



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Papel de la subunidad β_4 en la expresión de los canales
de calcio tipo L en miocitos cardíacos de rata adulta”**

T E S I S

QUE PRESENTA

M EN C. JUAN ANDRES ALVARADO SALAZAR

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA GARCÍA

Dedicatoria

María Estela Alvarado Salazar (Q.E.P.D.)

‡ 9 de noviembre 1999

Te amo ma, siempre estás en mi mente y en mi corazón...

¡Te extraño!

Isabella Alvarado Torres

♥ 25 de noviembre 2015

Desde que llegaste a mi vida, tu sonrisa ha iluminado mis días, tu amor ha dado sentido a mi vida, eres mi mayor tesoro y mi motor constante para siempre continuar.

¡te amo infinitamente mi hermosa princesa!

A mi esposa Blanca Estela Torres Cabrera

Por caminar conmigo cada paso de este camino, incluso en los momentos más difíciles. Contigo he conocido el amor, pero también el odio; sin embargo, has sido el faro que me guía cuando todo parece perdido. A pesar de las pruebas y dificultades vividas, sé que juntos construiremos mejores tiempos. Esta tesis es testimonio no sólo de un logro académico, si no también de nuestra resiliencia, de nuestra tolerancia, de nuestros demonios, de todo un proceso que hemos vivido como conocidos, como amigos, como amantes, como esposos, pero también como enemigos y desconocidos.

¡GRACIAS POR TODO EL APOYO QUE ME HAS DADO!

TE AMO



¡Demolí todos los puentes detrás de mí,
para no tener otra opción que seguir adelante!

Fridtjof Nansen

Agradecimientos

Al Programa de Doctorado en Ciencias, con Especialidad en Farmacología del Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada con registro CVU 718928.

A la Dra. María del Carmen García García y al Dr. Jorge Alberto Sánchez Rodríguez por permitir incorporarme a su grupo de investigación y desarrollar mi proyecto doctoral bajo su dirección, asimismo, por todo el apoyo recibido durante estos años, que siempre será invaluable.

A mi comité tutorial, la Dra. María del Carmen Cárdenas Aguayo, el Dr. Pablo Muriel de la Torre y el Dr. Benjamín Florán Garduño por su tiempo, asesoría y apoyo durante mi proyecto doctoral.

A la Dra. Elba Dolores Carrillo Valero por su colaboración y asesoría en este proyecto de investigación, tanto científica como técnica.

A la Q. Ascención Hernández Pérez "Tere" por su gran paciencia, por su apoyo en el trabajo de cultivo celular y aislamiento de cardiomiocitos, para llevar a cabo este proyecto de investigación.

A Oscar Ramírez Herrera y Sergio Gómez por su apoyo técnico en el laboratorio durante estos años y por su amistad.

A Enrique, Julio e Ivonne Lezama por el apoyo técnico brindado durante la realización de este proyecto. A mis compañeros del laboratorio por las pláticas compartidas, por sus consejos, por estar en momentos difíciles, por su ayuda durante algunos experimentos y sobre todo por sus palabras de aliento y motivación al M en C. Erick Galicia Galicia, al Dr. Maikel Valle Clara, a la Dra. Joice Thomas Gavali, al Dr. Raúl Sampieri Cabrera, al M en C. Wilibaldo López Orea y a la M en C. Elizabeth Romero Monter.

Contenido

Resumen	1
Abstract.....	2
1. Introducción	3
1.1. Canales iónicos.....	3
1.2. Canales de calcio voltaje dependiente (VGCC)	5
1.2.1. Estructura de los canales VGCC.....	5
1.2.2. Clasificación de los canales VGCC	6
1.3. Subunidades de los canales VGCC	8
1.4. Regulación de la expresión de los canales de calcio	14
1.4.1. Modificaciones postraduccionales	14
1.4.2. Regulación transcripcional y génica por calcio.....	18
1.5. La hormona tiroidea T3 y los canales de calcio.....	21
1.5.1. Hormonas tiroideas	21
1.5.2. La hormona tiroidea T3 y la homeostasis del calcio	24
1.5.3. Asociación entre la hormona tiroidea T3 y los canales de calcio en el hipertiroidismo y patologías cardiovasculares	26
2. Hipótesis.....	28
3. Objetivos	29
3.1. Objetivo general	29
3.2. Objetivos particulares.....	29
4. Material y métodos	30
4.1. Reactivos.....	30
4.2. Ratas Wistar macho adultas	31
4.3. Aislamiento de cardiomiocitos	31
4.4. Cultivo de células H9c2	32

4.5.	Tratamiento con la hormona triyodotironina (T3).....	32
4.6.	Obtención de plásmidos	33
4.6.1.	Bacterias competentes	33
4.6.2.	Transformación de bacterias y obtención de plásmidos	33
4.7.	Transfección de células H9c2.....	34
4.8.	Obtención de extractos totales de proteínas.....	35
4.9.	Western Blot	35
4.10.	Cuantificación de ARNm por PCR en tiempo real (qRT-PCR).....	36
4.11.	Inmunocitoquímica y microscopia confocal	37
4.12.	Análisis estadístico	39
5.	Resultados.....	39
5.1.	Células H9c2 y cardiomiocitos tratados con T3.....	39
5.1.1.	Expresión de los niveles de ARNm y proteína de α 1c	39
5.1.2.	Localización y expresión de los niveles de proteína y de ARNm de β 4	41
5.1.3.	Efecto de la T3 en la expresión de los niveles proteicos de pCREB y en su localización	44
5.2.	Efecto de la sobreexpresión de β 4 en los niveles de la proteína y del ARNm de α 1c.....	47
6.	Discusión.....	49
7.	Conclusión	56
8.	Referencias.....	57
	Anexo: productos científicos	65

Resumen

Los canales de calcio Cav1.2 son cruciales en la contracción del corazón y la regulación del calcio. La hormona tiroidea, triyodotironina (T3), interviene en la función cardíaca, pero los mecanismos específicos por los cuales T3 regula los canales Cav1.2 todavía no se comprenden completamente. En esta investigación estudiamos el papel de la subunidad $\beta 4$ en la regulación de la subunidad $\alpha 1c$ de los canales Cav1.2 en células cardíacas, así como la influencia de la hormona T3 en esta interacción.

Se utilizaron células H9c2 y cardiomiocitos de rata. Los métodos empleados incluyeron western blot, qRT-PCR e inmunofluorescencia para evaluar los cambios en la expresión de $\alpha 1c$ y $\beta 4$. También se llevaron a cabo experimentos de sobreexpresión de $\beta 4$ para investigar su efecto sobre la expresión del gen CACNA1C, que codifica a $\alpha 1c$. Se encontró que el tratamiento con T3 durante 48 horas aumenta la expresión de $\alpha 1c$ tanto a nivel de ARNm como de proteína, lo que sugiere un papel regulador positivo de la hormona T3 sobre los canales Cav1.2. Además, T3 provocó una reducción significativa en los niveles de la proteína $\beta 4$ sin afectar su ARNm, lo que indica una posible regulación postranscripcional. También se observó una disminución en la translocación nuclear de $\beta 4$ tras el tratamiento con T3. La sobreexpresión de $\beta 4$ disminuyó la expresión de $\alpha 1c$ a nivel de ARNm y de proteína, sugiriendo que $\beta 4$ actúa como represor de la expresión de $\alpha 1c$. T3 también aumentó la translocación del factor de transcripción pCREB al núcleo, lo que podría explicar parcialmente la regulación positiva de $\alpha 1c$, al interactuar con $\beta 4$ a través del receptor a la hormona tiroidea α .

Dado el papel fundamental de los canales Cav1.2 en la función cardíaca, esta regulación es clave para entender los efectos cardiotrópicos de la T3 y sugiere posibles objetivos terapéuticos para mejorar el manejo de enfermedades cardíacas, donde la modulación de la actividad de estos canales puede ser crucial en el desarrollo de tratamientos cardioprotectores.

Abstract

Cav1.2 calcium channels are crucial in heart contraction and calcium regulation. The thyroid hormone, triiodothyronine (T3), is involved in cardiac function, but the specific mechanisms by which T3 regulates Cav1.2 channels are not yet fully understood. In this research we study the role of the $\beta 4$ subunit in the regulation of the $\alpha 1c$ subunit of the Cav1.2 channels in cardiac cells, as well as the influence of the T3 hormone on this interaction.

H9c2 cells and Wistar rat cardiomyocytes, both derived from the ventricle, were used. The methods employed included western blotting, qRT-PCR, and immunofluorescence to assess changes in $\alpha 1c$ and $\beta 4$ expression. $\beta 4$ overexpression experiments were also carried out to investigate its effect on the expression of the CACNA1C gene, which encodes $\alpha 1c$. T3 treatment for 48 hours was found to increase $\alpha 1c$ expression at both the mRNA and protein levels, suggesting a positive regulatory role of the T3 hormone on Cav1.2 channels. In addition, T3 caused a significant reduction in $\beta 4$ protein levels without affecting its mRNA, indicating possible post-transcriptional regulation. A decrease in nuclear translocation of $\beta 4$ was also observed after treatment with T3. The overexpression of $\beta 4$ decreased the expression of $\alpha 1c$ at the mRNA and protein level, suggesting that $\beta 4$ acts as a repressor of $\alpha 1c$ expression. T3 also increased the translocation of the transcription factor pCREB to the nucleus, which could partially explain the upregulation of $\alpha 1c$, by interacting with $\beta 4$ via the receptor to thyroid hormone α .

Given the fundamental role of Cav1.2 channels in cardiac function, this regulation is key to understanding the cardiotropic effects of T3 and suggests possible therapeutic targets to improve the management of heart disease, where modulation of the activity of these channels may be crucial in the development of cardioprotective treatments.

1. Introducción

1.1. Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas integrales y especializadas que se expresan en la mayoría de las células y forman un poro para que los iones (aniones y cationes) y otras moléculas específicas fluyan a través de la membrana plasmática o de la membrana de los organelos intracelulares [1,2]. En su mayoría los canales son multímeros formados por varias subunidades proteicas las cuales pueden ser idénticas o diferentes, asimismo, pueden estar asociadas a subunidades reguladoras que modifican las propiedades eléctricas y la sensibilidad de los canales a diversos factores [1-3]. El término de canal iónico fue acuñado por Andrew Huxley y Alan Hodgkin posterior a los estudios que realizaron acerca de la generación y propagación de los impulsos nerviosos en el axón gigante de calamar [2].

Existen distintos tipos de canales iónicos que se clasifican de acuerdo con el estímulo que activa su apertura [2,3]. Una de las clasificaciones más sencillas divide a estos complejos moleculares en tres grandes grupos:

- Los canales activados por la unión de un ligando, el sensor en este tipo de canales es una región del canal que se encuentra en el exterior o interior de la membrana y tienen alta sensibilidad y afinidad por una molécula específica la cual abre o cierra el poro del canal.
- Canales estimulados por cambios en la presión o la tensión, denominados mecanosensibles que se abren ante una aplicación de presión o tensión en la membrana celular, así como por, fosforilaciones o la interacción con otras moléculas presentes en la célula. Para explicar la apertura de estos canales se ha propuesto como agente sensor a los ácidos grasos de la membrana que son activados por fosfolipasas. También, el citoesqueleto que se localiza inmediatamente por debajo del canal tiene participación en el adecuado funcionamiento de dichos canales.

- El tercer grupo son los canales activados por una variación en el potencial de membrana que se denominan dependientes de voltaje, los cuales responden a la hiperpolarización y despolarización de la membrana. En este tipo de canales la región sensora del voltaje son varios aminoácidos con carga positiva que se mueven en el campo eléctrico de la membrana como consecuencia de las diferencias del potencial eléctrico en la región externa e interna de ésta, lo cual, modifica la estructura terciaria del canal permitiendo el estado abierto o cerrado del poro.

La importancia de los canales iónicos radica en su participación en múltiples procesos fisiológicos tal como la excitación nerviosa y muscular, en las transducciones sensoriales y de señales, también en la secreción de hormonas y procesamiento de información en el cerebro, así como, en el crecimiento celular, en la regulación de la presión sanguínea, el balance hídrico y en la homeostasis salina [2,4].

Por otra parte, la importancia biológica de los canales iónicos también radica en el hecho de que gran diversidad de agentes farmacológicos median su actividad terapéutica a través de la interacción con estos complejos proteicos, como por ejemplo fármacos antihipertensivos, antiarrítmicos o ansiolíticos, por mencionar algunos [2,4]. Asimismo, los canales iónicos son complejos dinámicos que mantienen una relación íntima con el metabolismo y la fisiología celular, por lo tanto, alguna alteración en estas proteínas de membrana puede ser la causa de daño celular, anomalías en un órgano específico o en todo el sistema dando origen a una patología [2,5]. Este tipo de alteraciones en la actividad de los canales iónicos y que originan una disfunción fisiológica se les denominan canalopatías, las cuales pueden originarse por un proceso inmunológico o genético [2, 5], como se describe a continuación:

- Las patologías autoinmunitarias pueden dar origen a canalopatías debido a que se producen anticuerpos contra las proteínas de membrana lo cual aumenta o disminuye la función idónea del canal.

- Las canalopatías pueden originarse por alteraciones genéticas. Dichas variaciones genómicas pueden presentarse en la región codificante del gen de un canal iónico originando la síntesis de cadenas proteicas que no son procesadas correctamente y no se embeben en la membrana celular o bien, se incorporan y al formar los canales éstos no son funcionales. También, las mutaciones pueden darse en la región promotora del gen que codifica para un canal y con ello causar una sobreexpresión o disminución en la expresión de las proteínas del canal, es decir, habría una variación en la cantidad de canales presentes. Asimismo, la alteración se puede producir en los genes que codifican proteínas que regulan a los canales causando una inadecuada actividad de los complejos proteicos.

Con base en lo anterior, el presente trabajo de investigación tiene como principal orientación el estudio de los canales de calcio tipo L cardiacos que son parte de la superfamilia de canales voltaje dependientes [6], los cuales se describen en la siguiente sección.

1.2. Canales de calcio voltaje dependiente (VGCC)

1.2.1. Estructura de los canales VGCC

Los canales iónicos activados por voltaje desempeñan un papel fundamental, tanto en la generación como en la transmisión de la información en forma de potenciales de acción, dentro del sistema nervioso y del sistema cardiovascular [6, 7].

Los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje tipo L (VGCC, por sus siglas en inglés) son la principal vía de entrada de Ca^{2+} en los cardiomiocitos contribuyendo a la homeostasis del calcio, crítica para una adecuada función contráctil y fisiológica del corazón y son, además, blancos terapéuticos de importancia clínica en patologías cardiacas [8, 9].

Los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje tipo L, son complejos proteicos compuestos por cinco subunidades: la subunidad α_1 (170 kDa), subunidad principal o formadora del poro del canal; así como, las subunidades auxiliares β (50-78 kDa), γ (32 kDa), y el dímero $\alpha_2\delta$ (150/17-25 kDa, respectivamente), unido por un puente disulfuro (Figura 1) [9]. Los canales de calcio activados por voltaje requieren una subunidad auxiliar la β , para su correcto transporte y localización en la membrana plasmática [10], así como, para una adecuada modulación de sus propiedades fisiológicas [11].

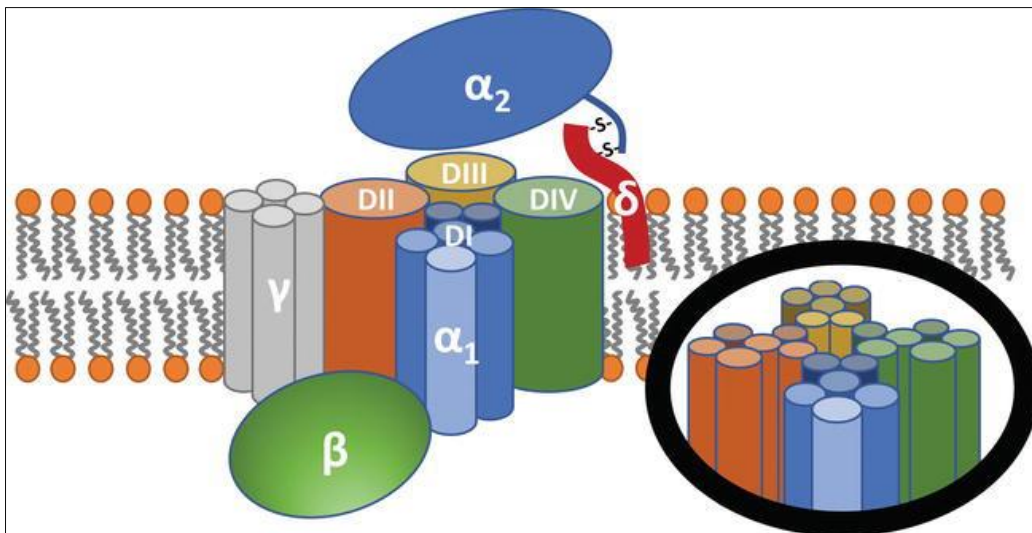


Figura 1. Esquema del canal de calcio voltaje dependiente tipo L, donde se muestran los cuatro dominios que forman la subunidad α_1 , las subunidades γ y β , así como, el dímero $\alpha_2\delta$ [9].

1.2.2. Clasificación de los canales VGCC

Los canales de calcio tipo L son un grupo de canales iónicos de gran relevancia en la fisiología celular y la fisiopatología. Se caracterizan por su capacidad para permitir el flujo de iones calcio (Ca^{2+}) a través de las membranas celulares y son fundamentales en varios procesos biológicos, incluyendo la contracción muscular, la liberación de neurotransmisores y la excitabilidad cardíaca. Como se mencionó anteriormente, los canales de calcio tipo L son parte de la superfamilia de canales VGCC que se dividen

en varios tipos según su sensibilidad al voltaje y su conductancia. Dentro de esta clasificación, los canales tipo L se caracterizan por su capacidad de abrirse a potenciales de membrana positivos, es decir, en condiciones de despolarización del potencial de acción cardíaco [12,13] y su persistencia en la activación durante prolongados períodos de tiempo, dicha característica es esencial para funciones que requieren una liberación continua de calcio, como la secreción de hormonas y la contracción del músculo cardíaco como se muestra en la Figura 2 [14].

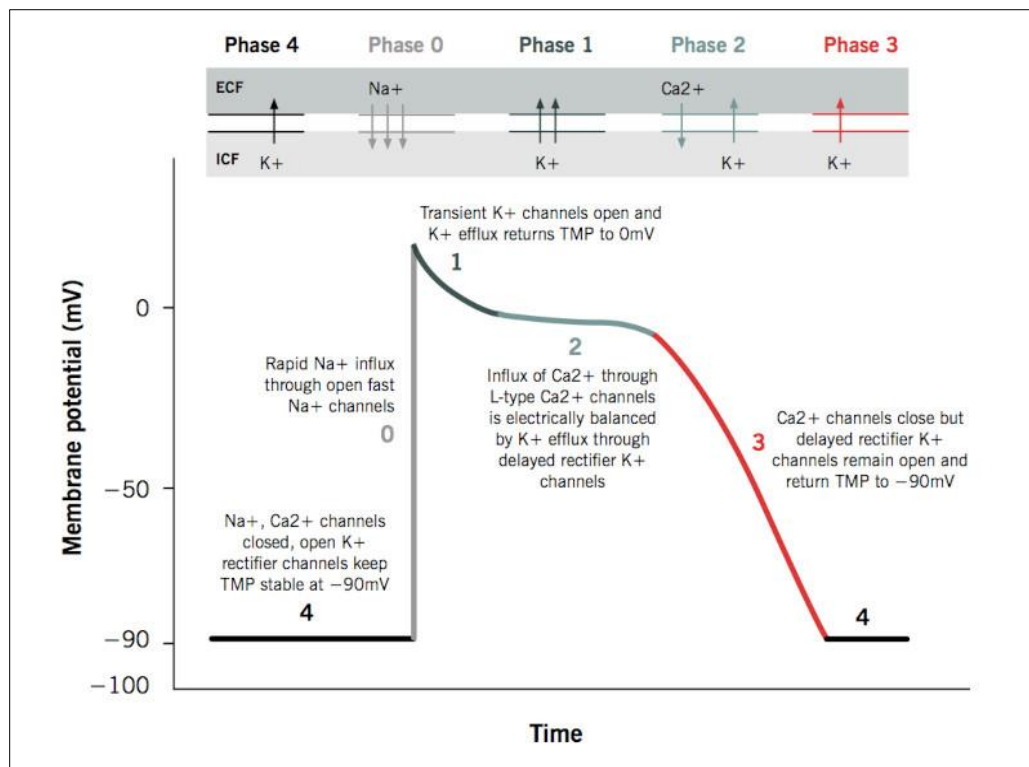


Figura 2. Fases del potencial de acción cardíaco. **Fase 4 o potencial de reposo:** se establece un equilibrio iónico, manteniendo un potencial de reposo estable hasta que se inicia un nuevo potencial de acción. **Fase 0 o despolarización:** ocurre cuando los canales de Na⁺ se abren permitiendo una entrada rápida del sodio, lo que despolariza la membrana y genera un aumento abrupto del potencial de membrana. **Fase 1 o repolarización inicial:** los canales de Na⁺ se cierran y los de K⁺ se abren brevemente, lo que causa una pequeña salida de K⁺ y una ligera repolarización. **Fase 2 o meseta:** los canales de Ca²⁺ tipo L se abren permitiendo la entrada de calcio mientras la salida de K⁺ continúa. Esto equilibra la carga y crea una fase prolongada (meseta), crucial para la contracción sostenida del corazón. **Fase 3 o repolarización rápida:** los canales de calcio se cierran y la salida de potasio se acelera, lo que causa la repolarización completa de la célula, restableciendo el potencial de membrana negativo [12].

Este ciclo asegura la correcta contracción y relajación del músculo cardíaco, sincronizando los latidos [14].

Los canales de calcio voltaje dependiente se dividen en varios subtipos, los cuales se identifican mediante la denominación de la subunidad α [14, 15]. Hasta la fecha se conocen 10 genes que codifican la subunidad α formadora del poro de los VGCC y se dividen en 2 subfamilias: tres genes codifican los canales activados por bajo voltaje, canales de calcio tipo T (Cav3.1 a 3.3), mientras que siete genes codifican los canales activados por alto voltaje que consisten en los canales de calcio tipo P/Q (Cav2.1), los tipos N (Cav2.2), los tipo R (Cav2.3) y los tipo L (Cav1.1 a Cav1.4, codificados por los genes CACNA1S, CACNA1C, CACNA1D y CACNA1F, respectivamente) [16], como se muestran en la Figura 3. Siendo los canales Cav1 los que se estudian en este proyecto de investigación, principalmente los Cav1.2:

- **Cav1.1 o $\alpha 1s$:** localizados predominantemente en musculo esquelético, estos canales son cruciales para la contracción muscular a través del acople excitación-contracción.
- **Cav1.2 o $\alpha 1c$:** se encuentran en el corazón y en otros tejidos excitables, son esenciales para la excitabilidad cardíaca y la contracción miocárdica.
- **Cav1.3 $\alpha 1d$:** estos canales son expresados en el oído interno y en las células de las glándulas endocrinas, desempeñando un papel vital en la liberación de hormonas.
- **Cav1.4 $\alpha 1f$:** predominantemente en la retina, están involucrados en la transmisión de señales visuales.

1.3. Subunidades de los canales VGCC

Los canales de calcio dependientes de voltaje son actores principales en muchos procesos fisiológicos en células excitables, como se mencionó anteriormente hay tres

subdivisiones principales de los canales de calcio definidas por la subunidad α formadora del poro, los canales Cav1, Cav2 y Cav3 (Figura 3) [18].

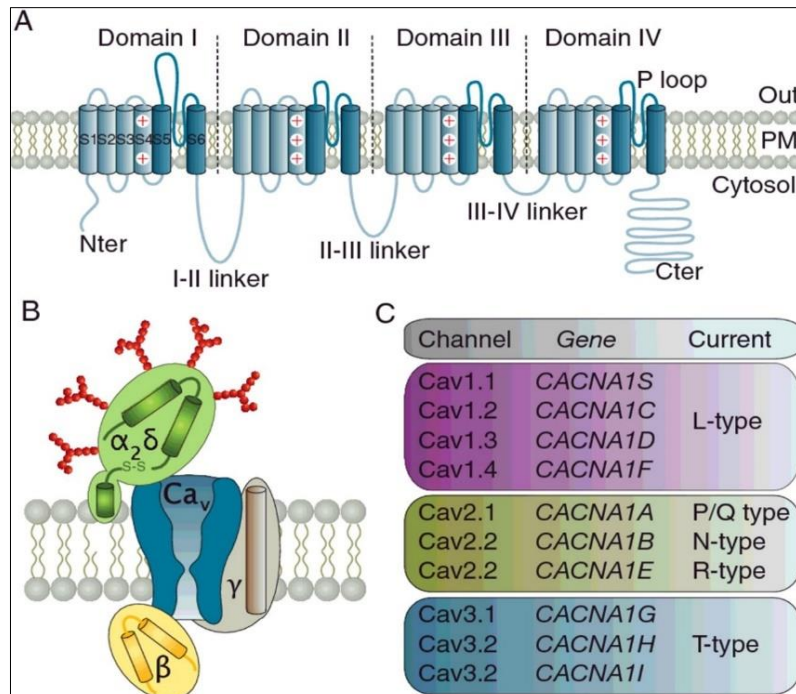


Figura 3. Canales de calcio voltaje dependientes. **A.** Topología de la subunidad α formadora del poro, que consiste en 4 repeticiones o dominios (I a IV), formados por seis segmentos transmembranales (S1 a S6); el dominio 1 se une al 2 a través del linker I-II, los dominios 2 y 3 unidos por el linker II-III y los dominios 3 y 4 los une el linker III-IV. **B.** Complejo de los canales de calcio voltaje dependiente formado por las subunidades α , γ , β , α_2 y δ . **C.** Familias y genes que codifican los canales de calcio voltaje dependientes [18].

Los VGCC son complejos proteicos formados por cuatro subunidades, la principal o formadora del poro α_1 y las subunidades auxiliares o accesorias β , γ y $\alpha_2\delta$ [14]. El análisis de las propiedades bioquímicas, de glicosilación y de hidrofobicidad de estas subunidades llevó a entender un modelo que está formado por la subunidad principal transmembranal α_1 , asociada con el dímero $\alpha_2\delta$, una subunidad β intracelular y una subunidad γ transmembranal, como se muestra en la Figura 1 [14, 18]. Aunque las subunidades α_1 determinan las principales propiedades biofísicas y farmacológicas de estos canales, su expresión y sus propiedades también están reguladas por las subunidades auxiliares, principalmente por el complejo $\alpha_2\delta$ y la subunidad β [18-20].

Las subunidades accesorias desempeñan un papel importante en el plegamiento del canal y posterior a la síntesis de la subunidad α_1 apoyan al transporte de ésta a la superficie celular y a dominios particulares en células polarizadas como las neuronas, en conjunto estos procesos se conocen como tráfico e implican diversos pasos [19, 20]. Asimismo, los canales Cav1 y Cav2 forman un complejo heteromérico ensamblándose con una de las cuatro subunidades β_1 - β_4 que son codificadas por los genes CACNB1-4 y una de las cuatro subunidades $\alpha_2\delta_1$ - $\alpha_2\delta_4$ codificadas por los genes CACNA2D1-4, como se observa en la Figura 4. Las subunidades α de los canales Cav3 llegan a formar canales funcionales solas, pero algunos se asocian con subunidades accesorias [18].

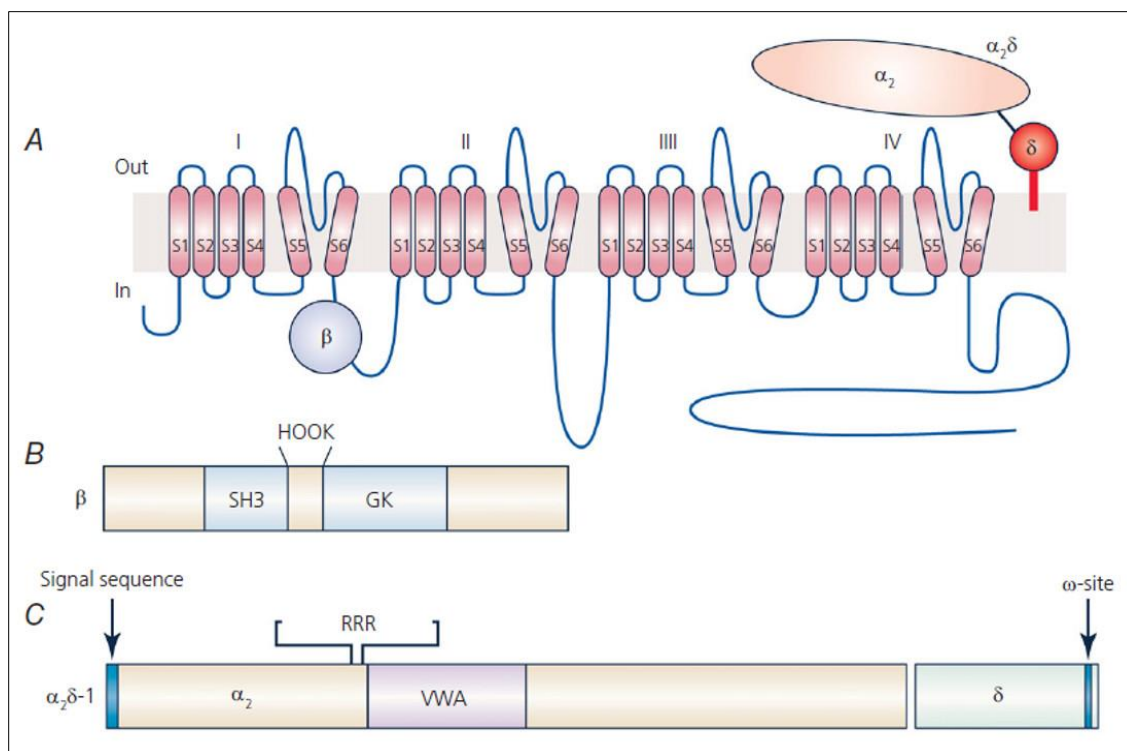


Figura 4. Topología del complejo del canal de calcio: A) Interacción de la subunidad principal α_1 con las subunidades auxiliares β y $\alpha_2\delta$. B y C) Dominios de las subunidades β y $\alpha_2\delta$, respectivamente [18].

Originalmente se consideró que la subunidad auxiliar γ sólo se encontraba en complejos de los VGCC de músculo esquelético. Sin embargo, se ha ido revelando la existencia de diversas subunidades gamma, codificadas en distintos cromosomas y

con diferente distribución en tejidos: γ 1 (cromosoma 17q24, músculo esquelético), γ 2 (cromosoma 22, cerebro), γ 3 (cromosoma 16p13.1-p12, cerebro), γ 4 (cromosoma 17q24, corazón, pulmón, cerebro, próstata y medula espinal), γ 5 (cromosoma 17q24, cerebro), γ 6 (cromosoma 19q13.4, corazón, músculo esquelético y cerebro), γ 7 (cromosoma 19q13.4, cerebro, corazón, pulmón y testículos) y γ 8 (19q13.4, cerebro, testículos y medula espinal) [18,19].

A pesar de que ha sido posible identificar en varios tejidos a diversas proteínas asociadas en complejo con los canales de calcio [19]. Sólo se han identificado a las tres proteínas antes mencionadas β , γ y α 2 δ como subunidades accesorias de los VGCC, ya que éstas están presentes en canales de calcio purificados bioquímicamente, asimismo tienen la capacidad de modular de manera directa el tráfico y las propiedades biofísicas de la subunidad α 1c, al interactuar y asociarse directa y establemente con la subunidad formadora del poro [19].

Asimismo, cada subunidad desempeña un papel en la modulación de las propiedades, la estabilidad y los mecanismos reguladores del canal, por lo que es fundamental comprender la interacción funcional y estructural que subyacen entre las subunidades que forman los canales VGCC, tanto en condiciones fisiológicas como en fisiopatológicas [14, 21]. Si alguna de estas subunidades presenta cualquier desregulación, se pueden originar diversas patologías, como enfermedades cardiovasculares o neurológicas. Por ejemplo, las arritmias cardíacas, la esquizofrenia o el autismo están asociados con anomalías en la función de los canales Cav [14, 18, 22].

Los avances en la biología estructural han proporcionado información acerca de las complejas disposiciones tridimensionales y de las interacciones de las subunidades de los canales de VGCC, lo que los posiciona como potenciales objetivos terapéuticos en diversos contextos clínicos [21, 23].

La **subunidad $\alpha 1$** está formada aproximadamente por 200 aminoácidos, organizados en los 4 dominios repetidos (I-IV). Cada dominio comprende seis segmentos transmembranales (S1-S6), conectados por bucles asociados a la membrana, como se muestra en la Figura 5. Los segmentos intracelulares participan en interacciones con otras subunidades y proteínas reguladoras. Como ya se hizo mención, esta subunidad es fundamental para formar el poro conductor de iones del canal, lo que permite la entrada de Ca^{2+} en respuesta a la despolarización de la membrana [14, 24, 25].

La **subunidad auxiliar β** es un componente clave que modula las propiedades del canal Cav y que participa en el transporte de la subunidad $\alpha 1$ posterior a su síntesis de novo. Posee una estructura que incluye un dominio SH3 y un dominio guanilato cinasa (GK), ambos característicos de la familia MAGUK de proteínas de andamiaje. La subunidad β interacciona con la subunidad $\alpha 1$ a través del dominio de interacción α (AID), lo que influye en la expresión, en la cinética y la farmacología del canal (Figura 5). La presencia de la subunidad β también puede estabilizar el complejo del canal, mejorar su dependencia del voltaje y regular su actividad a través de interacciones directas proteína-proteína [19, 22, 26].

La **subunidad accesoria $\alpha 2\delta$** es una proteína glicosilada formada por la proteína $\alpha 2$ y δ unidas por puentes de disulfuro, la región $\alpha 2$ existe en posición extracelular primordialmente y la región δ se encuentra anclada a la membrana, como se puede observar en la Figura 5. Desempeña un papel crucial en el tráfico y en la localización de los canales facilitando su expresión en la membrana plasmática, también afecta la densidad de las corrientes, la cinética del canal y las relaciones corriente-voltaje modulando la sensibilidad al voltaje. A esta subunidad se le ha implicado en varios trastornos neurológicos y musculares debido a su influencia en la función del canal [14, 21].

Aunque no está bien caracterizada la **subunidad auxiliar γ** , se cree que esta subunidad ayuda a la modulación y localización de los canales Cav dentro de la membrana (Figura 5). Su función suele depender del tipo de VGCC y de su localización, y puede variar entre los distintos tipos de canales. La primera subunidad identificada fue γ_1 que se purificó del músculo esquelético y se descubrió que formaba parte de un complejo del canal funcional con las subunidades α_1s (Cav1.1), β_1a y $\alpha_2\gamma_1$, dicho canal produce la corriente de calcio tipo L que en el musculo esquelético adulto es la principal corriente de calcio. Debido a problemas asociados con la expresión de la subunidad α_1s se han estudiado los efectos reguladores de la subunidad γ_1 a través de la coexpresión funcional con la subunidad cardíaca α_1c , β y $\alpha_2\delta$ en sistemas heterólogos. Así se encontró que la subunidad accesoria γ_1 regula el voltaje y la cinética del proceso de inactivación [14, 19, 27].

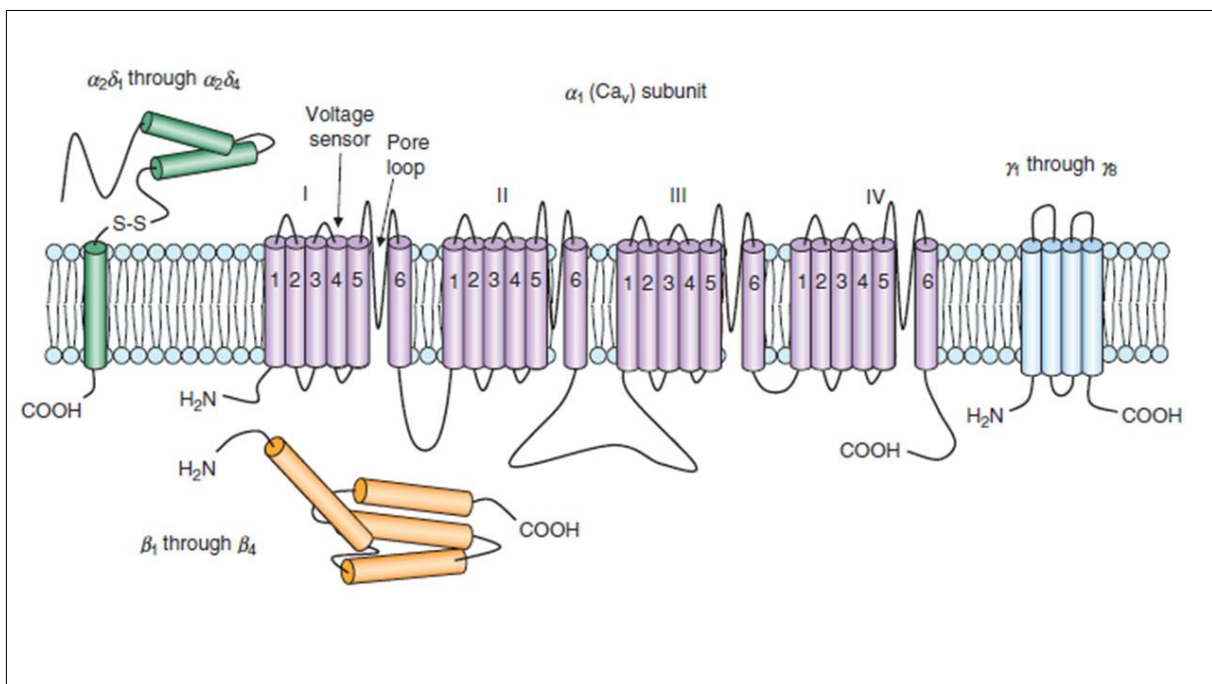


Figura 5. Estructura de los canales VGCC: topología de la subunidad α_1 y de las subunidades auxiliares β , $\alpha_2\delta$ y γ [25].

1.4. Regulación de la expresión de los canales de calcio

Los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) son proteínas de membrana esenciales que facilitan la entrada de iones de Ca^{2+} en las células excitables, vinculando así las señales eléctricas a respuestas celulares críticas como la liberación de neurotransmisores, la contracción muscular y la expresión génica. La regulación de los canales VGCC es un proceso complejo que involucra varios mecanismos, incluidas modificaciones transcripcionales, postraduccionales, entre otras, que rigen su síntesis, localización y actividad, lo cual afecta, tanto las vías de señalización como la homeostasis del calcio dentro de la célula. Comprender cómo se regulan los VGCC no sólo proporciona información sobre los mecanismos celulares fundamentales, sino que también ofrece posibles objetivos terapéuticos para el tratamiento de las afecciones en las que están implicados estos canales iónicos.

1.4.1. Modificaciones postraduccionales

Las modificaciones postraduccionales (PTM, por sus siglas en inglés) de los canales de calcio VGCC desempeñan un papel crucial en la regulación de su función y localización celular. Entre las modificaciones más importantes se encuentran la fosforilación, la S-nitrosilación, ubiquitinación, la sumoilación y el procesamiento proteolítico, cada una de las cuales contribuye a la modulación de la actividad del canal y la dinámica de la señalización, procesos que se muestran en la Figura 6.

- **Fosforilación:** es un mecanismo de gran relevancia en los canales de calcio tipo L, ya que influye notablemente en sus propiedades de activación y en su interacción con las vías de señalización. La actividad de los canales de calcio tipo L, como el Cav1.2 se modula a través de la fosforilación por la proteína cinasa A (PKA) y la proteína cinasa C (PKC), lo que mejora la entrada del calcio necesaria para el acoplamiento excitación-contracción en el músculo esquelético y cardíaco. También, la regulación a través de la fosforilación afecta la tasa de

inactivación del canal y facilita la modulación de la liberación de neurotransmisores en las terminales sinápticas, desempeñando así un papel clave en la plasticidad sináptica [14, 28].

- **S-nitrosilación:** es un mecanismo mediado por el óxido nítrico (NO), implica la unión covalente de una molécula de NO a un residuo de cisteína, específicamente al grupo tiol (S-NO) y es una modificación postraducciona l ubicua que afecta a más de 1000 proteínas que participan en diversos procesos fisiológicos, incluidos los canales de calcio cardíacos Cav1.2 [28].
- **Ubiquitinación:** es un proceso que consiste en la unión de manera covalente de ubiquitina con otras proteínas, lo cual se lleva a cabo principalmente por una cascada enzimática que involucra enzimas activadoras de ubiquitina (E1), enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) y ligasas de ubiquitina (E3). Investigaciones recientes han resaltado el papel tan complejo del sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) en la modulación de la actividad de los VGCC. La ubiquitinación afecta a la cantidad de VGCC en la membrana plasmática regulando su estabilidad y degradación. El equilibrio entre los procesos de ubiquitinación y desubiquitinación es fundamental para mantener los niveles adecuados de VGCC, lo que influye en diversas afecciones fisiológicas y patofisiológicas, incluidas las canalopatías. Las anomalías en la ubiquitinación de VGCC puede provocar respuestas celulares alteradas y se han relacionado con una variedad de trastornos genéticos asociados con la desregulación del calcio [28, 29].
- **Sumoilación:** es un proceso que implica la unión covalente de proteínas pequeñas modificadoras similares a la ubiquitina (SUMO) a proteínas diana, incluidos los VGCC como los canales tipo N Cav2.2. Esta modificación mejora la densidad de corriente del Cav2.2 y se ve facilitada por la enzima conjugada Ubc9,

como se ha demostrado a través de experimentos que muestran que la coexpresión de SUMO-1 con Cav2.2 conduce una mayor actividad del canal y a cambios en el punto medio de activación. En concreto, se han identificado los residuos de lisina en el canal Cav2.2, particularmente Lisina 394, como críticos en esta modulación, lo que destaca la naturaleza selectiva de la sumoilación al influir en las propiedades del canal y la liberación de neurotransmisores presinápticos [30].

- **Procesamiento proteolítico:** se refiere a la escisión de las subunidades de los canales VGCC que puede afectar su localización y actividad funcional. Los VGCC experimentan un importante procesamiento proteolítico que influye en sus mecanismos reguladores y se produce de distintas maneras según el tejido. En los tejidos del músculo cardíaco y esquelético, la proteólisis se dirige principalmente al carboxilo terminal distal de la subunidad $\alpha 1$. Esta escisión produce un fragmento auto inhibitorio que puede reasociarse con el carboxilo terminal proximal, modulando la función del canal durante la estimulación β -adrenérgica. En el cerebro se produce una escisión similar, probablemente por proteasas similares a la calpaína que pueden producir fragmentos que se translocan al núcleo y presentan actividad como factores de transcripción. En los canales Cav1 y Cav2 la subunidad δ , que está asociada a la subunidad $\alpha 2$, sufre modificaciones postraduccionales significativas que incluyen la escisión y posteriormente la formación de un ancla de glicosilfosfatidilinosito (GPI). Este procesamiento altera la interacción de los canales con la membrana plasmática y puede modular la eficacia general de la señalización del calcio [28, 31, 32].
- **Modulación mediada por proteína G:** es otra modificación postraducciona que regula a los VGCC. Se han identificado regiones intracelulares específicas de los canales de calcio voltaje dependiente, en particular el bucle entre los dominios I

y II de los canales Cav2.2, como sitios de unión para las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G, que puede inhibir la actividad de los canales. Esta regulación es esencial para la integración de la señalización del calcio con varias vías del receptor acoplado a la proteína G (GPCR), lo que permite ajustar con precisión las respuestas fisiológicas dependientes del calcio en varios tipos de células [28, 33].

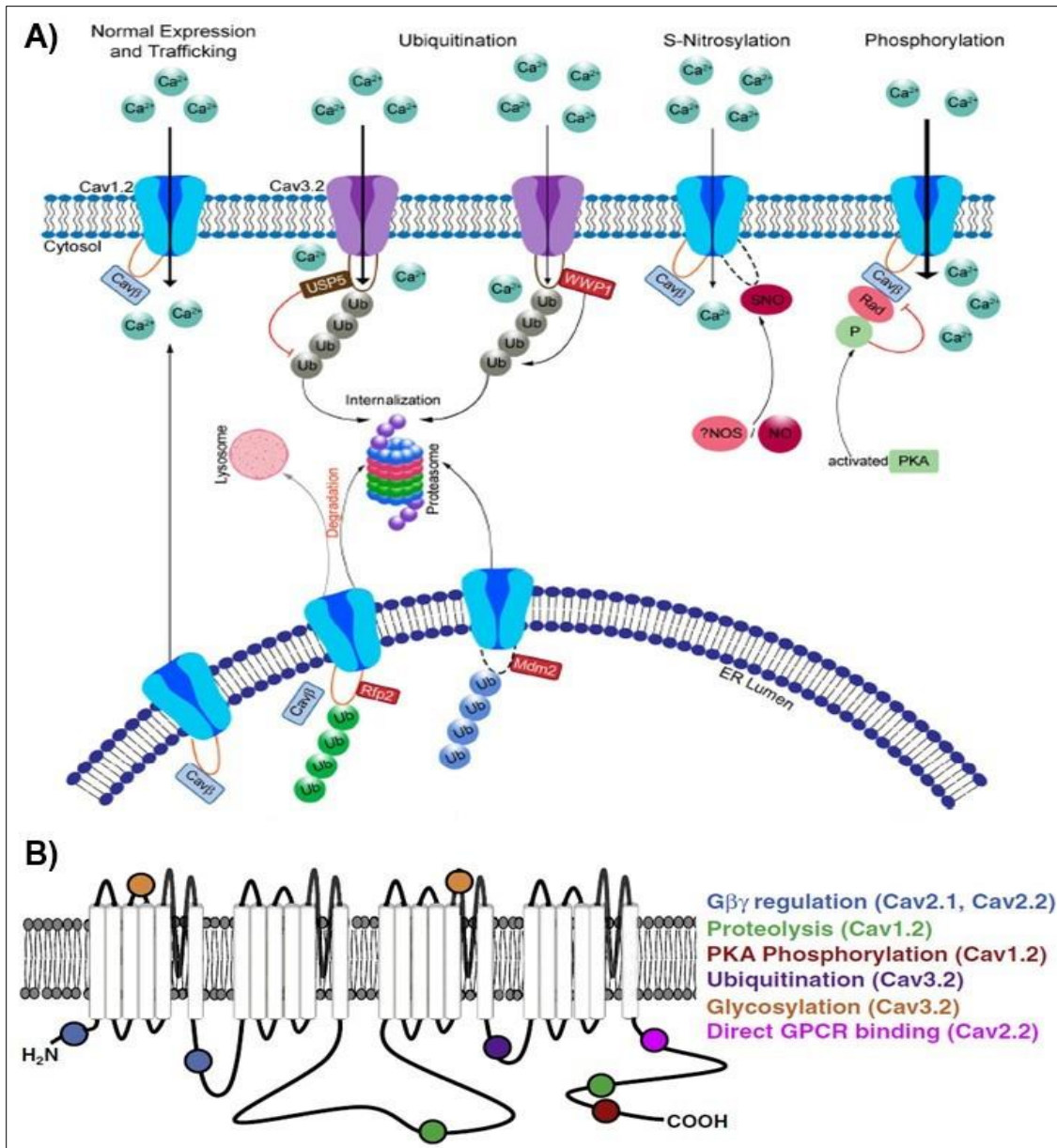


Figura 6. Procesos de regulación postraduccional en canales de calcio voltaje dependientes. A) Vías de señalización que siguen los mecanismos como: ubiquitinación, S-nitrosilación y fosforilación [28]. B) Esquema de la subunidad α_1 y los sitios de interacción en los mecanismos de regulación [33].

1.4.2. Regulación transcripcional y génica por calcio

La regulación transcripcional de los canales de calcio voltaje dependientes, así como el calcio como segundo mensajero en la modulación de la expresión génica son aspectos cruciales de la señalización celular, particularmente en procesos cardiacos, neuronales y en el músculo esquelético donde está involucrado el calcio y factores de transcripción.

El calcio juega un papel en la regulación de los factores transcripcionales que modulan la expresión génica ante diversos estímulos. Uno de los mecanismos de mayor relevancia implica la activación de la vía NFAT (factor nuclear de células T activadas) que se regula a través de la fosforilación y posterior localización subcelular de las proteínas NFAT. En condiciones no estimuladas, NFAT está hiperfosforilada y se localiza en el citoplasma. Tras el aumento del calcio intracelular, la calcineurina (CaN) desfosforila a NFAT, lo que permite su translocación a núcleo donde puede activar genes implicados en diversos procesos celulares y también en patologías incluidas la insuficiencia cardiaca, la cardiopatía isquémica y la hipertrofia cardiaca [34-37], como se muestra en la Figura 7 [37].

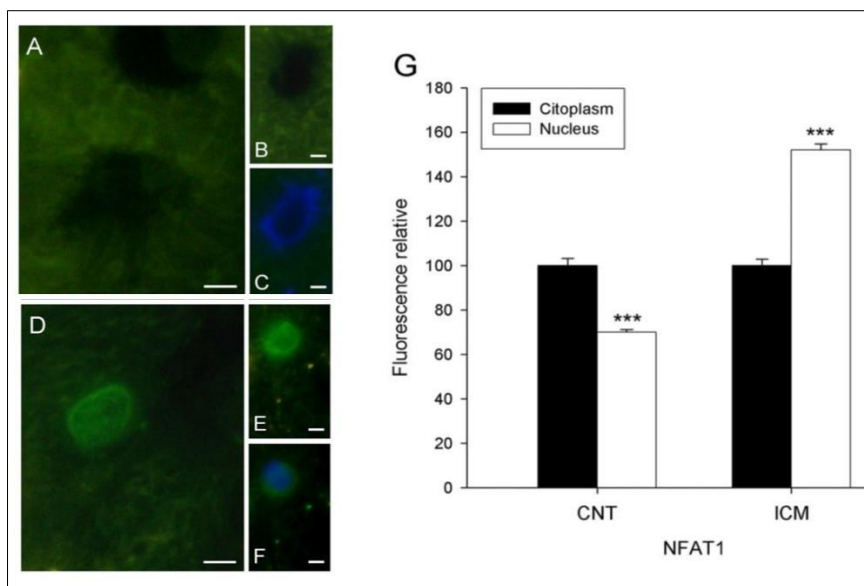


Figura 7. Micrografía de fluorescencia de la translocación nuclear de NFAT en cardiomiocitos humanos. A-C) NFAT se localiza en citoplasma en condiciones fisiológicas. D-F) NFAT se transloca al núcleo en la cardiopatía isquémica. G) Análisis de la fluorescencia en el grupo control y en la cardiopatía isquémica [37].

Además, la interacción de NFAT con otros factores de transcripción, como el factor potenciador de miocitos 2 (MEF2) y GATA4, participa en la regulación génica en respuesta al calcio, particularmente en la insuficiencia cardíaca donde sus niveles de expresión se encuentran elevados, lo que indica una regulación cooperativa de la expresión génica. Se ha demostrado que GATA4 interactúa con NFAT, promoviendo la activación sinérgica de la expresión de genes cardíacos, lo cual es crucial para la remodelación patológica observada en la insuficiencia cardíaca. También, en la miocardiopatía isquémica, como en la dilatada, existe una correlación significativa entre los niveles proteicos de NFAT y MEF2, lo que indica que esos dos factores pueden trabajar en conjunto para modular el panorama transcripcional en condiciones patológicas [36, 37], como se muestra en la Figura 8.

Otras investigaciones también han identificado el papel de la histona desacetilasa 4 (HDAC4) en la actividad transcripcional de MEF2. En condiciones fisiológicas HDAC4 inhibe la actividad de MEF2 al retenerla en el citoplasma. Sin embargo, tras la activación de CaMKII (proteína cinasa II dependiente de calcio/calmodulina), por el aumento del calcio intracelular, la HDAC4 se fosforila y se exporta desde el núcleo, lo que permite que MEF2 active genes diana. Esta vía tiene alta significancia en la insuficiencia cardíaca, donde se han encontrado los niveles tanto de HDAC4 como de MEF2 elevados, lo que sugiere un ciclo de retroalimentación que puede aumentar la remodelación cardíaca y la hipertrofia [37-39], de acuerdo con lo presentado en la Figura 8.

Asimismo, la actividad de las vías de señalización dependientes de calcio puede modular la expresión de genes tempranos como, c-fos y CREB (proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc). La regulación transcripcional de los canales de calcio dependientes de voltaje por CREB y su forma fosforilada pCREB, tiene implicaciones fundamentales en varios procesos fisiológicos como la liberación de

neurotransmisores, la contracción muscular y la expresión génica. Cabe destacar que la señalización de calcio tiene un papel primordial en la activación de CREB, ya que el ingreso de calcio en las células activa diversas vías de señalización, incluida Ras-MAPK que conduce a la fosforilación de CREB, particularmente en el residuo S133, lo cual es fundamental para su activación. Esta modificación promueve la unión de CREB a coactivadores iniciando la actividad transcripcional. Se sabe que la fosforilación en S133 mejora la actividad transcripcional de CREB, pero su fosforilación puede ser en otros residuos como S129, S142 y S143, lo que puede originar efectos opuestos, por ejemplo, la fosforilación en S142 inhibe la función de CREB [39-42].

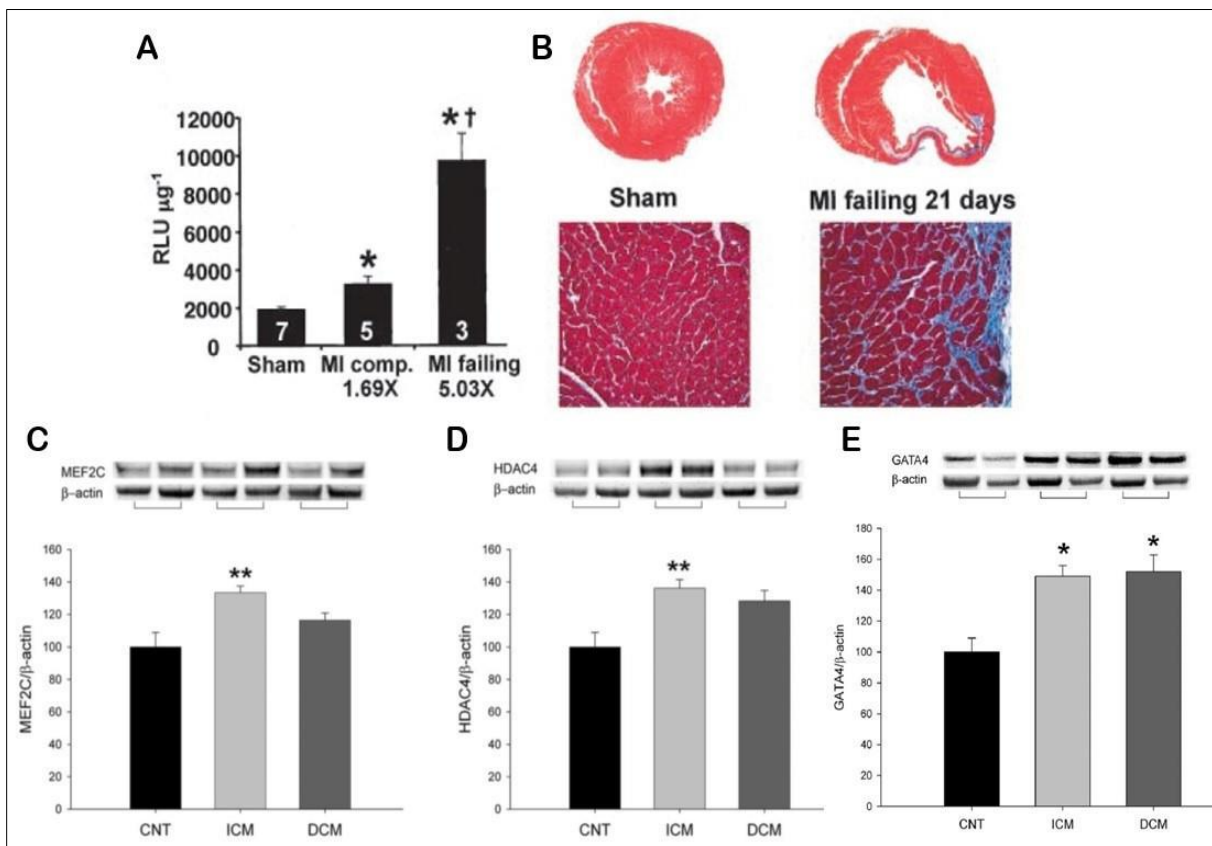


Figura 8. A) Aumento de NFAT en la falla cardíaca inducida por infarto al miocardio en ratones de 8 semanas, evaluada por ensayo de Luciferasa. B) Histología de corazón infartado y tinción de Trichrome, en color azul es la zona con fibrosis [33]. C y D) Aumento de la expresión proteica de MEF2 y HDAC4 en la cardiomiopatía isquémica y E) Aumento en los niveles de la expresión de la proteína GATA4 en la cardiomiopatía isquémica y distal en cardiomiocitos humanos [35].

1.5. La hormona tiroidea T3 y los canales de calcio

1.5.1. Hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas son reguladores bioquímicos esenciales producidos por la glándula tiroides; influyen significativamente en una amplia gama de procesos fisiológicos, incluidos el metabolismo, el crecimiento y el desarrollo. Las dos hormonas principales se esquematizan en la Figura 9, la triyodotironina (T3) y la tiroxina (T4), desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis metabólica, ambas sintetizadas a partir del aminoácido tirosina y que requieren yodo para su síntesis [43].

La tiroxina, o T4, a menudo se considera una prohormona y actúa como reservorio de la T3. Aunque la T4 es menos activa que la T3, se convierte en T3 en los tejidos diana como el hígado, los riñones y el músculo esquelético cuando se requiere. La síntesis de la T4 es un complejo proceso que requiere de la proteína tiroglobulina, que se almacena en los folículos tiroideos hasta que se libera en la circulación. La tiroxina influye en varias funciones metabólicas como la velocidad en la que el cuerpo utiliza las grasas y los carbohidratos, asimismo, desempeña un papel en la síntesis de proteínas. La T3 es la forma biológicamente más activa de la hormona tiroidea y se considera de tres a cinco veces más potente que la T4. Si bien la T3 se produce principalmente en la glándula tiroides, la mayor parte se produce en los tejidos periféricos a través de la conversión de la T4, un proceso que se lleva a cabo por enzimas desyodasas, como se indica en la Figura 9. La T3 es responsable de regular numerosos procesos fisiológicos, como la tasa metabólica, la frecuencia cardíaca y la regulación de la temperatura [43-45].

Además de la T3 y de la T4, la glándula tiroides también produce calcitonina, una hormona que ayuda a regular los niveles de calcio en la sangre al promover la deposición de calcio en los huesos. Si bien, la calcitonina no está catalogada como

una hormona tiroidea que afecte el metabolismo, desempeña un importante papel en la homeostasis del calcio en el organismo [43].

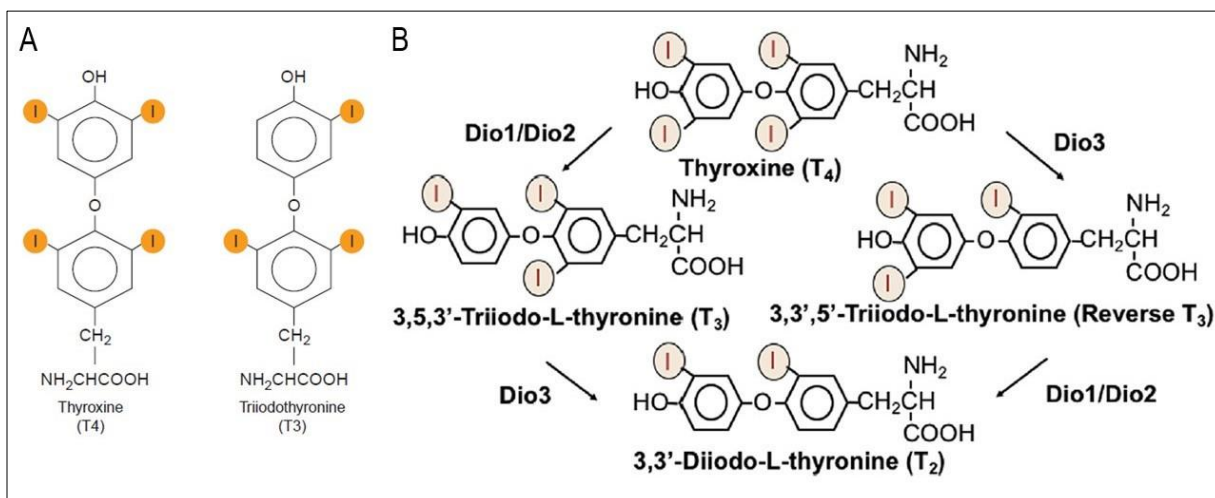


Figura 9. A) Estructura química de las hormonas tiroideas T₃ y T₄ con los yodos resaltados [43]. B) Mecanismo de desyodación de la T₄ por las desyodasas Dio1/Dio2 y Dio3 para obtener la hormona T₃ [44].

La síntesis y la liberación de estas hormonas se controlan meticulosamente a través de una serie de señales hormonales y mecanismos de retroalimentación. La liberación de las hormonas tiroideas está regulada principalmente por el eje hipotálamo-hipófisis-glándula tiroideas. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) que estimula la glándula pituitaria o hipófisis para que produzca la hormona estimulante de la tiroides (TSH). La TSH, a su vez, actúa sobre la glándula tiroidea para promover la síntesis y liberación de T₃ y T₄. Posteriormente, las hormonas T₃ y la T₄ inhiben la secreción de TRH y TSH e ingresan a las células diana. La concentración intracelular de la T₃ está determinada por la actividad de las desyodasas Dio1 y Dio2. Las hormonas tiroideas llevan a cabo sus funciones no genómicas y de igual manera la T₃ ingresa al núcleo y se une a los receptores nucleares de la hormona tiroidea (THR) para regular la expresión de los genes diana de la T₃ [44]. La regulación de la TSH está estrechamente relacionada con los niveles de las hormonas tiroideas circulantes. Las concentraciones elevadas de la T₃ y la T₄ libres proporcionan una

retroalimentación negativa a la glándula pituitaria, inhibiendo la síntesis y la secreción de TSH. Por el contrario, los niveles bajos de estas hormonas estimulan la liberación de TSH. Este circuito de retroalimentación asegura que los niveles de las hormonas tiroideas se mantengan dentro de concentraciones fisiológicas, lo cual asegura la homeostasis metabólica [43, 44], tal como se representa en la Figura 10.

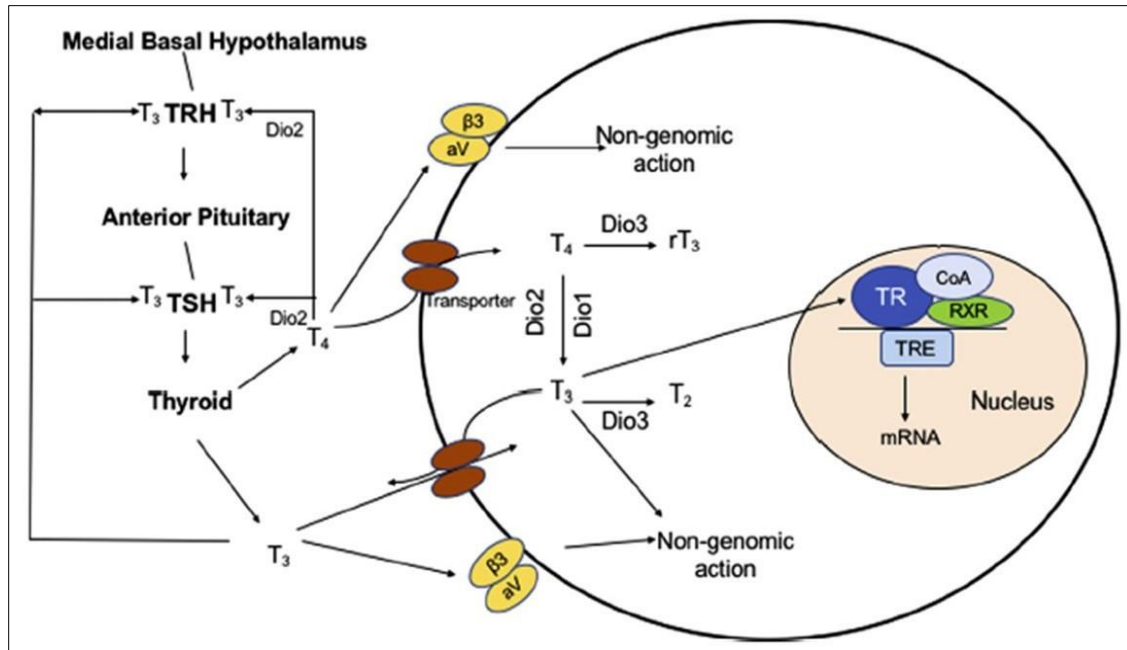


Figura 10. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroideas y su retroalimentación en la liberación y acción de las hormonas tiroideas [43].

En el sistema cardiovascular, las hormonas tiroideas aumentan tanto la frecuencia como la fuerza de las contracciones cardíacas, mejorando así el gasto cardíaco general. Este efecto está relacionado con el aumento de la demanda de oxígeno que acompaña a una mayor actividad metabólica, lo que requiere un mejor flujo sanguíneo para disipar el exceso de calor y dióxido de carbono generado durante estos procesos. La modulación de la función cardíaca por las hormonas tiroideas también es evidente en su participación sobre la miosina en el músculo cardíaco, mejorando la contractilidad; asimismo, mejoran la función sistólica y diastólica del corazón y disminuyen la resistencia vascular sistémica [45].

Además, las hormonas tiroideas regulan la expresión de varios genes en los cardiomiocitos. Regulan a alza a los transportadores de iones como, Na^+/K^+ ATPasa y a los canales de potasio dependientes de voltaje, incluidos Kv1.5, Kv4.2 y Kv4.3, tanto a nivel transcripcional y postranscripcional. Asimismo, regulan a la baja la expresión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), modulando de esta manera el acople-excitación-contracción en los cardiomiocitos [45,46].

1.5.2. La hormona tiroidea T3 y la homeostasis del calcio

La regulación de los canales de calcio voltaje dependientes por la hormona tiroidea triyodotironina (T3) es un aspecto fundamental de la fisiología cardíaca que influye tanto en la función cardíaca como en la salud cardiovascular general. La T3 es la forma activa de las hormonas que se une a los receptores nucleares que inician la transcripción genética y que posteriormente modulan la expresión y la actividad de las proteínas esenciales para el manejo del calcio en los cardiomiocitos [47, 48], como se esquematiza en la Figura 11 [49].

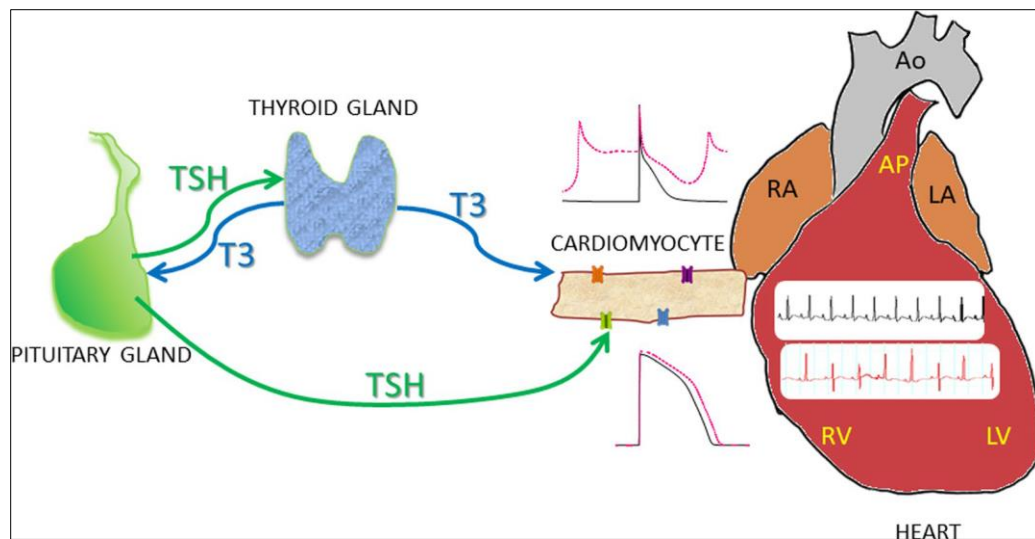


Figura 11. Esquema representativo de la función de las hormonas triyodotironina (T3) y la hormona estimuladora de tiroides sobre la corriente eléctrica de los miocitos cardiacos regulada por las corrientes iónicas que se encargan de generar el potencial de acción en el miocardio [49].

Los canales de calcio dependientes de voltaje son esenciales para varios procesos celulares, como ya se mencionó previamente, y su regulación está influida significativamente por las hormonas tiroideas, en particular la T3. La T3 ejerce su función sobre los Cav uniéndose a receptores nucleares de alta afinidad, que posteriormente modulan la transcripción génica y la síntesis de proteínas involucradas en la regulación de los canales de calcio [48].

La T3 se une a los receptores de la hormona tiroidea (TR) ubicados en la superficie de la célula que luego se translocan al núcleo y se unen a secuencias de ADN específicas conocidas como elementos de respuesta a la hormona tiroidea (TRE). Esta interacción puede provocar la activación o supresión de la transcripción génica, lo que afecta a la expresión de los canales de calcio en los miocitos cardíacos. Además, se ha demostrado que la T3 regula la transcripción de genes relacionados con la homeostasis del calcio, como los que codifican a la adenosina trifosfatasa de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA2) y a la proteína fosfolambano (PLB) [50]. En este sentido, la T3 mejora la contractilidad cardíaca principalmente modulando el manejo del calcio en los cardiomiocitos aumentando la expresión de la SERCA2 en el retículo sarcoplásmico, lo que promueve la recaptura del calcio; mientras que disminuye al fosfolambano que inhibe a la bomba de calcio. En consecuencia, la T3 aumenta al fosfolambano fosforilado, lo que mejora el ciclo del calcio y a su vez el rendimiento contráctil [51]. Además, la hormona tiroidea T3 ejerce un efecto cronotrópico positivo, provocando un aumento de la frecuencia cardíaca a través de la acción directa sobre los canales HCN2 y HCN4, los cuales producen las corrientes denominadas funny, también sobre el NCX, el canal de rianodina (RyR) y los canales de calcio tipo L y tipo T en el nódulo sinoauricular y, en consecuencia, mejora el gasto cardíaco [47]. Este mecanismo es vital para regular las funciones sistólica y diastólica, lo que sugiere que la T3 puede tener actividad como un posible agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades como la insuficiencia cardíaca. Esta relación entre la T3 y los canales

de calcio resalta el papel integral de las hormonas tiroideas en el mantenimiento de un gasto cardíaco eficiente [52, 53].

Estudios en pacientes con infarto agudo al miocardio e insuficiencia cardíaca crónica han demostrado que el tratamiento con la T3 mejora la función cardíaca durante la recuperación postisquemia, asimismo limita la apoptosis, lo que destaca su papel cardioprotector [54].

1.5.3. Asociación entre la hormona tiroidea T3 y los canales de calcio en el hipertiroidismo y patologías cardiovasculares

Existen diversos estudios sobre los cambios en los canales de calcio producidos principalmente en procesos relacionados con el hipertiroidismo. Se ha demostrado así que la hormona T3 participa en la regulación de la subunidad $\alpha 1c$ de los canales de calcio Cav1.2 a través de procesos genómicos y no genómicos. La administración de la T3 disminuye significativamente la expresión del ARNm de la subunidad $\alpha 1c$ en cardiomiocitos ventriculares de ratas Lewis adultas hipertiroides en comparación con ratas eutiroides. Esta reducción persiste y no se modifica por el uso de beta bloqueadores, como el bisoprolol [55]. A pesar de la disminución en la expresión de la subunidad $\alpha 1c$, la T3 aumenta la corriente de calcio tipo L a tiempos cortos debido a la activación de la cascada de la adenilato ciclasa. Sin embargo, este aumento es transitorio ya que después de algunos días la corriente disminuye, lo que podría contribuir a la menor tolerancia al ejercicio y síntomas de disfunción cardíaca en el hipertiroidismo [55].

En un modelo de rata con hipertiroidismo inducido por tiroidectomía, la administración de la T3 redujo los niveles proteicos de la subunidad $\alpha 1c$ de los canales calcio tipo L en el tejido auricular, lo que lleva a una disminución de la duración del potencial de

acción (DPA) en las células miocárdicas auriculares. Esta reducción de la DPA facilita condiciones que contribuyen al desarrollo de la fibrilación auricular. En células HL-1 de origen auricular, la T3 disminuye a las 0.5 y 2 horas la expresión del ARNm de la subunidad $\alpha 1c$, mientras que los niveles proteicos disminuyen hasta las 24 horas. El mayor efecto de la T3 sobre la subunidad $\alpha 1c$ se observó con una concentración de 100 nM (nmol/L) [56]. El mecanismo subyacente implica la interacción entre la T3 y el factor de transcripción CREB en las células HL-1. La T3 disminuye la fosforilación en la Ser133, limitando su activación y su capacidad para promover la transcripción del gen que codifica a la subunidad $\alpha 1c$. Además, la T3 induce una interacción con el receptor de la hormona tiroidea (TR), particularmente el subtipo TR α , que se une a CREB y suprime la actividad de este último promotor del canal de calcio, disminuyendo su expresión y la corriente de calcio. Este “cross-talk” entre TR y CREB interfiere con la expresión de los canales de calcio tipo L, lo cual es crucial en la modificación de la actividad eléctrica auricular observada en el hipertiroidismo [56, 57].

En otros estudios, se ha observado como la T3 ejerce un papel crucial en la regulación de la subunidad $\alpha 1c$ de los canales de calcio Cav1.2, especialmente en el contexto de la insuficiencia cardíaca inducida por infarto al miocardio. La subunidad formadora del poro $\alpha 1c$ es fundamental en los procesos de acople excitación-contracción en el corazón, permitiendo la entrada de calcio a través de los túbulos transversos (TT) al interior de los cardiomiocitos, lo cual es necesario para la contracción efectiva de las células miocárdicas [58]. Este estudio muestra que la T3 actúa sobre la expresión y estabilidad de los canales Cav1.2 que se encuentran en los TT. En la insuficiencia cardíaca se observa una remodelación alterada de los TT, lo que incluye una disminución en la organización y en la expresión del ARNm y los niveles de la proteína de $\alpha 1c$, de los canales RyR2 y de otras proteínas esenciales como, BIN1 y Jph2. Esta

desorganización provoca una disrupción en el flujo y sincronización del calcio, reduciendo la eficiencia de contracción de los cardiomiocitos [58].

La administración de la T3 después del infarto al miocardio ayuda a restaurar los niveles de expresión de la subunidad $\alpha 1c$ de los canales Cav1.2, así como la densidad de estos canales y a mejorar la organización de los TT, lo que permite el retorno parcial hacia la normalidad en el transporte de calcio. Este efecto se traduce en una mejora de la contractilidad celular y la función cardíaca. Además, la T3 modula indirectamente la actividad de los canales Cav1.2 a través de la regulación de genes asociados a la yuxtaposición de los canales Cav1.2 y RyR2 en los TT, optimizando la sincronización entre la entrada de calcio extracelular y su liberación desde el retículo sarcoplásmico [58]. Resaltando que la T3 podría tener un papel cardioprotector en los miocitos dañados al participar en procesos genómicos y no genómicos directa e indirectamente sobre la subunidad $\alpha 1c$.

2. Hipótesis

- La subunidad $\beta 4$ tiene una función represora sobre el gen CACNA1C abatiendo la expresión de la subunidad $\alpha 1c$ en células cardíacas.
- La hormona tiroidea T3 puede incrementar la expresión de los canales de calcio tipo L (Cav1.2) en células cardíacas mediante la disminución de la expresión de la subunidad auxiliar $\beta 4$.
- La inhibición de la interacción entre la proteína $\beta 4$ y el gen CACNA1C puede ser a través de un mecanismo en el que T3 promueva la translocación nuclear del factor de transcripción pCREB, lo cual, origina la activación la transcripción del gen CACNA1C.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Determinar el papel de la subunidad $\beta 4$ en la expresión de los canales de calcio tipo L en la línea celular H9c2 y en cardiomiocitos de rata Wistar adulta en condiciones fisiológicas.

3.2. Objetivos particulares

- Evaluar la expresión del factor de transcripción pCREB y de las subunidades $\alpha 1c$ y $\beta 4$ de los canales Cav1.2 en la línea celular H9c2 y en miocitos cardiacos de rata adulta tanto en condiciones control como tratados con la hormona tiroidea T3.
- Determinar el efecto de la sobreexpresión de la subunidad $\beta 4$ sobre la expresión de la subunidad $\alpha 1c$ de los canales Cav1.2.
- Estudiar el efecto de la hormona T3 sobre la expresión de las subunidades $\beta 4$ y $\alpha 1c$ de los canales Cav1.2.
- Determinar el papel del factor de transcripción pCREB en la regulación de la subunidad $\beta 4$ sobre la subunidad $\alpha 1c$ de los canales Cav1.2, mediada por la hormona T3.

4. Material y métodos

4.1. Reactivos

- **PBS 10X:** 2 g de KCl, 80 g de NaCl, 2 g de KH_2PO_4 y 11.5 g de Na_2HPO_4 disolver en 500 mL, ajustar a pH 7.4 con NaOH 1N.
- **Buffer de corrida para proteínas 10X:** 30.2 g de Tris base, 144 g de glicina y 10 g de SDS disolver en 500 mL ajustar pH a 8.3 con HCl concentrado.
- **Buffer de transferencia:** 0.532 g de Tris base, 0.293 g de glicina, 0.375 mL de SDS al 10 % y 20 mL de metanol.
- **Buffer de lisis:** 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% de Tritón X-100 y un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa.
- **Buffer RIPA:** 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5 % deoxicolato de sodio, 0.1 % dodecilsulfato de sodio (SDS), 50 mM de Tris-HCl a pH 8.0 y un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa.
- **Buffer SLB 4X:** 2 mL de Tris HCl pH 6.8 1M, 0.8 g de SDS, 4 mL de Glicerol al 10%, 0.4 mL de 2-mercapto etanol 14.2 M, 1 mL de EDTA 0.5 M y 0.8 g de azul de bromofenol.
- **Acrilamida 30 % y bis-acrilamida 0.8 %:** 30 g de acrilamida y 0.8 g de bis-acrilamida. Agitar durante 2 h con resina AG 501-X8 y enseguida filtrar en papel filtro de poro de 0.45 μm , almacenar en oscuridad.
- **Solución de bloqueo:** leche baja en grasa al 4.5 % en PBS 1X.
- **Azul de Coomassie:** 10 % de ácido acético, agua-metanol 1:1 y 0.25 g/100 mL de azul brillante Coomassie R-250. Filtrar con papel Whatman No. 1.
- **Rojo de Ponceau:** 1 % de ácido acético y 0.5 g/ 100 mL de Ponceau red.

- **Solución Tyrode:** 136 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES y 11 mM de glucosa a pH de 7.4.

4.2. Ratas Wistar macho adultas

Las ratas Wistar macho utilizadas en este proyecto de investigación se obtuvieron del bioterio de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV, de entre 7 a 8 semanas de edad, con un peso aproximado entre 250 y 300 gramos. Se mantuvieron con ciclos luz-oscuridad de 12/12 horas, con agua y alimento estándar *ad libitum*. El protocolo de uso de animales de bioterio en investigación fue aprobado por el Comité Interno para Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del UPEAL del CINVESTAV.

4.3. Aislamiento de cardiomiocitos

A las ratas Wistar macho se les administró 500 U/kg de solución de heparina sódica y se anestesiaron con 50 mg/kg de pentobarbital sódico, ambos administrados por vía intraperitoneal. Una vez que los animales no presentaron respuesta a la estimulación mecánica se extrajo de manera rápida el corazón, se lavó en solución de Tyrode sin Ca²⁺ (136 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES y 11 mM de glucosa (Sigma-Aldrich)) a pH de 7.4 y oxigenado con 95 % de O₂ y 5 % CO₂. Se localizó la aorta y se conectó a una cánula en el sistema de Langendorff. Se recirculó Tyrode sin calcio durante 5 minutos. Posteriormente, el corazón se perfundió durante 60 minutos con 70 U/mL de colagenasa tipo II (Worthington) y 0.5 mg/100 mL de proteasa tipo XIV (Sigma-Aldrich) en Tyrode sin calcio. El corazón se retiró del sistema Langendorff y el ventrículo se cortó en pedazos pequeños; las células se disgregaron mecánicamente y se filtraron a través de un filtro de nylon de poro de 100 µm. Posteriormente, se centrifugaron por 2 minutos a 500 rpm de 2 a 3 veces. Los pellets de cardiomiocitos se resuspendieron en solución de Tyrode sin calcio con 1 % de albúmina sérica bovina

(Sigma-Aldrich). Finalmente, los cardiomiocitos aislados se resuspendieron gradualmente en Tyrode con calcio (0.1, 0.5 y 1 mM).

4.4. Cultivo de células H9c2

Se cultivaron células H9c2 provenientes de ventrículo embrionario de rata (pases 17-24, ATCC® CRL-1446) en monocapas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco - Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco), 1.5 g/L de bicarbonato de sodio, 50 UI de penicilina y 50 µg/mL de estreptomicina a 37 °C en un ambiente húmedo con 5 % de CO₂.

4.5. Tratamiento con la hormona triyodotironina (T3)

Se cultivaron células H9c2 como se indica en el apartado 4.3. en cajas de cultivo celular p100 para la determinación de la expresión de proteínas por Western blot y en p35 para la cuantificación de ARNm por qRT-PCR a una confluencia entre el 80-90 %. Las células cultivadas se trataron con DMSO el grupo control y con T3 (T6397, Sigma-Aldrich) a una concentración de 100 nmol/L por períodos de 2, 6, 12, 24 y 48 horas. Posteriormente, las células se rasparon y colocaron en buffer de lisis (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% de Tritón X-100 y un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Halt™; Thermo Scientific)). Las muestras se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Los cardiomiocitos recién aislados, suspendidos en Tyrode con 1 mM de calcio, se trataron con DMSO (grupo control) y con T3 a una concentración de 100 nmol/L por períodos de 2, 6, 12 y 24 horas. Posteriormente, se centrifugaron a 500 rpm por 2 minutos, se desechó el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió en buffer de lisis RIPA (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5 % deoxicolato de sodio, 0.1 % dodecilsulfato de sodio (SDS), 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0) y un cóctel de inhibidores

de proteasas y fosfatasa). Las muestras se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su uso. Las muestras que se emplearon para la cuantificación de ARNm por qRT-PCR se colocaron en 500 μ L de QIAZOL (Qiagen) y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

4.6. Obtención de plásmidos

Los plásmidos o vectores de expresión GFP, pSG5 y β 4 se obtuvieron a partir de cultivo bacteriano de *E. coli* cepa DH5 α (bacterias competentes y transformación de bacterias), posteriormente los plásmidos se purificaron con el kit EndoFree Maxi de QIAGEN® siguiendo las instrucciones del proveedor y finalmente, la cuantificación se llevó a cabo en el equipo NanoPhotometer® N60/N50 de IMPLEN.

4.6.1. Bacterias competentes

Se inoculó una colonia de la cepa DH5 α de *E. coli* en 5 mL de medio SOB suplementado con 10mM MgSO₄, se mantuvo en agitación a 37°C toda la noche. Se agregaron 500 μ L del cultivo inicial a 50 mL de medio SOB suplementado con 10mM MgSO₄, se mantuvo en agitación a 37°C hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.5 a 550 nm, enseguida el medio de cultivo se pasó a hielo durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm a 4°C por 12 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet de células fue resuspendido en 16 mL de TFB1, seguido de una incubación en hielo por 15 minutos y centrifugación a 2500 rpm a 4°C por 12 minutos. El pellet de células se resuspendió en 4 mL de TFB2, después de incubar en hielo por 15 minutos se fraccionaron alícuotas de 200 μ L y se almacenaron a -70°C .

4.6.2. Transformación de bacterias y obtención de plásmidos

A 200 μ L de bacterias competentes de *E. coli* cepa DH5 α se agregaron 5 μ L de mezcla de ligación: inserto (construcciones con la subunidad β 4 clonada por Castellanos *et al* [59] o construcciones del vector pSG5 que tiene la secuencia de resistencia a la

ampicilina) y el vector pSG5 vacío. Se incubó en hielo durante 20 minutos y enseguida 1.5 minutos a 42 °C. La mezcla de ligación se adicionó a 800 µL de medio SOC (800 µL medio SOB, 16 µL de glucosa al 20 % y 8 µL de MgSO₄ 1mM), se agitó durante 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, se sembraron cajas de agar Luria con 100 µg/mL ampicilina, se incubó toda la noche a 37 °C y después se almacenaron a 4 °C.

Se inoculó una colonia de bacterias transformadas en 5 mL de TB dry con 5 µL de ampicilina y se incubó por 8 horas a 37 °C. 500 µL del cultivo inicial se adicionaron a 250 mL de TB dry con 250 µL de ampicilina, se incubaron toda la noche en agitación vigorosa a 37 °C. Se purificaron y cuantificaron los plásmidos.

4.7. Transfección de células H9c2

Se cultivaron células H9c2 como se indica en el apartado 4.3. en cajas de cultivo celular p100 para la determinación de la expresión de proteínas por Western Blot y en p35 para la cuantificación de ARNm por qRT-PCR a una confluencia entre el 80-90 %. 24 horas previas a la transfección se cambió el medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1.5 g/L de bicarbonato de sodio, sin antibióticos. Las células se transfectaron transitoriamente con los plásmidos que contenían las construcciones de β4 y el vector pSG5 vacío con Lipofectamina 2000® (Invitrogen), de acuerdo con las indicaciones del proveedor, el medio se cambió a las 6 horas y se mantuvieron durante 48 horas en un ambiente húmedo con 5 % de CO₂ a 37 °C. Posteriormente, las células se rasparon y colocaron en buffer de lisis (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% de Tritón X-100 y un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Halt™; Thermo Scientific)). Las muestras se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su uso. Las muestras que se emplearon para qRT-PCR se colocaron en 500 µL de QIAZOL (Qiagen) y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

4.8. Obtención de extractos totales de proteínas

Las muestras de células H9c2 o de cardiomiocitos aislados se descongelaron en hielo y se mantuvieron bajo las mismas condiciones por 1 hora más, agitando cada 10 minutos en vórtex por 15 segundos. Posteriormente, se realizaron 5 ciclos de sonicación (potencia 30%) de 10 segundos cada ciclo, llevando a cabo todo el proceso en hielo. Se centrifugó a 13000 g por 10 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y almacenó en alícuotas de 50 y 100 µL en nitrógeno líquido hasta su uso.

4.9. Western Blot

Los extractos totales de proteínas de células H9c2 y de cardiomiocitos aislados se mezclaron con Sample Loading Buffer 1X (SBL) y su respectivo buffer de lisis para cada tipo de muestra. Las muestras se colocaron a baño maría en ebullición durante 3 minutos para desnaturalizar las proteínas. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm (Thermo Scientific) en un sistema semi-húmedo Trans-Blot® Turbo TM Transfer System (Bio-rad, Hercules, CA). Enseguida, la membrana se bloqueó con leche sin grasa al 4.5 % en PBS 1X en agitación por 1 hora. Se eliminó la solución de bloqueo y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Se incubó toda la noche con el anticuerpo primario diluido en PBS 1X (α 1c 1:200 (anti-rabbit polyclonal, ACC-003 Alomone Labs), pCREB 1:500 (anti-rabbit monoclonal, ab32096 Abcam), β 4 1:1000 (anti-rabbit polyclonal, A9304 ABclonal Technology), β -tubulina 1:5000 (anti-rabbit polyclonal, ab15568 Abcam) y GAPDH 1:5000 (anti-mouse monoclonal, G8795 Sigma-Aldrich).

Después de la incubación, se mantuvo la membrana durante 30 minutos a 20 °C, se retiró el anticuerpo primario y se hicieron 3 lavados con PBS-Tween 20 (0.1 %). Se incubaron por 1 hora a 20 °C y con agitación los anticuerpos secundarios conjugados

con peroxidasa de rábano picante (HRP) anti-rabbit IgG y anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

Se retiró el anticuerpo secundario y se hicieron 3 lavados con PBS-Tween 20 (0.1 %). Se llevo a cabo la inmunodetección por quimioluminiscencia de las proteínas mediante la adición de una mezcla de luminol y peróxido (Millipore, Immobilon Western), enseguida se escurrieron las membranas para eliminar el exceso de luminol y peróxido, se colocaron en un cassette para revelado y, en completa oscuridad, se realizó la detección utilizando película autorradiográfica Fuji Medical X-ray Film (Fujifilm), la cual se reveló en un sistema tradicional de revelado (solución reveladora, solución de paro y solución desteñidora). El análisis de la expresión relativa de las proteínas de interés se determinó por densitometría de las bandas del peso en kDa correspondiente a cada una de las proteínas bajo estudio (α 1c, β 4 y pCREB), para luego compararlas con un normalizador de la carga de proteínas (β -tubulina o GAPDH). El análisis se realizó en el software Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated).

4.10. Cuantificación de ARNm por PCR en tiempo real (qRT-PCR)

Las muestras se descongelaron y se les retiró el medio por centrifugación a 5000 rpm, 5 min. La pastilla de células se resuspendió en 700 μ L de QIAZOL. Para los ensayos de qRT-PCR se usó 1 μ g de ARN de las células en cada condición experimental. Se extrajo el ARN con el kit RNeasy mini kit (Qiagen). La cuantificación se realizó por espectrofotometría (NanoPhotometer® N60/N50; IMPLEN). La RT-PCR se realizó con 500 ng de ARN tratado con DNasa I en reacciones de 20 μ L. La síntesis de DNA complementario se realizó con Superscript III RT (Invitrogen) y *random hexameres* (250 ng), según las instrucciones del proveedor. Para cuantificar el ARNm, se usaron ensayos TaqMan (Applied Biosystems) con un iCycler iQ (Bio-Rad) usando la mezcla maestra de expresión génica TaqMan (4369016) y los siguientes ensayos TaqMan: β 4

(Cacnb4, Rn01449787_m1) and α 1c (Cacna1c, Rn00709287_m1). El ensayo TaqMan que se usó como control para los ARNm fue (Hs99999901_s1) que corresponde al ARN ribosomal 18S eucariota. La cuantificación se realizó por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ [60].

4.11. Inmunocitoquímica y microscopia confocal

En placas de 24 pozos se sembraron células H9c2 en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1.5 g/L de bicarbonato de sodio, 50 UI de penicilina y 50 μ g/mL de estreptomicina a 37 °C en un ambiente húmedo con 5 % de CO₂ a una confluencia de 80-90 %. Las células cultivadas se trataron con DMSO para el grupo control, y con T3 a una concentración de 100 nmol/L por períodos de 2, 6 y 12 horas para los grupos experimentales. Se retiró el medio y se hicieron 5 lavados con PBS 1X frío, se fijaron las células con paraformaldehído al 4 % (PFA) durante 10 minutos a 4 °C, se retiró el PFA y se realizaron 5 lavados con PBS 1X frío. Se bloqueó y permeabilizó durante 30 minutos con solución de 1 % de Tritón X-100 y 1% albúmina sérica bovina (BSA) en PBS 1X.

Se hicieron 5 lavados con PBS 1X frío, se incubó toda la noche con el anticuerpo primario diluido en BSA al 1 % en PBS 1X (pCREB 1:100 (anti-rabbit monoclonal, ab32096 Abcam) y β 4 1:50 (anti-mouse monoclonal, SMC-318, Stress Marq). Al día siguiente se hicieron 5 lavados con PBS-Tween 20 (0.1 %). Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Alexa-Fluor 488 (1:200, anti-mouse, A21202, Thermo Fisher) y Alexa-Fluor 555 (1:200, anti-rabbit, A31572, Thermo Fisher).

Se hicieron 5 lavados con PBS-Tween 20 (0.1 %). Se incubó con tinción de núcleos Hoechst (1:1000 en PBS 1X, H3570 Thermo Fisher Scientific) durante 10 minutos. Se hicieron 5 lavados con PBS 1X frío y se escurrieron. Las preparaciones se montaron

en portaobjetos con 2 μ L de medio de montaje (Vectashield, H1000, Vector Laboratories). Las preparaciones se almacenaron protegidas de la luz a 4 $^{\circ}$ C.

Cubreobjetos redondos de 18 mm se colocaron en placas de 24 pozos y se incubaron con laminina (Sigma Aldrich) por 24 horas. Los cardiomiocitos recién aislados (resuspendidos en solución Tyrode con 1 mM de calcio y 5 % de suero fetal bovino) se colocaron, para su adhesión, en los cubreobjetos con laminina durante 2 horas. Posteriormente, se realizaron 5 lavados con solución Tyrode con 1 mM de calcio. Los cardiomiocitos se trataron con DMSO, el grupo control, y con T3 a una concentración de 100 nmol/L por períodos de 2, 6 y 12 horas para los grupos experimentales. Se retiró la solución Tyrode y se hicieron 5 lavados con PBS 1X frío, se fijaron las células con PFA al 4 % durante 10 minutos a 4 $^{\circ}$ C, se retiró el PFA y se realizaron 5 lavados con PBS 1X frío. Se bloqueó y permeabilizó durante 60 minutos con solución de 0.3 % de Tritón X-100 y 5% de suero de burro en PBS 1X. Se hicieron 5 lavados con PBS 1X frío, y se incubó toda la noche con el anticuerpo primario diluido en BSA al 0.5 % y 0.3 % de Tritón X-100 en PBS 1X (pCREB 1:100 (anti-rabbit monoclonal, ab32096 Abcam) y β 4 1:50 (anti-mouse monoclonal, SMC-318, Stress Marq). Al día siguiente se hicieron 5 lavados con PBS-Tween 20 (0.1 %). Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Alexa-Fluor 488 (1:200, anti-mouse, A21202, Thermo Fisher) y Alexa-Fluor 555 (1:200, anti-rabbit, A31572, Thermo Fisher), preparados en 0.5 % de BSA y 0.3 % de Tritón X-100 en PBS 1X.

Se hicieron 5 lavados con PBS-Tween 20 (0.1 %). Se incubó con tinción de núcleos Hoechst (1:1000 en PBS 1X, H3570 Thermo Fisher Scientific) durante 10 minutos. Se hicieron 5 lavados con PBS 1X frío y se escurrieron. Las preparaciones se montaron en portaobjetos con 2 μ L de medio de montaje (Vectashield, H1000, Vector Laboratories). Las preparaciones se almacenaron protegidas de la luz a 4 $^{\circ}$ C.

Las inmunocitoquímicas fueron analizadas con el microscopio confocal de barrido láser (LEICA, TCSSP8) con el objetivo de aceite de inmersión 40 x. Las imágenes fueron obtenidas en Z-stacks formadas por entre 25 – 35 cortes de 0.5 μm por célula que se sobrepusieron en una imagen, con una resolución de 1024 x 1024 y profundidad de 8 bits por pixel. Las imágenes obtenidas de las inmunocitoquímicas se analizaron y procesaron en los softwares Leica LAS X Office (Leica Microsystems) y el procesador digital de imágenes ImageJ 1.44 p (NIH, Bethesda, Maryland, USA).

4.12. Análisis estadístico

Los datos se expresan como las medias \pm SE. Los análisis estadísticos se realizaron en GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc.) y Sigma Stat 2.0. (Systat Software Inc.). Para comparaciones entre grupos, se realizó la prueba t de Student. Para comparaciones múltiples de datos con una distribución normal se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguidos de la prueba post hoc de Dunn. Se consideró estadísticamente significativa una $p < 0.05$.

5. Resultados

5.1. Células H9c2 y cardiomiocitos tratados con T3

5.1.1. Expresión de los niveles de ARNm y proteína de $\alpha 1c$

Con el propósito de investigar el mecanismo celular y/o molecular en el que participa la subunidad $\beta 4$ sobre la regulación de la subunidad principal $\alpha 1c$ de los canales Cav1.2, inicialmente se realizaron experimentos para analizar el curso temporal del efecto de la hormona T3 tanto en el ARNm como en la proteína de la subunidad $\alpha 1c$. Cultivos celulares de la línea H9c2 se trataron con la hormona T3 a una concentración de 100 nM (nmol/L) por períodos de 2, 6, 12, 24 y 48 horas [56]. En la Figura 12 se

muestran los resultados de la expresión del ARN mensajero (panel A) y de los niveles de la proteína de $\alpha 1c$ (paneles B y C), analizados por qRT-PCR y por western blot, respectivamente. En comparación con las células H9c2 del grupo control tratadas con DMSO, se observó que en un período corto de 2 horas hubo un aumento del ARNm de $\alpha 1c$, seguido de su disminución a las 6 y 12 horas. A las 24 y 48 horas los niveles del ARNm aumentan nuevamente de manera significativa. Los niveles de la proteína $\alpha 1c$ aumentaron significativamente hasta las 48 horas de tratamiento con la hormona T3 en comparación con el grupo control. El panel C muestra blots representativos a diferentes períodos de tratamiento (a, b, c, d).

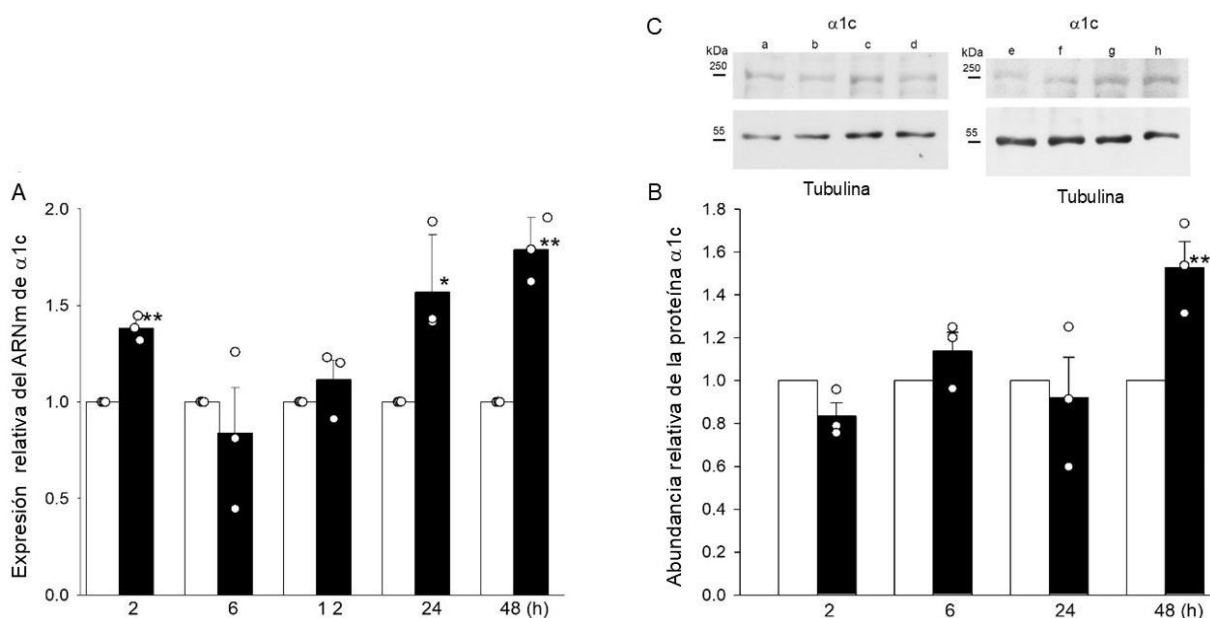


Figura 12. Expresión relativa del ARNm y de la abundancia de la proteína $\alpha 1c$ en células H9c2 después de la incubación con T3. (A, B) Las gráficas muestran los promedios \pm SEM de la expresión relativa del ARNm de la subunidad $\alpha 1c$ y de la abundancia de la proteína en células H9c2 de tres experimentos independientes. (C) Blots representativos en condiciones control (a, c, e y g) y 2, 6, 24 y 48 horas después del tratamiento con T3 (b, d, f y h, respectivamente). Las bandas de tubulina se utilizaron para normalizar los valores de densidad de las bandas de la subunidad $\alpha 1c$. En los paneles (A y B) cada símbolo representa un experimento independiente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5.1.2. Localización y expresión de los niveles de proteína y de ARNm de $\beta 4$

Con respecto a la subunidad $\beta 4$, la hormona T3 produjo una disminución de la subunidad a nivel de proteína a tiempos cortos de 2 horas que se mantuvo disminuida hasta las 24 horas, en comparación con las células del grupo control, como se observa en la Figura 13 (paneles A y B); mientras que, produjo un incremento en el nivel de expresión del ARNm de esta subunidad a partir de las 24 horas (panel B).

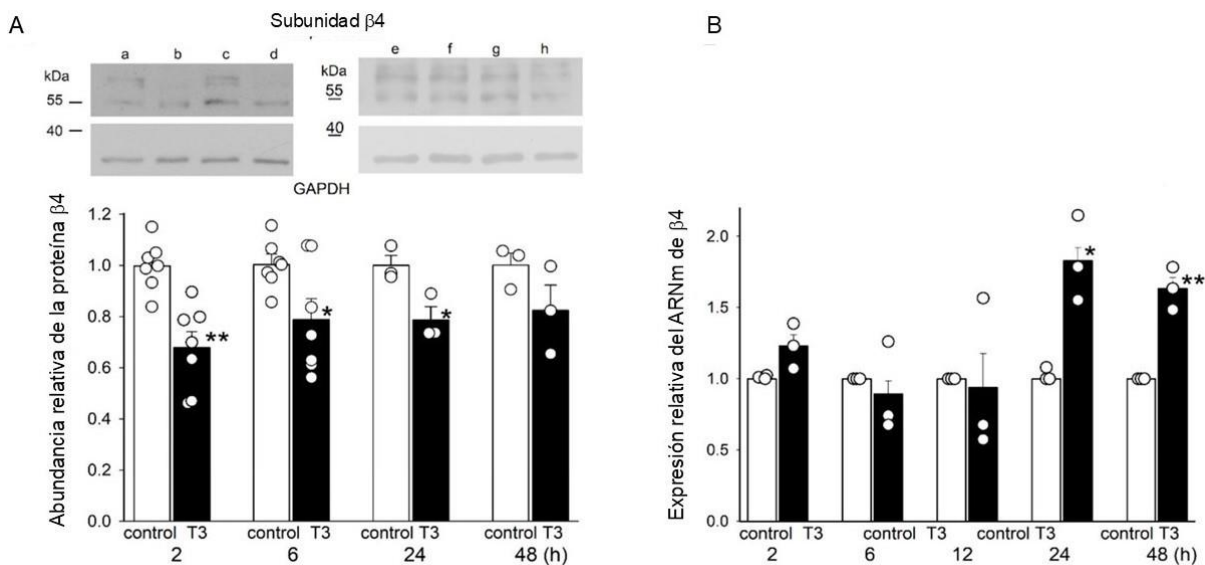


Figura 13. Abundancia relativa de la proteína $\beta 4$ en las células H9c2 después de la incubación con T3. (A) Las barras indican los promedios \pm SEM de la abundancia relativa de la proteína $\beta 4$ en células H9c2 ($n= 3-7$). Se muestran blots representativos en condiciones control (a, c, e y g) y 2, 6, 24 y 48 horas después de la incubación con T3 (carriles b, d, f y h, respectivamente), de 4 experimentos individuales. Se utilizaron las bandas de GAPDH para normalizar los valores de la densidad de las bandas de la subunidad $\beta 4$. (B) La gráfica muestra los promedios \pm SEM de la expresión relativa del ARNm de la subunidad $\beta 4$ en células H9c2 después de la incubación con T3. (A y B) cada símbolo representa un experimento independiente. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Cabe destacar que, de manera temprana, en las células H9c2 tratadas con la hormona T3 se observa una disminución de la proteína a tiempos cortos de 2 horas y se mantiene disminuida hasta las 24 horas, por lo que, para analizar si había cambios en su localización, se realizaron experimentos con microscopia confocal, para analizar la

relación proteica núcleo-citosol, como se muestra en la Figura 14. A las 2 horas de tratamiento hay una disminución de la presencia de la subunidad $\beta 4$ en el núcleo (paneles A y B).

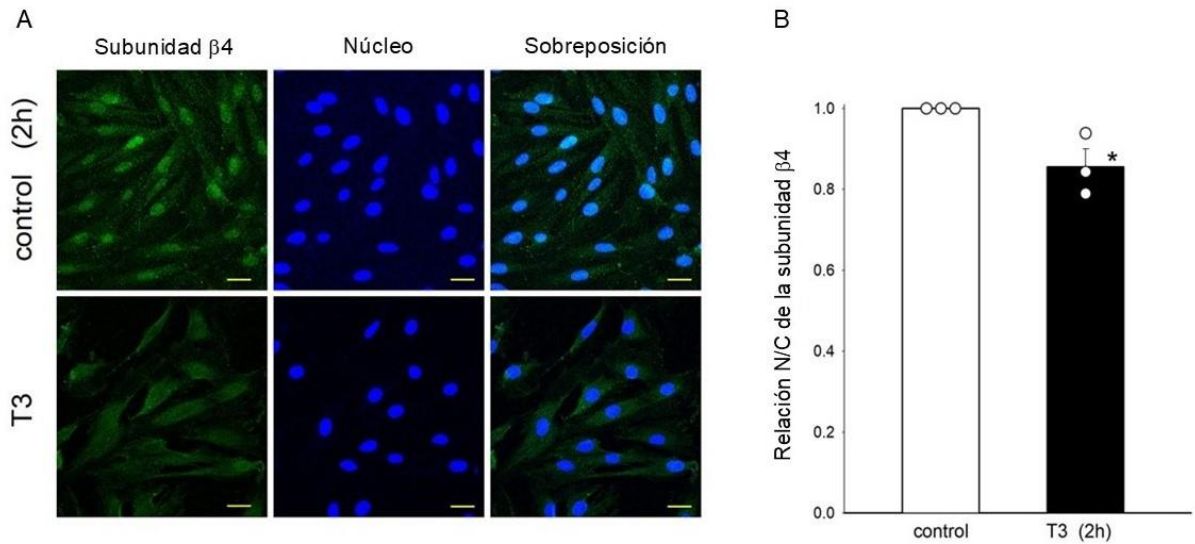


Figura 14. (A) Imágenes de microscopía confocal de células H9c2 en condiciones control y después del tratamiento con T3 durante 2 h. Se presentan imágenes representativas de 3 experimentos independientes que muestran la localización de la subunidad $\beta 4$ (verde) con los núcleos marcados con Hoechst 33342 (azul) y su colocalización. Barra de calibración $32 \mu\text{m}$. (B) Las barras indican los promedios \pm SEM de la relación núcleos/citosol de tres experimentos independientes. En la gráfica cada punto representa un experimento independiente. $*p < 0.05$.

Para investigar si estos cambios observados en las células H9c2, de origen cardiaco, se producían también en el tejido adulto, se analizaron los niveles de la proteína $\beta 4$ en cardiomiocitos en condiciones control y después de 2, 6, 12 y 24 horas de ser tratados con la hormona T3, encontrándose que los niveles proteicos de $\beta 4$ se mantienen semejantes en las primeras 2 y 6 horas entre el grupo control y los miocitos tratados con la T3. Sin embargo, en los grupos de cardiomiocitos tratados por 12 horas sí se observó una disminución en la abundancia de la proteína $\beta 4$, como se observa en la Figura 15.

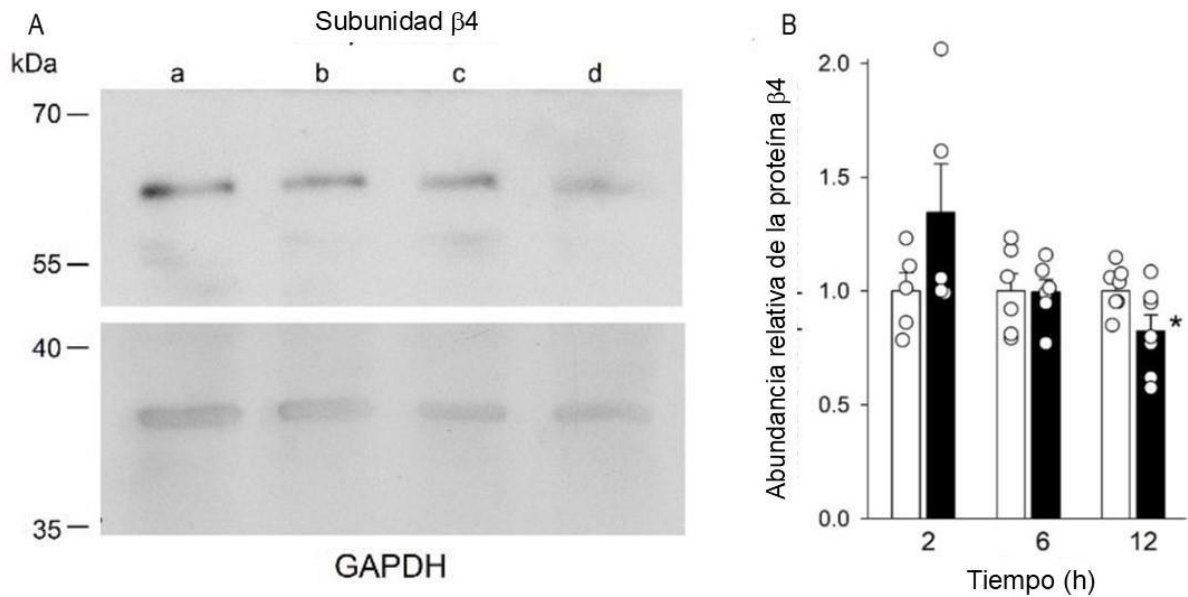


Figura 15. Efecto del tratamiento con T3 sobre la abundancia relativa de la subunidad $\beta 4$ en cardiomiocitos ventriculares de rata. (A) Imágenes representativas de la subunidad $\beta 4$ y GAPDH en condiciones control (a y c) y después de 12 horas de tratamiento con T3 (b y d) de dos experimentos independientes. (B) La gráfica muestra los promedios \pm SEM de la abundancia relativa de la proteína $\beta 4$ en condiciones control y después del tratamiento con T3 en los períodos indicados (n= 3-7). Cada punto representa un experimento independiente. *p<0.05.

Una vez que se determinó por western blot que en los cardiomiocitos disminuyeron los niveles de la proteína $\beta 4$ a las 12 horas posteriores al tratamiento con la hormona T3, se realizaron estudios de inmunohistoquímica en estas células en condiciones control y tratadas con la hormona T3 durante 12 y 24 horas. En la Figura 16 se puede observar que en los cardiomiocitos tratados con la hormona T3 los niveles de la proteína $\beta 4$ disminuyen de manera global, respecto a los miocitos en condiciones control. Por lo tanto, no hubo cambio en la relación núcleo-citosol, a diferencia de lo observado en células H9c2.

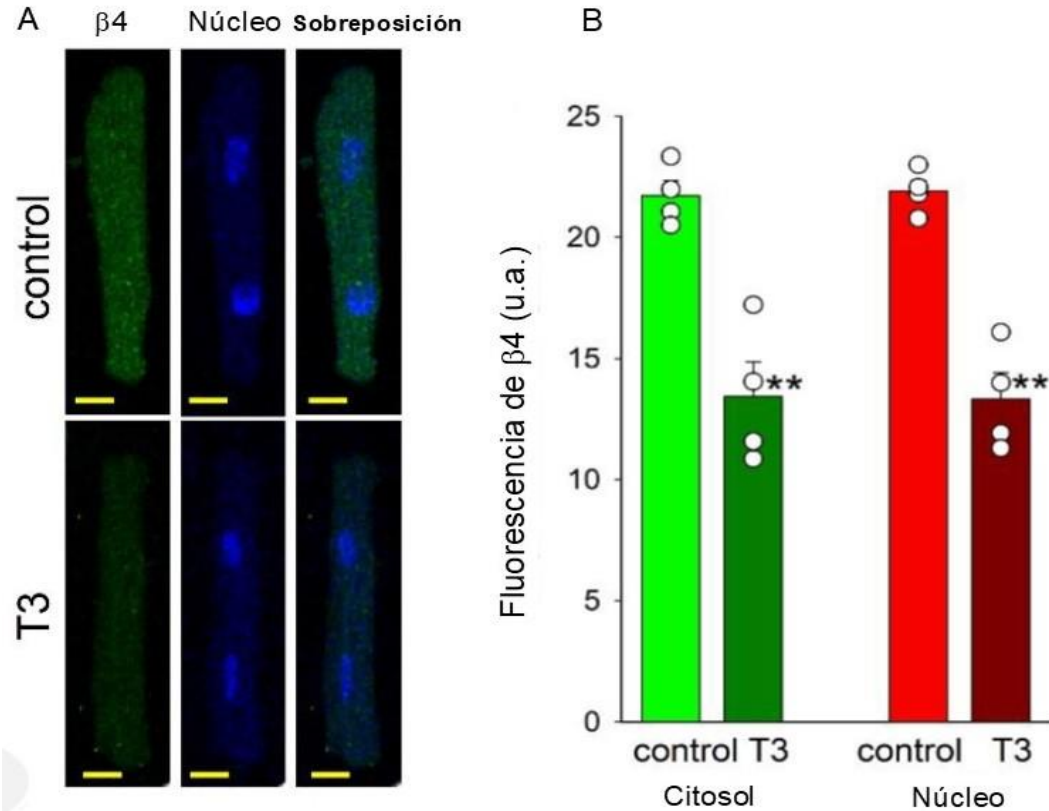


Figura 16. Efecto del tratamiento con T3 sobre la abundancia relativa de la subunidad $\beta 4$ en cardiomiocitos ventriculares de rata. (A) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de cardiomiocitos en condiciones control y después del tratamiento con T3 durante 24 h. Las imágenes muestran la localización de la subunidad $\beta 4$ (verde), los núcleos teñidos con Hoechst 33342 (azul) y su colocalización. Barras de calibración 14 μ m. (B) Gráfica con los promedios \pm SEM de la fluorescencia de $\beta 4$ en el citosol (barras verdes) y en los núcleos (barras en rojo) después del tratamiento con T3 durante 12 y 24 horas ($n = 4$). Cada símbolo representa un experimento independiente. *** $p < 0.01$.

5.1.3. Efecto de la T3 en la expresión de los niveles proteicos de pCREB y en su localización

Para analizar los posibles cambios en el factor de transcripción pCREB por el tratamiento con T3 se realizaron experimentos para determinar el curso temporal de sus niveles proteicos. Las células H9c2 se trataron con la hormona T3 a una concentración de 100 nM durante períodos de 2, 6, 12, 24 y 48 horas. Los niveles de la abundancia proteica de pCREB se mantuvieron similares, tanto en las células en

condiciones control como en las que se trataron con la hormona T3, como se muestra en la Figura 17.

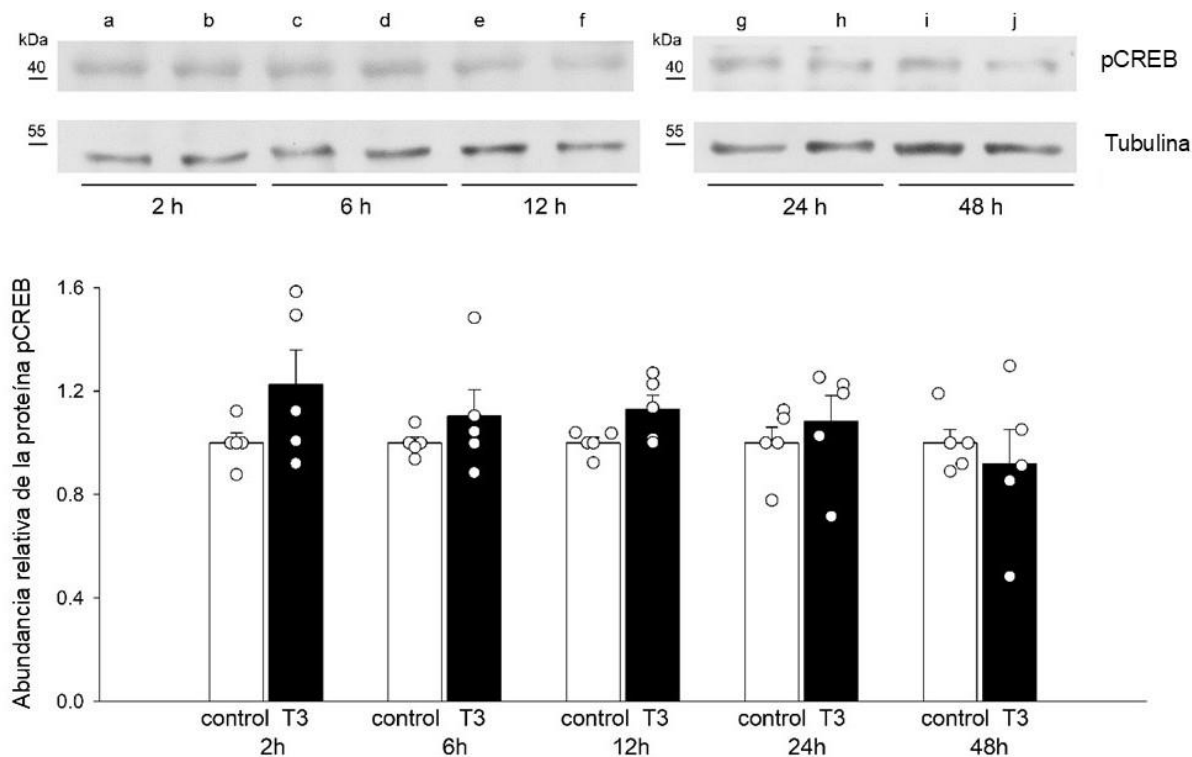


Figura 17. Abundancia relativa de pCREB en células H9c2 después de la incubación con T3. En la parte superior se muestran imágenes representativas de las proteínas pCREB y tubulina en condiciones control (a, c, e, g, i) y después del tratamiento con T3 durante los períodos indicados (b, d, f, h y j). Las barras indican los promedios \pm SEM de la abundancia relativa de pCREB en condiciones control y después del tratamiento con T3 (n=5) a los tiempos indicados. Cada símbolo representa un experimento independiente. Los valores de densidad de la tubulina se utilizaron para la normalización de la densidad de pCREB.

A pesar de que la hormona T3 no afectó los niveles de la proteína pCREB durante el curso temporal sí indujo su traslocación nuclear en períodos cortos de 2 y 6 horas. Esta traslocación se observó tanto en las células H9c2 como en los cardiomiocitos, como se puede observar en las Figuras 18 y 19, respectivamente.

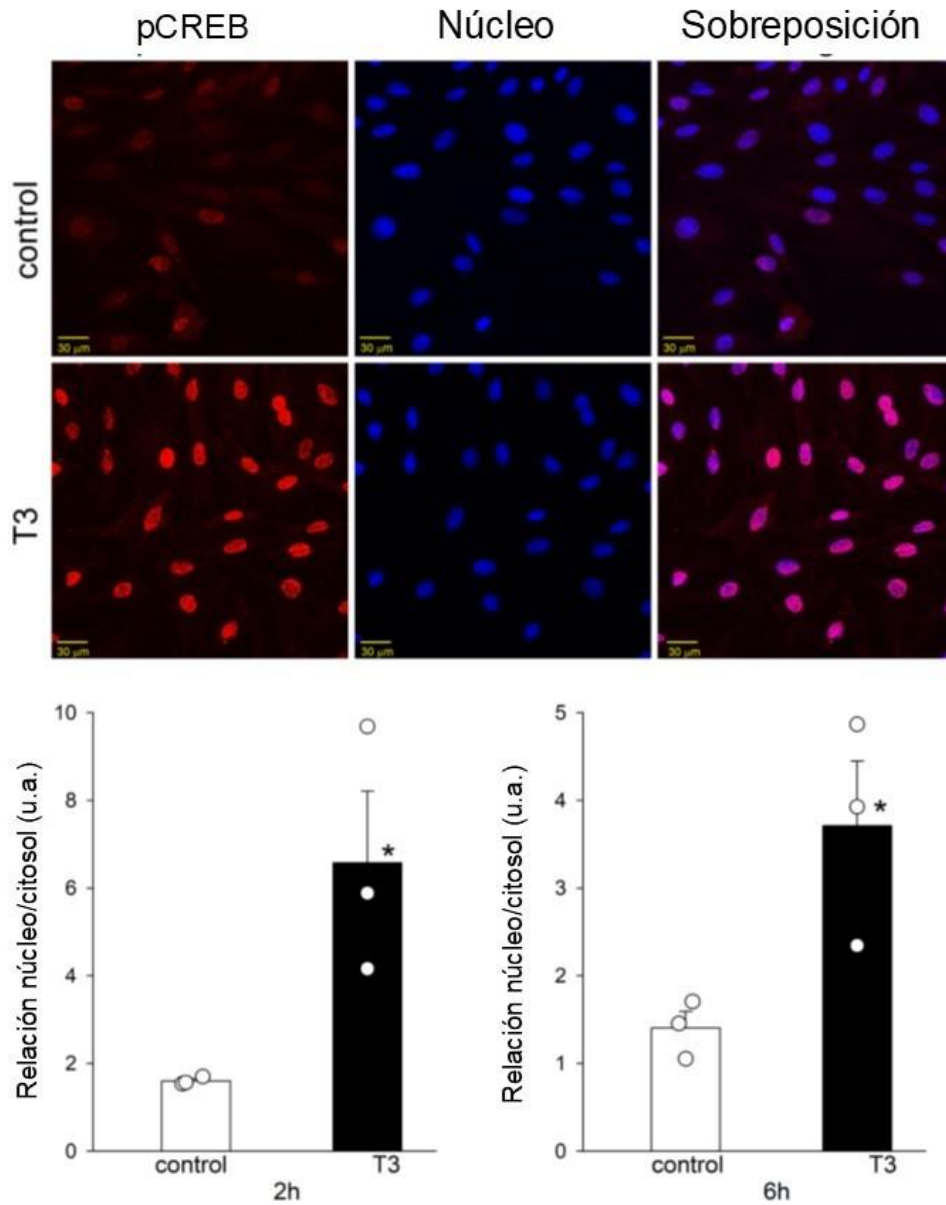


Figura 18. Translocación nuclear de pCREB inducida por T3 en células H9c2. Imágenes de microscopía confocal de células H9c2 en condiciones control y después del tratamiento con T3 durante 2 horas. Imágenes representativas de tres experimentos independientes muestran la localización de pCREB (rojo) con los núcleos teñidos con Hoechst 33342 (azul) y su colocalización. Barra de calibración 30 µm. Las barras representan los promedios \pm SEM de la relación núcleo/citosol en condiciones control y después del tratamiento con T3 durante 2 y 6 horas (n=3). Cada símbolo representa un experimento independiente. *p<0.05.

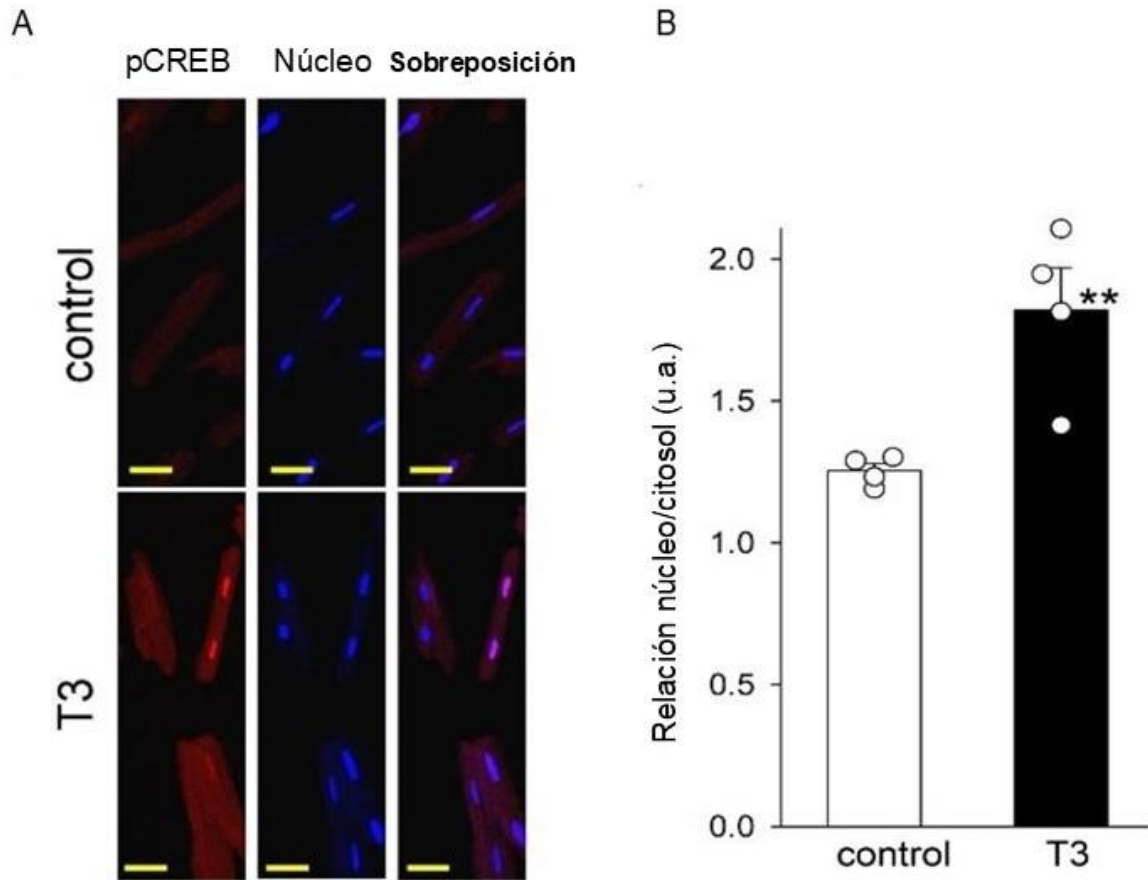


Figura 19. Efecto del tratamiento con T3 sobre la translocación nuclear de pCREB en cardiomiocitos ventriculares de rata. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de cardiomiocitos en condiciones control y después de 2 h de tratamiento con T3. Las imágenes muestran la localización de pCREB (rojo) con los núcleos marcados con Hoechst 33342 (azul) y su colocalización. Barras de calibración, 30 μm . (B) Las barras representan los promedios \pm SEM de la relación núcleo/citosol en condiciones control y después de 2 y 6 horas de tratamiento con T3 (n=4). Cada símbolo representa un experimento independiente. ** $p < 0.01$.

5.2. Efecto de la sobreexpresión de $\beta 4$ en los niveles de la proteína y del ARNm de $\alpha 1c$

Ya que el tratamiento con la hormona T3 produjo una disminución de los niveles de la proteína $\beta 4$ a tiempos cortos, mientras que los niveles proteicos y la expresión de ARNm de la subunidad $\alpha 1c$ aumentaron a tiempos más prolongados (a partir de las 24 horas); se procedió a investigar si estos efectos tenían una relación causal. Con este propósito realizamos experimentos de sobreexpresión de la subunidad $\beta 4$ en células

H9c2 para analizar si tenía un efecto en la subunidad $\alpha 1c$. En la Figura 20 se muestran los resultados de la sobreexpresión de $\beta 4$. En el panel A se presentan los resultados que confirman la sobreexpresión de la subunidad. En los paneles B y C se muestran los resultados de $\alpha 1c$. La sobreexpresión de $\beta 4$ indujo una disminución en la expresión del ARNm y en los niveles de la proteína $\alpha 1c$, como se muestra en los paneles B y C de la Figura 20, respectivamente.

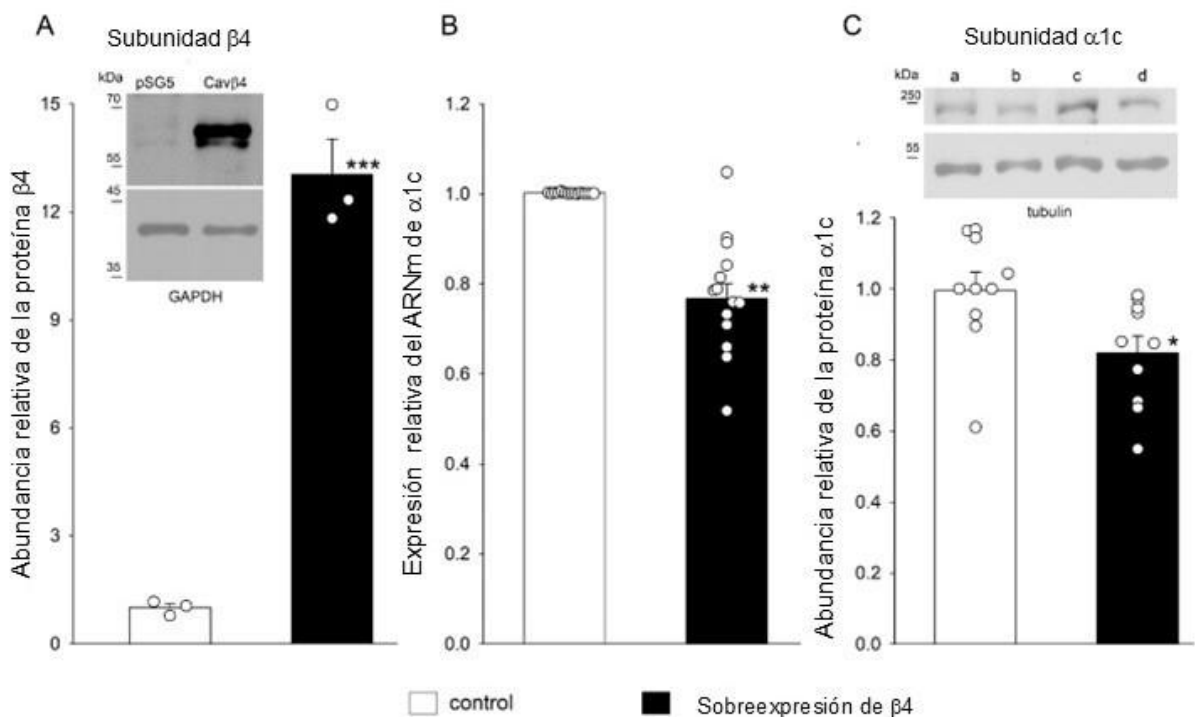
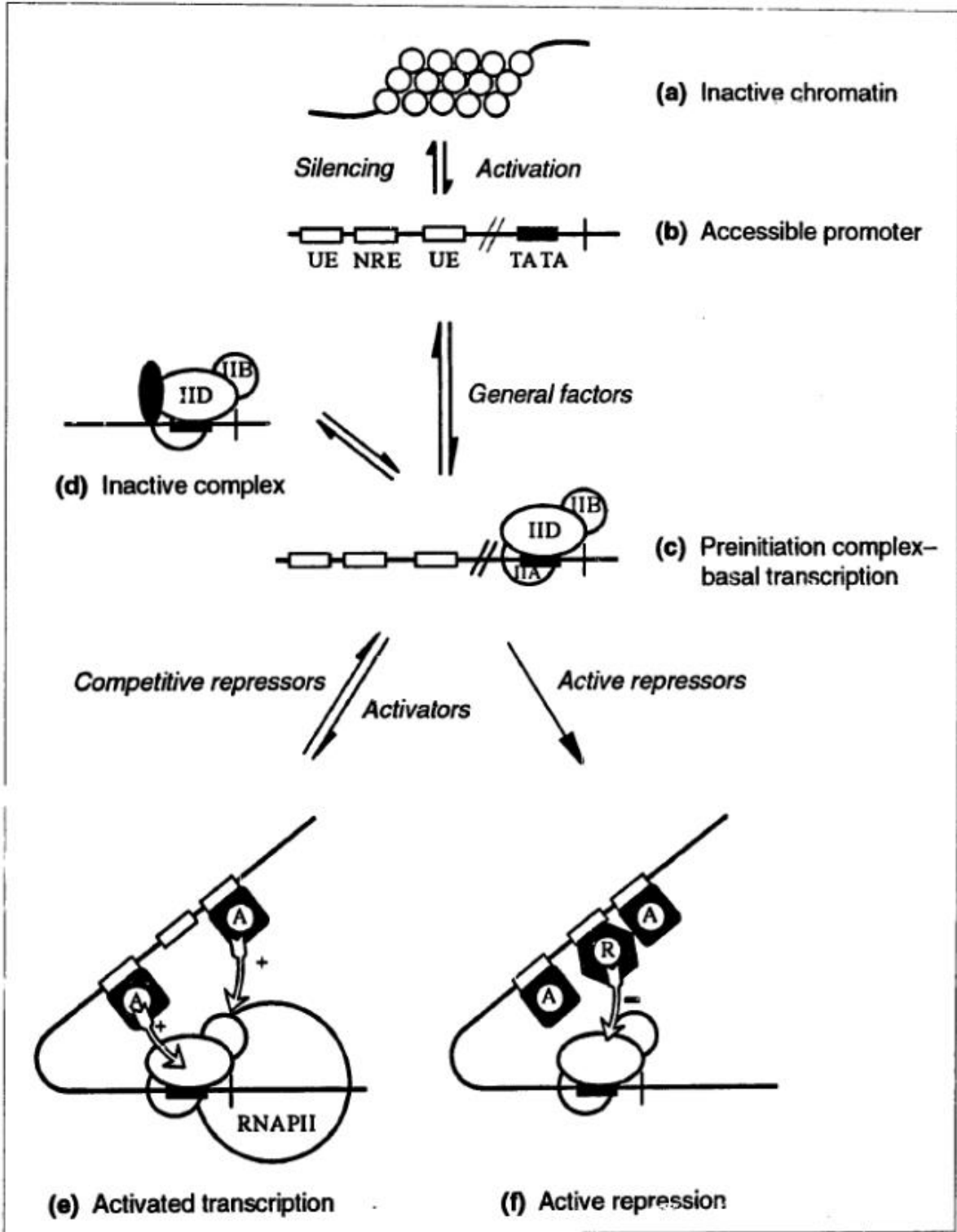


Figura 20. Expresión relativa del ARNm y de la abundancia de la proteína $\alpha 1c$ en células H9c2 después de la sobreexpresión de la subunidad $\beta 4$. (A) Las barras indican los promedios \pm SEM de la abundancia relativa de la proteína $\beta 4$ en condiciones control y después de la sobreexpresión de $\beta 4$ ($n=3$). El inserto muestra blots representativos de las bandas de la subunidad $\beta 4$ y de GAPDH; esta última se utilizó para normalizar los valores de la densidad de la subunidad $\beta 4$. (B) Las barras indican los promedios \pm SEM de la expresión relativa del ARNm de la subunidad $\alpha 1c$ de los experimentos control y de los de sobreexpresión de $\beta 4$ ($n=14$). (C) Se muestran blots representativos de las bandas de la proteína $\alpha 1c$ de experimentos control (a y c), y después de la sobreexpresión de $\beta 4$ (b y d). El gráfico muestra los promedios \pm SEM de la abundancia relativa de la proteína $\alpha 1c$. Cada símbolo representa un experimento independiente. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

6. Discusión

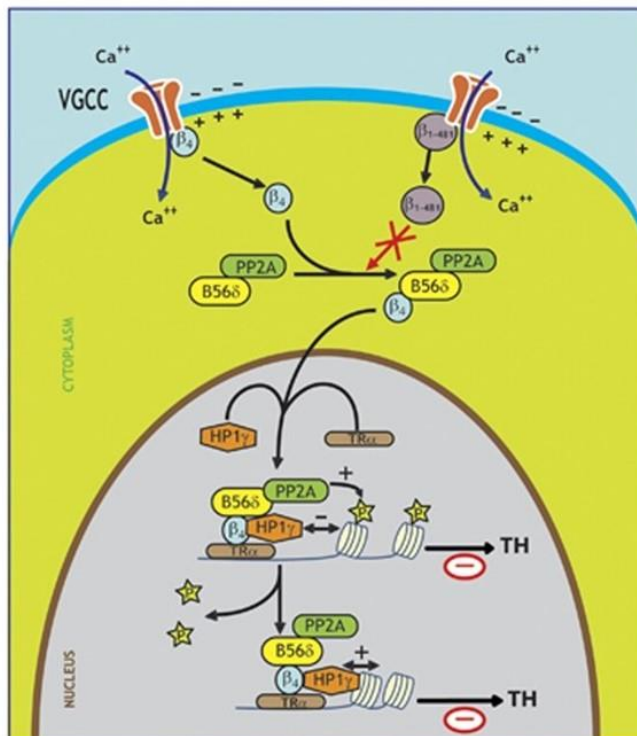
Este trabajo tuvo como interés principal analizar la regulación de los canales de Ca^{2+} Cav1.2 cardíacos por la hormona tiroidea T3, utilizando como modelo la línea celular H9c2 e investigando algunos efectos en cardiomiocitos ventriculares de rata Wistar macho adulta. La T3 es una hormona crucial para la regulación del metabolismo y funciones cardíacas [45]. Nuestra hipótesis supone que la hormona T3 aumenta la expresión de la subunidad $\alpha 1c$ del canal de Ca^{2+} a través de regular a la baja a la subunidad $\beta 4$, la que estaría actuando como un represor de la transcripción. En este proceso proponemos la participación de pCREB. Es decir, nosotros postulamos y mostramos evidencia que apoya fuertemente el que, además de las bien conocidas funciones de la subunidad auxiliar $\beta 4$ modificando las propiedades cinéticas del canal de Ca^{2+} Cav1.2 y de su transporte a la membrana celular, regula también su transcripción.

La regulación de la expresión de los ARN mensajeros se lleva a cabo por proteínas especializadas denominadas factores de transcripción y existen proteínas asociadas a estos factores que facilitan o inhiben la transcripción, formando complejos altamente especializados. En el siguiente esquema tomado de la revisión de Cowell publicada en TIBS en 1994 [61], se ilustra de manera simplificada la regulación de la transcripción de genes:



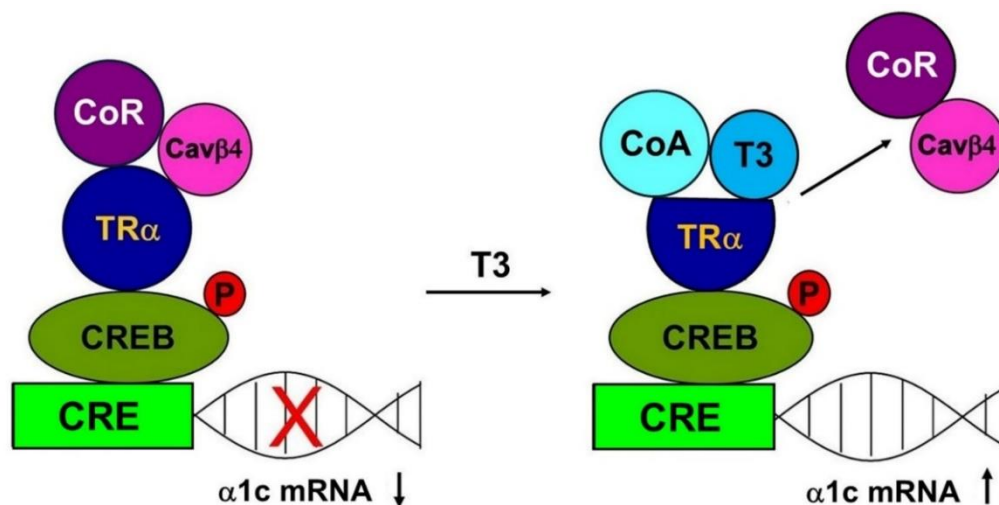
Esquema: regulación de transcripción de genes [61].

Existen antecedentes en neuronas que demuestran que la subunidad β_4 puede reprimir la expresión de genes. Tadmouri y cols., (2012) describieron que esta subunidad actúa como parte de una plataforma de represión del gen de la tirosina hidroxilasa y postularon que la represión de este gen depende de la interacción entre la subunidad β_4 y el receptor de la hormona tiroidea $TR\alpha$. Este receptor es nuclear y contiene un sitio de unión a la T3 y un sitio de unión al ADN que interactúa con elementos receptores tiroideos. La subunidad β_4 no tiene una secuencia de localización nuclear, sin embargo, interactúa de proteína a proteína y se asocia con una subunidad de la fosfatasa 2A denominada Ppp2r5 δ la cual cuenta con la secuencia de localización al núcleo y de esta forma la β_4 se puede localizar en el núcleo. Existen otras proteínas que también son reclutadas al complejo macromolecular, lo cual conduce a la desfosforilación de la histona H3 por la fosfatasa 2A. El complejo entre la subunidad β_4 y Ppp2r5 δ recluta una proteína nuclear que se relaciona con el silenciamiento del gen de la tirosina hidroxilasa neuronal y con su regulación transcripcional [62], como se muestra en el siguiente esquema.



Esquema: regulación transcripcional del gen de la tirosina hidroxilasa mediado por la subunidad β_4 (azul) de los canales de Ca^{2+} Cav1.2 [62].

Por lo tanto, tomando estos antecedentes, nosotros postulamos que la regulación a la baja de la subunidad $\beta 4$ por la T3 observada en nuestros experimentos bloquea la desfosforilación de CREB, liberando la inhibición de la $\beta 4$ y promoviendo el incremento en la expresión de genes blanco, tal como el de la subunidad $\alpha 1c$. Estas ideas se sintetizan en nuestro siguiente esquema:



En condiciones basales CREB se mantiene en un nivel bajo de fosforilación por la acción de correpresores que interactúan con el factor de transcripción TR α , siendo la subunidad $\beta 4$ también un correpresor. Ésta se une a TR α según demostraron Tadmouri y cols., (2012). En este esquema la hormona tiroidea T3 inhibe la unión de la $\beta 4$ con TR α promoviendo su salida del núcleo del complejo represor hacia su degradación. Esto explicaría nuestros resultados de western blot y los de inmunofluorescencia de la $\beta 4$ en los cuales encontramos una disminución de la proteína y una menor cantidad a nivel del núcleo, respectivamente. El esquema también es compatible con nuestras observaciones de PCR en tiempo real en las que no observamos una disminución del mensajero de la $\beta 4$ por la T3, sino solamente de la proteína. Según esta propuesta cuando el complejo represor se separa, se permite la unión de coactivadores que favorecen la presencia de la forma fosforilada de CREB en el núcleo, tal como

observamos con los experimentos de inmunofluorescencia, de esta manera el resultado es un incremento de la transcripción del gen de $\alpha 1c$.

En nuestro estudio resalta la interacción entre el receptor de la hormona tiroidea $TR\alpha$ y el factor de transcripción pCREB como un posible mecanismo de cross-talk transcripcional, donde pCREB podría unirse a $TR\alpha$ posteriormente a su translocación al núcleo y el complejo T3-pCREB- $TR\alpha$ activaría al gen CACNA1C que codifica la subunidad $\alpha 1c$, y de esta manera regularía la expresión de los canales de Ca^{2+} Cav1.2 a través de una regulación combinatoria transcripcional que implica la unión de factores de transcripción al ADN e interacciones proteína-proteína, ya se ha reportado anteriormente la relación directa entre $TR\alpha$ y pCREB [57].

Los resultados obtenidos apoyan nuestra hipótesis, la hormona T3 aumenta la expresión del ARNm y los niveles de la proteína $\alpha 1c$ tras períodos de incubación de 24 y 48 horas, lo que concuerda con algunos estudios previos sobre el papel de la hormona T3 en la regulación de los canales de calcio Cav1.2 en cardiomiocitos [58, 64]. Sin embargo, en células auriculares se ha mostrado un efecto contrario; Chen y cols., reportaron que tanto el ARNm como la abundancia de la proteína disminuye [56]. La disparidad temporal entre el aumento de la expresión del ARNm y los niveles de la proteína $\alpha 1c$ sugiere que el mecanismo de T3 podría involucrar cambios en la tasa de traducción y en la estabilidad del ARN; como, por ejemplo, modificaciones en la longitud del poli(A) del ARNm durante la poliadenilación [65, 66]. Un punto interesante para resaltar es el aumento no-lineal de la expresión del ARNm de $\alpha 1c$, como se puede observar en la Figura 12 A. En este contexto, en la literatura científica ya se ha reportado este mismo comportamiento en otro ARNm blanco de la hormona T3, el ARNm_{S14} que codifica para la proteína "Spot 14". La hormona T3 induce un aumento en un período corto, 4 horas, que luego disminuye y se observa su aumento estable hasta las 24 horas [66].

A diferencia de los efectos sobre la subunidad principal $\alpha 1c$, la hormona T3 disminuye rápidamente la abundancia de la proteína $\beta 4$ a las 2 horas, esto sin afectar la expresión de su ARNm a tiempos cortos, sino hasta las 24 y 48 horas, como se ha mencionado. Esto puede indicar que T3 influye sobre $\beta 4$ a nivel postranscripcional, posiblemente mediante micro ARNs, o por degradación proteosomal. Este mismo efecto se corroboró en el tejido adulto con un ligero desfase de horas, ya que en cardiomiocitos la T3 disminuyó los niveles proteicos de $\beta 4$ a las 12 horas. Lo cual sugiere que el mecanismo que de la T3 para disminuir los niveles de $\beta 4$ en el tejido no diferenciado (como las células H9c2), y en el tejido adulto puede ser similar.

La disminución en la translocación nuclear de la proteína $\beta 4$ posterior a las 2 horas del estímulo con la hormona T3 apoya la hipótesis de que esta subunidad auxiliar es un represor transcripcional de la subunidad $\alpha 1c$ de los canales de calcio Cav1.2 en el núcleo de las células cardíacas. En los cardiomiocitos adultos la hormona T3 también disminuye la abundancia de la proteína $\beta 4$, sin embargo, lo hace de manera global, tanto en el núcleo como en el citosol. De acuerdo con estos resultados, la hormona T3 puede armonizar un mecanismo bidireccional entre las subunidades $\alpha 1c$ y $\beta 4$, reclutando al factor de transcripción pCREB para llevar a cabo un proceso transcripcional, como se ha reportado que sucede con los canales de calcio Cav1.2 y Cav1.3 donde pCREB media la señalización nuclear en neuronas [67]. Es muy posible que haya nuevos mecanismos por elucidarse, distintos a los mecanismos clásicos de las subunidades auxiliares de los canales de calcio dependientes de voltaje, como por ejemplo, los que se han reportado para la subunidad $\beta 4$ donde acopla directamente la excitabilidad neuronal con los procesos transcripcionales al interactuar con el receptor de la hormona tiroidea alfa ($TR\alpha$), que es un factor de transcripción y de esta manera inhibe la transcripción del gen de la tirosina hidroxilasa [62, 68].

Uno de los hallazgos de este trabajo es que la hormona T3 induce la translocación nuclear de pCREB sin modificar sus niveles de proteína, lo cual es consistente con el hecho de que, siendo pCREB un regulador de $\alpha 1c$ su translocación podría facilitar la activación de la transcripción de $\alpha 1c$ conduciendo al aumento observado en la expresión de la subunidad formadora del poro de los canales Cav1.2. Dicho mecanismo sugiere que la hormona T3 podría influir en la función cardíaca a través de la activación de los canales de calcio Cav1.2. Cabe destacar que la translocación nuclear de pCREB se observa a tiempos cortos de 2 y 6 horas, tanto en las células H9c2 como en los cardiomiocitos de rata adulta.

Nuestros experimentos describen por vez primera la regulación transcripcional de la subunidad $\alpha 1c$ por la subunidad $\beta 4$. Previamente se ha descrito que otras subunidades beta del canal Cav1.2 también participan en fenómenos transcripcionales. Por ejemplo, la subunidad $\beta 2$ interacciona de manera directa con H-Ras permitiendo que los canales Cav1.2 acoplen la despolarización de la membrana con la activación transcripcional a través de la vía ERK/CREB [68].

En resumen, nuestro estudio proporciona una evidencia detallada de cómo la hormona tiroidea T3 modula a los canales de calcio Cav1.2, lo que tiene implicaciones significativas para el tratamiento de enfermedades cardíacas asociadas con desequilibrios tiroideos. El proyecto de investigación aporta evidencia de que la regulación de las subunidades de los canales Cav1.2 es compleja y depende de múltiples factores de transcripción y de la interacción entre subunidades. Nuestros hallazgos fortalecen la base científica para desarrollar tratamientos más específicos dirigidos a mejorar la función cardíaca en pacientes con disfunción tiroidea y se subraya la importancia de la investigación de la regulación de los canales iónicos cardíacos.

7. Conclusión

Los resultados obtenidos en nuestro proyecto de investigación destacan el papel fundamental de la hormona tiroidea T3 en la regulación de los canales de calcio Cav1.2 en células cardíacas, específicamente mediante su modulación a través de una de sus propias subunidades, la subunidad auxiliar $\beta 4$. Asimismo, la T3, a través de sus efectos opuestos sobre las subunidades $\alpha 1c$ y $\beta 4$, influye en la funcionalidad de los canales Cav1.2 y, por ende, en la excitación y la contractilidad del corazón. Esto es especialmente relevante debido a que los canales Cav1.2 son esenciales en el acople excitación-contracción del miocardio y en la homeostasis del calcio intracelular, procesos críticos para la salud cardíaca.

8. Referencias

1. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Guide to receptors and channels (GRAC). 5^a edition. Br. J. Pharmacol. 2011; 164: 1-326.
2. Martínez Rosas M. Los canales iónicos: la biología y patología. Arch Cardiol Mex. 2004; 74 (suplemento 2): S205-S210.
3. Cesare P, Moriondo A, Vellani V, McNaughton PA. Ion channels gated by heat. Proc Natl Acad Sci. 1999; 96: 7658-7663.
4. Eugene Elmore D. Investigations of ion channel structure-function relationships using molecular modeling and experimental biochemistry [Dissertation]. California, USA: California Institute of Technology; 2004.
5. Zaydman MA, Silva JR, Cui J. Ion channel associated diseases: overview of molecular mechanisms. Chem Rev. 2012; 112 (12): 6319-6333.
6. Furukawa T. Types of voltage-gated calcium channels: molecular and electrophysiological views. Curr Hypertens Rev. 2013; 9 (3): 170-181.
7. Barker BS, Young GT, Soubrane CH, Stephens GJ, Stevens EB, Patel MK. Ion Channels. En: Conn MP, editor. Conn's Translational Neuroscience. 1st edition. USA: Elsevier; 2016. p. 11-43.
8. Satin J, Schroder E. Autoregulation of cardiac L-type calcium channels: Review. Trends. Cardiovas. Med. 2009; 19(8):268-71.
9. Feng T, Kalyaanamoorthy S, Barakat K. L-type calcium channels: structure and functions, ion channels in health and sickness. En: Shad KF, editor. IntechOpen, 2018.

10. Gregg RG, Messing A, Strube C, Beurg M, Moss R, Behan M, et al. Absence of the β subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the $\alpha 1$ subunit and eliminates excitation-contraction coupling. PNAS. 1996; 93(24):13961-13966.
11. Colecraft HM, Alseikhan B, Takahashi SX, Chaudhuri D, Mittman S, Yegnasubramanian V, et al. Novel functional properties of Ca^{2+} channel β subunits revealed by their expression in adult rat heart cells. J. Physiol. 2002; 541(2):435-452.
12. Berridge MJ, Lipp & Bootman MD. The versatility and universality of calcium signaling. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2000; 1(1):11-21.
13. Nerbonne JM & Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. Physiol Rev. 2005; 85:1205-1253.
14. Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011; 3(8):a003947.
15. Striessnig J, Pinggera A, Kaur G, Bock G & Tuluc P. L-type Ca^{2+} channels in heart and brain. WIREs Membr Transp Signal. 2014; 3:15-38.
16. Weiss N & Zamponi GW. Trafficking of neuronal calcium channels. Neuronal Signaling. 2017; 1:NS20160003.
17. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature. 2002; 415: 198-205.
18. Dolphin AC. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. J Physiol. 2016; 594(19):5369-5390.
19. Arikath J & Campbell KP. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. Curr Opin Neurobiol. 2003; 13:298-307.

20. Campiglio M & Flucher BE. The role of auxiliary subunits for the functional diversity of voltage-gated calcium channels. *J Cell Physiol.* 2015; 230:2019-2031.
21. Yao X, Gao S, & Yan N. Structural biology of voltage-gated calcium channels. *Channels.* 2023; 18(1):2290807.
22. Dolphin AC. Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Curr Opin Neurobiol.* 2009; 19(3):237-244.
23. Hidalgo P, & Neely A. Multiplicity of protein interactions and functions of the voltage-gated calcium channel β -subunit. *Cell Calcium.* 2007; 42(4-5):389-396.
24. Caterral WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000; 16:521-555.
25. Subrata P. Fundamentals of molecular structural biology. Chapter 14. Membrane structure and function. Academic Press, Elsevier Inc. 2020; 405-420.
26. Rousset M, Charnet P & Cens T. Structure of the calcium channels beta unit: the place of the beta-interaction domain. *Med Sci (Paris).* 2005; 21(3):279-283.
27. Chu P, Robertson HM & Best PM. Calcium channels g subunit provide insights into the evolution of this gene family. *Gene.* 2001; 280 (1-2):37-48.
28. Zhen Loh KW, Cheng Liang M, Wah Soong T & Hu Z. Regulation of cardiovascular calcium channel activity by post-translational modifications or interacting proteins. *Pflugers Arch.* 2020; 472:653-667.
29. Felix R & Weiss N. Ubiquitination and proteasome-mediated degradation of voltage-gated Ca^{2+} and potential pathophysiology implication. *Gen Physiol Biophys.* 2017; 36(1):1-5.

30. Silveirinha V, Lin H, Tanifuji S, Mochida S, Cottrell GS, Cimarosti H, et al. Cav2.2 (N-type) voltage-gated calcium channels are activated by SUMOylation pathways. *Cell Calcium*. 2021; 93: 102326.
31. Davies A, Kadurin I, Alvarez-Laviada A, Douglas L, Nieto-Rostro M, Bauer CS, et al. The $\alpha 2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *PNAS*. 2010; 107(4): 1654-1659.
32. Kathryn A & Jian Y. Regulation of voltage-gated calcium channels by proteolysis. *Acta Physiologica Sinica*. 2012; 64(5):504-514.
33. Huan J & Zamponi GW. Regulation of voltage gated calcium channels by GPCRs and post-translation modification. *Curr Opin Pharmacol*. 2017; 32:1-8.
34. Cain SM & Snutch TP. Voltage-gated calcium channels and disease. *Biofactors*. 2011; 37(3):197-205.
35. Wilkins BJ, Dai Y, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, et al. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2004. 94(1):110-118
36. Hui W, Wenhua S, Shuojie Z, Lulin W, Panpan Z, Tongtong Z, et al. How does NAFT3 regulate the occurrence of cardiac hypertrophy? *Int J Cardiol Heart Vasc*. 2023; 48:101271.
37. Cortés R, Rivera M, Roselló-Lletí E, Martínez-Dolz L, Almenar L, Azorín I, et al. Differences in MEF2 and NAFT transcriptional pathways according to human heart failure aetiology. *PLoS ONE*. 2012; 7(2):e30915.

38. Douglas Fields R, Lee PR & Cohen JE. Temporal integration of intracellular Ca²⁺ signaling network in regulating gene expression by action potential. *Cell calcium*. 2005; 37:433-442.
39. Hernández-Oliveras A & Zarain-Herzberg A. The role of Ca²⁺ signaling in the regulation of epigenetic mechanisms. *Cell calcium*. 2024; 117:102836.
40. Barbado M, Fablet K, Ronjat M & De Waard M. Gene regulation by voltage-dependent calcium channels. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1793:1096-1104.
41. Pulimood NS, Contreras M, Pruitt ME, Tarasiewicz A & Medina AE. Phosphorylation of CREB at Serine 142 and 143 is essential for visual cortex plasticity. *eNeuro*. 2021; 8(5):1-10.
42. Wheeler DG, Groth RD, Ma H, Barrett CF, Owen SF, Safa P & Tsien RW. Cav1 and Cav2 channels engaged distinct modes of Ca²⁺ signaling to control CREB-dependent gene expression. *Cell*. 2012; 149:1112-1124.
43. Liu Y, Milanesi A & Brent GA. Thyroid hormones. In: Gerald Litwack. *Hormonal signaling in biology and medicine*. USA: Academic Press Elsevier; 2019. 487-506.
44. Odum J. Disrupters of the thyroid hormone action and synthesis. In: Philippa D. Darbre. *Endocrine disruption and human health*. Massachusetts, USA: Academic Press Elsevier; 2015. 91-109.
45. Yamakawa H, Kato TS, Noh JY, Yuasa S, Kawamura A, Fukuda K, et al. Thyroid hormone plays an important role in cardiac function: from bench to bedside. *Front Physiol*. 2021; 12:606931.
46. Razvi S, Jabbar A, Pingitore A, Danzi S, Biondi B, Klein I, et al. Thyroid hormones and cardiovascular function and diseases. *J Am Coll Cardiol*. 2018; 71(16):1781-1796.

47. Dillmann WH. Cellular action of thyroid hormone on the heart. *Thyroid*. 2002; 12(6):447-452.
48. Gilani N, Wang K, Muncan A, Peter J, An S, Bhatti S, et al. Triiodothyronine maintains cardiac transverse-tubule structure and function. *J Mol Cell Cardiol*. 2021; 160:1-14.
49. Casis O, Echeazarra L, Sáenz-Díez B & Gallego M. Deciphering the roles of triiodothyronine (T3) and thyroid-stimulating hormone (TSH) on cardiac electrical remodeling in clinical and experimental hypothyroidism. *J Physiol Biochem*. 2024; 80:1-9.
50. Gelen V, Sengül E & Kükürt A. Thyroid hormones (T3 and T4) and their effects on the cardiovascular system. In: Gelen V. *Hyperthyroidism – recent updates*. London, UK: Intech Open; 2023. 117-128.
51. Ojamaa K, Kenessey A & Klein I. Thyroid hormone regulation of phospholamban phosphorylation in the rat heart. *Endocrinology*. 2000; 141(6):2139-21
52. Klein I & Danzi S. Thyroid disease and heart. *Circulation*. 2007;116(15):1725-1735
53. Cooper D & Biondi B. Subclinical thyroid disease. *Lancet*. 2012; 379:1142-1154.
54. Pantos C, Trikas A, Pissimisis E, Grigoriou K, Stougiannos P, Dimopoulos A, et al. Effects of acute triiodothyronine treatment in patients with anterior myocardial infarction undergoing primary angioplasty: evidence from a pilot randomized clinical trial (ThyRepair Study). *Thyroid*. 2022; 32(6):714-724.
55. Watanabe H, Washizuka T, Komura S, Yoshida T, Hosaka Y, Hatada K, et al. Genomic and non-genomic regulation of L-type calcium channels in rat ventricle by thyroid hormone. *Endocr Res*. 2005; 31(1):59-70.

56. Chen W, Yeh Y, Lin K, Chang G & Kuo C. Molecular characterization of thyroid hormone-inhibited atrial L-type calcium channel expression: implication for atrial fibrillation in hyperthyroidism. *Basic Res Cardiol*. 2011; 106:163-174.
57. Méndez-Pertuz M, Sánchez-Pacheco A & Aranda A. The thyroid hormone receptor antagonizes CREB-mediated transcription. *EMBO Journal*. 2003. 22(12):3102-3112.
58. An S, Gilani N, Huang Y, Muncan A, Zhang Y, Tang Y, et al. Adverse transverse-tubule remodeling in a rat model of heart failure is attenuated with low-dose triiodothyronine treatment. *Molecular Medicine*. 2019; 25(1):53.
59. Castellano A, Wei L, Birnbaumer L & Perez-Reyes E. Cloning and expression of a neuronal calcium channel beta subunit. *J Biol Chem*. 1993; 268(17):12359-12366.
60. Livak KJ & Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*. 2001; 25(4):402-408.
61. Cowell IG. Repression versus activation in the control of gene transcription. *Trends Biochem Sci*. 1994; 19(1):38-42.
62. Tadmouri A, Kiyonaka S, Barbado M, Rousset M, Fablet K, Sawamura S, et al. Cacnb4 directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *EMBO Journal*. 2012; 31:3730-3744.
63. Servili E, Trus M, Maayan D & Atlas D. β -subunit of the voltage-gated Ca^{2+} channel Cav1.2 drives signaling to the nucleus via H-Ras. *PNAS*. 2018; 115(37):E8624-E8633.
64. Charest A, Nasta N, Siddiqui S, Menkes S, Thomas A, Saad D, et al. Nanoscale organization of cardiac calcium channels is dependent on thyroid hormone status. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2024; 327(5):H1309-H1326.

65. Goulart-Silva F, Bargi de Souza P & Nunes MT. T3 rapidly modulates TSH β mRNA stability and translational rate in the pituitary of hypothyroid rats. *Mol Cell Endocrinol.* 2011; 332(1-2):277-282.
66. Jump DB, Narayan P, Towle H & Oppenheimer JH. Rapid effects of triiodothyronine on hepatic gene expression. Hybridization analysis of tissue-specific triiodothyronine regulation of Mrnas14. *JBC.* 1984; 259(5):2789-2797.
67. Zhang H, Fu Y, Altier C, Platzer J, Surmeier DJ & Bezprozvanny I. Cav1.2 and Cav1.3 neuronal L-type calcium channels: differential targeting and signaling to pCREB. *Eur J Neurosci.* 2006; 23(9):2297-2310.
68. Ronjat M, Kiyonaka S, Barbado M, De Waard M & Mori Y. Nuclear life of the voltage-gated cacnb4 subunit and its role in gene transcription regulation. *Channels.* 2013; 7(2):119-125.



Article

Thyroid Hormone Upregulates Cav1.2 Channels in Cardiac Cells via the Downregulation of the Channels' β 4 Subunit

Elba D. Carrillo, Juan A. Alvarado , Ascención Hernández, Ivonne Lezama, María C. García and Jorge A. Sánchez *

Department of Pharmacology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Mexico City 07360, Mexico; elcarrillo@cinvestav.mx (E.D.C.); juanandres.alvarado@cinvestav.mx (J.A.A.); ashernandez@cinvestav.mx (A.H.); ivonne.lezama@cinvestav.mx (I.L.); cgarcia@cinvestav.mx (M.C.G.)

* Correspondence: jsanchez@cinvestav.mx



Citation: Carrillo, E.D.; Alvarado, J.A.; Hernández, A.; Lezama, I.; García, M.C.; Sánchez, J.A. Thyroid Hormone Upregulates Cav1.2 Channels in Cardiac Cells via the Downregulation of the Channels' β 4 Subunit. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 10798. <https://doi.org/10.3390/ijms251910798>

Academic Editor: Irene Frischauf

Received: 29 August 2024

Revised: 27 September 2024

Accepted: 6 October 2024

Published: 8 October 2024

Abstract: Thyroid hormone binds to specific nuclear receptors, regulating the expression of target genes, with major effects on cardiac function. Triiodothyronine (T3) increases the expression of key proteins related to calcium homeostasis, such as the sarcoplasmic reticulum calcium ATPase pump, but the detailed mechanism of gene regulation by T3 in cardiac voltage-gated calcium (Cav1.2) channels remains incompletely explored. Furthermore, the effects of T3 on Cav1.2 auxiliary subunits have not been investigated. We conducted quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction, Western blot, and immunofluorescence experiments in H9c2 cells derived from rat ventricular tissue, examining the effects of T3 on the expression of α 1c, the principal subunit of Cav1.2 channels, and Cav β 4, an auxiliary Cav1.2 subunit that regulates gene expression. The translocation of phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein (pCREB) by T3 was also examined. We found that T3 has opposite effects on these channel proteins, upregulating α 1c and downregulating Cav β 4, and that it increases the nuclear translocation of pCREB while decreasing the translocation of Cav β 4. Finally, we found that overexpression of Cav β 4 represses the mRNA expression of α 1c, suggesting that T3 upregulates the expression of the α 1c subunit in response to a decrease in Cav β 4 subunit expression.

Keywords: Cav1.2 channels; β 4 subunit; thyroid hormone; H9c2 cell line; pCREB



VIII CONGRESO AMIINSHAE
Investigación científica

Asociación Mexicana de Investigadores
de los Institutos Nacionales de Salud y
Hospitales de Alta Especialidad



AMIINSHAE
Asociación Mexicana de Investigadores
de los Hospitales Nacionales de Salud y
Respiratorios de Alta Especialidad

10º ANIVERSARIO

México, Ciudad de México a 31 de octubre de 2024