western blots* que fueron obtenidas para cada una de las proteínas investigadas. Los símbolos abiertos y grises representan células control y tratadas con aldosterona ( $1\mu\text{M}$ ), respectivamente. Los datos son el promedio de un total de 3 experimentos.

## 7.5 Niveles de expresión de las sintasas de óxido nítrico (eNOS y nNOS)

Resultados obtenidos previamente por Ríos-Pérez y colaboradores (2016) mostraron que aldosterona provoca una disminución significativa en la producción de óxido nítrico (NO, Ríos-Pérez *et al.*, 2016) por lo que decidimos evaluar si el tratamiento con aldosterona provoca cambios en la expresión de dos isoformas de las sintasas de NO: endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS).

En ambos casos (eNOS y nNOS) la señal obtenida para estas proteínas se normalizó por aquella correspondiente a  $\beta$ -tubulina, la imagen representativa de los *western blots* para cada proteína analizada se muestra en los paneles inferiores de la Figura 24 (A y B). Lo que se observó es que los niveles de expresión de ambas sintasas presentaron una tendencia a ser mayores en cardiomiocitos expuestos a aldosterona con respecto a sus respectivos controles (Figura 24A y B); sin embargo, no se lograron detectar cambios significativos ( $p=0.41$ , eNOS;  $p=0.69$ , nNOS).

En consecuencia, no es posible asociar la disminución en la producción de NO con alteraciones en la expresión de estas proteínas, por lo que dicha disminución más bien podría deberse a cambios en la actividad de una o ambas sintasas (aspecto que deberá ser estudiado detalladamente, en un futuro cercano).

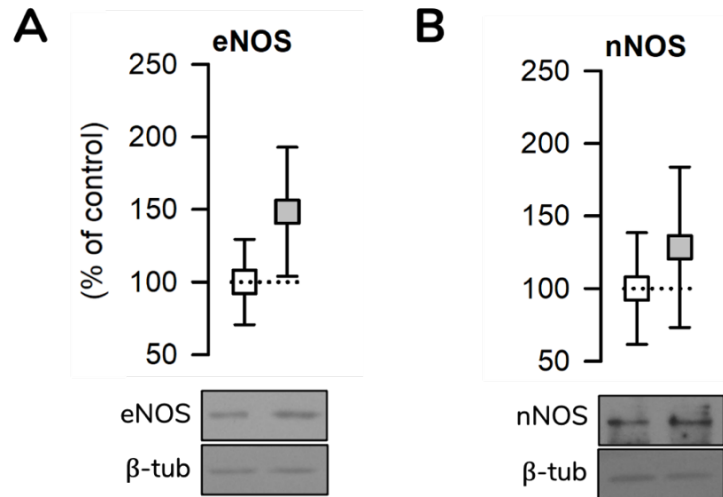


Figura 24. Niveles de expresión de eNOS y nNOS en cardiomiocitos auriculares control (cuadros abiertos) y tratados con aldosterona (1 $\mu$ M, cuadros grises). Las gráficas muestran datos promedio de densitometría que reflejan la expresión de eNOS (A) y nNOS (B) En la parte inferior se muestran las fotografías representativas de los *western blots* correspondientes a cada proteína analizada (N=3).

## 7.6 Efecto de aldosterona en los niveles de expresión del intercambiador de Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX)

Datos previos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que el tratamiento crónico con aldosterona modifica la duración del potencial de acción (PA) en los cardiomiocitos auriculares, particularmente en la fase cuatro del PA, sin que hasta el momento se conozcan las causas subyacentes (Ríos-Pérez *et al.*, 2016).

En seguida se investigó el nivel de expresión del NCX (Figura 25), el cual participa de manera importante en la fase cuatro del PA y en teoría podría explicar las alteraciones en la duración del PA. El experimento consistió en comparar la inmunoreactividad que se detectó con un kit de quimioluminiscencia y la señal obtenida para el NCX se normalizó por aquella correspondiente a  $\beta$ -tubulina. Las imágenes representativas se muestran en la parte inferior de la Figura 25. Se puede ver que, en la muestra de células tratadas con aldosterona (a la

*derecha*) existe mayor señal del NCX, respecto a su respectivo control (a la *izquierda*) y de hecho, se logró detectar un aumento significativo de más del 100 % (Figura 25, parte superior).

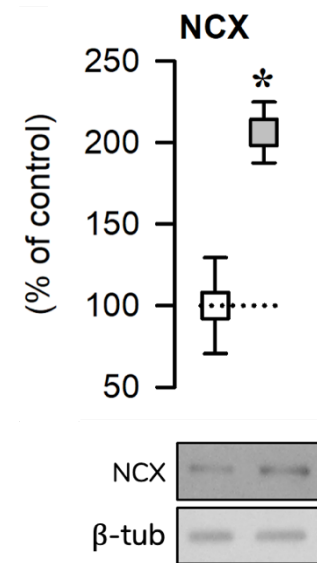


Figura 25. Niveles de expresión del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) que fueron obtenidos en miocitos auriculares control (cuadros abiertos) y tratados con aldosterona ( $1\mu\text{M}$ , cuadros grises). Los datos se obtuvieron tal como se describe en las figuras 21 y 22. \*  $p < 0.05$ ,  $N=3$ .

## 7.7 Comportamiento de los niveles de ROS en células control y tratadas con aldosterona en función del tiempo en cultivo.

Datos obtenidos en células ventriculares de rata neonata y en cardiomiocitos auriculares de la línea celular HL-1 sugieren que aldosterona promueve un incremento en la producción de ROS (Hayashi *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2010). Sin embargo, se desconoce si algo similar sucede en cardiomiocitos auriculares de rata adulta.

Por lo tanto, en seguida investigamos los niveles de producción de ROS en células control y expuestas a aldosterona, en función del tiempo en cultivo (Figura 26).

Interesantemente, como podemos observar en el curso temporal de la Figura 26, la hormona provocó una mayor producción de ROS (círculos grises), la cual se evidenció a partir de las primeras 48 horas y alcanzó niveles máximos en los días 4-6 de cultivo.

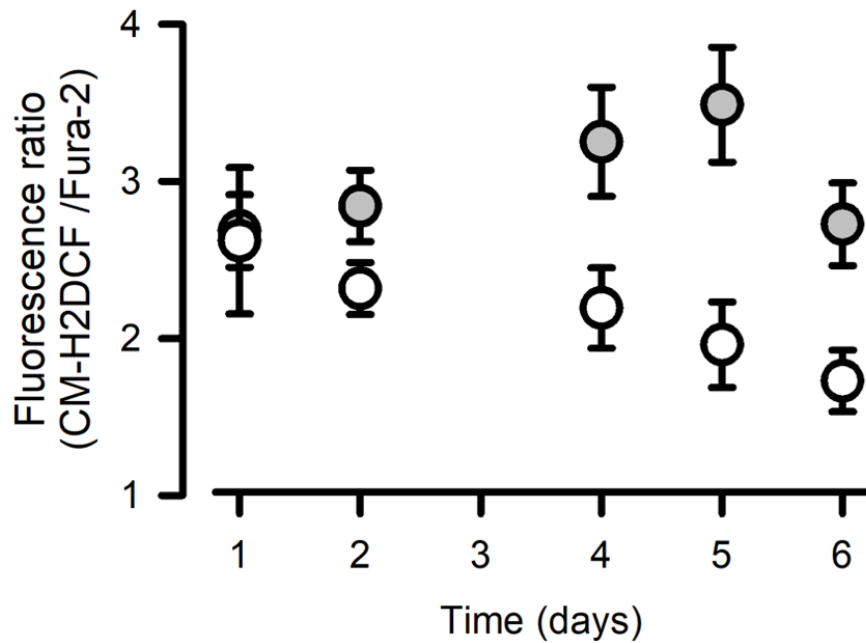


Figura 26. Curso temporal del efecto de aldosterona en la producción de ROS. Promedio de los valores del cociente de fluorescencia (CM-H2DCF/Fura-2) que fue registrado en cardiomiocitos auriculares en condiciones control (círculos vacíos) y tratadas con aldosterona (100 nM, círculos grises). Cada punto de datos refleja el promedio de un total de 17 a 24 células investigadas.

## 7.8 El efecto en la producción de ROS es dependiente de la concentración de aldosterona

En la Figura 26 se observa que 100 nM de aldosterona aumenta la producción de ROS, y el efecto es mayor a los días 4-6 de tratamiento. En seguida nos preguntamos si dicho efecto es dependiente de la concentración de la hormona. Lo que se hizo fue medir la producción de ROS a los 5 días de tratamiento, y se usaron varias concentraciones de la hormona. Los datos obtenidos se muestran en la

Figura 27.

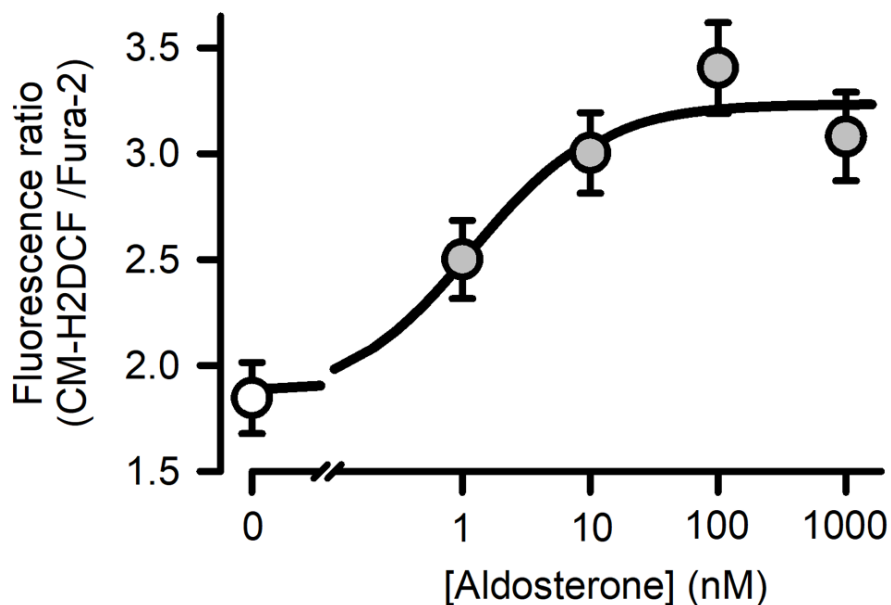


Figura 27, Adosterona incrementa la producción de ROS en cardiomiocitos auriculares de manera concentración-dependiente. Cada punto en la gráfica es el promedio de los valores del cociente de fluorescencia (CM-H2DCF/Fura-2) registrado en un total de 44-46 células. Las mediciones se hicieron al día 5 de cultivo, utilizando diferentes concentraciones de aldosterona (nM). La  $EC_{50}$  calculada fue de 1.2 nM, con un coeficiente de Hill de 0.9.

Tal como se puede apreciar, la producción de ROS comienza a incrementarse desde 1 nM y el efecto satura a concentraciones cercanas a 100 nM. A los datos experimentales se ajustó

una curva calculada utilizando a la ecuación de Hill, encontrándose que el efecto presenta un coeficiente de Hill de 0.9 y una  $EC_{50}$  de 1.2 nM (

Figura 27). Estos datos son compatibles con la afinidad que muestra el dominio de unión a ligando del MR por aldosterona ( $EC_{50} = 1$  nM; Rogerson et al., 1999)

## **7.9 La tetrahidrobiopterina (BH4) previene los efectos de aldosterona en NO y ROS**

Previamente se demostró que, en nuestro modelo de cardiomiocitos auriculares, aldosterona inhibe la producción de NO (Figura 16; Ríos-Pérez *et al.*, 2016). Sin embargo, ese efecto no está asociado con una menor expresión de las isoformas endotelial y neuronal de las NOS (Figura 24); por lo tanto, nos preguntamos si podría deberse a un desacople de NOS, que a su vez podría estar siendo ocasionado por una probable oxidación de tetrahidrobiopterina (BH4; Vásquez-Vivar *et al.*, 1998, 2003; Werner *et al.*, 2003).

Notablemente, se encontró que al suplementar el medio de cultivo con BH4 se previno el efecto de aldosterona en NO (Figura 28A). Adicionalmente, se observó que esta maniobra también atenúa la sobreproducción de ROS inducida por el esteroide (Figura 28B). Estos datos sugieren que en el estrés oxidativo inducido por aldosterona participa una síntesis de ROS por NOS (es decir, NOS desacopladas; véase la Figura 4).

En términos más generales, los datos sugieren que aldosterona activa un ciclo en el que se aumenta la producción de ROS, lo cual promueve la oxidación de BH4, limitando su biodisponibilidad durante la síntesis de NO (Véase Figura 4) y esto a su vez resulta en mayor



producción de ROS a expensas de disminuir la síntesis de NO.

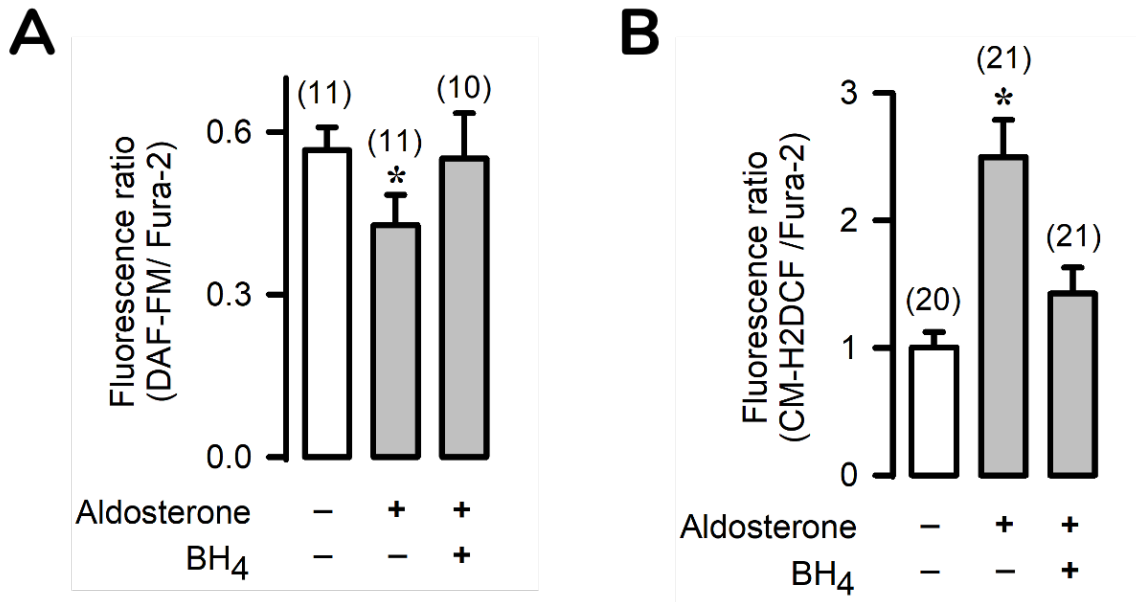


Figura 28. En cardiomiocitos tratados con adosterona 100 nM de manera crónica, por 5 días; la administración del cofactor de NOS, BH<sub>4</sub> (10  $\mu$ M), previene una disminución en los niveles de NO y un incremento en los niveles de ROS. Las gráficas muestran los valores promedio de los cocientes de fluorescencia de los indicadores de NO (DAF-FM; A) y ROS (CM-H2DCF; B) normalizados por la fluorescencia de Fura-2. Los números arriba de las barras indican el número de células investigadas. \* p< 0.05.

### 7.10 ALDH2 interfiere en los efectos de aldosterona, a nivel de hipertrofia y producción de ROS y NO.

En seguida nos interesó descubrir si la regulación de ALDH2 (usando Daidzina y Alda-1 (Keung y Vallee, 1998; Perez-Miller *et al.*, 2010) interfiere con las acciones de aldosterona. Con este fin, en adelante sólo se trabajó con las siguientes condiciones experimentales; y los datos se muestran conforme código que se indica en paréntesis: células control (*barra blanca*), células tratadas con aldosterona (*barra gris*), células tratadas con Daidzina (*barra blanca con rombos*) y células tratadas con aldosterona y Alda-1 (*barra gris con rombos*).

Tal como se puede apreciar en la Figura 29A, Daidzina elevó la producción de ROS, en aproximadamente el mismo nivel que aldosterona; es decir, un ~80 % por encima del valor control. Por su parte, el resultado del tratamiento mixto con aldosterona y Alda-1 fue que se previene el incremento en los niveles de ROS relacionado con la administración de la hormona (Figura 29A).

De igual forma, el efecto de aldosterona en NO fue mimetizado por Daidzina e impedido por Alda-1 (Figura 29B). De hecho, Alda-1 no sólo impidió la reducción inducida por aldosterona en los niveles de NO, sino que elevó la tasa de producción por encima del nivel control basal (en aproximadamente un 50 %; Figura 29B), sin que hasta el momento se conozca a qué se debe este efecto.

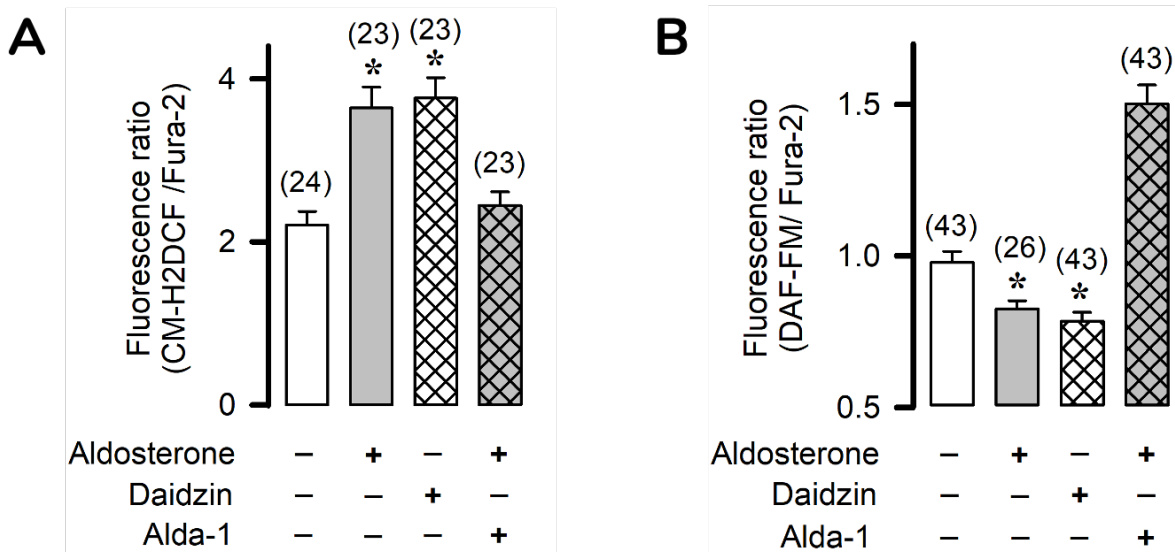


Figura 29. ALDH2 conecta con las vías de señalización involucradas en la regulación de radicales libres por aldosterona. Se muestran valores promedio de la producción de ROS (A) y NO (B) que fueron registrados en células cultivadas en condiciones control o en presencia de: aldosterona (100 nM), Daidzina y aldosterona + Alda-1. Las mediciones se realizaron el día 5 de cultivo y en todos los casos Alda-1 se adicionó 30 minutos antes de iniciar el tratamiento con aldosterona. \* P< 0.05.

Dado que aldosterona promueve hipertrofia cardíaca *in vivo* (Park *et al.*, 2004; Takeda *et al.*, 2002), nos preguntamos si este efecto se relaciona con una posible acción directa en el miocito cardíaco (Figura 30).

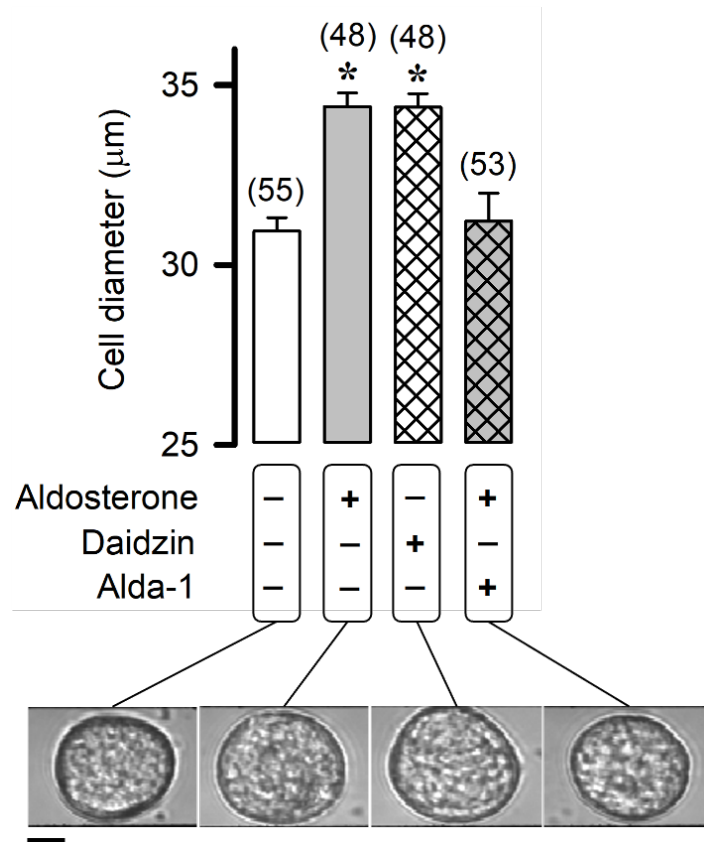


Figura 30. Análisis del tamaño celular. Se muestran los valores promedio del diámetro celular que fueron registrados en células cultivadas bajo las mismas condiciones experimentales que en la figura anterior. El inserto presentado en la parte inferior de la gráfica corresponde a imágenes de campo claro que fueron obtenidas de células con un diámetro cercano a la media de cada condición experimental. La barra de calibración horizontal significa 10 µm. \* P < 0.05.

Conforme a esa posibilidad, aldosterona promovió un aumento significativo en el diámetro celular (~ 3 µm). Quizás más interesante, este cambio morfológico fue reproducido por Daidzina e impedido por Alda-1 tal como se aprecia en los datos presentados en la gráfica de la Figura 30. El incremento en el diámetro los cardiomiocitos tratados con la hormona y daidzina es evidente también en las fotografías de campo claro de las células que podemos

observar en el inserto localizado en la parte inferior de la misma figura.

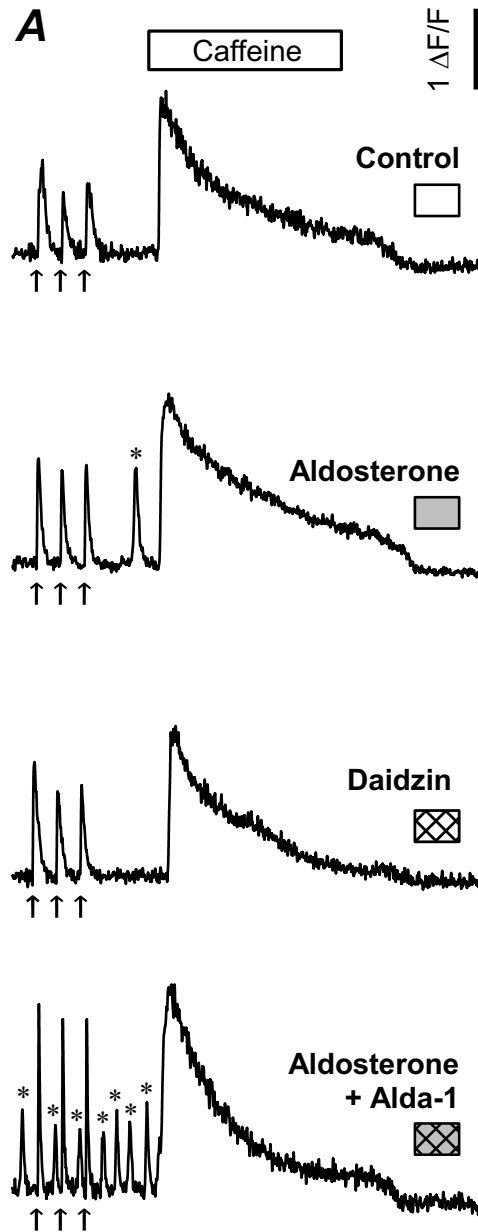
### 7.11 Los moduladores de ALDH no interfieren con la regulación de la homeostasis de $\text{Ca}^{2+}$ por aldosterona

Los datos obtenidos con Alda-1 (20  $\mu\text{M}$ ) y Daidzina (20  $\mu\text{M}$ ) sugieren que la actividad de ALDH2 está acoplada con los efectos de aldosterona (100 nM) a nivel de producción de especies reactivas y tamaño celular (Figura 29 y 30). Por lo tanto, enseguida nos preguntamos si algo similar sucede con la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ . El diseño experimental se puede observar en la Figura 31.

Básicamente, se monitoreó el nivel basal de calcio segundos antes de aplicar un tren de pulsos eléctricos con la finalidad de inducir transitorios de calcio (Figura 31, flechas). Aquí es importante mencionar que algunas células presentaron "oscilaciones espontáneas de calcio"; es decir, transitorios de calcio que se observan de manera asincrónica con relación a los estímulos eléctricos (Figura 31, asteriscos). Al término de la estimulación eléctrica se aplicó un pulso de cafeína (10 mM, 25 s) y un subsecuente lavado (Figura 31, *Caffeine*).

---

Figura 31. Registros representativos de los niveles de calcio intracelular. Se muestran trazos representativos de niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  que fueron registrados en cardiomiocitos cultivados en condiciones: control, aldosterona (100 nM), Daidzina y aldosterona + Alda-1. En todos los casos las células fueron sometidas en primer lugar a estimulación eléctrica de campo (3 pulsos de 20 V a una frecuencia de 1 Hz, flechas) y posteriormente a un pulso de cafeína (10 mM, 25 s). Los eventos de liberación espontánea de  $\text{Ca}^{2+}$  están marcados con asteriscos (\*). Las cajas por debajo del título de cada condición experimental representan un código que se utilizó para identificar a dichas condiciones rápidamente, en figuras subsecuentes.



Este protocolo (Figura 31) se aplicó a un total de 248 células. Particularmente, a 60 células cultivadas en condiciones testigo (Control), 62 tratadas con aldosterona 100 nM (Aldosterone), 78 cultivadas en presencia de Daidzina (Daidzin) y 48 células que fueron incubadas en presencia de aldosterona y Alda-1 (Aldosterone + Alda-1). Los valores promedio de las mediciones que obtuvimos se muestran en la Figura 32.

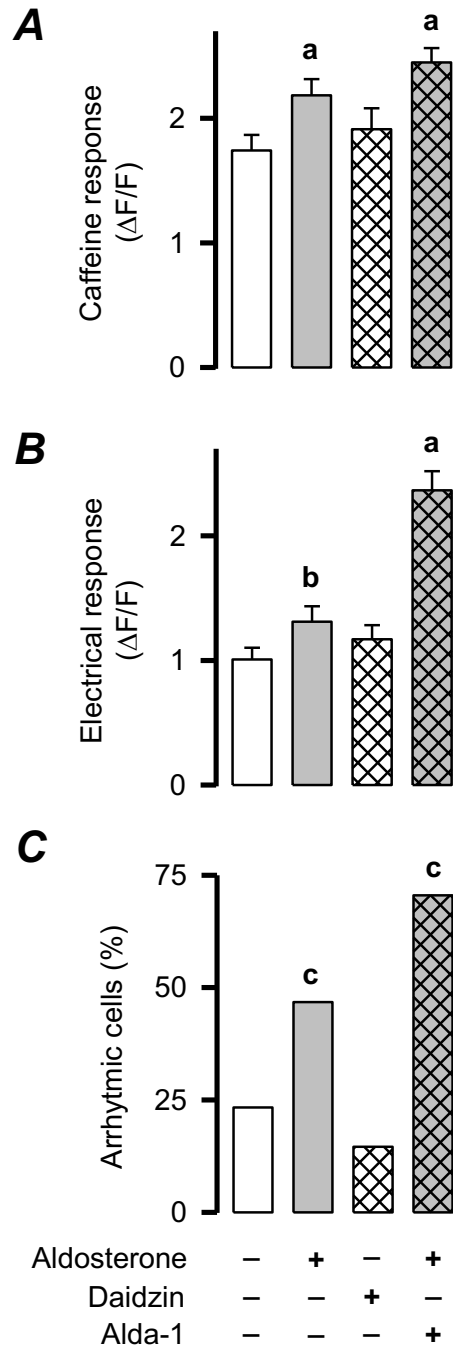


Figura 32. Los moduladores de ALDH2 no previenen ni mimetizan el efecto de aldosterona (100 nM) en la homeostasis de Ca<sup>2+</sup>. Se muestran los valores promedio de la magnitud de los transitorios evocados por estimulación eléctrica (A) y por cafeína (C), así como el porcentaje de células que presentó eventos de liberación de Ca<sup>2+</sup> fuera de ritmo de estimulación eléctrica (*Arrhythmic cells*). Los datos provienen de un total de 248 células (60 Control, 62 Aldosterona, 78 Daidzina y 48 Aldosterona + Alda-1) y fueron obtenidos a partir de trazos como los que se ilustran en la figura 30. <sup>a</sup>p < 0.05, <sup>b</sup>p = 0.056, <sup>c</sup>p < 0.05 — prueba  $\chi^2$ .

Los datos indican que aldosterona incrementó la magnitud de la respuesta a cafeína (Figura 32A; *Caffeine response*), lo cual sugiere que la hormona optimiza el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS que se encuentra disponible para ser liberado y está de acuerdo con los datos reportados por Ríos-Pérez y sus colaboradores (2016).

Este efecto se asoció con una tendencia de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$ , evocados eléctricamente, a ser de mayor magnitud que en condiciones control (Figura 32B). La hormona también provocó una mayor incidencia de oscilaciones espontáneas de  $\text{Ca}^{2+}$  ("células arrítmicas", Figura 32C). Por su parte, daidzina y Alda-1 fueron incapaces de imitar y prevenir, respectivamente, estos efectos de aldosterona (Figura 32A-C). Un aspecto interesante es que, en lugar de ser inhibidos, dichos efectos fueron más acentuados por Alda-1 (Figura 32A-C).

De hecho, en la condición de aldosterona más Alda-1 también se observó un marcado aumento en la fracción de calcio del RS que se logra liberar mediante estimulación eléctrica (Figura 33A: *Fractional SR Ca release*), así como un aumento en la velocidad de caída de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  evocada eléctricamente (Figura 33B). En relación con la cinética de decaimiento los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por cafeína, la cual refleja la actividad del NCX, no encontramos cambios significativos (Figura 33C;  $\tau_{CAFF}$ ).

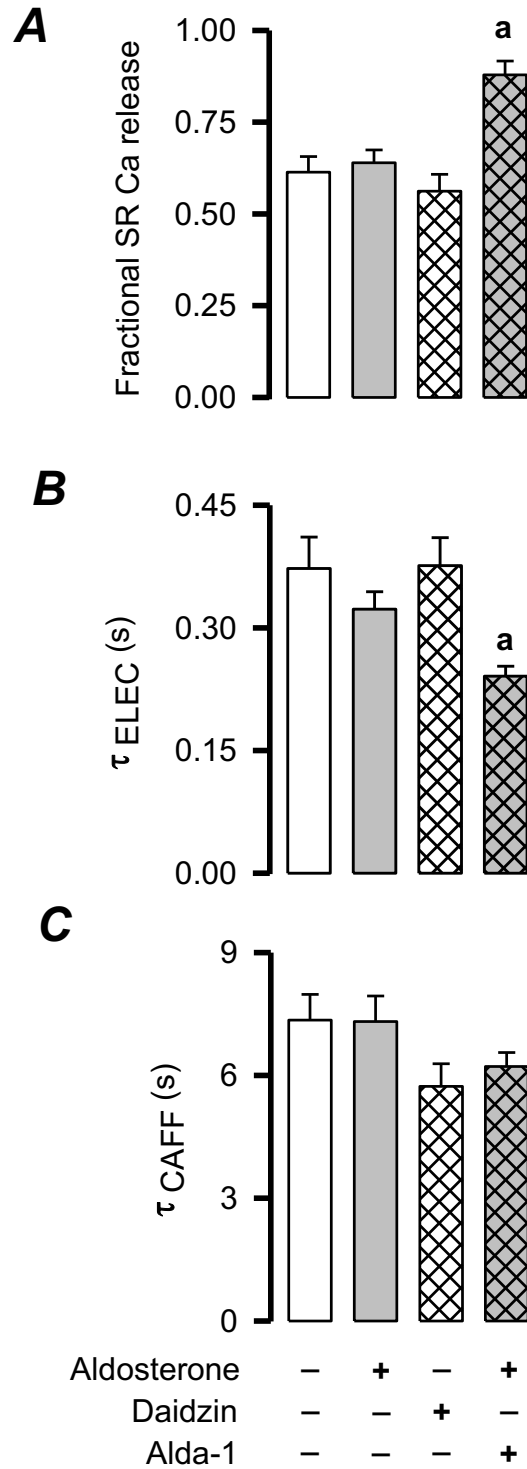


Figura 33. El uso combinado de aldosterona y Alda-1 optimiza la fracción de  $Ca^{2+}$  del RS liberado por estimulación eléctrica e incrementa la velocidad de recaptura del ion al RS. Se muestran valores de la fracción de  $Ca^{2+}$  del RS liberado por estimulación eléctrica (A) y las constantes de tiempo con que decae el transitorio de  $Ca^{2+}$  inducido eléctricamente (B,  $\tau_{ELEC}$ ) o por cafeína (C,  $\tau_{CAFF}$ ). Los datos fueron estimados a partir de trazos como los que se ilustran en la figura 29 y representan los promedios obtenidos a partir de las mismas células que en la figura 31. \* $p < 0.05$ .



## 8 Discusión

El presente trabajo describe los efectos del tratamiento crónico con aldosterona en miocitos auriculares adultos. Dichos efectos incluyen: hipertrofia, estrés oxidativo, desacople de las NOS, sobreexpresión del NCX, y modificaciones en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. En particular, este último se caracteriza por mayor contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE disponible para ser liberado, estimulación de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS, y susceptibilidad de desarrollar eventos de liberación espontánea de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los datos fueron obtenidos en células que estuvieron expuestas a la hormona de 1 a 6 días y el cambio en la producción de ROS se detectó a partir del segundo día. Además, todas las mediciones se llevaron a cabo en células sumergidas en una solución salina, libre de aldosterona. Todo esto fue con la finalidad de estudiar únicamente efectos a largo plazo y permanentes, los cuales en teoría se podrían explicar con base en el mecanismo general de acción de la hormona; es decir, activación del MR y modificaciones subsecuentes a nivel de expresión génica y por ende de proteínas. No obstante, de las proteínas investigadas únicamente detectamos cambios en el NCX, y esto no se acompañó de sendas modificaciones en el funcionamiento y capacidad del intercambiador para movilizar calcio. Por lo tanto, es probable que la mayor abundancia del NCX sea algo secundario; es decir, que no se encuentre dentro de los efectos primordiales o al inicio de las acciones de la hormona.

Lo que sí parece ser fundamental, es que las células expuestas al esteroide se mantienen en un estado que se caracteriza por mayor liberación de calcio del RS, estrés oxidativo e hipertrofia. La mayor liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , a su vez, podría explicar el estrés oxidativo, puesto que una posible sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial podría estar provocando mayor síntesis de ROS. No obstante, aquí conviene mencionar otra posibilidad muy interesante y que convendría explorar más adelante es que aldosterona también genere estrés oxidativo mediante una inhibición en el nivel de expresión de proteínas que pertenecen al sistema de defensa antioxidante.

Un dato que nos parece muy interesante es que el estímulo en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS se observó tanto en células intactas como en condiciones de *whole-cell patch-clamp*. De hecho, en esta última condición experimental también se logró estudiar a la corriente de calcio ( $I_{\text{Ca}}$ ), misma que no resultó afectada por el tratamiento con la hormona. Lo anterior sugiere que el efecto en la homeostasis del calcio obedece a cambios que se llevan a cabo a nivel del RS, primordialmente.

En conjunto, los datos de las Figura 31–33 sugieren que el uso combinado de aldosterona y Alda-1 promueve mayor actividad de SERCA (menor valor de  $\tau_{\text{ELEC}}$ , sin cambio en  $\tau_{\text{CAFF}}$ ). En teoría la mayor actividad de la bomba podría ser debida al mayor nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Figura 32B, Aldosterona + Alda-1) que resulta del incremento en liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS. No obstante, también hay que tener en mente una posibilidad muy interesante, que se esté incrementando el nivel de expresión de SERCA. Esta posibilidad deberá ser investigada cuidadosamente en un trabajo futuro.

Adicionalmente, y tomando en cuenta los datos de la Figura 25, se puede concluir que la sobreexpresión del NCX que provoca aldosterona, aparentemente, no se acompaña de un mayor número de intercambiadores funcionales en la membrana plasmática ya que no se observó una disminución en los valores de  $\tau_{\text{CAFF}}$ , aún cuando observamos un incremento en la magnitud del transitorio de calcio (Figura 33C).

Previamente se reportó que aldosterona aumenta la densidad de  $I_{\text{Ca}}$  (Ríos-Pérez *et al.*, 2016); sin embargo, a la fecha desconocemos el mecanismo preciso para entender por qué el efecto en  $I_{\text{Ca}}$  se logra o no detectar. Una de las posibles explicaciones es que existe una diferencia metodológica, entre ambos estudios, que pudiera ser la clave para encontrar dicho mecanismo.

La diferencia consiste en que el efecto en  $I_{Ca}$  se observó utilizando una alta capacidad buffer de  $Ca^{2+}$  en el citosol; concretamente, 10 mM de EGTA, mientras que en este trabajo utilizamos 1 mM. Por lo tanto, más adelante sería conveniente registrar a  $I_{Ca}$  en presencia de concentraciones crecientes de este quelante de calcio (en el electrodo). Si la hipótesis fuese verdadera, se esperaría que el efecto se fuera desenmascarando, paulatinamente.

Otra posibilidad es que, los canales de calcio tipo L estén siendo regulados de manera autócrina. En teoría, el mensajero químico extracelular involucrado se estaría perdiendo selectivamente en los experimentos de esta tesis, pero no en los de Ríos-Pérez. En este caso, la diferencia metodológica involucrada sería que Ríos-Pérez no aplicó un recambio de la solución de registro extracelular tan exhaustivo como el que se utilizó en este trabajo y que es necesario para eliminar el Fluo-4 que se fuga de la micropipeta a la solución extracelular, cuando se intenta registrar a cada una de las células.

Nuestros datos indican que aldosterona eleva el valor de capacitancia membranal o  $C_m$  (Figura 20A; Ríos-Pérez *et al.*, 2016) y el diámetro celular (Figura 30), lo cual sugiere que los cardiomiocitos adultos desarrollan hipertrofia cuando se cultivan en presencia de la hormona (en teoría, el incremento en  $C_m$  podría deberse a un incremento en las invaginaciones de la membrana de los cardiomiocitos y no necesariamente a un aumento en el tamaño celular y para distinguir entre estas dos posibles explicaciones, fue necesario realizar la medición del diámetro celular).

En el trabajo de Ríos-Pérez y colaboradores (2016) se reportó que el incremento en  $C_m$  se puede prevenir suplementando el medio de cultivo ya sea con un quelante de calcio (EGTA) o el antioxidante N-acetilcisteína (NAC, Figura 16). Esta observación sugiere que la hipertrofia que desarrollan los miocitos depende tanto de  $Ca^{2+}$  como de ROS; sin embargo, no permite establecer una relación causa-efecto, entre estos dos segundos mensajeros.

No obstante, en esta tesis se observó que el activador de ALDH2 frenó tanto la respuesta hipertrófica como la sobreproducción del ROS, pero falló en disminuir el estímulo en de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . No sólo eso, la Daidzina *per-se* generó tanto hipertrofia como estrés oxidativo, sin afectar la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 31, 31 y 32). Estos datos indican que el estrés oxidativo promueve hipertrofia, incluso en ausencia de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  exacerbada (condición experimental: *Daidzina*). Pero no al revés; es decir, en ausencia de estrés oxidativo la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  exacerbada no genera hipertrofia, (condición experimental: *Aldosterona + Alda 1*). En otras palabras, la sobreproducción de ROS y la subsiguiente hipertrofia están ambas ubicadas "rio abajo" del catión divalente, en un orden jerárquico que consiste en  $\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{ROS} \rightarrow \text{hipertrofia}$ .

Existe evidencia de que aldosterona regula la expresión y funcionamiento de proteínas que son fundamentales para el acople EC. Así, se ha reportado que la activación del receptor a mineralocorticoides disminuye el nivel de expresión de FKBP. Esta proteína actúa como subunidad accesoria del RyR y contribuye a mantener al canal en el estado cerrado. En consecuencia, la activación del MR y la subsiguiente menor expresión de FKBP se traducen en una mayor actividad de los RyRs (Gómez *et al.*, 2009).

Adicionalmente, se ha propuesto que la fosforilación de los RyRs por PKA desfavorece la interacción RyR-FKBP y en consecuencia, dicha fosforilación también provoca que existan canales con mayor probabilidad de apertura (Vest *et al.*, 2005). En este punto es importante mencionar que Ríos-Pérez y colaboradores (2016) reportaron que la activación crónica del MR se acopla positivamente con la señalización del cAMP y PKA (el incremento en la densidad de  $I_{\text{Ca}}$  depende de esta vía de señalización; Ríos-Pérez *et al.*, 2016). Por lo tanto, es posible aldosterona estimule la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de promover que se remuevan las FKBP de los RyR (ya sea al disminuir la expresión y abundancia de las primeras, o promoviendo la fosforilación por PKA de los segundos). Este esquema podría llevar a un vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio, lo cual en nuestros experimentos no se observó. Al contrario, existe una sobrecarga de calcio que podría explicarse por un aumento en el nivel de expresión de SERCA y como ya se mencionó antes, esto debería ser investigado

en trabajos subsecuentes. Alternativamente, lo que podría explicar el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  del RS es una posible fosforilación por PKA de fosfolamban, lo cual redundaría en mayor actividad de SERCA.

Aparte del supuesto rol que se mencionó para la FKBP12, existe otra posibilidad para entender la mayor liberación de calcio del RS, que conviene no perder de vista. En teoría, ésta se pudo haber originado por una posible hiperactividad de los RyRs, en respuesta a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS (Figura 32A, *respuesta a cafeína*). Recientemente, a este fenómeno se le ha llamado SOICR (del inglés *Store Overload-Induced  $\text{Ca}^{2+}$  release*; Jiang et al., 2004).

La activación de una fosfatasa llamada calcineurina estimula una cascada de señalización que resulta en hipertrofia cardíaca (Molkentin *et al.*, 1998). Un aspecto interesante es que, además de promover hipertrofia, la aldosterona aumenta la actividad y expresión de calcineurina. De hecho, la respuesta hipertrófica de la hormona se ve atenuada al inhibir a esta fosfatasa (Takeda *et al.*, 2002).

No sólo eso, resulta que al cultivar a los cardiomiocitos de animales neonatos en presencia de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se promueve un aumento de casi 3 veces en la actividad de calcineurina (He, H. *et al.*, 2014). Por lo tanto, el aumento en el tamaño celular que provocan la aldosterona y Daidzina (Figura 30) se pudo haber originado en una posible regulación de calcineurina por estrés oxidativo; a nivel de actividad y expresión génica.

Además de la calcineurina, CaMKII también promueve el desarrollo de hipertrofia, a través de una vía de señalización que actúa en paralelo con aquella de la fosfatasa (Passier et al., 2000). Aquí es conveniente mencionar que la aldosterona también provoca una oxidación de la CaMKII, y eso resulta en mayor actividad de esta quinasa (He, B. J. *et al.*, 2011). Por lo tanto, la respuesta hipertrófica (Figura 30) también se puede explicar con base en una posible oxidación y activación de CaMKII.

Los cardiomiocitos neonatales que se mantienen en cultivo, así como ciertas líneas celulares de origen cardíaco responden a la aldosterona aumentando la producción de ROS (Figura 13 y 14; Hayashi *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2019; Tsai *et al.*, 2010). Adicionalmente, nuestros datos muestran, por primera vez, que el cultivo de cardiomiocitos adultos en presencia de este esteroide también provoca un marcado aumento en el nivel de producción de ROS. Por lo tanto, los efectos de aldosterona a nivel de estrés oxidativo del órgano cardíaco y sus respectivas implicaciones para la situación *in vivo* se deben, al menos en parte, a que el miocito cardíaco aumenta la producción de ROS por ser un blanco directo de la hormona. Dicha conclusión no es trivial, ya que estos datos nos ayudan a entender porqué el aldosteronismo se asocia con estrés oxidativo en el músculo cardíaco; sin necesidad de recurrir a esquemas elaborados que impliquen efectos en distintos tejidos, hormonas y neurotransmisores y que podrían llevar a pensar que el impacto en los miocitos cardíacos es "de rebote."

Los datos de la Figura 28A muestran que aldosterona inhibe la producción de NO en un 20 %, aproximadamente; es decir, un porcentaje menor al que se observó anteriormente (~ 55 %; Ríos-Pérez *et al.*, 2016). En teoría, esta discrepancia se puede explicar debido a que se usaron distintas concentraciones de la hormona: 100 nM (este trabajo) versus 1000 nM (Ríos-Pérez *et al.*, 2016). Por lo tanto, una curva concentración-respuesta del efecto en la producción de NO probablemente estaría saturando con valores superiores a 100 nM (contrario a lo que sucede con la regulación de ROS, la cual satura con 10 nM; Figura 27).

Se piensa que el prevenir el desacople de NOS podría ser relevante, clínicamente hablando. Esto se debe a que existe una correlación positiva entre la relación de concentraciones BH4/BH2 y una marcada mejoría en los síntomas que presentan modelos animales de enfermedades cardíacas (por ejemplo, isquemia miocárdica, disfunción vascular e hipertensión; Werner *et al.*, 2011). Además, en otros trabajos se ha reportado que existe una correlación positiva entre el desacople de NOS y la FA humana (Kim *et al.*, 2005). Lo anterior, en combinación con la presente observación de que el BH4 previene el desarrollo de estrés oxidativo (Figura 28B), sugiere que evitar el desacople de NOS también podría

ayudar a contrarrestar los efectos adversos del aldosteronismo, incluyendo a la FA. Con relación a ALDH2, si bien es cierto que su activación fue capaz de prevenir el estrés oxidativo y la hipertrofia (Figura 29 y 30), también es cierto que dicha activación podría llevar a empeorar el desbalance en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  que provoca aldosterona (Figura 31–33).

Nuestro hallazgo de que Alda-1 se opone a la regulación positiva de ROS que provoca aldosterona es acorde con la idea de que el compuesto activa directamente a ALDH2 y en consecuencia acelera el metabolismo del 4-HNE. Esta interpretación se basa en que la actividad de ALDH2 oxida a un grupo carbonilo del 4-HNE, formándose un ácido carboxílico (Breitzig *et al.*, 2016). Dicha acción es desintoxicante, puesto que interrumpe el siguiente círculo vicioso: el 4-HNE, producto de la peroxidación lipídica, se une a blancos moleculares en la mitocondria (e.g., un canal de aniones dependiente de voltaje o VDAC1 y el uniportador de calcio mitocondrial o MCU). Mediante un mecanismo, que aún no está bien definido, esto último conduce a una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en dicho organelo, así como a una mayor tasa de generación de ROS (Santin *et al.*, 2020; Zhang, R. *et al.*, 2020).

A la fecha no contamos con un mecanismo preciso que nos permita entender el siguiente resultado inesperado, para el caso de Alda-1: aumentos exacerbados tanto en la tasa de síntesis de NO como en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS. En ambos casos, la aplicación de Alda-1 provoca que se eleven los niveles correspondientes, pero muy por encima de lo observado en células control o tratadas con aldosterona. Las siguientes evidencias nos llevan a pensar que estos efectos podrían estar interrelacionados: 1) se ha demostrado que el NO regula la actividad de muchas proteínas que participan en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , ya sea directamente (a través de una modificación postraduccional denominada S-nitrosilación) o indirectamente (mediante la modulación de cascadas de señalización); y 2) se sabe que, en reciprocidad, la función de las NOS es un evento que depende del  $\text{Ca}^{2+}$  (Busse y Mülsch, 1990; Hare, 2003). Esperamos que en un futuro cercano se logre demostrar esta hipótesis. En ese mismo sentido, se requiere un esfuerzo adicional para encontrar evidencia que nos lleve a entender por qué el aumento que provoca aldosterona en el nivel de expresión del NCX no se traduce en una mayor la tasa de eflujo de  $\text{Ca}^{2+}$ . En términos más generales, también sería interesante adoptar

enfoques experimentales distintos, que nos lleven a estudiar estas cuestiones. Por ejemplo, utilizando otros métodos para detectar radicales libres y analizando posibles modificaciones postraduccionales en los principales blancos moleculares del NO y ROS. Adicionalmente, el papel de ALDH2 se podría reevaluar tratando de manipular el nivel de expresión de la enzima.

Tomados en conjunto, nuestros datos indican que: En ausencia de sobreproducción ROS, una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS exacerbada no es suficiente para provocar hipertrofia. Por el contrario, la sobreproducción ROS sí induce hipertrofia, incluso en ausencia de una liberación estimulada de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS. ALDH2 previene la hipertrofia y el estrés oxidativo inducido por aldosterona, pero exagera el estímulo correspondiente en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS. Aún no sabemos si la hipertrofia también se puede prevenir promoviendo el acople de NOS, y si eso sucede sin estimular más la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (respecto al tratamiento con Aldosterona).

De manera más concisa, los resultados de esta tesis sugieren que aldosterona induce una secuencia de eventos jerárquicos, en donde la producción ROS se encuentra ubicada justo en el centro, concretamente:  $\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{ROS} \rightarrow \text{hipertrofia}$ .



## 9 Conclusiones

A. En miocitos auriculares de rata adulta un tratamiento crónico con aldosterona:

1. Provoca sobreproducción de ROS y el efecto comienza a ser evidente a partir de las primeras 48 horas, alcanza un máximo en los días 4-6 y depende de la concentración de la hormona ( $EC_{50} = 1.2$  nM, con coeficiente de Hill de 0.9)
2. No modifica los niveles de expresión de proteínas relacionadas con la producción o eliminación de ROS (NOX2 y NOX4 y ALDH2) y NO (eNOS y nNOS)
3. Causa un incremento significativo en los niveles de expresión del NCX.
4. Atenúa la tasa de producción de NO.
5. Incrementa la susceptibilidad de desarrollar oscilaciones de  $Ca^{2+}$  fuera de ritmo, lo cual se acompaña de una mayor carga de  $Ca^{2+}$  del RS disponible para ser liberado, así como de una clara tendencia a desarrollar transitorios de  $Ca^{2+}$  de amplitud exacerbada.
6. Aumenta el diámetro y la capacitancia membranal ( $C_m$ ) de las células.
7. Promueve que los transitorios de  $Ca^{2+}$  sean de mayor amplitud, en ausencia de cambios en la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$ ; como consecuencia, también induce una mayor ganancia del acople EC.

B. Un cofactor de las sintasas de óxido nítrico ( $BH_4$ ) previene los efectos de aldosterona a nivel de NO y ROS

C. Por su parte los compuestos que modulan a la enzima ALDH2, tales como Daidzina (inhibidor) y Alda-1 (activador) mimetizan y previenen, respectivamente:

1. El incremento en la producción de ROS
2. La disminución en la producción de NO
3. Los cambios en el tamaño celular

- D. En contraste, la daidzina no mimetiza la estimulación de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS por aldosterona y dicho efecto no es prevenido sino enfatizado por Alda-1.
- E. Adicionalmente, el activador de ALDH2 (Alda-1) induce un incremento en la velocidad de decaimiento de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  evocados por estimulación eléctrica, lo cual sugiere una mayor velocidad de recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$  al RS por la bomba SERCA, que a su vez podría estar siendo provocada por la mayor amplitud de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  y una posible mayor expresión de SERCA.
- F. La actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  se mantiene constante en todas las condiciones experimentales investigadas (Control, Aldosterona, Daidzina y Aldosterona más Alda-1).

## 10 Perspectivas

- 1) Cultivar miocitos auriculares de rata adulta en condiciones control y presencia de aldosterona, durante 4-6 días, e investigar:
  - a) Niveles de expresión de SERCA.
  - b) El curso temporal y la curva dosis respuesta de los cambios en NO.
  - c) Posibles cambios en el nivel de expresión de una subunidad accesoria de RyR (FKBP12/12.6), ya que previamente se reportó que en miocitos ventriculares la expresión de esta proteína disminuye, provocando mayor actividad del RyR.
  - d) El estado redox de RyR2, NCX y CaMKII, ello debido a que estas proteínas son susceptibles a oxidación, lo que puede modificar su función y por tanto la homeostasis de  $Ca^{2+}$
  - e) Los detalles involucrados en el proceso del desacople de NOS (Uncoupled-NOS)
  - f) Si BH4 previene el efecto hipertrófico, así como las alteraciones en la homeostasis de  $Ca^{2+}$
  - g) Si aumenta la expresión de la cadena pesada de miosina, lo cual se usa como un marcador de hipertrofia.
  - h) La actividad del NCX usando otros métodos, con el fin de explicar porque no se observó mayor actividad, aún cuando se presenta un incremento significativo en los niveles de expresión

## 11 Bibliografía

- Alkaitis y Crabtree. (2012). Recoupling the cardiac nitric oxide synthases: Tetrahydrobiopterin synthesis and recycling. *Current Heart Failure Reports*, 9(3), 200–210. DOI:10.1007/s11897-012-0097-5
- Alnouti y Klaassen. (2008). Tissue distribution, ontogeny, and regulation of aldehyde dehydrogenase (Aldh) enzymes mRNA by prototypical microsomal enzyme inducers in mice. *Toxicological Sciences*, 101(1), 51–64. DOI:10.1093/toxsci/kfm280
- Anderson, Brown, y Bers. (2011). CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(4), 468–473. DOI:10.1016/j.yjmcc.2011.01.012
- Andrew y Mayer. (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*, 43(3), 521–531. DOI:10.1016/S0008-6363(99)00115-7
- Arolfo, Overstreet, Yao, Fan, Lawrence, Tao, Keung, Vallee, Olive, Gass, Rubin, Anni, Hodge, Besheer, Zablocki, Leung, Blackburn, Lange, y Diamond. (2009). Suppression of heavy drinking and alcohol seeking by a selective ALDH-2 inhibitor. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33(11), 1935–1944. DOI:10.1111/j.1530-0277.2009.01031.x
- Ashpole, Herren, Ginsburg, Brogan, Johnson, Cummins, Bers, y Hudmon. (2012). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates cardiac sodium channel NaV1.5 gating by multiple phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry*, 287(24), 19856–19869. DOI:10.1074/jbc.M111.322537
- Avila, de la Rosa, Monsalvo-Villegas, y Montiel-Jaen. (2019). Ca<sup>2+</sup> Channels Mediate Bidirectional Signaling between Sarcolemma and Sarcoplasmic Reticulum in Muscle Cells. *Cells*, 9(1), 55. DOI:10.3390/cells9010055
- Aydin, Okmen, Erdinler, Sanli, y Cam. (2005). Adrenal adenoma presenting with ventricular fibrillation. *Texas Heart Institute Journal*, 32(1), 85–87.

- Battelli, Polito, Bortolotti, y Bolognesi. (2016). Xanthine oxidoreductase-derived reactive species: Physiological and pathological effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. DOI:10.1155/2016/3527579
- Bell, Vila-Petroff, y Delbridge. (2014). CaMKII-dependent responses to ischemia and reperfusion challenges in the heart. *Frontiers in Pharmacology*, 5 MAY(May), 1–7. DOI:10.3389/fphar.2014.00096
- Benitah, Perrier, Gomez, y Vassort. (2001). Effects of aldosterone on transient outward K<sup>+</sup> current density in rat ventricular myocytes. *J.Physiol*, 537, 151–160.
- Benitah y Vassort. (1999). Aldosterone Upregulates Ca(2+) Current in Adult Rat Cardiomyocytes. *Circ.Res.*, 85(0009-7330 JC-DAJ), 1139–1145. DOI:10.1161/01.RES.85.12.1139
- Berlett y Stadtman. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313–20316. DOI:10.1074/jbc.272.33.20313
- Berry y Hare. (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: Molecular mechanisms and pathophysiological implications. *Journal of Physiology*, 555(3), 589–606. DOI:10.1113/jphysiol.2003.055913
- Bers. (2002). Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198–205. DOI:10.1038/415198a
- Bers y Morotti. (2014). Ca<sup>2+</sup> current facilitation is CaMKII-dependent and has arrhythmogenic consequences. *Frontiers in Pharmacology*, 5 JUN(June), 1–10. DOI:10.3389/fphar.2014.00144
- Bistola, Nikolopoulou, Derventzi, Kataki, Sfyra, Nikou, Toutouza, Toutouzas, Stefanadis, y Konstadoulakis. (2008). Long-term primary cultures of human adult atrial cardiac myocytes: Cell viability, structural properties and BNP secretion in vitro. *International Journal of Cardiology*, 131(1), 113–122. DOI:10.1016/j.ijcard.2007.10.058
- Blatter, Kockskämper, Sheehan, Zima, Hüser, y Lipsius. (2003). Local calcium gradients during excitation-contraction coupling and alternans in atrial myocytes. *Journal of Physiology*, 546(1), 19–32. DOI:10.1113/jphysiol.2002.025239

- Bonilla, Sridhar, Nishijima, Györke, Cardounel, y Carnes. (2013). Differential Effects of the Peroxynitrite Donor, SIN-1, on Atrial and Ventricular Myocyte Electrophysiology. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 61(5), 401–407. DOI:10.1097/FJC.0b013e31828748ca
- Bootman, Smyrnias, Thul, Coombes, y Roderick. (2011). Atrial cardiomyocyte calcium signalling. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(5), 922–934. DOI:10.1016/j.bbamcr.2011.01.030
- Bradford. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Breitzig, Bhimineni, Lockey, y Kolliputi. (2016). 4-Hydroxy-2-nonenal: A critical target in oxidative stress? *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 311(4), C537–C543. DOI:10.1152/ajpcell.00101.2016
- Brennan, Bardswell, Burgoyne, Fuller, Schröder, Wait, Begum, Kentish, y Eaton. (2006). Oxidant-induced activation of type I protein kinase A is mediated by RI subunit interprotein disulfide bond formation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(31), 21827–21836. DOI:10.1074/jbc.M603952200
- Budas, Disatnik, y Mochly-Rosen. (2009). Aldehyde Dehydrogenase 2 in Cardiac Protection: A New Therapeutic Target? *Trends in Cardiovascular Medicine*, 19(5), 158–164. DOI:10.1016/j.tcm.2009.09.003
- Bukowska, Röcken, Erxleben, Röhl, Hammwöhner, Huth, Ebert, Lendeckel, y Goette. (2010). Atrial expression of endothelial nitric oxide synthase in patients with and without atrial fibrillation. *Cardiovascular Pathology*, 19(3), e51–e60. DOI:10.1016/j.carpath.2008.12.014
- Busse y Mülsch. (1990). Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Letters*, 265(1–2), 133–136. DOI:10.1016/0014-5793(90)80902-U

- Cadenas. (2018). ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier B.V. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.024
- Cai, Li, Goette, Mera, Honeycutt, Feterik, Wilcox, Dudley, Harrison, y Langberg. (2002). Downregulation of Endocardial Nitric Oxide Synthase Expression and Nitric Oxide Production in Atrial Fibrillation Potential Mechanisms for Atrial Thrombosis and Stroke. *Circulation*, 104(suppl II), 2854–2859. DOI:10.1161/01.CIR.0000039327.11661.16
- Camors y Valdivia. (2014). CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors. *Frontiers in Pharmacology*, 5 MAY(May), 1–13. DOI:10.3389/fphar.2014.00101
- Cantu-Medellin y Kelley. (2013). Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biology*, 1(1), 353–358. DOI:10.1016/j.redox.2013.05.002
- Cecarini, Gee, Fioretti, Amici, Angeletti, Eleuteri, y Keller. (2007). Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(2), 93–104. DOI:10.1016/j.bbamcr.2006.08.039
- Chen, C.-H., Ferreira, Gross, y Mochly-Rosen. (2014). Targeting Aldehyde Dehydrogenase 2: New Therapeutic Opportunities. *Physiological Reviews*, 94(1), 1–34. DOI:10.1152/physrev.00017.2013
- Chen, Q., Vazquez, Moghaddas, Hoppel, y Lesnefsky. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36027–36031. DOI:10.1074/jbc.M304854200
- Choudhary, Dudley, Universi-, y Dudley. (2002). Heart failure, oxidative stress, and ion channel modulation. *Congestive Heart Failure*, 8(3), 148–155. DOI:10.1111/j.1527-5299.2002.00716.x
- Crabtree y Channon. (2011). Synthesis and recycling of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 25(2), 81–88. DOI:10.1016/j.niox.2011.04.004

- Crabtree, Smith, Lam, Goligorsky, y Gross. (2008). Ratio of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin to 7,8-dihydrobiopterin in endothelial cells determines glucose-elicited changes in NO vs. superoxide production by eNOS. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 294(4), 1530–1540. DOI:10.1152/ajpheart.00823.2007
- D’Oria, Schipani, Leonardini, Natalicchio, Perrini, Cignarelli, Laviola, y Giorgino. (2020). The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. DOI:10.1155/2020/5732956
- De Giusti, Nolly, Yeves, Caldiz, Villa-Abrille, Chiappe de Cingolani, Ennis, Cingolani, y Aiello. (2011). Aldosterone Stimulates the Cardiac Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger via Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Hypertension*, 58(5), 912–919. DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.176024
- Di Meo, Reed, Venditti, y Victor. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. DOI:10.1155/2016/1245049
- Eager y Dulhunty. (1998). Activation of the cardiac ryanodine receptor by sulfhydryl oxidation is modified by Mg<sup>2+</sup> and ATP. *Journal of Membrane Biology*, 163(1), 9–18. DOI:10.1007/s002329900365
- Ebata, Muto, Okada, Nemoto, Amemiya, Saito, y Asano. (1999). Aldosterone activates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in vascular smooth muscle cells by nongenomic and genomic mechanisms. *Kidney International*, 56(4), 1400–1412. DOI:10.1046/j.1523-1755.1999.00674.x
- Erickson, Joiner, Guan, Kutschke, Yang, Oddis, Bartlett, Lowe, O’Donnell, Aykin-Burns, Zimmerman, Zimmerman, Ham, Weiss, Spitz, Shea, Colbran, Mohler, y Anderson. (2008). A Dynamic Pathway for Calcium-Independent Activation of CaMKII by Methionine Oxidation. *Cell*, 133(3), 462–474. DOI:10.1016/j.cell.2008.02.048
- Förstermann. (2010). Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 459(6), 923–939. DOI:10.1007/s00424-010-0808-2
- Förstermann y Sessa. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 829–837. DOI:10.1093/eurheartj/ehr304



- Foteinou, Greenstein, y Winslow. (2015). Mechanistic Investigation of the Arrhythmogenic Role of Oxidized CaMKII in the Heart. *Biophysical Journal*, 109(4), 838–849. DOI:10.1016/j.bpj.2015.06.064
- Fournier, Luft, Bader, Ganten, y Andrade-Navarro. (2012). Emergence and evolution of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Journal of Molecular Medicine*, 90(5), 495–508. DOI:10.1007/s00109-012-0894-z
- Frisk, Koivumäki, Norseng, Maleckar, Sejersted, y Louch. (2014). Variable t-tubule organization and Ca<sup>2+</sup> homeostasis across the atria. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 307(4). DOI:10.1152/ajpheart.00295.2014
- Glantzounis, Tsimoyiannis, Kappas, y Galaris. (2005). Uric Acid and Oxidative Stress. *Current Pharmaceutical Design*, 11(32), 4145–4151. DOI:10.2174/138161205774913255
- Glukhov, Balycheva, Sanchez-Alonso, Ilkan, Alvarez-Laviada, Bhogal, Diakonov, Schobesberger, Sikkell, Bhargava, Faggian, Punjabi, Houser, y Gorelik. (2015). Direct evidence for microdomain-specific localization and remodeling of functional L-type calcium channels in rat and human atrial myocytes. *Circulation*, 132(25), 2372–2384. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018131
- Goldhaber. (1996). Free radicals enhance Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 271(3), H823–H833. DOI:10.1152/ajpheart.1996.271.3.H823
- Goldhaber y Liu. (1994). Excitation-contraction coupling in single guinea-pig ventricular myocytes exposed to hydrogen peroxide. *The Journal of Physiology*, 477(1), 135–147. DOI:10.1113/jphysiol.1994.sp020178
- Gomes, Campos, Bechara, Queliconi, Lima, Disatnik, Magno, Chen, Brum, Kowaltowski, Mochly-Rosen, y Ferreira. (2014). Aldehyde dehydrogenase 2 activation in heart failure restores mitochondrial function and improves ventricular function and remodelling. *Cardiovascular Research*, 103(4), 498–508. DOI:10.1093/cvr/cvu125

- Gómez, Rueda, Sainte-Marie, Pereira, Zissimopoulos, Zhu, Schaub, Perrier, Perrier, Latouche, Richard, Picot, Jaissier, Lai, Valdivia, y Benitah. (2009). Mineralocorticoid modulation of cardiac ryanodine receptor activity is associated with downregulation of fk506-binding proteins. *Circulation*, *119*(16), 2179–2187. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.805804
- Guo, Liu, Zang, Dong, Ying, Wang, Xu, Song, Cai, Zhang, Duan, Mehta, y Su. (2013). ALDH2 protects against stroke by clearing 4-HNE. *Cell Research*, *23*(7), 915–930. DOI:10.1038/cr.2013.69
- Gutiérrez-Martín, Martín-Romero, Henao, y Gutiérrez-Merino. (2002). Synaptosomal plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump activity inhibition by repetitive micromolar ONOO-pulses. *Free Radical Biology and Medicine*, *32*(1), 46–55. DOI:10.1016/S0891-5849(01)00760-2
- Guzy y Schumacker. (2006). Oxygen sensing by mitochondria at complex III: The paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Experimental Physiology*, *91*(5), 807–819. DOI:10.1113/expphysiol.2006.033506
- Hammer, Ruppenthal, Viero, Scholz, Edelmann, Kaestner, y Lipp. (2010). Remodelling of Ca<sup>2+</sup> handling organelles in adult rat ventricular myocytes during long term culture. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *49*(3), 427–437. DOI:10.1016/j.yjmcc.2010.05.010
- Han, Fu, Wei, Xie, Li, Yang, Li, Liang, y Huo. (2008). Nitric oxide overproduction derived from inducible nitric oxide synthase increases cardiomyocyte apoptosis in human atrial fibrillation. *International Journal of Cardiology*, *130*(2), 165–173. DOI:10.1016/j.ijcard.2008.02.026
- Hare. (2003). Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *35*(7), 719–729. DOI:10.1016/S0022-2828(03)00143-3
- Hayashi, Kobara, Abe, Tanaka, Gouda, Toba, Yamada, Tatsumi, Nakata, y Matsubara. (2008). Aldosterone Nongenomically Produces NADPH Oxidase-Dependent Reactive Oxygen Species and Induces Myocyte Apoptosis. *Hypertens Res*, *31*(2), 363–375. DOI:10.1291/hypres.31.363

- He, B. J., Joiner, Singh, Luczak, Swaminathan, Koval, Kutschke, Allamargot, Yang, Guan, Zimmerman, Grumbach, Weiss, Spitz, Sigmund, Blankestijn, Heymans, Mohler, y Anderson. (2011). Oxidation of CaMKII determines the cardiotoxic effects of aldosterone. *Nature Medicine*, 17(12), 1610–1618. DOI:10.1038/nm.2506
- He, H., Liu, Lv, Liang, Leng, Zhao, Zhang, Du, Chen, Li, Lu, y Shan. (2014). Calcineurin suppresses AMPK-dependent cytoprotective autophagy in cardiomyocytes under oxidative stress. *Cell Death and Disease*, 5(1), 1–10. DOI:10.1038/cddis.2013.533
- Hille y Nishino. (1995). Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *The FASEB Journal*, 9(11), 995–1003. DOI:10.1096/fasebj.9.11.7649415
- Hohendanner, McCulloch, Blatter, Michailova Anushka P., y Michailova. (2014). Calcium and IP3 dynamics in cardiac myocytes : experimental and computational perspectives and approaches. *Frontiers in Pharmacology*, 5(March), 1–10. DOI:10.3389/fphar.2014.00035
- Hohendanner, Walther, Maxwell, Kettlewell, Awad, Smith, Lonchyna, y Blatter. (2015). Inositol-1,4,5-trisphosphate induced Ca<sup>2+</sup> release and excitation-contraction coupling in atrial myocytes from normal and failing hearts. *The Journal of Physiology*, 593(6), 1459–1477. DOI:10.1113/jphysiol.2014.283226
- Hsu, Tsai, Yeh, Chang, Kuo, Chen, Tsai, y Chang. (2020). Aldehyde dehydrogenase 2 ameliorates chronic alcohol consumption-induced atrial fibrillation through detoxification of 4-hne. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 1–13. DOI:10.3390/ijms21186678
- Huyet, Pinon, Fay, Rafestin-Oblin, y Fagart. (2012). Structural determinants of ligand binding to the mineralocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 350(2), 187–195. DOI:10.1016/j.mce.2011.07.035
- Ide, Tsutsui, Kinugawa, Utsumi, Kang, Hattori, Uchida, Arimura, Egashira, y Takeshita. (1999). Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res*, 85(4), 357–363. DOI:10.1161/01.RES.85.4.357

- Ji, Wei, Hao, Xing, Yuan, Wang, Xu, y Chen. (2016). Aldehyde dehydrogenase 2 has cardioprotective effects on myocardial ischaemia/reperfusion injury via suppressing mitophagy. *Frontiers in Pharmacology*, 7(APR), 1–15. DOI:10.3389/fphar.2016.00101
- Jiang, Xiao, Yang, Wang, Choi, Zhang, Cheng, y Chen. (2004). RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death reduce the threshold for store-overload-induced Ca<sup>2+</sup> release (SOICR). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(35), 13062–13067. DOI:10.1073/pnas.0402388101
- Johnstone y Hool. (2014). Glutathionylation of the L-type Ca<sup>2+</sup>channel in oxidative stress-induced pathology of the heart. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 19203–19225. DOI:10.3390/ijms151019203
- Judd, Lovas, y Huang. (2016). Isolation, culture and transduction of adult mouse cardiomyocytes. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(114), 1–10. DOI:10.3791/54012
- Kaneko, Beamish, y Dhalla. (1989). Depression of heart sarcolemmal Ca<sup>2+</sup>-pump activity by oxygen free radicals. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 256(2). DOI:10.1152/ajpheart.1989.256.2.h368
- Kar, Kellogg, y Roman. (2015). Oxidative stress induces phosphorylation of neuronal NOS in cardiomyocytes through AMP-activated protein kinase (AMPK). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 459(3), 393–397. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.02.113
- Keung y Vallee. (1993). Daidzin: a potent, selective inhibitor of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(4), 1247–1251. DOI:10.1073/pnas.90.4.1247
- Keung y Vallee. (1998). Daidzin and its antidipsotropic analogs inhibit serotonin and dopamine metabolism in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2198–2203. DOI:10.1073/pnas.95.5.2198

- Kharlap, Goriunova, Timofeeva, Smolianova, Khaspekov, Raskin, Dzemeshevich, Akchurin, Golitsyn, y Bibilashvili. (2008). [Gene expression analysis in myocytes of right atrial appendages in patients with atrial fibrillation using cDNA microarray technique]. *Kardiologiia*, 48(9), 34–42.
- Kim, Guzik, Zhang, Zhang, Kattach, Ratnatunga, Pillai, Channon, y Casadei. (2005). A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circulation Research*, 97(7), 629–636. DOI:10.1161/01.RES.0000183735.09871.61
- Knapp y Klann. (2000). Superoxide-induced stimulation of protein kinase C via thiol modification and modulation of zinc content. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 24136–24145. DOI:10.1074/jbc.M002043200
- Koppaka, Thompson, Chen, Ellermann, Nicolaou, Juvonen, Petersen, Deitrich, Hurley, y Vasiliou. (2012). Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 520–539. DOI:10.1124/pr.111.005538
- Korzick. (2003). REGULATION OF CARDIAC EXCITATION-CONTRACTION COUPLING: A CELLULAR UPDATE. *Advances in Physiology Education*, 27(4), 192–200. DOI:10.1152/advan.00028.2003
- Kukreja, Okabe, Schrier, y Hess. (1988). Oxygen radical-mediated lipid peroxidation and inhibition of Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 261(2), 447–457. DOI:10.1016/0003-9861(88)90361-X
- Kuppusamy y Zweier. (1989). Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *Journal of Biological Chemistry*, 264(17), 9880–9884.
- Kuroda, Ago, Matsushima, Zhai, Schneider, y Sadoshima. (2010). NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), 15565–15570. DOI:10.1073/pnas.1002178107

- Kurt y Vickas. (2013). Atrial fibrillation in the elderly: the potential contribution of reactive oxygen species. *Journal of Geriatric Cardiology*, 9(4), 379–388. DOI:10.3724/SP.J.1263.2012.08141
- Kuwabara, Nishino, Okamoto, Matsumura, Eger, Pai, y Nishino. (2003). Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), 8170–8175. DOI:10.1073/pnas.1431485100
- Kuzkaya, Weissmann, Harrison, y Dikalov. (2003). Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: Implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(25), 22546–22554. DOI:10.1074/jbc.M302227200
- Lalevée, Rebsamen, Barrère-Lemaire, Perrier, Nargeot, Bénitah, y Rossier. (2005). Aldosterone increases T-type calcium channel expression and in vitro beating frequency in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 67(2), 216–224. DOI:10.1016/j.cardiores.2005.05.009
- Lassègue, San Martín, y Griendling. (2012). Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circulation Research*, 110(10), 1364–1390. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.111.243972
- Lassègue, Sorescu, Szöcs, Yin, Akers, Zhang, Grant, Lambeth, y Griendling. (2001). Novel gp91 phox Homologues in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*, 88(9), 888–894. DOI:10.1161/hh0901.090299
- Louch, Sheehan, y Wolska. (2011). Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(3), 288–298. DOI:10.1016/j.yjmcc.2011.06.012
- Lu, Li, Zhai, Li, Xie, Zhang, Xiao, y Gao. (2019). Spironolactone suppresses aldosterone-induced Kv1.5 expression by attenuating mineralocorticoid receptor-Nox1/2/4-mediated ROS generation in neonatal rat atrial myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 520(2), 379–384. DOI:10.1016/j.bbrc.2019.10.039

- Luczak y Anderson. (2014, agosto). CaMKII oxidative activation and the pathogenesis of cardiac disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. DOI:10.1016/j.yjmcc.2014.02.004
- Lv, Bai, Zhang, Zhang, Meng, Li, y Xu. (2015). Aldosterone down-regulates the slowly activated delayed rectifier potassium current in adult Guinea pig cardiomyocytes. *British Journal of Pharmacology*, 172(23), 5596–5608. DOI:10.1111/bph.13163
- Marengo, Hidalgo, y Bull. (1998). Sulfhydryl oxidation modifies the calcium dependence of ryanodine- sensitive calcium channels of excitable cells. *Biophysical Journal*, 74(3), 1263–1277. DOI:10.1016/S0006-3495(98)77840-3
- Maulik y Kumar. (2012). Oxidative stress and cardiac hypertrophy: A review. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22(5), 359–366. DOI:10.3109/15376516.2012.666650
- McNally, Saxena, Cai, Dikalov, y Harrison. (2005). Regulation of xanthine oxidoreductase protein expression by hydrogen peroxide and calcium. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(8), 1623–1628. DOI:10.1161/01.ATV.0000170827.16296.6e
- Milliez, Girerd, Plouin, Blacher, Safar, y Mourad. (2005). Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *Journal of the American College of Cardiology*, 45(8), 1243–1248. DOI:10.1016/j.jacc.2005.01.015
- Mitcheson, Hancox, y Levi. (1998). Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties [In Process Citation]. *Cardiovasc.Res.*, 39(2), 280–300. DOI:10.1016/S0008-6363(98)00128-X
- Molkentin, Lu, Antos, Markham, Richardson, Robbins, Grant, y Olson. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*, 93(2), 215–228. DOI:10.1016/S0092-8674(00)81573-1
- Montiel-Jaen, Monsalvo-Villegas, y Ávila. (2021). Modulating ALDH2 reveals a differential dependence on ROS for hypertrophy and SR Ca<sup>2+</sup> release in aldosterone-treated cardiac myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 536, 7–13. DOI:10.1016/j.bbrc.2020.12.049

- Moris, Spartalis, Spartalis, Karachaliou, Karaolani, Tsourouflis, Tsilimigras, Tzatzaki, y Theocharis. (2017). The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. *Annals of Translational Medicine*, 5(16), 1–11. DOI:10.21037/atm.2017.06.27
- Morris y Sulakhe. (1997). Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-Pump Dysfunction in Rat Cardiomyocytes Briefly Exposed to Hydroxyl Radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(1–2), 37–47. DOI:10.1016/S0891-5849(96)00238-9
- Muralidharan, Cserne Szappanos, Ingley, y Hool. (2017). The cardiac L-type calcium channel alpha subunit is a target for direct redox modification during oxidative stress—the role of cysteine residues in the alpha interacting domain. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 44(February), 46–54. DOI:10.1111/1440-1681.12750
- Murdoch, Zhang, Cave, y Shah. (2006). NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovascular Research*, 71(2), 208–215. DOI:10.1016/j.cardiores.2006.03.016
- Nabeebaccus, Zhang, y Shah. (2011). NADPH oxidases and cardiac remodelling. *Heart Failure Reviews*, 16(1), 5–12. DOI:10.1007/s10741-010-9186-2
- Nakamura, Fushimi, Kouchi, Mihara, Miyazaki, Ohe, y Namba. (1998). Inhibitory Effects of Antioxidants on Neonatal Rat Cardiac Myocyte Hypertrophy Induced by Tumor Necrosis Factor- and Angiotensin II. *Circulation*, 98(8), 794–799. DOI:10.1161/01.CIR.98.8.794
- Nimse y Pal. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986–28006. DOI:10.1039/c4ra13315c
- Nishino, Okamoto, Kawaguchi, Hori, Matsumura, Eger, Pai, y Nishino. (2005). Mechanism of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: Identification of the two cysteine disulfide bonds and crystal structure of a non-convertible rat liver xanthine dehydrogenase mutant. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 24888–24894. DOI:10.1074/jbc.M501830200
- Osornio-Garduño. (2013). *Impacto de pirfenidona en la dinámica del Ca<sup>2+</sup> de cardiomiocitos auriculares*. CINVESTAV-IPN.



- Palmer, L. G. (1993). Regulation of the Na-K pump of the rat cortical collecting tubule by aldosterone. *The Journal of General Physiology*, 102(1), 43–57. DOI:10.1085/jgp.102.1.43
- Palmer, Lawrence G., Li, Lindemann, y Edelman. (1982). Aldosterone control of the density of sodium channels in the toad urinary bladder. *The Journal of Membrane Biology*, 64(1–2), 91–102. DOI:10.1007/BF01870771
- Park, Park, Suh, y Park. (2004). NAD(P)H oxidase inhibitor prevents blood pressure elevation and cardiovascular hypertrophy in aldosterone-infused rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(3), 812–817. DOI:10.1016/j.bbrc.2003.11.173
- Passier, Zeng, Frey, Naya, Nicol, McKinsey, Overbeek, Richardson, Grant, y Olson. (2000). CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 105(10), 1395–1406. DOI:10.1172/JCI8551
- Perez-Miller, Younus, Vanam, Chen, Mochly-Rosen, y Hurley. (2010). Ald-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(2), 159–164. DOI:10.1038/nsmb.1737
- Purohit, Rokita, Guan, Chen, Koval, Voigt, Neef, Sowa, Gao, Luczak, Stefansdottir, Behunin, Li, El-Accaoui, Yang, Swaminathan, Weiss, Wehrens, Song, Dobrev, Maier, y Anderson. (2013). Oxidized Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Triggers Atrial Fibrillation. *Circulation*, 128(16), 1748–1757. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003313
- Reeves, J. P., Bailey, y Hale. (1986). Redox modification of sodium-calcium exchange activity in cardiac sarcolemmal vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 261(11), 4948–4955.
- Reeves, John P. y Condrescu. (2008). Ionic regulation of the cardiac sodium-calcium exchanger. *Channels*, 2(5), 322–328. DOI:10.4161/chan.2.5.6897

- Reil, Hohl, Selejan, Lipp, Drautz, Kazakow, Münz, Müller, Steendijk, Reil, Allessie, Böhm, y Neuberger. (2012). Aldosterone promotes atrial fibrillation. *European Heart Journal*, 33(16), 2098–2108. DOI:10.1093/eurheartj/ehr266
- Ríos-Pérez, García-Castañeda, Monsalvo-Villegas, y Avila. (2016). Chronic atrial ionic remodeling by aldosterone: potentiation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels and its arrhythmogenic significance. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 468(11–12), 1823–1835. DOI:10.1007/s00424-016-1876-8
- Rogerson, Brennan, y Fuller. (2004). Mineralocorticoid receptor binding, structure and function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 217(1–2), 203–212. DOI:10.1016/j.mce.2003.10.021
- Rogerson, Dimopoulos, Sluka, Chu, Curtis, y Fuller. (1999). Structural Determinants of Aldosterone Binding Selectivity in the Mineralocorticoid Receptor Structural Determinants of Aldosterone Binding Selectivity in the Mineralocorticoid Receptor \*. *The Journal of biological chemistry*, 274(51), 36305–36311.
- Rossier, Python, y Maturana. (2010). Contribution of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors to the chronotropic and hypertrophic actions of aldosterone in neonatal rat ventricular myocytes. *Endocrinology*, 151(6), 2777–2787. DOI:10.1210/en.2009-1375
- Santacruz-Toloza, Ottolia, Nicoll, y Philipson. (2000). Functional analysis of a disulfide bond in the cardiac Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, 275(1), 182–188. DOI:10.1074/jbc.275.1.182
- Santamaria-Herrera, Ríos-Pérez, De La Rosa, García-Castañeda, Osornio-Garduño, Ramos-Mondragón, Mancilla-Percino, y Avila. (2016). MDIMP, a novel cardiac Ca<sup>2+</sup> channel blocker with atrial selectivity. *European Journal of Pharmacology*, 781, 218–228. DOI:10.1016/j.ejphar.2016.04.027
- Santin, Fazal, Sainte-Marie, Sicard, Maggiorani, Tortosa, Yücel, Teysse, Rouquette, Marcellin, Vindis, Shih, Lairez, Burlet-Schiltz, Parini, Lezoualc'h, y Mialet-Perez. (2020). Mitochondrial 4-HNE derived from MAO-A promotes mitoCa<sup>2+</sup> overload in chronic postischemic cardiac remodeling. *Cell Death and Differentiation*, 27(6), 1907–1923. DOI:10.1038/s41418-019-0470-y

- Schieber y Chandel. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10), R453–R462. DOI:10.1016/j.cub.2014.03.034
- Seddon, Looi, y Shah. (2007). Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart*, 93(8), 903–907. DOI:10.1136/hrt.2005.068270
- Sorescu y Griendling. (2002). Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure. *Congestive Heart Failure*, 8(3), 132–140. DOI:10.1111/j.1527-5299.2002.00717.x
- Staerk, Sherer, Ko, Benjamin, y Helm. (2017). Atrial Fibrillation. *Circulation Research*, 120(9), 1501–1517. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.117.309732
- Steinberg. (2015). Mechanisms for redox-regulation of protein kinase C. *Frontiers in Pharmacology*, 6(JUN), 1–9. DOI:10.3389/fphar.2015.00128
- Stoddard. (2000). Risk of thromboembolism in acute atrial fibrillation or atrial flutter. *Echocardiography*, 17(4), 393–405. DOI:10.1111/j.1540-8175.2000.tb01155.x
- Sugiyama, Levy, y Michel. (2009). Tetrahydrobiopterin Recycling, a Key Determinant of Endothelial Nitric-oxide Synthase-dependent Signaling Pathways in Cultured Vascular Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(19), 12691–12700. DOI:10.1074/jbc.M809295200
- Takeda, Yoneda, Demura, Usukura, y Mabuchi. (2002). Calcineurin inhibition attenuates mineralocorticoid-induced cardiac hypertrophy. *Circulation*, 105(6), 677–679. DOI:10.1161/hc0602.104675
- Terentyev, Györke, Belevych, Terentyeva, Sridhar, Nishijima, Carcache de Blanco, Khanna, Sen, Cardounel, Carnes, Györke, Gyo, Belevych, Terentyeva, Sridhar, Nishijima, Blanco, Khanna, Sen, Cardounel, Carnes, Gyo, Györke, Belevych, Terentyeva, Sridhar, Nishijima, Carcache de Blanco, Esperanza Khanna, Sen, Cardounel, Carnes, Györke, De Blanco, Khanna, Sen, Cardounel, Carnes, y Györke. (2008). Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in chronic heart failure. *Circulation Research*, 103(12), 1466–1472. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.108.184457

- Thompson-Gorman y Zweier. (1990). Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. *Journal of Biological Chemistry*, 265(12), 6656–6663. DOI:10.1016/s0021-9258(19)39200-2
- Touyz. (2004). Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: What is the clinical significance? *Hypertension*, 44(3), 248–252. DOI:10.1161/01.HYP.0000138070.47616.9d
- Tsai, Chiang, Tseng, Hwang, Kuo, Wu, Yu, Wang, Lai, y Lin. (2010). Increased Expression of Mineralocorticoid Receptor in Human Atrial Fibrillation and a Cellular Model of Atrial Fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(8), 758–770. DOI:10.1016/j.jacc.2009.09.045
- Tsai, Wang, Chen, Hwang, Hsieh, Hsu, Tseng, Lai, Tseng, Chiang, y Lin. (2007). Angiotensin II increases expression of  $\alpha_1C$  subunit of L-type calcium channel through a reactive oxygen species and cAMP response element-binding protein-dependent pathway in HL-1 myocytes. *Circulation Research*, 100(10), 1476–1485. DOI:10.1161/01.RES.0000268497.93085.e1
- Tsutsui, Kinugawa, y Matsushima. (2011). Oxidative stress and heart failure. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 301(6), 2181–2190. DOI:10.1152/ajpheart.00554.2011
- Vásquez-Vivar, Kalyanaraman, y Martásek. (2003). The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: Enzymology and physiological implications. *Free Radical Research*, 37(2), 121–127. DOI:10.1080/1071576021000040655
- Vásquez-Vivar, Kalyanaraman, Martásek, Hogg, Masters, Karoui, Tordo, y Pritchard. (1998). Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), 9220–9225. DOI:10.1073/pnas.95.16.9220
- Vest, Wehrens, Reiken, Lehnart, Dobrev, Chandra, Danilo, Ravens, Rosen, y Marks. (2005). Defective cardiac ryanodine receptor regulation during atrial fibrillation. *Circulation*, 111(16), 2025–2032. DOI:10.1161/01.CIR.0000162461.67140.4C

- Voigt, Li, Wang, Wang, Trafford, Abu-Taha, Sun, Wieland, Ravens, Nattel, Wehrens, y Dobrev. (2012). Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> Leak and increased Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation*, 125(17), 2059–2070. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067306
- Wang, W. H. y Giebisch. (2009). Regulation of potassium (K) handling in the renal collecting duct. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 458(1), 157–168. DOI:10.1007/s00424-008-0593-3
- Wang, Y. Y., Zhao, y Zhe. (2015). The emerging role of CaMKII in cancer. *Oncotarget*, 6(14), 11725–11734. DOI:10.18632/oncotarget.3955
- Watson, Karthikeyan, Lip, y Beevers. (2009). Atrial fibrillation in primary aldosteronism. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 10(4), 190–194. DOI:10.1177/1470320309342734
- Werner, Blau, y Thöny. (2011). Tetrahydrobiopterin: Biochemistry and pathophysiology. *Biochemical Journal*, 438(3), 397–414. DOI:10.1042/BJ20110293
- Werner, Gorren, Heller, Werner-Felmayer, y Mayer. (2003). Tetrahydrobiopterin and Nitric Oxide: Mechanistic and Pharmacological Aspects. *Experimental Biology and Medicine*, 228(11), 1291–1302. DOI:10.1177/153537020322801108
- Wier, W. G., Egan, López-López, y Balke. (1994). Local control of excitation-contraction coupling in rat heart cells. *The Journal of Physiology*, 474(3), 463–471. DOI:10.1113/jphysiol.1994.sp020037
- Wier, Withrow Gil. (2007). Gain and cardiac E-C coupling: Revisited and revised. *Circulation Research*, 101(6), 533–535. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.107.160929
- Williams. (2005). Aldosterone Biosynthesis, Regulation, and Classical Mechanism of Action. *Heart Failure Reviews*, 10(1), 7–13. DOI:10.1007/s10741-005-2343-3
- Winter, Schneider, O’Sullivan, Harvey, y Geibel. (1999). Rapid Effects of Aldosterone on Sodium-Hydrogen Exchange in Isolated Colonic Crypts. *Journal of Membrane Biology*, 170(1), 17–26. DOI:10.1007/s002329900534

- Xie, Santulli, Reiken, Yuan, Osborne, Chen, y Marks. (2015). Mitochondrial oxidative stress promotes atrial fibrillation. *Nature Publishing Group*, 1–11. DOI:10.1038/srep11427
- Yoo, Aistrup, Shiferaw, Ng, Mohler, Hund, Waugh, Browne, Gussak, Gilani, Knight, Passman, Goldberger, Wasserstrom, y Arora. (2018). Oxidative stress creates a unique, CaMKII-mediated substrate for atrial fibrillation in heart failure. *JCI insight*, 3(21). DOI:10.1172/jci.insight.120728
- Youn, Zhang, Zhang, Chen, Liu, Ping, Weiss, y Cai. (2013). Oxidative stress in atrial fibrillation: An emerging role of NADPH oxidase. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 62, 72–79. DOI:10.1016/j.yjmcc.2013.04.019
- Zennaro, Farman, Bonvalet, Lombès, Inserm, y Fe. (1997). Ribonucleic Acid Isoforms of the Human Mineralocorticoid Receptor in Normal and Pathological States. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(5), 1345–1352. DOI:10.1210/jcem.82.5.3933
- Zhang, J., Youn, Kim, Ramirez, Gao, Ngo, Chen, Scovotti, Mahajan, y Cai. (2012). NOX4-dependent hydrogen peroxide overproduction in human atrial fibrillation and HL-1 atrial cells: Relationship to hypertension. *Frontiers in Physiology*, 3 JUN(June), 1–8. DOI:10.3389/fphys.2012.00140
- Zhang, R., Liu, Fan, Wang, Xu, Wei, Zheng, Yuan, Gao, Yin, Zheng, Zhang, Zhang, Yang, Xue, Wang, Xu, Wang, Cao, y Chen. (2020). Aldehyde Dehydrogenase 2 Protects Against Post-Cardiac Arrest Myocardial Dysfunction Through a Novel Mechanism of Suppressing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Frontiers in Pharmacology*, 11(March), 1–14. DOI:10.3389/fphar.2020.00373
- Zhong, Zhang, Li, Xie, Sun, Sun, Tan, Sun, Jia, y Zhou. (2015). Pharmacological activation of aldehyde dehydrogenase 2 by Alda-1 reverses alcohol-induced hepatic steatosis and cell death in mice. *Journal of Hepatology*, 62(6), 1375–1381. DOI:10.1016/j.jhep.2014.12.022

Zhu, Klutho, Scott, Xie, Luczak, Dibbern, Prasad, Jaffer, Venema, Nguyen, Guan, Anderson, y Grumbach. (2014). Oxidative activation of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates vascular smooth muscle migration and apoptosis. *Vascular Pharmacology*, 60(2), 75–83. DOI:10.1016/j.vph.2014.01.001