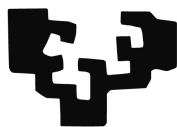


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina y Odontología

Fisiologia Saila
Medikuntza eta Odontologia Fakultatea

REGULACIÓN α_1 -ADRENÉRGICA DE LA CORRIENTE I_{Kr} CARDIACA

Janire Urrutia Iñiguez

Directores

Dr. Oscar Casis Saenz y Dra. Mónica Gallego Muñoz

Leioa, 2011



Ésta obra está bajo una [Licencia Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported](#)

*“Si lloras porque se ha puesto el sol,
las lágrimas no te dejarán ver las estrellas”*

¿Quién iba a decir que tan pronto llegaría este momento? Los que me conocen bien saben lo difícil que resulta esto para mí ya que no soy mucho de palabras, pero en fin, me gustaría agradecer a todas las personas que de un modo u otro me han ayudado y apoyado durante este período.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores Oscar y Mónica, por haberme dado la oportunidad de realizar mi deseo. Muchas gracias por todo lo que me habéis aportado durante este tiempo. Suerte con el nuevo laboratorio!

También quisiera agradecer a mi más que compañera de labo, Aintzane por todo lo que hemos vivido juntas y por esas interminables charlas. Has sido un apoyo incondicional en el día a día, no solo en lo laboral sino también en lo personal. Espero que todo te vaya bien en la vida, pronto se te olvidarán las penas con la nueva llegada... Suerte!

Tampoco podrían faltar entre estas líneas mis compañer@s de laboratorio. Eskerrík asko Arantza y Marian por ayudarme día a día en el trabajo y por el apoyo que me habéis dado. Suerte con las oposiciones. Tampoco me quiero olvidar de Rosa Mari, gracias por tus consejos y por quitar hierro a lo que para mí parecía que tenía. A Aitor, Hiart, Ane, Sendoa, Nora, Itxaso y Estí por vuestra amistad. Espero que os vaya muy bien.

Encarní, como voy a echar de menos esas charlitas matinales y las broncas que hemos tenido por fregar el labo. Ha sido un placer conocerte.

A Carlos eskerrík asko por facilitarnos los pedidos.

También me gustaría agradecer a la gente del laboratorio de Neuroquímica por haber estado dispuesta a ayudarme, a Lorena, Elena, Naía, Nerea, Amaía, Asier, Bego, Jaime, Ekaitz, Leire, Idoia, Jon, Alex, Maider, Itziar, Laura, Gorka, Naiara, pero en especial a Itxari por el apoyo que me has dado sobre todo en los últimos meses con los problemas que me han ido surgiendo. Eskerrík asko benetan eta ánimo, zuk ere lortuko duzu eta! Espero no haberme olvidado de nadie...

Gracias también a Hector y Helen por todo el apoyo y la ayuda que me ofrecisteis cuando estuve allí con vosotros en el verano del 2009. ¿Quién iba a decir que nos volveríamos a ver y trabajar juntos de nuevo?

A mis amig@s de la uní, Pam, Aina, Itxas, Zur, Jokín y Josu eskerrík asko por esos inolvidables ratos que pasamos durante la carrera y después de ella y por supuesto, por vuestra amistad.

Agradecimientos

Eskerrik asko a la cuadrilla de los cumpleaños en el chino Olatz, Maitane, BíoZ y Janís, por los momentos vividos juntas. También quiero dar las gracias a BíoZ, Aitor y Ager por esos fines de semana que pasamos. Os echaré mucho de menos.

Por último quisiera agradecer de manera especial el apoyo incondicional que vosotros ama y aíta me habéis dado siempre. Sin vosotros no se lo que hubiera sido de mí. A mis hermanos Iban y Mikel, y a mis cuñados, Eider y Edoí, por haber estado siempre dispuestos a ayudar. Y como no a tí, Ibaí, que aunque te quedes el último en la lista sabes que eres el más importante. Mila esker nigatik egin duzun eta egíngo duzun guztiagatik.

Para terminar, me gustaría dedicar esta Tesis a varias personas que nos han dejado, en especial a Nieves que se que le hubiera hecho mucha ilusión ver este momento, eskerrik asko por todo lo que me has aportado.

0. Contenido

ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	3
1 INTRODUCCIÓN	9
1.1 CANALES IÓNICOS	9
1.1.1 Características generales	9
1.1.2 Canales de potasio dependientes de voltaje	11
1.1.2.1 Subunidades α con seis segmentos transmembrana y un dominio formador de poro (6TM1P)	13
1.1.2.1.1 Funcionamiento de los canales iónicos dependientes de voltaje	14
1.1.3 Canales erg	19
1.1.3.1 Propiedades biofísicas de los canales erg	20
1.2 EL CORAZÓN	22
1.2.1 El músculo cardiaco	22
1.2.1.1 Bases fisiológicas del potencial de acción cardiaco	22
1.2.1.1.1 Variabilidad Regional	25
1.2.1.2 Receptores adrenérgicos en el corazón	27
1.2.1.2.1 Regulación adrenérgica del potencial de acción cardiaco	29
1.2.1.2.2 Regulación adrenérgica de la I_{Kr} /hERG	31
1.2.2 Canalopatías de K^+	32
1.2.2.1 LQTS	33
2 OBJETIVOS DEL ESTUDIO	39
3 MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1 MATERIAL	43
3.1.1 Cultivos celulares	43
3.1.2 Bacterias	43
3.1.3 Aparatos y reactivos	43
3.1.3.1 Equipamiento general	43
3.1.3.2 Mantenimiento y transfección de los cultivos celulares	
HEK-293	44
3.1.3.3 Crecimiento de bacterias y cuantificación de DNA	44
3.1.3.4 Detección de proteínas	45
3.1.3.4.1 Enriquecimiento de la membrana plasmática	45
3.1.3.4.2 Cuantificación de proteínas	45

3.1.3.4.3 Electroforesis y Western blot	45
3.1.3.5 Registros electrofisiológicos	45
3.1.4 Soluciones	46
3.1.4.1 Agua	46
3.1.4.2 Soluciones para la transformación y el crecimiento de las bacterias	46
3.1.4.3 Soluciones para el mantenimiento de células HEK-293	47
3.1.4.4 Soluciones para la transfección celular	47
3.1.4.5 Soluciones para la técnica de detección de proteínas	47
3.1.4.6 Soluciones para la técnica de registro electrofisiológico	48
3.1.5 Plásmidos	49
3.1.6 Anticuerpos	51
3.1.6.1 Anticuerpos primarios	51
3.1.6.2 Anticuerpos secundarios	51
3.1.7 Bloqueantes y agonistas específicos	51
3.2 MÉTODOS	52
3.2.1 Crecimiento de bacterias y cuantificación de DNA	52
3.2.1.1 Transformación de bacterias mediante shock térmico	52
3.2.1.2 Crecimiento de bacterias en medio líquido	53
3.2.1.3 Purificación y cuantificación de DNA	54
3.2.1.3.1 Purificación de plásmidos	54
3.2.1.3.2 Cuantificación de DNA	55
3.2.2 Mantenimiento y transfección de las células HEK-293 en cultivo	55
3.2.2.1 Mantenimiento	55
3.2.2.2 Transfección	56
3.2.3 Detección de proteínas	57
3.2.3.1 Enriquecimiento de la membrana plasmática	57
3.2.3.2 Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford	57
3.2.3.3 Electroforesis y Western blot	58
3.2.3.3.1 Preparación de los geles de electroforesis	58
3.2.3.3.2 Carga de muestras y electroforesis	59
3.2.3.3.3 Electrotransferencia	59
3.2.3.4 Inmunodetección	59
3.2.3.4.1 Bloqueo de sitios de unión inespecíficos en la membrana	59

3.2.3.4.2 Incubación con el anticuerpo primario	60
3.2.3.4.3 Incubación con el anticuerpo secundario	60
3.2.3.4.4 Detección por quimioluminiscencia	60
3.2.3.4.5 Stripping	60
3.2.3.5 Análisis de imagen	61
3.2.4. Técnica de registro electrofisiológico	61
3.2.4.1 Técnica Patch-Clamp	61
3.2.4.2 Procedimiento experimental	62
3.2.4.3 Protocolo utilizado en los registros de corriente iónica	64
3.2.4.4 Adquisición y análisis de los datos	65
4 RESULTADOS	69
4.1 Efecto de la estimulación del receptor α_{1A} -AR sobre la corriente hERG	69
4.2 Efecto directo de la fenilefrina sobre el canal hERG	74
4.3 El efecto de la fenilefrina sobre la curva de activación de la corriente hERG se debe a la activación del receptor α_{1A} -AR	76
4.4 Importancia de la proteínas MinK y MiRP1 en la regulación α_{1A} -AR del canal hERG	79
4.5 Identificación de la vía intracelular que conecta el receptor α_{1A} -AR y el canal hERG	84
4.6 Efecto de la estimulación del receptor α_{1A} -AR sobre la corriente D-hERG	92
4.7 Efecto de la estimulación del receptor α_{1A} -AR sobre la corriente NTK-hERG	98
5 DISCUSIÓN	107
5.1 Modulación por proteínas accesorias	108
5.2 Identificación de la vía intracelular	109
5.2.1 Implicación de proteína quinasas	110
5.2.2 Implicación del PIP ₂	112
5.3 Resumen	114
6 CONCLUSIONES	119
7 BIBLIOGRAFÍA	123

ABREVIATURAS

BIM-1	Bisindolilmaleimida-1
BSA	Albúmina de Suero Bovino (Bovine Serum Albumin)
DAG	Diacilglicerol
D-hERG	Mutante de hERG, exento de los aminoácidos 883-894
diC8-PIP₂	D-mio-Fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EGTA	Ácido etilen-glicol tetraacético
FBS	Suero Fetal Bovino (Fetal Bovine Serum)
GFP	Proteína fluorescente verde (Green Fluorescent Protein)
HEK-293	Células de riñón embrionario humano (Human Embryonic Kidney)
HEPES	Ácido hidroxietil-piperazin-etanosulfónico
hERG	human ether-a-go-go related gene
I_{Kr}	Corriente rectificadora tardía rápida de potasio
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
NTK-hERG	Mutante de hERG, exento de los aminoácidos 2-354 (N-Truncated hERG)
OAG	1-oleoil 2-actilglicerol (análogo de DAG)
PBS	Tampón fosfato salino
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PKA	Proteína quinasa dependiente de cAMP
PKC	Proteína quinasa dependiente de fosfolipasa C
PLC	Fosfolipasa C
SDS	Dodecil sulfato sódico
TRIS	Trishidroximetilaminometano
V_h	Voltaje medio

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Esquema de los estados conformacionales o “gating” del canal iónico.	9
Figura 2. Esquema de la estructura general de los canales dependientes de voltaje.	10
Figura 3. Estructura molecular de los canales de K ⁺ dependientes de voltaje.	12
Figura 4. Estructura del canal KcsA y su filtro de selectividad.	14
Figura 5. Movimiento del sensor de voltaje en el KvAP.	16
Figura 6. Mecanismo de inactivación tipo N (A) y tipo C (B).	18
Figura 7. Diagrama de una subunidad α del canal hERG.	20
Figura 8. I-V de la corriente hERG.	21
Figura 9. La conformación del canal hERG es dependiente de voltaje.	21
Figura 10. Potencial de acción.	23
Figura 11. Variabilidad regional del potencial de acción cardiaco.	26
Figura 12. Esquema de un receptor adrenérgico acoplado a proteína G.	28
Figura 13. Potencial de acción y electrocardiograma.	35
Figura 14. Esquema del método de transformación de bacterias.	53
Figura 15. Crecimiento de bacterias y extracción de DNA.	55
Figura 16. Esquema del método de transfección.	56
Figura 17. Esquema en el que representa la modalidad de “célula entera”.	62
Figura 18. Secuencia de aproximación de la pipeta a la superficie de la célula.	63
Figura 19. Esquema del protocolo de estimulación.	64
Figura 20. Células HEK-293 transfectadas con el canal hERG, el receptor α_{1A} -AR y GFP.	69
Figura 21. Detección del canal hERG y del receptor α_{1A} -AR en las células HEK-293.	69
Figura 22. Detección del canal hERG con dos anticuerpos de distinto origen.	70
Figura 23. Registro de la corriente hERG.	71
Figura 24. Curva densidad de corriente-voltaje.	71
Figura 25. Curva de activación de la corriente hERG.	72
Figura 26. Ajuste de la deactivación de la corriente hERG.	72
Figura 27. Registro de la corriente hERG en presencia del receptor α_{1A} -AR.	73
Figura 28. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG.	74

Índice de figuras y tablas

Figura 29. Registro de la corriente hERG en ausencia del receptor α_{1A} -AR.	75
Figura 30. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en ausencia del receptor α_{1A} -AR.	76
Figura 31. Registro de la corriente hERG en ausencia del receptor α_{1A} -AR.	77
Figura 32. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en ausencia del receptor α_{1A} -AR.	77
Figura 33. Registro de la corriente hERG en presencia de 100nM de 5-Metil-Urapidil.	78
Figura 34. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de 100nM de 5-Metil-Urapidil.	78
Figura 35. Detección del MinK (A) y MiRP1 (B) en las células HEK-293.	79
Figura 36. Registro de la corriente hERG en ausencia y en presencia de MinK.	80
Figura 37. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en ausencia y presencia de MinK.	80
Figura 38. Registro de la corriente hERG en presencia de MinK.	81
Figura 39. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de MinK.	81
Figura 40. Registro de la corriente hERG en ausencia y en presencia de MiRP1.	82
Figura 41. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en ausencia y presencia de MiRP1.	82
Figura 42. Registro de la corriente hERG en presencia de MiRP1.	83
Figura 43. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de MiRP1.	83
Figura 44. Registro de la corriente hERG en presencia de 50 μ M de GPant2A.	84
Figura 45. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de 50 μ M de GPant2A.	85
Figura 46. Registro de la corriente hERG en presencia de 1 mM de Neomicina.	85
Figura 47. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de 1 mM de Neomicina.	86
Figura 48. Registro de la corriente hERG en presencia de 10 μ M de BIM-1.	86
Figura 49. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de 10 μ M de BIM-1.	87
Figura 50. Registro de la corriente hERG en presencia de 50 μ M de Genisteina.	88
Figura 51. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de 50 μ M de Genisteina.	88

Figura 52. Fosforilación del canal hERG.	89
Figura 53. Registro de la corriente hERG en presencia de 80 nM de anti-PIP ₂ .	90
Figura 54. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de 80 nM de anti-PIP ₂ .	90
Figura 55. Registro de la corriente hERG en presencia de 10 μM de diC8-PIP ₂ .	91
Figura 56. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de 10 μM de diC8-PIP ₂ .	92
Figura 57. Detección del canal D-hERG en las células HEK-293.	93
Figura 58. Registro de la corriente hERG y D-hERG.	93
Figura 59. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de las corrientes hERG y D-hERG.	94
Figura 60. Registro de la corriente D-hERG.	94
Figura 61. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente D-hERG.	95
Figura 62. Registro de la corriente D-hERG en presencia de 10 μM de diC8-PIP ₂ .	95
Figura 63. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente D-hERG en presencia de 10 μM de diC8-PIP ₂ .	96
Figura 64. Registro de la corriente D-hERG en presencia de 10 μM de BIM-1.	97
Figura 65. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente D-hERG en presencia de 10 μM de BIM-1.	97
Figura 66. Representación esquemática de la vía de regulación de la corriente D-hERG.	98
Figura 67. Detección del canal NTK-hERG en las células HEK-293.	99
Figura 68. Registro de la corriente hERG y NTK-hERG.	99
Figura 69. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de las corrientes hERG y NTK-hERG.	100
Figura 70. Registro de la corriente NTK-hERG.	100
Figura 71. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente NTK-hERG.	101
Figura 72. Representación esquemática de la vía de regulación de la corriente NTK-hERG.	101
Figura 73. Representación esquemática de la vía de regulación de la corriente hERG.	115

TABLAS

Tabla 1. Tipos de LQTS congénito, genes y proteínas asociadas.	34
Tabla 2. Valores de la deactivación de la corriente hERG.	102
Tabla 3. Valores del voltaje medio de activación de la corriente hERG.	103
Tabla 4. Valores de la deactivación de la corriente D-hERG.	104
Tabla 5. Valores del voltaje medio de activación de la corriente D-hERG y NTK-hERG.	104

1. Introducción

1 INTRODUCCIÓN

1.1 CANALES IÓNICOS

1.1.1 Características generales

Los canales iónicos son una clase ubicua de proteínas integrales de la membrana celular que forman poros hidrófilos a través de los cuales se produce el flujo de iones a favor de su gradiente electroquímico. Los canales iónicos participan en un gran número de procesos fisiológicos fundamentales, ya que permiten cambios rápidos y selectivos en la permeabilidad de la membrana, como los que se producen por ejemplo durante la transducción sensorial, la generación y propagación del potencial de acción, la contracción muscular o la transmisión sináptica.

Los canales iónicos están presentes en todas las células y tienen una distribución y densidad variable según el tipo celular. Son proteínas dinámicas que pueden oscilar de forma rápida entre distintos estados conformacionales, un fenómeno conocido como “gating” del canal [figura 1]. En el estado de reposo el canal está cerrado, no permitiendo que los iones fluyan de un lado a otro de la membrana, pero en este estado es susceptible de ser abierto. El estado activo del canal permite el flujo de iones a su través ya que el canal se abre. Por último, en el estado inactivo el canal también está cerrado y por lo tanto no conduce.

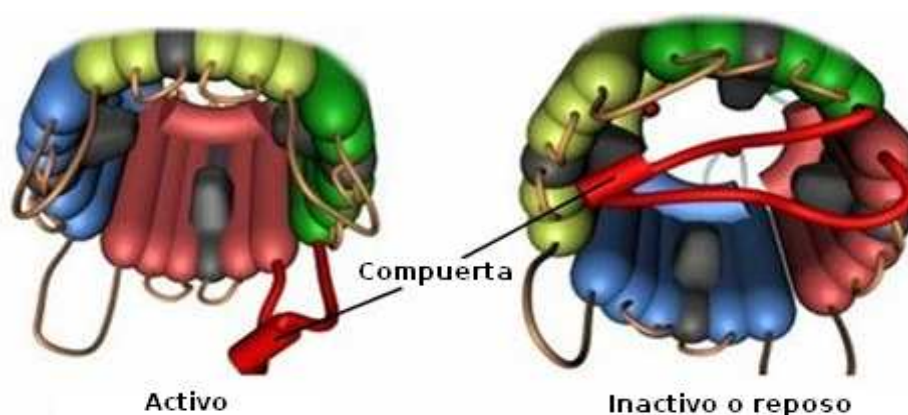


Figura 1. Esquema de los estados conformacionales o “gating” del canal iónico. El canal iónico tiene diferentes estados conformacionales. En el estado activo el canal está abierto y por lo tanto conduce iones a su través. En los estados inactivo y reposo el canal se encuentra cerrado bloqueando así el flujo de iones. (Modificada de Whizar-Lugo et ál.).

Existe un equilibrio entre estos estados conformacionales, determinados por la cantidad de corriente que fluye a través de la membrana en función del tiempo. Este equilibrio puede verse influenciado por factores como el gradiente eléctrico transmembrana, la unión de ligandos (extracelulares o intracelulares) o modificaciones covalentes del canal por fosforilación u otros mecanismos. En líneas generales, en función del mecanismo que determina la transición entre abierto y cerrado de los canales, éstos se pueden clasificar en dos grandes grupos: los canales regulados por ligando (acetilcolina, ATP,...) y los regulados por cambios en el potencial de membrana.

Todos los canales son fundamentalmente permeables al ión que les da nombre, pero ninguno es absolutamente específico. El canal es permeable en función de cual sea el tamaño y las propiedades físico-químicas del ión, de tal manera que la estructura del poro está adaptada para la conducción de un determinado ión.

Dentro de la familia de los canales dependientes de voltaje, todos ellos tienen una estructura general conservada en la que se pueden distinguir una serie de elementos: el filtro de selectividad, el sensor de voltaje, las compuertas de "gating" y los lugares de unión a moduladores [figura 2].

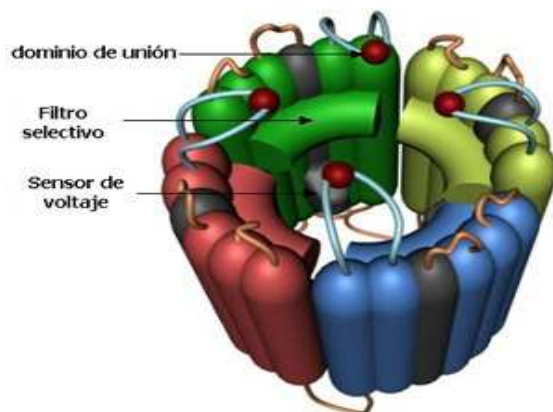


Figura 2. Esquema de la estructura general de los canales dependientes de voltaje. Los canales dependientes de voltaje presentan varios elementos en común, como son el filtro de selectividad, el sensor de voltaje, las compuertas de "gating" y los dominios de unión a moduladores. (Tomada de <http://fisicoqpotmem.blogspot.com>).

Como su propio nombre indica, en los canales dependientes de voltaje la apertura, el cierre o la inactivación están determinados por cambios en el voltaje del potencial de membrana. Esta dependencia está determinada por la presencia del sensor de voltaje que detecta los cambios que se producen en el potencial de la membrana y los

traduce en un cambio conformacional que mueve las compuertas de activación e inactivación, que abren y cierran el canal afectando así al paso de iones a través del poro. Así, a potenciales hiperpolarizados los canales se encuentran preferentemente en el estado de reposo, en el cual no hay flujo de iones a través del canal. Al despolarizarse la membrana, el equilibrio se desplaza hacia el estado abierto, de forma que los canales pasan más tiempo abiertos, aumentando el flujo de iones a su través. En algunos casos, aún cuando la membrana permanece despolarizada, los canales están en un estado conformacional inactivo, distinto al de reposo, pero indistinguible desde el punto de vista de la permisividad al paso de iones. En el estado inactivo el canal no conduce ya que la compuerta de inactivación está cerrada. Una vez que el canal alcanza el estado inactivo es necesaria su reactivación para poder responder al siguiente estímulo.

La selectividad iónica depende de la estructura del poro, y más específicamente del filtro de selectividad. El diámetro del poro es mucho mayor que el tamaño del ión en prácticamente toda su longitud, pero se estrecha hasta dimensiones atómicas al llegar al filtro de selectividad, donde se establece la selectividad del canal para un ión u otro. Cuando el canal está abierto, el ión entra por la boca del poro e interacciona con el filtro de selectividad. Esta interacción es fuerte pero no covalente y permite la identificación del ión. Una vez que el ión ha sido identificado pierde las moléculas de agua que lo hidratan y pasa a través del poro al otro lado de la membrana ^[Hille, 2001].

1.1.2 Canales de potasio dependientes de voltaje

Los canales de K^+ están formados por subunidades principales, las subunidades α , y por subunidades accesorias [figura 3]. La subunidad α de estos canales es una proteína multimérica. Es decir, esta subunidad principal no es suficiente para formar un poro a través del cual pasen los iones, por lo que deben asociarse varias subunidades para que el canal sea funcional. En cuanto a las subunidades accesorias, éstas pueden ser citoplasmáticas, extracelulares o transmembranales y su función es la de modular las propiedades de la subunidad principal.

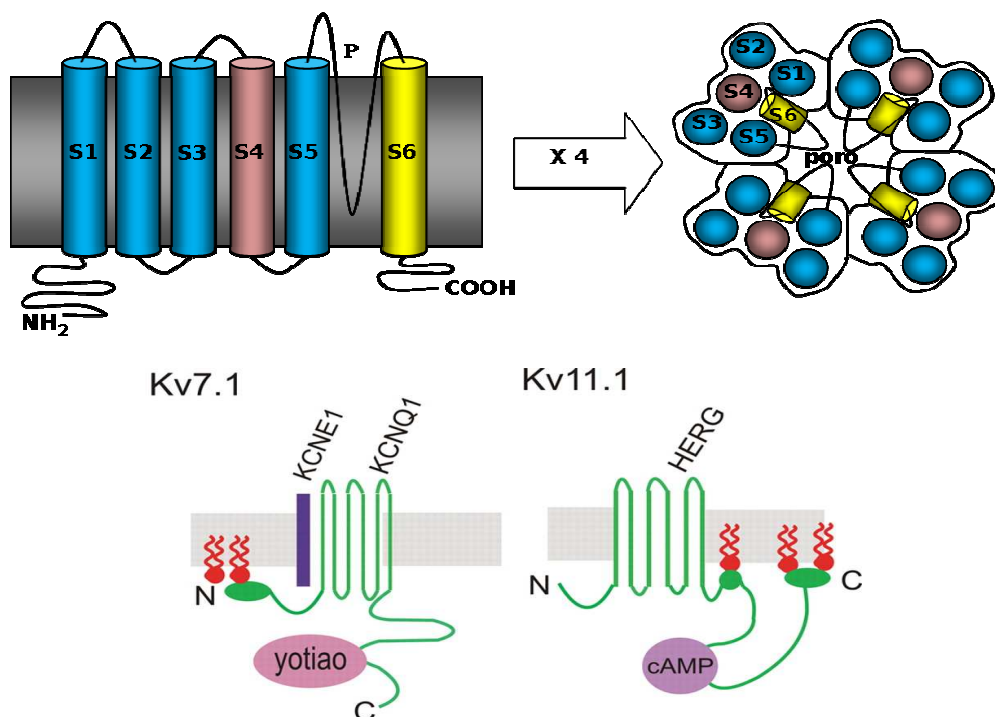


Figura 3. Estructura molecular de los canales de K⁺ dependientes de voltaje. Panel superior: vista lateral de una subunidad α compuesta por 6 segmentos transmembrana (izquierda) y vista superior de un canal K_v en su estado funcional, compuesto por 4 subunidades α (derecha). (Tomada de Alday, 2009). Panel inferior: los tetrámeros pueden estar acompañados de distintas subunidades accesorias o sustancias reguladoras como las proteínas yotiao o KCNE1 o el cAMP (Tomada de Woodcock *et ál.*, 2009).

La estructura básica y compartida por todos los canales de K⁺ está formada por 2 dominios transmembrana (2TM) conectados por una región bucle que entra y sale de la bicapa lipídica por el lado exterior de la membrana plasmática. Este bucle, llamado dominio P, forma parte esencial del poro del canal y tienen una secuencia de aminoácidos altamente conservada: TXXTXG(Y/F)G (X es cualquier aminoácido). Esta secuencia constituye parte esencial del filtro de selectividad del canal.

Una manera de clasificar los canales de K⁺ es en función de la estructura de sus subunidades α, ya que pueden presentar combinaciones muy diversas. Cada uno de los grupos comprende una familia discreta de proteínas, en base a la identidad de secuencia, y cada una de estas familias a su vez se divide en subfamilias. Esta diversidad aumenta teniendo en cuenta su capacidad de formar estructuras heterotetraméricas funcionales y de asociarse con subunidades accesorias.

El canal iónico que se estudia en el presente trabajo pertenece al grupo de canales formados por 6 segmentos transmembrana. A continuación se hace una pequeña descripción de las propiedades de esta familia.

1.1.2.1 Subunidades α con seis segmentos transmembrana y un dominio formador de poro (6TM1P)

La subunidad α está constituida por 6 segmentos transmembrana S1, S2, S3, S4, S5 y S6 con extremos amino- y carboxilo-terminal citoplasmáticos [figura 3, panel superior]. Cada subunidad consta de dos módulos funcionalmente distintos que son el sensor de voltaje, en el que participan los segmentos S1-S4, y el poro del canal, formado por los segmentos S5-S6. El segmento S4 contiene residuos de arginina o lisina cada tres posiciones y es el único dominio transmembrana que está positivamente cargado [Horn, 2000]. La despolarización de la membrana causa un movimiento de los residuos positivos del S4, y este movimiento de cargas a través del campo eléctrico de la membrana media la apertura del canal. Por otra parte, el bucle que une los segmentos S5-S6 constituye la vía de permeación de iones, que contiene el filtro de selectividad del canal.

Como se ha mencionado anteriormente, una única subunidad α no es suficiente para constituir un poro, por lo que, para formar un canal de K^+ funcional tienen que agruparse 4 subunidades α [Rudy, 1988] [figura 3]. Cuando las subunidades α son todas iguales el canal es un homotetrámero. Aunque a veces pueden formarse homotetrámeros, la mayoría de los canales de K^+ de las células excitables están formados por el ensamblaje de subunidades α diferentes y son por tanto heterotetrámeros [Lazdunski, 1992].

Los canales de K^+ pertenecientes a esta clase estructural se clasifican en varias subfamilias dependiendo de sus características funcionales: Kv, KCNQ, EAG, KcGMP y SK [Hille, 2001]. Más adelante, se desarrollará en mayor profundidad las características de la familia EAG (ether-à-go-go gene), ya que el canal hERG pertenece a esta familia de genes y es el que se estudia en este trabajo.

Este canal es el responsable de producir la corriente I_{Kr} en miocitos cardiacos junto con una subunidad accesoria todavía sin identificar. Algunos autores sugieren que interacciona con la proteína MinK, mientras que otros apoyan la interacción entre hERG y MiRP1. Cuando se hace referencia a esta corriente en miocitos cardiacos se le denomina corriente I_{Kr} , mientras que cuando se habla de ella en sistemas heterólogos se hace referencia a la corriente hERG, ya que normalmente no se asocia a ninguna proteína accesoria.

1.1.2.1.1 Funcionamiento de los canales iónicos dependientes de voltaje

Conductancia iónica: el poro

Los canales además de una alta selectividad muestran una velocidad de permeación cercana a la difusión de los iones en solución (10^6 - 10^8 por s). La velocidad y la selectividad son cruciales para las funciones biológicas de la célula. Los canales forman poros de dimensiones definidas que son impermeables a los iones que exceden las dimensiones de la parte más estrecha.

Durante muchos años se sabía que en el lazo reentrante que conforma el poro de los canales de potasio, se encontraba una secuencia de aminoácidos altamente conservada: TXXTXGYG (X es cualquier aminoácido), prácticamente la totalidad de canales de potasio comparten los últimos tres residuos GYG. Se consideraba que estos tres residuos eran los responsables de la selectividad al potasio, formando el “filtro de selectividad”, pero no existían pruebas que lo confirmaran. Cuando se obtuvo la estructura del canal bacteriano KcsA [Doyle *et al.*, 1998], se desveló que el poro posee forma de un cono invertido [figura 4A]. Desde el interior hacia el exterior celular se reconoce un túnel, seguido de un vestíbulo más ancho y un conducto estrecho de ~ 12 Å, a nivel molecular este conducto lo conforman el esqueleto de carbonilos de la secuencia TVGYG del lazo reentrante de cada subunidad [figura 4B].

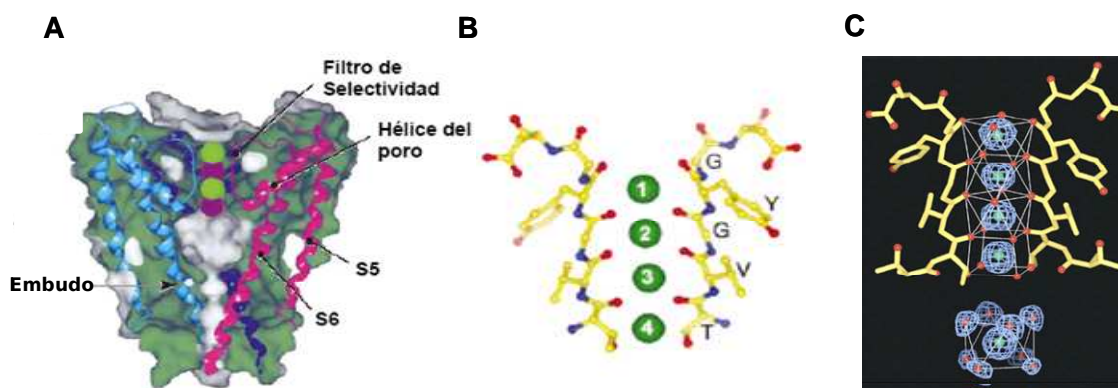


Figura 4. Estructura del canal KcsA y su filtro de selectividad. **A** La estructura del poro de KcsA muestra sólo dos de las cuatro subunidades. Los lazos extendidos de las cuatro subunidades forman el filtro de selectividad. Las bolas representan dos iones de K^+ y sus dos posibles posiciones. En el canal cerrado las hélices S6 se cruzan impidiendo el flujo de iones. **B** Ampliación del filtro de selectividad donde se aprecia la secuencia TVGYG y los sitios de coordinación del K^+ (Tomada de Morais-Cabral *et al.*, 2001). **C** En la imagen se muestra la interacción del K^+ deshidratado con los sitios de coordinación en el filtro de selectividad. En el vestíbulo el K^+ vuelve a hidratarse por medio de ocho moléculas de agua. Los átomos de oxígeno de los carbonilos cuando se coordinan con el K^+ forman la misma estructura que el agua con el potasio hidratado. (Tomada de MacKinnon, 2004).

El conducto, formado por el filtro de selectividad, es lo suficientemente estrecho como para que un ión de potasio unido a moléculas de agua no lo atraviese, por lo que el ión debe ser deshidratado. La disposición de los oxígenos de los grupos carbonilos del filtro de selectividad forma unos sitios de interacción que favorece la deshidratación del potasio [Morais-Cabral *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001]. El filtro de selectividad posee cuatro sitios de unión a potasio P1:P4. Cada sitio de unión contiene un núcleo de coordinación formado por ocho oxígenos que se orientan de manera similar a como lo hacen las moléculas de agua que rodean al potasio hidratado [figura 4C]. De este modo, el potasio se puede liberar de su capa de hidratación y sustituirla por un sitio de interacción ordenado. Se ha observado que los iones K^+ pasan en fila por el filtro, separados por una molécula de agua, y sólo dos de los cuatro sitios de unión son ocupados al mismo tiempo. Cuando el canal está cerrado los iones K^+ se mueven de manera concertada entre dos posiciones, P1 y P3 ó P2 y P4. Cuando el canal se abre entra un tercer ión, se generan interacciones electrostáticas entre ellos y desestabiliza la unión de los K^+ con los carbonilos del filtro, favoreciendo un paso más rápido a través del canal [Zhou & MacKinnon, 2003] permitiendo que los iones fluyan en la dirección dictada por el gradiente electroquímico. Tras pasar el filtro de selectividad, en el vestíbulo el K^+ se rehidrata y el ciclo se cierra.

Activación de los canales

En la mayoría de los canales iónicos dependientes de voltaje la apertura de la compuerta del poro está acoplada alostéricamente al dominio sensor de voltaje [Yu & Catterall, 2004]. Dicho dominio, compuesto por los cuatro segmentos transmembrana S1-S4, se encarga de convertir los cambios del potencial de membrana en fuerza mecánica que abre el poro. La característica que permite detectar cambios en el voltaje reside en el segmento S4. En este segmento cada tres residuos se encuentra un aminoácido con carga neta positiva (Arg ó Lys) a la cual se le atribuye la sensibilidad al voltaje en la activación de *Shaker* [Papazin *et al.*, 1991; Aggarwal & MacKinnon, 1996]. Gracias a la configuración en hélice α se consigue que todas las cargas se coloquen en el mismo lado de la hélice.

Se han propuesto varios modelos para explicar los cambios mecánicos del sensor de voltaje. Algunos autores proponen que el sensor de voltaje S4 se encuentra aislado de los lípidos por una pared proteica constituida por los segmentos S1, S2 y S3 [Catterall, 1986; Guy & Seetharamulu, 1986; Bezanilla, 2002; Bezanilla, 2005b]. Las cargas positivas del segmento S4 detectan la diferencia de potencial a través de la proteína y causan un desplazamiento hacia arriba del segmento S4 y abren el poro.

El grupo de R. MacKinnon al cristalizar el canal bacteriano KvAP [Jiang *et al.*, 2003a] sugirió un nuevo “modelo de la pala” [Jiang *et al.*, 2003b]. La estructura reveló que cuando el canal está cerrado los segmentos S1-S2 están inmersos en un ambiente lipídico, mientras que el S4 junto a un fragmento del S3 (S3b) se encuentran en la interfase membrana-citoplasma y forman una unidad compacta que se llamó “pala”. En respuesta a una despolarización, las cargas situadas en el extremo de la pala se trasladan de la cara interna a la externa de la membrana, atravesándola completamente [figura 5]. En este modelo el sensor detecta la diferencia de potencial a través de la membrana plasmática. El “modelo de la pala”, aunque novedoso, creó mucha controversia y no parece que se ajuste a las observaciones en otros K_v [Cohen *et al.*, 2003; Lainé *et al.*, 2003; Cuello *et al.*, 2004; Bezanilla, 2005a]. En estas revisiones se critica la propuesta que la “pala” S3b-S4 tenga que cruzar completamente la membrana.

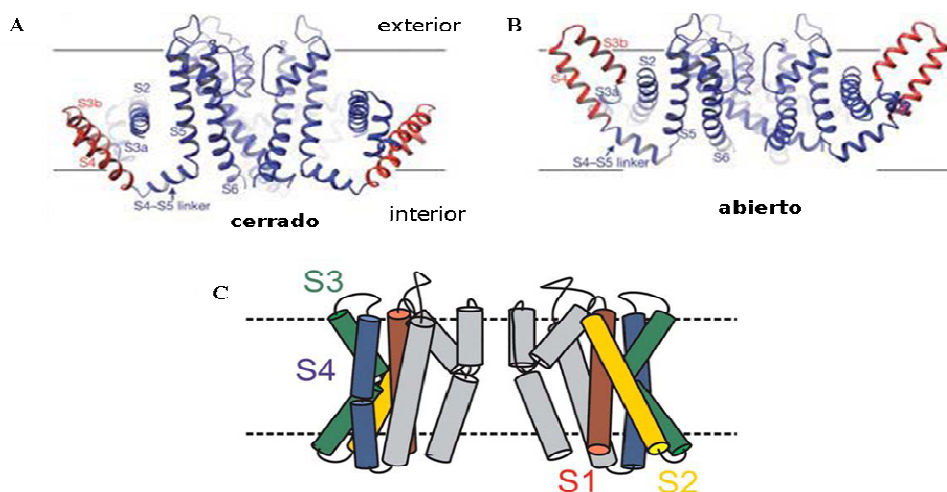


Figura 5. Movimiento del sensor de voltaje en el KvAP. Representación del estado cerrado (A) y abierto (B) del KvAP según el modelo de MacKinnon. En rojo se representa las palas (S3b-S4) y en azul el resto de los segmentos transmembrana. (Tomada de Jiang *et al.*, 2003b). C Configuración del sensor de voltaje del canal KvAP según Cuello *et al.*, 2004.

El grupo de E. Perozo propuso un nuevo modelo para KvAP, un canal dependiente de voltaje de la arquea *Aeropyrum pernix* [Cuello *et al.*, 2004]. En este modelo todos los segmentos presentan una distribución clásica, más o menos paralelos al eje del poro, y el sensor de voltaje S4 puede interactuar con los lípidos [figura 5C]. Basándose en este modelo, R. MacKinnon reinterpretó sus resultados cristalográficos [MacKinnon, 2004] y llegó a la conclusión que los segmentos S3 y S4 se encuentran en la interfase lípido-proteína mientras que los segmentos S1 y S2 se sitúan transversalmente a la membrana. Posteriormente, el grupo de R. MacKinnon cristalizó otro canal de potasio, $K_v1.2$ [Long *et al.*, 2005a] que permitió estudiar otro ejemplo del sensor de voltaje [Long *et al.*, 2005b]. A diferencia del KvAP, en el $K_v1.2$ el movimiento del sensor de voltaje se acopla al

poro: los segmentos S1-S4 forman un complejo que interacciona con la región del poro S5-S6 de la subunidad adyacente mediante el conector S4-S5. A pesar de todos los modelos propuestos, aún no se alcanza un consenso y el debate sobre el mecanismo y la localización del sensor de voltaje sigue abierto.

Inactivación de los canales

La inactivación de un canal consiste en la oclusión de su poro, de manera que no puedan pasar más iones a su través. La inactivación de los canales dependientes de voltaje se puede originar desde el estado abierto o el estado cerrado [Bean, 1981; Aldrich & Stevens, 1983; Solc & Aldrich, 1988; Zagotta *et al.*, 1990; Patil *et al.* 1998; Roux *et al.*, 1998; Rasmusson *et al.*, 1998; Greenstein *et al.*, 2000]

Los mecanismos de inactivación son diferentes dependiendo del canal iónico. En general, pueden tener dos tipos de inactivación: la inactivación tipo N, muy rápida y la tipo C, generalmente más lenta [Hoshi *et al.*, 1990; Hoshi *et al.*, 1991]

La **inactivación tipo N** sigue el mecanismo de bola y cadena, en el cual, la bola está en el extremo N-terminal intracelular de cada subunidad α [Hoshi *et al.*, 1991]. Está formada por aproximadamente 20 aminoácidos con residuos hidrofóbicos y positivos. Por su parte, el receptor de inactivación incluye aminoácidos del bucle intracelular que une los segmentos transmembrana S4 y S5 [Isacoff *et al.*, 1991]. La inactivación sólo ocurre una vez el canal se activa [Zagotta y Aldrich, 1990] y solo es necesaria la unión de un dominio de inactivación aunque existen 4 por canal [MacKinnon *et al.*, 1993; Gómez-Lagunas & Armstrong, 1995]. Las subunidades accesorias que puedan estar presentes en el complejo de membrana también son capaces de inducir esta inactivación [Heinemann *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996] [figura 6A].

Sin embargo, otros canales de K^+ han desarrollado la lenta **inactivación tipo C** [figura 6B]. El canal hERG es una excepción ya que muestra una inactivación tipo C muy rápida. Esta inactivación requiere secuencias de aminoácidos situadas en el extremo extracelular del segmento S6 en vez de en el extremo N-terminal [Hartmann *et al.*, 1991]. El grado de inactivación depende de la ocupación de un lugar de unión para iones K^+ en la parte externa del poro, de tal forma que este sitio ha de quedar libre para que la inactivación proceda [Lopez-Barneo *et al.*, 1993; Baukrowitz & Yellen, 1995]. Se considera que el filtro de selectividad actúa también como una compuerta con distintas conformaciones y que el sitio externo de unión al K^+ favorece la no inactivación del canal [Yellen, 1998; Bernéche & Roux, 2005]. La inactivación tipo C se ve incrementada por la presencia de bloqueadores por la parte interna del poro, que disminuyen la conductancia, disminuyendo por tanto la unión de K^+ a la parte externa del poro. De esta forma, la inactivación tipo N

incrementa la inactivación tipo C [Baukrowitz & Yellen, 1995]. En ambos casos el grado de inactivación es independiente de voltaje a potenciales en los que la activación es completa, lo que sugiere que, al igual que la inactivación tipo N, la inactivación C es un proceso acoplado a la activación.

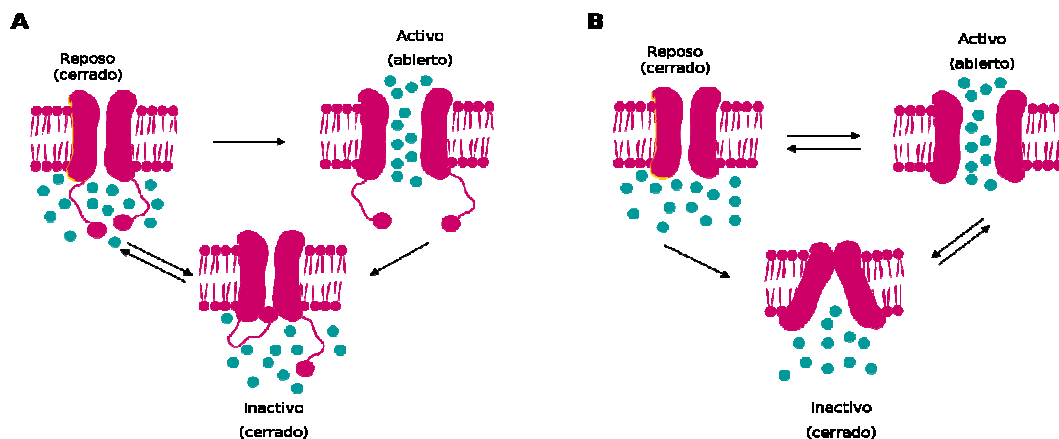


Figura 6. Mecanismo de inactivación tipo N (A) y tipo C (B). En el proceso de la inactivación tipo N, la bola positivamente cargada se une a la parte hidrofóbica de la cavidad central del poro evitando así el flujo de iones. Cada subunidad principal tiene su bola-cadena, pero una es suficiente para provocar la inactivación. Sin embargo, la inactivación tipo C requiere la constricción del filtro de selectividad bloqueando el poro por la parte extracelular del canal iónico.

Reposo de los canales

En el estado de reposo los canales son capaces de abrirse de nuevo frente a una despolarización. El paso del estado inactivo al de reposo es un proceso que depende de tiempo y de voltaje. Sin embargo, la exposición a potenciales hiperpolarizantes facilita el paso de canal inactivo a canal cerrado en reposo; en este proceso pueden estar involucrados tanto la disposición de los iones dentro de la boca del poro [Ortega-Sáez et ál., 2000] como el acoplamiento a los cambios conformacionales del sensor de voltaje [Olcese et ál., 1997]. Cuando el canal pasa a dicho estado la partícula bloqueante se retira dejando libre el poro. Además, como la membrana deja de estar despolarizada y pasa a su potencial de reposo, ya no hay fuerza que mantenga el cambio conformacional y el sensor de voltaje vuelve a su posición normal. Así, el canal se cierra y queda susceptible de ser abierto en la próxima despolarización.

El paso del canal desde el estado inactivo al de reposo es lo que se denomina "recuperación de la inactivación" del canal. La recuperación de la inactivación es un parámetro importante a la hora de diferenciar canales. Además, suele ser un proceso dependiente de voltaje, es decir, un canal puede recuperarse de la inactivación en pocos milisegundos a un determinado voltaje y sin embargo tardar más tiempo al

aplicar un voltaje distinto. Al paso del estado activo al de reposo se le denomina deactivación del canal.

1.1.3 Canales erg

Los canales erg pertenecen a la familia EAG. Esta familia está formada por tres subfamilias estructuralmente similares: eag (ether-á-go-go gene o K_v10) con dos miembros, erg (eag-related gene o K_v11) y elk (eag-like o K_v12) con tres miembros cada uno. El primer miembro de esta familia fue clonado de un mutante de *Drosophila melanogaster* [Warmke et ál., 1991], el cual fue caracterizado por una agitación de sus patas al ser anestesiado con éter. Desde 1994, han sido clonados distintos canales homólogos de los canales EAG de *Drosophila* en distintos mamíferos [Warmke & Ganetzky, 1994]. Aunque en un principio los miembros de la familia EAG fueron clasificados como canales K_v por su selectividad al K^+ y la formación de subunidades con seis segmentos transmembrana, estos canales presentan distinta cinética de “gating” además de distintas propiedades farmacológicas [Schwarz & Bauer, 1999].

A pesar de la similitud que presentan en la estructura con la superfamilia de canales de K^+ dependientes de voltaje, la subfamilia erg presenta varias características diferentes. El N-terminal de todos los miembros de esta subfamilia presenta el dominio Per-Arnt-Sim (PAS) [figura 7]. Este dominio está implicado en diversos mecanismos de transducción en respuesta a factores ambientales, como el oxígeno, la luz o el potencial redox. Aún así, no está claro cuál es la función del dominio PAS en esta proteína. Sin embargo, mutaciones en esta región del erg están asociadas a anomalías en la deactivación y a defectos en el tráfico intracelular [Bronstein-Sitton, 2006].

Otra de las distintas características que presentan estos canales es la presencia del dominio de unión a nucleótidos cíclicos (cNDB) en el C-terminal intracelular. Varios estudios sugieren que la actividad del canal puede estar regulada por cAMP mediante una vía directa o indirecta [Cui et ál., 2000]. Asimismo, mutaciones en este dominio tienen implicaciones en el procesamiento así como en el tráfico del canal [Akhavan et ál., 2005], pudiendo tener también un papel importante en la interacción entre el canal y la subunidad accesoria KCNE2 (MiRP1) [Cui et ál., 2001].

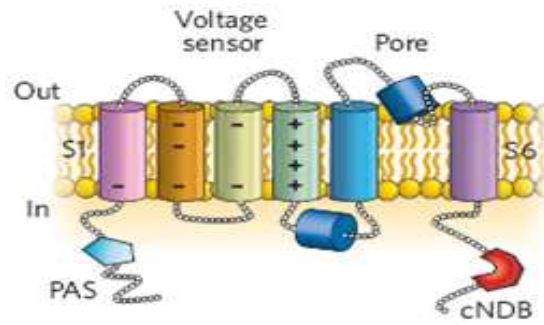


Figura 7. Diagrama de una subunidad α del canal hERG. Cada subunidad contiene seis segmentos transmembrana, S1-S6. El segmento S4 contiene muchos aminoácidos básicos (+), mientras que los segmentos S1-S3 residuos ácidos de Asp (-). Estos residuos pueden formar puentes de sales con los residuos básicos del segmento S4 durante el “gating” del canal. El dominio PAS se encuentra en el N-terminal y el dominio de unión a nucleótidos cíclicos (cNDB) en el C-terminal. (Tomada de Sanguinetti & Tristani-Firouzi, 2006).

1.1.3.1 Propiedades biofísicas de los canales erg

Las propiedades biofísicas diferencian a la subfamilia erg del resto de la superfamilia de canales dependientes de voltaje. Los canales erg están caracterizados por una cinética de activación muy lenta acompañada de una rápida cinética de inactivación. La corriente del canal erg1 (hERG) y del erg2 es una fuerte rectificadora de entrada, es decir que el canal conduce mucho más eficientemente hacia el interior de la célula que hacia el exterior. Esto se debe a la rápida inactivación del canal a potenciales positivos, de ahí que la curva I-V tenga una forma de campana [figura 8]. Estos dos canales además muestran una lenta cinética de activación. El canal erg3 en cambio, genera una débil corriente rectificadora entrante que se activa a potenciales negativos y tiene una rápida cinética de activación [Bronstein-Sitton, 2006].

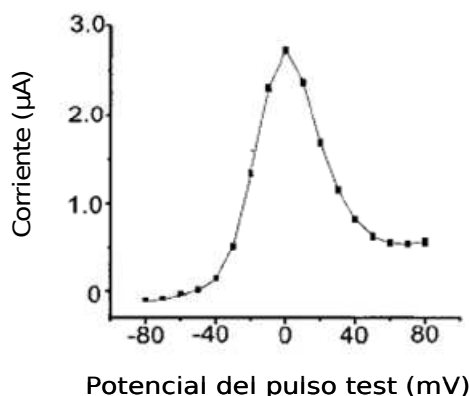


Figura 8. I-V de la corriente hERG. La corriente aumenta a potenciales negativos hasta llegar a un máximo (a 0 mV aproximadamente). A potenciales positivos la corriente disminuye debido a la rápida inactivación. (Modificada de Thomas *et ál*, 1999).

A potenciales negativos (por ejemplo, -80 mV), el canal hERG está en estado de reposo [figura 9]. La despolarización de la membrana celular hacia potenciales más positivos que -60 mV induce al canal a que se abra, permitiendo una difusión de iones de K^+ hacia el lado extracelular de acuerdo a su fuerza electroquímica. Según el potencial de membrana se despolariza progresivamente hacia potenciales más positivos, el canal entra en el estado inactivo directamente desde el estado de reposo, por lo tanto no conduce. La inactivación de estos canales es mucho más rápida que la activación, lo que reduce la conductancia hacia fuera a potenciales despolarizados y prolonga la fase 2 o meseta del potencial de acción cardiaco. La recuperación desde la inactivación es más rápida que la deactivación provocando la fase 3 de la repolarización del potencial de acción cardiaco [Sanguinetti & Tristani-Firouzi, 2006].

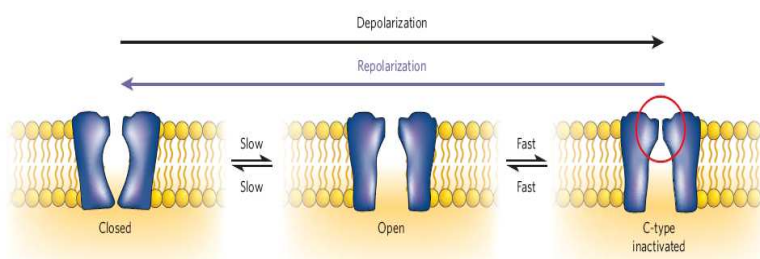


Figura 9. La conformación del canal hERG es dependiente de voltaje. El canal hERG está en reposo, abierto o inactivado dependiendo del voltaje transmembrana. El canal está cerrado a voltajes negativos. La despolarización activa suavemente el canal, que después se inactiva rápidamente, especialmente a potenciales altos. La repolarización de la membrana invierte la transición entre los estados del canal. La inactivación de tipo C está causada por la constricción del filtro selectivo (circulo rojo). (Tomada de Sanguinetti & Tristani-Firouzi, 2006).

La inactivación es dependiente de voltaje, el voltaje medio de inactivación es de -40 mV donde hay una rápida inactivación haciendo que la reducción de la conductancia de la célula entera sea dependiente de voltaje. Debido a esta rápida inactivación a potenciales positivos, la corriente rectifica y la I-V de la corriente toma forma de campana [figura 8]. Cuando la membrana se repolariza los canales se recuperan de la inactivación a una velocidad 10 veces mayor que la velocidad de deactivación. Estas características de la cinética afectan fuertemente a la contribución neta de los canales hERG durante la fase de repolarización tardía típica del potencial de acción. La inactivación del canal domina a potenciales muy positivos y reduce mucho la magnitud de la corriente en el pico del potencial de acción. Durante la meseta y continuando la fase 3, los canales se recuperan de la inactivación; como la deactivación es lenta, la corriente hERG aumenta transitoriamente aunque la fuerza electroquímica del potasio esté reducida.

1.2 EL CORAZÓN

1.2.1 El músculo cardiaco

El corazón es una bomba muscular que, como consecuencia de la actividad contráctil de sus paredes, impulsa la sangre a lo largo de todo el cuerpo, a donde lleva nutrientes, hormonas y otras sustancias reguladoras y de donde retira las sustancias de desecho. Cada ciclo cardiaco se inicia con la generación espontánea de un potencial de acción en las células marcapasos del nodo sinoauricular. El potencial de acción viaja rápidamente por ambas aurículas y, desde ahí, a través del nodo auriculoventricular a los ventrículos.

A diferencia del músculo esquelético que necesita ser estimulado por el sistema nervioso central para contraerse, el impulso eléctrico que activa al miocardio no es ni iniciado ni conducido por tejido nervioso. En vez de eso, las células marcapasos del nodo sinoauricular crean el impulso inicial, que es transmitido a los miocitos auriculares y ventriculares por las células de conducción. Tanto las células marcapasos como las células de conducción son células musculares especializadas.

1.2.1.1 Bases fisiológicas del potencial de acción cardiaco

En condiciones de reposo, la concentración intracelular de potasio en los miocitos cardiacos es muy alta (150 mM) mientras que la extracelular es muy baja (5 mM). El

potencial de equilibrio para el K^+ en estas condiciones es de -95 mV. Como la membrana es relativamente permeable a este ión, el potencial de reposo de la célula se mantiene cerca del mismo, aproximadamente en -90 mV.

Por otro lado, la concentración intracelular de sodio (Na^+) es muy baja (12 mM) y la extracelular en cambio, muy alta (145 mM). El potencial de equilibrio para el Na^+ en estas condiciones es de $+60$ mV, muy lejos del potencial de reposo de la célula, por lo que el Na^+ tiende a entrar al interior celular a favor del enorme gradiente electroquímico. Sin embargo, no hay movimiento de Na^+ a través de la membrana porque esta es impermeable a dicho ión.

La contracción de las células musculares cardiacas está provocada por una excitación eléctrica de características especiales: el potencial de acción. Esta excitación provoca modificaciones de la permeabilidad a los iones responsables del potencial de acción. El potencial de acción consiste en una elevación rápida o despolarización del potencial de membrana desde el potencial de reposo, seguido de un retorno al potencial de reposo o repolarización. El potencial de acción cardiaco se divide en distintas fases [figura 10]:

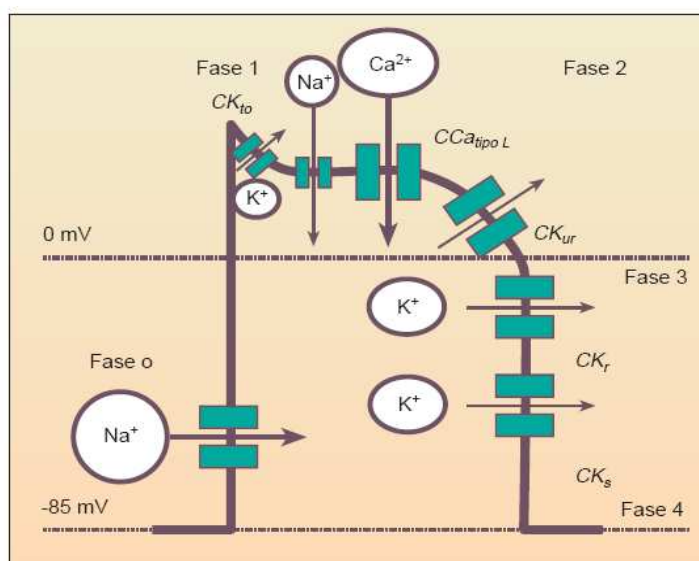


Figura 10. Potencial de acción. Esquema de un potencial de acción cardiaco, en el se representan sus distintas fases así como las corrientes de entrada y de salida que en él intervienen. (CK_{to} : canales de K^+ transitorios; $CCa_{tipo L}$: canales de Ca^{2+} tipo L; CK_{ur} : canales de K^+ de activación ultrarrápida, CK_r : canales de K^+ de activación rápida y CK_s : canales de K^+ de activación lenta). (Tomada de Lozano, 2001).

Despolarización (fase 0): En condiciones de reposo los canales selectivos para el Na^+ están cerrados impidiendo el flujo del ión. Sin embargo, cuando un estímulo eleva el potencial de la membrana hasta el potencial umbral, los canales selectivos para el

Na^+ reaccionan ante este cambio de voltaje sufriendo una modificación en su estructura, permitiendo así el movimiento del ión a su través. El Na^+ entra masivamente al interior celular empujado por su gradiente electroquímico, produciendo una corriente de entrada de Na^+ (I_{Na}) la cual, al introducir cargas positivas, provoca la rápida despolarización de la membrana. El paso de Na^+ a través de estos canales abiertos hace menos negativo el potencial de la membrana, lo que a su vez hace que se abran más canales de Na^+ . En consecuencia, el potencial de membrana llega a valores positivos al final de la fase 0 (+30 mV). Muy rápidamente, en menos de 2 milisegundos, los canales de Na^+ se cierran de nuevo y el potencial deja de subir.

Repolarización: Este mecanismo consta, a su vez, de distintas fases:

Fase 1: La subida del potencial de la membrana provoca un aumento transitorio de la permeabilidad al K^+ . Como consecuencia, el K^+ es empujado por su gradiente electroquímico hacia el exterior de la célula, provocando una pequeña repolarización rápida que dura unos pocos milisegundos. Esta repolarización es producida por la corriente transitoria de salida de K^+ “transient outward” (I_{to}). La I_{to} va a ser la encargada de determinar la amplitud y la duración de la siguiente fase, por lo que será, en gran medida, la responsable de regular la duración y la potencia de la contracción cardiaca.

Fase 2 (meseta): Este periodo de despolarización más o menos mantenido, prolonga la duración del potencial de acción hasta 200 ó 300 milisegundos. Son varios los mecanismos que participan en esta fase. Por un lado, la activación de una corriente de entrada de Ca^{2+} ($I_{\text{Ca-L}}$) debido a la apertura de canales selectivos para este ión, el cual entra al interior de la célula a favor de su gradiente electroquímico. Esta corriente, asegura una adecuada entrada de Ca^{2+} a la célula para el acoplamiento excitación-contracción. Por otro, aunque en menor medida, se activan también otros canales de Na^+ y participan en esa entrada de cargas positivas al interior de la célula. El lento movimiento de entrada de estos iones por si solo volvería a despolarizar la célula, pero es contrarrestado por un movimiento de K^+ hacia el exterior. Una parte de la salida de K^+ es producida por la I_{to} , que al inicio de la fase de meseta todavía está activa. Sin embargo, la mayor parte de la corriente de salida de K^+ que contrarresta la entrada de Ca^{2+} durante la meseta es debida a la activación de otros canales de K^+ . Unos presentan una activación rápida y son responsables de la corriente ultrarrápida de potasio (I_{Kur}), otros la tienen lenta y son responsables de la corriente rectificadora tardía lenta de potasio (I_{Ks}), y otros en cambio presentan una conductividad muy

pequeña a potenciales altos y generan la corriente rectificadora tardía rápida de potasio (I_{Kr}). Esta permeabilidad al K^+ es pequeña al comienzo de la fase de meseta, pero lo suficiente como para equilibrar las corrientes de entrada y mantener una meseta relativamente estable.

Fase 3: Corresponde a la repolarización rápida final del potencial de acción. Lleva el potencial de la membrana hasta su nivel de reposo, y se debe a la inactivación de la I_{Ca-L} y a la activación progresiva de la I_{Ks} , pero sobre todo de la I_{Kr} . Esta fase, marca el final de la sístole y el comienzo de la diástole.

Fase 4: Corresponde al periodo durante el cual la célula se encuentra en su potencial de reposo y depende fundamentalmente de la corriente de potasio rectificadora anómala (I_{K1}). Durante esta fase, las bombas de Na^+/K^+ y de Na^+/Ca^{2+} se encargan de devolver las concentraciones de los distintos iones a sus valores intra- y extracelulares anteriores al potencial de acción.

La membrana de las células musculares se caracteriza por la presencia de numerosas y profundas invaginaciones: los túbulos T. A través de ellos, el potencial de acción que despolariza la membrana alcanza rápidamente la profundidad de la fibra facilitando así la propagación del estímulo.

1.2.1.1.1 Variabilidad Regional

El estímulo se propaga con un orden a través del tejido lo que hace que exista una gran variabilidad en la forma, amplitud y duración del potencial de acción entre unas regiones y otras del corazón [Hume & Uehara, 1985]. Así, los potenciales de acción en el músculo auricular, ventricular y tejido de conducción son algo diferentes entre sí y a su vez muy distintos a los de las células marcapasos [figura 11]. Este hecho se debe a las diferencias en la expresión y/o a las propiedades de los canales iónicos que toman parte en el potencial de acción. Las células del nódulo sino-auricular y auriculoventricular tienen un potencial de reposo de -60 mV, un ascenso lento de la fase 0 y carecen prácticamente de meseta. Los miocitos auriculares y ventriculares tienen un potencial de reposo de -90 mV; el potencial de acción de las células auriculares tiene forma triangular, mientras que las ventriculares tienen una clara meseta. Las fibras de Purkinje tienen un potencial de reposo máximo también próximo a -90 mV, siendo la duración del potencial de acción más largo debido a su prolongada meseta.

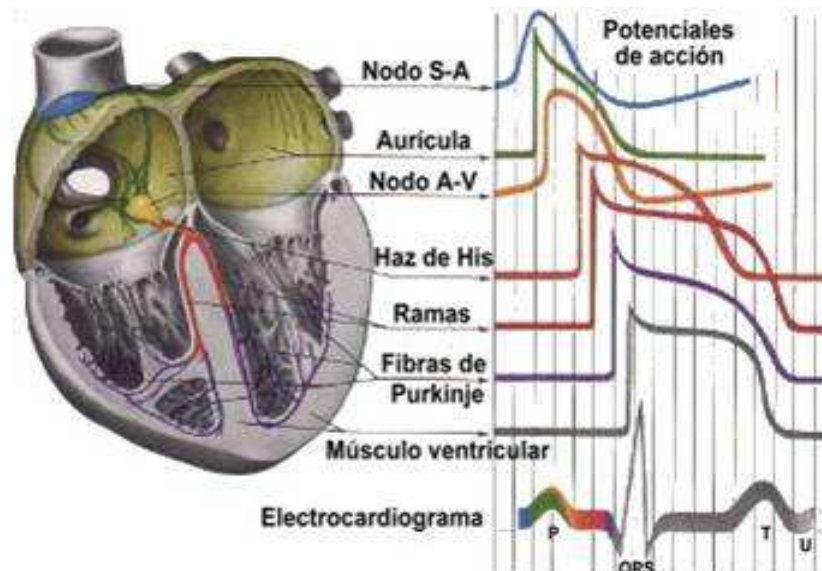


Figura 11. Variabilidad regional del potencial de acción cardíaco. El potencial de acción cardíaco es distinto en las distintas regiones del corazón permitiendo una contracción secuencial y ordenada. (Tomada de Netter, 1983).

Una de las causas que originan la variabilidad regional del potencial de acción es que la distribución de los canales en las distintas regiones cardíacas no es homogénea. Hay canales que tienen una amplia distribución en una zona, pero están prácticamente ausentes en otra. Como consecuencia de esto, una corriente puede ser muy grande en una región y muy pequeña en otra condicionando así la duración del potencial de acción. Hay estudios que sugieren que pequeños cambios en las propiedades dependientes de tiempo o voltaje de los canales iónicos cardíacos pueden tener profundos efectos en la duración del potencial de acción así como en el periodo refractario y en el ritmo [Clancy *et al.*, 2002; Delmar, 1992; Luo & Rudy, 1994a; Luo & Rudy, 1994b].

Las diferencias en la duración de los potenciales de acción se deben sobre todo a la velocidad de repolarización. Esto indica que los mecanismos responsables de la forma del potencial de acción están mediados por corrientes repolarizantes [Watanabe *et al.*, 1983; Clark *et al.*, 1993; Casis *et al.*, 1998]. De esta manera, el potencial de acción es más corto en el ventrículo derecho que en el izquierdo. Dentro de este último, el potencial de acción es más largo en la base que en la punta y en el endocardio más que en el epicardio [Watanabe *et al.*, 1983; Clark *et al.*, 1993; Casis *et al.*, 1998].

En los ventrículos, el estímulo eléctrico viaja por el tabique despolarizando en primer lugar el endocardio de la punta. De ahí, la despolarización se transmite al epicardio y va subiendo rápidamente hacia la base. En consecuencia, la contracción viaja desde la punta hacia la base y desde la parte interior del ventrículo hacia la parte exterior. Esta

variabilidad regional permite una contracción ventricular secuencial y ordenada. La relajación por su parte, también va de punta a base ya que en la punta el potencial de acción es más corto y se repolariza antes. Además, el epicardio se repolariza y relaja antes que el endocardio debido a que el potencial de acción epicárdico es más corto. Esta relajación secuencial realizada de punta a base hace que aumente la presión negativa en el interior del ventrículo y de esta forma se facilita el llenado.

Por otro lado, la variabilidad regional proporciona un mecanismo antiarrítmico. El endocardio es la zona que antes se despolariza, pero como tiene un potencial de acción más largo, es también la que más tarde se repolariza debido a los largos periodos refractarios manteniendo una conducción armoniosa. Estos periodos permiten evitar las reentradas de un impulso que ha seguido un largo trayecto en una región que acaba de ser activada por un camino más corto. Estos fenómenos, que a veces se observan en patologías, desorganizan la actividad cardiaca y provocan trastornos del ritmo.

1.2.1.2 Receptores adrenérgicos en el corazón

Los receptores adrenérgicos (AR) pertenecen a la extensa familia de receptores acoplados a proteínas G, los cuales son activados por la adrenalina y noradrenalina. Estos neurotransmisores juegan papeles importantes regulando multitud de procesos en el organismo, entre ellos la actividad del corazón.

Estos receptores están formados por una única cadena polipeptídica que contiene siete segmentos transmembrana, un amino-terminal extracelular y un carboxilo-terminal intracelular [figura 12]. La región con la que el receptor interacciona con las proteínas G es el bucle intracelular que une el quinto y sexto segmentos transmembrana.

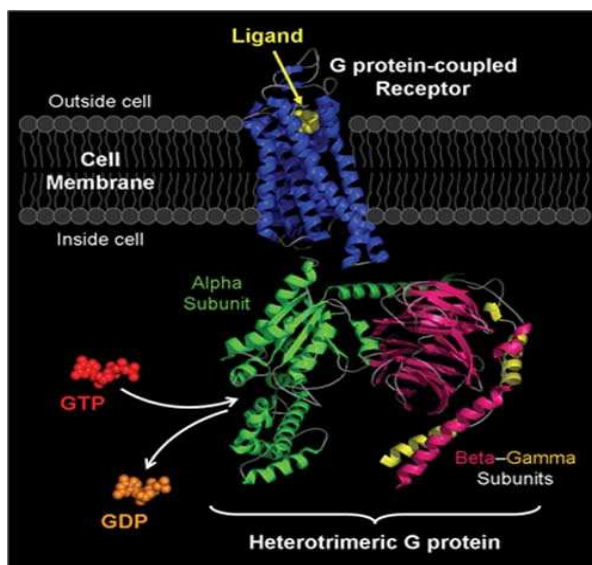


Figura 12. Esquema de un receptor adrenérgico acoplado a proteína G. El receptor presenta siete segmentos transmembrana con el amino-terminal extracelular y el carboxilo-terminal intracelular. Al receptor aparece acoplado una proteína G formada por tres subunidades: subunidad α , subunidad β y subunidad γ . (Tomada de Snyder, 2005).

Los receptores adrenérgicos se dividen en dos grandes grupos: los receptores α -adrenérgicos (α -AR) y los β -adrenérgicos (β -AR). Los receptores α -AR se dividen a su vez en dos subtipos: α_1 y α_2 . Actualmente se sabe que en el tejido cardíaco los receptores α pertenecen exclusivamente al tipo α_1 . Dentro de los receptores α_1 -AR podemos encontrar al menos tres subtipos: α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} .

En el corazón se expresan todos los subtipos de receptores α_1 , aunque el subtipo α_{1A} es el que predomina en humanos [Bylund *et al.*, 1994; Price *et al.*, 1994]. Clásicamente, los receptores α_1 están acoplados a proteínas G_{α_q} y su activación estimula la fosfolipasa C. Este enzima hidroliza Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) generando por un lado Inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) que moviliza Ca^{2+} de los almacenes intracelulares, y Diacilglicerol (DAG) que estimula PKC. Esta quinasa regula la actividad de numerosas proteínas celulares entre las que se encuentran canales iónicos de calcio y potasio [Singer-Lahat *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1997]. Además, los receptores α_{1A} -AR pueden activar otras vías de señalización dando lugar por ejemplo a la liberación de ácido araquidónico, activación de la fosfolipasa D, respuestas mitogénicas o aumento en la entrada de Ca^{2+} al interior celular [Zhong & Minneman, 1999]. También, se ha demostrado que estos receptores activan las proteínas G_s en corazón [Gallego *et al.*, 2005].

Por lo que respecta a los receptores β -AR, éstos han sido ampliamente estudiados tanto en condiciones fisiológicas como patológicas debido a su importante papel en la contracción cardíaca. Hay tres subtipos de receptores β (β_1 , β_2 y β_3) todos ellos

presentes en el corazón humano [Bylund *et al.*, 1998]. La respuesta clásica a la activación de los receptores β es la interacción con la proteína G_{α_s} , lo que produce un aumento de los niveles de cAMP y la activación de la PKA, enzima que fosforila el canal de Ca^{2+} tipo L, entre otros, favoreciendo la entrada de Ca^{2+} a la célula. También fosforila proteínas contráctiles entre otras dianas.

El receptor β_1 es el receptor predominante en el corazón y produce efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos. El receptor β_2 es un receptor polimórfico y es el receptor adrenérgico predominante en músculo liso que causa relajación de la musculatura lisa visceral. El receptor β_3 es el receptor adrenérgico que predominantemente causa efectos metabólicos, por lo que sus acciones específicas incluyen, por ejemplo, la estimulación de la lipólisis del tejido adiposo.

1.2.1.2.1 Regulación adrenérgica del potencial de acción cardíaco

El sistema nervioso autónomo lleva a cabo la regulación de las actividades del músculo cardíaco. El corazón recibe inervaciones tanto del sistema nervioso simpático como del parasimpático. Estas fibras no provocan la contracción del corazón como ocurre en el músculo esquelético, sino que modifican la frecuencia y la fuerza de contracción cardíaca aumentando o disminuyendo la actividad intrínseca del corazón. El efecto del nervio vago está mediado por el neurotransmisor acetilcolina, mientras que el efecto del simpático lo está por la adrenalina y la noradrenalina. Como este estudio está enfocado a la regulación del canal hERG por el receptor α_1 -AR, nos centraremos en la estimulación simpática.

Las fibras simpáticas que inervan el corazón surgen de los segmentos cuarto y quinto de la médula torácica y alcanzan el miocardio a través de los ganglios paravertebrales cervical inferior y primer torácico. Las terminaciones postganglionales se distribuyen a lo largo y ancho del corazón [Hoffman & Leftkowitz, 1982]. El efecto de la actividad simpática en las células se conoce menos que el del sistema parasimpático.

Tanto los receptores β -AR como los receptores α -AR son estimulados por la adrenalina y la noradrenalina. Mientras que los receptores β -AR se saturan con una estimulación simpática media, la activación de los receptores α -AR se da por una hiperactivación simpática, como el estrés físico o emocional.

Uno de los principales efectos de la estimulación simpática del corazón es el inotropismo positivo, es decir, el aumento en la fuerza de contracción cardíaca. Este efecto se ha atribuido clásicamente a la estimulación de los receptores β -AR, que

Introducción

produce un aumento de la I_{Ca-L} , el cual tiene como consecuencia un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} que estimula la contracción muscular.

Sin embargo, la noradrenalina también aumenta la fuerza de contracción a través de sus receptores α -AR mediante varios mecanismos como por ejemplo un aumento en la sensibilidad al Ca^{2+} de las miofibrillas [Blinks & Endoh, 1986; Endoh & Blinks, 1988], fosforilación de proteínas contráctiles [Garvey *et al.*, 1988] o un aumento de la I_{Ca-L} [Miura *et al.*, 1978; Zhang *et al.*, 1998; Liu & Kennedy, 1998]. Otros estudios señalan a las corrientes de K^+ como las principales responsables de los cambios en la fuerza de contracción. Se ha encontrado una correlación directa entre el efecto inotrópico positivo y la prolongación del potencial de acción debida a la reducción de las corrientes de K^+ [Apkon & Nerbonne, 1988; Fedida *et al.*, 1989; Fedida *et al.*, 1990].

Por otro lado, el sistema nervioso simpático afecta también a la frecuencia cardiaca innervando el nodo sinoauricular (efecto conotrópico positivo). Una estimulación simpática intensa puede aumentar la frecuencia cardiaca hasta 200 ó 250 latidos/minuto en individuos jóvenes.

Respecto al potencial de acción cardiaco, el sistema nervioso simpático regula todas las fases de la repolarización. Así, la noradrenalina regula la fase 1 del potencial de acción actuando de varias maneras sobre la I_{to} . Por un lado, la estimulación de los receptores α -AR disminuye la corriente, ya que activa la proteína G_{α_s} , la cual activa a su vez adenilato ciclasa provocando la fosforilación del canal I_{to} mediante la proteína quinasa A (PKA) [Gallego *et al.*, 2005]. Esta fosforilación del canal reduce la fase 1 permitiendo una mayor entrada de Ca^{2+} a la célula durante la posterior fase de meseta, aumentando así la fuerza de la contracción [Volk *et al.*, 1995]. Para que este efecto se produzca, tras la fosforilación del canal es necesaria la formación de un complejo supramolecular del canal con una subunidad accesoria de la familia de las KChIPs (K⁺ Channel Interacting Proteins) [Schrader *et al.*, 2002]. Por otro lado, la estimulación de los receptores β -AR aumenta la expresión de la I_{to} , siendo necesaria una estimulación basal mantenida de los receptores β -AR para mantener la amplitud de la corriente en sus niveles correctos [Gallego *et al.*, 2000].

El sistema nervioso simpático también regula la fase 2 del potencial de acción, actuando tanto sobre las corrientes de K^+ como sobre la de Ca^{2+} . En este sentido la estimulación de los receptores β -AR activa la cascada de la proteína G_s -cAMP, provocando la fosforilación del canal I_{Ca-L} por PKA, lo que aumenta la magnitud de la I_{Ca-L} y por tanto la fuerza de contracción [Speralakis, 1994]. Se está llegando a conocer cómo estos componentes se asocian de distinta manera en distintos microdominios de la

membrana del cardiomiocito, en un proceso en el que intervienen las A Kinase Anchoring Proteins (AKAPs) [Balijepalli *et al.*, 2006].

Las corrientes I_{Ks} e I_{Kr} participan tanto en la fase 2 como en la fase 3 del potencial de acción, y ambas están reguladas por el sistema nervioso simpático. La magnitud de la I_{Ks} , formada por el canal KCNQ1 junto con la proteína accesoria Mink [Sanguinetti *et al.*, 1996; Barhanin *et al.*, 1996], aumenta tras la estimulación de los β -AR, por un mecanismo mediado por el acoplamiento del receptor a una proteína G_s , aumento del cAMP y fosforilación del canal por la PKA. En esta cascada intracelular el receptor, el canal, la PKA y la proteína fosfatasa 1 (PP1) se encuentran asociadas formando un complejo supramolecular gracias a la proteína de anclaje Yotiao [Marx *et al.*, 2002; Kass *et al.*, 2003].

1.2.1.2.2 Regulación adrenérgica de la I_{Kr} /hERG

Aunque la I_{Kr} es la principal corriente repolarizante en el ventrículo humano, su regulación es la que menos se conoce. Existen trabajos dispersos sobre mecanismos puntuales de regulación del canal, pero no existe una idea clara sobre los mecanismos generales de regulación de esta corriente. La regulación simpática de esta corriente es compleja, ya que por un lado la estimulación de los receptores β -AR aumenta la amplitud de la corriente, mientras que por otro lado los receptores α -AR la inhiben.

Se ha descrito que la corriente es reducida por hormonas como la TRH a través de un mecanismo que implica a PKC pudiendo ser por una fosforilación directa del canal [Barros *et al.*, 1997; Barros *et al.*, 1998], pero esto último no está demostrado. La I_{Kr} es reducida también por fosforilación del canal por la tirosina quinasa Src, pero los autores no explican que proteína activa a esta quinasa [Cayabyab & Schlichter, 2002].

La estimulación de los receptores β -AR regula el canal hERG por fosforilación del canal por PKA, conjuntamente con la interacción directa del cAMP con el dominio cNDB [Thomas *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2000]. Además, hay estudios en los que demuestran una interacción de la proteína 14-3-3 con el canal hERG dependiente de la fosforilación por PKA, ya que cuando ésta se inhibe dicha interacción no ocurre [Kagan *et al.*, 2002; Tutor *et al.*, 2006]. Sin embargo, no hay nada claro sobre el mecanismo de regulación del canal por los receptores α -AR.

En 1999 el grupo de Gea-Ny Tseng mencionó por primera vez una reducción de la corriente hERG por la estimulación de los α_{1A} -AR, mediado por una proteína G sin identificar [Jiang *et al.*, 1999].

En 2001, el grupo de T.V. McDonald sugirió que modificando la concentración de PIP_2 se altera la densidad de corriente de $\text{hERG}/I_{\text{Kr}}$ además de las cinéticas de gating y que la estimulación $\alpha_{1\text{A}}\text{-AR}$ afecta a la corriente hERG mediante el consumo de PIP_2 que es hidrolizado por PLC [Bian *et ál.*, 2001]. Tres años más tarde reafirmaron esta regulación, demostrando que una región del C-terminal del canal es el sitio de unión físico y funcional con PIP_2 [Bian *et ál.*, 2004].

Por otro lado, el grupo de D. Thomas y C. Karle describieron en 2002 que la reducción de la corriente tras la estimulación $\alpha_{1\text{A}}\text{-AR}$ se debe a la fosforilación del canal hERG a través de la activación de la PKA [Wei *et ál.*, 2002]. Dos años después el mismo grupo describió que el efecto $\alpha_{1\text{A}}\text{-AR}$ sobre el canal hERG depende tanto de PKA como de PKC, pero que no se debe a una fosforilación directa del canal, ya que la delección de todos los sitios consenso de fosforilación en el canal no reduce el efecto [Thomas *et ál.*, 2004b]. En contra de este resultado, el grupo de J. Mitcheson publicó unos resultados sugiriendo la fosforilación directa del canal por PKC como mecanismo de regulación del mismo en el cual interviene el C-terminal del canal [Cockerill *et ál.*, 2007]. Además, la estimulación del $\alpha_{1\text{A}}\text{-AR}$ en cardiomiocitos de cobaya provoca una inhibición de la corriente I_{Kr} mediante la activación tanto de PKC como de PKA [Wang *et ál.*, 2009]. Por último, apoyando la teoría de PKC, D. Thomas y T.V. McDonald muestran en una publicación conjunta que la estimulación prolongada del $\alpha_{1\text{A}}\text{-AR}$ con fenilefrina o la activación directa de PKC aumenta la abundancia de la proteína hERG y la densidad de corriente de una manera tiempo- y dosis-dependiente [Chen *et ál.*, 2010].

1.2.2 Canalopatías de K^+

Mutaciones hereditarias en los genes que codifican canales cardiacos o enfermedades cardiacas pueden provocar cambios en las propiedades o en la expresión funcional de los canales pudiendo cambiar la forma, sincronización, y/o propagación del potencial de acción. Esto predispone al corazón a sufrir arritmias graves.

La repolarización lenta del potencial de acción es un mecanismo útil pero imperfecto contra las arritmias ventriculares por reentrada [Sanguinetti & Tristani-Firouzi, 2006]. Como anteriormente se ha mencionado, la principal corriente responsable de la fase 3 del potencial de acción cardiaco es la I_{Kr} [Hartmann *et ál.*, 1991; Trudeau *et ál.*, 1995], por lo que cualquier alteración en su funcionamiento puede provocar arritmias ventriculares graves. La gran mayoría de las alteraciones cardiacas hereditarias arritmogénicas en las que los genes involucrados han sido identificados, han resultado ser canalopatías. Dichos

genes codifican subunidades de canales que regulan de manera muy importante las corrientes iónicas que determinan el potencial de acción cardíaco.

En células no cardíacas, el canal ERG1 contribuye mayormente en el mantenimiento del potencial de reposo [Schwarz & Bauer, 2004]. Además de en el corazón, el ERG1 también se expresa en diversos tejidos: células tumorales [Arcangeli, 2005; Bianchi *et al.*, 1998; Guasti *et al.*, 2005], miocitos del músculo liso gastro-intestinal [Farrelly *et al.*, 2003], células β pancreáticas [Rosati *et al.*, 2000], lactótrofos [Bauer *et al.*, 2003], células del cuerpo carotideo [Overholt *et al.*, 2000], en la parte interna del oído [Nie *et al.*, 2005] y en linfocitos [Smith *et al.*, 2002]. El significado clínico de la presencia de este canal en estos tejidos es incierto. Sin embargo, evidencias farmacológicas sugieren que la regulación al alza de la expresión eag/erg puede ser importante. Bloqueadores específicos de los canales pueden reducir la proliferación celular [Crociani *et al.*, 2003]. Los canales están implicados en la regulación de la migración de células tumorales [Lastraioli *et al.*, 2004] y en la señalización dependiente de la adhesión [Cherubini *et al.*, 2005; Hofmann *et al.*, 2001]. La expresión de los canales erg está alterada durante la atrofia muscular [Wang *et al.*, 2006]. Aún así, la patología asociada a mutaciones congénitas de KCNH2 parece estar limitada al corazón.

Un aumento en la función de los genes de canales de K^+ puede provocar Síndrome de intervalo QT Corto o el SQTs (Short QT Syndrome). Esta enfermedad se caracteriza por un acortamiento anormal del intervalo QT del electrocardiograma (ECG), que es el tiempo entre el inicio de la despolarización y el final de la repolarización. Debido a las mutaciones de estos genes, la repolarización de los miocitos se acelera pudiendo causar arritmias letales.

1.2.2.1 LQTS

El Síndrome de intervalo QT Largo congénito o LQTS (Long QT Syndrome) fue la primera arritmia genéticamente determinada asociada con una alteración en el funcionamiento de los canales iónicos en las células del miocardio y es también el más abundante [figura 13]. Esta enfermedad se caracteriza por una prolongación anormal del intervalo QT del ECG.

El LQTS es frecuentemente mal-diagnosticado como epilepsia y los pacientes son tratados con drogas antiepilépticas. El KCNH2 fue descubierto inicialmente en el hipocampo [Warmke *et al.*, 1994], por eso es obvio pensar que mutaciones en este gen puede causar desordenes en el Sistema Nervioso Central, pero no ha sido hasta hace poco cuando se ha descubierto la conexión entre mutaciones del canal y la epilepsia [Omichi *et al.*, 2010].

Hay 12 diferentes tipos de arritmias hereditarias las cuales incluyen el intervalo QT prolongado como síntoma clínico [tabla 1]. Los LQT1-LQT3 representan el 75% del total de los casos clínicos de LQTS.

Tabla 1. Tipos de LQTS congénito, genes y proteínas asociadas. LQT1-LQT3 representan el 75% del total de casos clínicos de LQTS. LQT9-LQT12 son extremadamente raros. **a:** este desorden arritmico no está siempre asociado a intervalos prolongados del QT. (Tomada de Sanguinetti, 2010).

Type	Human gene (alternative name)	Protein
LQT1	<i>KCNQ1 (KVLQT1)</i>	α -Subunit for slow delayed rectifier K channel
LQT2	<i>KCNH2 (HERG1)</i>	α -Subunit for rapid delayed rectifier K channel
LQT3	<i>SCN5A</i>	α -Subunit for Na channel ($\text{Na}_v1.5$)
LQT4 ^a	<i>ANK2</i>	Ankyrin-B
LQT5	<i>KCNE1</i>	β -Subunit (“MinK”) for slow delayed rectifier K channel
LQT6	<i>KCNE2</i>	β -Subunit (“MiRP1”) for several K^+ channels
LQT7 ^a	<i>KCNJ2</i>	α -Subunit for inward rectifier K channel (Kir2.1)
LQT8	<i>CACNA1C</i>	α -Subunit for L-type Ca channel
LQT9 ^a	<i>CAV3</i>	Caveolin-3
LQT10	<i>SCN4B</i>	β -Subunit for Na channel ($\text{Na}_v1.5$)
LQT11	<i>AKAP9</i>	A-Kinase anchoring protein type 9 (“Yotiao”)
LQT12	<i>SNTA1</i>	Alpha1-syntrophin

El LQT causado por mutaciones en el gen *KCNH2* que codifica para la proteína hERG, fue el segundo *loci* descrito, de ahí el nombre LQT2. Además de la prolongación del intervalo QT, el ECG de los pacientes con LQT2 muestra una onda T bífida, aunque no aparece en todos los pacientes con un genotipo LQT2 confirmado.

El síncope asociado a LQTS es causado por una taquicardia ventricular específica llamada “*torsade de pointes*” (torsión de puntas) que se distingue por la torsión sinusoidal del axis QRS alrededor de la línea isoeléctrica del trazado del ECG [figura 13]. Este tipo de taquicardia puede cesar espontáneamente o bien degenerar en una fibrilación ventricular, alta actividad desorganizada, que constituye una amenaza para la vida y que es la mayor causa de muerte súbita [Vega Hernández & Félix, 2001; Sanguinetti, 2010].

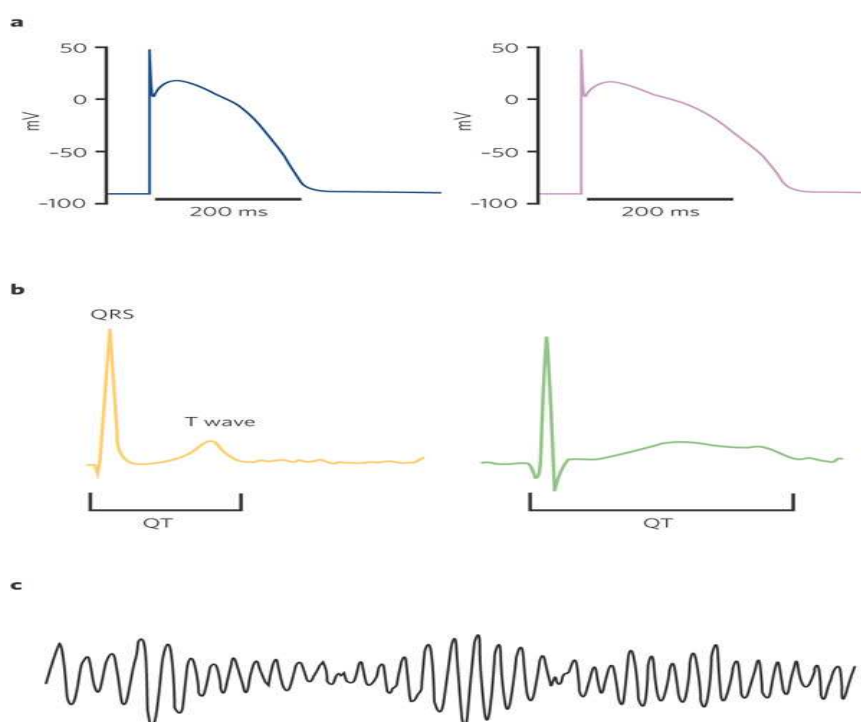


Figura 13. Potencial de acción y electrocardiograma. **A** Potencial de acción ventricular normal (izquierda) y con una fase 3 anormalmente larga (derecha). **B** Registro de la actividad ventricular en un electrocardiograma normal (izquierda) y de un paciente con LQTS (derecha). **C** Electrocardiograma de un paciente con *torsade de pointes*. (Tomada de Sanguinetti & Tristani-Firouzi, 2006).

La incidencia de el síndrome QT largo congénito no está definida con precisión pero se estima que 1 de cada 2500 personas en el mundo está afectada [Tester & Ackerman, 2009]. El LQTS congénito es a menudo causado por mutaciones dominantes en los genes *KCNH2* o *KCNQ1*, aunque el corazón es estructuralmente normal [Curran *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996; Splawski *et al.*, 1997].

Las mutaciones homocigotas en *KCNH2* son muy raras y resultan en muerte intrauterina del feto o en un nacimiento con vida pero con una severa prolongación del intervalo QT, por eso las mutaciones heterocigotas son las más comunes en el LQTS. Aunque casi todas las mutaciones causan defectos en el tráfico, hay mutaciones que reducen la I_{Kr} alterando las propiedades de gating del canal hERG. Las mutaciones que aumentan la inactivación o aceleran la deactivación reducen la contribución de la corriente I_{Kr} durante la repolarización del potencial de acción [Sanguinetti, 2010]. La consecuencia funcional primaria de estas mutaciones es un retraso en la repolarización del corazón y un incremento en el riesgo a desarrollar arritmias cardíacas [Hoshi *et al.*, 1990].

Existe además una forma no congénita del LQTS, el LQTS adquirido, que en la práctica clínica es mucho más abundante que la congénita. El LQTS adquirido está asociado

tanto a una insuficiencia cardiaca crónica como a un efecto secundario de fármacos que bloquean el canal hERG [Mitcheson *et al.*, 2000] o que interfieren en el tráfico del canal desde el retículo endoplasmático hasta la superficie celular [Fenichel *et al.*, 2004]. Este canal es excepcionalmente susceptible al bloqueo por infinidad de sustancias que no afectan a otros canales. Esa susceptibilidad se debe a dos aminoácidos aromáticos, Tyr652 y Phe656, en la parte interna del poro [Recanatini *et al.*, 2005; Sanguinetti & Mitcheson, 2005]. Por ello, la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Médicos, obliga a estudiar el efecto sobre el intervalo QT de todos los fármacos, incluidos los no cardiovasculares, y la FDA americana obliga a estudiar directamente el posible bloqueo del canal hERG por cada nuevo fármaco que se pretenda enviar al mercado. Las consecuencias de la prolongación del intervalo QT inducida por las drogas, puede ser seria y parecerse mucho a LQT2 con *torsade de pointes*, fibrilación ventricular o muerte súbita [Sanguinetti & Tristani-Firouzi, 2006].

El desencadenante más común de la arritmia en los pacientes con LQT2 parece ser el estrés emocional, aunque también es un desencadenante típico el ruido alto e inesperado [Wilde *et al.*, 1999]. La mayoría de pacientes sintomáticos con LQT2 que sufren eventos cardiacos letales y no letales están asociados a un incremento del tono simpático [Schwartz *et al.*, 2001; Lown, 1987; Kamarck & Jennings, 1991; Priori *et al.*, 1997], lo que indica una relación clara entre el sistema nervioso simpático y la aparición de estas arritmias. Por ello, resulta imprescindible conocer no solo el funcionamiento del canal hERG, sino sus mecanismos de regulación neurohumoral.

El tratamiento para el LQT2 es el mismo que para los otros tipos de LQTS. La terapia más común es la administración de bloqueantes de receptores β -AR. Recientemente se han descubierto activadores de hERG, pero todavía no se ha probado ni la eficacia y ni la seguridad de ninguno de los componentes [Casis *et al.*, 2006]. A los pacientes con alto riesgo a menudo se les interviene para la denervación de los nervios simpáticos de la parte izquierda del corazón y/o la implantación un desfibrilador. Esta denervación reduce un 90% de los eventos cardiacos [Schawartz *et al.*, 2004].

Debido a la importancia que tiene la corriente I_{Kr} /hERG en el potencial de acción cardiaco, se planteó este trabajo con el fin de conocer el mecanismo de la regulación α_{1A} -adrenérgica de esta corriente ya que una hiperactivación de los receptores α_{1A} -AR disminuiría la corriente I_{Kr} /hERG prolongando demasiado el potencial de acción. Este excesivo alargamiento puede desacoplar el periodo refractario de las células pudiendo desencadenar arritmias ventriculares por reentrada.

2. Objetivos

2 OBJETIVOS DEL ESTUDIO

La corriente de potasio rectificadora tardía rápida es la responsable de la terminación del potencial de acción ventricular en el corazón humano. La reducción de la magnitud de esta corriente provoca un alargamiento en la duración del potencial de acción, que si es moderada provoca un aumento en la contracción cardiaca. La estimulación simpática provoca dicha reducción de la corriente a través de la activación de los receptores α_1 -adrenérgicos, aumentando así la fuerza de la contracción. Sin embargo, una actividad simpática muy alta, como en situaciones de estrés físico o emocional, o una actividad simpática normal en personas que presenten previamente LQTS o isquemia miocárdica, puede inhibir la corriente alargando excesivamente la duración del potencial de acción hasta el punto de desencadenar arritmias ventriculares, como *torsade de pointes* pudiendo degenerar en fibrilación ventricular letal. Por ello, es muy importante conocer los mecanismos de regulación α_1 -adrenérgica de la corriente, para posteriormente poder buscar el mejor modo de controlar las posibles alteraciones causadas por esta regulación.

Por todo lo expuesto, la hipótesis de partida es que la corriente hERG está regulada por el receptor α_{1A} -adrenérgico mediante el consumo de PIP_2 y/o por fosforilación por PKC.

El propósito de la presente tesis doctoral se resume en los siguientes objetivos:

- I. Caracterizar el efecto de la estimulación del receptor α_{1A} -adrenérgico sobre la corriente hERG en un sistema heterólogo.
- II. Comprobar si el efecto de la estimulación del receptor α_{1A} -adrenérgico sobre la corriente hERG se ve modulada por las proteínas Mink y MiRP1 en un sistema heterólogo.
- III. Identificar la vía intracelular de regulación de la corriente hERG por el receptor α_{1A} -adrenérgico en un sistema heterólogo.

3. Material y Métodos

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Cultivos celulares

Para llevar a cabo el presente estudio, se ha utilizado un sistema heterólogo. El sistema utilizado fue la línea celular HEK-293, células inmortalizadas obtenidas a partir de células embrionarias de riñón humano. Esta línea celular ha sido y es ampliamente utilizada en el estudio de la expresión heteróloga de canales iónicos ya que apenas expresan de forma endógena dichos canales. Además de utilizar esta línea, se ha utilizado otra línea que expresa de forma estable el canal hERG [cedida amablemente por el Dr. January (Department of Medicine, University of Wisconsin-Madison, Madison WI, USA)] a la cual se le hacía expresar de forma transitoria el receptor α_{1A} -adrenérgico.

3.1.2 Bacterias

El DNA plasmídico utilizado en las transfecciones de las células HEK-293 se reprodujo mediante bacterias *E.coli* de las cepas DH5 α y one shot Top 10 transformadas con dicho DNA mediante shock térmico.

3.1.3 Aparatos y reactivos

3.1.3.1 Equipamiento general

Para la preparación de los experimentos se han utilizado diversos aparatos de uso común en cualquier laboratorio de investigación básica:

- Micropipetas de precisión de volumen variable: 0,5-10, 10-100, 20-200 y 100-1000 μ l. Nichipet
- Equipo de ultrapurificación de agua Synergy. Millipore

Material y Métodos

- Balanza de precisión AB204. Mettler Toledo
- Pipetas de volumen variable: 1, 2, 5, 10 y 20 ml. Silber Brand
- pHmetro BasicC. Crison
- Equipo de tratamiento de agua Elix. Millipore
- Dispensador automático 0,5-10 ml Mulipette plus. *Eppendorf*
- Vortex Reax Top *Heidolph*

3.1.3.2 Mantenimiento y transfección de los cultivos celulares HEK-293

Para el mantenimiento y manipulación de las células se han utilizado los siguientes materiales y aparatos:

- Frascos Corning, 25 cm²
- Baño termostatzado
- Microscopio invertido de epifluorescencia DMIL. Leica
- Placas de cultivo Sarstedt, 60 x 15 mm
- Incubador de CO₂. Sanyo
- Cabina de seguridad biológica. Faster BH-EN 2004

3.1.3.3 Crecimiento de bacterias y cuantificación de DNA

Para el crecimiento de las bacterias y la posterior extracción de DNA los aparatos y materiales que se han utilizado son los siguientes:

- Estufa Selecta
- Baño termostatzado
- Bomba de vacío
- Campana de seguridad biológica Faster BH-EN 2004
- Espectrofotómetro WPA 1101 Biotech Photometer
- Centrífuga Sprectafuge 24D Labnet
- QIAprep Spin Miniprep Kit. Qiagen
- Placas de cultivo 100 x 20 mm. Falcon
- Incubador Heidolph Unimax 1010. Heidolph Inkubator 1000
- Centrífuga refrigerada de alta velocidad 2-16 pk. Sigma

3.1.3.4 Detección de proteínas

3.1.3.4.1 Enriquecimiento de la membrana plasmática

Para el enriquecimiento las membranas plasmáticas se han utilizado los siguientes materiales y aparatos:

- Homogeneizador Tenbroeck. Wheaton Science Products
- Centrífuga refrigerada de alta velocidad 2-16 pk. Sigma

3.1.3.4.2 Cuantificación de proteínas

Para llevar a cabo la cuantificación de proteínas se ha utilizado el espectrofotómetro WPA 1101 Biotech Photometer y el reactivo de Bradford.

3.1.3.4.3 Electroforesis y Western blot

Para la técnica de Western blot se han utilizado los siguientes aparatos y reactivos:

- Agitador Agimatic N. Selecta
- Agitador ARF. Velp
- Agitador magnético ARE VELD Scientifica
- Cubeta de transferencia líquida Mini protean. Biorad
- Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell. BioRad
- Fuente de alimentación PowerPac 300. BioRad
- Plataforma agitadora Duomax 1030. Heidolph
- Mini protean Tetra Cell. BioRad
- Sistema de adquisición de imágenes Gelogic 2200. Kodak
- Reactivos de quimioluminiscencia Super Signal West pico. Thermo

3.1.3.5 Registros electrofisiológicos

Los registros electrofisiológicos se realizaron en un equipo compuesto por los elementos que se detallan a continuación:

- Micromanipulador piezoeléctrico Burleigh PZ-305, con 70 μm de movimiento en cada uno de los tres ejes
- Microscopio invertido de epifluorescencia DMIL con contraste de fases. Leica
- Interfase analógico/digital DigiData 1440. Axon Instruments Inc
- Sistema de perfusión
- Ordenador Pentium
- Software de adquisición Clampex 10.2. Axon Instrument Inc
- Vidrio de borosilicato 1,10 mm de diámetro interno y de 1,5 mm de diámetro externo. Sutter Instrument
- Macromanipulador mecánico de posicionamiento Newport 360-90, con 5 cm de movimiento en cada uno de los tres ejes
- Amplificador de señales/generador de estímulos Axopatch 200B. Axon Instruments Inc
- Estirador de micropipetas PP-830. Narishige
- Bomba de vacío
- Mesa antivibratoria TMC
- Software de análisis Clampfit 10.2. Axon Instrument Inc

3.1.4 Soluciones

3.1.4.1 Agua

Para preparar todas las disoluciones empleadas en la presente Tesis Doctoral se utilizó agua ultrapura del Tipo I desionizada.

3.1.4.2 Soluciones para la transformación y el crecimiento de las bacterias

Para la transformación y el crecimiento de las bacterias se utilizó el medio SOC además de medio LB Agar y LB Broth.

Medio LB Agar: Disolver 3,5% LB Agar en agua destilada. Hervir el medio y filtrar. Antes de que el medio se solidifique se añade 1 $\mu\text{l/ml}$ de antibiótico según el gen de

resistencia del plásmido. Repartir 25 ml de medio en cada placa de petri de 100 x 20 mm.

Medio LB Broth: Disolver 20% LB Broth en agua destilada. Hervir el medio y filtrar. Se añade 1 µl/ml de antibiótico según el gen de resistencia del plásmido.

Además de estos medios, también se utiliza una solución de agua al 75% de glicerol para la conservación de las bacterias transformadas a -80 °C.

3.1.4.3 Soluciones para el mantenimiento de células HEK-293

Para el mantenimiento de las células HEK-293 se usó el medio de cultivo DMEM (Dubelcco's modified Eagle's medium) con un suplemento del 10% de suero fetal bovino y 1% de cóctel de penicilina, estreptomicina y anfotericina B.

3.1.4.4 Soluciones para la transfección celular

Para este proceso se han utilizado DMEM, suero fetal bovino, Lipofectamine 2000 (Invitrogen) o Fugene 6 (Roche) y cDNA.

3.1.4.5 Soluciones para la técnica de detección de proteínas

Tampón de homogeneización: TRIS-HCl 20 mM pH 7,4; EDTA 1 mM; cóctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich) 2,5 µl/ml y cóctel inhibidor de fosfatasa (Sigma-Aldrich) al 1%. Los inhibidores de proteasas y fosfatasa deben ser añadidos justo antes de su uso.

Reactivo de Bradford: 0,12 mM de Azul brillante de Coomassie en 5% de etanol al 95% y 10% de ácido ortofosfórico. Volumen ajustado con agua desionizada. Filtrar 3 veces.

Tampón de muestra: 60 mM Tris-HCl, pH 6,8; 3% SDS; 10% glicerol; 0,003% azul de bromofenol y 1% β-mercaptoetanol. Ajustar el volumen con agua desionizada.

Tampón de electroforesis: 50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 384 mM glicina y 0,1% SDS. Volumen ajustado con agua desionizada.

Tampón de transferencia: 25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM glicina; 20% metanol y 0,05% SDS. Ajustar el volumen con agua desionizada.

Gel separador (7%): 24,6% de acrilamida/bisacrilamida 30%; 26,52% de Tris-HCl

1,5M, pH 8,8; 1,06% de SDS 10%; 0,53% de persulfato amónico 10%; 0,1% de TEMED y 47,25% agua desionizada.

Gel concentrador (5%): 16,6% de acrilamida/bisacrilamida 30%; 25% de Tris-HCl 0,5M, pH 6,8; 1% de SDS 10%; 1% de persulfato amónico 10%; 0,25% de TEMED y 56% agua desionizada.

Solución stock PBS 5x: 0,4 M Na_2HPO_4 , 0,11 M NaH_2PO_4 y 0,50 M NaCl. Ajustar el pH con NaOH a 7,5 y llevar a volumen deseado con agua desionizada.

Solución PBS-TWEEN 20: 20% PBS 5x y 0,1% TWEEN 20. Ajustar el volumen con agua desionizada.

Solución bloqueo: 5% de leche en polvo, 0,5% BSA y 0,1% TWEEN 20. Ajustar el volumen con PBS-TWEEN 20.

Soluciones de revelado: el revelado se realizó mediante la incubación de las membranas con la mezcla de las siguientes soluciones:

Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution (1 ml).

Super Signal West Pico Luminol/Enhancer Solution (1 ml).

Solución de stripping: 0,2 M Glicina (pH 2).

3.1.4.6 Soluciones para la técnica de registro electrofisiológico

Para registrar corrientes iónicas se han empleado disoluciones de diferente composición. La disolución que llena la pipeta recibe el nombre de “disolución interna”, y la que baña las células mientras se realizan los registros electrofisiológicos se denomina “disolución externa”.

Solución interna: la composición iónica de esta solución reproduce el medio celular citoplasmático. Está compuesto por las siguientes sustancias: 125 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM EGTA- K^+ , 10 mM HEPES- K^+ y 5 mM ATP; pH 7,2 ajustado con KOH. Ajustar el volumen con agua desionizada, alicuotar y congelar a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

La mayor parte los compuestos bloqueantes utilizados en este trabajo fueron añadidos a la solución interna.

3.1.6 Anticuerpos

3.1.6.1 Anticuerpos primarios

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:

Anticuerpo	Casa comercial	Concentración
anti-hERG	Santa Cruz Biotechnology	1/200
anti- α_1 -AR	Oncogene research products	1/400
anti-P-Serina	Sigma-Aldrich	1/500
anti-P-Tirosina	Cell Signaling Technology	1/2000
anti-P-Treonina	Cell Signaling Technology	1/1000
anti-MinK	Santa Cruz Biotechnology	1/100
anti-MiRP1	Abnova	1/200

Estos anticuerpos fueron diluidos en la solución de bloqueo.

3.1.6.2 Anticuerpos secundarios

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes:

Anticuerpo	Casa comercial	Concentración
anti-conejo	Amersham Biosciences	1/5000
anti-ratón	Sigma-Aldrich	1/3300
anti-cabra	Santa Cruz Biotechnology	1/5000

Estos anticuerpos fueron diluidos en la solución de bloqueo.

3.1.7 Bloqueantes y agonistas específicos

Para el estudio de la regulación del canal hERG por el receptor α_{1A} -AR se utilizaron distintas sustancias:

20 μ M Fenilefrina (Sigma-Aldrich). Agonista específico del receptor α_{1A} -AR. Además, a la solución se le añadió Ácido Ascórbico (Sigma-Aldrich) y se mantuvo en oscuridad para prevenir la oxidación de la fenilefrina. Se añadió a la disolución externa.

100 nM 5-Metil-Urapidil (Sigma-Aldrich). Antagonista selectivo para el receptor α_{1A} -AR. Se añadió a la disolución externa.

50 μ M Genisteina (Sigma-Aldrich). Inhibidor de tirosina quinasas. Se añadió a la disolución interna.

50 μ M GP antagonista 2A (Calbiochem). Peptido que inhibe selectivamente la activación de la proteína G_q . Se añadió a la disolución interna.

1 mM Neomicina (Sigma-Aldrich). Inhibidor de PLC. Se añadió a la disolución interna.

10 μ M Bisindolilmaleimida 1 (BIM-1) (Calbiochem). Inhibidor de las isoformas α , β_1 , β_{II} , γ , δ y ϵ de PKC. Actúa sobre el sitio de unión de ATP. Se añadió a la disolución interna.

80nM Anti-PIP₂ (Santa Cruz Biotechnology). Neutraliza el PIP₂. Se añadió a la disolución interna.

10 μ M D-mio-Fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (diC8-PIP₂) (Echelon Biosciences). Este análogo no-hidrolizable de PIP₂ se utilizó para aumentar la concentración de PIP₂ en la membrana celular. Se añadió a la disolución interna.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Crecimiento de bacterias y cuantificación de DNA

3.2.1.1 Transformación de bacterias mediante shock térmico

Para transformar las bacterias *E.coli* con el DNA correspondiente se utilizó el siguiente protocolo [figura 14]:

Antes de comenzar, se deben preparar las placas de LB Agar con el antibiótico correspondiente a cada plásmido.

1. Tomar las bacterias del congelador de -80 °C.
2. Tomar 1 tubo de 12 ml por cada DNA y añadir 50 μ l de bacterias a cada tubo. Tirar las bacterias sobrantes.

3. Añadir en cada tubo 50 ng del DNA que se quiere crecer y pipetearlo justo encima de las bacterias. Colocar todos los tubos en el hielo y mantenerlos durante 30 minutos.
4. Darles un shock de calor a las bacterias. Para ello, poner los tubos 20 segundos a 37 °C en un baño previamente caliente.
5. Regresar los tubos al hielo y mantenerlos durante 5 minutos.
6. Añadir a cada tubo 500 µl de medio SOC (medio sin antibiótico). Este medio se conserva a 4 °C.
7. Poner los tubos durante 1 hora a 37 °C en agitación.
8. Verter el contenido de cada tubo en una placa con LB Agar-antibiótico y mover la placa hasta que el contenido del tubo cubra toda la superficie de la placa.
9. Poner las placas boca arriba en la incubadora a 37 °C.
10. Cuando se seca el líquido, se dan vuelta a las placas y se dejan en la incubadora toda la noche.

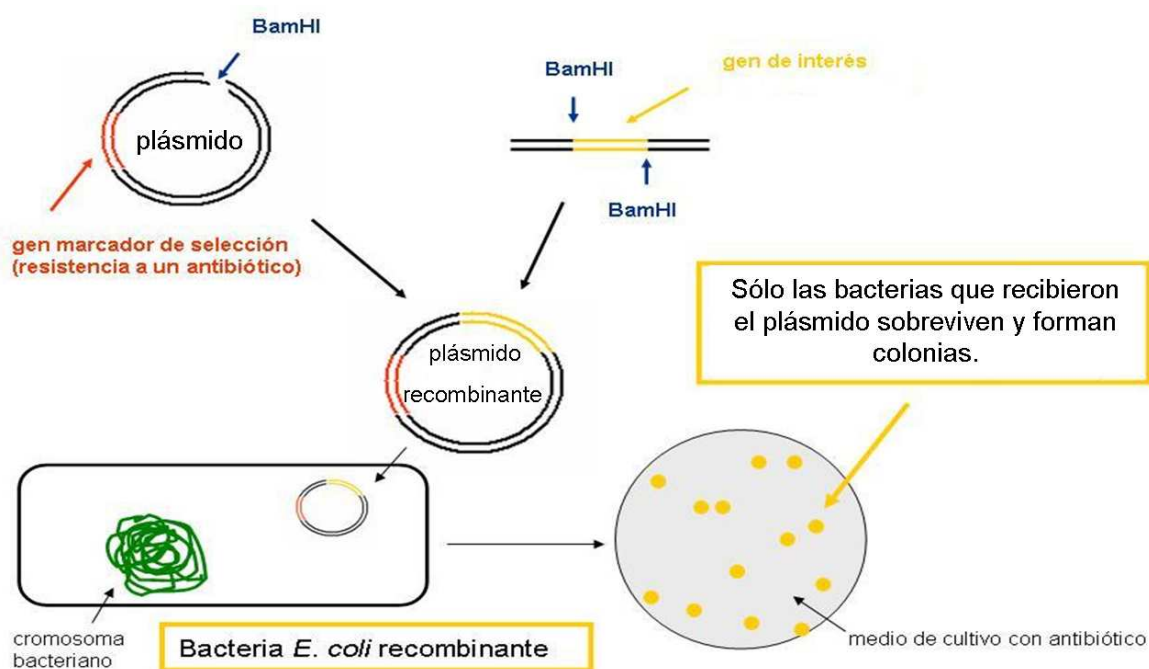


Figura 14. Esquema del método de transformación de bacterias. El gen de interés se inserta en un plásmido con un gen marcador de selección. Mediante el método de shock térmico se introduce el plásmido en las bacterias que serán incubadas en placas de agar con antibiótico. Sólo las bacterias que reciben el plásmido sobreviven y forman colonias. (Modificada de <http://www.argenbio.org>).

3.2.1.2 Crecimiento de bacterias en medio líquido

Una vez obtenidas las colonias en las placas, éstas se crecieron en medio líquido siguiendo el siguiente protocolo:

1. Añadir a tubos de 12 ml 3,5 ml de medio LB Broth con antibiótico.
2. Picar con un palito una colonia aislada de la placa en la que crecieron bacterias.
3. Introducir el palito en cada tubo de LB Broth.
4. Poner los tubos en el agitador a 37 °C hasta el día siguiente.

Con las bacterias que crecen se pueden tomar 750 µl y añadirles 750 µl de glicerol al 75% y conservarlas a -80 °C. Si es necesario crecer este DNA de nuevo, se toman 5 µl de estas bacterias ya transformadas y se comienza en el punto 3.

3.2.1.3 Purificación y cuantificación de DNA

3.2.1.3.1 Purificación de plásmidos

Una vez conseguido el crecimiento de bacterias en medio líquido, se procedió a la purificación de los plásmidos mediante el QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). El protocolo que se siguió fue el recomendado por el fabricante [figura 15]:

1. Centrifugar los tubos de 12 ml durante 5 minutos a 1100 g.
2. Conservar el precipitado y añadir 250 µl de tampón de resuspensión P1.
3. Disolver el precipitado y colocarlo en un tubo eppendorf.
4. Añadir rápido a cada tubo 250 µl de tampón de lisis P2 y mezclarlos volteándolos varias veces.
5. Añadir a cada tubo 350 µl de tampón de neutralización N3 y mezclar el contenido hasta que el color blanco sea homogéneo.
6. Centrifugar durante 10 minutos a 16000 g.
7. Por decantación, poner el sobrenadante en columnas Qiaprep colocadas previamente en las llaves de un sistema de vacío.
8. Encender la bomba de vacío para que el sobrenadante se filtre. Apagar la bomba.
9. Añadir 750 µl de tampón de lavado PE y volver a encender la bomba.
10. Una vez que el filtrado a concluido, colocar las columnas en los tubos colectores del kit y centrifugar durante 1 minuto a 16000 g para eliminar el resto de líquido que no se ha filtrado.
11. Poner la columna en tubo eppendorf de 1,5 ml y añadir 50 µl de tampón de elución EB en el centro de la columna.
12. Dejar reposar 1 minuto y centrifugar durante 1 minuto a 16000 g.
13. Recoger los 50 µl de DNA plasmídico para su posterior cuantificación.

3.2.1.3.2 Cuantificación de DNA

Para la cuantificación del DNA se diluyeron 5 μ l de DNA en 95 μ l de agua desionizada y se midió la absorbancia a 260 nm. Una vez obtenida la concentración del DNA, se conserva a -20 $^{\circ}$ C.

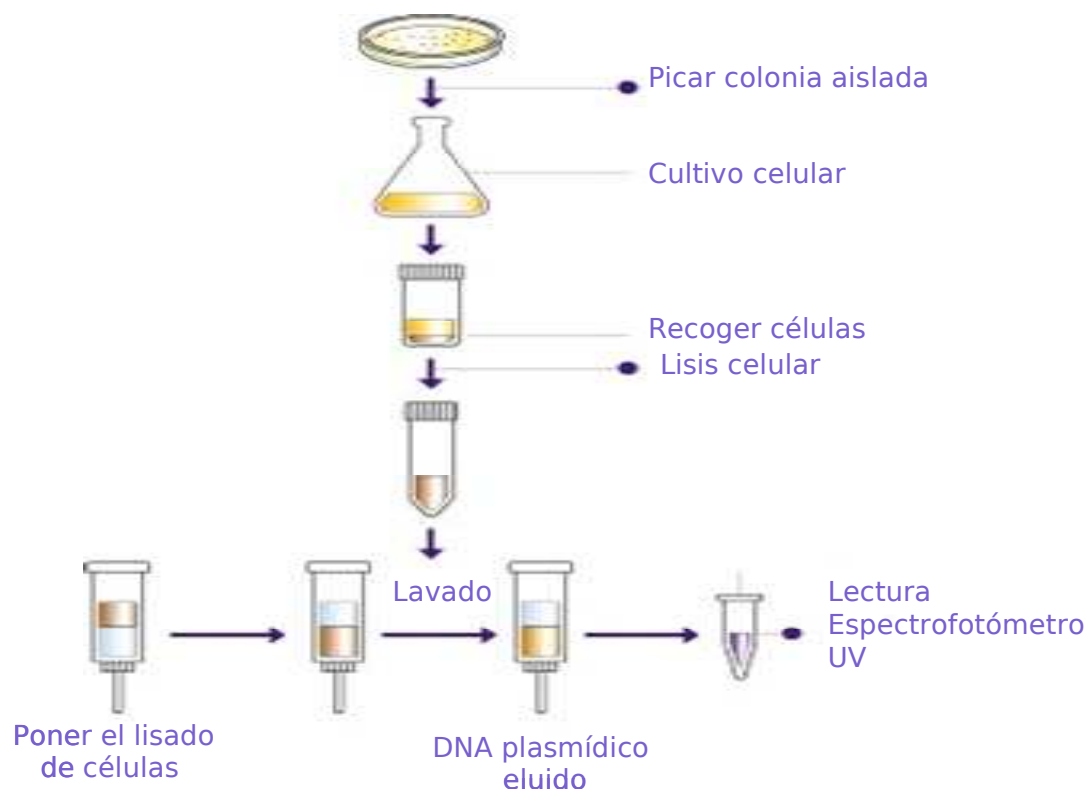


Figura 15. Crecimiento de bacterias y extracción de DNA. Se pican las colonias que han crecido en la placa y se siembran en medio de cultivo líquido. Después, se procede a la extracción de DNA siguiendo el protocolo. Por último, se cuantifica el DNA (Modificada de <http://www.acgtinc.com>).

3.2.2 Mantenimiento y transfección de las células HEK-293 en cultivo

3.2.2.1 Mantenimiento

Las células HEK-293 se mantuvieron en cultivo en un medio de crecimiento (DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% cóctel de antibióticos y anfotericina B). En el caso de la línea estable HEK-hERG el medio de crecimiento también lleva Genisteina. Cuando las células crecen hasta alcanzar un 90% de confluencia, necesitan ser resemebradas a menor densidad. Para ello se aspiró el medio de cultivo, se añadió un ml de medio y se despegaron las células con ayuda de una micropipeta, asegurándose bajo microscopio de que la mayoría se despegaran. Una vez despegadas del fondo, se separaron los agregados formados, se diluyó la muestra y se

sembraron nuevos frascos a la densidad deseada en 5 ml de medio de crecimiento, o placas en el caso de la transfección. Las células se mantuvieron en el incubador en una atmósfera de 5% de CO₂ y a 37 °C y el medio se cambió cada 2-3 días. Este procedimiento se realizó normalmente una vez por semana, ya que es el tiempo que tardan las células en volver a alcanzar dicha confluencia.

3.2.2.2 Transfección

La modulación del canal hERG por el receptor α_{1A} -AR fue estudiada mediante la transfección transitoria expresando el receptor α_{1A} -AR en la línea que expresa de forma estable el canal hERG. Para estas transfecciones se usaron 1 μ g de DNA del receptor α_{1A} -AR y 0,2 μ g de DNA de la proteína GFP, este último como marcador de transfección y así poder estimar la eficiencia de la transfección e identificar las células transfectadas mediante estimulación con una lámpara de fluorescencia. En el caso de los mutantes, se usaron 4 μ g de DNA de los mutantes D-hERG y NTK-hERG, 1 μ g de DNA del receptor α_{1A} -AR y 0,2 μ g de DNA de la proteína GFP.

Para que la transfección fuese exitosa, la confluencia en las placas debía ser elevada, en torno al 70-80%. En el proceso se utilizó el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) o Fugene 6 (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante [figura 16].

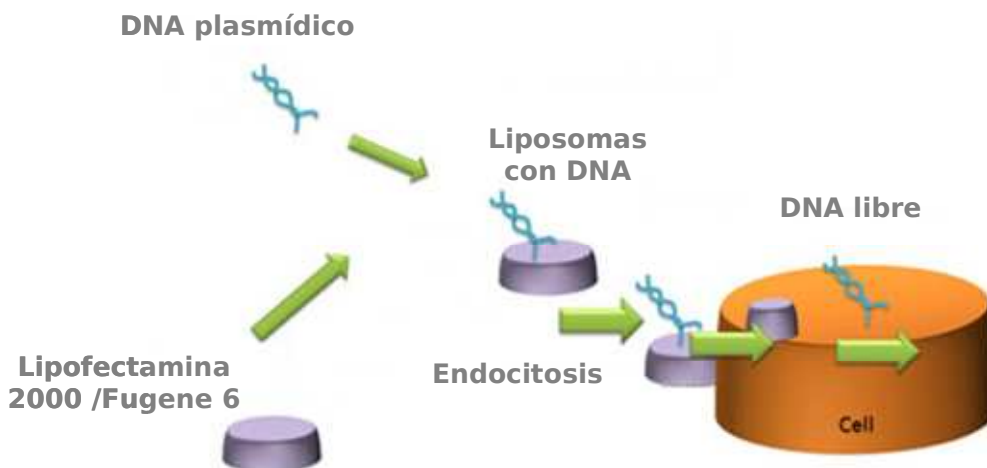


Figura 16. Esquema del método de transfección. El DNA plasmídico se junta con Lipofectamina 2000/Fugene 6 y mediante endocitosis el DNA plasmídico entra en la célula. (Modificada de <http://www.molecularstation.com>).

3.2.3 Detección de proteínas

3.2.3.1 Enriquecimiento de la membrana plasmática

Entre cuarenta y ocho y setenta y dos horas después de la transfección, las células se despegaron del fondo como anteriormente está descrito para así obtener la muestra celular.

Una vez obtenidas las muestras celulares, cada muestra fue dividida en dos grupos: el grupo control y el estimulado con 20 μM del agonista específico del receptor α_{1A} -AR (fenilefrina). Después del tiempo de incubación, se recogieron en un tubo para su posterior centrifugación a 1000 g durante 10 minutos con el fin de depositarlas. Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y se añadió al pellet tampón de homogeneización. Con un homogenizador de vidrio se homogeneizaron las células durante 1 minuto en hielo. Después, se realizó una segunda centrifugación (500 g durante 5 minutos) para depositar los núcleos y las células sin romper. Se recogió el sobrenadante y el pellet se volvió a homogeneizar, volviéndolo a centrifugar (500 g durante 5 minutos). Seguidamente, el sobrenadante obtenido se centrifugó (20000 g durante 30 minutos). Tras esta última centrifugación el sobrenadante fue eliminado y se resuspendió el pellet en tampón de homogeneización. Se reservó parte de la muestra para la determinación de proteína mediante el método de Bradford. Por último, la suspensión de membranas fue almacenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior utilización.

3.2.3.2 Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford

Antes de la inmunodetección de proteínas, es necesario determinar la concentración proteica en cada muestra, para partir de la misma cantidad de proteína total y así poder comparar de forma equitativa las bandas de expresión obtenidas en el Western blot. Para ello, dicha determinación se realizó mediante el método de Bradford. Este método se basa en el uso del colorante Azul brillante de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250), el cual se une a las proteínas en una solución ácida causando un cambio en la longitud de onda de absorción máxima del colorante, de 465 nm a 595 nm. Para la determinación de la concentración de proteínas se realiza la lectura a 595 nm y se compara con una curva patrón de concentraciones conocidas de BSA.

3.2.3.3 Electroforesis y Western blot

Esta metodología se utiliza para identificar de forma exacta y diferencial una proteína determinada. Esta técnica utiliza la separación electroforética de proteínas acoplada a la detección inmunoquímica mediante el uso de anticuerpos, los cuales se van a unir específicamente a la proteína de estudio.

En el presente estudio esta técnica fue utilizada para determinar la expresión del canal hERG, el receptor α_{1A} -AR y los niveles de fosforilación de los aminoácidos Treonina, Tirosina y Serina.

La técnica de Western blot se divide en diferentes etapas: electroforesis en geles de poliacrilamida, electrotransferencia e inmunodetección. A continuación detallaremos en profundidad cada una de las etapas de la técnica.

A todas las muestras se les adicionó un volumen de tampón de muestra según la concentración de proteína que fuera necesaria. A continuación las proteínas fueron desnaturalizadas calentando las muestras a 100 °C durante 5 minutos.

3.2.3.3.1 Preparación de los geles de electroforesis

Las muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida discontinuos, los cuales estaban formados por un gel concentrador y un gel separador. Ambos geles estaban compuestos por una mezcla de acrilamida y bis-acrilamida. La polimerización de los geles se inició por la adición de los compuestos persulfato amónico y TEMED. Además, el gen concentrador presentaba un tamaño de poro mayor debido a que contenía menor cantidad de acrilamida. Este hecho favoreció la concentración de todas las proteínas de la muestra en una única banda, justo antes de la entrada de las mismas en el gel separador, donde las proteínas fueron separadas de acuerdo a su masa molecular.

En primer lugar se preparó la solución del gel separador. Esta solución fue vertida en el interior de los cristales de polimerización y a continuación se añadió agua para favorecer la polimerización adecuada del gel. Una vez polimerizada la parte del gel separador, se procedió a la preparación del gel concentrador. Esta solución fue vertida encima del gel separador, después de quitar el agua, ajustando en la parte superior de la misma los peines necesarios para formar las calles del gel.

3.2.3.3.2 Carga de muestras y electroforesis

Una vez que el gel concentrador estaba polimerizado, los peines fueron retirados cuidadosamente. Los cristales que contenían los geles fueron colocados en la cubeta de electroforesis, la cual fue rellena con el tampón de electroforesis.

En los carriles extremos de cada gel se cargó el marcador de peso molecular, el cual era de un rango comprendido entre 10 y 250 kDa (SeeBlue pre-Stained Standard, Bio-Rad). Después de cargar las muestras en las correspondientes calles, se conectaron los bornes de la cubeta de electroforesis a la fuente de alimentación seleccionando un voltaje constante de 80 V hasta que todas las proteínas de la muestra se concentraron en una única banda. Una vez que la banda hubo llegado al gel de separación, se cambió el voltaje a 130 V. La electroforesis se consideró finalizada una vez que el frente llegara al final del gel.

3.2.3.3.3 Electrotransferencia

Una vez que las proteínas habían sido separadas en función de su peso molecular, éstas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences), activadas previamente sumergiéndolas durante 5 minutos en agua y 15 minutos en tampón de transferencia reutilizado. Después, se prepararon los sándwiches de transferencia. Para ello se colocaron 1 esponja (antes sumergido en el tampón de montar), en una cara del sándwich, después 3 papeles Whatman del tamaño del gel (antes sumergidos en el tampón de montar), seguido la membrana de nitrocelulosa, encima de ésta el gel, otros 3 papeles Whatman y por último otra esponja. Se cerró el sándwich y se colocó en la cubeta de transferencia con tampón de transferencia y hielo en agitación. Seguidamente, se aplicó una corriente de 300 mA durante 90 minutos.

3.2.3.4 Inmunodetección

3.2.3.4.1 Bloqueo de sitios de unión inespecíficos en la membrana

Una vez terminada la transferencia, fue necesario el bloqueo de sitios de unión inespecíficos en la membrana. Para ello, se incubó la membrana de transferencia con la solución de bloqueo, durante 60 minutos en agitación suave.

3.2.3.4.2 Incubación con el anticuerpo primario

Una vez que se habían bloqueado los sitios de unión inespecíficos, procedimos a la incubación de la membrana con el anticuerpo primario correspondiente. La solución de incubación utilizada fue la solución de bloqueo a la cual añadimos una concentración determinada de anticuerpo primario. La incubación de los anticuerpos primarios se realizó a una temperatura de 4 °C, en agitación suave durante toda la noche.

Después del periodo de incubación, la membrana fue sometida a 4 lavados de 10 de minutos y agitación suave con la solución PBS-TWEEN 20.

3.2.3.4.3 Incubación con el anticuerpo secundario

Después de la etapa de lavado, se procedió a la incubación de la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente durante 2 horas a temperatura ambiente, en agitación suave. En este caso la solución utilizada también fue la de bloqueo. El anticuerpo secundario reconoce el anticuerpo primario ya fijado en la membrana además de tener unida la enzima peroxidasa.

3.2.3.4.4 Detección por quimioluminiscencia

Una vez terminada la incubación, se realizaron 4 lavados con PBS-TWEEN 20 de 10 minutos cada uno con agitación suave para eliminar el anticuerpo secundario sobrante.

Para llevar a cabo el revelado, la membrana se incubó con las soluciones de revelado durante 5 minutos. La peroxidasa oxida el luminol y éste oxidado emite luz, lo que revela la banda exponiendo la membrana a un analizador de imágenes digital.

3.2.3.4.5 Stripping

Con el fin de detectar otra proteína en la misma membrana, una vez revelada la membrana, se realizaron dos incubaciones con la solución de stripping de 15 minutos a 60°C y agitación suave para eliminar los restos del anticuerpo. Seguidamente, se hicieron dos lavados de PBS-TWEEN 20 de 10 minutos de duración cada uno para después bloquear y reteñir la membrana como anteriormente está descrito.

3.2.3.5 Análisis de imagen

Una vez obtenidas las bandas correspondientes a las proteínas de estudio, se utilizó el programa Molecular Imaging Software de Kodak para la cuantificación del grado de fosforilación del canal. En dicha cuantificación se midieron las intensidades de las bandas obtenidas en el Western blot. Después, los datos fueron analizados mediante el test “t” de Student, considerando significativo el valor de p menor a 0,05.

3.2.4. Técnica de registro electrofisiológico

3.2.4.1 Técnica Patch-Clamp

Esta técnica de pinzamiento de membrana se basa en poner en contacto una micropipeta de borosilicato con un diámetro de punta aproximado de 2,5 μm con la membrana de una célula con la ayuda del microscopio invertido, el macromanipulador y el micromanipulador. Después de la aplicación de una pequeña succión en la pipeta se forma un sello de alta resistencia (del orden de $G\Omega$) entre la pipeta y la membrana. A través de la pipeta, que lleva un electrodo en su interior, se inyecta a la célula la corriente necesaria para mantener el potencial de membrana fijado en el nivel deseado, se aplican los diferentes protocolos de estimulación y se registran las corrientes iónicas resultantes a través del amplificador electrónico conectado a la pipeta.

Con el amplificador se fija el potencial de membrana a un valor determinado y se registra la corriente generada. El amplificador dispone además de circuitos electrónicos que permiten compensar tanto las capacidades de la pipeta y de la célula, así como la resistencia en serie.

Los pulsos de potencial se generan en el ordenador y son convertidos en analógicos con el convertidor digital/analógico de la interfase. Del mismo modo, la corriente generada por la célula es digitalizada con el conversor analógico/digital.

La modalidad utilizada para medir las corrientes macroscópicas de potasio fue la de “célula entera” o “whole-cell”. Para ello, una vez formado el gigasello, se aplica una ligera succión rompiendo el parche de membrana comprendido en la punta de la pipeta, estableciéndose un contacto entre la solución de la pipeta y el medio intracelular [figura 17].

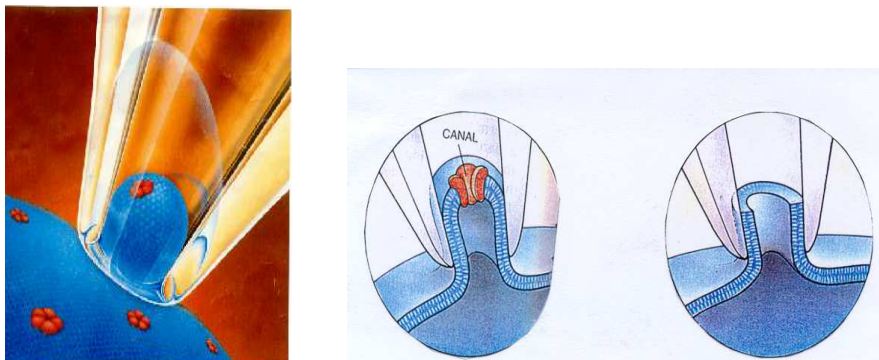


Figura 17. Esquema en el que representa la modalidad de “célula entera”. Formación del gigasello (tomada de <http://www-users.york.ac.uk>) y ruptura del parche de membrana. (Tomadas de Alday, 2009).

3.2.4.2 Procedimiento experimental

Antes de comenzar, se prepara el equipo de registro. Para ello, se rellena el sistema de perfusión con cada una de las soluciones y se purgan las vías para eliminar las burbujas de las vías de perfusión.

Posteriormente se colocan las células en una cámara de 0,5 ml de volumen montada en el microscopio invertido, donde las dejamos reposar durante 10-15 minutos para que se posen en el fondo de la misma. Tras este periodo, abrimos la perfusión por la que se hace pasar la disolución externa durante 10 minutos para que las células se habitúen al medio.

A continuación se fabrican las micropipetas utilizando el estirador de pipetas vertical y se rellenan con la solución interna correspondiente utilizando una jeringa adecuada al diámetro del vidrio. En este proceso no debe quedar ninguna burbuja de aire ya que impediría el contacto eléctrico entre el electrodo y la solución. Se sitúa la micropipeta en el soporte del electrodo asegurándose el contacto entre la solución interna y el electrodo. Además, introducimos en la cámara el electrodo de referencia.

Tras esto, introducimos la punta de la pipeta en la disolución de la cámara aplicando a través de ella pulsos de -10 mV a una frecuencia de 50 Hz. Estos pulsos se registran en la pantalla del ordenador como una deflexión negativa de la línea isoeléctrica de corriente. Midiendo la amplitud de esta deflexión de corriente y sabiendo que la diferencia de potencial que hemos aplicado es de -10 mV, el programa de registro calcula automáticamente la resistencia de la pipeta mediante la ley de Ohm:

$$V = I \cdot R, \text{ donde } V \text{ es voltaje, } I \text{ es corriente y } R \text{ es resistencia.}$$

La aproximación de la pipeta a la célula se realiza primeramente con el macromanipulador, y una vez situada la punta de la pipeta en las inmediaciones de la célula elegida, se hace uso del micromanipulador [figura 18]. El control de estas operaciones se realiza visualmente bajo el microscopio. Cuando la punta de la pipeta se acerca a la membrana de la célula, la resistencia aumenta. En ese momento se aplica una ligera succión (presión negativa) en el interior de la micropipeta, por lo que una pequeña porción de la membrana celular se invagina en el interior de la pipeta formándose el gigasello entre la punta de la micropipeta y la membrana celular [figura 17]. Al formarse el sello la deflexión de corriente registrada se reduce en relación directa a la resistencia del microelectrodo. En este momento sólo se registra la corriente capacitiva de la pipeta en respuesta a los pulsos de voltaje. La corriente capacitiva es compensada con el amplificador.



Figura 18. Secuencia de aproximación de la pipeta a la superficie de la célula. La pipeta de borosilicato se aproxima paulatinamente hacia el miocito hasta que entra en contacto con la membrana del mismo, formandose un gigasello.

Llegados a este punto, se aplica un potencial negativo para aproximarse a las condiciones de potencial de la célula en reposo, -80 mV, y se aplica una succión en la pipeta consiguiendo que el parche de membrana se rompa. Así, se establece un acceso de baja resistencia al interior de la célula, permitiendo estudiar las propiedades eléctricas de toda la membrana celular [figura 17].

Tras la ruptura del parche de membrana se produce una diálisis entre la disolución interna de la pipeta y el interior de la célula. Una vez roto el parche surge una nueva

corriente de aparición casi instantánea y de desaparición rápida, que es la corriente necesaria para cargar la capacidad de la membrana.

Antes de comenzar a registrar las corrientes, se compensa la capacidad de la membrana y las resistencias en serie. En estas condiciones se fija el voltaje de toda la membrana y se registra la corriente iónica resultante de todos los canales presentes en la membrana.

3.2.4.3 Protocolo utilizado en los registros de corriente iónica

Para registrar la corriente hERG de las células HEK-293, éstas se mantuvieron a un potencial de mantenimiento de -80 mV. Se empleó un protocolo de registro que consiste en aplicar un prepulso despolarizante de 2 segundos de duración desde un potencial de -40 mV hasta +70 mV en incrementos de 10 mV. Inmediatamente después se registra la corriente de cola durante la repolarización aplicando un pulso a -40 mV durante 5 segundos, volviendo después a su potencial de reposo [figura 19].

La amplitud de la corriente de cola depende del potencial del prepulso que le precede y permite medir la activación del canal.

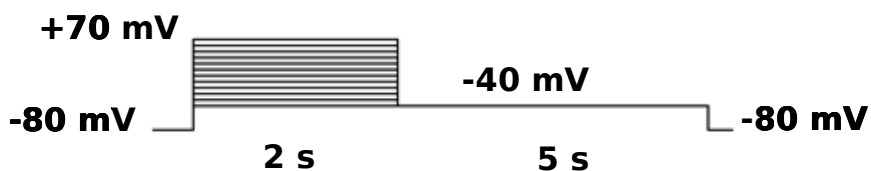


Figura 19. Esquema del protocolo de estimulación. La célula se mantiene a un potencial de reposo de -80 mV y se le aplica un prepulso despolarizante de 2 segundos de duración desde un potencial de -40 mV hasta +70 mV. Inmediatamente después se mide la corriente de cola durante la repolarización aplicando un pulso de -40 mV durante 5 segundos, volviendo a su potencial de reposo.

Los canales hERG a -80 mV se encuentran en estado de reposo. La corriente aumenta a potenciales por encima de -40 mV ya que los canales pasan del estado de reposo al activo, pero disminuye con la despolarización por encima de 0 mV debido a la inactivación del canal (rectificación del canal). La corriente de cola en la repolarización desde voltajes positivos se debe a la rápida recuperación de los canales inactivados al estado abierto. Esta corriente de cola sirve para medir la dependencia de voltaje de la activación del canal. Finalmente del estado activo pasan al de reposo con una lenta deactivación.

3.2.4.4 Adquisición y análisis de los datos

La adquisición de datos y parte del análisis se han realizado con el programa pClamp. Los protocolos de estimulación eléctrica fueron controlados por el CLAMPEX 10.2, que permite definir los protocolos de estimulación. Para analizar los registros electrofisiológicos se ha utilizado CLAMPFIT 10.2.

Curva densidad de corriente-voltaje: el gráfico se obtiene de la medición de la corriente al final de los prepulsos del protocolo. La corriente fue normalizada con la capacidad de la célula.

Curva de activación o dependencia de voltaje de activación: para calcular la dependencia de voltaje de activación se midió la amplitud de la corriente de cola, ya que los canales pasan del estado inactivo al abierto. Las corrientes fueron normalizadas a la corriente máxima para comparar las células entre sí. Se graficó la curva de activación (corriente respecto al voltaje del prepulso). Dicha curva fue ajustada a una ecuación Boltzman la cual calcula el voltaje medio de la activación, es decir, el voltaje en el que el 50% de los canales está abierto.

$$f(v) = 1 / [1 + e^{(V_h - V)/V_c}], \text{ donde:}$$

V = voltaje del prepulso

V_h = voltaje medio de activación

V_c = pendiente. Indica la dependencia de voltaje de la activación.

Deactivación de la corriente: mediante este parámetro se mide el tiempo que necesita el canal para pasar del estado abierto al de reposo. La caída de la corriente de cola se ajustó a una exponencial de primer orden:

$$f(t) = A \cdot e^{-t/\tau}, \text{ donde:}$$

t = tiempo

A = amplitud del componente

τ = constante de tiempo de desactivación de los canales

Material y Métodos

A lo largo de todo el apartado de resultados, los datos se expresan como Media \pm error estándar. El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el test “t” de Student para muestras apareadas o no apareadas de las medias considerando estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

4. Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Efecto de la estimulación del receptor α_{1A} -AR sobre la corriente hERG

Para llevar a cabo los objetivos de esta Tesis Doctoral, en primer lugar se quiso estudiar cuál es el efecto de la estimulación del receptor α_{1A} -AR sobre la corriente hERG. Para ello las células HEK-293 fueron transfectadas con el plásmido del canal hERG, el receptor α_{1A} -AR y la proteína GFP. En la figura 20 se pueden observar las células transfectadas de color verde debido a la proteína fluorescente verde (GFP).

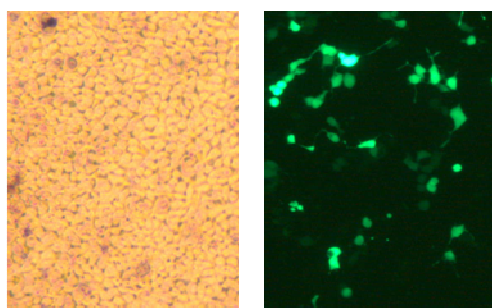


Figura 20. Células HEK-293 transfectadas con el canal hERG, el receptor α_{1A} -AR y GFP. A la derecha se muestran las células vistas con luz normal y a la izquierda estimuladas con luz UV.

Aunque la GFP se utilizó como marcador de la transfección, se realizaron varios Western blot con el fin de mostrar que tanto el canal hERG como el receptor se expresaban en la membrana celular [figura 21].

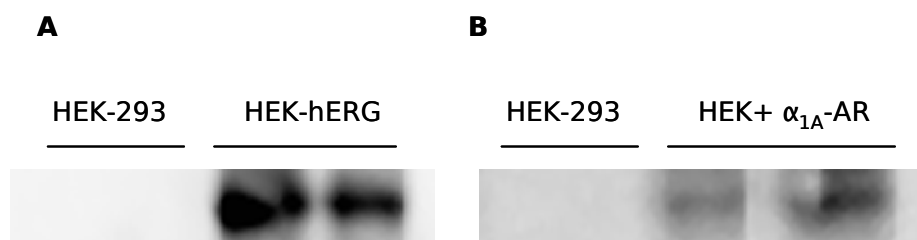


Figura 21. Detección del canal hERG y del receptor α_{1A} -AR en las células HEK-293. **A** Detección del canal hERG en células HEK-293 sin transfectar y transfectadas con el canal hERG. **B** Detección del receptor α_{1A} -AR en células HEK-293 sin transfectar y transfectadas con el receptor α_{1A} -AR.

Después de verificar la expresión de las proteínas de interés, se probaron dos anticuerpos comerciales anti-hERG de distinto origen para comprobar si existía alguna diferencia entre sí. Observamos que el anticuerpo anti-hERG obtenido en conejo

detectó una sola banda del canal hERG [figura 21, 22], mientras que el anticuerpo anti-hERG obtenido en cabra detectó dos bandas correspondientes al canal [figura 22]. Estas dos bandas de distinta masa molecular corresponden a la forma madura (155 kDa) y a la forma inmadura (135 kDa) del canal [Cockerill *et al.*, 2007]. Para los posteriores experimentos se utilizó el anticuerpo que detectó las dos bandas, es decir, el anti-hERG obtenido en cabra, ya que podría dar más información.

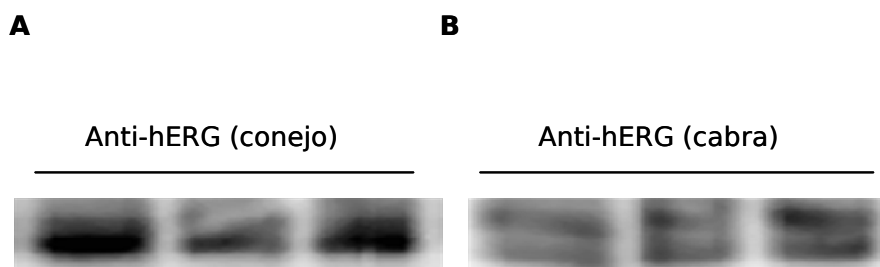


Figura 22. Detección del canal hERG con dos anticuerpos de distinto origen. A Detección del canal hERG utilizando el anti-hERG obtenido en conejo en el cual solo aparece una banda más gruesa. **B** Detección del canal hERG utilizando el anti-hERG obtenido en cabra. En este caso se detectan las dos bandas (madura e inmadura) del canal hERG.

Aunque los primeros experimentos fueron realizados transfectando el canal hERG en las células HEK-293, posteriormente el Dr. January nos cedió la línea celular que expresa de forma estable el canal hERG y fue utilizada durante la mayoría de los siguientes experimentos.

Una vez visto que las proteínas se expresaban bien en la membrana celular, el siguiente paso fue registrar la corriente hERG utilizando la configuración de célula entera de la técnica de Patch Clamp. Utilizando el protocolo de estimulación detallado en la sección de material y métodos obtuvimos el registro de la figura 23.

Los canales hERG a -80 mV se encuentran en estado de reposo. La corriente aumenta a potenciales por encima de -40 mV ya que los canales pasan del estado de reposo al activo, pero disminuye con la despolarización por encima de 0 mV debido a su inactivación. La inusual dependencia de voltaje de la corriente hERG resulta de la rápida inactivación dependiente de voltaje tipo C que limita el flujo de iones de K^+ a voltajes positivos. La corriente de cola en la repolarización desde voltajes positivos se debe a la rápida recuperación de los canales inactivados al estado abierto. Finalmente del estado activo pasan al de reposo con una lenta deactivación.

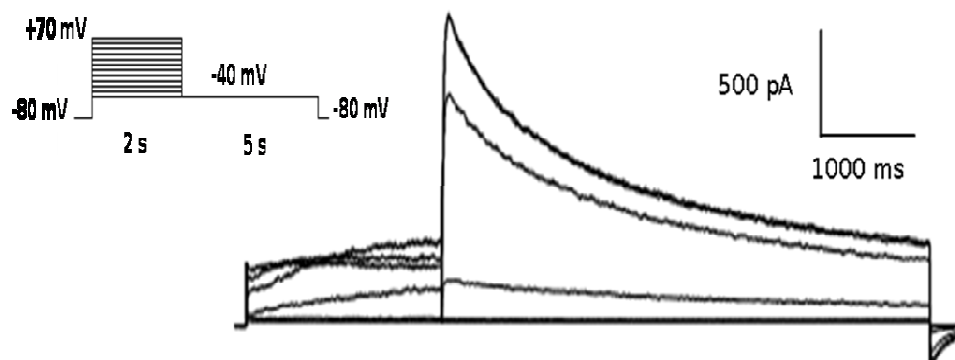


Figura 23. Registro de la corriente hERG. Registro de la corriente hERG obtenida después de estimular la célula con prepulsos despolarizantes seguidos de un pulso repolarizante a -40 mV para medir la corriente de cola.

Una vez obtenido el registro, se graficó la curva densidad de corriente-voltaje [figura 24] con la corriente obtenida en el prepulso del protocolo. Para ello la corriente fue normalizada a la capacidad de la célula y así poder comparar corrientes de diferentes células.

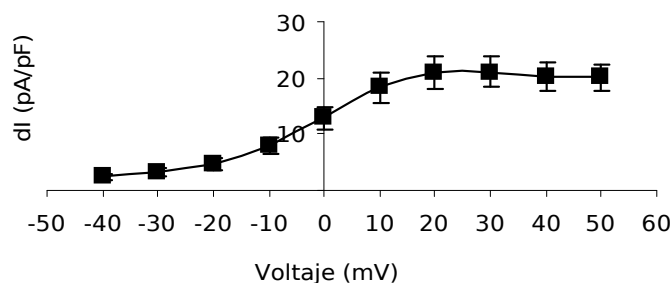


Figura 24. Curva densidad de corriente-voltaje. La densidad de corriente está normalizada a la capacidad de las células. La corriente hERG aumenta a potenciales despolarizados hasta llegar a un máximo. A partir de él, la corriente no rectifica y se mantiene constante debido a las corrientes endógenas de las células HEK-293.

La curva densidad de corriente-voltaje de la corriente hERG tiene forma típica de campana debida a la rápida inactivación que provoca una reducción de la conductancia dependiente de voltaje. En este caso una vez que alcanza el máximo la corriente no se reduce debido a la contribución de las corrientes endógenas de las células HEK-293. Para graficar estos datos solamente se han tenido en cuenta los

Resultados

potenciales entre -40 mV y +50 mV, ya que la contribución de las corrientes endógenas fue mayor a potenciales superiores.

Para calcular la dependencia de voltaje de la activación de la corriente hERG se midió la amplitud de la corriente de cola. Las corrientes fueron normalizadas a la corriente máxima y se graficó la curva de activación (corriente respecto al voltaje) [figura 25]. Dicha curva fue ajustada a una ecuación Boltzman la cual calcula el voltaje medio de la activación (V_h), es decir, el voltaje en el que el 50% de los canales está abierto. En este caso el voltaje medio de activación de la corriente hERG es de $10,92 \pm 1,93$ mV. (Al final de la sección de resultados se muestran resumidos los datos del voltaje medio de activación de todos los grupos experimentales).

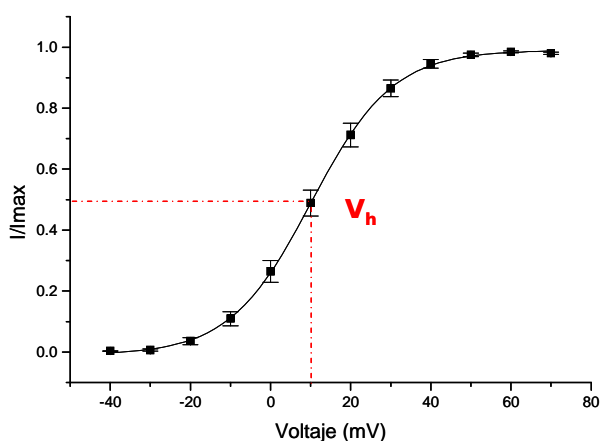


Figura 25. Curva de activación de la corriente hERG. La corriente está normalizada a la corriente máxima. La curva de activación se ajusta a la ecuación de Boltzman. El V_h de activación es el voltaje al cual el 50% de los canales están abiertos.

El último parámetro que se midió fue el tiempo que el canal necesita para pasar del estado activo al de reposo, es decir la deactivación de la corriente. Para ello, la caída de la corriente se ajustó a una ecuación exponencial [figura 26].

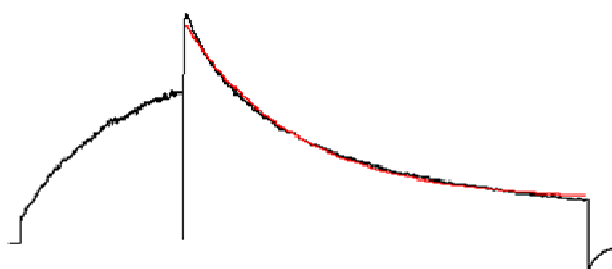


Figura 26. Ajuste de la deactivación de la corriente hERG. Registro del trazo a 0 mV de la corriente hERG y el ajuste de la caída de la deactivación de la corriente hERG a una exponencial (trazo rojo).

Como se puede observar en la figura 26, la corriente hERG muestra una deactivación muy lenta, con una constante de tiempo de $1331,3 \pm 74,41$ ms que incluso no llega a ser total al final del pulso de 5 segundos. (Al final de la sección de resultados se muestran resumidos los datos de la deactivación de todos los grupos experimentales).

Una vez analizada la corriente hERG en condiciones control, la célula fue estimulada con $20 \mu\text{M}$ de fenilefrina durante 5 minutos de perfusión [figura 27] con el fin de estudiar el efecto de la estimulación del receptor α_{1A} -AR sobre la corriente hERG. La normalización de las corrientes se realizó para poder comparar distintas células entre si. En el caso de la curva densidad de corriente-voltaje la amplitud se normalizó respecto a la capacidad de la célula, mientras que la curva de activación se normalizó respecto a la amplitud máxima de cada corriente.

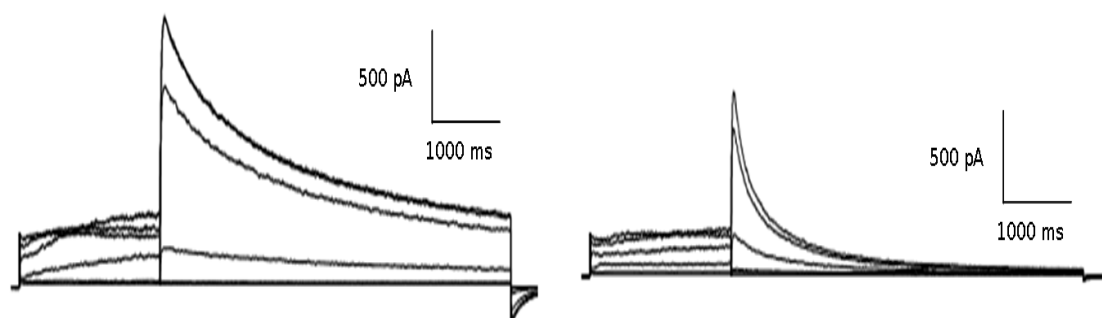


Figura 27. Registro de la corriente hERG en presencia del receptor α_{1A} -AR. Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de $20 \mu\text{M}$ de fenilefrina (derecha).

Como se observa en la figura 27, el registro cambia de aspecto en presencia de fenilefrina. Se observa una reducción de la amplitud de la corriente tanto en los prepulsos como en la corriente de cola. Además, los prepulsos de la corriente son más lineales y la amplitud de cada prepulso es más o menos constante en el tiempo. La deactivación también se ve alterada en presencia del agonista, mostrándose más rápida.

La fenilefrina provoca una pérdida en la forma de campana en la curva densidad de corriente-voltaje [figura 28A], haciéndola más lineal además de reducir la densidad de la corriente. Del mismo modo, la fenilefrina desplaza la curva de activación hacia valores más positivos alterando así el voltaje medio de activación ($10,92 \pm 1,93$ vs. $26,77 \pm 2,15$ mV, $p=0,0001$) [figura 28B].

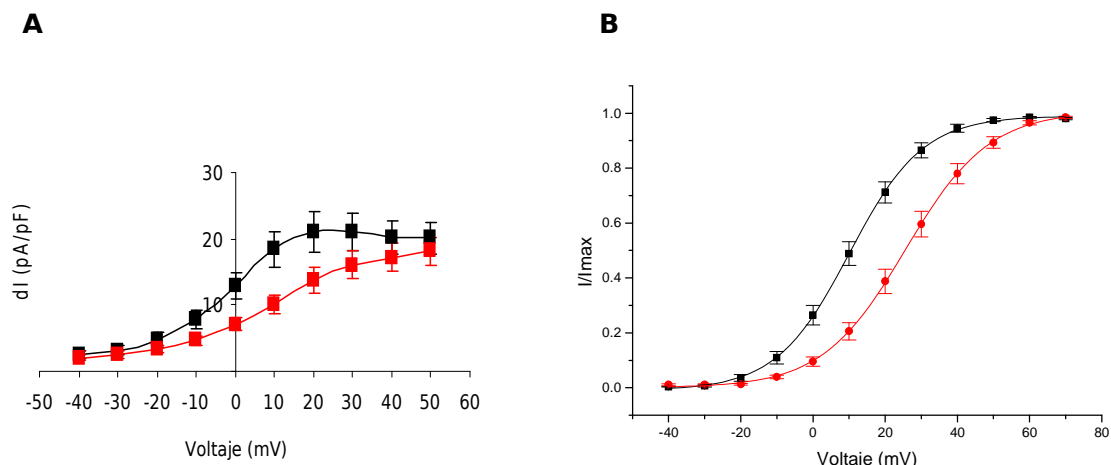


Figura 28. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG. A Representación de la densidad de la corriente hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μ M de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μ M de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media \pm error estándar).

Analizando la deactivación de la corriente, la fenilefrina reduce significativamente el tiempo que el canal necesita para pasar del estado abierto al de reposo ($1331,3 \pm 74,41$ vs. $638,97 \pm 43,93$ ms, $p < 0,0001$).

La fenilefrina induce varios cambios en la corriente hERG. Por un lado se ha mencionado que la fenilefrina reduce la amplitud de la corriente. En este caso, esta disminución de la corriente no se puede achacar completamente al efecto provocado por la estimulación del receptor α_{1A} -AR ya que esta corriente muestra run-down, es decir, muestra una disminución de la amplitud de la corriente hERG durante el tiempo.

Por otro lado, la densidad de corriente-voltaje pierde la forma de campana debido al aumento de la contribución de las corrientes endógenas de las propias células ya que a potenciales muy positivos el canal hERG no debería de conducir corriente.

Finalmente, la estimulación del receptor α_{1A} -AR desplaza el V_h de activación hacia valores más positivos. Así, a un determinado potencial el canal conduce menos cuando el receptor α_{1A} -AR es estimulado. También se observa que la deactivación del canal está acelerada.

4.2 Efecto directo de la fenilefrina sobre el canal hERG

Como el canal hERG es muy susceptible al bloqueo por muchas sustancias, se quiso comprobar si la fenilefrina tenía algún efecto directo sobre el canal ya que en los

registros realizados hasta el momento se vio que la fenilefrina afectaba rápidamente a la deactivación del canal.

Para ello se registraron células sin transfectar con el receptor α_{1A} -AR. En la figura 29 se observa como afecta la fenilefrina a la deactivación del canal. Una vez aplicada la fenilefrina, la deactivación de la corriente hERG es mucho más rápida que en condiciones control, lo que supone un bloqueo directo del canal provocado por el agonista específico del receptor α_{1A} -AR ($1420,7 \pm 98,71$ vs. $998 \pm 85,06$ ms, $p < 0,0001$). Por lo tanto, los datos de la deactivación solo se utilizaron como referencia de perfusión de la fenilefrina.

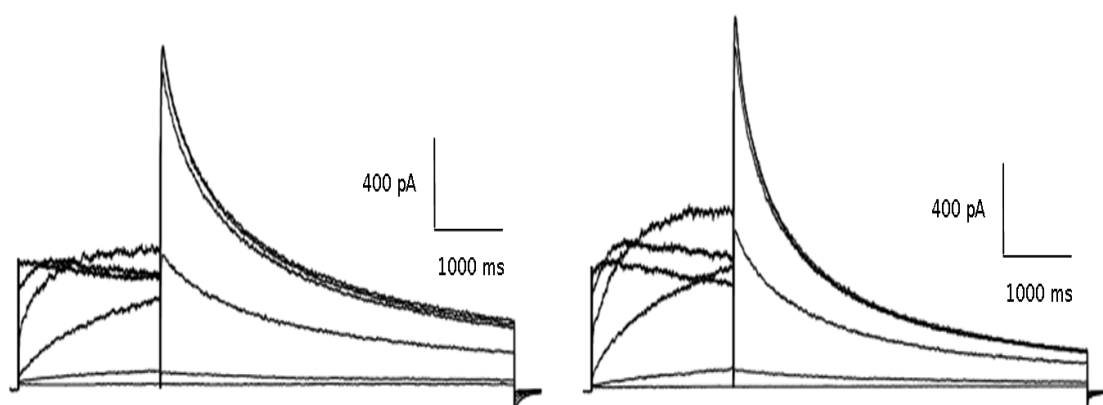


Figura 29. Registro de la corriente hERG en ausencia del receptor α_{1A} -AR. Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de 20 μ M de fenilefrina (derecha).

En cuanto a los valores de densidad de corriente respecto al voltaje, observamos que la corriente es similar en ausencia y en presencia de la fenilefrina [figura 30A]. A lo que la curva de activación se refiere, no se observaron diferencias significativas, lo que sugiere que el desplazamiento del voltaje medio de activación observado en el anterior grupo de experimentos no es debido a un efecto directo de la fenilefrina sobre el canal sino a un efecto de la fenilefrina sobre el receptor α_{1A} -AR ($-1,73 \pm 2,37$ vs. $-4 \pm 2,54$ mV, n.s.) [figura 30B].

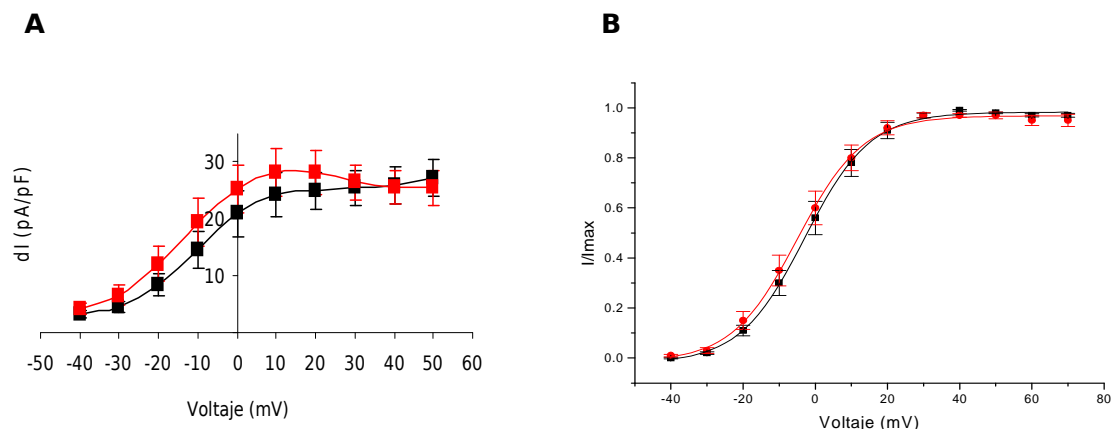


Figura 30. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en ausencia del receptor α_{1A} -AR. **A** Representación de la densidad de la corriente hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μ M de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μ M de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media \pm error estándar).

Es por todo ello, que los resultados del efecto de la fenilefrina sobre el canal no se han presentado como el cambio de la amplitud de la corriente sino como el cambio en el voltaje medio de activación, aunque también se presentan las curvas densidad de corriente-voltaje.

4.3 El efecto de la fenilefrina sobre la curva de activación de la corriente hERG se debe a la activación del receptor α_{1A} -AR

Para comprobar que el desplazamiento de la curva de activación es debido a la estimulación del receptor α_{1A} -AR, quisimos bloquear el receptor α_{1A} -AR. Visto que la fenilefrina tuvo un efecto directo sobre el canal hERG, primero se optó por examinar si también se bloqueaba directamente con el antagonista específico del receptor α_{1A} -AR, el 5-Metil-Urapidil.

Se utilizaron las células de la línea que expresa de forma estable el canal hERG sin transfectar con el receptor α_{1A} -AR y se registró la corriente en ausencia y presencia del antagonista del receptor [figura 31].

Como se observa en la figura 31, la deactivación del canal hERG se ve acelerada en presencia del antagonista 5-Metil-Urapidil ($1666 \pm 129,89$ vs. $1294,5 \pm 130,16$ ms, $p < 0,0001$).

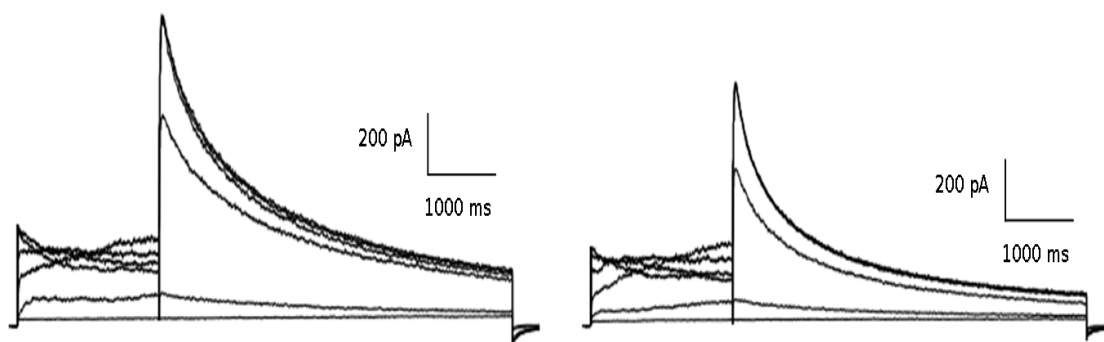


Figura 31. Registro de la corriente hERG en ausencia del receptor α_{1A} -AR. Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de 100 nM de 5-Metil-Urapidil (derecha).

Respecto a la curva densidad de corriente-voltaje se observa una reducción de la corriente en presencia del antagonista. El uso del 5-Metil-Urapidil tampoco afecta al voltaje medio de activación de los canales ($8,81 \pm 2,07$ vs. $8 \pm 2,23$ mV, n.s.) [figura 32].

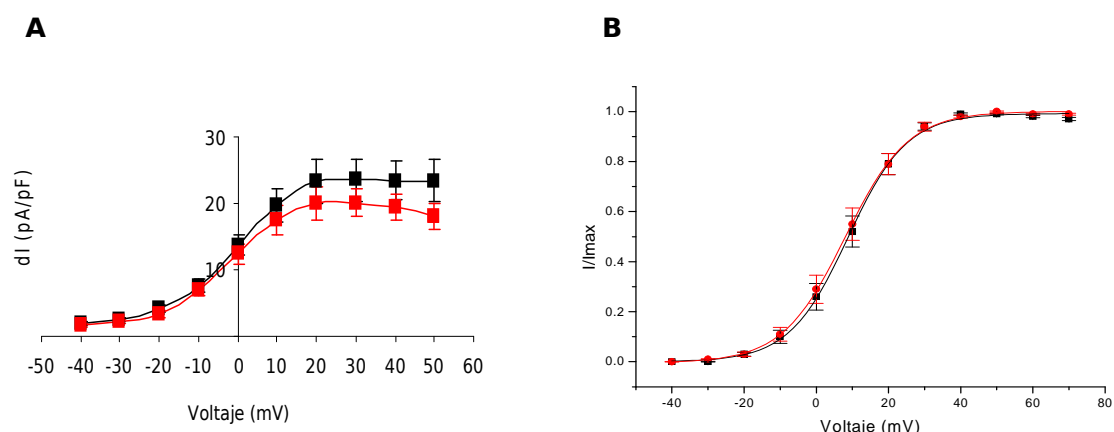


Figura 32. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en ausencia del receptor α_{1A} -AR. **A** Representación de la densidad de la corriente hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de 100 nM de 5-Metil-Urapidil (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de 100 nM de 5-Metil-Urapidil (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media \pm error estándar).

Una vez comprobado que el antagonista del receptor α_{1A} -AR solo afectó a la velocidad de la deactivación sugiriendo un bloqueo del canal, se comprobó el efecto de la fenilefrina sobre el canal con los receptores α_{1A} -AR bloqueados con el antagonista 5-Metil-Urapidil.

Para ello, se transfectaron las células HEK-hERG con el receptor α_{1A} -AR y se registró la corriente en presencia del bloqueante seguido de la estimulación del receptor α_{1A} -AR

[figura 33]. Como era de esperar, la fenilefrina acelera la deactivación de la corriente hERG.

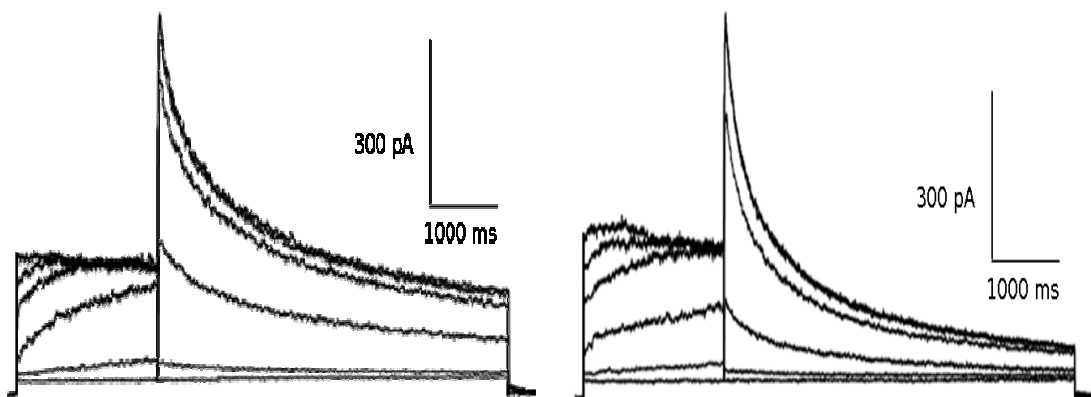


Figura 33. Registro de la corriente hERG en presencia de 100nM de 5-Metil-Urapidil. Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de 20 μ M de fenilefrina (derecha).

Tras el bloqueo del receptor α_{1A} -AR con 5-Metil-Urapidil, la curva densidad de corriente-voltaje aumenta tras la estimulación del receptor con la fenilefrina a partir de +10 mV [figura 34A]. En cambio, el voltaje medio de activación es significativamente mayor en presencia de la fenilefrina ($8,45 \pm 4,94$ vs. $15,05 \pm 5,49$ mV, $p=0,013$) [figura 34B]. Sin embargo, este desplazamiento de la curva de activación es mucho menor que en ausencia del antagonista del receptor α_{1A} -AR, sugiriendo el bloqueo parcial de los receptores.

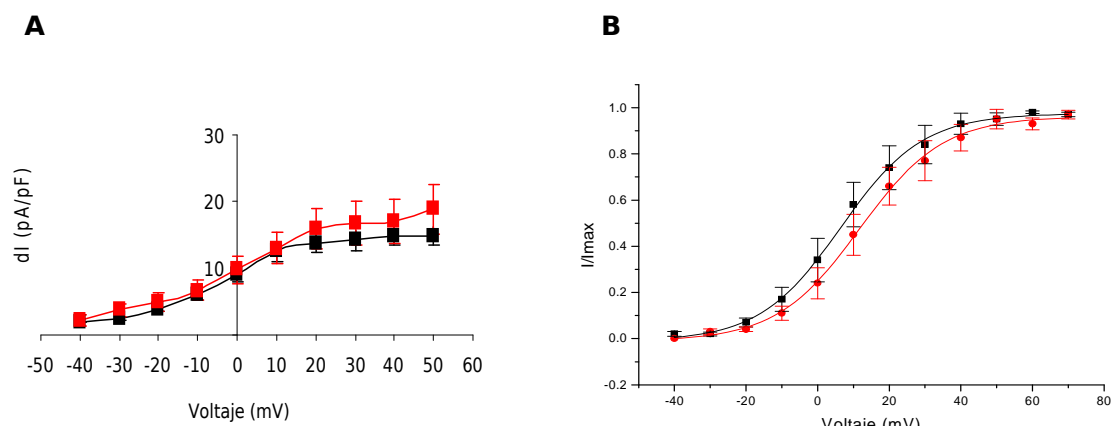


Figura 34. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de 100nM de 5-Metil-Urapidil. **A** Representación de la densidad de la corriente hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μ M de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μ M de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media \pm error estándar).

El bloqueo del receptor α_{1A} -AR contrarresta el efecto de la fenilefrina sobre la estimulación del receptor α_{1A} -AR, indicando que el desplazamiento del V_h de activación se debe a la estimulación del receptor α_{1A} -AR.

4.4 Importancia de la proteínas MinK y MiRP1 en la regulación α_{1A} -AR del canal hERG

Una vez analizado el efecto de la fenilefrina sobre la corriente hERG en presencia y ausencia del receptor α_{1A} -AR y del antagonista del mismo, se quiso estudiar el papel de las proteínas accesorias MinK y MiRP1 en la regulación α_{1A} -adrenérgica. Existen diversos trabajos en los que demuestran la interacción entre estas proteínas accesorias y el canal hERG en sistemas heterólogos, pero no está claro cuál de ellas es la compañera en el sistema nativo (revisado por McCrossan & Abbott, 2004).

Para estudiar la corriente en estas condiciones, además de transfectar el receptor α_{1A} -AR a la línea que expresa de forma estable el canal hERG, también se transfectaron las proteínas MinK o MiRP1 por separado. Como anteriormente, también se realizaron Western blots para la detección de estas proteínas en la membrana plasmática [figura 35].

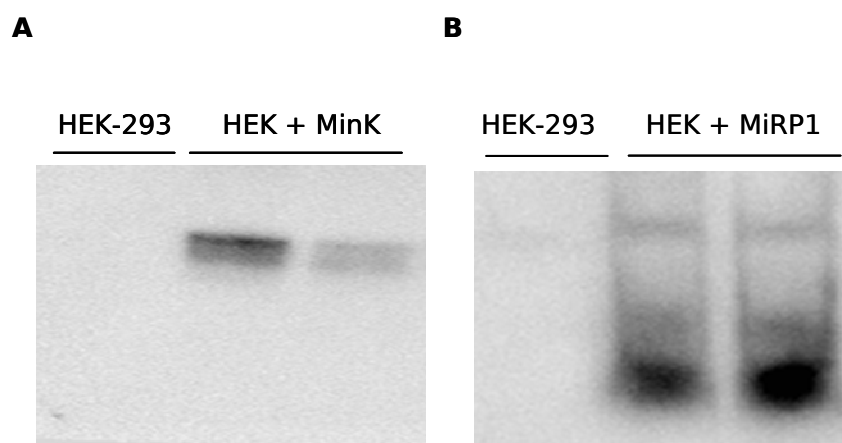


Figura 35. Detección del MinK (A) y MiRP1 (B) en las células HEK-293. A Detección de la proteína MinK en células HEK-293 sin transfectar y transfectadas con MinK. **B** Detección de la proteína MiRP1 en células HEK-293 sin transfectar y transfectadas con MiRP1.

Después de comprobar la expresión en la membrana celular, se registraron las corrientes en ausencia y presencia de MinK [figura 36].

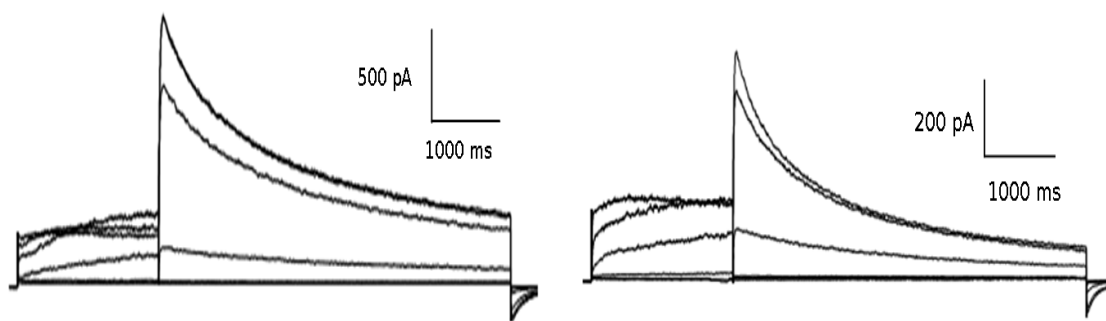


Figura 36. Registro de la corriente hERG en ausencia y en presencia de MinK. Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de MinK (derecha).

La curva densidad de corriente-voltaje no muestra grandes diferencias cuando el canal se expresa solo o asociado a la proteína MinK [figura 37A]. El voltaje medio de activación de la corriente hERG a su vez, tampoco se encuentra modificado en presencia de MinK ($10,92 \pm 1,93$ vs. $14,03 \pm 4,12$ mV, n.s) [figura 37B]. Por último, la presencia de MinK provoca una deactivación significativamente más lenta de la corriente hERG comparada con la deactivación de la corriente en ausencia de ésta ($1331,3 \pm 74,41$ vs. $2015,6 \pm 314,43$ ms, $p=0,0028$).

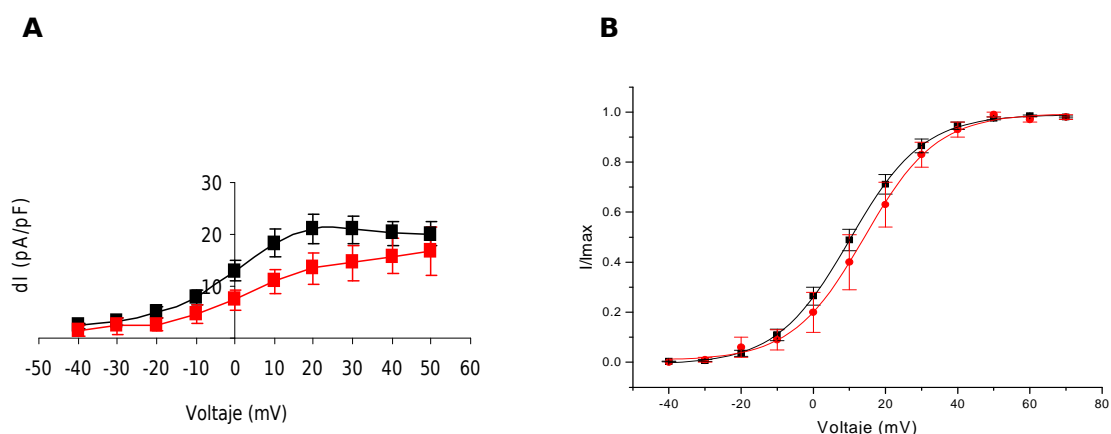


Figura 37. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en ausencia y presencia de MinK. **A** Representación de la densidad de la corriente hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de MinK (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de MinK (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media \pm error estándar).

La figura 38 muestra el registro obtenido en células que expresan la proteína MinK en ausencia y presencia de la fenilefrina. En presencia de la fenilefrina la deactivación de la corriente hERG se ve acelerada.

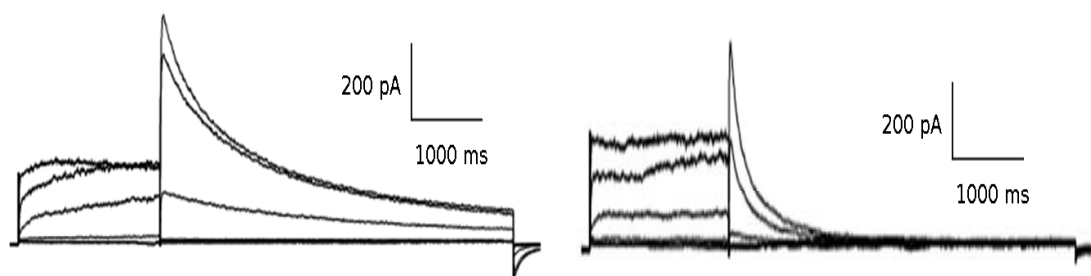


Figura 38. Registro de la corriente hERG en presencia de MinK. Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de 20 μM de fenilefrina (derecha).

La curva densidad de corriente-voltaje se ve disminuida en presencia del agonista del receptor α_{1A} -AR [figura 39A]. La curva de activación por su parte, está afectada ya que la estimulación del receptor α_{1A} -AR desplaza el voltaje medio de activación hacia valores más positivos ($14,03 \pm 4,12$ vs. $27,72 \pm 3,16$ mV, $p=0,0017$) [figura 39B]. El voltaje medio de activación se ve alterado de igual manera en ausencia o presencia de MinK cuando la célula es estimulada con fenilefrina, lo que sugiere que la proteína MinK no tiene un papel relevante en la regulación de la corriente hERG por el receptor α_{1A} -AR.

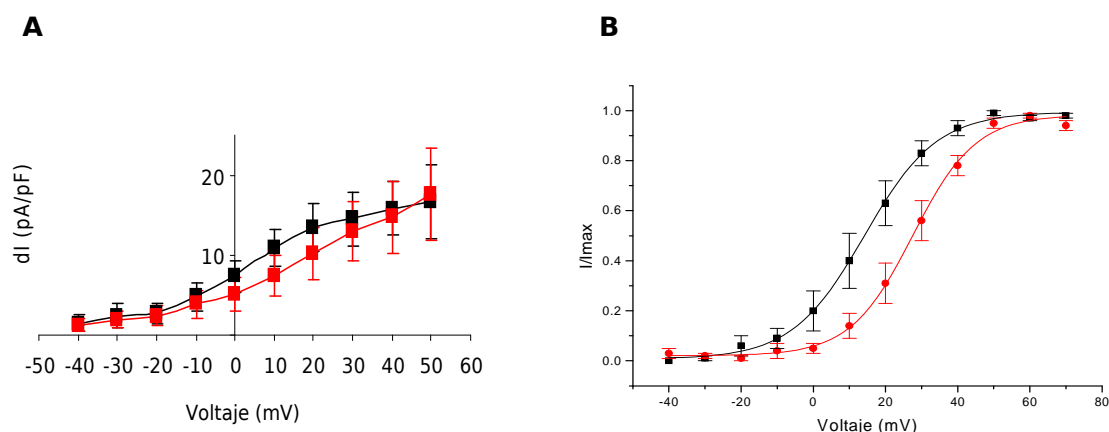


Figura 39. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de MinK. **A** Representación de la densidad de la corriente hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media \pm error estándar).

Después de analizar la corriente en presencia de MinK, se comprobó el comportamiento de la corriente hERG en presencia de MiRP1 [figura 40]. La presencia

Resultados

de MiRP1 no altera prácticamente la forma de la curva densidad de corriente-voltaje [figura 41A]. Sin embargo, el voltaje medio de activación es mucho más negativo en presencia de MiRP1 ($10,92 \pm 1,93$ vs. $-1,29 \pm 3,26$ mV, $p=0,0023$) [figura 41B]. En este caso la proteína MiRP1 tampoco altera la deactivación de la corriente hERG ($1331,3 \pm 74,41$ vs. $1450,3 \pm 117,65$ ms, n.s.).

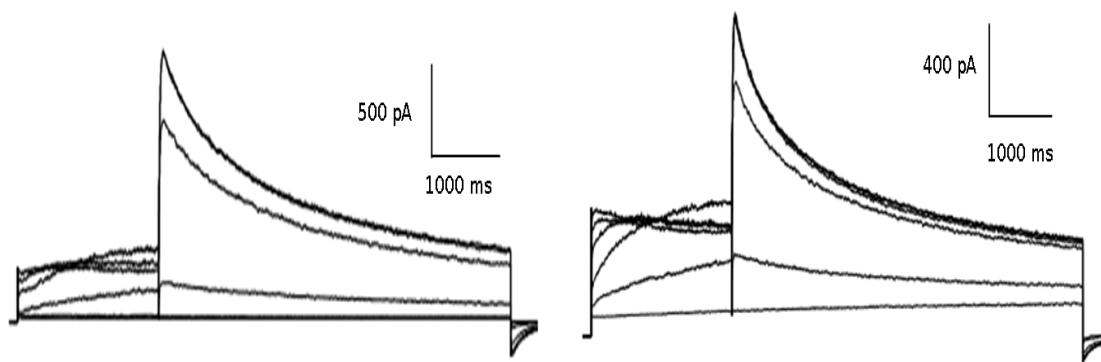


Figura 40. Registro de la corriente hERG en ausencia y en presencia de MiRP1. Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de MiRP1 (derecha).

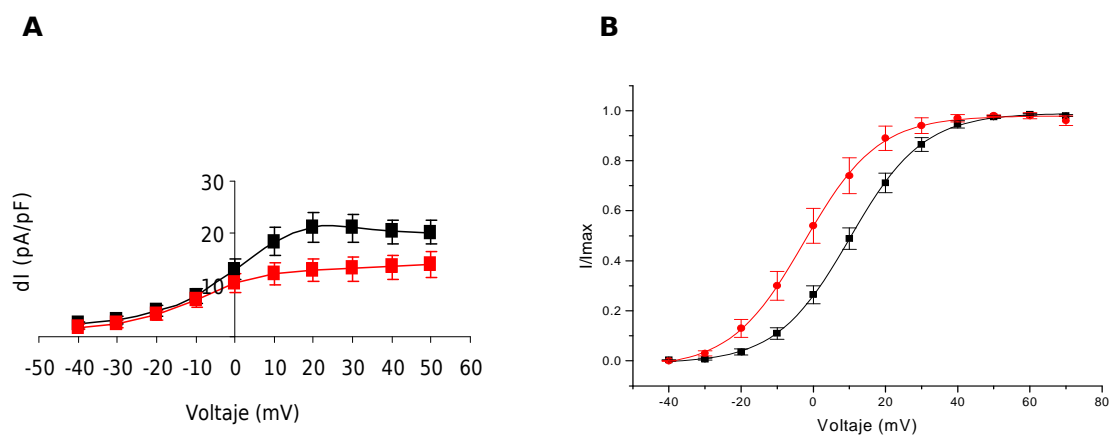


Figura 41. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en ausencia y presencia de MiRP1. **A** Representación de la densidad de la corriente hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de MiRP1 (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de MiRP1 (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media \pm error estándar).

Para estudiar la respuesta de la estimulación del receptor α_{1A} -AR en presencia de MiRP1 se registró la corriente en presencia y ausencia de la fenilefrina [figura 42]. En este caso también se observa la rápida deactivación debido al bloqueo directo del canal por la fenilefrina.

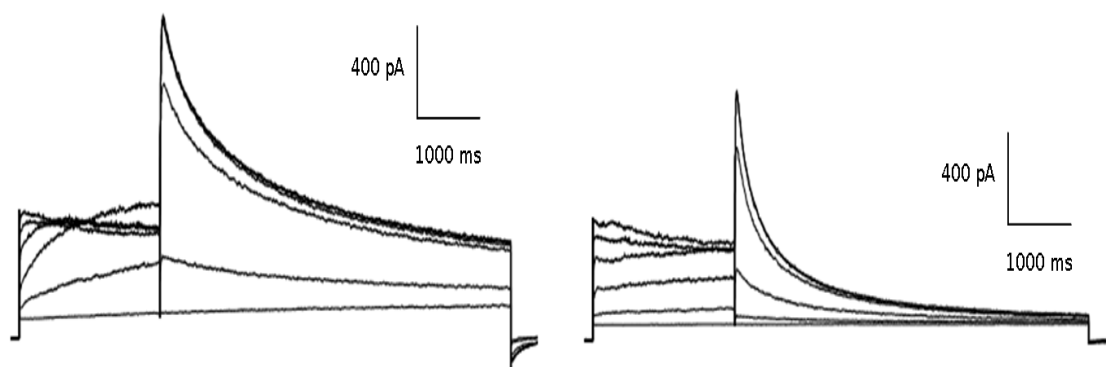


Figura 42. Registro de la corriente hERG en presencia de MiRP1. Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de 20 μM de fenilefrina (derecha).

Como ocurría con MinK, la curva densidad de corriente-voltaje de hERG-MiRP1 no presenta grandes cambios en presencia de la fenilefrina [figura 43A]. El voltaje medio de activación también se ve desplazado hacia valores más positivos cuando el receptor α_{1A} -AR es estimulado ($-1,29 \pm 3,26$ vs. $12,24 \pm 3,64$ mV, $p < 0,0001$) [figura 43B]. Este desplazamiento es similar al del grupo control, lo que sugiere que MiRP1 tampoco es importante en la regulación de la corriente hERG por los receptores α_{1A} -AR.

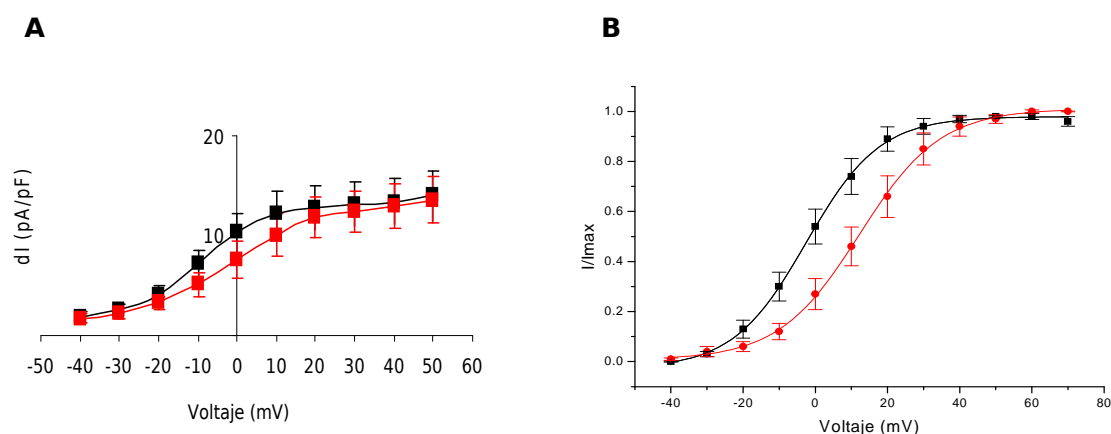


Figura 43. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de MiRP1. **A** Representación de la densidad de la corriente hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media \pm error estándar).

4.5 Identificación de la vía intracelular que conecta el receptor α_{1A} -AR y el canal hERG

Llegados a este punto quisimos centrarnos en definir la ruta intracelular activada por el receptor α_{1A} -AR. Como anteriormente se ha mencionado no existe una idea clara sobre los mecanismos puntuales de regulación del canal hERG por los receptores α_{1A} -AR. El receptor α_{1A} -AR es un receptor acoplado a proteína G. Este receptor está asociado clásicamente a la proteína G_q , a la cual se une para activarla. En su activación la proteína G_q se disocia por una parte en el dímero $\beta\gamma$ y la subunidad α_q por otra. La subunidad α_q a su vez activa la fosfolipasa C (PLC), la cual hidroliza el Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) en Diacilglicerol (DAG) e Inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). La proteína quinasa C (PKC) es activada por el DAG y por la liberación de Ca^{2+} procedente del retículo endoplasmático el cual ha sido activado por el IP_3 .

Según algunos autores la estimulación del receptor provoca la fosforilación del canal por PKC regulando así la corriente [Thomas *et al.*, 2004b; Cockerill *et al.*, 2007]. Otros en cambio achacan dicha regulación al consumo de PIP_2 [Bian *et al.*, 2001; Bian *et al.*, 2004].

Para comprobar la participación de los componentes de esta ruta intracelular se utilizaron distintos compuestos que fueron añadidos a la disolución interna y la corriente fue registrada 10 minutos después, asegurándose la diálisis al interior de la célula.

La proteína G_{α_q} fue la primera que inhibimos ya que es el primer paso en esta ruta intracelular. Para ello se utilizó 50 μM de GPant2A. Después de 10 minutos de diálisis se registró la corriente en ausencia y en presencia de la fenilefrina [figura 44].

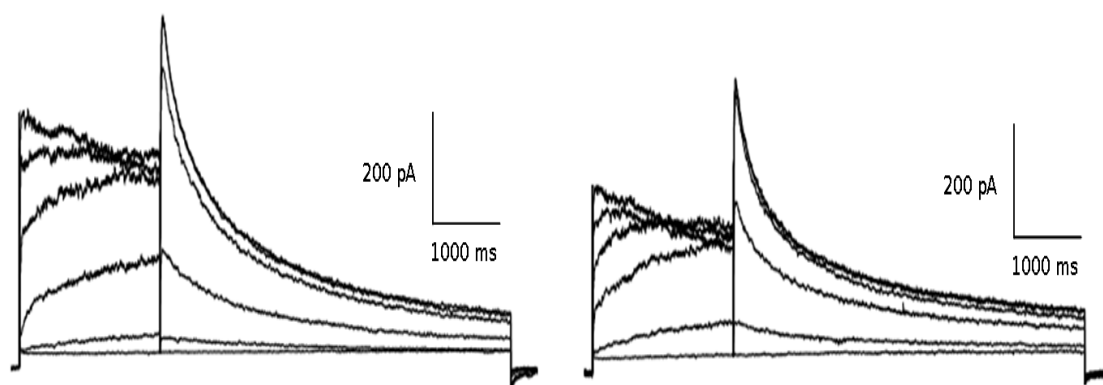


Figura 44. Registro de la corriente hERG en presencia de 50 μM de GPant2A. Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de 20 μM de fenilefrina (derecha).

Como era de esperar, la estimulación del receptor α_{1A} -AR no provoca cambios en la densidad de corriente-voltaje ni tampoco en el voltaje medio de activación ($10,48 \pm 3,67$ vs. $8,54 \pm 3,18$ mV, n.s.) [figura 45], indicando que la proteína G_{α_q} se encuentra implicada en la ruta de regulación de la corriente hERG.

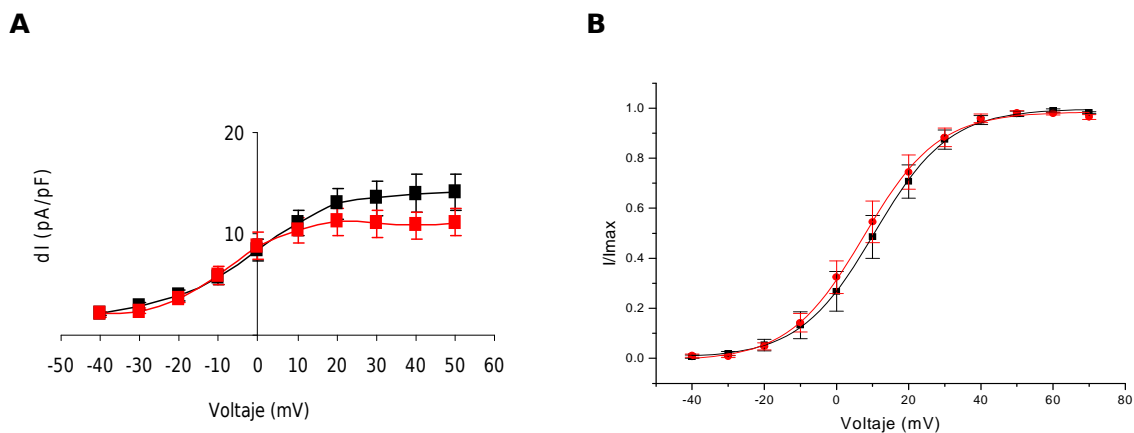


Figura 45. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de 50 μ M de GPant2A. A Representación de la densidad de la corriente hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μ M de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. B Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μ M de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media \pm error estándar).

La proteína G_{α_q} activa la PLC, con lo que el siguiente paso fue bloquear la PLC dializando 1 mM de Neomicina durante 10 minutos [figura 46].

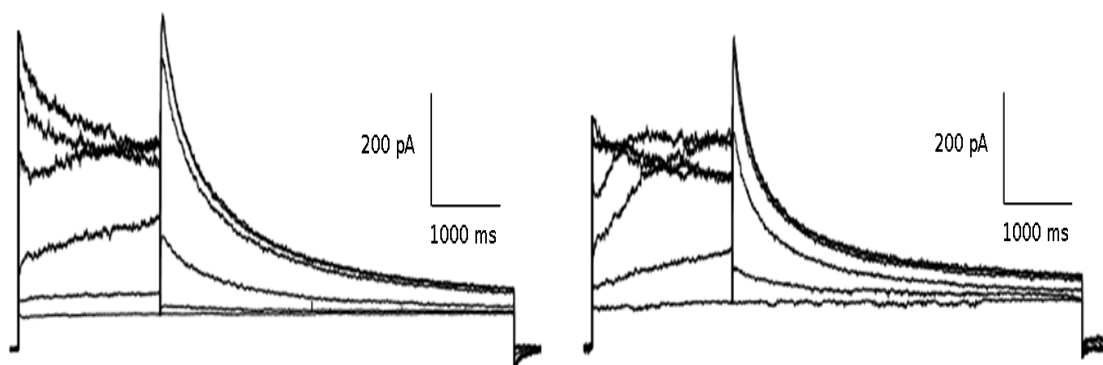


Figura 46. Registro de la corriente hERG en presencia de 1 mM de Neomicina. Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de 20 μ M de fenilefrina (derecha).

El bloqueo de la PLC provoca el mismo resultado que el bloqueo de la G_{α_q} , es decir, la estimulación del receptor α_{1A} -AR no altera el voltaje medio de activación ($2,72 \pm 2,11$

Resultados

vs. $-0,54 \pm 3,29$ mV, n.s.) [figura 47B], indicando su participación en esta ruta intracelular.

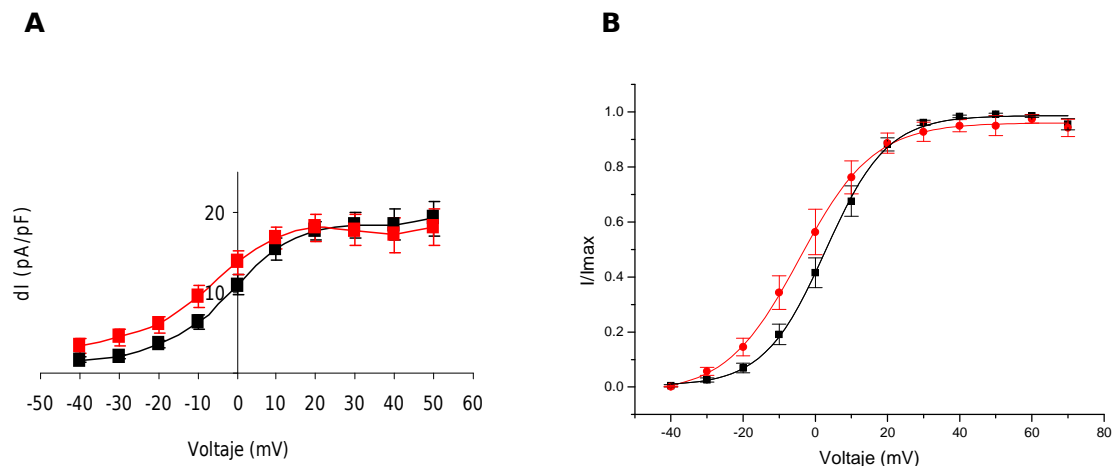


Figura 47. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de 1 mM de Neomicina. A Representación de la densidad de la corriente hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μ M de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μ M de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media \pm error estándar).

La PLC hidroliza PIP_2 en DAG e IP_3 y estos activan PKC. Para comprobar la participación de PKC se utilizó 10 μ M de Bisindolilmaleimida-1 (BIM-1) como inhibidor de la misma [figura 48].

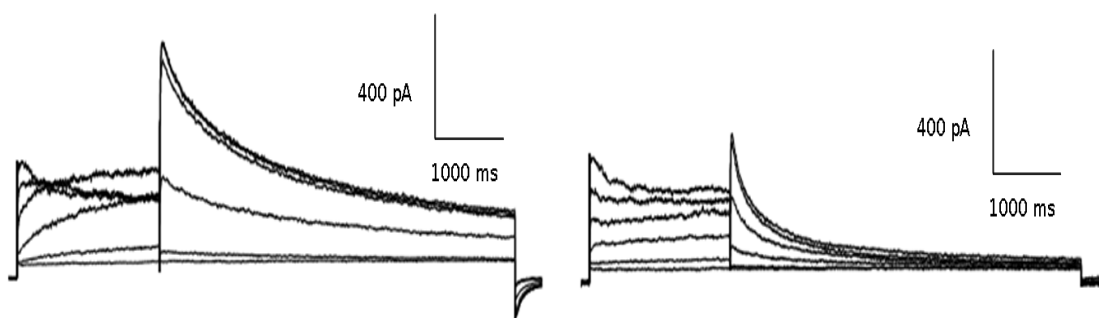


Figura 48. Registro de la corriente hERG en presencia de 10 μ M de BIM-1. Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de 20 μ M de fenilefrina (derecha).

En este caso, la estimulación del receptor α_{1A} -AR provoca pequeños cambios en la curva densidad de corriente-voltaje [figura 49A], pero sobre todo en el voltaje medio

de activación, desplazando la curva de activación hacia valores más despolarizados ($7,67 \pm 3,86$ vs. $19,75 \pm 3,45$ mV, $p=0,0007$) [figura 49B].

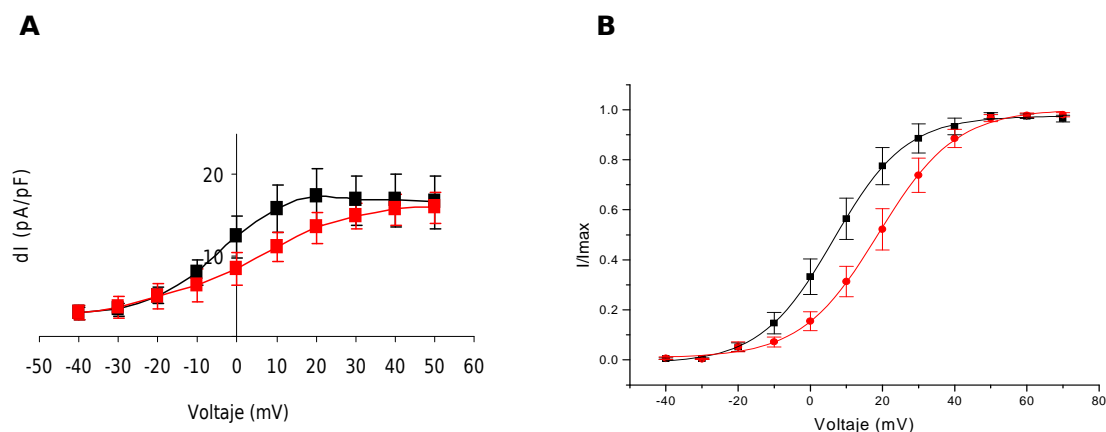


Figura 49. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de 10 μ M de BIM-1. **A** Representación de la densidad de la corriente hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μ M de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μ M de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media \pm error estándar).

La estimulación del receptor α_{1A} -AR provoca un desplazamiento del V_h de activación de 16 mV. Cuando PKC está bloqueada, el desplazamiento disminuye a 12 mV. Estos cuatro mV de diferencia podrían deberse a que PKC contribuye en la ruta de la regulación α_{1A} -adrenérgica del canal hERG, con lo que no sería descartada de la ruta intracelular.

Además de inhibir PKC, en este trabajo se quiso bloquear la participación de las tirosina quinasas para ver si la regulación del canal se veía afectada, ya que hay autores que han descrito la participación de éstas [Cayabyab & Schlichter, 2002]. Para ello se utilizó 50 μ M de Genisteina y se registró la corriente en las mismas condiciones que los grupos anteriores [figura 50].

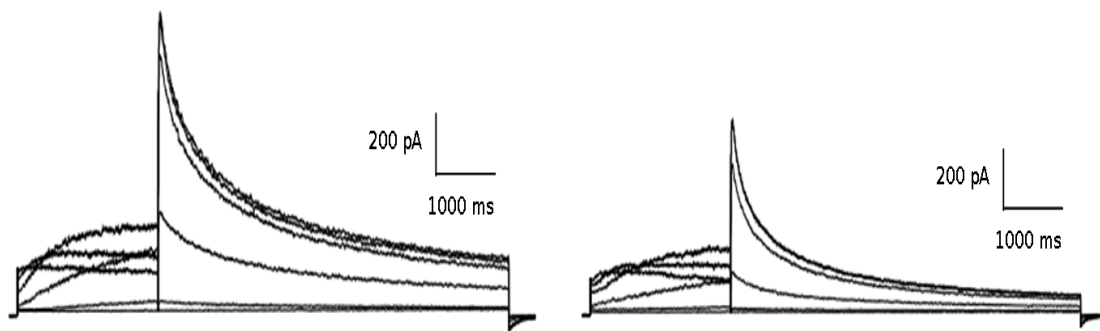


Figura 50. Registro de la corriente hERG en presencia de 50 μM de Genisteina. Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de 20 μM de fenilefrina (derecha).

El bloqueo de las tirosina quinasas no previene el efecto de la estimulación del receptor α_{1A} -AR sobre el voltaje medio de activación ($10,32 \pm 3,42$ vs. $25,88 \pm 3,01$ mV, $p=0,0006$) [figura 51B], mostrando que no son candidatas en la ruta de la regulación de la corriente por la estimulación del receptor α_{1A} -AR.

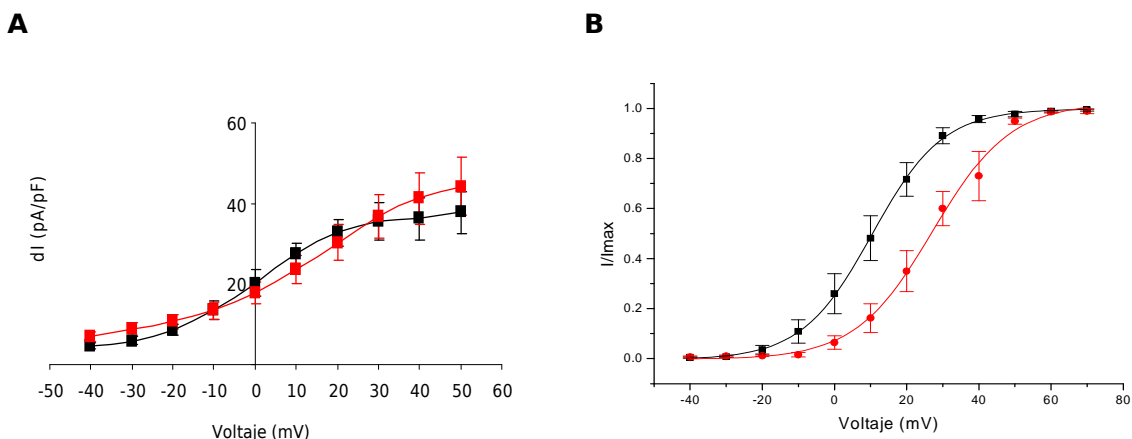


Figura 51. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de 50 μM de Genisteina. **A** Representación de la densidad de la corriente hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media \pm error estándar).

Además de registrar la corriente en presencia de bloqueantes de PKC y de tirosina quinasas, también se quiso observar mediante Western blot el grado de fosforilación del canal hERG. Para ello, las células previamente transfectadas con el canal hERG y el receptor α_{1A} -AR se separaron en dos grupos: control (sin estimulación) y estimuladas con 20 μM de fenilefrina. Después de la incubación, se procedió a la obtención de una muestra enriquecida en membranas celulares para realizar el Western blot con el fin

de analizar el grado de fosforilación del canal [figura 52]. Para ello, se utilizaron anticuerpos anti-P-Treonina, anti-P-Tirosina y anti-P-Serina.

En primer lugar, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con el anticuerpo anti-hERG y una vez reveladas se realizó un stripping para incubarlas con los anticuerpos contra los distintos residuos fosforilados.

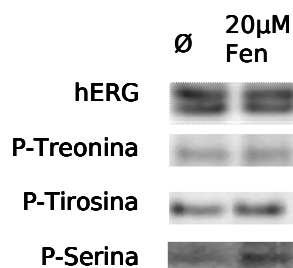


Figura 52. Fosforilación del canal hERG. Western blot del canal hERG y de P-Treonina, P-Tirosina y P-Serina. Se pueden observar las dos bandas que corresponden a la forma madura e inmadura del canal. La forma madura del canal ya sea en condiciones control (Ø) o tratadas con fenilefrina (20 µM Fen) se encuentra fosforilada en residuos de Treonina, de Tirosina y de Serina.

Como se observa en la figura 52, el canal se encuentra fosforilado tanto en ausencia (Ø) como en presencia de fenilefrina (20 µM Fen) y la banda que se encontró fosforilada es la correspondiente a la forma madura del canal hERG.

Aunque a simple vista no se observaron diferencias significativas en el grado de fosforilación entre el grupo control y las tratadas, la intensidad de las distintas bandas fue analizada mediante el analizador digital de imagen Molecular Imaging Software de Kodak. Posteriormente, los datos obtenidos fueron comparados mediante el test “*t*” de Student, no obteniendo diferencias estadísticamente significativas en el grado de fosforilación entre los grupos (100%±18,44 vs. 87,40%±18,29, n.s. para P-Treonina; 100%±17,50 vs. 100%±32,84, n.s. para P-Tirosina; 100%±8,33 vs. 133,33%±22, n.s. para P-Serina).

La activación de la PLC hidroliza PIP₂ en IP₃ y DAG. Basándose en la hipótesis de algunos autores [Bian *et al.* 2001; Bian *et al.*, 2004], los cuales indican que la modificación de concentración de PIP₂ puede ser la causante de la regulación de la corriente, se neutralizó PIP₂ utilizando 80 nM de anticuerpo contra él [figura 53].

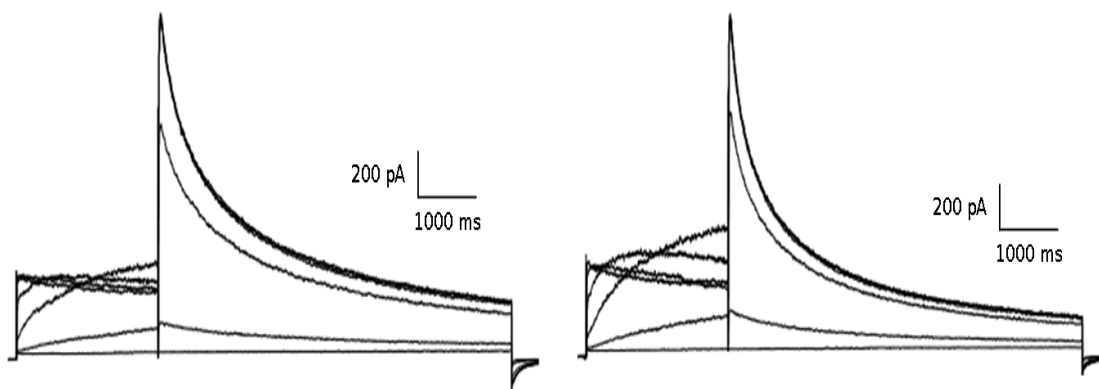


Figura 53. Registro de la corriente hERG en presencia de 80 nM de anti-PIP₂. Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de 20 μM de fenilefrina (derecha).

PIP₂ parece estar implicado en la regulación de la corriente hERG por el receptor α_{1A}-AR, ya que una vez eliminada su disponibilidad con el anticuerpo el voltaje medio de activación no varía al aplicar fenilefrina (0,18±2,64 vs. -0,34±5,12 mV, n.s.) [figura 54B]. El anticuerpo evita la hidrólisis de PIP₂ de manera que la vía intracelular se ve bloqueada. En consecuencia, no se ve efecto de la estimulación del receptor α_{1A}-AR sobre el V_h de activación de la corriente hERG, ya que se mantendría la posible interacción entre PIP₂ y el canal sugiriendo que es el consumo de PIP₂ lo que regula la corriente hERG por el receptor α_{1A}-AR.

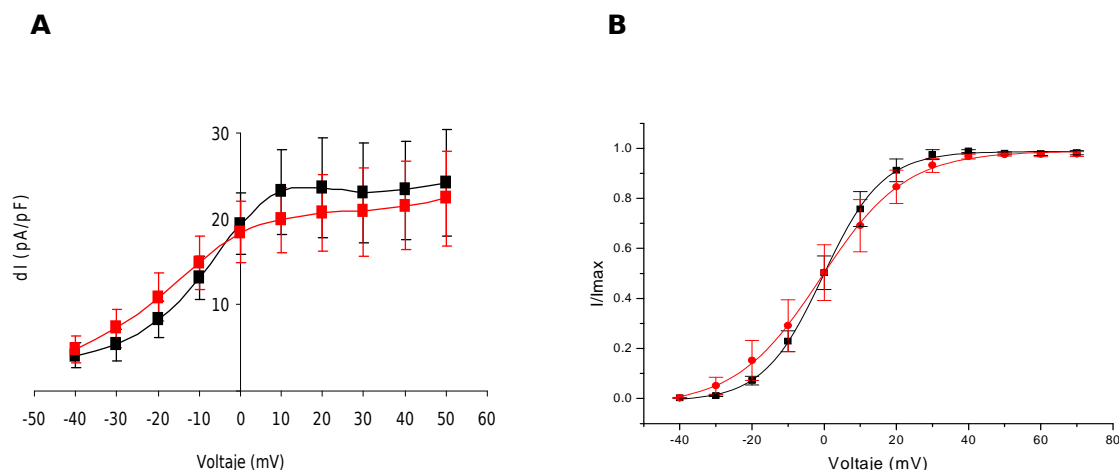


Figura 54. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de 80 nM de anti-PIP₂. **A** Representación de la densidad de la corriente hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media ± error estándar).

Visto que la depleción de PIP_2 puede ser la causante de la regulación, se quiso comprobar qué sucedía con un suplemento del mismo. Para ello, añadimos $10\ \mu\text{M}$ de un análogo no-hidrolizable de PIP_2 (diC8-PIP_2) a la solución utilizada en la pipeta de registro. Una vez pasados los 10 minutos se registró la corriente en ausencia y en presencia de la fenilefrina [figura 55].

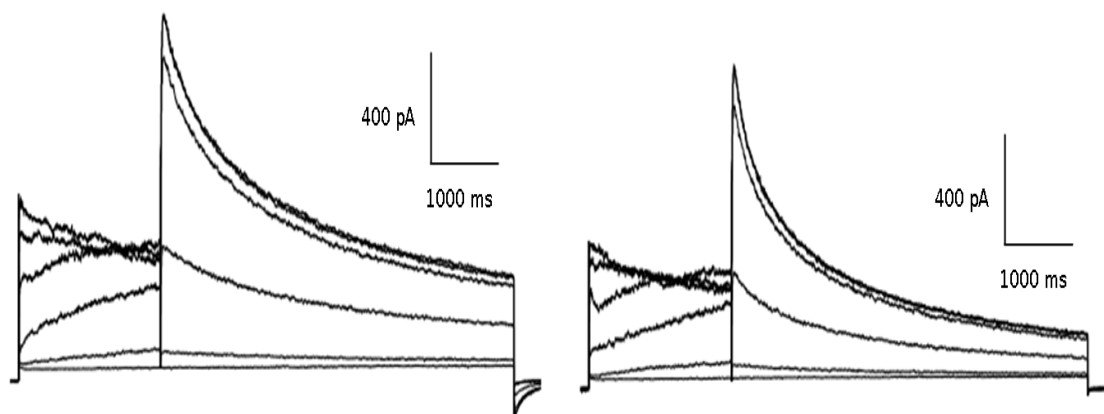


Figura 55. Registro de la corriente hERG en presencia de $10\ \mu\text{M}$ de diC8-PIP_2 . Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de $20\ \mu\text{M}$ de fenilefrina (derecha).

El uso del análogo no-hidrolizable de PIP_2 no impide que la estimulación del receptor α_{1A} -AR active $G_{\alpha q}$ y PLC, pero esta última no puede hidrolizarlo y provocar la activación de PKC. Suponiendo que es el consumo de PIP_2 el causante de la regulación de la corriente hERG por el receptor α_{1A} -AR, podría esperarse que la presencia de diC8-PIP_2 impida el desplazamiento de la curva de activación de la corriente hacia valores más positivos tras la aplicación de fenilefrina.

Como se observa en la figura 56B, el voltaje medio de activación no ha sido modificado por la estimulación del receptor α_{1A} -AR ($10,23 \pm 2,25$ vs. $9,21 \pm 2,99$ mV, n.s.), sugiriendo que debido a ese suplemento la concentración de PIP_2 no varía y por lo tanto no se ve efecto de la estimulación del receptor α_{1A} -AR sobre el canal hERG.

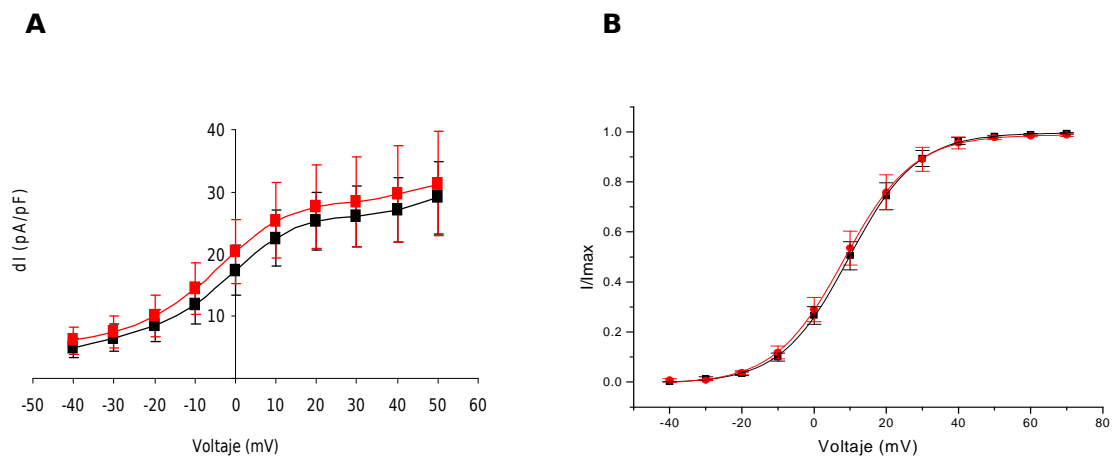


Figura 56. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente hERG en presencia de 10 µM de diC8-PIP₂. **A** Representación de la densidad de la corriente hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 µM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 µM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media ± error estándar).

Los datos obtenidos hasta este punto sugieren que la regulación de la corriente hERG por el receptor α_{1A} -AR está mediada por la proteína $G_{\alpha q}$. Esta proteína G activa la PLC hidrolizando así PIP₂ en DAG e IP₃. El consumo de PIP₂ y la fosforilación del canal por PKC regulan la activación del canal modificando así la corriente hERG.

Para corroborar los resultados obtenidos hasta el momento, se decidió utilizar dos mutantes del canal hERG, el D-hERG y el NTK-hERG. El mutante D-hERG está exento de la unión a PIP₂ ya que muestra una delección de los aminoácidos 883-894 del C-terminal [Bian *et al.*, 2004]. El mutante NTK-hERG tiene una delección de los aminoácidos 2-354 del N-terminal, con lo cual está exento de los residuos críticos para la fosforilación por PKC [Cockerill *et al.*, 2007].

4.6 Efecto de la estimulación del receptor α_{1A} -AR sobre la corriente D-hERG

Como hemos mencionado, el mutante D-hERG está exento de la unión a PIP₂, con lo cual, si esta interacción es importante en la regulación de la corriente por el receptor α_{1A} -AR la vía intracelular estará bloqueada no viéndose efecto de la estimulación del receptor α_{1A} -AR.

Siguiendo el mismo procedimiento, en primer lugar se transfectaron las células HEK-293 con 4 µg de DNA del canal D-hERG, 1 µg de DNA del receptor α_{1A} -AR y 0,2 µg de

DNA de GFP. Se utilizó una cantidad mayor de DNA del canal ya que las células mostraban una corriente muy pequeña con menor cantidad de DNA.

Se realizó un Western blot con el fin de detectar el canal en la membrana plasmática [figura 57] y después se registró la corriente utilizando el mismo protocolo que en los casos anteriores [figura 58, derecha].

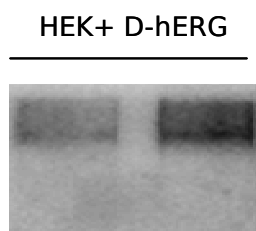


Figura 57. Detección del canal D-hERG en las células HEK-293. Detección del canal D-hERG en células HEK-293 transfectadas con el mutante (duplicado).

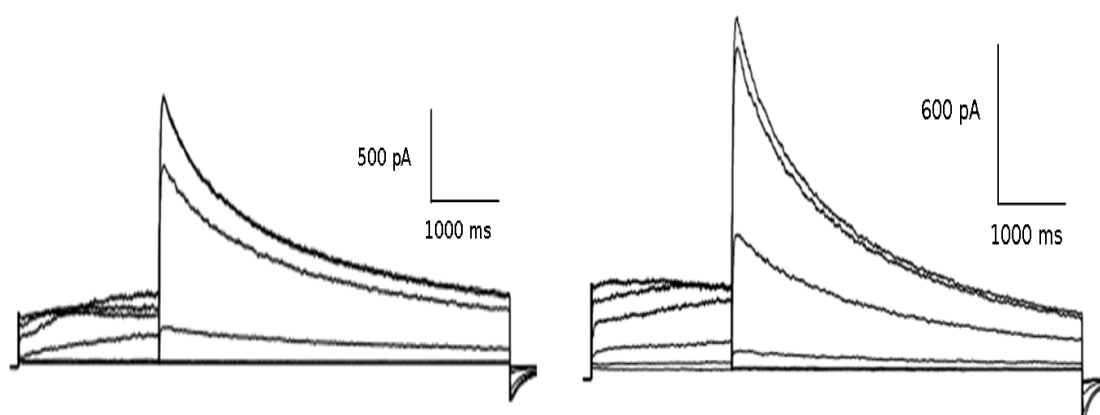


Figura 58. Registro de la corriente hERG y D-hERG. Registro de la corriente hERG (izquierda) vs. D-hERG (derecha).

La curva densidad de corriente-voltaje de la corriente D-hERG es muy parecida a la de hERG nativa. La curva de activación es un poco más negativa que la corriente hERG nativa ($10,92 \pm 1,93$ vs. $7,92 \pm 3,00$ mV, n.s.). La corriente D-hERG muestra una deactivación más lenta no significativa que la que muestra el canal hERG nativo ($1331,1 \pm 74,41$ vs. $1633,9 \pm 155,24$ ms, n.s.) [figura 59].

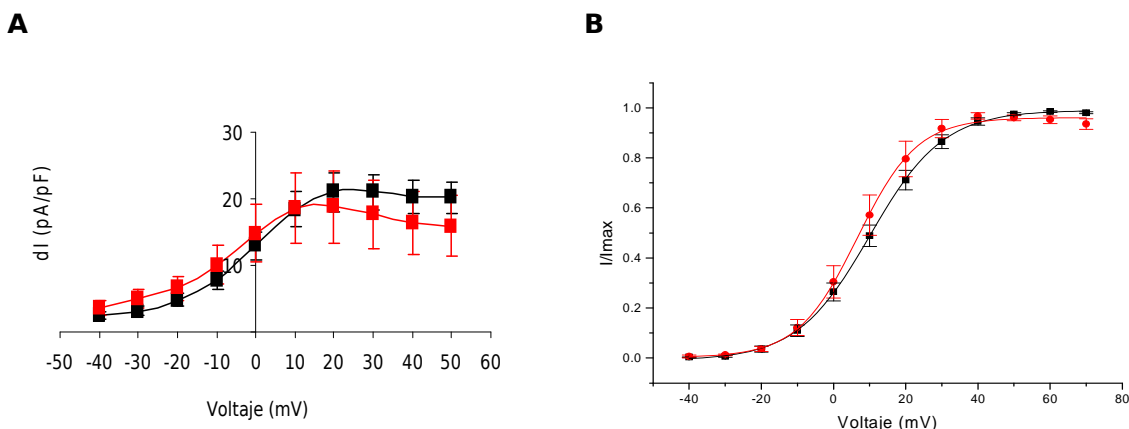


Figura 59. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de las corrientes hERG y D-hERG. **A** Representación de la densidad de la corriente hERG (trazo negro) y de la D-hERG (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima de hERG (trazo negro) y de D-hERG (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media \pm error estándar).

En cuanto al efecto de la fenilefrina sobre la regulación del canal D-hERG por el receptor α_{1A} -AR, en la figura 60 se observa la rápida deactivación provocada por la fenilefrina sobre el canal.

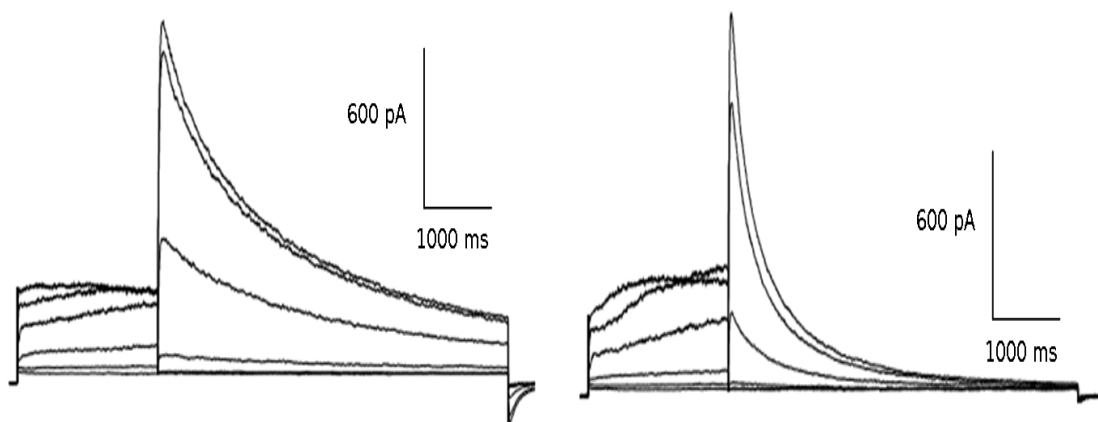


Figura 60. Registro de la corriente D-hERG. Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de 20 μ M de fenilefrina (derecha).

La curva densidad de corriente-voltaje está desplazada a la derecha en presencia de fenilefrina. La curva de activación en cambio, se ve desplazada hacia valores despolarizados ($7,92 \pm 3,00$ vs. $14,92 \pm 2,87$ mV, $p < 0,0001$) [figura 61].

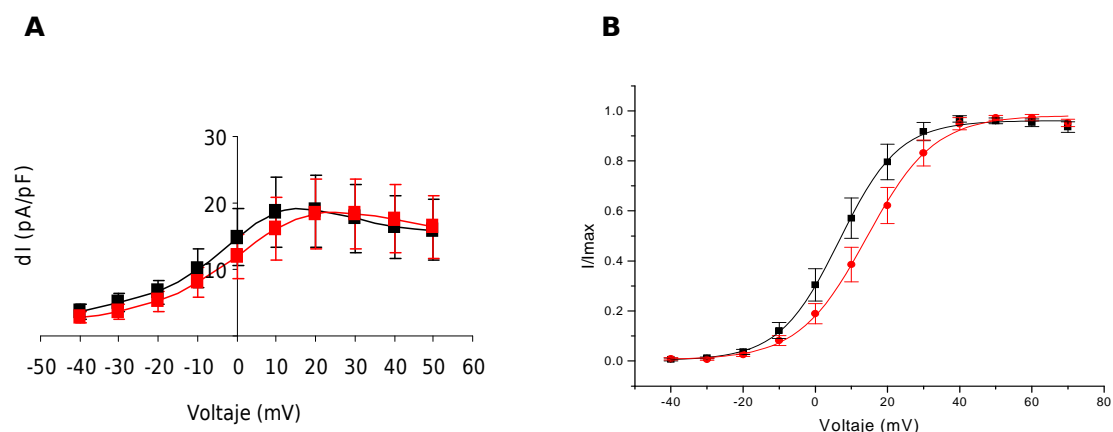


Figura 61. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente D-hERG. **A** Representación de la densidad de la corriente D-hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media \pm error estándar).

La estimulación del receptor α_{1A} -AR provoca un desplazamiento del voltaje medio de activación de la corriente D-hERG menor que el de la corriente hERG. Este dato apoya a los resultados obtenidos con el canal hERG nativo ya que a este mutante le falta el punto de unión a PIP_2 , sugiriendo que esta unión tiene importancia en la regulación del canal hERG.

Con la intención de corroborar que el canal mutado no tiene unión a PIP_2 , se utilizó el análogo de PIP_2 , diC8-PIP_2 , se estimuló el receptor α_{1A} -AR con fenilefrina y se registró la corriente [figura 62].

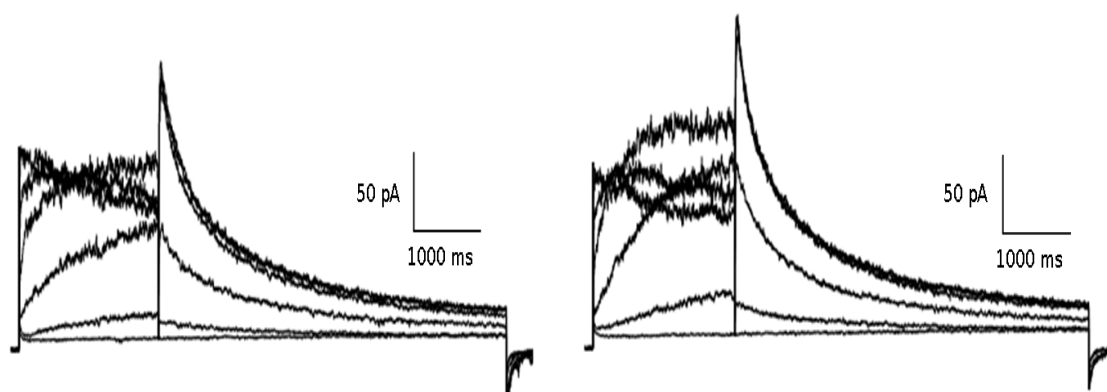


Figura 62. Registro de la corriente D-hERG en presencia de 10 μM de diC8-PIP_2 . Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de 20 μM de fenilefrina (derecha).

Resultados

La curva densidad de corriente-voltaje es prácticamente igual en presencia del agonista del receptor α_{1A} -AR. La curva de activación muestra que la estimulación del receptor α_{1A} -AR apenas provoca desplazamiento del voltaje medio de activación ($13,32 \pm 4,34$ vs. $11,48 \pm 4,52$ mV, $p=0,3567$) [figura 63].

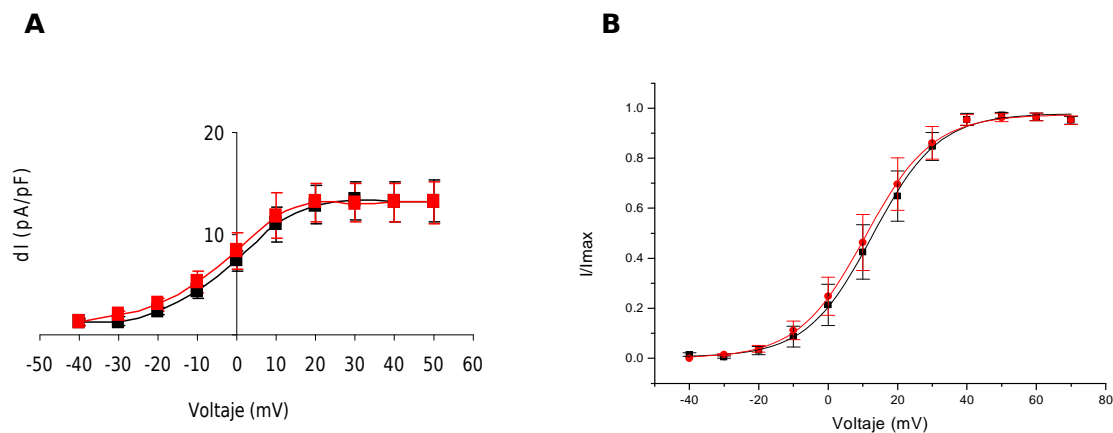


Figura 63. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente D-hERG en presencia de 10 µM de diC8-PIP₂. **A** Representación de la densidad de la corriente D-hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 µM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 µM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media ± error estándar).

Estos resultados indican que la interacción entre el canal y PIP₂ contribuye en la regulación de la corriente hERG por el receptor α_{1A} -AR.

Estudiando la corriente hERG nativa, al bloquear PKC, se vio un desplazamiento del V_h de activación de 4 mV menos comparándola con la corriente sin utilizar ningún bloqueante. Para comprobar si esa pequeña diferencia tiene importancia en la regulación de la corriente hERG, bloqueamos PKC con BIM-1 en las células transfectadas con el mutante D-hERG y estimulamos el receptor α_{1A} -AR como en los casos anteriores [figura 64].

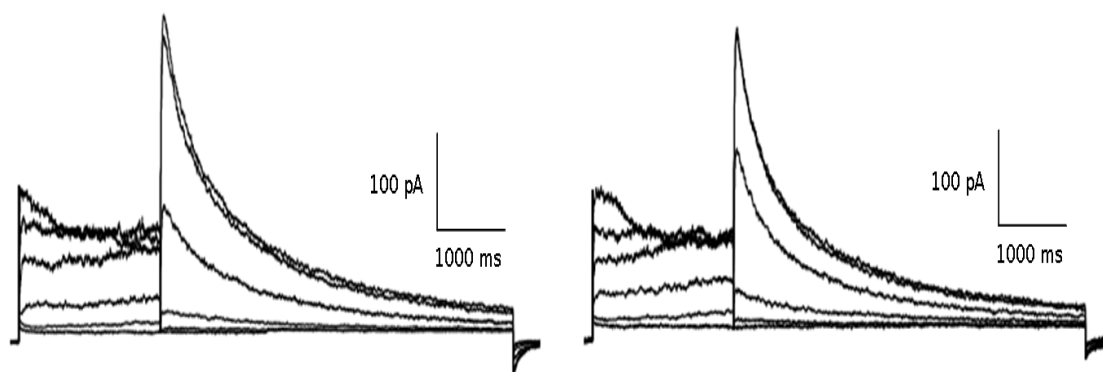


Figura 64. Registro de la corriente D-hERG en presencia de 10 μM de BIM-1. Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de 20 μM de fenilefrina (derecha).

La fenilefrina acelera la deactivación de la corriente hERG como en todos los casos anteriores. La densidad de corriente-voltaje de la corriente D-hERG aumenta con la estimulación de fenilefrina debido a una mayor contribución de las corrientes endógenas [figura 65A]. El voltaje medio de activación de la corriente D-hERG no se desplaza hacia valores más positivos debido al bloqueo de PKC ($12,47 \pm 3,86$ vs. $11,80 \pm 3,89$ mV, $p=0,7054$) [figura 65B].

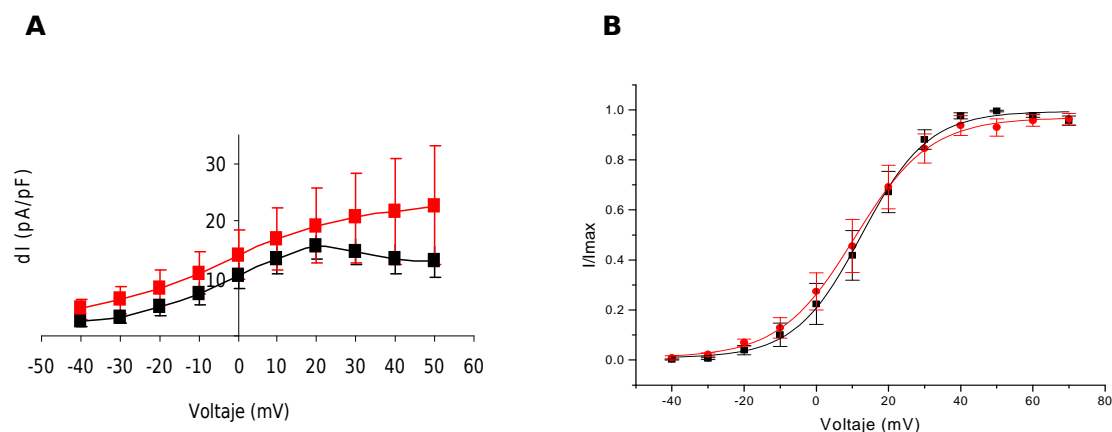


Figura 65. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente D-hERG en presencia de 10 μM de BIM-1. Representación de la densidad de la corriente D-hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media \pm error estándar).

Estos resultados indican que la fosforilación del canal por PKC contribuye a la regulación de la corriente hERG por el receptor α_{1A} -AR.

Por tanto, el mutante D-hERG demuestra que tanto PIP_2 como PKC intervienen en la regulación de la corriente hERG por el receptor α_{1A} -AR, aunque la participación de ambos sea en diferente grado [figura 66].

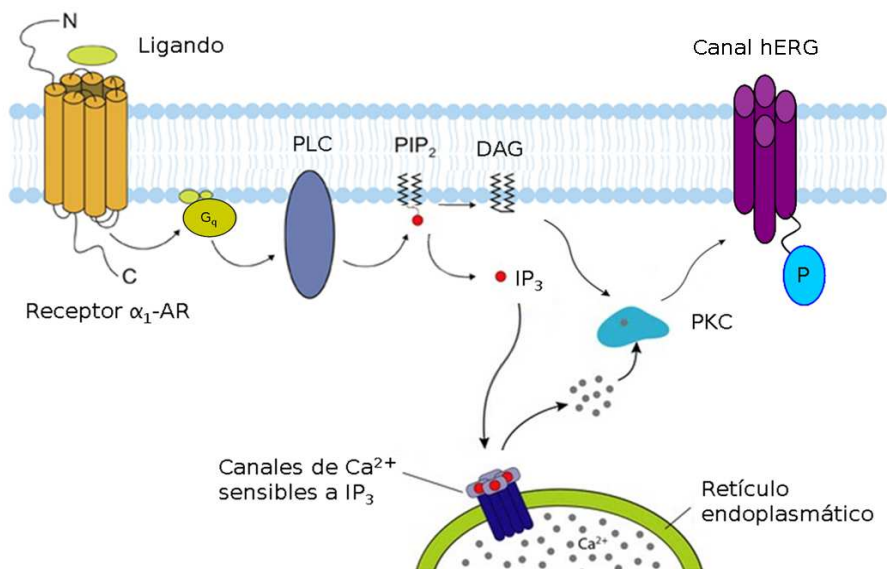


Figura 66. Representación esquemática de la vía de regulación de la corriente D-hERG. La estimulación del receptor α_{1A} -AR provoca la activación de la proteína $G_{\alpha q}$, la cual activa PLC que hidroliza PIP_2 en DAG e IP_3 . La activación de PKC regula la corriente D-hERG.

4.7 Efecto de la estimulación del receptor α_{1A} -AR sobre la corriente NTK-hERG

El otro mutante utilizado fue el N-Truncated-hERG (NTK-hERG). A esta proteína le faltan los aminoácidos 2-354 del N-terminal, gran parte del amino-terminal, además está exento de los residuos críticos para la fosforilación por PKC. Se sabe que este terminal es muy importante en el gating del canal y por ese motivo la delección de una parte del mismo tiene una repercusión importante en la corriente.

Como en el caso anterior se transfectaron las células HEK-293 con 4 μg de DNA del canal NTK-hERG, 1 μg de DNA del receptor α_{1A} -AR y 0,2 μg de DNA de GFP y se detectó mediante Western blot [figura 67].

HEK + NTK-hERG

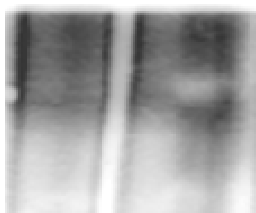


Figura 67. Detección del canal NTK-hERG en las células HEK-293. Detección del canal NTK-hERG en células HEK-293 transfectadas con el mutante (duplicado).

Esta corriente es muchísimo más pequeña que la corriente nativa y se comporta totalmente diferente al canal nativo. De hecho, la corriente se encuentra activa a potenciales en los cuales el canal nativo no lo está. Esto, nos llevó a cambiar el potencial de holding del protocolo a -40 mV, ya que a -80 mV este canal se encuentra abierto.

La figura 68 muestra la gran diferencia existente entre la corriente nativa y la corriente NTK-hERG. La mayor diferencia está en la rápida deactivación que tiene el mutante, sugiriendo que el N-terminal participa en las propiedades biofísicas del canal. Este dato no ha sido analizado en el mutante debido a que el ajuste no se realizó bien.

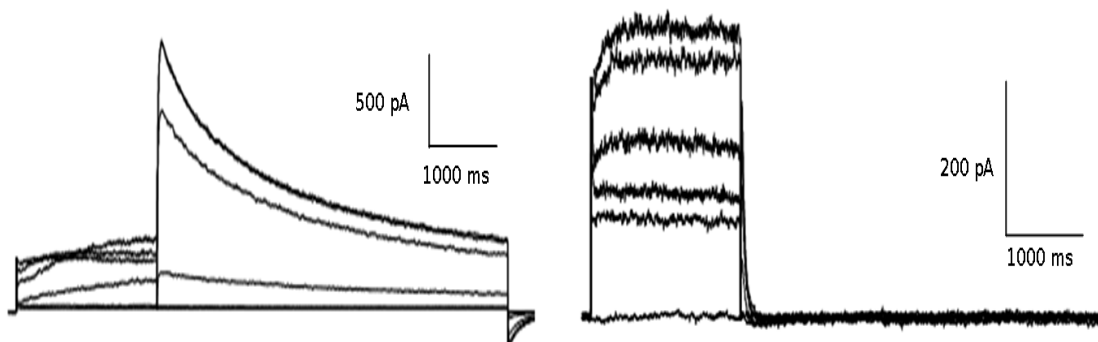


Figura 68. Registro de la corriente hERG y NTK-hERG. Registro de la corriente hERG (izquierda) vs. NTK-hERG (derecha).

Por otro lado, la curva densidad de corriente-voltaje muestra que la corriente NTK-hERG rectifica mucho más que la corriente nativa además de activarse antes [figura 69A]. En cuanto al voltaje medio de activación, el mutante lo tiene más hiperpolarizado ($10,92 \pm 1,93$ vs. $5,49 \pm 3,07$ mV, n.s.) [figura 69B].

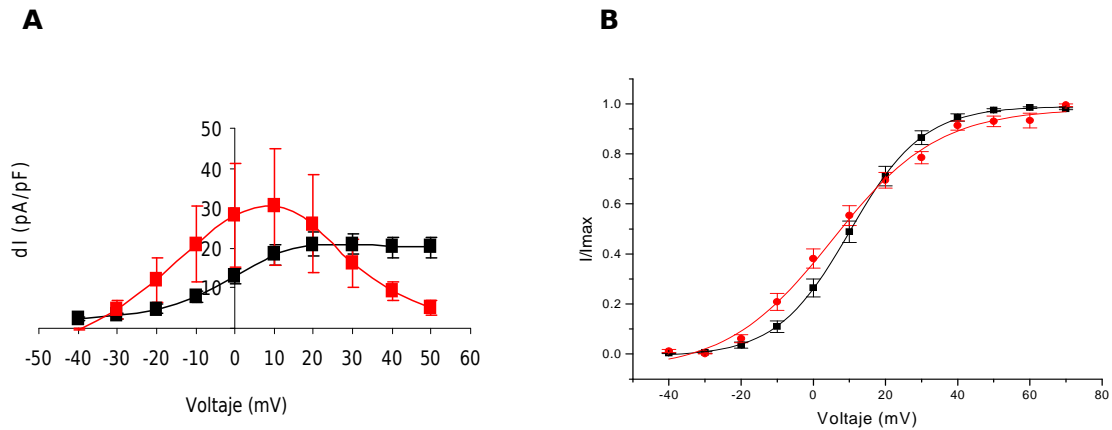


Figura 69. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de las corrientes hERG y NTK-hERG. **A** Representación de la densidad de la corriente hERG (trazo negro) y de la NTK-hERG (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima de hERG (trazo negro) y de NTK-hERG (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media \pm error estándar).

Una vez observados los cambios entre la corriente nativa y la de NTK-hERG, se estudió el efecto de la fenilefrina sobre la corriente NTK-hERG [figura 70].

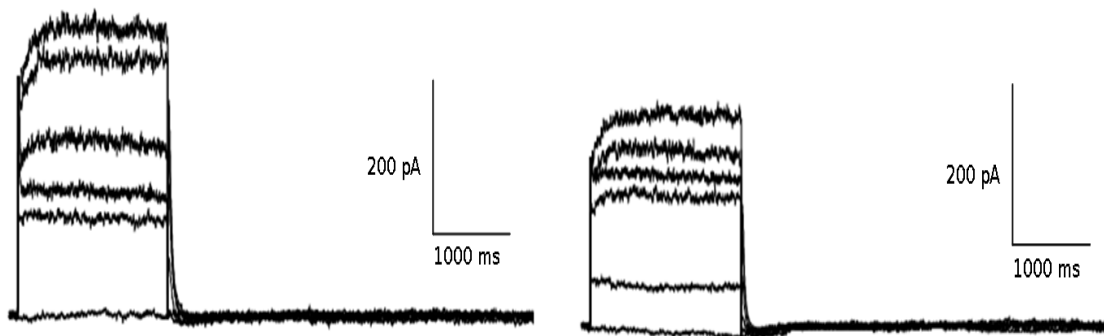


Figura 70. Registro de la corriente NTK-hERG. Registro de la corriente en ausencia (izquierda) vs. presencia de 20 μ M de fenilefrina (derecha).

La curva densidad corriente-voltaje disminuye en presencia de fenilefrina, manteniendo la rectificación de la corriente aunque las corrientes endógenas aumentan a potenciales positivos [figura 71A]. La curva de activación se desplaza significativamente hacia valores más positivos en presencia de la fenilefrina ($5,49 \pm 3,07$ vs. $17,85 \pm 0,47$ mV, $p < 0,0001$), sugiriendo de nuevo la participación de PIP_2 ya que este mutante no presenta los residuos críticos para la fosforilación por PKC. Con lo cual, el efecto de la estimulación del receptor sobre la corriente se debe a la unión entre PIP_2 y el canal [figura 71B].

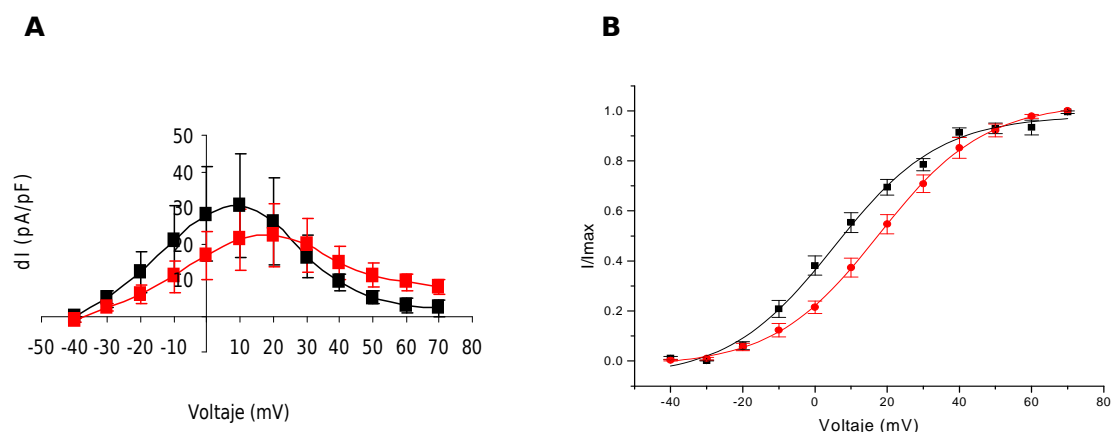


Figura 71. Curva densidad de corriente-voltaje (A) y curva de activación (B) de la corriente NTK-hERG. **A** Representación de la densidad de la corriente NTK-hERG en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. **B** Representación de la curva de activación normalizada a la corriente máxima en ausencia (trazo negro) y en presencia de 20 μM de fenilefrina (trazo rojo) respecto al voltaje. (Media \pm error estándar).

En el caso de este mutante, no se muestran los datos obtenidos con el bloqueante de PKC y el análogo de PIP_2 ya que en los 10 minutos de diálisis se reducía demasiado la corriente haciendo imposible el posterior análisis de la corriente.

Los resultados obtenidos con el mutante NTK-hERG nos indican que en la regulación de la corriente hERG por el receptor α_{1A} -AR el consumo de PIP_2 regula el canal mediante el punto de unión entre ambos [figura 72].

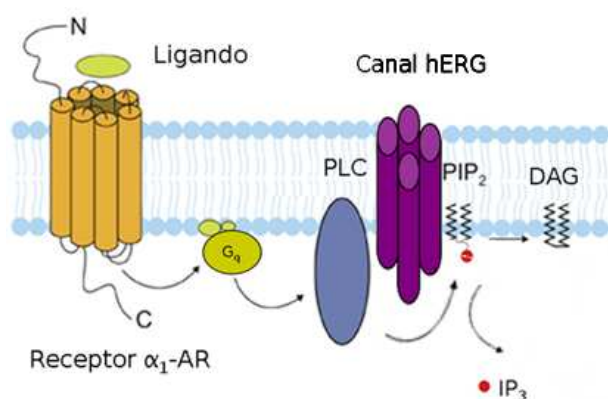


Figura 72. Representación esquemática de la vía de regulación de la corriente NTK-hERG. La estimulación del receptor α_{1A} -AR provoca la activación de la proteína G_{α_q} , la cual activa PLC que hidroliza PIP_2 en DAG e IP_3 . El consumo de PIP_2 provoca la regulación de la corriente NTK-hERG mediada por la interacción entre PIP_2 y el canal.

En las siguientes tablas aparecen resumidos los datos de la deactivación y del voltaje medio de activación de todos los grupos experimentales.

Resultados

Tabla 2. Valores de la deactivación de la corriente hERG. Media y error estándar de la constante de tiempo de deactivación (τ) (ms) de la corriente hERG a +10 mV de todos los grupos experimentales en condiciones control, en presencia de 20 μ M de fenilefrina o de 100nM de 5-Metil-Urapidil. *p* es la probabilidad del test “*t*” de Student apareado y *n* es el número de células.

Grupos Experimentales	Control	20 μ M Fenilefrina	100 nM 5-Metil-Urapidil	<i>p</i>	<i>n</i>
Control	1331,3 \pm 74,41	638,97 \pm 43,93		<0,0001	29
Sin receptor	1420,7 \pm 98,71	998,99 \pm 85,06		<0,0001	18
Sin receptor	1666 \pm 129,89		1294,5 \pm 130,16	<0,0001	10
100 nM 5-Metil-Urapidil	1416,6 \pm 174,14	892,92 \pm 121,63		0,0002	8
MinK	2015,6 \pm 314,43	757,19 \pm 99,27		0,0028	7
MiRP1	1450,3 \pm 117,65	923,86 \pm 119,18		<0,0001	13
50 μM GPant2A	1357,8 \pm 103,85	1051,7 \pm 91,16		0,0021	9
1 mM Neomicina	1079,3 \pm 67,24	842,74 \pm 64,96		<0,0001	9
10 μM BIM-1	1891,7 \pm 217,04	1096,5 \pm 153,98		0,0008	10
50 μM Genisteina	1064,6 \pm 127,02	577,76 \pm 94,72		0,0048	9
80 nM Anti-PIP₂	1081,6 \pm 145,87	831,28 \pm 138,63		0,0026	7
10 μM diC8-PIP₂	1379,6 \pm 156,84	1175,8 \pm 462,21		0,0061	11

Tabla 3. Valores del voltaje medio de activación de la corriente hERG. Media y error estándar del voltaje medio de activación (mV) de la corriente hERG de todos los grupos experimentales en condiciones control, en presencia de 20 μ M de fenilefrina o 100nM de 5-Metil-Urapidil. *p* es la probabilidad del test “*t*” de Student apareado y *n* es el número de células.

Grupos Experimentales	Control	20 μM Fenilefrina	100 nM 5-Metil-Urapidil	p	n
Control	10,92 \pm 1,93	26,77 \pm 2,15		0,0001	37
Sin receptor	-1,73 \pm 2,37	-4,00 \pm 2,54		>0,05	18
Sin receptor	8,81 \pm 2,07		8,00 \pm 2,23	>0,05	10
100 nM 5-Metil Urapidil	8,45 \pm 4,94	15,05 \pm 5,49		0,013	9
MinK	14,03 \pm 4,12	27,72 \pm 3,16		0,0017	7
MiRP1	-1,29 \pm 3,26	12,24 \pm 3,64		<0,0001	13
50 μM GPant2A	10,48 \pm 3,67	8,54 \pm 3,18		>0,05	9
1 mM Neomicina	2,72 \pm 2,11	-0,54 \pm 3,29		>0,05	9
10 μM BIM-1	7,67 \pm 3,86	19,75 \pm 3,45		0,0007	10
50 μM Genisteina	10,32 \pm 3,42	25,88 \pm 3,01		0,0006	9
80 nM Anti-PIP₂	0,18 \pm 2,64	-0,34 \pm 5,12		>0,05	8
10 μM diC8-PIP₂	10,23 \pm 2,25	9,21 \pm 2,99		>0,05	11

Resultados

Tabla 4. Valores de la deactivación de la corriente D-HERG. Media y error estándar de la constante de tiempo de deactivación (τ) (ms) de la corriente D-HERG a +10 mV de todos los grupos experimentales en condiciones control y en presencia de 20 μ M de fenilefrina. p es la probabilidad del test “ t ” de Student apareado y n es el número de células.

Grupos Experimentales	Control	20 μ M Fenilefrina	p	n
Control	1633,9 \pm 155,24	891,60 \pm 82,53	<0,0001	10
10 μ M diC8-PIP ₂	1085,5 \pm 140,39	884,20 \pm 103,36	0,0091	6
10 μ M BIM-1	1183,66 \pm 157,32	964,65 \pm 138,40	0,0245	7

Tabla 5. Valores del voltaje medio de activación de la corriente D-HERG y NTK-HERG. Media y error estándar del voltaje medio de activación (mV) de la corriente D-HERG de todos los grupos experimentales en condiciones control y en presencia de 20 μ M de fenilefrina. p es la probabilidad del test “ t ” de Student apareado y n es el número de células.

Mutante hERG	Grupos Experimentales	Control	20 μ M Fenilefrina	p	n
D-HERG	Control	7,92 \pm 3,00	14,92 \pm 2,87	<0,0001	11
D-HERG	10 μ M diC8-PIP ₂	13,32 \pm 4,34	11,48 \pm 4,52	0,3567	6
D-HERG	10 μ M BIM-1	12,47 \pm 3,86	11,80 \pm 3,89	0,7054	7
NTK-HERG	Control	5,49 \pm 3,07	17,85 \pm 0,47	<0,0001	6

5. Discusión

5 DISCUSIÓN

El Sistema Nervioso Simpático regula la duración del potencial de acción cardiaco modulando la amplitud de distintas corrientes repolarizantes de potasio. La corriente repolarizante de potasio más importante en el corazón humano es la I_{Kr} , acarreada por el canal hERG.

Mientras que la regulación del canal hERG mediada por la estimulación de los receptores β -AR se conoce bastante bien [Tutor *et ál.*, 2006], no hay nada claro sobre la regulación del canal por parte de los receptores α_{1A} -AR. En el presente trabajo se estudia la regulación del canal hERG por el receptor α_{1A} -AR ya que es el que predomina en el corazón humano.

De acuerdo con otros autores, nuestros resultados muestran que la activación del receptor α_1 -AR con fenilefrina provoca una disminución de la corriente I_{Kr} /hERG [Heath & Terrar, 2000; Bian *et ál.*, 2001; Karle *et ál.*, 2002, Thomas *et ál.*, 2003; Thomas *et ál.*, 2004b; Bian *et ál.*, 2004]. También provoca la pérdida de la rectificación de la corriente hERG. Por otro lado, acelera la deactivación de la corriente hERG [Thomas *et ál.*, 2004b] y desplaza el voltaje medio (V_h) de activación hacia potenciales más positivos [Bian *et ál.*, 2004].

Después de ver los efectos que la fenilefrina tiene sobre la corriente hERG, comprobamos cuál de estos efectos estaba mediado por la estimulación del receptor α_{1A} -AR y cuál por efecto directo de la fenilefrina sobre el canal.

Para ello, en primer lugar estudiamos el efecto de la fenilefrina sobre el canal sin transfectar las células con el receptor α_1 -AR. Se vio que la deactivación se acelera en presencia del agonista del receptor, sugiriendo un bloqueo directo sobre el canal hERG. También se ha observado que en presencia de la fenilefrina la corriente recupera parte de la rectificación. Por último, la curva de activación no se ve desplazada en presencia de fenilefrina y tampoco se ve alterada la amplitud de la corriente.

Otro grupo de experimentos se realizó en presencia del receptor α_{1A} -AR y del bloqueante específico del mismo 5-Metil-Urapidil. En este caso, se observa una aceleración de la deactivación del canal hERG, una pérdida de la rectificación de la corriente hERG, una disminución de la amplitud de la corriente y un desplazamiento del V_h de activación. Todos estos efectos, a excepción de la aceleración de la

deactivación, se produjeron en mucha menor medida que en ausencia del bloqueante del receptor.

En conclusión, estos resultados sugieren que la aceleración de la deactivación se debe al bloqueo directo del canal y que la pérdida de rectificación se debe al aumento de la contribución de las corrientes endógenas debido a la estimulación del receptor con su agonista. En cuanto a la disminución de la corriente, no se puede concluir cuál es el efecto del receptor sobre la amplitud de corriente ya que en las células HEK-293 la corriente hERG muestra run-down, es decir, con el tiempo la amplitud de la corriente disminuye.

Finalmente, el desplazamiento del V_h de activación de la corriente es el único parámetro que se puede achacar exclusivamente a la estimulación del receptor α_{1A} -AR. Por lo tanto, en nuestro estudio el parámetro que se ha analizado como consecuencia de la regulación de la corriente hERG por el receptor α_{1A} -AR es el voltaje medio de activación.

5.1 Modulación por proteínas accesorias

En miocitos cardiacos, la corriente I_{kr} parece estar formada por la subunidad α formadora de poro (hERG) asociada a una proteína accesoria todavía sin identificar, ya que las propiedades biofísicas que muestra la corriente nativa son similares pero no idénticas a las de la corriente hERG obtenida en los sistemas heterólogos. Las candidatas a formar parte de esta corriente son las proteínas MinK y MiRP1, de la familia KCNE.

Aunque hay varios trabajos publicados sobre la existencia de esta asociación entre la proteína hERG y estas proteínas accesorias en sistemas heterólogos, existe gran controversia entre los grupos (revisado por McCrossan & Abbott, 2004). Esas diferencias pueden deberse a que los sistemas heterólogos utilizados son distintos, ya que se han utilizado ovocitos de *Xenopus*, células CHO, HEK-293 y AT-1. Lo que todavía no se ha estudiado es la posible interacción de estas proteínas con hERG en el sistema nativo.

En estudios previos realizados en células CHO la amplitud de corriente en configuración de célula entera aumenta cuando el canal se coexpresa con MinK. Aumenta la sensibilidad al voltaje de activación y de inactivación a voltajes intermedios; no hay diferencias significativas ni en la constante de tiempo de activación ni de la deactivación y tampoco en la conductancia de canal único. Así

mismo, incrementa el número de canales funcionales en la membrana y favorece efectos estimulantes de cAMP sobre la corriente hERG [McDonald *et al.*, 1997]. En células AT-1, oligonucleotidos antisentido contra MinK, reducen la corriente I_{Kr} [Cui *et al.*, 2000]. En ovocitos de *Xenopus* y en células HEK-293 mutaciones en MinK también inhiben la habilidad de esta proteína de aumentar la corriente hERG [Bianchi *et al.*, 1999].

Mientras que la asociación de la proteína MiRP1 con hERG en ovocitos no provoca ninguna alteración de la corriente [Zhang *et al.*, 2001], en células CHO, la proteína MiRP1 hace más lenta la velocidad de activación y no provoca cambios en el estado estable de inactivación. El canal deactiva más rápido en presencia de MiRP1 y la corriente es más sensible al bloqueo por E4031 [Abbott *et al.*, 1999]. Mutaciones en MiRP1 asociadas a LQTS disminuyen la densidad de la corriente hERG [Sesti *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2003]. Al igual que MinK, MiRP1 también favorece un efecto estimulante de cAMP sobre hERG [Cui *et al.*, 2000]. Las diferencias entre los resultados obtenidos por los distintos grupos pueden deberse al diferente sistema heterólogo utilizado.

En este trabajo se quiso estudiar si alguna de estas dos proteínas accesorias alteraba de alguna manera la regulación de la corriente hERG por el receptor α_{1A} -AR. Los resultados obtenidos aquí muestran que MinK hace significativamente más lenta la deactivación de la corriente hERG. MiRP1 en cambio, no la altera contrariando los resultados de Abbott *et al.* (1999) obtenidos en células CHO. En cuanto al voltaje medio de activación, mientras que MinK no lo altera, MiRP1 lo hace significativamente más negativo.

Aún así, en presencia de estas proteínas, la estimulación del receptor provoca un desplazamiento del V_h de activación hacia valores más positivos desplazándose del mismo modo que en ausencia de ellas, sugiriendo que estas dos proteínas accesorias no modulan la regulación del canal hERG por el receptor α_{1A} -AR.

5.2 Identificación de la vía intracelular

El receptor α_{1A} -AR es un receptor acoplado a proteínas G. La estimulación del mismo tiene efecto en su efector mediante la vía G_{α_q} -PLC [Graham *et al.*, 1996]. El enzima PLC aumenta los niveles de DAG e IP_3 , que a su vez activan la familia de PKC. En 1999 el grupo de Gea-Ny Tseng mencionó por primera vez una reducción de la corriente hERG por la estimulación de los α_{1A} -AR, mediado por una proteína G sin identificar [Jiang *et al.*, 1999].

En esta Tesis Doctoral se interrumpió esta vía a diferentes niveles para estudiar el efecto del agonista sobre la corriente hERG. Para ello se utilizaron compuestos que o inhiben directamente las proteínas o evitan la activación de las mismas.

Así, la inhibición de la activación de la proteína G_q por GPant2A previene el desplazamiento del voltaje medio de activación. Del mismo modo, la inhibición de PLC con Neomicina, también evita el desplazamiento de la activación de la corriente en presencia de la estimulación del receptor α_{1A} -AR. Estos resultados confirman que la regulación de la corriente hERG está mediada por la vía intracelular G_{α_q} -PLC como típicamente se ha asociado.

5.2.1 Implicación de proteína quinasas

Uno de los mecanismos más habituales para modular canales iónicos, es la fosforilación y desfosforilación por proteínas quinasas y fosfatasas. Por los resultados obtenidos mediante Western blot, vemos que la proteína hERG está altamente fosforilada en condiciones basales. La estimulación del receptor α_{1A} -AR no altera significativamente la fosforilación en residuos de Treonina, Serina y/o Tirosina. De todas formas, nuestro método de medición es muy poco preciso, por lo que pequeños cambios en el grado de fosforilación no serían detectados con el mismo.

Se ha visto que las proteína tirosina quinasas regulan distintos tipos de canales iónicos [Davis *et al.*, 2001]. Así, la inhibición de estas proteínas con Genisteina disminuye la amplitud de la corriente hERG y desplaza el voltaje medio de activación hacia valores más hiperpolarizados [Zhang *et al.*, 2008]. La I_{Kr} es reducida también por fosforilación del canal por la tirosina quinasa Src, pero los autores no explican que proteína activa a esta quinasa [Cayabyab & Schlichter, 2002]. Aún así, según Davis *et al.* (2001) la Genisteina, aunque es ampliamente usada, puede actuar por un mecanismo inespecífico bloqueando otras proteínas intermediarias. Un estudio publica que los inhibidores de fosforilación en residuos de Tirosina muestran un efecto inhibitorio inespecífico en la corriente I_{Kr} de miocitos ventriculares de cobaya [Missan *et al.*, 2006].

En nuestro caso, la inhibición de las tirosina quinasas con Genisteina no evita que el V_h de activación se desplace hacia valores más despolarizados de la misma manera que el control, sugiriendo que estas proteínas no intervienen en esta regulación.

Por su parte, el enzima PLC activo hidroliza el PIP_2 en DAG e IP_3 . El DAG y el Ca^{2+} citoplasmático, liberado del retículo endoplasmático por mediación de IP_3 , activan PKC. La PKC una vez activa fosforila distintas proteínas, entre ellas algunos canales iónicos.

La modulación de la corriente I_{Kr} y hERG producida por la estimulación de α_{1A} -AR y β -AR es bloqueada por inhibidores de proteína quinasas [Heath & Terrar, 2000; Karle *et al.*, 2002, Thomas *et al.*, 2004b]. Un estudio previo sugiere que la regulación del canal hERG por el receptor α_{1A} -AR está mediado tanto por PKA como por PKC, pero no es una fosforilación directa ya que mutando los sitios consenso de fosforilación por ambas proteína quinasas en el canal hERG y estimulando PKC, no se inhibe el efecto provocado por la estimulación del receptor [Thomas *et al.*, 2004b]. De todos modos, aunque lo ven poco probable, no excluyen que la fosforilación suceda en la Treonina 74, aminoácido que no puede ser sustituido para que el canal siga siendo funcional.

La estimulación del receptor muscarínico M3 reduce la amplitud de la corriente hERG como en el caso del receptor α_1 -AR [Cockerill *et al.*, 2007]. Según los autores, el mecanismo por el cual se regula el canal es por una fosforilación directa del canal por parte de PKC, mientras que PKA no tiene ninguna función en la regulación. La activación por PMA de las isoformas de PKC sensibles a DAG altera la amplitud de la corriente hERG en sistemas heterólogos [Barros *et al.*, 1997; Barros *et al.*, 1998; Cockerill *et al.*, 2007; Kiehn *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2003]. En contra de estos resultados, Bian *et al.* (2001) excluyen la contribución de PKC en la regulación de la corriente hERG, ya que el inhibidor de PKC, Celeritrina, no evita el efecto provocado por el receptor.

Con el fin de comprobar si la PKC estaba implicada en esta regulación de la corriente hERG por el receptor α_{1A} -AR, se bloqueó la proteína con BIM-1. A diferencia de otros autores, en este estudio a la hora de registrar la corriente, BIM-1 fue disuelta en la solución de la pipeta, ya que hay estudios en los que demuestran que este bloqueante provoca un efecto directo sobre la corriente hERG, modificando así las propiedades biofísicas del canal [Thomas *et al.*, 2004a; Harmati *et al.*, 2011].

Nuestros resultados muestran que el bloqueo de la quinasa no evita totalmente el efecto de la estimulación del receptor α_{1A} -AR sobre la curva de activación de la corriente hERG. Los resultados obtenidos nos sugieren que en la regulación de la corriente hERG por el receptor α_{1A} -AR la PKC modula parcialmente la corriente.

El aminoácido T74 está en el dominio PAS del N-terminal del canal hERG. Según Cockerill *et al.* (2007) se requiere un N-terminal intacto para la fosforilación dependiente de PKC y la modulación de la corriente hERG, lo que sugiere que los residuos críticos para la fosforilación residen en el N-terminal [Cockerill *et al.*, 2007].

Con estos antecedentes, quisimos comprobar que sucedía con el mutante NTK-herg (N-Truncated-hERG) que está exento del amino-terminal, en concreto le faltan los

aminoácidos 2-354. Esta delección modifica mucho las propiedades biofísicas del canal. Este canal se encuentra en estado abierto a unos potenciales en los cuales el nativo no lo está, mostrando una mayor dependencia de voltaje de activación. Por eso, a la hora de registrar esta corriente se modificó el potencial de reposo del protocolo de estimulación, siendo de -40 mV. También tiene una deactivación rapidísima lo que nos dificultó hacer los ajustes. En cambio, mantiene muy bien la rectificación a potenciales positivos, obteniendo una curva densidad de corriente-voltaje en forma de campana.

La estimulación del receptor α_{1A} -AR mostró un desplazamiento en menor grado del V_h de activación, sugiriendo la importancia del amino-terminal en esta regulación. Nos hubiese gustado tener datos de la corriente en presencia del análogo diC8-PIP₂ y el inhibidor BIM-1 de PKC, pero debido a las pequeñas corrientes, al tiempo de espera para la diálisis de estos componentes y al fuerte run-down, estos resultados no se pudieron obtener.

5.2.2 Implicación del PIP₂

Se sabe que distintos canales iónicos son regulados por los fosfolípidos, sugiriendo una interacción entre PIP₂ y los canales iónicos. La estimulación del receptor α_{1A} -AR activa PLC mediante la G_{α_q} que hidroliza PIP₂. Así, hay trabajos que muestran evidencias de que PIP₂ toma parte en la regulación de canales rectificadores de entrada [Fan & Makielski, 1997; Shyng & Nichols, 1998; Baukrowitz *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1998; Liou *et al.*, 1999; Rohacs *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999], como en la de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (revisado en Roberts-Crowley *et al.*, 2009), también intervienen en la regulación del intercambiador de Na⁺/Ca²⁺ cardiaco (revisado en Berberían *et al.*, 2009), regula el canal KCNQ1 [Matavel & Lopes, 2009] y la corriente I_{Kr}/hERG mediada por receptores adrenérgicos [Bian *et al.*, 2001; Bian *et al.*, 2004].

Los receptores α_{1A} -AR han sido relacionados con una reducción de PIP₂ inducida por PLC, el cual aumenta la actividad de hERG [Bian *et al.*, 2001] y de la corriente de cola de la ERG/I_{Kr} de miocitos cardiacos de conejo [Bian *et al.*, 2004]. Cambios en la concentración intracelular de PIP₂ alteran significativamente la amplitud de la corriente y el gating dependiente de voltaje de la corriente hERG expresada en sistemas heterólogos. El exceso de PIP₂ aumenta la amplitud de corriente y desplaza la dependencia de voltaje de la activación hacia valores hiperpolarizados [Bian *et al.*, 2004]. La corriente se reduce cuando se añade anti-PIP₂ a la solución de la pipeta sin ninguna estimulación del receptor [Huang *et al.*, 1998; Liou *et al.*, 1999; Bian *et al.*, 2004]. Esta respuesta en miocitos sugiere que la señalización acoplada a G_{α_q} en vivo puede alterar la I_{Kr} nativa por una depleción de

PIP₂ mediada por PLC independientemente de calcio y de la actividad de PKC [Bian *et al.*, 2004].

Nuestros resultados sugieren que el consumo de PIP₂ regula el gating del canal hERG. Cuando se utilizó el anticuerpo contra PIP₂, éste fue neutralizado en la membrana, disminuyendo su disponibilidad para el enzima PLC. Así, tras la estimulación de la célula, la fenilefrina no provoca ningún cambio en el V_h de activación, ya que el enzima PLC no tiene disponible el sustrato, quedándose la vía intracelular bloqueada.

Además, tras el aumento de la concentración de PIP₂ en la célula utilizando el análogo no-hidrolizable diC8-PIP₂, la estimulación del receptor no provoca ningún cambio en el voltaje medio de activación. Estos resultados sugieren que es el consumo de PIP₂ lo que provoca un cambio en el gating del canal, desplazando el V_h de activación hacia valores despolarizados.

El mecanismo molecular que regula el canal mediante los receptores α_{1A} -AR puede deberse a una posible interacción entre el canal y PIP₂. Los grupos fosfato negativamente cargados de la cabeza de PIP₂ interactúan con aminoácidos positivamente cargados del canal. Una región de residuos catiónicos conservados en el C-terminal del dominio citoplasmático de los canales de K⁺ rectificadores de entrada es uno de los posibles sitios de unión de PIP₂ [Fan & Makielski, 1997; Huang *et al.*, 1998]. El carboxilo-terminal del canal hERG contiene un grupo de residuos básicos comparable con ese posible sitio de interacción con PIP₂ [Bian *et al.*, 2004].

El mutante D-hERG está exento del posible sitio de unión de PIP₂ ya que le faltan los aminoácidos 883-894 del C-terminal. Así, el efecto de PIP₂ sobre la amplitud de la corriente D-hERG y la activación dependiente de voltaje es anulado [Bian *et al.*, 2004]. En el mutante M-hERG, en el cual los aminoácidos positivamente cargados son neutralizados, el aumento de amplitud de corriente dependiente de PIP₂ y la activación dependiente de voltaje también son prevenidos [Bian *et al.*, 2004]. El grupo de T.V. McDonald (2004) sugiere que la dependencia de voltaje de activación y la cinética de activación están afectados por la interacción de PIP₂ con los sitios del canal entre los aminoácidos 883-894.

Para corroborar que el receptor α_{1A} -AR regula el canal hERG debido a su interacción con PIP₂, testamos el mutante D-hERG. Este mutante está exento de la unión de PIP₂ al canal, por lo que la estimulación del receptor no debería de provocar ningún cambio en el V_h de activación. En cambio, cuando el receptor α_{1A} -AR se estimuló con su agonista, se observó un desplazamiento del voltaje medio de activación hacia valores

más despolarizados. Este desplazamiento sin embargo, ocurre en menor medida comparándolo con la corriente nativa. El agonista del receptor en presencia del análogo no-hidrolizable diC8-PIP₂ no provoca un desplazamiento significativo de la curva de activación hacia potenciales despolarizados, confirmando la implicación de la depleción de PIP₂ en la regulación del canal. El bloqueo de la PKC por BIM-1 en el caso del mutante corrobora que la PKC también regula el canal, ya que la estimulación del receptor provoca cambios en el V_h de la activación, que son prevenidos por el bloqueo de la quinasa. Por lo tanto, tanto PIP₂ como PKC contribuyen a la regulación de la corriente hERG.

5.3 Resumen

Las distintas demandas cardiovasculares del corazón requieren respuestas dinámicas. El ritmo cardiaco y la contractilidad son regulados por complejos hormonales y cascadas de señalización autónomas implicando receptores acoplados a proteínas G. En particular la estimulación de α_1 -AR en cardiomiocitos provoca un alargamiento en la repolarización, un aumento moderado del inotropismo y un descenso del automatismo de las células de Purkinje [Kurz et ál., 1991], particularmente durante periodos de estrés extremo o una estimulación autónoma. Bajo condiciones patofisiológicas, resultados mal-adaptativos pueden inducir eventos severos cardiovasculares. Así, las arritmias ventriculares son a menudo precipitadas por estrés físico o emocional en particular en enfermos coronarios o con LQTS [Lown, 1987; Kamarck & Jennings, 1991; Napolitano et ál., 1994; Priori et ál., 1997].

Los resultados obtenidos en este trabajo, indican que la regulación de la corriente hERG por el receptor α_{1A} -AR está mediada por la interacción entre PIP₂ y el canal, con lo cual la disminución de la concentración de PIP₂ desplaza el V_h de activación del canal hERG. Además, el V_h de activación de la corriente hERG está desplazado también, aunque en menor medida por la activación de PKC [figura 73]. Este desplazamiento del V_h de activación hacia potenciales más positivos, reduce la disponibilidad de la corriente a potenciales fisiológicos, provocando el alargamiento de la duración del potencial de acción cardiaco.

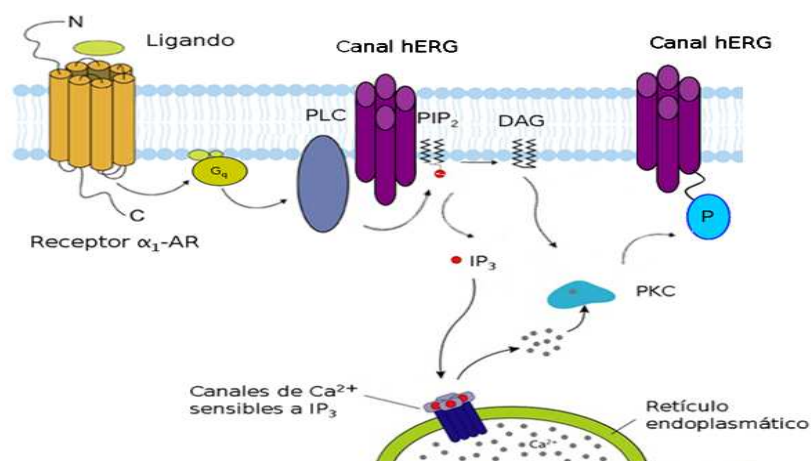


Figura 73. Representación esquemática de la vía de regulación de la corriente hERG. La estimulación del receptor α_{1A} -AR provoca la activación de la proteína $G_{\alpha q}$, la cual activa PLC que hidroliza PIP_2 . El consumo de PIP_2 altera la interacción entre el canal y PIP_2 regulando así la corriente. Además, la activación de la PKC por DAG provoca la fosforilación del canal hERG.

6. Conclusiones

6 CONCLUSIONES

- I. La estimulación del receptor α_{1A} -adrenérgico desplaza a potenciales más positivos el voltaje medio de activación del canal de potasio cardiaco hERG. Este desplazamiento hace que la disponibilidad de canales abiertos al voltaje de la meseta del potencial de acción cardiaco sea menor.
- II. La regulación del canal hERG por el receptor α_{1A} -adrenérgico es independiente de la presencia o ausencia de las subunidades reguladoras de la familia KCNE MinK o MiRP1 en el complejo molecular del canal.
- III. La vía intracelular que conecta al receptor α_{1A} -adrenérgico con el canal hERG incluye la activación de una proteína $G_{\alpha q}$ y de la Fosfolipasa C, que a su vez hidroliza el Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, liberando Diacilglicerol, el cual activa la proteína quinasa C.
- IV. El desplazamiento de la curva de activación del canal hERG tras la estimulación α_{1A} -adrenérgica se debe sobre todo a una reducción de la unión entre el canal y el Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, y en menor medida a la fosforilación del canal por la proteína quinasa C.

7. Bibliografía

7 BIBLIOGRAFÍA

A

Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA. MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*. **1999**; 97: 175-87.

Aggarwal SK & Mickinnon R. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron*. **1996**; 16: 1169-77.

Akhavan A, Atanasiu R, Noguchi T, Han W, Holder N, Shrier A. Identification of the cyclic-nucleotide-binding domain as a conserved determinant of ion-channel cell-surface localization. *J Cell Sci*. **2005**; 118: 2803-12.

Alday A. Compartimentación de la regulación de la corriente transitoria de salida de potasio cardiaca por receptores α_1 -adrenérgicos y por CaMKII [Tesis Doctoral]. Leioa: UPV/EHU; **2009**.

Aldrich RW & Stevens CF. Inactivation of open and closed sodium channels determined separately. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **1983**; 48 Pt 1: 147-53.

Apkon M & Nerbonne JM. α -adrenergic agonists selectively suppress voltage-dependent K⁺ currents in rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci. USA*. **1988**; 85: 8756-60.

Arcangeli A. Expression and role of hERG channels in cancer cells. *Novartis Found Symp*. **2005**; 266: 225-32; discussion 232-34.

B

Balijepalli RC, Foell JD, Hall DD, Hell JW, Kamp TJ. Localization of cardiac L-type Ca(2+) channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta(2)-adrenergic regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2006**; 103(19): 7500-5.

Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. KvLQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the *IKS* cardiac potassium current. *Nature*. **1996**; 384: 78-80.

Barros F, del Camino D, Pardo LA, Palomero T, Giraldez T, De la Peña P. Demonstration of an inwardly rectifying K⁺ current component modulated by thyrotropin-releasing hormone and caffeine in GH3 rat anterior pituitary cells. *Pflugers Arch*. **1997**; 435(1): 119-29.

Barros F, Gomez-Varela D, Vilorio CG, Palomero T, Giraldez T, De la Peña P. Modulation of human erg K⁺ channel gating by activation of a G protein-coupled receptor and protein kinase C. *J Physiol*. **1998**; 511 (Pt 2): 333-46.

Bibliografía

Bauer CK, Wulfsen I, Schafer R, Glassmeier G, Wimmers S, Flitsch J, Ludecke DK, Schwarz JR. HERG K⁺ currents in human prolactin-secreting adenoma cells. *Pflugers Arch.* **2003**; 445: 589-600.

Baukrowitz T & Yellen G. Modulation of K⁺ current by frequency and external K⁺: a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron.* **1995**; 15: 951-60.

Baukrowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitz S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppertsberg JP, Fakler B. PIP₂ and PIP as determinants for ATP inhibition of K_{ATP} channels. *Science.* **1998**; 282 (5391): 1141-4.

Bean BP. Sodium channel inactivation in the crayfish giant axon. Must channel open before inactivating? *Biophys J.* **1981**; 35: 595-614.

Berberián G, Forcato D, Beaugé L. key role of a PtdIns-4,5P₂ micro domains on ionic regulation of the mammalian heart Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Cell Cal.* **2009**; 45: 546-53.

Bernéche S & Roux B. A gate in the selectivity filter of potassium channels. *Structure.* **2005**; 13: 591-600.

Bezanilla F. The voltage-sensor structure in a voltage-gated channel. *TRENDS Biochem Sci.* **2005a**; 30: 166-8.

Bezanilla F. Voltage sensor movements. *J Gen Physiol.* **2002**; 120: 465-73.

Bezanilla F. Voltage-gated ion channels. *IEEE Trans Nanobioscience.* **2005b**; 4: 34-48.

Bian J, Cui J, Mc Donald TV. HERG K⁺ Channel Activity Is Regulated by Changes in Phosphatidil Inositol 4, 5-Bisphosphate. *Circ Res.* **2001**; 89: 1168-76.

Bian JS, Kagan A, McDonald TV. Molecular analysis of PIP₂ regulation of HERG and I_{Kr}. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2004**; 287: H2154-63.

Bianchi L, Shen Z, Dennis AT, Priori SG, Napolitano, C, Ronchetti E, Bryskin R, Schwartz PJ, Brown AM. Cellular dysfunction of LQT5-minK mutants: abnormalities of IKs, IKr and trafficking in long QT syndrome. *Hum Mol Genet.* **1999**; 8: 1499-1507.

Bianchi L, Wible B, Arcangeli A, Taglialatela M, Morra F, Castaldo P, Crociani O, Rosati B, Faravelli L, Olivotto M, Wanke E. herg encodes a K⁺ current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells. *Cancer Res.* **1998**; 58: 815-22.

Blinks JR & Endoh M. Modification of myofibrillar responsiveness to Ca²⁺ as an inotropic mechanism. *Circulation.* **1986**; 73 (supl III): 85-98.

Bronstein-Sitton N. The *ether-a-go-go* Related Gene (*erg*) Voltage-Gated K⁺ Channels: A Common Structure With Uncommon Characteristics. *Modulator.* **2006**; 21: 13-5.

Bylund DB, Bond RA, Clarke DE, Eikenburg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minnerman KP, Mollinoff PB, Ruffolo RR, Strosberf AD, Trendelenburg UG. Adrenoceptors, in the IUPHAR compendium of receptor characterization and classification. IUPHAR Media, (London): Girdlestone D; **1998**.

Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minnerman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Trendelenburg U. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* **1994**; 46: 121-36.

C

Casis O, Iriarte M, Gallego M, Sánchez-Chapula JA. Differences in regional distribution of K⁺ current densities in rat ventricle. *Life Sci.* **1998**; 63: 391-400.

Casis O, Olesen SP, Sanguinetti MC. Mechanism of action of a novel human ether-a-go-go-related gene channel activator. *Mol Pharmacol.* **2006**; 69 (2): 658-65.

Catterall WA. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu Rev Biochem.* **1986**; 55: 953-85.

Cayabyab FS & Schlichter LC. Regulation of an ERG K⁺ current by Src tyrosine kinase. *J Biol Chem.* **2002**; 277(16): 13673-81.

Chen J, Chen K, Sroubek J, Wu ZY, Thomas D, Bian JS, McDonald TV. Post-transcriptional control of HERG potassium channel protein by α -adrenergic receptor stimulation. *Mol Pharmacol.* **2010**; 78(2): 186-97.

Cherubini A, Hofmann G, Pillozzi S, Guasti L, Crociani O, Cilia E, Di Stefano P, Degani S, Balzi M, Olivotto M, Wanke E, Becchetti A, Defilippi P, Wymore R, Arcangeli A. Human ether-a-go-go-related gene 1 channels are physically linked to beta1 integrins and modulate adhesion-dependent signaling. *Mol Biol Cell.* **2005**; 16: 2972-83.

Clancy CE, Tateyama M, Kass RS. Insights into the molecular mechanisms of bradycardia-triggered arrhythmias in long QT-3 syndrome. *J Clin Invest.* **2002**; 110: 1251-62.

Clark RB, Bouchard RA, Salinas-Stefanon E, Sánchez-Chapula JA, Gilles WR. Heterogeneity of action potential waveforms and K⁺ currents in rat ventricle. *Cardiovasc.* **1993**; 27: 1795-9.

Cockerill SL, Tobin AB, Torrecilla I, Willars GB, Standen NB, Mitcheson JS. Modulation of hERG potassium currents in HEK-293 cells by protein kinase C. Evidence for direct phosphorylation of pore forming subunits. *J Physiol.* **2007**; 581(2): 479-93.

Cohen BE, Grabe M, Jan LY. Answers and questions from the KvAP structures. *Neuron.* **2003**; 39: 395-400.

Crociani O, Guasti L, Balzi M, Becchetti A, Wanke E, Olivotto M, Wymore RS, Arcangeli A. Cell cycle-dependent expression of HERG1 and HERG1B isoforms in tumor cells. *J Biol Chem.* **2003**; 278: 2947-55.

Bibliografia

Cuello LG, Cortes DM, Perozo E. Molecular Architecture of the KvAP Voltage-Dependent K⁺ Channel in a Lipid Bilayer. *Science*. **2004**; 306: 491-5.

Cui J, Kagan A, Qin D, Mathew J, Melman YF, McDonald TV. Analysis of the Cyclic Nucleotide Binding Domain of the HERG Potassium Channel and Interactions with KCNE2. *J Biol Chem*. **2001**; 276, 20: 17244-51.

Cui J, Melman Y, Palma E, Fishman GI, McDonald TV. Cyclic AMP regulates the HERG K⁺ potassium channel by dual pathways. *Curr Biol*. **2000**; 10: 671-4.

Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: *HERG* mutations cause long QT syndrome. *Cell*. **1995**; 80: 795-803.

D

Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Gui P, Hill MA, Wilson E. Regulation of ion channels by protein tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2001**; 281(5): H1835-62.

Delmar M. Role of potassium currents on cell excitability in cardiac ventricular myocytes. *J Cardiovasc Electrophysiol*. **1992**; 3: 474-86.

Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. **1998**; 280: 69-77.

E

Endoh M & Blinks JR. Actions of sympathomimetic amines on the Ca²⁺ transients and contractions of rabbit myocardium: reciprocal changes in myofibrillar responsiveness to Ca²⁺ mediated through α_1 - and β -adrenoceptors. *Circ Res*. **1988**; 62: 247-65.

F

Fan Z & Makielski JC. Anionic phospholipids activate ATPsensitive potassium channels. *J Biol Chem*. **1997**; 272: 5388-95.

Farrelly AM, Ro S, Callaghan BP, Khoyi MA, Fleming N, Horowitz B, Sanders KM, Keef KD. Expression and function of KCNH2 (HERG) in the human jejunum. *Am J Physiol*. **2003**; 284: G883-95.

Fedida D, Shimoni Y, Giles WR. A novel effect of norepinephrine on cardiac cells mediated by α -adrenoceptors. *Am J Physiol*. **1989**; 256: H1500-4.

Fedida D, Shimoni Y, Giles WR. α -adrenergic modulation of the transient outward current in rabbit atrial myocytes. *J Physiol*. **1990**; 423: 257-77.

Fenichel RR, Malik M, Antzelevitch C, Sanguinetti M, Roden DM, Priori SG, Ruskin JN, Lipicky RJ, Cntilena LR; Independent Academic Task Force. Drug-induced torsades de pointes and implications for drug development. *J Cardiovasc Electrophysiol*. **2004**; 15 (4): 475-95.

Furushima H, Chinushi M, Washizuka T, Aizawa Y. Role of alpha1-blockade in congenital long QT syndrome: investigation by exercise stress test. *Jpn Circ J.* **2001**; 65: 654-8.

G

Gallego M, Casis E, Izquierdo MJ, Casis O. Restoration of cardiac transient potassium current by norepinephrine in diabetic rats. *Pflügers Arch-Eur J Physiol.* **2000**; 441: 102-7.

Gallego M, Setién R, Puebla L, Boyano-Adánez MdelC, Arilla E, Casis O. alpha-1-Adrenoceptors stimulate a Galphas proteína and reduce the transient outward K⁺ current via a cAMP/PKA-mediated pathway in the rat heart. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2005**; 288 (3): c577-85.

Garvey WR, Kranias EG, Solaro RJ. Phosphorylation of C-protein, troponin I and phospholamban in isolated rabbit hearts. *Biochem J.* **1988**; 249: 709-14.

Gomez-Lagunas F & Armstrong CM. Inactivation in ShakerB K⁺ channels: a test for the number of inactivating particles on each channel. *Biophys J.* **1995**; 68: 89-95.

Graham RM, Perez DM, Hwa J, Piascik MT. alpha 1-adrenergic receptors subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ Res.* **1996**; 78: 737-49.

Greenstein JL, Wu R Po S, Tomaselli GF, Winslow RL. Role of the calcium-independent transient outward current I(to1) in shaping action potential morphology and duration. *Circ Res.* **2000**; 87: 1026-33.

Guasti L, Cilia E, Crociani O, Hofmann G, Polvani S, Becchetti A, Wanke E, Tempia F, Arcangeli A. Expression pattern of the ether-a-go-go-related (ERG) family proteins in the adult mouse central nervous system: evidence for coassembly of different subunits. *J Comp Neurol.* **2005**; 491: 157-4.

Guy HR & Seetharamulu P. Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1986**; 83: 508-12.

H

Harmati G, Papp F, Szentandrassy N, Bárándi L, Ruzsnavsky F, Horváth B, Bányász T, Magyar J, Panyi G, Krasznai Z, Nánási P. Effects of the PKC inhibitors chelerytrine and bisindolylmaleimide I (GF 109203X) on delayed rectifier K⁺ currents. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.* **2011**; 383(2): 141-8.

Hartmann HA, Kirsch GE, Drewe JA, Taglialatela M, Joho RH, Brown AM. Exchange of conduction pathways between two related K⁺ channels. *Science.* **1991**; 251: 942-4.

Heath BM & Terrar DA. Protein kinase C enhances the rapidly activating delayed rectifier potassium current, I_{Kr}, through a reduction in C-type inactivation in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol.* **2000**; 522: 391-402.

Heinemann SH, Rettig J, Graack HR, Pongs O. Functional characterization of Kv channel beta subunits from rat brain. *J Physiol.* **1996**; 493: 625-33.

Bibliografia

Hille B. Ion channels of excitable membranes. 3^a ed. Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates Inc; **2001**.

Hoffman BB & Leftkowitz RJ. Adrenergic receptors in heart. *Ann Rev Physiol.* **1982**; 44: 475.

Hofmann G, Bernabei PA, Crociani O, Cherubini A, Guasti L, Pillozzi S, Lastraioli E, Polvani S, Bartolozzi B, Solazzo V, Gragnani L, Defilippi P, Rosati B, Wanke E, Olivotto M, Arcangeli A. HERG K⁺ channels activation during beta (1) integrin-mediated adhesion to fibronectin induces an upregulation of alpha(v)beta(3) integrin in the preosteoclastic leukemia cell line FLG 29.1. *J Biol Chem.* **2001**; 276: 4923-31.

Horn R. A new twist in the saga of charge movement in voltage-dependent ion channels. *Neuron.* **2000**; 25: 511-4.

Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science.* **1990**; 250: 533-8.

Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron.* **1991**; 7: 547-56.

<http://www.acgtinc.com>

<http://fisicoqpotmem.blogspot.com/>

<http://www.argenbio.org>

<http://www.molecularstation.com>

<http://www.users-york.ac.uk>

Huang CL, Feng S, Hilgemann DW. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilization by Gbetagamma. *Nature.* **1998**; 391: 803-6.

Hume JR & Uehara A. Ionic basis for the different action potential configurations of single guinea-pig atrial and ventricular myocytes. *J Physiol.* **1985**; 368: 3524-44.

I

Isacoff EY, Jan YN, Jan LY. Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K⁺ channel. *Nature.* **1991**; 353: 86-90.

J

Jiang M, Dun W, Fan JS, tseng G-NY. Use-Dependent 'Agonist' Effect of Azimilide on the HERG Channel. *JPET.* **1999**; 291: 1324-36.

Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature.* **2003a**; 423: 33-41.

Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*. **2003b**; 423: 42-8.

K

Kagan A, Melman YF, Krumerman A, McDonald TV. 14-3-3 amplifies and prolongs adrenergic stimulation of HERG K⁺ channel activity. *EMBO J*. **2002**; 21 (8): 1889-98.

Kamarck T & Jennings JR. Biobehavioral factors in sudden cardiac death. *Psychol Bull*. **1991**; 109(1): 42-75.

Karle CA, Zitron E, Zhang W, Kathofer S, Schoels W, Kiehn J. Rapid component I_{Kr} of the guinea-pig cardiac delayed rectifier K⁺ current is inhibited by β1-adrenoreceptor activation, via cAMP/protein kinase A-dependent pathways. *Cardiovasc Res*. **2002**; 53: 355-62.

Kass RS, Kurokawa J, Marx SO, Marks AR. Leucine/isoleucine zipper coordination of ion channel macromolecular signaling complexes in the heart. Roles in inherited arrhythmias. *Trends Cardiovasc Med*. **2003**; 13: 52-6.

Kiehn J, Karle C, Thomas D, Yao X, Brachmann J, Kübler W. HERG potassium channel activation is shifted by phorbol esters via protein kinase A-dependent pathways. *J Biol Chem*. **1998**; 273 (39): 25285-91.

Kurz T, Yamada KA, DaTorre SD, Corr PB. Alpha 1-adrenergic system and arrhythmias in ischaemic heart disease. *Eur Heart J*. **1991**; 12 [Suppl F]: 88-98.

L

Lainé M, Lin M, Bannister JP, Silverman WR, Mock AF, Roux B, Papazian DM. Atomic proximity between S4 segment and pore domain in shaker potassium channels. *Neuron*. **2003**; 39: 467-81.

Lastraioli E, Guasti L, Crociani O, Polvani S, Hofmann G, Witchel H, Bencini L, Calistri M, Messerini L, Scatizzi M, Moretti R, Wanke E, Olivotto M, Mugnai G, Arcangeli A. *herg1* gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells. *Cancer Res*. **2004**; 64: 606-11.

Lazdunski M. Potassium channels: structure-function relationships, diversity and pharmacology. *Cardiovasc Drugs Ther*. **1992**; 6: 313-9.

Liou HH, Zhou SS, Huang CL. Regulation of ROMK1 channel by protein kinase A via a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1999**; 96: 5820-5.

Liu SJ & Kennedy RH. α-adrenergic activation of L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes: perforated patch-clamp recordings. *Am. J. Physiol*. **1998**; 274: H2203-7.

Long SB, Campbell EB, MacKinnon R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science*. **2005a**; 309: 897-903.

Bibliografía

Long SB, Campbell EB, MacKinnon R. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science*. **2005b**; 309: 903-8.

López-Barneo J, Hoshi T, Heinemann S, Aldrich R. Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors Channels*. **1993**; 1: 61-71.

Lown B. Sudden cardiac death: biobehavioral perspective. *Circulation*. **1987**; 76(1 Pt 2): 186-96.

Lozano JA. Arritmias cardíacas y su tratamiento [monografía de Internet]. **2001**. Disponible en: <http://dfarmacia.com>.

Lu Y, Mahaut-Smith MP, Huang CL, Vanderberg JI. Mutant MiRP1 subunits modulate HERG K⁺ channel gating: a mechanism for pro-arrhythmia in long QT syndrome type 6. *J Physiol*. **2003**; 551: 253-62.

Luo CH & Rudy Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. *Circ Res*. **1994a**; 74: 1071-96.

Luo CH & Rudy Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. II. After depolarizations, triggered activity, and potentiation. *Circ Res*. **1994b**; 74: 1097-113.

M

MacKinnon R, Aldrich RW, Lee AW. Functional stoichiometry of Shaker potassium channel inactivation. *Science*. **1993**; 262: 757-9.

MacKinnon R. Structural biology. Voltage sensor meets lipid membrane. *Science*. **2004**; 306: 1304-5.

Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR, Kass RS. Requirement of a Macromolecular Signaling Complex for β -Adrenergic Receptor Modulation of the KCNQ1-KCNE1 Potassium Channel. *Science*. **2002**; 295: 496-9.

Matavel A & Lopes C MB. PKC activation and PIP₂ depletion underlie biphasic regulation of I_{Ks} by Gq-coupled receptors. *L Mol Cell Cardiol*. **2009**; 46: 704-12.

McCrossan ZA & Abbott GW. The MinK-related peptides. *Neuropharm*. **2004**; 47: 787-821.

McDonald TV, Yu Z, Ming Z, Palma E, Meyers MB, Wang KW, Goldstein SA, Fishman GI. A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I(Kr). *Nature*. **1997**; 388: 289-92.

Missan S, Zhabyeyev P, Lindsell P, McDonald TF. Insensitivity of cardiac delayed-rectifier I(Kr) to tyrosine phosphorylation inhibitors and stimulators. *Br J Pharmacol*. **2006**; 148(5): 724-31.

Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti MC. A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2000**; 97: 12329-33.

Miura Y, Inui J, Imamura H. Alpha-adrenoceptor-mediated restoration of calcium-dependent potential in the partially depolarized rabbit papillary muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. **1978**; 301: 201-5.

Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R. Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature*. **2001**; 414: 37-42.

N

Nakamura TY, Coetzee WA, Vega-Sánchez De Miera E, Artman M, Rudy B. Modulation of Kv4 channels, key components of rat ventricular transient outward current, by PKC. *Am J Physiol*. **1997**; 273: H1775-86.

Napolitano C, Priori S, Schwartz P. Torsade de pointes. Mechanisms and management. *Drugs*. **1994**; 47: 51-65.

Netter F. Colección Ciba de ilustraciones médicas. Tomo V. Corazón. Salvat Editores SA; **1983**.

Nie L, Gratton MA, Mu KJ, Dinglasan JN, Feng W, Yamoah EN. Expression and functional phenotype of mouse ERG K⁺ channels in the inner ear: potential role in K⁺ regulation in the inner ear. *J Neurosci*. **2005**; 25: 8671-9.

O

Olcese R, Latorre R, Toro L, Bezanilla F, Stefani E. Correlation between charge movement and ionic current during slow inactivation in Shaker K channels. *J Gen Physiol*. **1997**; 11: 579-89.

Omichi C, Momose Y, Kitahara S. Congenital long QT syndrome presenting with a history of epilepsy: Misdiagnosis or relationship between channelopathies of the heart and brain? *Epilepsia*. **2010**; 51(2): 289-92.

Ortega-Sáez P, Pardal R, Castellano A, López-Barneo. Collapse of conductance is prevented by glutamate residue conserved in voltage-dependent K⁺ channels. *J Gen Physiol*. **2000**; 116: 181-90.

Overholt JL, Ficker E, Yang T, Shams H, Bright GR, Prabhakar NR. HERG-Like potassium current regulates the resting membrane potential in glomus cells of the rabbit carotid body. *J Neurophysiol*. **2000**; 83: 1150-7.

P

Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY. Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature*. **1991**; 349: 305-10.

Patil PG, Brody DL, Yue DT. Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels. *Neuron*. **1998**; 20: 1027-38.

Price DT, Lefkowitz RJ, Caron MG, Berkowitz D, Schwinn DA. Localization of mRNA for three distinct alpha 1-adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human alpha-adrenergic physiology. *Mol Pharmacol*. **1994**; 45: 171-5.

Priori SG, Napolitano C, Paganini V, Cantu F, Schwartz PJ. Molecular biology of the long QT syndrome: impact on management. *Pacing Clin Electrophysiol*. **1997**; 20(8 Pt 2): 2052-7.

R

Rasmusson RL, Morales MJ, Wang S, Liu S, Campbell DL, Brahmajothi MV, Strauss HC. Inactivation of Voltage-Gated Cardiac K⁺ Channels. *Circ Res*. **1998**; 82: 739-50.

Recanatini M, Poluzzi E, Masetti M, Cavalli A, De Ponti F. QT prolongation through hERG K⁺ channel blockade: current knowledge and strategies for the early prediction during drug development. *Med Res Rev*. **2005**; 25: 133-66.

Roberts-Crowley ML, Mitra-Ganguli T, Liu L, Rittenhouse AR. Regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels by lipids. *Cell Cal*. **2009**; 45: 589-601.

Rohacs T, Chen J, Prestwich GD, Logothetis DE. Distinct specificities of inwardly rectifying K(+) channels for phosphoinositides. *J Biol Chem*. **1999**; 274: 36065-72.

Rosati B, Marchetti P, Crociani O, Lecchi M, Lupi R, Arcangeli A, Olivotto M, Wanke E. Glucose- and arginine-induced insulin secretion by human pancreatic beta-cells: the role of HERG K⁺ channels in firing and release. *Faseb J*. **2000**; 14: 2601-10.

Roux MJ, Olcese R, Toro L, Bezanilla F, Stefani E. Fast inactivation in Shaker K⁺ channels. Properties of ionic and gating currents. *J Gen Physiol*. **1998**; 111: 625-38.

Rudy B. Diversity and ubiquity of K channels. *Neurosci*. **1988**; 25: 729-49.

S

Sanguinetti MC & Mitcheson JS. Predicting drug-hERG channel interactions that cause acquired long QT syndrome. *Trends Pharmacol Sci*. **2005**; 26: 119-24.

Sanguinetti MC & Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*. **2006**; 440 (7083): 463-9.

Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT. Coassembly of KVLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac IKS potassium channel. *Nature*. **1996**; 384: 80-3.

Sanguinetti MC. HERG1 channelopathies. *Pflugers Arch-Eur J Physiol*. **2010**; 460: 265-76.

Schrader LA, Anderson AE, Mayne A, Pfaffinger PJ, Sweatt JD. PKA modulation of Kv4.2-encoded A-type potassium channels requires formation of a supramolecular complex. *J Neurosci*. **2002**; 22 (23): 10123-33.

Schwartz PJ, Priori SG, Cerrone M, Spazzolini C, Odero A, Napolitano C, Bloise R, De Ferrari GM, Klersy C, Moss AJ, Zareba W, Robinson JL, Hall WJ, Brink PA, Toivonen L, Epstein AE, Li C, Hu D. Left cardiac sympathetic denervation in the management of high-risk patients affected by the long-QT syndrome. *Circulation*. **2004**; 109: 1826-33.

Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AA, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V, Wattanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann MH, Schwartz K, Coumel P, Bloise R. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation*. **2001**; 103: 89-95.

Schwarz JR & Bauer CK. Functions of erg K⁺ channels in excitable cells. *J Cell Mol Med*. **2004**; 8: 22-30.

Schwarz JR & Bauer CK. The ether-à-go-go-Related Gene K⁺ Current: Functions of a Strange Inward Rectifier. *News Physiol Sci*. **1999**; 14: 135-42.

Sesti F, Abbott GW, Wei J, Murray KT, Saksena S, Schwartz PJ, Priori SG, Roden DM, George Jr AL, Goldstein SA. A common polymorphism associated with antibiotic-induced arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2000**; 97: 10613-8.

Shyng SL & Nichols CG. Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of K_{ATP} channels. *Science*. **1998**; 282: 1138-41.

Singer-Lahat D, Gershon E, Lotan H, Hullin R, Biel M, Flockerzi V, Hofmann F, Dascal N. Modulation of cardiac Ca²⁺ channels in *Xenopus* oocytes by protein kinase C. *FEBS Lett*. **1992**; 306: 113-8.

Smith GA, Tsui HW, Newell EW, Jiang X, Zhu XP, Tsui FW, Schlichter LC. Functional up-regulation of HERG K⁺ channels in neoplastic hematopoietic cells. *J Biol Chem*. **2002**; 277: 18528-34.

Snyder B. Where are the new drugs? The push to improve the pipeline [monografía de Internet]. **2005**. Disponible en: <http://www.mc.vanderbilt.edu/lens/>.

Solc C & Aldrich RW. Voltage-gated potassium channels in larval CNS neurons of *Drosophila*. *J Neurosci*. **1988**; 8: 2556-70.

Speralakis N. Regulation of calcium slow channels of heart by cyclic nucleotides and effects of ischemia. *Adv Pharmacol*. **1994**; 31: 1-24.

Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT. Mutations in the *hminK* gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nature Genet*. **1997**; 17: 338-40.

Sun ZH, Swan H, Viitasalo M, Toivonen L. Effects of epinephrine and phenylephrine on QT interval dispersion in congenital long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*. **1998**; 31: 1400-5.

T

Tapper AR & George AL. MinK subdomains that mediate modulation of and association with KvLQT1. *J Gen Physiol*. **2000**; 116: 379-90.

Tester DJ & Ackerman MJ. Cardiomyopathic and channelopathic causes of sudden unexplained death in infants and children. *Annu Rev Med*. **2009**; 60: 69-84.

Bibliografía

Thomas D, Hammerling BC, Wimmer A-B, Wu K, Ficker E, Kuryshev YA, Scherer D, Kiehn J, Katus HA, Schoels W, Karle CA. Direct block of hERG potassium channels by the protein kinase C inhibitor bisindolylmaleimide I (GF109203X). *Cardio Res.* **2004a**; 64: 467-76.

Thomas D, Wu K, Wimmer AB, Zitron E, Hammerling BC, Kathofer S, Lueck S, Bloehs R, Kreye VA, Kiehn J, Katus HA, Schoels W, Karle CA. Activation of cardiac human ether-a-go-go related gene potassium currents is regulated by α_{1A} -adrenoceptors. *J Mol Med.* **2004b**; 82(12): 826-37.

Thomas D, Zhang W, Karle CA, Kathofer S, Schols W, Kubler W, Kiehn J. Deletion of protein kinase A phosphorylation sites in the HERG potassium channel inhibits activation shift by protein kinase A. *J Biol Chem.* **1999**; 274(39): 27457-62.

Thomas D, Zhang W, Wu K, Wimmer AB, Gut B, Wendt-Nordahl G, Kathöfer S, Kreye VA, Katus HA, Schoels W, Kiehn J, Karle CA. Regulation of HERG potassium channel activation by protein kinase C independent of direct phosphorylation of the channel protein. *Cardiovasc Res.* **2003**; 59 (1): 14-26.

Trudeau M, Warmke JW, Ganetzky B, Robertson GA. HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science.* **1995**; 269: 92-5.

Tutor AS, Delpón E, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Tamargo J, Mayor F Jr, Penela P. Association of 14-3-3 Proteins to β_1 -Adrenergic Receptors Modulates Kv11.1 K⁺ Channel Activity in Recombinant Systems. *Mol Biol Cell.* **2006**; 17: 4666-74.

V

Vega Hernández A & Félix R. Fisiopatología de los canales iónicos sensibles al voltaje. Avance y perspectiva. Vol. 20. Mexico; **2001**. p. 83-96.

Volk T, Nguyen TH-D, Schultz JH, Ehmke H. Relationship between transient outward K⁺ current and Ca²⁺ influx in rat cardiac myocytes of endo- and epicardial origin. *J Physiol.* **1995**; 19 (3): 841-50.

W

Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature Genetics.* **1996**; 12: 17-23.

Wang S, Xu DJ, Cai J, Huang Y, Zou JG, Cao KJ. Rapid component I_{Kr} of cardiac delayed rectifier potassium currents in guinea-pig is inhibited by α_1 -adrenoreceptor activation via protein kinase A and protein kinase C-dependent pathways. *Eur J Phar.* **2009**. 608: 1-6.

Wang X, Hockerman GH, Green HW III, Babbs CF, Mohammad SI, Gerrard D, Latour MA, London B, Hannon KM, Pond AL. Merg1a K⁺ channel induces skeletal muscle atrophy by activating the ubiquitin proteasome pathway. *Faseb J.* **2006**; 20: 1531-3.

Wang Z, Kiehn J, Yang Q, Brown M, Wible BA. Comparison of binding and block produced by alternatively spliced Kvbeta1 subunits. *J Biol Chem.* **1996**; 271: 311-7.

Warmke J, Drysdale R, Ganetzky B. A Distinct Potassium Channel Polypeptide Encoded by the *Drosophila eag* Locus. *Science.* **1991**; 252: 1560-2.

Warmke JW & Ganetzky B. A family of potassium channel genes related to *eag* in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1994**; 91: 3438-42.

Watanabe T, Delbridge LM, Bustamante JO, McDonald TF. Heterogeneity of the action potential in isolated rat ventricular myocytes and tissue. *Circ Res.* **1983**; 52: 280-90.

Wei Z, Thomas D, Karle DA, Kathöter S, Schenkel J, Kreye VA, Ficker E, Wible BA, Kiehn J. Protein Kinase A-mediated phosphorylation of HERG potassium channel in a human cell line. *Chin Med J.* **2002**; 115(5): 668-76.

Whizar-Lugo V, Flores-Carrillo JC, Puerta-Román G. Toxicidad de los Anestésicos Locales [monografía de Internet]. Disponible en:

http://www.anestesia-dolor.org/anestesia/docs/toxicidad_delos_anesteticos_locales.html.

Wilde AA, Jongbloed RJ, Doevendans PA, Duren DR, Hauer RN, van Langen IM, van Tintelen JP, Smeets HJ, Meyer H, Geelen JL. Auditory stimuli as a trigger for arrhythmic events differentiate HERG-related (LQTS2) patients from KVLQT1-related patients (LQTS1). *J Am Coll Cardiol.* **1999**; 33: 327-32.

Woodcock EA, Kistler PM, Ju Y. Phosphoinositide signalling and cardiac arrhythmias. *Cardiovasc Res.* **2009**; 82(2): 286-95.

X

Xie LH, Horie M, Takano M. Phospholipase C-linked receptors regulate the ATP-sensitive potassium channel by means of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1999**; 96: 15292-7.

Y

Yellen G. The moving part of voltage gated ion channels. *Q Rev Biophys.* **1998**; 31: 239-95.

Yu FH & Catterall WA. The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE.* **2004**; 2004: re15.

Z

Zagotta WN & Aldrich RW. Voltage depending gating of Shaker A-type potassium channel in *Drosophila* muscle. *J Gen Physiol.* **1990**; 95: 29-60.

Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW. Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science.* **1990**; 250: 568-71.

Bibliografia

Zhang D-Y, Wang Y, Lau C-P, Tse H-F, Li G-R. Both EGFR kinase and Src-related tyrosine kinases regulate human ether-à-go-go-related gene potassium channels. *Cell Sig.* **2008**; 20: 1815-21.

Zhang H, He C, Yan X, Mirshahi T, Logothetis DE. Activation of inwardly rectifying K⁺ channels by distinct PtdIns (4,5)P₂ interactions. *Nat Cell Biol* **1999**; 1: 183-8.

Zhang M, Hiraoka M, Hirano Y. effects of α1-adrenergic stimulation on L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell* **1998**; 30: 1955-65.

Zhang M, Jiang M, Tseng GN. MinK-related peptide associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as beta subunit of cardiac transient outward channel? *Circ Res.* **2001**; 88: 1012-9.

Zhong H & Minneman KP. α1-Adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol.* **1999**; 375: 261-7.

Zhou Y & MacKinnon R. The occupancy of ions in the K⁺ selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J Mol Biol.* **2003**; 333: 965-75.

Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A, MacKinnon R. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature.* **2001**; 414: 43-8.

