

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



MODULACIÓN DE LOS CANALES Kv4.3 CARDIACOS HUMANOS  
POR ENDOCANNABINOIDES Y ÁCIDOS GRASOS

TESIS DOCTORAL DE:

**IRENE AMORÓS GARCÍA**

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**EVA DELPÓN MOSQUERA  
JUAN TAMARGO MENÉNDEZ  
RICARDO CABALLERO COLLADO**

Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**



**MODULACIÓN DE LOS CANALES Kv4.3  
CARDIACOS HUMANOS  
POR ENDOCANNABINOIDES Y ÁCIDOS GRASOS**

**TESIS DOCTORAL**

**Irene Amorós García**

**DIRECTORES**

**Prof. Eva Delpón Mosquera**

**Prof. Juan Tamargo Menéndez**

**Prof. Ricardo Caballero Collado**

**Madrid, 2013**



## **Summary**



## INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained cardiac arrhythmia in clinical practice. Its incidence increases two-fold per decade after 55 years of age, affecting  $\approx 5\%$  of population over 65 years of age. AF alters electrophysiological, histological and contractile atrial properties in a way that promotes both the occurrence and persistence of the arrhythmia, a phenomenon called “atrial remodelling”. Electrical remodelling mainly consists of an inhomogeneous shortening of both action potential (AP) and atrial refractory period durations (APD and ARP respectively), which allows for a higher number of excitation wave fronts to coexist simultaneously and disorderly in the atria. The shortening of APD and ARP are caused by changes in the expression levels of the channels that generate the currents that underlie atrial AP. In the human atrial myocardium, the height and duration of the plateau phase of the AP are determined by the balance between the inward  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{\text{CaL}}$ ) and two outward  $\text{K}^{+}$  currents, the ultrarapid component of the delayed rectifier current ( $I_{\text{Kur}}$ ) and the 4-aminopyridine-sensitive component of the transient outward current ( $I_{\text{to1}}$ ). Human cardiac  $I_{\text{to1}}$  is carried by Kv4.3  $\alpha$ -subunits co-assembled with different  $\beta$ -subunits.

The endocannabinoid system is a modulating system that regulates the nervous, immune and endocrine systems, although its effects can affect many other systems such as the cardiovascular one. Endocannabinoids (EC) are synthesized on demand in the myocardium where they modulate cardiac contractility and frequency and exert cardioprotective and antiarrhythmic actions in ischemia-reperfusion models. It has been proposed that in some pathologic situations, such as AF, EC synthesis is increased. However, there are no data regarding the expression of cannabinoid (CB) receptors in human myocardium and the possible electrophysiological direct effects produced by EC and EC-related compounds. There are also no data on the effects produced by the activation of the CB receptors on ion channels involved in the repolarization of human atrial APs. Thus, it would be of interest to analyze the effects of these compounds on the Kv4.3 channels which generate the  $I_{\text{to1}}$  and are critically involved in human atrial repolarization.

Therefore, the main objectives of this Doctoral Thesis were:

- a) To analyze the putative non-receptor mediated effects of EC and EC-related compounds [anandamide (AEA), methanandamide (MetAEA), 2-arachidonoylglycerol (2-AG), L- $\alpha$ -lisofosfatidilinositol (LPI), oleoylethanolamide (OEA), stearoylethanolamide (SEA) and palmitoylethanolamide (PEA)] on Kv4.3 channels cloned from human tissue.

- b) To analyze the putative non-receptor mediated effects of the corresponding fatty acids from which ethanolamides are endogenously synthesized [arachidonic acid (AA), oleic acid (OA), stearic acid (SA), and palmitic acid (PA)] on Kv4.3 channels.
- c) To determine the expression levels of CB receptor type 1 (CB1), type 2 (CB2), and G protein-coupled receptor 55 (GPR55) in atrial samples obtained from patients in sinus rhythm (SR) and AF.
- d) To determine the effects produced by the activation of CB receptors on Kv4.3 channels, as well as the intracellular signalling pathway responsible for them.
- e) To analyze the non-receptor and receptor mediated effects of the EC on  $I_{to1}$  current recorded in human atrial myocytes.

## RESULTS

We first studied the non-mediated effects of AEA, its metabolically stable analog MetAEA, 2-AG, and LPI, by using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique in Chinese hamster ovary (CHO) cells stably expressing the  $\alpha$ -Kv4.3 and  $\beta$ -KChIP2a subunits.

All compounds decreased Kv4.3+KChIP2a peak current amplitude ( $I_{Kv4.3}$ ) and significantly accelerated the kinetics of the inactivation process. For a better characterization of the steady-state block, we calculated the reduction of the total charge crossing the membrane through Kv4.3+KChIP2a channels at +50 mV ( $Q_{Kv4.3}$ ) produced by each compound at different concentrations. The Hill equation was fitted to the data yielding an  $IC_{50}$  of  $0.4 \pm 0.01$   $\mu$ M for AEA,  $0.5 \pm 0.02$   $\mu$ M for MetAEA,  $0.3 \pm 0.01$   $\mu$ M for 2-AG, and  $8.0 \pm 0.9$   $\mu$ M for LPI, respectively.

All compounds, except LPI, modified the voltage dependence of Kv4.3+KChIP2a channels inactivation by shifting the inactivation curve to more negative potentials. Representation of the relative current as a function of the membrane potential, demonstrated that the EC-induced blockade significantly increased in the voltage range coinciding with that of channel inactivation, suggesting that EC blocked Kv4.3+KChIP2a channels preferentially in the inactivated state.

To get a deeper insight into the mechanism responsible for the non-mediated effects of AEA on Kv4.3+KChIP2 channels, we performed the following groups of experiments. First, CHO cells stably expressing Kv4.3+KChIP2 were transiently transfected with MiRP2 or DPP6 encoding genes to analyze the effects produced by AEA in the presence of these  $\beta$ -

subunits. The results demonstrated that the auxiliary subunits were not involved in the effects. Moreover, by using time-resolved fluorescence intensity and anisotropy measurements, we demonstrated that the effects were not mediated by changes on the membrane order and/or microviscosity. Finally, in another set of experiments, we compared the blockade produced by AEA when it was added extra- or intracellularly. The results suggested that the blockade was produced as a consequence of the AEA interaction with the extracellular face of the channel.

AEA also inhibited  $I_{to1}$  recorded in human atrial myocytes. These experiments were developed in the presence of CB1 (rimonabant) and CB2 (AM630) receptor antagonists and, thus, suggest that AEA effects were receptor-independent.

Next, we analyzed the effects on  $I_{Kv4.3}$  of the fatty acids (AA, OA, SA, and PA) and their respective ethanolamides (OEA, SEA, and PEA). AA, OA and OEA inhibited  $I_{Kv4.3}$  in a concentration-dependent manner and modified the voltage dependence of Kv4.3+KChIP2a channels inactivation by shifting the inactivation curve to more negative potentials. On the contrary, SA, PA, SEA and PEA only slightly blocked Kv4.3+KChIP2a channels and did not modify the voltage dependence of the inactivation process. In order to find a relationship between their potency of block and their structure, we compared the concentration-response curves for all ECs, ethanolamides, and fatty acids tested. The results suggested that the number of carbon atoms in the fatty acid chain, but not the presence or absence of the ethanolamide group, determines the potency of block, which increased when the number of carbon atoms increased. The presence of double bonds in the fatty acid chain is also critical.

Afterwards we determined by PCR the expression of CB1, CB2 and GPR55 receptors in human atrial samples obtained from patients in SR and with chronic AF. CB receptors were expressed in human atrial appendages and chronic AF markedly and significantly increased their expression.

The next group of experiments, was performed in cells stably expressing CB1 (CHO-CB1) or GPR55 (CHO-GPR55) receptors. These cells were transiently transfected with the gene encoding human cardiac Kv4.3 and currents were recorded using the whole-cell patch-clamp technique. CB1 and GPR55 receptors were stimulated with WIN55,212-2 and with LPI and PEA, respectively.

CB1 and GPR55 receptor activation inhibited  $I_{Kv4.3}$  in a concentration-dependent manner. WIN55,212-2, LPI and PEA produced a more marked  $I_{Kv4.3}$  inhibition by activating CB receptors than that produced when they directly interact with the channel protein. Moreover, WIN55,212-2 and PEA but not LPI, modified the voltage dependence of Kv4.3+KChIP2a channels inactivation by shifting the inactivation curve to more negative potentials.

WIN55,212-2 also inhibited  $I_{to1}$  recorded in human atrial myocytes, and significantly accelerated its inactivation kinetics. However, LPI and PEA, produced less marked effects on atrial myocytes than in the heterologous GPR55 receptor system. Therefore, effects of the activation of GPR55 receptors on  $I_{Kv4.3}$  were not further analyzed.

Finally we analyzed the signalling pathway underlying the effects produced by CB1 receptors activation. The results demonstrated that the stimulation of CB1 activated phospholipase C (PLC), an effect which in turn increased the  $IP_3$  and DAG levels. This lead to the activation of protein kinase C (PKC) and to an increase of the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration which, in turn, activated the  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII). Both kinases (PKC and CaMKII) could interact with different sites of Kv4.3 channel, modulating the current amplitude.

## CONCLUSIONS AND DISCUSSION

In this Doctoral Thesis we have demonstrated that AEA, 2-AG and MetAEA produce a non-receptor mediated blockade of human cardiac Kv4.3+KChIP2a channels stably expressed in a mammalian cell line. Blockade of Kv4.3+KChIP2a channels produced by EC is due to their direct interaction with the external side of the pore-forming  $\alpha$ -Kv4.3 subunit. Interactions with auxiliary subunits or effects caused by disturbances in the cell membrane were discarded.

Moreover, data obtained in human atrial myocytes demonstrate that EC and their analogs inhibit native  $I_{to1}$  in a non-receptor mediated manner, thus confirming the results obtained in cell lines transfected with Kv4.3+KChIP2a channels.

We have also demonstrated that chronic AF increases the expression of CB receptors. Furthermore, EC can also modulate the native  $I_{to1}$  and Kv4.3 channels through the stimulation of CB1 receptors. Finally, we have demonstrated that the effects produced by CB1 receptor stimulation on Kv4.3 channels are caused by the activation the PLC/ $IP_3$ /DAG signaling pathway, which, in turn, stimulates CaMKII and PKC, being these two kinases the putative modulators of the channel activity.

Overall, we propose that ECs modulate Kv4.3 channels, which generate human cardiac  $I_{to1}$  and, therefore, modulate atrial AP morphology. This latter effect could be particularly interesting in situations in which EC synthesis is increased or in which the level of expression of CB receptors is increased, such as in AF.

## **Abreviaturas**



2-AG: 2-araquidonoilglicerol	efecto máximo observado
4-AP: 4-Aminopiridina	CHO: Células de ovario de hámster chino ( <i>Chinese Hamster Ovary cells</i> )
9-CPA: 9-ciclopentil adenina	CI <sub>50</sub> : Concentración que produce una inhibición de la corriente del 50%
AA: Ácido araquidónico	BK <sub>Ca</sub> : Canales de K <sup>+</sup> activados por Ca <sup>2+</sup> de alta conductancia C-terminal: Carboxilo-terminal
AC: Adenilato ciclasa	COS-7: CV-1 (simio) en Origen, y llevando el promotor SV40
ACh: Acetilcolina	CPA: 9-Ciclopentiladenina
AD: Aurícula derecha	Ct: Ciclo umbral en el que la fluorescencia de la muestra se hace detectable por encima del fondo
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario	CTX: Caribdotoxina
ADP: Adenosín difosfato	D: Dominio
AEA: Anandamida	DAG : Diacilglicerol
AI: Aurícula izquierda	DE: Desviación estándar
AKAP: Proteína de anclaje para la PKA	DHP: 1,4-Dihidropiridinas
AM251: 1-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-1-piperidinyl-1H-pyrazole-3-carboxamide	DIA: Dominio de interacción $\alpha$ del canal de Ca <sup>2+</sup>
AM281: 1-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-4-morpholinyl-1H-pyrazole-3-carboxamide	DIB: Dominio de interacción $\beta$ del canal de Ca <sup>2+</sup>
AM630: 6-Iodo-2-methyl-1-[2-(4 morpholinyl)ethyl]-1H-indol-3-yl] (4-methoxyphenyl) methanone	DMSO: Dimetilsulfóxido
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico	DPA: Duración del potencial de acción
AO: Ácido oléico	DPA <sub>n</sub> : DPA medida al n % de la repolarización
AP: Ácido palmítico	DPP: Proteínas dipeptidilpeptidasas
ARAI: Antagonista del receptor de angiotensina II	DTX: Dendrotoxina
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero	<i>E</i> : Potencial transmembrana
ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico	ECG: Electrocardiograma
AS: Ácido esteárico	EEM: Error estándar de la media
AsODN: Oligonucleótidos antisentido ( <i>Antisense oligonucleotides</i> )	EGTA: Ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetiléter)-tetraacético
ATP: Adenosín trifosfato	$E_K$ : Potencial de Nernst para el K <sup>+</sup>
AV: Aurículo-ventricular	$E_m$ : Potencial de membrana
BAPTA: Ácido 1,2-Bis (2-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacético	ERK: <i>Extracelullar signalling-regulated kinase</i>
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>e/i</sub> : Concentración extra/intracelular de Ca <sup>2+</sup>	<i>f</i> : Fracción de aumento/bloqueo producida por un fármaco
CaM: Calmodulina	<i>F</i> : Constante de Faraday (9.65x10 <sup>4</sup> C/mol)
CaMKII: Proteína quinasa II dependiente de Ca <sup>2+</sup> /CaM	FA: Fibrilación auricular
CB1: Receptor de cannabinoides tipo 1	FAAH: Amido hidrolasa de ácidos grasos ( <i>atty acid amide hidrolase</i> )
CB2: Receptor de cannabinoides tipo 2	FAC: Fibrilación auricular crónica
CE <sub>50</sub> : Concentración que produce la mitad del	FV: Fibrilación ventricular

G: conductancia	Kv4.3+KChIP2a
$\Delta G$ : Energía de Gibbs	$I_{Kv7.1}$ : Corriente de $K^+$ generada por canales
GAPDH: Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa ( <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i> )	$Kv7.1I_M$ : Corriente de activación lenta y que no inactiva en neuronas
GMPc: Guanosín monofosfato cíclico	$I_M$ : Corriente de inactivación lenta en neuronas
GPR: receptores acoplados a proteínas G ( <i>protein coupled receptors</i> )	IMC: Índice de masa corporal
GTP: Guanosín trifosfato	$I_{Na}$ : Corriente de entrada de $Na^+$
HCN: Canales activados por la hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos ( <i>Hyperpolarization activated Cyclic Nucleotide- gated channels</i> )	$I_{Na,L}$ : Corriente tardía de entrada de $Na^+$
HEK293: Células embrionarias humanas de riñón ( <i>Human Embryonic Kidney cells</i> )	$I_{NaCa}$ : Corriente del intercambiador $Na^+/Ca^{2+}$
HEPES: Ácido N-Hidroxietilpiperacina-N'- etanesulfónico	$[ion]_{e/i}$ : Concentración extra/intracelular del ion
hERG: <i>Human Ether-à-go-go Related Gene</i>	IP <sub>3</sub> : Inositol 1,4,5-trifosfato
HpTXs: Toxina Heteropoda	$I_{sus}$ : Corriente sostenida
HTA: Hipertensión arterial	$I_{to1}$ : Corriente transitoria de salida de $K^+$ cardíaca
HVA: <i>High-Voltage Activated</i>	$I_{to1,s}$ : Corriente transitoria de salida lenta de $K^+$
<i>i</i> : Intensidad de corriente unitaria	$I_{to1,f}$ : Corriente transitoria de salida rápida de $K^+$
<i>I</i> : Intensidad de corriente macroscópica	$I_{to2}$ : Corriente transitoria de salida de $Cl^-$ activada por $Ca^{2+}$
$I_A$ : Corriente transitoria de salida de $K^+$ en neuronas	I-V: Relación intensidad de corriente-voltaje
$I_{Ca}$ : Corriente de entrada de $Ca^{2+}$	JNK/SAPK: <i>Jun amino-terminal kinases/stress- activated kinases</i>
$I_{Ca,L}/I_{Ca,T}$ : $I_{Ca}$ generada por canales tipo L/tipo T	<i>k</i> : Valor de la pendiente de una curva
IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina	$[K^+]_{e/i}$ : Concentración extra/intracelular de $K^+$
$I_f$ : Corriente hiperpolarizante marcapasos ( <i>funny current</i> )	$K_{ACh}$ : Canales de $K^+$ activados por ACh
Ig: Inmunoglobulina	$K_{ATP}$ : Canales de $K^+$ activados por ATP
$I_{K1}$ : Corriente de $K^+$ con rectificación interna	$K_{Ca}$ : Canales de $K^+$ activados por $Ca^{2+}$
$I_{K,ACh}$ : Corriente de salida de $K^+$ activada por ACh	KChAP: <i>K<sup>+</sup> Channel-Associated Protein</i>
$I_{K,ATP}$ : Corriente de $K^+$ sensible a ATP	KChIP: <i>Kv Channel Interacting Protein</i>
$I_{K,r}$ : Corriente rectificadora tardía de $K^+$ de activación rápida	Kir: Canales de $K^+$ rectificadores internos
$I_{K,s}$ : Corriente rectificadora tardía de $K^+$ de activación lenta	Kv: Canales de $K^+$ dependientes de voltaje
$I_{K,ur}$ : Corriente rectificadora tardía de $K^+$ de activación ultrarrápida	Kv4.3-L: Variante larga del canal Kv4.3
$I_{Kv4.3}$ : Corriente de $K^+$ generada por canales	Kv4.3-S: Variante corta del canal Kv4.3
	logD: Coeficiente de distribución
	logP: Coeficiente de partición
	LPI: L- $\alpha$ -lisofosfatidilinositol
	<i>Ltk</i> : Fibroblastos de ratón carentes de tirosina quinasa
	LVA: <i>Low-Voltage Activated</i>
	MAGL: Monoacilglicerol lipasa
	MAPK: Quinasas activadas por mitógenos
	MetAEA: R-(+)-meta-anandamida

minK: <i>Minimal K<sup>+</sup> channel subunit</i>	estacionario
MiRP: <i>MinK-Related Peptides</i>	RS: Ritmo sinusal
N-terminal: Amino-terminal	r(t): Anisotropía de fluorescencia con resolución temporal
NAAA: <i>N-acylethanolamine-hydrolysing acid amidase</i>	RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa ( <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
NAB: <i>N-terminal A and B box</i> , también dominio T1	r <sub>∞</sub> : Anisotropía residual o límite
NBD: Dominios de unión de nucleótidos	SA: Senoauricular
n <sub>H</sub> : Coeficiente de Hill	SCE: Sistema cannabinoide endógeno
NO: Óxido nítrico	SEA: estearoiletanolamida
OEA: oleoiletanolamida	SJLN: Síndrome de Jervell y Lange-Nielsen
P <sub>ion</sub> : Permeabilidad de la membrana a un determinado ion	SM: Síndrome metabólico
PA: Potencial de acción	SNAP: (±)-S-Nitroso-N-acetilpenicilamina
PA-DPH: Sonda fluorescente 2-carboxietil-1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno	SNC: Sistema nervioso central
PaTXs: <i>Phrixotoxinas</i>	SNP: Sistema nervioso periférico
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )	SQTC: Síndrome de QT corto
PDE: Fosfodiesterasa	SQTL: Síndrome de QT largo
PEA: palmitoiletanolamida	SR141716A: N-Piperidino-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methylpyrazole-3-carboxamide
PIP <sub>2</sub> : Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato	SUR: Receptor de sulfonilureas
PKA: Proteína quinasa dependiente de AMPc	τ: Constante de tiempo
PKC: Proteína quinasa C	T: Temperatura absoluta
PKG: Proteína quinasa dependiente de GMPc	TALK: <i>TWIK-related Alkalosis-activated K<sup>+</sup> channels</i>
PLC: Fosfolipasa C	TASK: <i>TWIK-related Acid-Sensitive K<sup>+</sup> channels</i>
PMA: Miristato-acetato de forbol ( <i>Phorbol Myristate Acetate</i> )	TEA: Tetraetilamonio
PPAR: Receptor nuclear de peroxisomas ( <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i> )	THC: Δ9-tertrahidrocanabinol
PR: Potencial de reposo	THIK: <i>Tandem pore domain Halothane Inhibited K<sup>+</sup> channels</i>
PTX: Toxina <i>pertussis</i>	TM: Transmembrana (segmento)
Q: Carga	TRAAK: <i>TWIK-Related Arachidonic Acid-stimulated K<sup>+</sup> channels</i>
Q <sub>Kv4.3</sub> : carga total que atraviesa la membrana a través canales Kv4.3+KChIP2a	TREK: <i>TWIK-RElated K<sup>+</sup> channels</i>
qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa	TTX: Tetrodotoxina
Qss: <i>Quasi-Steady-State</i> del canal K <sub>ACh</sub>	TWIK: <i>Tandem of P domains in Weak Inward rectifier K<sup>+</sup> channels</i>
Q-V: Relación carga-voltaje	V: Voltaje
R: Constante universal de los gases (8.31 J/mol·K)	Vh: Valor del punto medio de una curva
RMB: Rimonabant	
r <sub>ss</sub> : Anisotropía de fluorescencia en estado	

WIN55-212,2: (*R*)-(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3[(4-morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazinyl]-(1-aphthalenyl)methanone mesylate

z: valencia de un ion

## **Índice**



<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Electrofisiología cardíaca</b> .....	<b>3</b>
1.1. Excitabilidad.....	4
1.1.1. Transporte de iones a través de la membrana celular.....	6
1.1.2. El potencial de acción .....	8
1.1.2.a. PA rápidos o dependientes de $\text{Na}^+$ .....	9
1.1.2.b. PA lentos o dependientes de $\text{Ca}^{2+}$ .....	11
1.2. Automatismo .....	12
1.3. Refractoriedad .....	13
1.4. Propagación del impulso cardíaco.....	14
<b>2. Canales iónicos dependientes de voltaje implicados en el potencial de acción cardíaco</b> .....	<b>17</b>
2.1. Canales de $\text{Na}^+$ .....	17
2.1.1. Estructura de los canales de $\text{Na}^+$ .....	18
2.1.2. Características de la $I_{\text{Na}}$ .....	20
2.1.3. Canalopatías asociadas a los canales de $\text{Na}^+$ cardíacos.....	22
2.2. Canales de $\text{Ca}^{2+}$ .....	22
2.2.1. Estructura de los canales de $\text{Ca}^{2+}$ .....	23
2.2.2. Características de la $I_{\text{Ca,L}}$ .....	25
2.2.3. Composición de los canales que generan la $I_{\text{Ca,L}}$ .....	26
2.2.4. Canalopatías asociadas al canal de $\text{Ca}^{2+}$ tipo L.....	27
2.3. Canales de $\text{K}^+$ .....	27
2.3.1. Canales 2TM/1P.....	30
2.3.1.a. La rectificación interna en los canales Kir .....	31
2.3.1.b. Estructura de los canales Kir.....	32
2.3.1.c. Principales corrientes cardíacas generadas a través de canales Kir .....	34
I. La $I_{\text{K1}}$ .....	34
I.a. Características de la $I_{\text{K1}}$ .....	35
I.b. Composición de los canales que generan la $I_{\text{K1}}$ .....	36
II. La $I_{\text{K,ATP}}$ .....	37
II.a. Composición de los canales que generan la $I_{\text{K,ATP}}$ .....	38
III. La $I_{\text{K,ACh}}$ .....	39
III.a. Características de la $I_{\text{K,ACh}}$ .....	39

III.b. Composición de los canales que generan la $I_{K,ACh}$ .....	40
2.3.2. Canales 4TM/2P.....	40
2.3.3. Canales 6TM/1P.....	42
2.3.3.a. Estructura de los canales Kv.....	45
I. La subunidad $\alpha$ .....	46
II. Subunidades auxiliares.....	49
2.3.3.b. La inactivación de los canales Kv.....	53
2.3.3.c. Principales corrientes generadas a través de canales Kv que intervienen en el PA cardíaco.....	55
I. La $I_{to}$ .....	55
I.a. Características de la $I_{to1}$ .....	55
I.b. Composición de los canales que generan la $I_{to1}$ .....	58
I.b.1. Composición de la $I_{to1,s}$ .....	59
I.b.2. Composición de la $I_{to1,f}$ .....	59
I.c. Regulación de la $I_{to1}$ .....	63
I.d. Propiedades farmacológicas de la $I_{to1}$ .....	65
I.e. La $I_{to1}$ en diversas patologías.....	67
II. La $I_{Kur}$ .....	68
II.a. Características de la $I_{Kur}$ .....	68
II.b. Composición de los canales que generan la $I_{Kur}$ .....	69
II.c. Regulación de la $I_{Kur}$ .....	70
II.d. Propiedades farmacológicas de la $I_{Kur}$ .....	71
II.e. La $I_{Kur}$ en diversas patologías y canalopatías asociadas a los canales Kv1.5.....	72
III. La $I_{Kr}$ .....	73
III.a. Características de la $I_{Kr}$ .....	74
III.b. Composición de los canales que generan la $I_{Kr}$ .....	74
III.c. La $I_{Kr}$ en diversas patologías.....	75
III.d. Canalopatías asociadas a las subunidades Kv11.1 y MiRP1.....	76
IV. La $I_{Ks}$ .....	77
IV.a. Características de la $I_{Ks}$ .....	77
IV.b. Composición de los canales que generan la $I_{Ks}$ .....	77
IV.c. La $I_{Ks}$ en diversas patologías.....	79
IV.d. Canalopatías asociadas a las subunidades Kv7.1 y minK.....	80

---

<b>3. Fibrilación auricular</b> .....	<b>80</b>
3.1. Génesis de la FA .....	81
3.2. Causas y condiciones asociada a la FA .....	84
3.3. Remodelado en la FA .....	85
3.3.1. Remodelado eléctrico .....	86
3.3.2. Remodelado estructural y contráctil .....	88
3.4. Tratamiento farmacológico de la FA .....	89
<b>4. Sistema endocannabinoide</b> .....	<b>91</b>
4.1. Endocannabinoides y análogos de endocannabinoides .....	92
4.2. Síntesis, transporte y degradación de los endocannabinoides .....	95
4.3. Receptores cannabinoides .....	98
4.3.1. Receptores no-CB1/no-CB2 o receptores <i>CB-like</i> .....	101
4.4. Acciones de los endocannabinoides .....	104
4.4.1. Acciones cardiovasculares de los endocannabinoides .....	104
4.4.2. Efectos de los endocannabinoides sobre diversos canales iónicos .....	107
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>111</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>115</b>
<b>1. Técnica de fijación de voltaje en parche de membrana (<i>patch-clamp</i>)</b> .....	<b>117</b>
<b>2. Compuestos</b> .....	<b>120</b>
<b>3. Registro de la <math>I_{Kv4.3}</math> en sistemas de expresión heterólogos</b> .....	<b>120</b>
3.1. Cultivo celular .....	120
3.2. Técnicas electrofisiológicas de registro en sistemas de expresión heterólogos .....	123
3.3. Soluciones, protocolos experimentales y análisis de resultados .....	124
<b>4. Registro de la <math>I_{to1}</math> en miocitos auriculares humanos</b> .....	<b>126</b>
4.1. Disociación de miocitos auriculares humanos .....	128
4.2. Técnicas de registro de de la $I_{to1}$ en miocitos auriculares humanos .....	129
4.3. Soluciones y protocolos experimentales .....	129
<b>5. Medidas de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario y con resolución temporal</b> .....	<b>130</b>

<b>6. Determinación del índice de complejidad .....</b>	<b>132</b>
<b>7. Análisis de la expresión del ARNm de los receptores CB.....</b>	<b>132</b>
7.1. Extracción de ARNm .....	132
7.2. Identificación de receptores CB en muestras auriculares humanas .....	133
7.3. Cuantificación de la expresión de receptores CB en muestras auriculares humanas.....	134
<b>8. Análisis estadístico de los resultados .....</b>	<b>134</b>
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>137</b>
<b>1. Características electrofisiológicas de la <math>I_{Kv4.3}</math> .....</b>	<b>139</b>
<b>2. Efectos directos de los endocannabinoides y análogos de cannabinoides sobre los canales <math>Kv4.3 + KChIP2</math>.....</b>	<b>141</b>
2.1. Efectos de la AEA y la MetAEA sobre los canales $Kv4.3 + KChIP2a$ .....	141
2.1.1. Posible implicación de los receptores CB en los efectos de la AEA sobre la $I_{Kv4.3}$ .....	148
2.2. Efectos del 2-AG y del LPI sobre los canales $Kv4.3 + KChIP2a$ .....	149
2.3. Efectos de la OEA, la SEA y la PEA sobre los canales $Kv4.3 + KChIP2a$ .....	153
2.4. Importancia de las subunidades auxiliares sobre los efectos de los endocannabinoides .....	156
<b>3. Efectos directos de la AEA sobre la corriente auricular humana <math>I_{to1}</math> .....</b>	<b>157</b>
<b>4. Estudio de la relación de la estructura y de la liposolubilidad de los endocannabinoides con su efecto sobre la <math>I_{Kv4.3}</math> .....</b>	<b>159</b>
4.1. Efectos de los ácidos grasos AA, AO, AS y AP sobre los canales $Kv4.3 + KChIP2a$ .....	160
4.2. Relación estructura-actividad.....	163
4.3. Papel de la liposolubilidad de los endocannabinoides y sus análogos en los efectos sobre la $I_{Kv4.3}$ .....	165
<b>5. Mecanismo de acción de bloqueo producido por la AEA sobre los canales <math>Kv4.3 + KChIP2a</math>.....</b>	<b>165</b>
5.1. Modificaciones en las propiedades dinámicas y estructurales de la membrana .....	166
5.2. Implicación del calcio intracelular .....	169

---

5.3. Sitio de unión de la AEA en los canales Kv4.3+KChIP2a .....	169
<b>6. Efectos mediados a través de receptor de los endocannabinoides y análogos de cannabinoides sobre los canales Kv4.3 .....</b>	<b>173</b>
6.1. Análisis de la expresión de ARNm de receptores CB en muestras auriculares humanas .....	173
6.1.1. PCR semicuantitativa .....	174
6.1.2. PCR cuantitativa .....	175
6.2. Efectos de la estimulación selectiva del receptor CB1 sobre la $I_{Kv4.3}$ .....	176
6.3. Efectos de la estimulación selectiva del receptor GPR55 por el LPI y la PEA sobre la $I_{Kv4.3}$ .....	180
<b>7. Efectos de la estimulación selectiva de los receptores CB1 y GPR55 sobre la corriente auricular humana <math>I_{to1}</math> .....</b>	<b>184</b>
7.1. Efectos de la estimulación selectiva del receptor CB1 por el WIN55,212-2 sobre la $I_{to1}$ .....	185
7.2. Efectos de la estimulación selectiva del receptor GPR55 por el LPI y la PEA sobre la $I_{to1}$ .....	186
<b>8. Identificación de la cascada intracelular responsable de los efectos del WIN55,212-2 sobre la <math>I_{Kv4.3}</math> .....</b>	<b>187</b>
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>197</b>
<b>1. Efectos de los endocannabinoides sobre los canales Kv4.3+KChIP2a y la <math>I_{to1}</math> .....</b>	<b>199</b>
<b>2. Determinación del posible sitio de unión de los endocannabinoides al canal Kv4.3+KChIP2a .....</b>	<b>202</b>
<b>3. Efectos de los endocannabinoides y análogos mediados a través de la estimulación de los receptores CB sobre la <math>I_{Kv4.3}</math> y la <math>I_{to1}</math> .....</b>	<b>204</b>
3.1. Modulación de la $I_{Kv4.3}$ y la $I_{to1}$ a través de la estimulación del receptor CB1 .....	205
3.2. Cascada intracelular responsable de la inhibición de la $I_{Kv4.3}$ por el WIN55,212,2 .....	207
3.3. Efectos del LPI y de la PEA mediados a través de la estimulación del receptor GPR55 sobre la $I_{Kv4.3}$ y la $I_{to1}$ .....	209
<b>4. Implicaciones clínicas de los resultados .....</b>	<b>211</b>
4.1. El SCE en diferentes situaciones patológicas .....	211

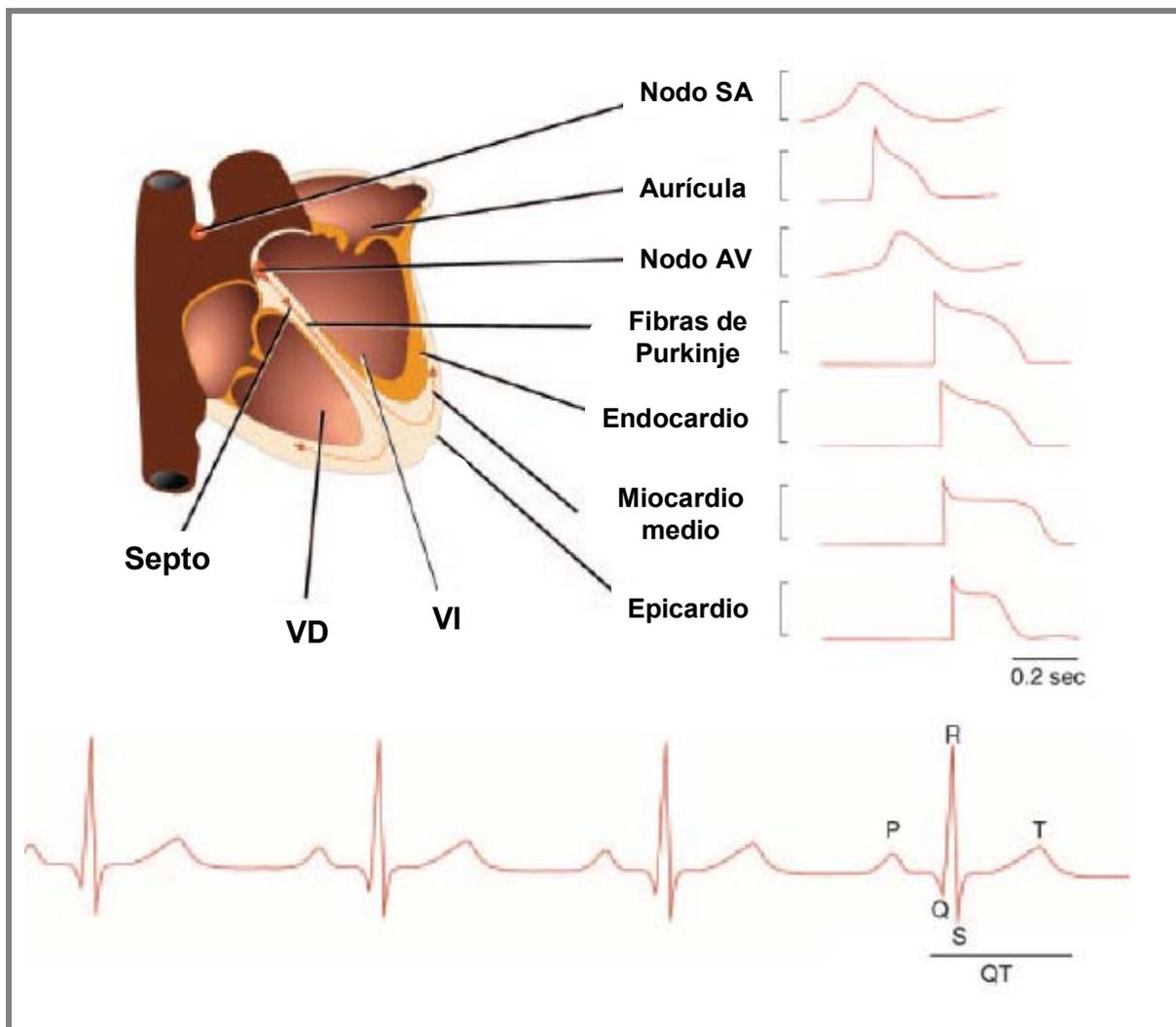
4.2. Modulación del SCE en la FA.....	.212
4.3. Implicaciones de la inhibición de la $I_{to1}$ en pacientes con FA.....	.214
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>.217</b>
<b>VII. Bibliografía</b> .....	<b>.221</b>

# **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. ELECTROFISIOLOGÍA CARDIACA

El corazón es un órgano que actúa a modo de bomba, enviando sangre a los distintos tejidos del organismo. Para llevar a cabo su función presenta tejidos especializados en los que se generan automáticamente impulsos que se conducen de forma organizada y provocan la contracción periódica del miocardio. El corazón está formado por dos tipos de músculo: el auricular y el ventricular, de los que depende su capacidad contráctil, y las fibras del tejido especializado de conducción, encargadas de la transmisión de los impulsos a través del corazón.



**Figura I.1. Representación esquemática de la actividad eléctrica en el miocardio.** Se observan los potenciales de acción registrados en diversas zonas del tejido cardíaco y su correlación con el electrocardiograma de superficie. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

En condiciones fisiológicas, el impulso cardíaco nace en el nodo senoauricular (SA), estructura que se localiza en la confluencia de la vena cava superior con la orejuela derecha y la pared lateral de la aurícula derecha (AD) (Figura I.1). El nodo SA genera unos 60-90

potenciales de acción (PA) por minuto que se propagan sin disminución de amplitud hasta que todas las células cardíacas son excitadas. Desde el nodo SA, el impulso se propaga por todo el tejido auricular a una velocidad de 0.3 m/s para, a continuación, llegar al nodo aurículo-ventricular (AV), única vía que permite la comunicación eléctrica entre aurículas y ventrículos en condiciones fisiológicas. En el nodo AV, el estímulo se ralentiza antes de pasar al ventrículo (0.01-0.05 m/s). El impulso pasa después a las fibras de transición y al sistema de His-Purkinje, a través del cual se conduce muy rápidamente (2-4 m/s). El haz de His se bifurca en una rama derecha y varias izquierdas, que acaban ramificándose profusamente en fibras de Purkinje, desde donde la activación se extiende por el músculo ventricular, empezando por el septo medio izquierdo y la base de los músculos papilares y, de ahí, al resto de los ventrículos. La rápida velocidad de conducción intraventricular (0.3-4 m/s) tiene como misión permitir que ambos ventrículos se contraigan de forma sincrónica en un corto espacio de tiempo, algo esencial para que se realice de forma eficaz la función de bomba (Hoffman y Cranefield, 1960; Delpón y Tamargo, 2010).

Para comprender este complejo mecanismo, que se repite con cada latido, es necesario conocer algunas propiedades de las células cardíacas tales como la excitabilidad, el automatismo, la refractariedad y la conducción del impulso cardíaco.

### 1.1. Excitabilidad

La membrana citoplásmica es una barrera que separa dos medios acuosos de diferente composición. Esta diferencia entre ambos medios origina un gradiente de concentración que induce la difusión de moléculas desde el medio donde están más concentradas hacia el medio en el que lo están menos (Tabla I.1). Termodinámicamente, la difusión es un proceso que disminuye el orden del sistema (es decir, que aumenta su entropía), lo que implica que la difusión libera energía. Nernst cuantificó esta energía como una variación de potencial eléctrico:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (I.1)$$

donde  $\Delta G$  es la energía de Gibbs liberada en el proceso de difusión,  $R$  es la constante universal de los gases (8.31 J/mol·K),  $T$  es la temperatura absoluta y  $[ion]_e$  e  $[ion]_i$  son las concentraciones extra e intracelulares del ion que difunde.

Así, si la membrana es únicamente permeable al  $K^+$ , éste difundirá desde el interior (donde está más concentrado) hacia el exterior de la célula (donde está menos concentrado),

por lo que el interior se tornará más negativo, con lo que volverá a atraer iones  $K^+$  hacia el interior de la célula. La energía de atracción también puede cuantificarse:

$$\Delta G = -E \cdot z \cdot F \quad (I.2)$$

donde  $E$  es el potencial transmembrana,  $z$  es la valencia del ion en cuestión y  $F$  es la constante de Faraday ( $9.65 \times 10^4$  C/mol). Con la salida progresiva de  $K^+$  de la célula, llega un punto en el que el gradiente eléctrico se iguala al gradiente químico (de concentración) que causa la difusión:

$$E \cdot z \cdot F = R \cdot T \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (I.3)$$

Reordenando los términos de la igualdad, se obtiene la “ecuación de Nernst” (Nernst, 1888):

$$E = (R \cdot T / z \cdot F) \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (I.4)$$

El potencial al que el flujo neto a través de la membrana de un ion es nulo recibe el nombre de “potencial de equilibrio” (Tabla I.1) y su valor viene dado por la ecuación de Nernst.

Ion	[Ion] <sub>e</sub> (mM)	[Ion] <sub>i</sub> (mM)	Potencial de equilibrio
Na <sup>+</sup>	135-145	12	+67
K <sup>+</sup>	3.5-5	155	-96
Cl <sup>-</sup>	123	4.2	-90
Ca <sup>2+</sup>	1.5	10 <sup>-4</sup> nM	+129

**Tabla I.1. Concentraciones extra e intracelulares de los principales iones en condiciones fisiológicas.** Los potenciales de equilibrio para cada ion se han obtenido mediante la ecuación de Nernst para una temperatura de 37°C.

La diferencia de potencial que existe a ambos lados de la membrana se denomina potencial de membrana ( $E_m$ ) y viene determinada por la concentración de iones a uno y a otro lado de la misma, así como por la permeabilidad de la membrana a cada ion (Hoffman y Cranefield, 1960). En condiciones normales, las células musculares auriculares y ventriculares presentan un  $E_m$  de aproximadamente -85 mV, mientras que en las células de los nodos SA y AV el  $E_m$  es de entre -45 y -65 mV. En las células auriculares y ventriculares el valor del  $E_m$  se mantiene constante si la célula no se estimula. A esta diferencia de potencial se le denomina “potencial de reposo” (PR) y está determinado por el equilibrio entre la capacidad de los distintos iones para atravesar la membrana a favor de su gradiente de

concentración y el transporte activo de dichos iones en contra de su gradiente. Pero, además, algunas células como las nerviosas y las musculares son excitables: son capaces de variar esta diferencia de potencial generando impulsos eléctricos (o PA) en respuesta a un estímulo mediante el intercambio de iones entre los medios intra y extracelular. En el miocardio, estos impulsos se propagan para convertirse en el factor determinante de la contracción rítmica del corazón. El control del intercambio iónico resulta además esencial para evitar una excesiva presión osmótica debida a los cambios en la osmolaridad de ambos medios.

Si la membrana de las células cardíacas sólo fuera permeable al  $K^+$ , el  $E_m$  debería alcanzar un valor similar al del potencial de equilibrio para el  $K^+$  ( $E_K$ ). Sin embargo, el valor del  $E_m$  es menos negativo que el del  $E_K$  debido a que la membrana es además permeable a otros iones. Cuando una membrana es permeable a varios iones, el  $E_m$  depende de tres factores: la polaridad de la carga eléctrica de cada ion, la permeabilidad de la membrana ( $P$ ) a cada ion y la concentración de estos iones a ambos lados de la membrana. Por tanto, la ecuación que define el  $E_m$  en las células permeables al  $Na^+$ , al  $Cl^-$  y al  $K^+$ , denominada “ecuación de campo constante” o “ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz” (Goldman, 1943; Hodgkin y Katz, 1949), es:

$$E_m = \left( \frac{RT}{Fz} \right) \ln \left[ \frac{([K^+]_e P_K + [Na^+]_e P_{Na} + [Cl^-]_e P_{Cl})}{([K^+]_i P_K + [Na^+]_i P_{Na} + [Cl^-]_i P_{Cl})} \right] \quad (I.5)$$

donde  $P_K$ ,  $P_{Na}$  y  $P_{Cl}$  representan la permeabilidad de la membrana al  $K^+$ , al  $Na^+$  y al  $Cl^-$ , respectivamente.

### 1.1.1. Transporte de iones a través de la membrana celular

En condiciones de reposo, el  $Na^+$  y el  $Ca^{2+}$  están más concentrados en el medio extracelular, mientras que el  $K^+$  y los aniones orgánicos son los que predominan en el medio intracelular. El transporte de iones a través de la membrana se produce a favor de gradiente de concentración (sin gasto de energía) o en contra de gradiente (y, por lo tanto, con gasto energético) y requiere de sistemas especializados de transporte como los canales iónicos o las proteínas transportadoras.

Los canales iónicos son proteínas transmembrana (TM) cuyas principales funciones son:

- Formar poros hidrófilos a través de los cuales los iones atraviesan la membrana a favor de gradiente de concentración y de potencial eléctrico (gradiente electroquímico), permitiendo el

paso de iones masivamente (hasta  $10^8$  iones/s) y generando una corriente iónica.

- Discriminar los iones que pasan a su través, gracias a un filtro de selectividad. El mecanismo de selectividad se basa tanto en el tamaño del ion en su forma hidratada como en su carga, de modo que ciertos residuos del canal se alinean en el poro e interaccionan con los iones formando barreras termodinámicas que favorecen el paso de unos iones frente a otros.
- Controlar la permeabilidad de la membrana a cada ion mediante la transición entre los diferentes estados del canal (abierto-conductor y cerrado e inactivo-no conductor). Entre los diferentes estados del canal se encuentran, al menos, un estado abierto y dos o más no conductores (estados cerrado e inactivo). Los cambios conformacionales de la proteína entre los distintos estados son lo que se denomina el *gating* del canal y se producen de forma muy rápida ( $<10 \mu\text{s}$ ). Según el estímulo que origine estos cambios conformacionales, los canales se clasifican en canales dependientes de voltaje (dependen del  $E_m$ ), canales activados por ligando (el proceso de apertura y cierre depende de la unión de moduladores externos como hormonas o neurotransmisores) y canales operados por segundos mensajeros (el *gating* está regulado por factores intracelulares como el  $\text{Ca}^{2+}$  o subunidades de proteínas G). En el caso de los canales dependientes de voltaje, la proteína presenta una serie de aminoácidos que se encuentran cargados a pH fisiológico y que se mueven en un campo eléctrico muy limitado y confinado en la bicapa lipídica de la membrana celular, originando unas corrientes que se denominan corrientes de *gating* (Armstrong y Bezanilla, 1973; Armstrong, 1974) y cuya magnitud es muy pequeña, ya que en este proceso se produce un desplazamiento de carga equivalente al movimiento lineal de  $\approx 12-13$  electrones (Schoppa y cols., 1992; Hirschberg y cols., 1995).

Las proteínas transportadoras facilitan el movimiento de pequeñas moléculas a través de la membrana. Estas proteínas sólo pueden fijar una o unas pocas moléculas al mismo tiempo para transferirlas al otro lado de la membrana, por lo que la velocidad de transporte es más lenta que la de los canales iónicos ( $10^2-10^4$  moléculas/s). Dentro de este grupo se encuentran proteínas como las bombas iónicas o los cotransportadores:

- Las bombas iónicas son enzimas de membrana que utilizan la energía liberada en la hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP) para transportar iones a través de la membrana en contra de gradiente en un proceso denominado “transporte activo”. Debido a su mecanismo, se denominan ATPasas.
- Los cotransportadores o intercambiadores, al igual que las bombas iónicas, trasladan moléculas en contra de su gradiente de concentración, aunque en este caso la energía que alimenta el proceso procede de la difusión de otras moléculas, normalmente iones  $\text{Na}^+$ . Si los

iones  $\text{Na}^+$  se mueven en la misma dirección que la molécula transportada se habla de un cotransportador, mientras que si se mueven en dirección contraria se habla de un intercambiador. Posteriormente, las ATPasas se encargan de restaurar el gradiente de  $\text{Na}^+$ . Por este motivo, a este proceso se le denomina “transporte activo secundario”.

### 1.1.2. El potencial de acción

Las células cardíacas son excitables, es decir, cuando reciben un estímulo de intensidad suficiente para superar el potencial umbral, generan una respuesta eléctrica o PA al que se acopla la respuesta contractil cardíaca. Por el contrario, cuando no se alcanza el potencial umbral, sólo se genera una respuesta local que no se propaga a las células colindantes: es un estímulo “todo o nada”. El PA es un cambio transitorio en la polaridad de la membrana resultante de múltiples cambios secuenciales en la permeabilidad de la misma a los diferentes iones. La entrada de cargas positivas en la célula produce la despolarización, con lo que el interior de la célula va haciéndose más positivo (en su valor máximo, el potencial puede alcanzar valores cercanos a +40 mV), mientras que la salida de cargas positivas es responsable de la repolarización.

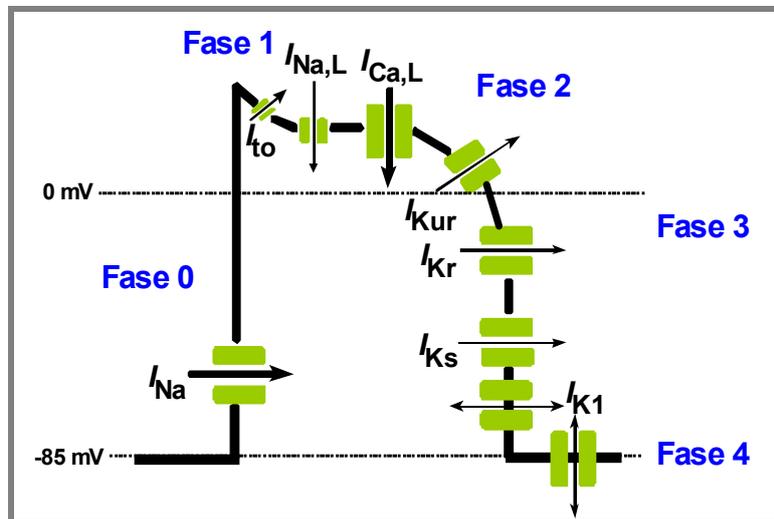
Parámetro	PA $\text{Na}^+$ -dependiente	PA $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente
Corriente despolarizante en la fase 0	$I_{\text{Na}}$	$I_{\text{Ca}}$
Potencial de reposo (mV)	-85 a -90	-45 a -65
Velocidad de conducción (m/s)	0.5-4	0.01-0.1
Amplitud del PA (mV)	100-130	40-85
Velocidad máxima de despolarización (mV/s)	200-1000	2-15
Factor de seguridad	Alto	Bajo
Se abole por	TTX, anestésicos locales, antiarrítmicos grupo I	Verapamilo, diltiazem, DHP, $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{La}^{3+}$

**Tabla I.2. Características de los PA rápidos y lentos.** TTX: Tetrodotoxina. DHP: Dihidropiridinas.

En el corazón se registran PA de diversos tipos (Figura I.1). En las células auriculares y ventriculares y en las células del sistema de His-Purkinje la despolarización es debida a la rápida entrada de iones de  $\text{Na}^+$ , mientras que en las células de los nodos SA y AV la despolarización es debida a la lenta entrada de iones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por lo tanto, en el corazón existen células que generan PA rápidos o “dependientes de  $\text{Na}^+$ ” y células que generan PA lentos o “dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ ” (Tabla I.2) (Coraboeuf y Otsuka, 1956; Beeler y Reuter, 1977; Carmeliet y Vereecke, 1979).

1.1.2.a. PA rápidos o dependientes de  $\text{Na}^+$ 

Los PA rápidos o dependientes de  $\text{Na}^+$  presentan 5 fases (Figura I.2) (Hoffman y Cranefield, 1960; Nattel, 2002; Delpón y Tamargo, 2010).



**Figura I.2. PA auricular rápido o “dependiente de  $\text{Na}^+$ ”.** Representación esquemática de las distintas fases del PA, donde se representan las diversas corrientes iónicas de entrada y de salida implicadas en el mismo.

La fase 0 de rápida despolarización de las células miocárdicas se debe a la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje y, por lo tanto, a la activación de la corriente rápida de entrada de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}}$ ), que desplaza el potencial de membrana desde sus valores en reposo (PR  $\approx -85$  mV) hasta valores positivos ( $\approx +30$  mV). La activación de la  $I_{\text{Na}}$  es un proceso muy rápido (0.5-2 ms) y su inactivación sigue una cinética biexponencial, con un componente lento ( $I_{\text{Na,L}}$ ) que se prolonga durante varios cientos de ms y que contribuye al mantenimiento de la fase 2 del PA. La magnitud de la  $I_{\text{Na}}$  determina la amplitud, la velocidad máxima de despolarización del PA y, por lo tanto, la velocidad de conducción intracardiaca (Hondegheem, 1978; Walton y Fozzard, 1979; Hille, 2001). A continuación, comienza la repolarización celular, en la que se distinguen 3 fases.

La fase 1 de rápida repolarización es consecuencia de la inactivación de la  $I_{\text{Na}}$  (paso del canal a una conformación no conductora) y de la activación de dos corrientes de salida de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje: a) la corriente transitoria ( $I_{\text{to1}}$ ), que se activa e inactiva rápidamente y que juega un papel fundamental en el control de la duración del PA (DPA) sobre todo a nivel auricular y del epicardio ventricular (Boyett, 1981; Josephson y cols., 1984; Giles e Imaizumi, 1988; Shibata y cols., 1989) y b) el componente ultrarrápido de la corriente rectificadora tardía, de rápida activación y lenta inactivación ( $I_{\text{Kur}}$ ), que es específicamente auricular

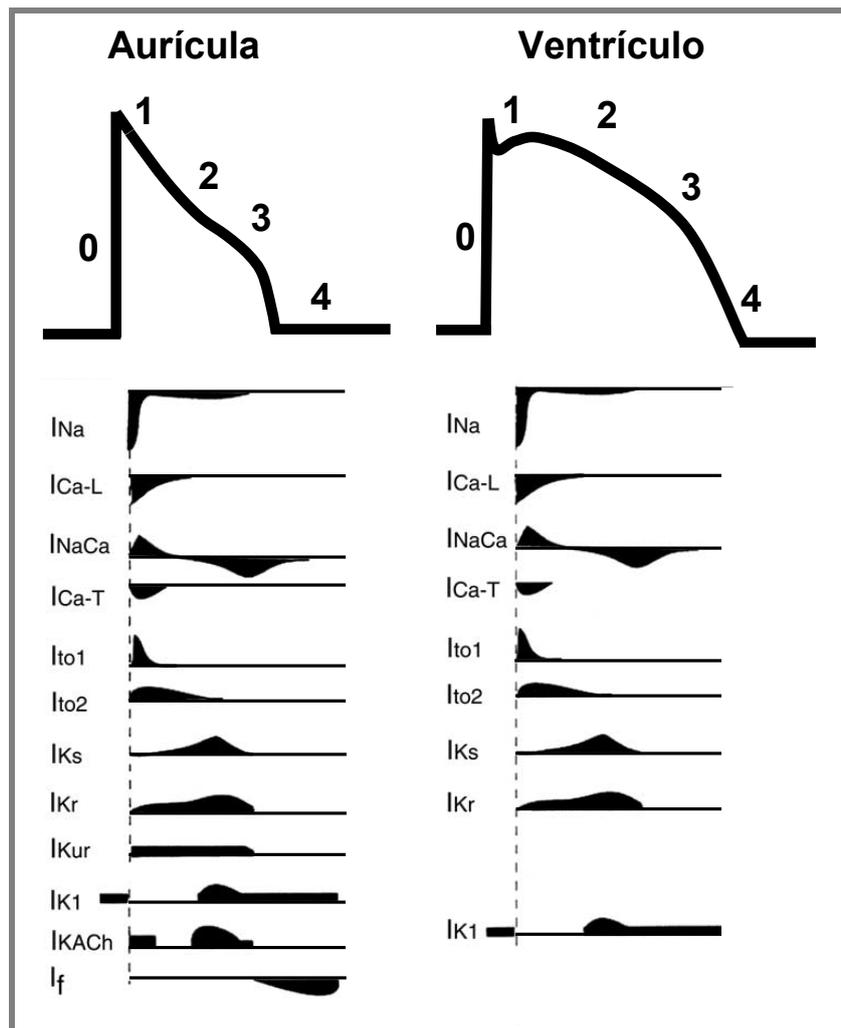
(Fedida y cols., 1993; Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993).

La fase 2 (o fase de meseta) representa el delicado equilibrio entre dos corrientes de entrada, la  $I_{Na,L}$  (Rudy, 1978; Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984; Gintant y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985) y la corriente de entrada de  $Ca^{2+}$  tipo L ( $I_{Ca,L}$ ) (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989; Bers y Pérez-Reyes, 1999), y tres corrientes rectificadoras tardías de salida de  $K^+$  de activación ultrarrápida, rápida y lenta ( $I_{Kur}$ ,  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$ , respectivamente) (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990 y 1991; Wang y cols., 1993 y 1994).

Durante la fase 3, la inactivación de las corrientes de entrada provoca el predominio de las corrientes repolarizantes de  $K^+$  activadas durante la fase 2 y, como consecuencia, el  $E_m$  alcanza de nuevo el valor del PR. Además, durante esta fase se produce la salida de  $K^+$  a través de canales que presentan rectificación interna ( $I_{K1}$ ), lo que determina la fase final de la repolarización (Carmeliet, 1993; Lopatin y Nichols, 2001). En las células auriculares, el sistema His-Purkinje y en los nodos SA y AV, la acetilcolina (ACh) y la adenosina se unen a sus respectivos receptores (muscarínico  $M_2$  y de adenosina  $A_1$ , ambos acoplados a proteínas Gi) activando otra corriente que presenta rectificación interna, la corriente de  $K^+$  activada por ACh ( $I_{K,ACh}$ ) (Sakmann y cols., 1983). La activación de la  $I_{K,ACh}$  en las células auriculares hiperpolariza el  $E_m$  y acorta marcadamente la DPA (Shen y Kurachi, 1995; Pelleg y Belardinelli, 1993).

La fase 4 del PA se inicia una vez que el potencial de la célula alcanza de nuevo su valor de reposo y finaliza al comienzo del siguiente PA. En las células musculares auriculares y ventriculares esta fase es isoeletrica y, por lo tanto, el  $E_m$  se mantiene constante durante el periodo comprendido entre el final de un PA y el comienzo del siguiente. El mantenimiento del  $E_m$  en niveles constantes durante la fase 4 se debe principalmente a la  $I_{K1}$  (Carmeliet, 1993; Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), aunque también participan la ATPasa dependiente de  $Na^+$  y  $K^+$  y el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ .

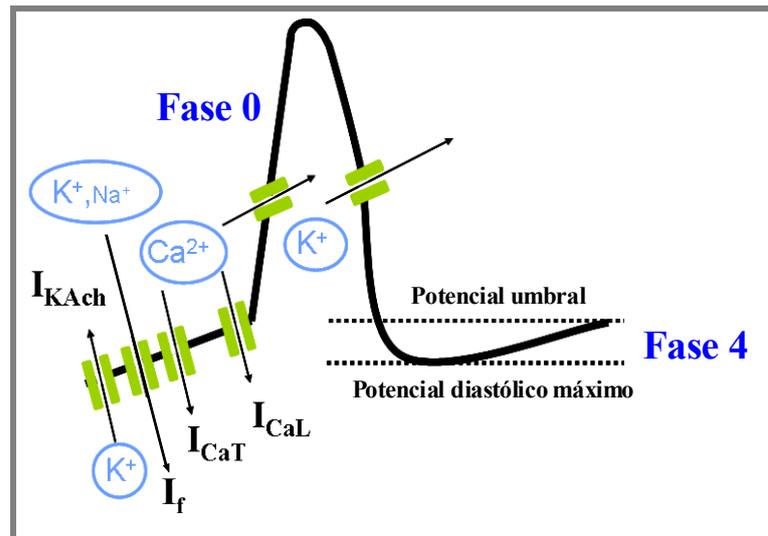
En la figura I.3 se muestran todas las corrientes implicadas en la génesis y en el mantenimiento del PA cardiaco en células auriculares y ventriculares. Al comparar la morfología de los PA auriculares y ventriculares se observa que la DPA es mayor en células ventriculares, lo que constituye un mecanismo protector que evita que las primeras puedan responder a frecuencias auriculares muy rápidas o a una estimulación prematura del corazón. Dentro del tejido auricular y ventricular se han identificado diferencias en la morfología y en la DPA (Figuras I.1 y 3), lo que ha sido atribuido a la diferencia de densidad del tipo de canal iónico expresado.



**Figura I.3.** Representación esquemática de PA auriculares y ventriculares con las respectivas corrientes iónicas que determinan su morfología. [Adaptada de Roberts, 2006]

#### 1.1.2.b. PA lentos o dependientes de $Ca^{2+}$

Los PA dependientes de  $Ca^{2+}$  se generan en las células de los nodos SA y AV cuyo PR es de  $\approx -55$  mV (Figura I.4). A este potencial, la  $I_{Na}$  está totalmente inactivada, por lo que la fase 0 de los PA en estas células se debe a la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L. También se generan PA dependientes de  $Ca^{2+}$  en las células de los anillos de las válvulas mitral y tricúspide y en células anormalmente despolarizadas (Reuter, 1973; Cranefield y Aronson, 1975).



**Figura I.4. PA lento o “dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ”.** Representación esquemática de las distintas fases del PA, donde se representan las diversas corrientes iónicas de entrada y de salida implicadas en el mismo.

La activación de la  $I_{\text{Ca,L}}$  es mucho más lenta que la de la  $I_{\text{Na}}$ , por lo que la amplitud de los PA dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  es menor ( $\approx 70\text{-}80$  mV) y su propagación mucho más lenta ( $0,02\text{-}0,05$  m/s), lo que explica su denominación de PA lentos (Isenberg y Klockner, 1982; Noble, 1984). La fase 2 (de meseta) se debe a un equilibrio entre la inactivación de la  $I_{\text{Ca,L}}$  y la activación de la  $I_{\text{Kr}}$ , y la fase 3 (de rápida repolarización) se debe a la activación de las corrientes de  $\text{K}^+$  rectificadoras tardías.

## 1.2. Automatismo

Aunque todos los miocitos cardiacos son excitables y responden a los estímulos eléctricos generando PA, algunos, además, presentan actividad automática intrínseca, es decir, son capaces de generar PA de forma espontánea. En condiciones fisiológicas, las células de los nodos SA y AV, de los tractos internodales auriculares y del sistema especializado de conducción His-Purkinje tienen actividad automática, careciendo de ella las células musculares auriculares y ventriculares (Hoffman y Cranefield, 1960). Los PA generados en estas estructuras presentan una fase 4 de lenta despolarización diastólica que desplaza el nivel del  $E_m$  hasta el nivel de potencial umbral y cuando éste se alcanza, se genera un nuevo PA propagado. La frecuencia de disparo de una célula automática depende del potencial diastólico máximo, del nivel de potencial umbral y de la pendiente de la fase 4 de lenta despolarización diastólica (Figura I.4).

Una característica de las células automáticas dependientes de  $\text{Na}^+$  es que cuando son estimuladas a una frecuencia mayor a la suya, tanto la inclinación de la fase 4 como la

frecuencia de disparo disminuyen. Esta característica se denomina “supresión por sobreestimulación” (Hoffman y Cranefield, 1960). En condiciones fisiológicas, las células del nodo SA generan PA a mayor frecuencia que las restantes células automáticas (60-80 latidos/min frente a  $\approx 15$  latidos/min), por lo que actúan como marcapasos dominante y determinan la frecuencia cardíaca, mientras que las demás células automáticas actúan como “marcapasos latentes o subsidiarios”.

El mecanismo responsable de la fase 4 de lenta despolarización diastólica varía en los distintos tejidos cardíacos automáticos. En las células del sistema His-Purkinje esta fase se debe a la activación mantenida de la corriente hiperpolarizante marcapasos o “*funny current*” ( $I_f$ ), una corriente de entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  generada a través de canales activados por la hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos (canales HCN, *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated*), y a la reducción de la  $I_{K_r}$  previamente activada durante la fase 3 del PA. La  $I_f$  se activa durante la fase 3 cuando el  $E_m$  se hace más negativo de -50 mV (Di Francesco, 2006; Baruscotti y cols., 2010). En las células de los nodos SA y AV, cuando el  $E_m$  alcanza valores de -50 mV se activa, además de la  $I_f$ , la corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales tipo T ( $I_{\text{Ca,T}}$ ), lo que acelera la fase final de la despolarización diastólica (Irisawa y Hagiwara, 1988). Finalmente, cuando se alcanza el potencial umbral, se activa la  $I_{\text{Ca,L}}$ , que es la corriente responsable de la fase 0 del PA en estas células.

### 1.3. Refractariedad

Desde hace más de 150 años se sabe que el corazón requiere cierto tiempo para recuperar la excitabilidad tras un primer estímulo, tiempo que se conoce como “periodo refractario” (Bowditch, 1871).

En las células que generan PA dependientes de  $\text{Na}^+$ , el periodo refractario viene determinado por la cinética de reactivación de la  $I_{\text{Na}}$ . Los canales de  $\text{Na}^+$  permanecen en estado de reposo durante la diástole (fase 4), se abren durante la fase 0 del PA y, a continuación, pasan a un estado inactivo no conductor en el que permanecen hasta que la repolarización alcanza valores más negativos de -50 mV. Dado que el estado inactivo no permite la entrada de  $\text{Na}^+$ , la aplicación de un estímulo durante las fases 1 y 2 y al comienzo de la fase 3 es incapaz de generar una respuesta propagada. Al periodo de tiempo durante el que la célula cardíaca es incapaz de generar un PA y permanece inexcitable se le denomina “periodo refractario absoluto” (Weidmann, 1955a; Hoffman y Cranefield, 1960; Hondeghem y Katzung, 1977). Conforme el  $E_m$  se repolariza entre -50 y -90 mV, cierta proporción de los

canales de  $\text{Na}^+$  pasan del estado inactivo al estado de reposo y, por lo tanto, la aplicación de un estímulo eléctrico es capaz de generar una respuesta. Esta respuesta tendrá menor amplitud y se conducirá, por tanto, más lentamente. Por lo tanto, existe un periodo de tiempo durante el cual la célula es excitable, pero en el que aún no ha recuperado la excitabilidad completamente. Durante este periodo de tiempo, denominado “periodo refractario efectivo”, un estímulo supraumbral puede producir una respuesta local, pero no un PA propagado (Hoffman y Cranefield, 1960). Al periodo refractario efectivo le sigue otro periodo de tiempo durante el cual un estímulo es capaz de inducir la génesis de un PA propagado, denominado “periodo refractario relativo”. A este nivel, la  $I_{\text{Na}}$  todavía no se ha reactivado por completo, por lo que si en este momento se genera un PA prematuro, éste va a presentar menor amplitud y una duración más corta que un PA generado cuando la célula se ha repolarizado y recuperado por completo su excitabilidad. La duración del periodo refractario cardíaco determina la máxima frecuencia de estimulación cardíaca y varía con la DPA. Las células auriculares presentan una menor duración del PA y del periodo refractario que las ventriculares ( $\approx 200$  ms en las primeras frente a los  $\approx 300$  ms de las segundas), lo que explica por qué la frecuencia de las arritmias supraventriculares es mayor que la de las ventriculares. El periodo refractario protege al corazón de aquellas situaciones en las que la frecuencia es muy rápida, y en las que, por tanto, se impide la relajación completa del músculo cardíaco, disminuyendo su función de bomba.

En los nodos SA y AV, la fase 0 del PA es debida a la activación de la  $I_{\text{Ca,L}}$ , corriente que presenta una constante de tiempo de reactivación de entre 100 y 300 ms (Gettes y Reuter, 1974; Bers y Pérez-Reyes, 1999). Por ello, no es posible generar un nuevo PA propagado incluso hasta después de que la célula se haya repolarizado por completo, es decir, que el periodo refractario efectivo se prolonga más allá de la DPA. A este fenómeno se le denomina “refractariedad posrepolarización” (Trautwein y Uchizono, 1963).

#### **1.4. Propagación del impulso cardíaco**

La propagación del impulso cardíaco es un fenómeno complejo que depende no sólo del tipo, tamaño, orientación y geometría de las células cardíacas, sino también de las propiedades activas y pasivas de la membrana. Las propiedades activas están determinadas por los mecanismos iónicos dependientes de voltaje y de tiempo que controlan la excitabilidad y la refractariedad. Por otro lado, la conducción del impulso cardíaco dependerá también del acoplamiento intercelular y de las propiedades de cable de la membrana

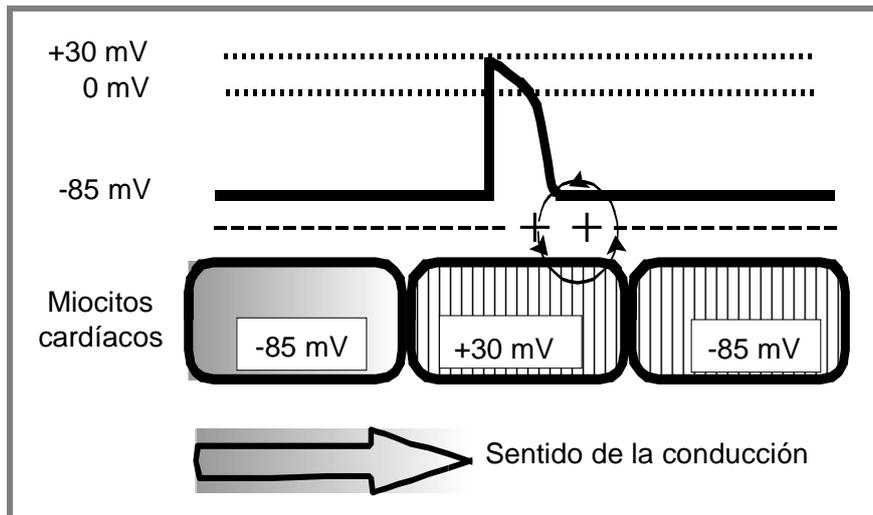
(resistencia y capacitancia), esto es, de las propiedades pasivas de la membrana.

Biofísicamente, la membrana es un elemento dieléctrico que aísla dos medios conductores. Sin embargo, este aislamiento no es perfecto, ya que existen mecanismos de transporte de iones, por lo que la resistencia al paso de cargas que ofrece la membrana ante una diferencia de potencial es finita y medible. Además, el dieléctrico (en este caso, los fosfolípidos de la membrana) que aísla los medios extra e intracelular está sometido a una diferencia de potencial en la membrana, por lo que atrae cargas a las proximidades de la membrana (los aniones del citosol serán atraídos por el exterior positivo y los cationes del medio extracelular son atraídos por el interior negativo). En estas condiciones, la membrana está acumulando carga según la ecuación:

$$Q = E_m \cdot C_m \quad (I.6)$$

donde  $Q$  es la carga acumulada y  $C_m$  la capacitancia de la membrana, que depende de las propiedades dieléctricas de la bicapa lipídica y de la geometría de la membrana. La  $C_m$  impone un retraso en la variación del voltaje y en la propagación del estímulo, ya que cualquier variación en el  $E_m$  debe vencer primero la carga acumulada en la membrana.

Los miocitos cardíacos están unidos entre sí por los discos intercalares, que permiten el acoplamiento eléctrico, y por los desmosomas, uniones especializadas que facilitan el acoplamiento contráctil. Estas uniones permiten que el miocardio funcione como un sincitio funcional. Este acoplamiento se realiza a través de uniones de baja resistencia ( $1-3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , unas 700 veces menor que la de la resistencia externa de la membrana), a las que se denomina “uniones estrechas” (*gap junctions*). En condiciones fisiológicas, la resistencia longitudinal o intracelular, determinada por las uniones estrechas y el citoplasma, es mínima, lo que permite un acoplamiento célula-célula que facilita la propagación sincrónica del impulso cardíaco.



**Figura I.5. Representación esquemática de la propagación del impulso cardíaco**

El impulso cardíaco se genera en el nodo SA y se propaga de forma electrotonica a las células excitables vecinas, desplazando su nivel de  $E_m$  hasta el nivel de potencial de membrana de la célula vecina ya excitada. Cuando esto sucede, se genera un nuevo PA, que a su vez despolarizará electrotonicamente las células vecinas hasta el nivel de potencial umbral produciendo la génesis de un nuevo PA y así sucesivamente (Figura I.5). La capacidad del PA propagado para desplazar el PR de una célula adyacente hasta el potencial umbral y generar un nuevo PA se denomina “factor de seguridad”. Cuanto mayor sea la amplitud de la  $I_{Na}$  que genera el PA, mayor será la velocidad de conducción con que éste se conducirá por el miocardio y, por lo tanto, mayor será el factor de seguridad de propagación del impulso cardíaco. Por el contrario, en todas aquellas situaciones en las que la  $I_{Na}$  esté parcialmente inhibida o en aquellas células que generen PA dependientes de  $Ca^{2+}$ , o tras la estimulación prematura, el factor de seguridad de propagación del impulso será menor (Delpón y Tamargo, 2010). El bloqueo de la conducción en cualquiera de estas situaciones propicia la aparición de arritmias por reentrada.

Una vez que los impulsos salen del nodo SA, se propagan con rapidez a toda la aurícula, produciendo la sístole auricular. A su paso a través del nodo AV, la propagación se ralentiza, lo que permite que la contracción auricular impulse la sangre hacia los ventrículos, optimizando el gasto cardíaco y reduciendo la posibilidad de que queden remanentes sanguíneos en la aurícula. Una vez que los impulsos salen del nodo AV, entran en el sistema de conducción, donde la propagación es más rápida, permitiendo finalmente la contracción ventricular coordinada.

La actividad eléctrica cardíaca tiene su reflejo en el electrocardiograma (ECG),

existiendo una relación entre los intervalos del ECG y las secuencias de activación y repolarización. La activación auricular (fase 0 de los PAs) corresponde a la onda P, y la ventricular, al complejo QRS, cuya duración es inversamente proporcional a la velocidad de conducción intraventricular. El intervalo PR refleja el tiempo de conducción a través del nodo AV, el haz de His y sus ramas, y se prolonga cuando disminuye la velocidad de conducción en dichas estructuras. La duración del intervalo QT refleja el tiempo de repolarización ventricular (Figura I.1).

## **2. CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE IMPLICADOS EN EL POTENCIAL DE ACCIÓN CARDÍACO**

### **2.1. Canales de Na<sup>+</sup>**

Los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje son fundamentales en la génesis y propagación de la señal eléctrica en tejidos excitables como el corazón, el músculo esquelético o el sistema nervioso (Hodgkin y Huxley, 1952a y b; Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003; George, 2005).

El canal de Na<sup>+</sup> presenta al menos tres estados conformacionales: reposo, activo e inactivo. Durante la diástole, el canal se encuentra en estado de reposo y la probabilidad de que se abra es extremadamente baja. La despolarización de la membrana produce un cambio conformacional en la estructura del canal que causa su apertura durante 1-2 ms, generándose una corriente rápida de entrada de Na<sup>+</sup>. A continuación, el canal se inactiva rápidamente, lo que produce el cese de la entrada de Na<sup>+</sup> (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003). El paso desde el estado inactivo hasta el estado de reposo se denomina “reactivación del canal” y es necesario para que el canal pueda volver a abrirse. En situación fisiológica, esta transición tiene lugar durante los primeros 50-100 ms de la diástole por lo que, considerando que en ritmo sinusal (RS) el intervalo diastólico es de entre 500 y 700 ms, cuando llega el siguiente latido la mayoría de los canales ya están en estado de reposo y, por lo tanto, preparados para volver a abrirse (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003). Además, el canal de Na<sup>+</sup> es la diana farmacológica de los anestésicos locales y de los fármacos antiarrítmicos del grupo I que, a las concentraciones empleadas en terapéutica, se unen con mayor afinidad a los estados abierto e inactivo del mismo (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003).

2.1.1. Estructura de los canales de Na<sup>+</sup>

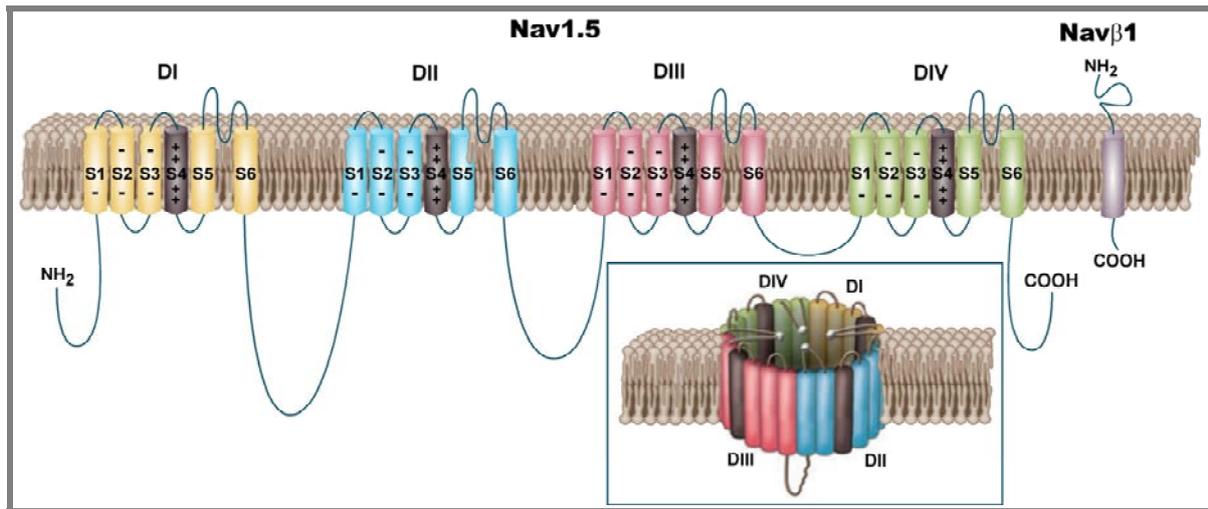
Los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje están compuestos por una subunidad conductora  $\alpha$  (de la que se han caracterizado 12 isoformas) y una o varias subunidades accesorias  $\beta$  ( $\beta_1$  a  $\beta_4$ ) (Figura I.6 y Tabla I.3) (Catterall, 2000; Goldin, 2002; Catterall y cols., 2005a; George, 2005; Abriel, 2010).

Subunidad $\alpha$				Subunidad $\beta$			
Gen	Proteína	Cromosoma	Tejido	Gen	Proteína	Cromosoma	Tejido
SCN1A	Nav1.1* ( $\alpha_1$ )	2q24	SNC	SCN1B	Nav $\beta$ 1.1* ( $\beta_1$ )	19q11	SNC
SCN2A	Nav1.2 ( $\alpha_2$ )	2q23	SNC	SCN2B	Nav $\beta$ 2.1* ( $\beta_2$ )	11q24	SNC
SCN3A	Nav1.3* ( $\alpha_3$ )	2q24	SNC	SCN3B	Nav $\beta$ 3.1* ( $\beta_3$ )	11q26	SNC
SCN4A	Nav1.4* ( $\alpha_4$ )	17q21	ME	SCN4B	Nav $\beta$ 4.1 ( $\beta_4$ )	11q24	SNC
SCN5A	Nav1.5* ( $\alpha_5$ )	3p21	MC				
SCN6A	Nav2.1* ( $\alpha_6$ )	2q21-23	Útero				
SCN7A	$\alpha_7$	2q36-37	SNC				
SCN8A	Nav1.6* ( $\alpha_8$ )	2q13	SNC				
SCN9A	Nav1.7	2q24	T				
SCN10A	Nav1.8	3p22	SNP				
SCN11A	Nav1.9	3p21	SNC				
SCN12A		3p23-21.3	SNC				

**Tabla I.3. Subunidades que forman el canal de Na<sup>+</sup> en el hombre.** \*Subunidades que se expresan en el corazón. MC: Músculo cardíaco. ME: Músculo esquelético. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico. T: Tiroides. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

- Subunidad  $\alpha$

Las subunidades  $\alpha$  de los canales de Na<sup>+</sup> pertenecen a una pequeña familia de proteínas con una secuencia aminoacídica altamente conservada que se expresan en diferentes tejidos y que codifican canales cuyas propiedades no son idénticas (Goldin, 2002).



**Figura I.6. Estructura del canal de  $\text{Na}^+$ .** Esquema de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del canal de  $\text{Na}^+$ . En la subunidad  $\alpha$ , se indica los diferentes dominios (DI a DIV) con sus segmentos en diferentes colores. Estos segmentos transmembrana se pliegan para formar un canal de  $\text{Na}^+$  que deja un poro iónico en su interior (recuadro). [Adaptada de Meisler and Kearney, 2005].

El gen *SCN5A* codifica la subunidad  $\alpha$  Nav1.5, responsable de la  $I_{\text{Na}}$  cardíaca. Esta subunidad está formada por 4 dominios homólogos (DI a DIV), con 6 segmentos TM dispuestos en  $\alpha$ -hélice cada uno (S1 a S6). Los segmentos de cada dominio se conectan mediante secuencias hidrofílicas no conservadas. El lazo que une los segmentos S5 y S6, denominada “lazo P”, es extracelular y forma parte del poro iónico. Los extremos carboxi- y amino-terminal (C- y N-terminal, respectivamente) y los lazos de unión entre los diferentes dominios son intracelulares (Goldin, 2002; Yu y Catterall, 2003) (Figura I.6).

En la membrana, la proteína del canal de  $\text{Na}^+$  orienta sus cuatro dominios de forma simétrica de manera que los S5 y S6 junto con los lazos P forman las paredes del poro hidrófilo. Los S1-S4 de los cuatro dominios quedan apartados del poro rodeados por los fosfolípidos de la membrana. Clásicamente, se ha considerado que el S4 queda, a su vez, rodeado por el resto de segmentos TM. La mayor parte de los residuos que forman los S5 y S6 de los 4 dominios son hidrófobos. Por su parte, los S4 presenta un residuo cargado (arginina o lisina) cada tres aminoácidos, formando una hélice de cargas positivas en la membrana. En total, 22 aminoácidos cargados positivamente (cuatro cargas positivas en el DI, cinco en los DII y DIII y ocho en el DIV) que aparecen conservados en todas las isoformas del canal de  $\text{Na}^+$  y que actúan como “sensor de voltaje” (Stühmer y cols., 1989). La teoría más aceptada acerca del sensor de voltaje es que los S4 se mueven físicamente a través de la membrana desde el interior hacia el exterior en respuesta a la despolarización, exponiendo al exterior dos cargas positivas que se encontraban previamente ocultas en el interior de la membrana (Yang y cols., 1996; Bezanilla, 2000 y 2002).

Cuatro de los residuos presentes en los lazos P forman un anillo que se denomina “locus DEKA”: ácido aspártico en DI, ácido glutámico en DII, lisina en DIII y alanina en DIV. Esta estructura determina la conductancia y la selectividad iónica del canal al  $\text{Na}^+$ , así como la unión de toxinas (Noda y cols., 1989; Terlau y cols., 1991). La sustitución de estos cuatro aminoácidos por residuos de ácido glutámico (que son los aminoácidos presentes en las posiciones análogas en el canal de  $\text{Ca}^{2+}$ ) convierte los canales de  $\text{Na}^+$  en selectivos para el  $\text{Ca}^{2+}$  (Heinemann y cols., 1992).

- Subunidades auxiliares

Las principales subunidades reguladoras del canal de  $\text{Na}^+$  son las subunidades  $\beta$ , de las que en la actualidad se conocen 4 isoformas ( $\beta_1$  a  $\beta_4$ ) (Tabla I.3) (Morgan y cols., 2000; Goldin, 2002). Son proteínas con un único dominio TM, un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal intracelular y presentan una secuencia tipo inmunoglobulina (Ig) (Isom y Catterall, 1996). Estas subunidades no forman parte del poro conductor del canal, pero regulan el *gating* del mismo, su expresión en la membrana y la unión con otras moléculas de la matriz extracelular y del citoesqueleto (Isom y Catterall, 1996).

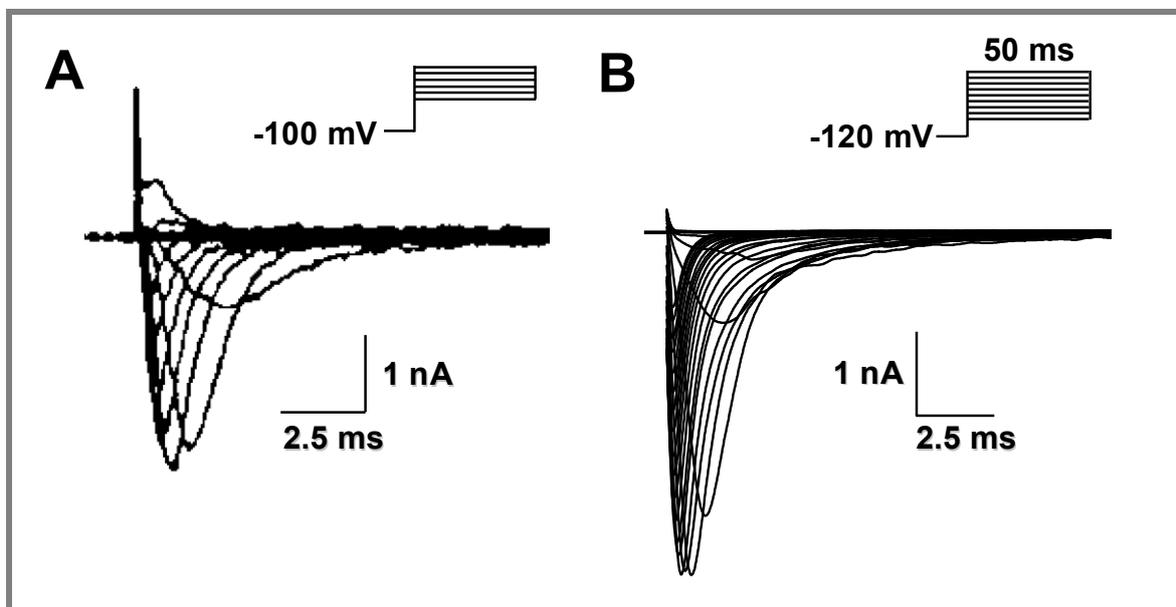
Su implicación en la regulación del canal de  $\text{Na}^+$  cardíaco no está clara todavía, aunque mutaciones en cada una de las cuatro subunidades auxiliares han sido relacionadas con diferentes síndromes arritmogénicos (Abriel, 2010). Además, la presencia de la subunidad  $\text{Nav}\beta 1.1$  disminuye la afinidad de anestésicos locales y fármacos antiarrítmicos del grupo I por la subunidad  $\alpha$   $\text{Nav}1.5$  (Balsler y cols., 1996; Makielski y cols., 1996; Balsler, 2001).

### 2.1.2. Características de la $I_{\text{Na}}$

La  $I_{\text{Na}}$  es la responsable de la fase 0 de los PA generados en las células musculares auriculares y ventriculares y en el sistema de His-Purkinje (Brown y cols., 1981; Fozzard y cols., 1985). La despolarización inicia un cambio conformacional que produce la apertura del canal de  $\text{Na}^+$  (Hirschberg y cols., 1995; Yang y Horn, 1995). La  $I_{\text{Na}}$  alcanza un pico máximo en 0.5-2 ms, y, a continuación, se inactiva de forma rápida (Figura I.7). El umbral de activación de la corriente se encuentra en -60 mV y alcanza su valor máximo entre -30 y -20 mV (Hodgkin y Huxley, 1952a y b; Armstrong, 1981). La inactivación no sólo cierra el canal, sino que impide la reapertura del mismo hasta que haya pasado el tiempo suficiente para su recuperación, determinando así la frecuencia máxima de excitación celular y preservando el gradiente iónico intracelular, lo que impide la muerte celular.

La inactivación de la  $I_{Na}$  cardíaca sigue un proceso biexponencial, presentando un componente rápido y uno lento (Rudy, 1978; Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985; Balsler, 2001). La rapidez de la activación y la inactivación sugiere que ambos procesos podrían estar acoplados (Aldrich y cols., 1983; Catterall, 2000; Balsler, 2001; Ulbricht, 2005). Incluso, el canal puede pasar al estado inactivo sin haber pasado por el estado abierto (“inactivación del estado cerrado”) (Horn y cols., 1981). Se ha demostrado que la “inactivación rápida” depende de tres residuos hidrofóbicos presentes en el lazo DIII-DIV, la “secuencia IFM” (Ile1488, Phe1489 y Met1490) (Eaholtz y cols., 1994). Además, el extremo C-terminal participa en la estabilización de esta inactivación, disminuyendo la probabilidad de reapertura (Mantegazza y cols., 2001; Cormier y cols., 2002; Motoike y cols., 2004).

La “inactivación lenta” es un proceso que se prolonga durante varios cientos de ms y que es responsable del control de la entrada de  $Na^+$  durante la fase de meseta del PA cardíaco, contribuyendo de este modo al mantenimiento de dicha fase (Clarkson y cols., 1984; Carmeliet, 1987; Fozzard y cols., 1987; Balsler, 2001). La inactivación lenta disminuye al aumentar la concentración extracelular de  $Na^+$  (Oxford y Yeh, 1985) y parece estar regulada por un complicado mecanismo en el que están involucrados los cuatro dominios del canal (O’Reilly y cols., 1999; Vilin y cols., 1999).



**Figura I.7. Registros de  $I_{Na}$ .** (A) Trazos de  $I_{Na}$  registrados en miocitos ventriculares humanos tras la aplicación de pulsos de 50 ms a potenciales entre -60 y +70 mV desde un potencial de fijación de -100 mV. (B)  $I_{Na}$  registrada en nuestro laboratorio en células CHO transfectadas de forma transitoria con la subunidad  $\alpha$  Nav1.5 y la subunidad  $\beta$ 1 tras la aplicación de pulsos de 50 ms a potenciales desde -80 hasta +70 mV desde un potencial de fijación de -120 mV [Adaptada de Müller-Ehmsen y cols., 1999 (A)]

### 2.1.3. Canalopatías asociadas a los canales de $\text{Na}^+$ cardíacos

La importancia de los canales de  $\text{Na}^+$  se pone de manifiesto por la existencia de diferentes enfermedades causadas por mutaciones en los genes que los codifican, y que afectan a la función nerviosa o a la del músculo esquelético y/o cardíaco (Cannon y cols., 1991; Wallace y cols., 1998; George, 2005; Zimmer y Surber 2008; Abriel, 2010).

A nivel cardíaco, las mutaciones en el gen que codifica la subunidad Nav1.5 (SCN5A) se han relacionado con la aparición de arritmias ventriculares (síndrome de QT largo [SQTL], síndrome de Brugada), fibrilación auricular (FA), con defectos en la conducción intracardíaca y/o muerte súbita en recién nacidos (Wang y cols., 1995a; Chen y cols., 1998; Schott y cols., 1999; Wei y cols., 1999; Schwartz y cols., 2000; Tan y cols., 2001; Grant y cols., 2002; Darbar y cols., 2008; Amin y cols., 2010; Wilde y Brugada, 2011; Nuñez y cols., 2012).

## 2.2. Canales de $\text{Ca}^{2+}$

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la despolarización de la membrana y son esenciales para acoplar las señales eléctricas en la superficie celular con la respuesta fisiológica a nivel celular (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989). Inicialmente, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje se clasificaron según la magnitud de la despolarización requerida para su activación: los que requerían una fuerte despolarización (HVA, *High Voltage Activated*) y los que requerían una despolarización menor (LVA, *Low Voltage Activated*). Los canales LVA son los que hoy en día se conocen como canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T, que se activan rápidamente a  $E_m \approx -50$  mV y que se inactivan también rápidamente (Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005). Los canales HVA se abren cuando se despolariza la membrana hasta  $\approx -30$  mV y su inactivación puede prolongarse hasta 100 ms. Estos canales presentan diferentes propiedades cinéticas, biofísicas y farmacológicas y, hasta el momento, se han identificado 5 subtipos (L, N, P, Q y R). Sin embargo, en el miocardio humano sólo se ha demostrado la presencia de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y tipo T.

Los canales de tipo L se localizan principalmente en los túbulos T de la membrana, próximos a los receptores de rianodina (RyR2) del retículo sarcoplásmico. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales tipo L promueve la apertura de los RyR2 con la consiguiente salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el mismo. Es decir, que la corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) provoca la liberación de “ $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ ” y con ello dispara la respuesta contractil de los miocitos cardiacos. A su vez, la  $I_{\text{Ca,L}}$  determina a nivel eléctrico la fase de meseta del PA. Por

su parte, los canales tipo T se localizan principalmente en las células auriculares y en las células del nodo SA y en las fibras de Purkinje, mientras que su presencia en las células ventriculares es mínima (Mitra y Morad, 1986; Hagiwara y cols., 1988; Bean, 1989; Yuan y cols., 1996).

### 2.2.1. Estructura de los canales de $\text{Ca}^{2+}$

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje son heterotetrámeros compuestos por las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\beta$  y  $\alpha_2/\delta$ , y, en algunos tejidos, la subunidad  $\gamma$  (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005). Hasta ahora, se han identificado los genes que codifican la expresión de 10 subunidades  $\alpha_1$  (Catterall y cols., 2005b), 4 subunidades  $\beta$ , 4 complejos  $\alpha_2/\delta$  y 8 subunidades  $\gamma$  (Tabla I.4), aunque, a nivel cardíaco, sólo se ha demostrado la existencia de las subunidades reguladoras  $\beta$  y  $\alpha_2/\delta$ . Los diferentes tipos de  $I_{\text{Ca}}$  se definen en función de la subunidad  $\alpha_1$  que forma el canal, mientras que las subunidades reguladoras  $\alpha_2/\delta$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  modulan su tráfico a la membrana y/o las propiedades biofísicas de la corriente (Figura I.8) (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005).

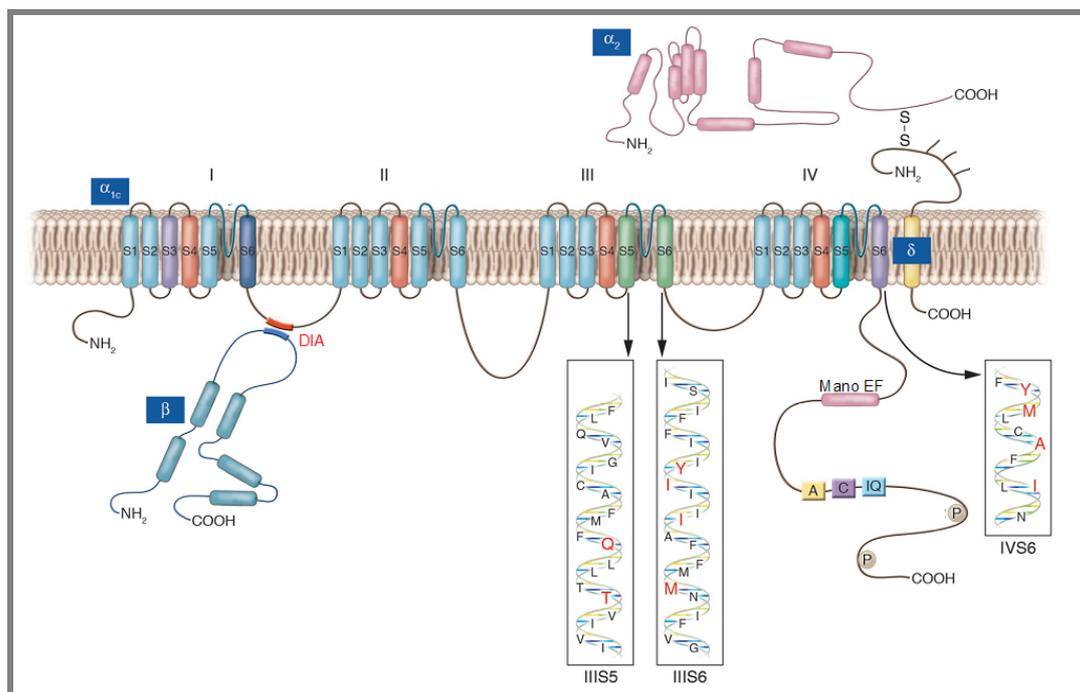


Figura I.8. Estructura del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. [Adaptada de Bodi y cols., 2005]

- Subunidad  $\alpha$

La familia Cav1 codifica las subunidades  $\alpha_1$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, siendo la Cav1.2 ( $\alpha_{1C}$ ) la que se expresa predominantemente en el corazón (Bodi y cols., 2005). La

familia Cav2 codifica las subunidades  $\alpha_1$  de los canales tipo P/Q, N y R, que se encuentran mayoritariamente en el cerebro, y la familia Cav3 codifica las subunidades  $\alpha_1$  de los canales tipo T (Tabla I.4) (Pérez-Reyes, 2003). Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presentan una gran homología estructural con los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje. Las subunidades  $\alpha_1$  presentan 4 dominios homólogos (DI a DIV), cada uno compuesto por 6 segmentos TM en  $\alpha$ -hélice (S1 a S6) (Figura I.8). El canal de  $\text{Ca}^{2+}$  presenta 4 cargas positivas en los S4 de cada dominio, dando lugar al sensor de voltaje. Estos residuos cargados están altamente conservados en todas las familias de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como en los canales de  $\text{Na}^+$ , el lazo P que une los S5 y S6 de los cuatro dominios contribuye a formar el poro del canal. Cada uno de los lazos P de los cuatro dominios contiene un residuo de glutámico (“locus EEEE”). Estos residuos forman una zona de alta afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  y conforma el filtro de selectividad del canal (Mikala y cols., 1993; Klockner y cols., 1996; Koch y cols., 2000).

	Subunidad $\alpha_1$				Subunidades $\beta$ reguladoras			
	Proteína	Gen	Cromosoma	$I_{\text{Ca}}$	Proteína	Gen	Cromosoma	
Cav $\alpha$ 1	Cav1.1 ( $\alpha_{1S}$ )	CACNA1S	1q31-32	L	Cav $\beta$	$\beta_1$	CACNB1	17q11.2
	Cav1.2* ( $\alpha_{1C}$ )	CACNA1C	12p13.3	L		$\beta_2^*$	CACNB2	10p12
	Cav1.3 ( $\alpha_{1D}$ )	CACNA1D	3p14.3	L		$\beta_3$	CACNB3	12q12
	Cav1.4 ( $\alpha_{1F}$ )	CACNA1F	Xp11.23	L		$\beta_4$	CACNB4	2q23
Cav $\alpha$ 2	Cav2.1 ( $\alpha_{1A}$ )	CACNA1A	19p13	P/Q	Cav $\alpha_2$ / $\delta$	$\alpha_2/\delta_1^*$	CACNA2D1	7q11.2
	Cav2.2 ( $\alpha_{1B}$ )	CACNA1B	9q34	N		$\alpha_2/\delta_2^*$	CACNA2D2	3p14
	Cav2.3* ( $\alpha_{1E}$ )	CACNA1E	1q25-31	R		$\alpha_2/\delta_3$	CACNA2D3	3p13
						$\alpha_2/\delta_4$	CACNA2D4	12p13
Cav $\alpha$ 3	Cav3.1* ( $\alpha_{1G}$ )	CACNA1G	17q21	T	Cav $\gamma$	$\gamma_1$	CACNG1	17q26
	Cav3.2* ( $\alpha_{1H}$ )	CACNA1H	16p13.3	T		$\gamma_2$	CACNG2	22q13
	Cav3.3 ( $\alpha_{1I}$ )	CACNA1I	22q13	T		$\gamma_3$	CACNG3	16p12
						$\gamma_4$	CACNG4	17q26
				$\gamma_5$		CACNG5	17q26	
				$\gamma_6$		CACNG6	19q13.4	
				$\gamma_7$		CACNG7	19q13.4	
				$\gamma_8$		CACNG8	19q13.4	

**Tabla I.4. Proteínas que forman los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje humanos.** \* Subunidades que se expresan en el corazón. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

- Subunidad  $\beta$

Las subunidades  $\beta$  son proteínas citosólicas que se ensamblan con las subunidades  $\alpha_1$  mediante un dominio de interacción  $\beta$  (DIB) que se une al dominio de interacción  $\alpha$  (DIA) de la subunidad  $\alpha_1$  (Figura I.8) (De Waard y cols., 1994; Pragnell y cols. 1994). Estas subunidades regulan la expresión en la membrana de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  HVA (Bichet y cols., 2000). Además, modulan las propiedades biofísicas del canal (Jangsangthong y cols., 2010) e intervienen en la regulación por el pH (Schuhmann y cols., 1997) o por receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Mikala y cols., 1998). Otro posible papel de las subunidades  $\beta$  es intervenir en el proceso de “facilitación” de la  $I_{\text{Ca,L}}$  (Cens y cols., 1996; Buraei y Yang, 2010). La facilitación produce un aumento de la densidad de corriente y una ralentización de la inactivación tras la fosforilación del canal por la proteína quinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina (CaMKII) (Sculptoreanu y cols., 1993; Yang y cols., 2003).

- Subunidad  $\alpha_2/\delta$

El complejo  $\alpha_2/\delta$  está formado por la unión mediante un puente disulfuro de la subunidad extracelular  $\alpha_2$  y la subunidad transmembrana  $\delta$  (Figura I.8). La función del complejo  $\alpha_2/\delta$  varía según las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta$  con las que interacciona, aunque se ha sugerido que el dominio  $\delta$  interviene en los cambios cinéticos mientras que el dominio  $\alpha_2$  es responsable del aumento de la expresión del canal en la membrana (Hofmann y cols., 1994; Mori y cols. 1996).

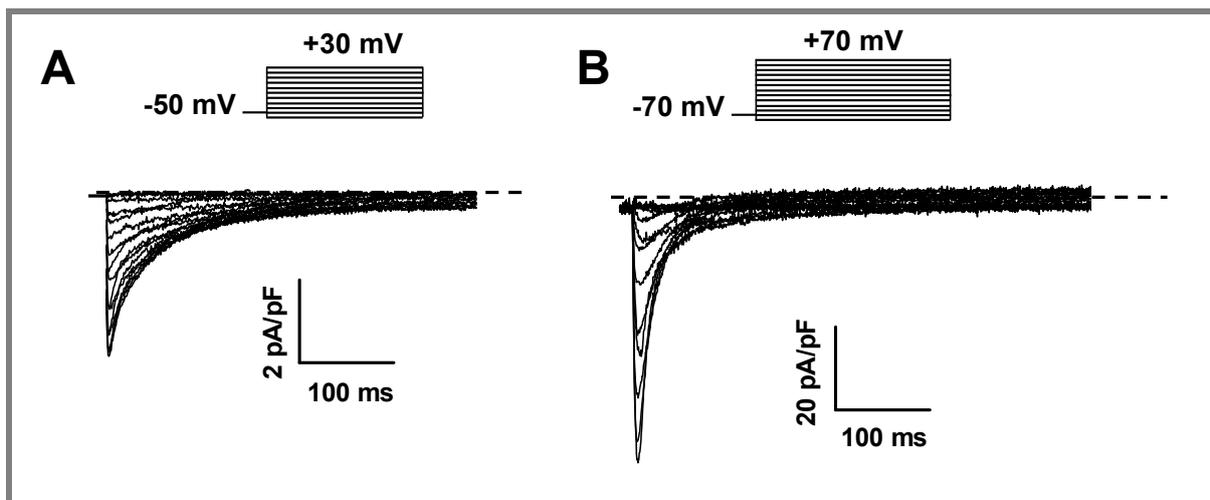
- Subunidad  $\gamma$

La subunidad  $\gamma$  es una proteína con cuatro dominios TM y extremos N- y C-terminales intracelulares de la que existen al menos 8 isoformas, aunque ninguna de ellas se expresa en tejido cardíaco (Kang y Campbell, 2003).

### 2.2.2. Características de la $I_{\text{Ca,L}}$

La  $I_{\text{Ca,L}}$  registrada en miocitos cardíacos presenta un potencial umbral de activación de alrededor de -30 mV y alcanza su máxima amplitud a potenciales entre 0 y +10 mV. La activación y la inactivación son relativamente lentas, alcanzándose el pico máximo al cabo de 1-5 ms (Figura I.9).

La inactivación de la corriente es un proceso que depende del voltaje y de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) (Kass y Sanguinetti, 1984; Lee y cols., 1985; Zhang y cols., 1994). En los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , los procesos de inactivación y de recuperación de la inactivación están regulados por cambios estructurales en diferentes partes de la subunidad  $\alpha_1$ , incluyendo el poro, los lazos intracelulares y el extremo C-terminal. Además, se ha comprobado que también participan interacciones con proteínas intracelulares y subunidades auxiliares como la subunidad  $\beta$ . La inactivación debida a altas  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  representa un mecanismo de retroalimentación negativo de gran importancia (Brehm y Eckert, 1978) en el que están implicados un motivo de unión a calmodulina (CaM) (el “motivo IQ”), un motivo en “mano EF” y los péptidos A y C que se encuentran en el extremo C-terminal del canal (Figura I.8) (Zuhlke y cols., 1999; Peterson y cols., 2000). Así, tras la despolarización y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aumenta hasta el rango micromolar, lo que hace que el  $\text{Ca}^{2+}$  se una a la CaM asociada al canal y se promueva la inactivación. En la inactivación dependiente de voltaje, el lazo DI-DII actúa como partícula bloqueante del canal (Kim y cols., 2004a).



**Figura I.9. Registros de  $I_{\text{Ca,L}}$ .** (A)  $I_{\text{Ca,L}}$  registrada en miocitos auriculares humanos disociados enzimáticamente en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. (B) Corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  registrada en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. La corriente fue registrada en células CHO transfectadas de forma transitoria con las subunidades  $\text{Cav}\alpha 1.2$ ,  $\text{Cav}\beta_2$  y  $\text{Cav}\alpha_2/\delta$ .

### 2.2.3. Composición de los canales que generan la $I_{\text{Ca,L}}$

Los miembros de la familia Cav1 codifican las subunidades  $\alpha_1$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, siendo la Cav1.2 ( $\alpha_{1C}$ ) la que se expresa predominantemente en el corazón (Bodi y cols., 2005). Se han identificado tres variantes de la isoforma Cav1.2 (Cav1.2a-c), de las que la Cav1.2a es la isoforma cardíaca específica. Además, en el corazón estos canales presentan dos tipos de subunidades auxiliares, las subunidades  $\beta$  y  $\alpha_2/\delta$  (Tabla I.4). El canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L

es una importante diana farmacológica para el tratamiento de diversas patologías. Los fármacos que inhiben la  $I_{Ca,L}$  (denominados “antagonistas del calcio”) están indicados en el tratamiento de diversas patologías como angina de pecho, hipertensión arterial (HTA), vasculopatías periféricas, algunas taquiarritmias supraventriculares y como protectores renales y cardíacos. Los antagonistas del  $Ca^{2+}$  se dividen estructuralmente en 3 grupos: las 1,4-dihidropiridinas (DHP, como el nifedipino), las bencilalquilaminas (como el verapamilo) y las benzotiazepinas (como el diltiazem). Todos ellos tienen su sitio de unión en el poro del canal (Hering y cols., 1996; Hockerman y cols., 1995; Schuster y cols., 1996; He y cols., 1997; Hockerman y cols., 1997).

#### 2.2.4. Canalopatías asociadas al canal de $Ca^{2+}$ tipo L

La canalopatía más importante que se ha identificado es la causada por la mutación G406R en el gen que codifica la subunidad Cav1.2 (CACNA1C), que se ha relacionado con la aparición de síndrome de Timothy (SQTL8) (Splawski y cols., 2004; Bidaud y Lori, 2011). Esta mutación produce un aumento en la amplitud de la  $I_{Ca,L}$  como consecuencia de la separación de la unión entre las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta$  y se manifiesta como alteraciones multiorgánicas que afectan al miocardio (prolongación del intervalo QT y arritmias graves e incluso letales) y producen inmunodeficiencia y autismo, lo que demuestra la amplia distribución de la subunidad Cav1.2 (Splawski y cols., 2004).

Se han descrito otras mutaciones en los genes que codifican la subunidad  $\alpha$  Cav1.2 (Antzelevitch y cols., 2007) y la subunidad auxiliar Cav $\beta_{2b}$  y  $\alpha_2/\delta_1$ , que reducen la entrada de  $Ca^{2+}$  durante la fase de meseta del PA y que se han relacionado con la aparición de síndrome de Brugada y con el síndrome de repolarización temprana (Cordeiro y cols., 2009; Burashnikov y cols., 2010).

### 2.3. Canales de $K^+$

Los canales de  $K^+$  constituyen el grupo más heterogéneo de proteínas de membrana. Se distribuyen ubicuamente a lo largo de toda la escala filogenética y están presentes prácticamente en todas las células, donde juegan un importante papel, por ejemplo, en el mantenimiento del PR celular, el control de la frecuencia de disparo de las células automáticas, la liberación de neurotransmisores, la secreción de insulina, la excitabilidad celular, el

transporte de electrolitos por las células epiteliales o la regulación de la contracción del músculo liso esquelético y cardíaco (Tabla I.5).

Corriente	Subunidad $\alpha$			Subunidad $\beta$					
	Proteína	Gen	Locus	Proteína	Gen	Locus			
$I_{K1}$	Kir2.1 (IRK1)	KCNJ2	17q23.1-24.2						
	Kir2.2 (IRK2)	KCNJ12	17p11.1						
	Kir2.3 (IRK3)	KCNJ4	22q13.10						
$I_{K,ACh}$	Kir3.1 (GIRK1)	KCNJ3	2q24.1						
	Kir3.4 (GIRK4)	KCNJ5	11q24						
$I_{K,ATP}$	Kir6.2 (BIR)	KCNJ11	11p15.1				SUR2A	ABCC9	12p12.1
$K_{2p}$	$K_{2p1.1}$ (TWIK-1)	KCNK1	1q42-43						
	$K_{2p2.1}$ (TREK-1)	KCNK2	1q41						
	$K_{2p3.1}$ (TASK-1)	KCNK3	2p24.1-23.3						
	$K_{2p5.1}$ (TASK-2)	KCNK5	6p21						
	$K_{2p6.1}$ (TWIK-2)	KCNK6	19q13-1						
	$K_{2p9.1}$ (TASK-3)	KCNK9	8q24-3						
	$K_{2p10.1}$ (TREK-1)	KCNK10	14q31						
	$K_{2p13.1}$ (THIK-1)	KCNK13	14q24.1-24.3						
	$K_{2p17.1}$ (TASK-4)	KCNK17	6p21.1-2						
$I_{to1}$	Kv4.3	KCND3	11p15.1	KChIP2	KCNIP2	10q25			
				DPPX	DPP6	7q36.2-36.3			
				MiRP1	KCNE2	21q22.12			
				MiRP2	KCNE3	11q13-q14			
	Kv1.4	KCNA4	11p14.3-15.2	Kv $\beta$ 1	KCNAB1	3q25			
				Kv $\beta$ 2	KCNAB2	1p36.3			
	Kv4.1	KCND1	Xp11.23	KChIP1	KCNIP1	5q35			
	Kv4.2	KCND2	7q31	KChIP2	KCNIP2	10q25			
	$I_{Kur}$	Kv1.5	KCNA5	12p13.3	Kv $\beta$ 1	KCNAB1	3q25		
					Kv $\beta$ 2	KCNAB2	1p36.3		
$I_{Ks}$	Kv7.1 (KCNQ1)	KCNQ1	11p15.5	minK	KCNE1	21q22.1-q22.2			
$I_{Kr}$	Kv11.1 (hERG)	KCNH2	7q35-36	minK	KCNE1	21q22.1-q22.2			
				MiRP1	KCNE2	21q22.1			

**Tabla I.5. Subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales que generan las diferentes corrientes de  $K^+$  cardíacas humanas.** Entre paréntesis, nombre alternativo de algunas de las proteínas. [Adaptada de Tamargo y cols., 2004b]

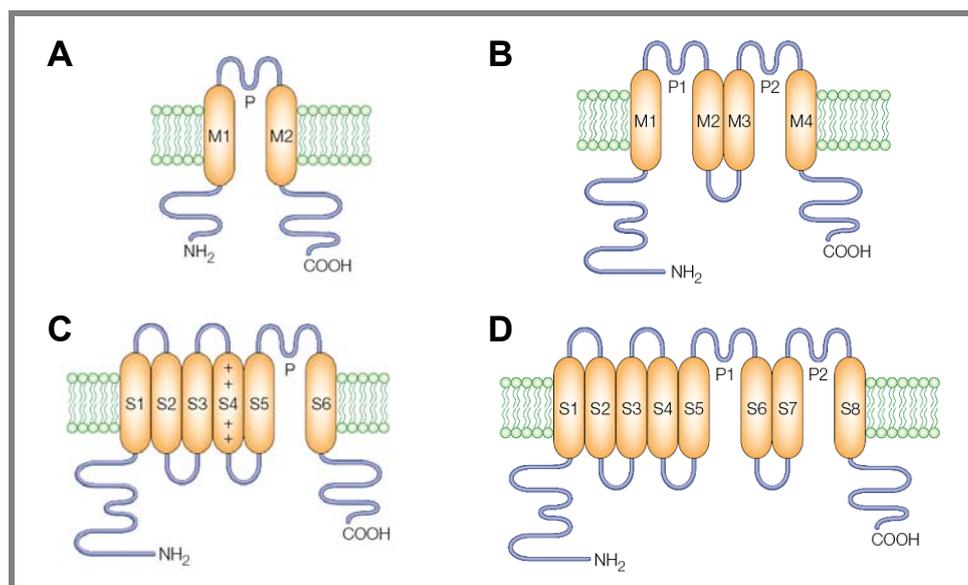
A nivel cardíaco, los canales de  $K^+$  juegan un papel fundamental en el PA, ya que permiten la salida de  $K^+$  de la célula, lo que conduce a la repolarización celular. Las cinéticas de activación e inactivación de cada canal determinan su participación en el control de la repolarización: los canales que se activan rápidamente intervienen en la repolarización durante las primeras fases del PA, mientras que los canales que generan corrientes rectificadoras tardías que se activan lentamente participan fundamentalmente en la

repolarización durante la fase 3. Los canales de  $K^+$  presentan una distribución heterogénea en función del tejido (aurícula frente a ventrículo) e incluso dentro de un mismo tejido (endocardio frente a epicardio). La heterogeneidad en los tipos y en la distribución de los canales de  $K^+$  determina la diferencia en la morfología de los PA de las distintas regiones del corazón (Figura I.1). Además, la expresión y las propiedades de los canales de  $K^+$  también pueden verse modificadas por fármacos, hormonas y diferentes patologías.

El estudio electrofisiológico del mutante *Shaker* de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), denominado así por el aleteo constante que se observaba en estas moscas al ser anestesiadas con éter, permitió la clonación y secuenciación del primer canal de  $K^+$  (Jan y cols., 1983). Desde entonces, el desarrollo de las técnicas de biología molecular ha permitido identificar más de 200 genes que codifican canales de  $K^+$  (Coetzee y cols., 1999; Snyders, 1999; Tamargo y cols., 2004b; Gutman y cols., 2005; Li y Dong, 2010).

Los canales de  $K^+$  se clasifican de acuerdo al número de segmentos TM y de poros que presentan (Figura I.10):

- Canales formados por 2 segmentos TM y 1 poro (2TM/1P) (canales de  $K^+$  rectificadores internos o canales Kir).
- Canales formados por 4 segmentos TM y 2 poros (4TM/2P) (canales K2p).
- Canales formados por 6 segmentos TM y 1 poro (6TM/1P) (canales de  $K^+$  dependientes de voltaje o canales Kv). Incluye también a los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$ , que presentan un segmento TM adicional (S0) en el extremo N-terminal (canales  $K_{Ca}$ ).
- Canales formados por 8 segmentos TM y 2 poros (8TM/2P), sólo encontrados en levaduras.



**Figura I.10. Topología de la subunidad  $\alpha$  de los cuatro grandes grupos de canales de  $K^+$ .** (A) Canales 2TM/1P. (B) Canales 4TM/2P (C) Canales 6TM/1P (D) Canales 8TM/2P. [Adaptadas de Choe, 2002]

## 2.3.1. Canales 2TM/1P

Los canales 2TM/1P o canales Kir, desempeñan varias funciones importantes como el control de la señalización neuronal, la frecuencia cardíaca o la liberación de insulina. Desde un punto de vista evolutivo, los canales 2TM/1P son los más antiguos y su estructura recuerda a los S5 y S6 de los canales Kv. Sin embargo, los canales Kir carecen de una estructura semejante al aparato sensor de voltaje de los canales Kv (S1 a S4).

Tras el clonaje de los primeros canales Kir (Ho y cols., 1993; Kubo y cols., 1993a y b), se han identificado muchas más proteínas pertenecientes a esta familia de canales. Actualmente, la familia de canales Kir se compone de 7 subfamilias (Kir1 a Kir7) (Tabla I.6), con distintas propiedades, diferente distribución y más o menos bien definidas funciones fisiológicas para cada una de ellas (Kubo y cols., 2005). Estas subfamilias se pueden clasificar en cuatro grupos: los canales que participan en el mantenimiento del PR (Kir2), los canales acoplados a proteínas G (Kir3), los canales sensibles a ATP (Kir6) y los canales transportadores de  $K^+$  (Kir1, Kir4 y Kir7).

Familia	Corriente	Proteína	Gen	Cromosoma	Localización
<b>Kir1 (ROMK)</b>		Kir1.1-1.3	KCNJ1	17q25	Riñón, corazón, páncreas
<b>Kir2 (IRK)</b>	$I_{K1}$	Kir2.1	KCNJ2	17q23.1-24.2	Corazón, SNC, ME, ML, pulmón, placenta, riñón
		Kir2.2	KCNJ12	17p11.1	Corazón
		Kir2.3	KCNJ4	22q13.10	Corazón, SNC, ME
		Kir2.4	KCNJ14	19q13.1-13.3	Corazón, SNC, retina
<b>Kir3 (GIRK)</b>	$I_{K,ACh}$	Kir3.1	KCNJ3	2q24.1	Corazón, cerebelo
		Kir3.2	KCNJ6	21q22.13-22.2	Corazón, páncreas
		Kir3.3	KCNJ9	1q21-23	SNC
		Kir3.4	KCNJ5	11q24	Corazón, páncreas
<b>Kir4 (BIR10)</b>		Kir4.1	KCNJ10	1q22-q2	Glía
		Kir4.2	KCNJ15	21q22.2	Riñón, pulmón, SNC
<b>Kir5</b>		Kir5.1	KCNJ16	17q23.1-24.2	SNC, SNP
<b>Kir6</b>	$I_{K,ATP}$	Kir6.1	KCNJ8	12p11.23	Heterogénea
		Kir6.2	KCNJ11	11p15.1	Heterogénea
<b>Kir7</b>		Kir7.1	KCNJ13	2q37	SNC, riñón, tiroides

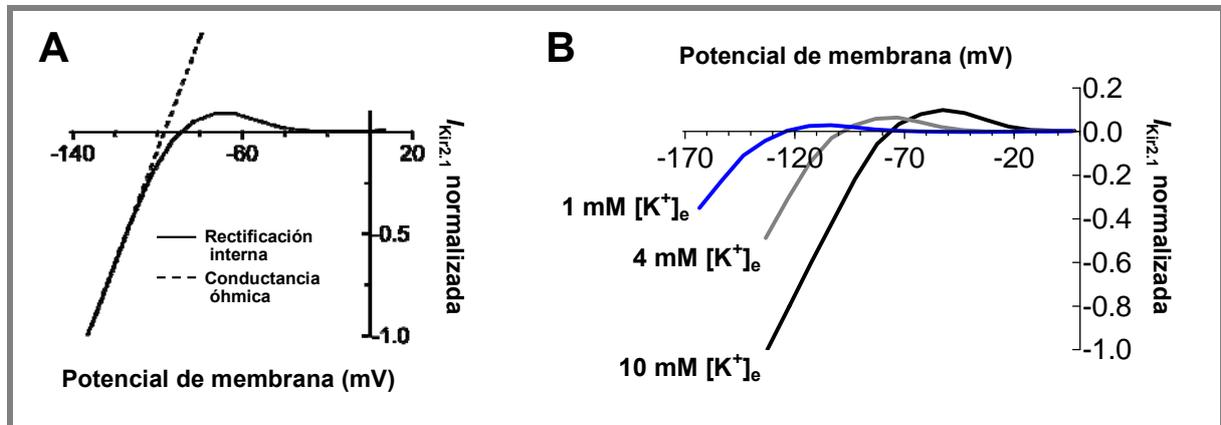
**Tabla I.6. Familias de canales de  $K^+$  2TM/1P en mamíferos.** ME: Músculo esquelético. ML: Músculo liso. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico.

## 2.3.1.a. La rectificación interna en los canales Kir

Los canales iónicos se pueden considerar como resistencias eléctricas situadas en la membrana plasmática que pasan cargas en forma de iones entre dos compartimentos (los medios intra y extracelular) (Dhamoon y Jalife, 2005). Las resistencias, que son independientes del tiempo y del voltaje, tienen una relación corriente-voltaje (relación I-V) lineal que se describe mediante la ley de Ohm (conductancia óhmica):

$$\text{Voltaje} = \text{Intensidad} \cdot \text{Resistencia} \quad (\text{I.7})$$

La conductancia (G) es la inversa de la resistencia, y frecuentemente se usa para describir las propiedades biofísicas del canal. Al contrario de lo que predice la Ley de Ohm, la rectificación interna se puede describir como una relación I-V no lineal donde aparece una reducción muy marcada y dependiente de voltaje de la amplitud de la corriente conforme se produce la despolarización de la membrana. Como resultado los canales de  $K^+$  que presentan rectificación interna generan una corriente de entrada de gran amplitud a potenciales más negativos del  $E_K$ , mientras que a potenciales más positivos generan una corriente de salida de amplitud mucho menor (Figura I.11).



**Figura I.11. Características de la rectificación interna en la  $I_{K1}$ .** (A) Relación I-V de la corriente  $I_{Kir2.1}$ . Se muestra la corriente esperada si el comportamiento del canal siguiese la ley de Ohm (línea punteada). (B) Efectos de la  $[K^+]_e$  sobre la  $I_{Kir2.1}$ . [Adaptadas de Dhamoon y Jalife, 2005 (A) y Gómez y cols., 2009 (B)]

Todos los canales Kir presentan una relación I-V con rectificación interna, pero existen grandes diferencias en su grado de rectificación, su regulación y su distribución (Tabla I.6). Las subfamilias Kir2 y Kir3 son las que presentan corrientes con una rectificación interna más marcada (los canales que se han denominado como “muy rectificadores”), similares a las originalmente descritas por Katz en músculo esquelético (Katz, 1949).

La rectificación interna que presentan los canales Kir se atribuye al bloqueo dependiente de voltaje del poro del canal por cationes endógenos como el  $Mg^{2+}$  (Matsuda y cols., 1987; Vandenberg, 1987), y en particular por poliaminas intracelulares como la espermina, la espermidina y la putrescina (Ficker y cols., 1994; Lopatin y cols., 1994).

Otra propiedad de estas corrientes es que presentan dependencia de la concentración extracelular de  $K^+$  ( $[K^+]_e$ ). En concreto, un aumento de la  $[K^+]_e$  produce un aumento de la probabilidad de apertura del canal y el desplazamiento hacia potenciales más positivos de la relación I-V (en paralelo al desplazamiento del  $E_K$ ).

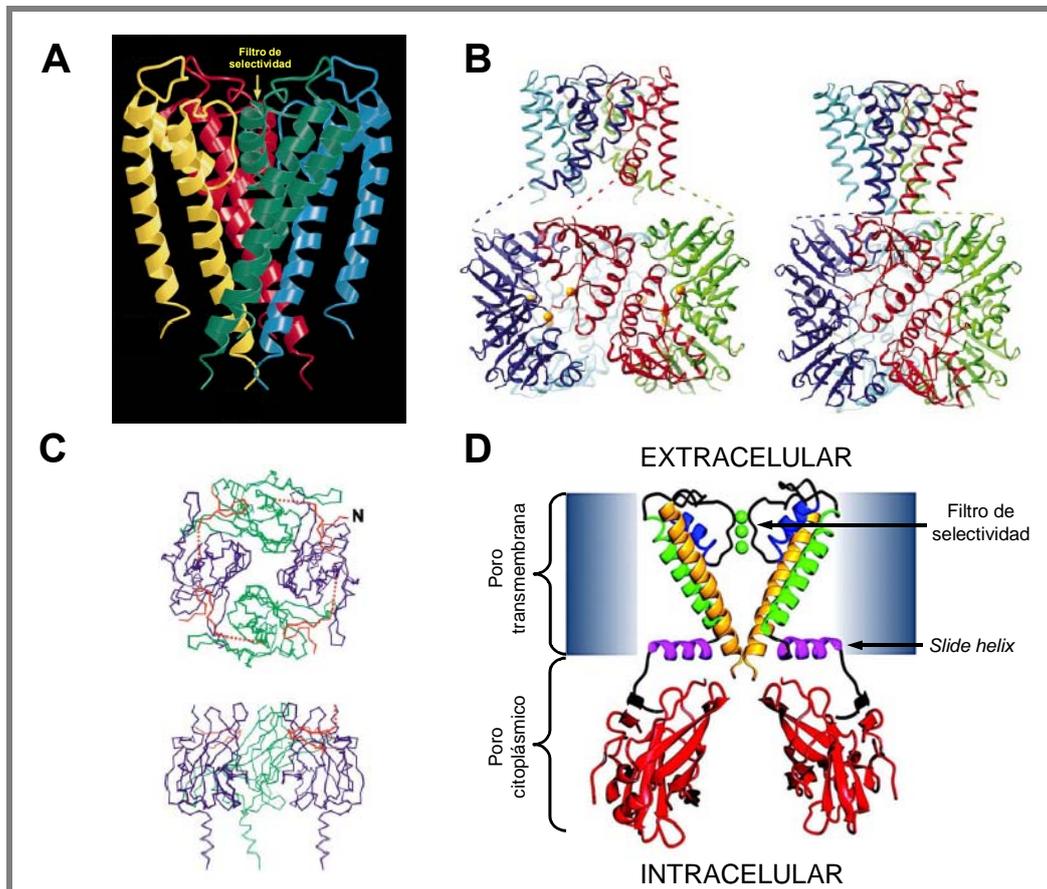
Se ha descrito que el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ) es capaz de modular todos los canales Kir tanto en células nativas como en sistemas de expresión heterólogos (Logothetis y cols., 2007; Lopes y cols., 2007; Cheng y cols., 2011). Se ha demostrado que las interacciones entre el  $PIP_2$  y el canal Kir2.1 producen un aumento de la probabilidad de apertura de los mismos, favoreciendo la estabilización del canal en el estado abierto y facilitando las transiciones desde el estado cerrado hacia el abierto (Xie y cols., 2008), mediante la interacción con residuos del canal situados en su mayoría en la parte superior del dominio citoplásmico (la más próxima a la cara interna de la membrana plasmática) y en la *slide helix* (Lopes y cols., 2002; Logothetis y cols., 2007). Por ello, se ha propuesto que el  $PIP_2$  modula los canales Kir interaccionando con los extremos N- y C-terminales de los mismos, aproximando el dominio intracelular a la cara citoplásmica de la membrana y facilitando la apertura del canal (Figura I.12) (Logothetis y cols., 2007). Recientemente, nuestro grupo ha descrito que la flecainida, un antiarrítmico de clase Ic, aumenta selectivamente la  $I_{K1}$  generada por homotetrámeros de Kir2.1 uniéndose a la cisteína 311, residuo inmediatamente anterior a la Arg312, que modula las interacciones entre el  $PIP_2$  y el canal (Caballero y cols., 2010b).

### 2.3.1.b. Estructura de los canales Kir

En 1998 se describió por primera vez la estructura cristalográfica mediante difracción con rayos X de un canal de  $K^+$ , el canal bacteriano *KcsA* (Doyle y cols., 1998). Gracias a este estudio y a las cristalizaciones posteriores de otros canales 2TM/1P tanto bacterianos, *MthK* (Jiang y cols., 2002a y 2002b) y KirBac (Kuo y cols., 2003), como de mamíferos, Kir3.1 (Nishida y MacKinnon, 2002) y Kir2.2 (Tao y cols., 2009), se ha podido avanzar en el conocimiento de los aspectos fundamentales de la estructura y del funcionamiento de estos canales de  $K^+$ .

Los canales Kir están formados por cuatro subunidades 2TM/1P que se disponen

simétricamente alrededor de un poro central (Figura I.12). Cada subunidad consta de dos hélices  $\alpha$  (M1 y M2) conectadas por una secuencia de 30 aminoácidos (lazo P) en la que se encuentra el filtro de selectividad del canal (Doyle y cols., 1998). Esta región está formado por una secuencia de aminoácidos (T-X-G-Y(F)-G) muy conservada en todos los canales de  $K^+$  ( $K^+$  channel signature).



**Figura I.12. Canales 2TM/1P.** (A) Estructura del canal *KcsA* en una visión lateral del tetrámero. (B) Estructura cristalizada del canal *MthK* en el estado abierto (a la izquierda) y modelo hipotético de su configuración cerrada (a la derecha). (C) Estructura del dominio intracelular del canal Kir3.1 en una visión superior (desde la membrana hacia el citoplasma) (panel superior) y en una visión lateral (panel inferior). (D) Modelo de la estructura de dos de las subunidades que forman los canales Kir2 basado en la estructura cristalográfica del canal bacteriano KirBac1.1. Se pueden distinguir la *slide helix* (en rosa), los segmentos M1 y M2 (en verde y amarillo, respectivamente), el lazo P (en azul) y el dominio citoplásmico (en rojo). [Adaptadas de Doyle y cols., 1998 (A), Jiang y cols., 2002a (B), Nishida y MacKinnon, 2002 (C) y Kuo y cols., 2003 (D)]

Cabe destacar que estos canales carecen del aparato sensor del voltaje que sí poseen los canales de  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $K^+$  sensibles a voltaje. El dominio N-terminal y el voluminoso dominio C-terminal son citoplasmáticos. En el extremo amino terminal aparece una estructura de  $\alpha$ -hélice (*slide helix*) que se dispone paralela a la membrana plasmática y que controla el movimiento de apertura del canal (Doyle y cols., 1998; Kuo y cols., 2003; Hibino y cols., 2010). La longitud del dominio citoplásmico de los canales Kir es, al menos, la misma que

la de la porción transmembrana (Figura I.12), lo que hace que estos canales presenten un poro iónico con una longitud total (poro citoplasmático + poro transmembrana) que es aproximadamente el doble de la de otros canales de  $K^+$  ( $\approx 60 \text{ \AA}$ ) (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005; Hibino y cols., 2010). Además, este dominio citoplasmático se encuentra formando un tetrámero relativamente polar y con una carga neta negativa que explicaría ciertas características de la rectificación interna de estos canales.

### 2.3.1.c. Principales corrientes cardíacas generadas a través de canales Kir

Dentro de la familia de canales Kir, las subfamilias Kir2, Kir3 y Kir6 son las que se expresan en el tejido cardíaco: los canales Kir2 participan en la formación de los canales que generan la  $I_{K1}$  (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), las subunidades Kir3.1 y Kir3.4 (pertenecientes al grupo de canales acoplados a proteínas G) forman el canal que genera la corriente activada por acetilcolina ( $I_{K,ACH}$ ), responsable de los efectos cronotrópicos e inotrópicos negativos observados tras la estimulación vagal (Yamada y cols., 1998; Stanfield y cols., 2002), y las subunidades Kir6 heteromerizan con el receptor de sulfonilureas (SUR) para formar los canales que generan la corriente sensible a ATP ( $I_{K,ATP}$ ), responsable del acortamiento de la DPA que aparece durante la isquemia cardíaca (Nichols y cols., 1996; Seino y Miki, 2003).

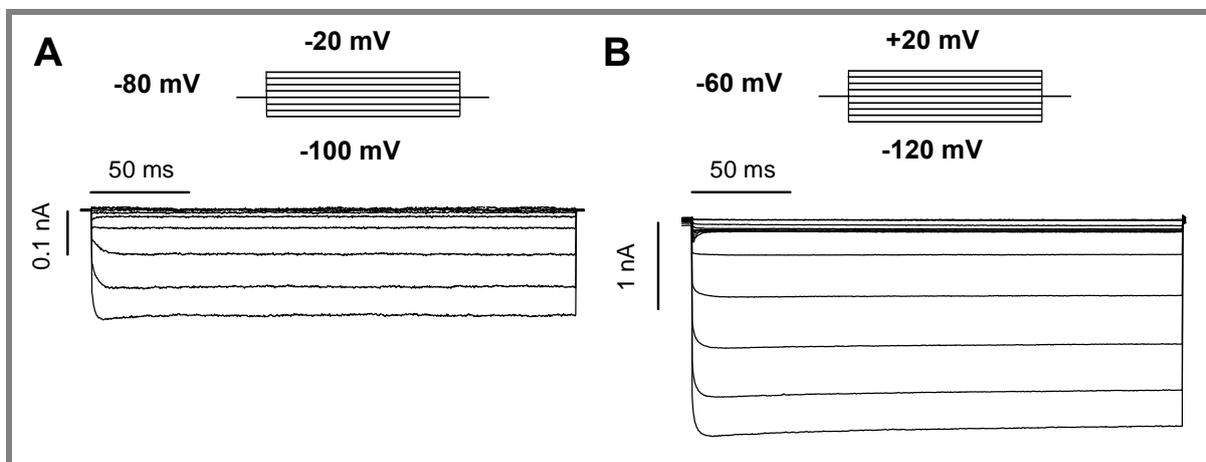
#### I. La $I_{K1}$

La corriente rectificadora interna  $I_{K1}$  es responsable de la fase final de la repolarización y del PR del PA auricular y ventricular (Nichols y cols., 1996; Lopatin y Nichols, 2001). Se han descrito mutaciones en los genes que codifican la expresión de proteínas que forman los canales que generan la  $I_{K1}$  humana, que conducen a la pérdida o a la ganancia de función de los mismos. La pérdida de función disminuye la  $I_{K1}$  y produce Síndrome de Andersen, que a nivel electrofisiológico se caracteriza por la prolongación del intervalo QT (SQTL tipo VII) (Plaster y cols., 2001; Tristani-Firouzi y cols., 2002). Por el contrario, la ganancia de función aumenta la  $I_{K1}$  lo que produce síndrome de QT corto (SQTC) tipo III (Priori y cols., 2005; Hattori y cols., 2012). Ambos síndromes, pero en particular el SQTC, cursan con arritmias ventriculares graves y potencialmente mortales.

### I.a. Características de la $I_{K1}$

A potenciales más negativos que el PR, la  $I_{K1}$  presenta una conductancia mucho mayor que cualquier otra corriente, por lo que es la corriente encargada de fijar el PR cerca del  $E_K$ . Posteriormente, cuando se produce la despolarización, los canales se mantienen cerrados durante toda la fase de meseta y se abren a potenciales más negativos que -20 mV, por lo que la  $I_{K1}$  contribuye también de esta forma a la parte final de la fase 3 de la repolarización (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2009).

Tal y como hemos visto, las distintas morfologías del PA registradas en el corazón se deben a la diferente expresión de las corrientes iónicas, incluida la  $I_{K1}$  (Schram y cols., 2002). La  $I_{K1}$  es prácticamente inexistente en células del nodo SA, lo que le permite mantener un PR relativamente despolarizado (-50 mV) y que éste no se mantenga estable durante la fase 4 (Schram y cols., 2002). Sin embargo, la  $I_{K1}$  está presente tanto en la aurícula como en el ventrículo aunque presenta diferencias significativas, ya que la corriente registrada en miocitos ventriculares es entre 6-10 veces mayor que la auricular, lo que permite mantener el PR más hiperpolarizado y una más rápida repolarización durante la fase 3 en el ventrículo (Lopatin y Nichols, 2001; Dhamoon y Jalife, 2005).



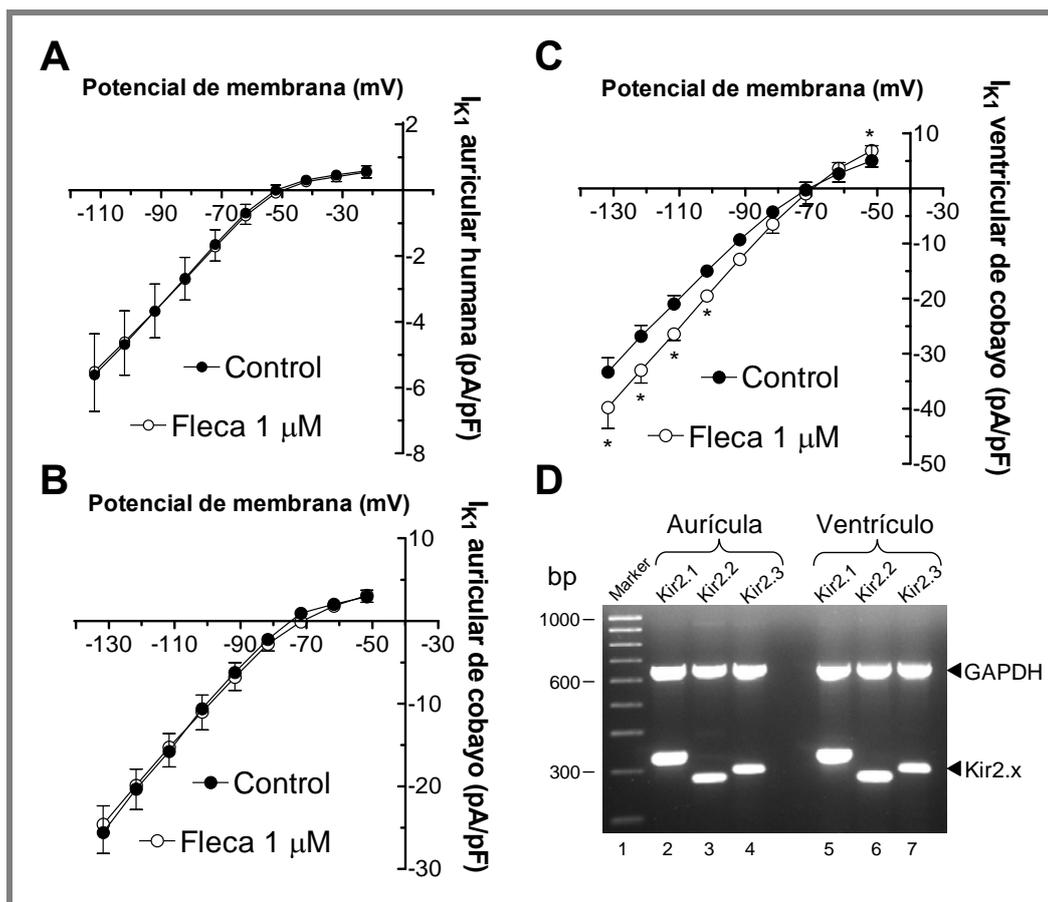
**Figura.I.13. Registros de  $I_{K1}$ .** (A) Familia de trazos de la  $I_{K1}$  registrada en miocitos auriculares humanos en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. (B) Corriente de  $K^+$  rectificadora interna registrada en células CHO transfectadas de forma transitoria con la subunidad Kir2.1.

Al aplicar un pulso hiperpolarizante, la amplitud de la  $I_{K1}$  alcanza un pico máximo de corriente con una cinética de activación muy rápida (1-2 ms) para, a continuación, disminuir ligeramente durante la aplicación del pulso, hasta alcanzar un nivel estable de corriente (Figura I.13). A potenciales más negativos que el  $E_K$ , se registra una corriente de entrada de  $K^+$  de gran amplitud, mientras que a potenciales más positivos que el  $E_K$ , se registra una

corriente de salida de  $K^+$  de pequeña amplitud. Además, conforme el potencial aplicado se va haciendo más positivo, la amplitud de esta corriente de salida disminuye hasta hacerse cero debido al fenómeno de rectificación interna (Figura I.13).

*I.b. Composición de los canales que generan la  $I_{K1}$*

Hasta la fecha se han clonado 4 miembros de la familia Kir2 (Kir2.1 a Kir2.4) en mamíferos, aunque la expresión de los canales Kir2.4 en el corazón es mínima (solamente se ha demostrado su presencia en las células nerviosas que inervan el miocardio) y parece localizarse preferentemente en el SNC (Liu y cols., 2001), lo que señala a los otros tres miembros de la familia como los canales responsables de la  $I_{K1}$  cardíaca. Se ha demostrado que la composición de los canales que generan la  $I_{K1}$  varía según la especie y el tipo celular estudiado y según la localización en la membrana de dichos canales (Zaritsky y cols., 2001; Kubo y cols., 2005, Gaborit y cols., 2007, Caballero y cols., 2010b). Se ha tratado de averiguar dicha composición atendiendo a las diferencias que presentan cada uno de los miembros de la subfamilia Kir2 respecto a propiedades farmacológicas u a otras propiedades como la conductancia, la sensibilidad al  $Ba^{2+}$  y al pH o la “cinética de activación” (Liu y cols., 2001; Muñoz y cols., 2007). Recientemente nuestro grupo ha descrito que la flecainida es capaz de aumentar la corriente generada por canales Kir2.1 pero no las corrientes generadas por los canales Kir2.2 o Kir2.3, del mismo modo que no modifica la  $I_{K1}$  registrada en miocitos auriculares humanos o de cobayo. Sin embargo la flecainida es capaz de aumentar la corriente  $I_{K1}$ , tanto de entrada como de salida de  $K^+$ , registrada en miocitos ventriculares de cobayo (Caballero y cols., 2010b). Estos datos sugieren que la  $I_{K1}$  ventricular en cobayo está generada mayoritariamente por canales formados por cuatro subunidades de Kir2.1, mientras que la  $I_{K1}$  auricular está generada por heterotetrámeros de Kir2.x. A pesar de que tanto en aurícula como en ventrículo encontramos la presencia de ARNm de todos ellos (Caballero y cols., 2010b), la expresión de Kir2.1 en tejido cardíaco de cobayo, es mayor en ventrículo que en aurícula, al igual que ocurría en humanos (Liu y cols., 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010, Caballero y cols., 2010b) (Figura I.14).



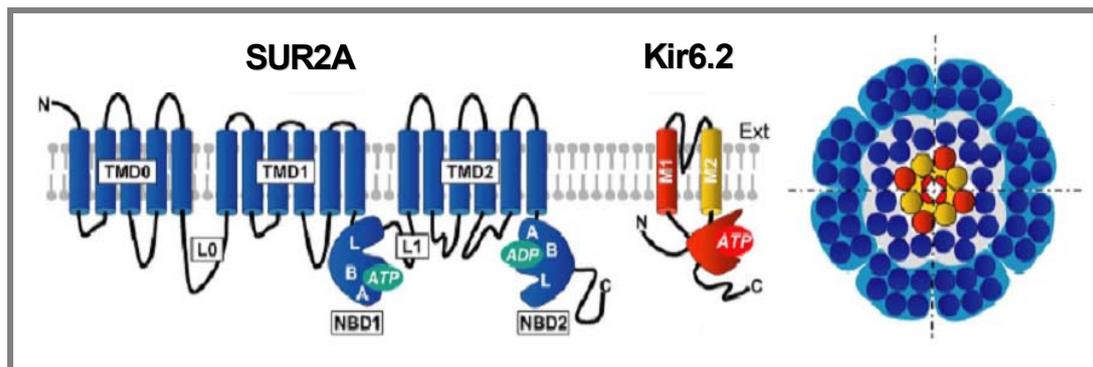
**Figura.I.14. Composición de la  $I_{K1}$ .** (A-C) Relaciones I-V de la  $I_{K1}$  auricular humana (A), de miocitos auriculares de cobayo (B) y de miocitos ventriculares de cobayo (C) en situación control y en presencia de flecaína 1  $\mu\text{M}$ . (D) Niveles de expresión de canales Kir2.x de muestras auriculares y ventriculares de cobayo. La primera línea indica el marcador de pesos moleculares (1,000-100 pares de bases). Las líneas 2-4 y 5-7 muestran los niveles de expresión de Kir2.1 (325 pb), Kir2.2 (291 pb) y Kir2.3 (303 pb), en tejido auricular y ventricular, respectivamente. El gen GAPDH se usó como control interno. [Adaptadas de Caballero y cols., 2010b]

## II. La $I_{K,ATP}$

En el corazón, la corriente rectificadora  $I_{K,ATP}$  juega un importante papel durante la isquemia miocárdica y en el preconditionamiento isquémico (Seino y Miki, 2003; Nerbonne y Kass, 2005). Esta corriente se inhibe por ATP intracelular y se activa por el ADP-Mg, por lo que la actividad del canal está regulada por el cociente ADP/ATP (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003). Por otra parte, la  $I_{K,ATP}$  presenta una rectificación mucho menor que la de la  $I_{K1}$  o la  $I_{K,ACh}$  (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

### II.a. Composición de los canales que generan la $I_{K,ATP}$

El canal  $K_{ATP}$  cardíaco es el resultado de la asociación de 4 subunidades  $\alpha$  Kir6.2 con 4 subunidades auxiliares SUR2A (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003). Las subunidades  $\alpha$  Kir6 están formadas por 2 segmentos TM (M1 y M2) y son las que confieren al canal la capacidad de ser regulado por el ATP (Tucker y cols., 1996). Las subunidades auxiliares SUR2A tienen 3 dominios TM (TMD0, TMD1 y TMD2) y 2 dominios de unión a nucleótidos, NBD1 y NBD2 (*Nucleotide Binding Domain*), localizados en el lazo de unión entre TMD1 y TMD2 y en la región C-terminal, respectivamente (Figura I.15) (Conti y cols., 2001; Seino y Miki, 2003). Las subunidades SUR2A son las que confieren al canal la sensibilidad al ADP y a las sulfonilureas (Yokoshiki y cols., 1998; Moreau y cols., 2000; Seino y Miki, 2003). Sin embargo, hay estudios que demuestran la existencia de canales  $K_{ATP}$  cardíacos sin la presencia de la subunidad SUR (Pu y cols., 2001), por lo que la estructura molecular exacta del canal que genera la  $I_{K,ATP}$  en el miocardio sigue siendo controvertida.



**Figura I.15. Estructura de los canales  $K_{ATP}$ .** Modelo estructural del canal  $K_{ATP}$  cardíaco formado por 4 subunidades Kir6.2 (en rojo y amarillo) y 4 subunidades SUR2A (en azul). Cada subunidad Kir6.2 está formada por 2 segmentos TM en  $\alpha$ -hélice y un largo dominio citoplásmico con el sitio de unión para el ATP. Cada subunidad SUR2A contiene 3 dominios TM (TMD0, TMD1 y TMD2) y 2 dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2) localizados en el lazo de unión entre TMD1 y TMD2 (L1) y en el extremo C-terminal. [Adaptada de Moreau y cols., 2005]

### III. La $I_{K,ACh}$

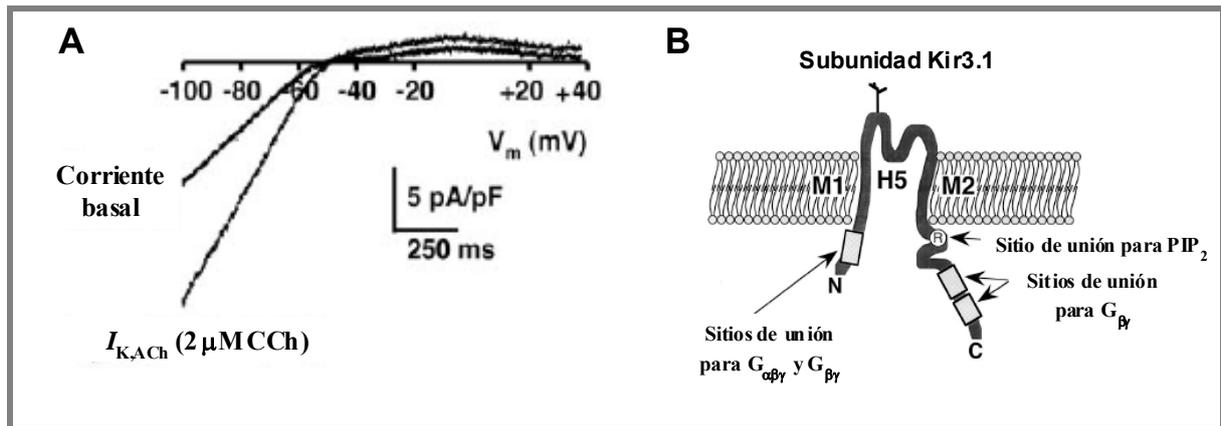
La densidad de los canales  $K_{ACh}$  es muy alta en las células marcapaso de los nodos SA (donde regulan la frecuencia cardíaca) y AV (donde regulan la velocidad de conducción a través del nodo AV) (Mark y Herlitz, 2000). Además, juega un papel importante en el control de la DPA en el tejido auricular, donde la densidad de la  $I_{K,ACh}$  es 6 veces mayor que en el ventricular (Schram y cols., 2002, Tamargo y cols., 2004b).

### III.a. Características de la $I_{K,ACh}$

La ACh estimula los receptores muscarínico  $M_2$  y produce la apertura de los canales  $K_{ACh}$  que generan una corriente que se caracteriza principalmente por una activación de cinética sigmoideal dependiente de tiempo y de la dosis de agonista, por lo que se tardan cientos de ms en alcanzar la amplitud máxima de la corriente (Breitwieser y Szabo, 1988) (Figura I.16A). Posteriormente, y aunque la ACh esté todavía presente, se produce la disminución gradual de la corriente hasta que se alcanza un nivel cercano al estado estable, denominado “*quasi-steady-state*” (Qss) (Kurachi y cols., 1987). La apertura de los canales  $K_{ACh}$  inducida tras la estimulación del receptor muscarínico  $M_2$  está mediada por una proteína G heteromérica formada por una subunidad  $G_\alpha$  y un dímero  $G_{\beta\gamma}$  (Yamada y cols., 1998). La estimulación del receptor muscarínico promueve la disociación del dímero  $G_{\beta\gamma}$  de la subunidad  $G_\alpha$ . El dímero  $G_{\beta\gamma}$  es la molécula que interactúa con el canal promoviendo su activación (Yamada y cols., 1998). Se ha propuesto que la desensibilización a corto plazo del canal se debe a la disociación de las proteínas G del receptor tras la aplicación del agonista o a la fosforilación del receptor muscarínico  $M_2$  y la desfosforilación del canal (Yamada y cols., 1998).

La activación de la  $I_{K,ACh}$  hiperpolariza el  $E_m$  y reduce la frecuencia de disparo de las células del nodo SA, lo que explica el efecto cronotrópico negativo de la ACh. Además, reduce la velocidad de conducción a través del nodo AV, lo que explica por qué la estimulación vagal o la administración de adenosina intravenosa pueden parar las taquiarritmias por reentrada intranodal (Snyders, 1999; Tamargo y cols., 2004b).

La  $I_{K,ACh}$  es estimulada por el ATP intracelular, el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ) y por agonistas de los receptores  $\mu$ -opioides,  $\alpha_2$ -adrenérgicos, de adenosina A1 y de endotelina  $ET_A$  e inhibida por la distensión de la membrana (dependiente de la subunidad Kir3.4) y la acidificación del medio intracelular (Ji y cols., 1998; Shieh y cols., 2000; Tamargo y cols., 2004b).



**Figura I.16. Características de la  $I_{K,ACh}$  y estructura de los canales  $K_{ACh}$ .** (A) Curva I-V en situación control y tras la aplicación de carbacol (CCh). (B) Esquema representativo de la estructura de la subunidad Kir3.1, formada por 2 segmentos transmembrana (M1 y M2) unidos por el lazo H5 y cuyos extremos N- y C-terminal son intracelulares. Se indican los sitios de unión de proteínas G y de PIP<sub>2</sub>. [Adaptadas de Dobrev y cols., 2005 (A) y Yamada y cols., 1998 (B)]

### III.b. Composición de los canales que generan la $I_{K,ACh}$

Hasta la fecha se han clonado 4 miembros de la familia Kir3 (Kir3.1 a Kir3.4) en mamíferos y un quinto miembro (Kir3.5) en oocitos de *Xenopus laevis* (Hedin y cols., 1996).

En el corazón humano, los canales que generan la  $I_{K,ACh}$  están formados por el ensamblaje de subunidades Kir3.1 y Kir3.4, que forman una estructura tetrámerica siguiendo una estequiometría 2:2 (Dascal y cols., 1993; Krapivinsky y cols., 1995; Yamada y cols., 1998), mientras que la presencia de Kir3.2 y Kir3.3 es mínima o incluso nula (Wickman y cols., 1998). Se ha postulado que la subunidad Kir3.1 requiere de la presencia de la subunidad Kir3.4 para translocarse a la membrana celular y que se forme así el canal funcional (Kennedy y cols., 1996; Yamada y cols., 1998). Las regiones N- y C-terminales de la subunidad Kir3.1 son las responsables de la unión del dímero G<sub>βγ</sub> al canal, aunque se ha propuesto que el extremo N-terminal de la subunidad Kir3.4 también participa en esta unión. La unión de la subunidad G<sub>α</sub> al canal parece estar mediada por el extremo N-terminal de Kir3.1 (Huang y cols., 1995; Tucker y cols., 1996) (Figura I.16B).

#### 2.3.2. Canales 4TM/2P

Los canales 4TM/2P (también llamados K<sub>2P</sub>) se ensamblan como dímeros y generan corrientes “de fondo” (*background*) en una gran variedad de tejidos, aunque en el tejido muscular sus niveles de expresión son muy bajos o incluso nulos (Lesage y Lazdunski, 2000).

Desde que se clonó el primer canal de esta familia, el canal TASK-1 (Lesage y cols., 1996), se han clonado un gran número de estos canales que se clasifican en diferentes familias basándose en sus características farmacológicas y funcionales (Lesage y Lazdunski, 2000). A nivel cardíaco se han identificado 5 familias:

- Los canales TWIK (*Tandem of P domains in Weak Inward rectifier K<sup>+</sup> channels*), que presentan una pequeña rectificación interna.
- Los canales TREK/TRAAK (*TWIK-RElated K<sup>+</sup> channels* y *TWIK-Related Arachidonic Acid-stimulated K<sup>+</sup> channels*), que son activados por ácidos grasos poliinsaturados y por la distensión de la membrana (*stretch*).
- Los canales TASK (*TWIK-related Acid-Sensitive K<sup>+</sup> channels*), que son sensibles a la acidosis.
- Los canales TALK (*TWIK-related ALkalosis-activated K<sup>+</sup> channels*), que son sensibles a la alcalosis.
- Los canales THIK (*Tandem pore domain Halothane Inhibited K<sup>+</sup> channels*), que son inhibidos por halotano.

Posteriormente, se adoptó una nueva nomenclatura para nombrar estos canales ( $K_{2P,x,y}$ ) y los genes que los codifican (KCNK1 a KCNK17) (Tabla I.7).

Los canales  $K_{2P}$  poseen una región central muy conservada (segmentos TM1 a TM4) y una gran diversidad en los extremos C- y N-terminales intracelulares (Figura I.10B). En estos canales se conserva la secuencia G(Y/F)G en el primer poro, aunque en el segundo poro es reemplazada por la secuencia G(F/L)G. El hecho de que los canales  $K_{2P}$  estén abiertos de forma casi continua sugiere su posible implicación en la regulación del  $E_m$  y de la excitabilidad celular (Lesage y Lazdunski, 2000; Patel y Honoré, 2001; O'Connell y cols., 2002).

Familia	Canal	Gen	Cromosoma	Localización
<b>TWIK</b>	K <sub>2p</sub> 1.1 (TWIK-1)	KCNK1	1q42	SNC, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, páncreas
	K <sub>2p</sub> 6.1 (TWIK-2)	KCNK6	19q11	SNC, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, páncreas, leucocitos
	K <sub>2p</sub> 7.1 (TWIK-3)	KCNK7	11q12	SNC, ME, corazón, pulmón, hígado, placenta, páncreas
	K <sub>2p</sub> 8.1 (TWIK-4)	KCNK8	11q12	
<b>TREK/ TRAAK</b>	K <sub>2p</sub> 2.1 (TREK-1)	KCNK2	1q41	SNC, corazón, placenta, pulmón, riñón
	K <sub>2p</sub> 10.1 (TREK-2)	KCNK10	14q32	SNC, páncreas, bazo, testículos
	K <sub>2p</sub> 4.1 (TRAAK)	KCNK4	11q12	SNC, ME, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, bazo, testículos, retina
<b>TASK</b>	K <sub>2p</sub> 3.1 (TASK-1)	KCNK3	2p24	SNC, ME, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, testículos, bazo, retina, intestino, piel, útero
	K <sub>2p</sub> 5.1 (TASK-2)	KCNK5	6p21.1	SNC, ME, corazón, hígado, pulmón, riñón, páncreas, intestino, útero
	K <sub>2p</sub> 9.1 (TASK-3)	KCNK9	8q24.3	SNC, corazón, hígado, pulmón, placenta, páncreas, testículos, leucocitos
	K <sub>2p</sub> 14.1 (TASK-4)	KCNK14		
	K <sub>2p</sub> 15.1 (TASK-5/KT3.3)	KCNK15	20q12	SNC, ME, placenta, testículos, páncreas
<b>TALK</b>	K <sub>2p</sub> 16.1 (TALK-1)	KCNK16	6p21	Páncreas
	K <sub>2p</sub> 17.1 (TALK-2)	KCNK17	6p21	SNC, corazón, placenta, pulmón, hígado, páncreas, testículos, ovario, leucocitos
<b>THIK</b>	K <sub>2p</sub> 13.1 (THIK-1)	KCNK13	14q32	SNC, ME, corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, testículos
	K <sub>2p</sub> 12.1 (THIK-2)	KCNK12	2p21	SNC, ME, corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, testículos

**Tabla I.7. Familias de canales de K<sup>+</sup> 4TM/2P.** ME: Músculo esquelético. SNC: Sistema nervioso central. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

### 2.3.3. Canales 6TM/1P

Los canales 6TM/1P agrupan a los canales de K<sup>+</sup> activados por voltaje (canales K<sub>v</sub>) y a los canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> (canales K<sub>Ca</sub>).

Tras el clonaje del canal *Shaker* (Jan y cols., 1983) se identificaron otras tres subfamilias de genes que codifican la expresión de un gran número de canales K<sub>v</sub> a las que se denominó *Shab*, *Shaw* y *Shal*. En mamíferos, estas cuatro familias se corresponden con las familias K<sub>v</sub>1 (*Shaker*), K<sub>v</sub>2 (*Shab*), K<sub>v</sub>3 (*Shaw*) y K<sub>v</sub>4 (*Shal*). Hasta la fecha, se han descrito doce familias de subunidades α K<sub>v</sub> (K<sub>v</sub>1 a K<sub>v</sub>12), con una homología aminoacídica de ≈70% dentro de una misma familia y de ≈40% entre diferentes familias (Tabla I.8) (Gutman y cols., 2005).

Además, la diversidad funcional de los canales Kv se ve aumentada por factores como: a) la formación de heterotetrámeros (Christie y cols., 1990; Ruppersberg y cols., 1990; Covarrubias y cols., 1991; MacKinnon, 1991); b) la presencia de miembros de las familias Kv5, Kv6, Kv8 y Kv9, que no forman canales funcionales por sí solos sino que son subunidades moduladoras que se ensamblan con subunidades Kv2 formando heterotetrámeros (Gutman y cols., 2005); c) la presencia de proteínas auxiliares, que modifican la función y/o la expresión en la membrana de los canales Kv (Gutman y cols., 2005); d) modificaciones postranscripcionales (*splicing* alternativo), que dan lugar a diferentes isoformas de los canales a partir de la expresión de un mismo gen (London y cols., 1997); y e) modificaciones postraduccionales, que regulan la función de muchos canales Kv mediante fosforilación, ubiquitinización, palmitoilización, nitrosilación, etc.

Familia	IUPHAR	Gen	Cromosoma	Localización
<b>Kv1 (<i>Shaker</i>)</b>	Kv1.1	KCNA1	12p13.3	Cerebro, corazón, retina, músculo esquelético, islotes pancreáticos
	Kv1.2	KCNA2	1p13	Cerebro, corazón, retina, músculo liso, islotes pancreáticos
	Kv1.3	KCNA3	1p13.3	Cerebro, pulmones, timo, hígado, nódulos linfáticos, testículos, linfocitos, fibroblastos, osteoclastos, plaquetas, islotes pancreáticos
	Kv1.4	KCNA4	11p14.3-15.2	Cerebro, músculo esquelético, corazón, islotes pancreáticos
	Kv1.5	KCNA5	12p13.3	Corazón, músculo liso, pituitaria, colon, riñón, estomago, aorta, arterias pulmonares, hipocampo
	Kv1.6	KCNA6	12p13.3	Cerebro, corazón, pulmones, testículos, músculo liso, arterias pulmonares, ovarios, astrocitos, oligodendrocitos
	Kv1.7	KCNA7	19q13.3	Corazón, músculo liso, placenta, arterias pulmonares
	Kv1.8	KCNA10	1p13.1	Riñón, cerebro, corazón, músculo esquelético, glándula adrenal
<b>Kv2 (<i>Shab</i>)</b>	Kv2.1	KCNB1	20q13.2	Cerebro, corazón, músculo esquelético, arterias pulmonares, pulmones, retina, cóclea
	Kv2.2	KCNB2	8q13.2	Cerebro, corazón, lengua, neuronas simpáticas, músculo liso
<b>Kv3 (<i>Shaw</i>)</b>	Kv3.1	KCNC1	11p15	Cerebro, pulmones, testículos, músculo esquelético
	Kv3.2	KCNC2	12q14.1	Cerebro, islotes pancreáticos, arterias mesentéricas
	Kv3.3	KCNC3	19q13.3-4	Cerebro, neuronas del SNC, arterias mesentéricas, córnea
	Kv3.4	KCNC4	1p21	Paratiroides, próstata, cerebro, células acinares pancreáticas
	Kv4.2	KCND2	7q31	Cerebro, corazón, cóclea
	Kv4.3	KCND3	1p13.3	Corazón, cerebro, músculo liso

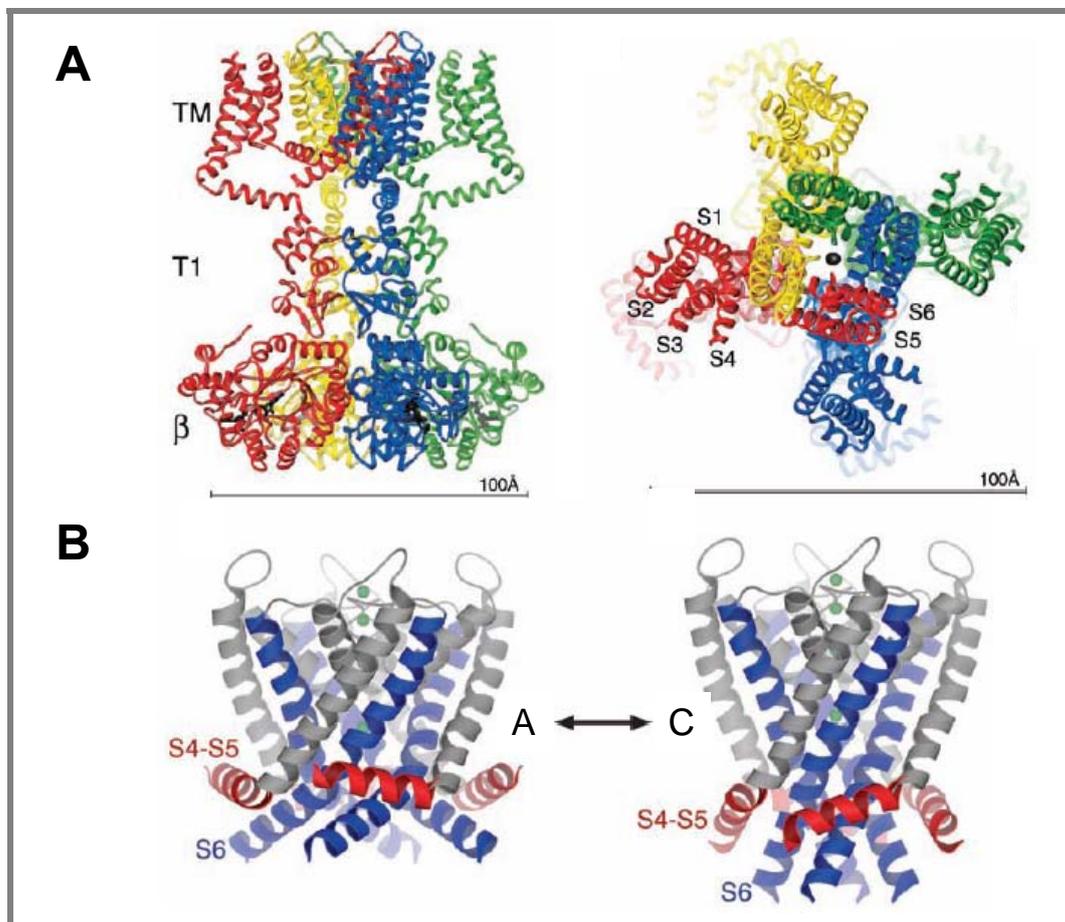
**Tabla I.8. Familias de canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje.** [Adaptada de Gutman y cols., 2005]

Familia	IUPHAR	Gen	Cromosoma	Localización
<b>Kv4 (Shal)</b>	Kv4.1	KCND1	Xp11.23	Cerebro, colon, corazón, pulmones, estómago, testículos, hígado, riñón, glándulas tiroideas, páncreas, arterias pulmonares
	Kv4.2	KCND2	7q31	Cerebro, corazón, cóclea
	Kv4.3	KCND3	1p13.3	Corazón, cerebro, músculo liso
<b>Kv5</b>	Kv5.1	KCNF1	2p25	Cerebro, corazón, músculo esquelético, hígado, riñón, páncreas
<b>Kv6</b>	Kv6.1	KCNG1	20q13	Cerebro, músculo esquelético, útero, ovarios, riñón, páncreas, piel, hueso, placenta, próstata, testículos
	Kv6.2	KCNG2	18q22-23	Corazón, cerebro
	Kv6.3	KCNG3	2p21	Cerebro, testículos, intestino, glándula adrenal, timo, pituitaria
	Kv6.4	KCNG4	16q24.1	Corazón, hígado, intestino, colon
<b>Kv7 (KvLQT)</b>	Kv7.1	KCNQ1	11p15.5	Corazón, riñón, recto, cóclea, páncreas, pulmones, placenta
	Kv7.2	KCNQ2	20q13.3	Cerebro, pulmones, testículos, corazón, ojo, placenta, intestino
	Kv7.3	KCNQ3	8q24	Cerebro, testículos, retina, colon
	Kv7.4	KCNQ4	1p34	Cóclea, placenta
	Kv7.5	KCNQ5	6q14	Cerebro, músculo esquelético
<b>Kv8</b>	Kv8.1	KCNV1	8q22.3-24.1	Cerebro, riñón
	Kv8.2	KCNV2	9p24.2	Pulmones, hígado, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículos, colon, ovarios
<b>Kv9</b>	Kv9.1	KCNS1	20q12	Cerebro, melanocitos
	Kv9.2	KCNS2	8q22	Cerebro, retina
	Kv9.3	KCNS3	2p24	Cerebro, colon, corazón, estómago, riñón, pulmones, testículos, piel, útero
<b>Kv10 (eag)</b>	Kv10.1	KCNH1	1q32-41	Cerebro, células tumorales
	Kv10.2	KCNH5	14q23.1	Cerebro
<b>Kv11 (erg)</b>	Kv11.1	KCNH2	7q35-36	Corazón, cerebro, células sanguíneas y tumorales, riñón, pulmón, hígado, ovarios, páncreas, testículos, próstata, intestino, útero
	Kv11.2	KCNH6	17q23.3	Cerebro, útero
	Kv11.3	KCNH7	2q24.2	Cerebro
<b>Kv12 (elk)</b>	Kv12.1	KCNH8	3p24.3	Cerebro, ganglios simpáticos, pulmones, útero, testículos, colon
	Kv12.2	KCNH3	12q13	Cerebro, pulmones
	Kv12.3	KCNH4	17q21.2	Cerebro, cerebelo, esófago, pulmones, glándula pituitaria

**Tabla I.8 (Continuación). Familias de canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje.** [Adaptada de Gutman y cols., 2005]

## 2.3.3.a. Estructura de los canales Kv

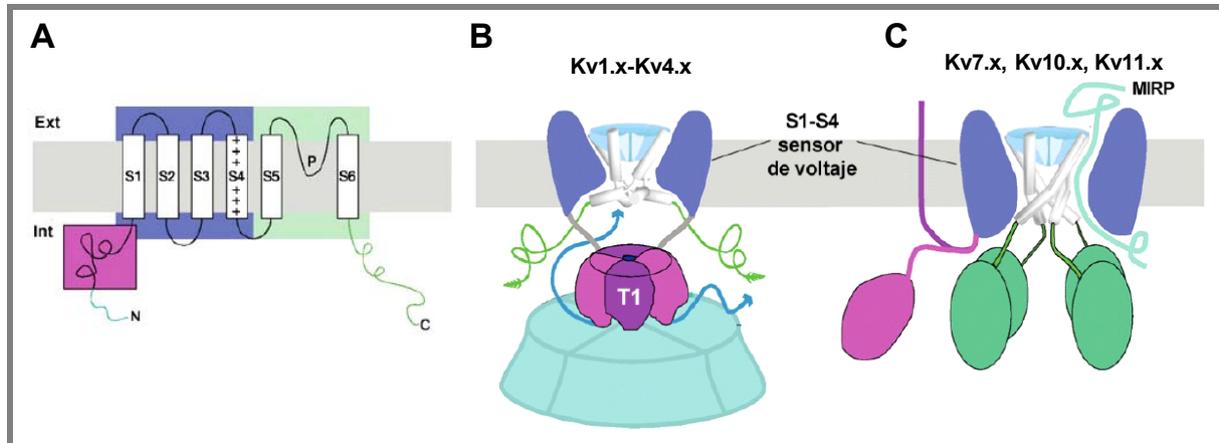
La primera estructura cristalográfica de un canal Kv de mamífero se resolvió en 2005. Era el canal formado por la subunidad  $\alpha$  Kv1.2 y la subunidad auxiliar Kv $\beta$ 2 de cerebro de rata (Long y cols., 2005a y b), que venía a confirmar los modelos que se habían propuesto anteriormente para los canales Kv tras la resolución de otros canales de  $K^+$  no dependientes de voltaje (Doyle y cols., 1998; Zhou y cols., 2001) y de canales Kv bacterianos (Sokolova y cols., 2001; Jiang y cols., 2003a y b). La estructura resuelta se correspondía con la de un canal tetramérico en estado abierto cuyas dimensiones eran de 135x95x95 Å, con un poro de  $\approx 12$  Å de diámetro (Figura I.17).



**Figura I.17. Estructura del complejo formado por la subunidad  $\alpha$  Kv1.2 y la subunidad auxiliar  $\beta_2$ .** (A) Vistas lateral (a la izquierda) y desde el lado extracelular (a la derecha) del complejo Kv1.2/Kv $\beta$ 2. (B) Modelo propuesto del canal Kv1.2, donde se observa la diferente posición del lazo S4-S5 en los estados abierto (a la izquierda) y cerrado (a la derecha). [Adaptadas de Long y cols., 2005a (A) y 2005b (B)]

Existen dos patrones fundamentales de organización estructural en la familia de canales Kv: los canales Kv1 a Kv4 presentan una estructura denominada T1 o “dominio NAB” en el extremo N-terminal que se ha demostrado fundamental para el reconocimiento entre

subunidades  $\alpha$  y responsable de la interacción con subunidades  $\beta$  y otras proteínas (Figura I.18B), mientras que los canales Kv7, Kv10 y Kv11 no presentan ese dominio T1 (Figura I.18C) (Shen y Pfaffinger, 1995; Xu y cols., 1995; Kreusch y cols., 1998; Yellen, 2002).



**Figura I.18. Estructura de la subunidad  $\alpha$  de los canales Kv.** (A) Esquema de la estructura de la subunidad  $\alpha$  de los canales Kv, donde se observan los 6 segmentos TM y los segmentos N- y C-terminales intracelulares. El recuadro rosa indica la posición del dominio T1. (B y C) Disposición estructural de los dominios intracelulares de los canales Kv1 a Kv4 (B) y de los canales Kv7, Kv10 y Kv11 (C). [Adaptadas de Yellen, 2002]

### I. La subunidad $\alpha$

En los canales Kv, cada subunidad  $\alpha$  consta de 6 segmentos TM (S1 a S6) con estructura de hélice  $\alpha$  y conectados entre sí por secuencias hidrofílicas no conservadas (Figuras I.10C y I.18A). Los S1 a S4 constituyen el sensor de voltaje y la secuencia que conecta el S5 y el S6 se denomina región P y forma parte del poro iónico (Liman y cols., 1991; MacKinnon, 1991; Yellen y cols., 1991; Yool y Schwarz, 1991).

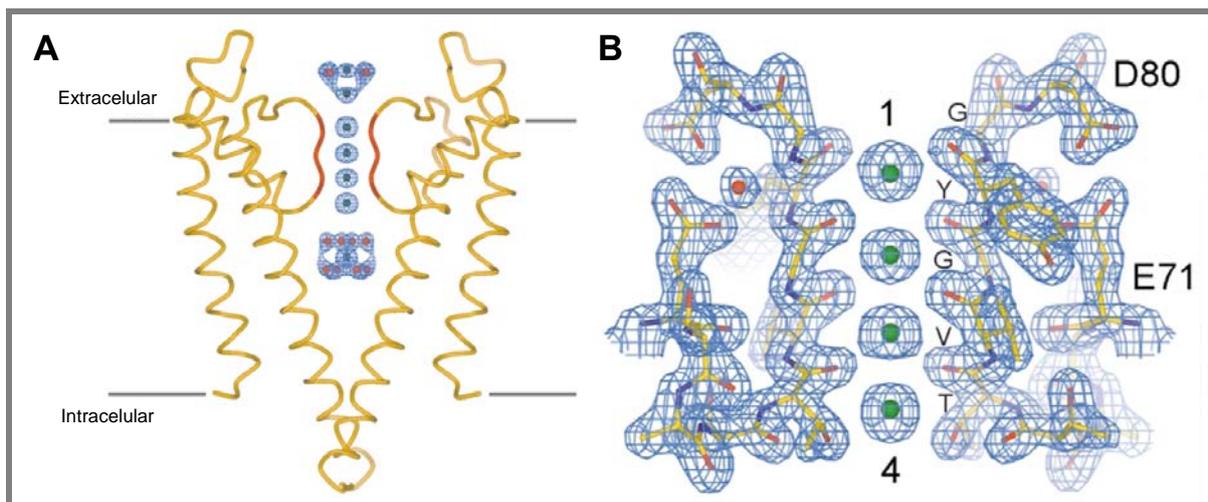
#### • Poro iónico y filtro de selectividad

Las cuatro subunidades  $\alpha$  que forman el canal se disponen de tal forma que la boca externa del poro está formada por el lazo P, mientras el segmento S6 y la región peptídica que une los segmentos S4 y S5 forman la boca interna del poro.

La región que une los segmentos S5 y S6 es el sitio de unión de muchas toxinas y el segmento de unión de S4-S5 forma parte del receptor para la partícula de inactivación (Isacoff y cols., 1991). Gracias a estudios de mutagénesis dirigida en canales, se ha podido demostrar que en el poro iónico se encuentran los lugares de unión para el tetraetilamonio (TEA) (Yellen y cols., 1991; Choi y cols., 1993), fármacos antiarrítmicos como la quinidina (Yeola y cols.,

1996), o anestésicos locales como la bupivacaína (Valenzuela y cols., 1995; Franqueza y cols., 1997) y la benzocaína (Caballero y cols., 2002).

El radio de un átomo de  $K^+$  es de 1.33 Å, mientras que el de un átomo de  $Na^+$  es de 0.95 Å. Pese a esta pequeña diferencia en el radio atómico, los canales de  $K^+$  son capaces de discriminar entre ambos iones con una selectividad superior a 1000 veces para el  $K^+$ , con una velocidad de conducción  $\approx 10^8$  iones/s. El filtro de selectividad del canal se encuentra en una región del lazo P formada por los aminoácidos (T/S)xxTxGYG, denominada “secuencia de selectividad del  $K^+$ ” y que está altamente conservada en todos los canales de  $K^+$  (MacKinnon y Yellen, 1990; Heginbotham y cols., 1994). A excepción de los aminoácidos que forman el filtro de selectividad, los aminoácidos que constituyen las paredes del canal son hidrófobos, minimizándose así la interacción electrostática del  $K^+$  con el canal y creándose una ruta de baja resistencia desde el citoplasma hasta el filtro de selectividad que permite que el ion  $K^+$  hidratado pase fácilmente desde la solución intracelular hasta la cavidad central, donde alcanza una elevada concentración ( $\approx 2$  M) (Zhou y cols., 2001).



**Figura I.19. Representación esquemática del filtro de selectividad de los canales de  $K^+$ .** (A) Representación esquemática de dos de las subunidades que forman el canal *KcsA* en una vista lateral, con la región que forma el filtro de selectividad señalada en rojo. Los sitios de unión de los iones  $K^+$  se representan como esferas verdes y las moléculas de agua como esferas rojas. (B) Detalle de la secuencia del filtro de selectividad del canal *KcsA*, donde se representan como esferas verdes los cuatro posibles ocupados por los iones  $K^+$ . [Adaptadas de Zhou y MacKinnon, 2003]

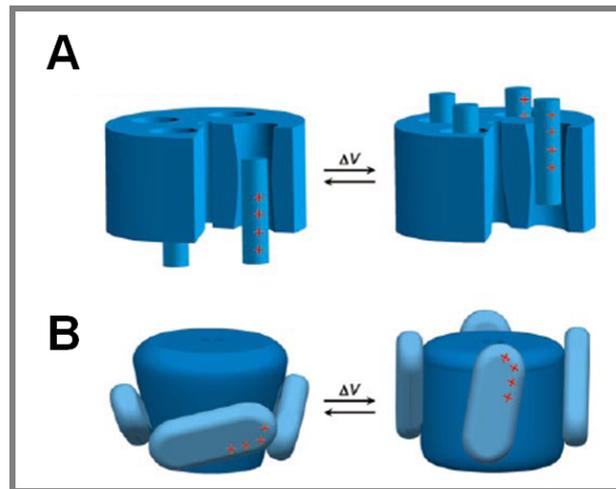
Una vez allí, el ion  $K^+$  ha de atravesar el estrecho paso que forma el filtro de selectividad y para ello ha de perder sus capas de hidratación. La entrada de un ion  $K^+$  en el filtro de selectividad crea un dipolo, de manera que un ion  $K^+$  dispone de cuatro sitios de unión a lo largo del filtro de selectividad, formados por los átomos de oxígeno de los carbonilos de los residuos TxGYG. Para compensar el coste energético que supone la deshidratación del ion al atravesar el filtro, los átomos de oxígeno hacen las veces de moléculas de agua de manera que

durante su paso a través del filtro de selectividad los iones  $K^+$  se encuentran rodeados de ocho átomos de oxígeno, en una disposición similar a la que adoptan las moléculas de agua que rodean a los iones de  $K^+$  en el medio acuoso (Figura I.19) (Roux y MacKinnon, 1999; MacKinnon, 2003).

El filtro de selectividad presenta una longitud de 12 Å, de manera que a lo largo del filtro normalmente se encuentran 2 iones  $K^+$  ( $\approx 2.7$  Å), separados por una molécula de agua, a una distancia de 3.5 Å (Morais-Cabral y cols., 2001; Zhou y MacKinnon, 2003). La presencia de un único ion  $K^+$  permitiría una fuerte interacción de éste con los aminoácidos del filtro, pero la entrada de un segundo ion produce una repulsión electrostática mutua, que compensa la atracción del filtro de selectividad y produce la salida del ion  $K^+$  hacia el espacio extracelular (Doyle y cols., 1998).

- Sensor de voltaje

La principal característica de los canales Kv consiste en que son capaces de detectar los cambios de voltaje producidos en la membrana y acoplar esta señal a su funcionamiento (Armstrong, 1974; Sigworth, 1994; Bezanilla, 2000 y 2002). La dependencia de voltaje de los canales de  $K^+$  se debe a la presencia en su estructura de un sensor de voltaje que está formado por los cuatro primeros segmentos del canal (S1-S4). El segmento S4 contiene cuatro o más residuos arginina y lisina, cada uno de los cuales separado por dos residuos hidrofóbicos, que se recolocan en la membrana cuando el  $E_m$  varía. Así, la apertura y cierre del canal generan un movimiento del sensor de voltaje de  $\approx 12-13 e_0$  a través del campo eléctrico transmembrana (Schoppa y cols., 1992; Hirschberg y cols., 1995), resultando en una corriente denominada “corriente de *gating*”, que puede ser medida experimentalmente (Armstrong y Bezanilla, 1973).



**Figura I.20. Modelos de movimiento del sensor de voltaje.** (A) Modelo convencional en el que el movimiento de cargas se realiza a través del núcleo proteico del canal mediante un movimiento de traslación y/o rotación del S4. (B) Modelo en el que el sensor de voltaje se encuentra sumergido en los lípidos de la membrana, produciendo el desplazamiento de cargas a través del campo eléctrico. [Adaptadas de Jiang y cols., 2003b]

Mutaciones en las que se neutralizan los aminoácidos cargados del S4 desplazan el valor del punto medio de la curva de activación del canal, lo que indica que el S4 juega un importante papel en el cambio conformacional que conlleva su apertura (Liman y cols., 1991; Papazian y cols., 1991).

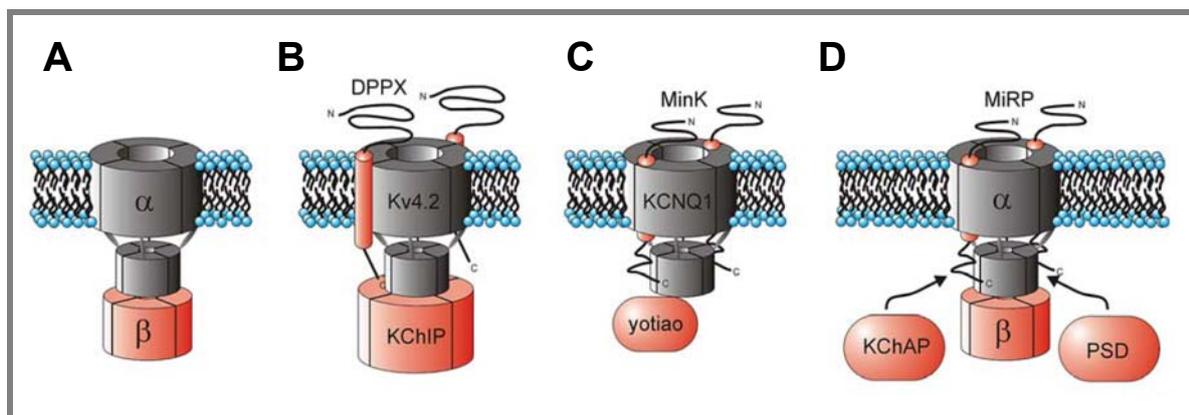
Dos son los principales modelos de movimiento del sensor propuestos: un modelo “de rotación”, con la exposición de determinados residuos del S4 en ranuras acuosas en las que el campo eléctrico está muy confinado (Figura I.20A), y un modelo “de inclinación” o “modelo de remo”, que implica grandes desplazamientos del sensor a través del campo transmembrana (Figura I.20B) (Jiang y cols., 2003b; Tombola y cols., 2005).

## II. Subunidades auxiliares

El ensamblaje de 4 subunidades  $\alpha$  es suficiente para formar un canal funcional que genere una corriente iónica. Sin embargo, la presencia de subunidades auxiliares aumenta la diversidad funcional de los canales Kv (Figura I.21 y Tabla I.9) y regula funciones como el *gating* y la expresión y/o el transporte a la membrana celular de los canales. Además, estas subunidades pueden servir como sitio de unión de moléculas adaptadoras o de ligandos exógenos/endógenos.

Familia	Subunidad	Gen	Cromosoma
<b>Kv<math>\beta</math></b>	Kv $\beta$ 1*	KCNAB1	3q25
	Kv $\beta$ 2*	KCNAB2	1p36.3
	Kv $\beta$ 3	KCNAB3	17p13
<b>minK y péptidos relacionados (KCNE)</b>	minK*	KCNE1	21q22
	MiRP1*	KCNE2	21q22
	MiRP2*	KCNE3	11q13
	MiRP3	KCNE4	2q36.3
	MiRP4*	KCNE5	Xq22
<b>KChAP</b>	KChAP*	PIAS3	1q12
<b>KChIP</b>	KChIP1	KCNIP1	5q35
	KChIP2*	KCNIP2	10q25
	KChIP3	KCNIP3	2q11.2-11.3
	KChIP4.2	CSEN	2q11.1
	KChIP4.3	KCNIP4	4p15.3
<b>DPP</b>	DPP6*	DPP6	7q36.2-36.3
	DPP10*	DPP10	2q14.1

**Tabla I.9. Principales subunidades auxiliares de los canales Kv.** \*Subunidades que se expresan en el miocardio. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]



**Figura I.21. Dibujo esquemático de diversas subunidades auxiliares de canales iónicos.** Las subunidades  $\alpha$  aparecen en gris y las subunidades  $\beta$  en rojo. (A) Ensamblaje de 4 subunidades  $\alpha$  Kv con 4 subunidades Kv $\beta$  citosólicas a través del extremo N-terminal. (B) Interacción del canal Kv4.2 con un complejo de 4 subunidades citoplásmicas KChIP. Se observa también la asociación de la subunidad DPPX con la subunidad  $\alpha$ . (C) Asociación de 4 subunidades Kv7.1 con 2 subunidades minK, así como la formación del complejo macromolecular con la proteína adaptadora yotiao. (D) Complejo molecular formado por una subunidad  $\alpha$  Kv, las subunidades auxiliares Kv $\beta$ , MiRP y KChAP y una proteína de densidad pos-sináptica (PSD). [Adaptadas de McCrossan y Abbott, 2004]

- Subunidades Kv $\beta$

La familia de las subunidades Kv $\beta$  está compuesta por tres proteínas homólogas (Kv $\beta$ 1 a Kv $\beta$ 3), así como varias isoformas de alguna de ellas (Wang y cols., 1996; Martens y cols., 1999). Estas proteínas poseen una simetría 4x muy similar a la de las enzimas óxido reductasa,

por lo que se ha sugerido que podrían actuar como sensores redox del canal (Bähring y cols., 2001). Las subunidades Kv $\beta$  son proteínas citosólicas que se ensamblan a la subunidad  $\alpha$  por el extremo N-terminal y su principal efecto es inducir una rápida inactivación de la corriente (especialmente las Kv $\beta$ 1), aunque también se ha descrito una función tipo chaperona que podría promover o estabilizar la expresión de los canales en la membrana (Figuras I.21A y D) (Nakahira y cols., 1996; Martens y cols., 1999; Wissmann y cols., 1999). Aunque las proteínas Kv $\beta$  se identificaron inicialmente como subunidades reguladoras de los canales Kv1, actualmente se piensa que participan también en la regulación de canales de las subunidades  $\alpha$  Kv2 y Kv4 (Yang y cols., 2001; Aimond y cols., 2005).

- Subunidad minK y péptidos relacionados

Hasta la fecha se han descrito 5 proteínas codificadas por genes de la familia KCNE (KCNE1 a KCNE5). Todas ellas presentan un único segmento TM, un dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal intracelular (McCrossan y Abbott, 2004; Bendahhou y cols., 2005).

La proteína minK (*minimal K<sup>+</sup> channel subunit*) fue la primera en ser identificada (Takumi y cols., 1988; Murai y cols., 1989). Su presencia en el corazón es predominantemente ventricular (Folander y cols., 1990) y su asociación con la subunidad  $\alpha$  Kv7.1 genera la  $I_{Ks}$  (Figura I.21C) (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). También se ha descrito que puede interaccionar con las subunidades  $\alpha$  Kv11.1 y Kv4.3. Además, mutaciones en el gen que codifica la subunidad minK producen una disminución de la  $I_{Ks}$  que se relaciona con la aparición de SQT5 (Splawski y cols., 2000). Las siguientes subunidades auxiliares codificadas por genes KCNE se identificaron por homología con minK y se denominaron MiRP (*MinK-Related Peptides*) (Figura I.21D) (Abbott y cols., 1999; McCrossan y Abbott, 2004). Se ha demostrado la presencia de MiRP1, MiRP2 y MiRP3 en tejido miocárdico humano, donde se ha sugerido que podrían ensamblarse con las subunidades  $\alpha$  Kv11.1, Kv7.1, Kv4.2 y Kv4.3 (Abbott y cols., 1999; Finley y cols., 2002; McCrossan y Abbott, 2004; Radicke y cols., 2006; Delpón y cols., 2008). Además, mutaciones en el gen que codifica la subunidad MiRP1 se han relacionado con la aparición de SQT6 (Abbott y cols., 1999) y de FA (Zhang y cols., 2005), mutaciones en el gen que codifica la subunidad MiRP2 se han relacionado con la aparición de FA (Zhang y cols., 2005) y síndrome de Brugada (Delpón y cols., 2008), y mutaciones en el gen que codifica la

subunidad MiRP4 se han relacionado con la aparición de Síndrome de Brugada y fibrilación ventricular (FV) (Ohno y cols., 2011).

- Subunidad KChAP

La subunidad KChAP (*K<sup>+</sup> Channel Associated Protein*) pertenece a la familia de proteínas inhibidoras del STAT activado (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) (Wible y cols., 1998). Estas proteínas interactúan con una gran variedad de factores de transcripción e intervienen en procesos como la apoptosis (Wible y cols., 2002). La subunidad KChAP es una proteína citoplásmica que puede unirse al extremo N-terminal de las subunidades  $\alpha$  Kv1, Kv2 y Kv4 (Figura I.21D) (Wible y cols., 1998; Kuryshev y cols., 2000).

- Subunidades KChIP

Las subunidades auxiliares KChIP (*Kv Channel Interacting Protein*) son proteínas citosólicas relacionadas con la familia de sensores neuronales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se han identificado cuatro subunidades KChIP (KChIP1 a KChIP4) y diversas isoformas de varias de ellas. Estas subunidades se unen al extremo N-terminal de las subunidades  $\alpha$  con una estequiometría 1:1 (Figura I.21B) (Kim y cols., 2004b). La mayoría de las proteínas KChIP modifican la actividad del canal afectando a la cinética de inactivación y/o de recuperación de la inactivación (An y cols., 2000; Decher y cols., 2001; Patel y cols., 2002; Wang y cols., 2007). Su distribución es heterogénea, siendo las isoformas KChIP2a, KChIP2b y KChIP2c las predominantes en el corazón (An y cols., 2000; Ohya y cols., 2001; Patel y cols., 2002; Decher y cols., 2004), donde se unen a las subunidades  $\alpha$  Kv4.2 y Kv4.3 para regular su expresión en membrana y modular las propiedades cinéticas de la  $I_{to1}$  (An y cols., 2000).

- Subunidades DPPX

Las proteínas dipeptidilpeptidasas (DPP) pertenecen a la familia de serín-proteasas no clásicas y son glicoproteínas de membrana con un largo extremo C-terminal extracelular (Wada y cols., 1992). El primer miembro identificado de esta familia fue la proteína DPP6 (Figura I.21B), del que se ha sugerido que tiene como función regular la cinética y el tráfico a la membrana de los canales Kv4 (Kin y cols., 2001; Nadal y cols., 2003), con los que interacciona siguiendo una estequiometría 1:1 (Soh y Goldstein, 2008). En neuronas, se ha propuesto que la corriente transitoria de  $\text{K}^+$  ( $I_A$ ) estaría formada por un complejo ternario 4:4:4 formado por subunidades  $\alpha$  Kv4 y subunidades auxiliares DPP6 y KChIP (Maffie y

Rudy, 2008). Su presencia en el miocardio humano permite aventurar la formación de dicho complejo también en el corazón para generar la  $I_{to1}$  (Radicke y cols., 2005). Además, se ha demostrado que otro miembro de esta familia, la proteína DPP10, interacciona con los canales Kv4 en neuronas (Jerng y cols., 2004; Li y cols., 2006a), por lo que su presencia en el miocardio sugiere que podría formar parte de los canales que generan la  $I_{to1}$  (Radicke y cols., 2007).

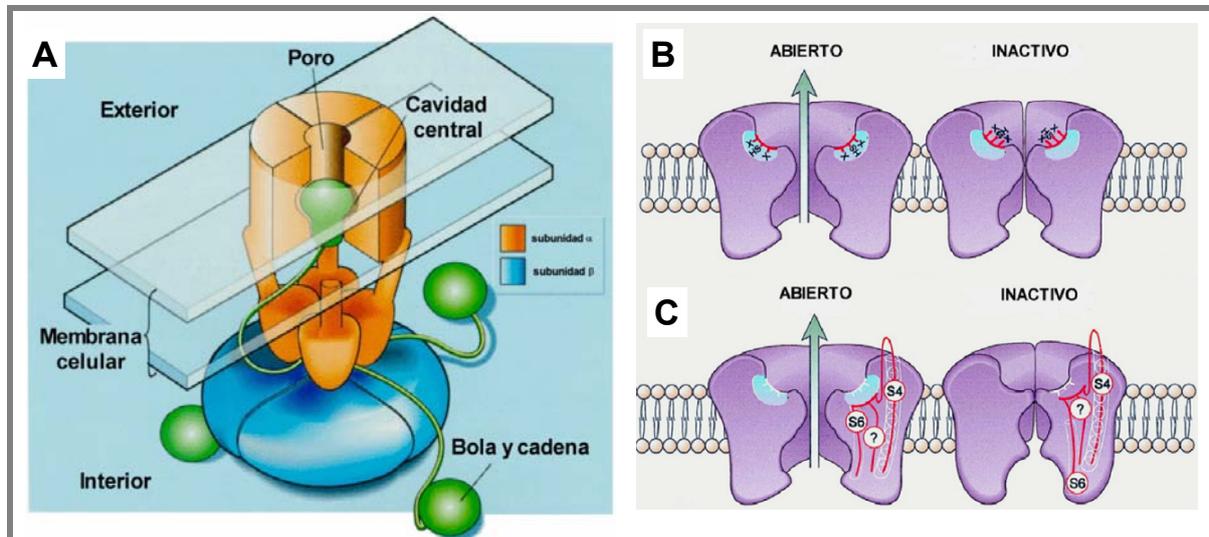
### 2.3.3.b. La inactivación de los canales Kv

El estado inactivo es un estado no conductor que la mayoría de los canales Kv alcanzan tras su activación, aunque puede alcanzarse desde el estado cerrado o sin que el canal se abra (Rasmusson y cols., 1998; Kurata y Fedida, 2006). Tanto la inactivación como la recuperación de la misma son fundamentales para determinar la contribución de cada una de las corrientes de  $K^+$  a la repolarización cardíaca. Sin embargo, no existe un único mecanismo responsable de la inactivación, sino que es un proceso que presenta propiedades diferentes dependiendo del canal estudiado.

La **inactivación tipo-N** se conoce como “modelo de la bola y la cadena”, ya que una secuencia de aproximadamente 20 aminoácidos del extremo N-terminal (bola), que se encuentra unida al canal a través del dominio formado por el resto de aminoácidos hasta el segmento S1 (cadena), ocluye el poro intracelular del canal e impide el paso de los iones (Figura I.22A) (Zagotta y cols., 1990; Isacoff y cols., 1991; MacKinnon y cols., 1993; Gómez-Lagunas y Armstrong, 1995; Lee y cols., 1996). Este mecanismo es un proceso de inactivación muy rápido (1-10 ms), por lo que también se conoce como “inactivación rápida” y se produce en canales de la familia *Shaker* (Kv1.1 y Kv1.4), *Shal* (Kv4.2 y Kv4.3) y *Shaw* (Kv3.1-3.4) (Coetzee y cols., 1999).

Se ha determinado que existen alrededor de 10 aminoácidos hidrofóbicos seguidos de una serie de aminoácidos con una carga neta positiva que determinan la inactivación tipo-N. Gracias a estos datos se ha postulado que los residuos hidrofóbicos del dominio de inactivación pueden interactuar directamente con regiones hidrofóbicas del canal, probablemente en la región que une los segmentos S4 y S5 (Isacoff y cols., 1991). Pero no siempre la inactivación tipo-N se produce a través de la secuencia descrita, ya que existen subunidades reguladoras, como las subunidades  $\beta$ , que pueden interaccionar con canales, como en el caso del canal Kv1.1, dando lugar a la inactivación tipo-N de los mismos (MacKinnon y cols., 1993; Rettig y cols., 1994).

Una importante característica de este tipo de inactivación es su sensibilidad al bloqueo por TEA y por pancuronio, sólo cuando son aplicados en la cara intracelular del poro (Choi y cols., 1991).



**Figura I.22. Modelos de inactivación de los canales Kv.** (A) Modelo de “la bola y la cadena”. (B-C) Modelo de inactivación tipo-C: cambios conformacionales en la boca externa del poro asociados a la inactivación tipo-C (B) y cambios conformacionales adicionales que tienen lugar durante este tipo de inactivación (C), asociados fundamentalmente al S6. [Adaptadas de Aldrich, 2001 (A) y Rasmusson y cols., 1998 (B-C)]

La eliminación de la inactivación rápida tipo-N dejó en evidencia la presencia de un proceso inactivante lento al que se denominó **inactivación tipo-C**, puesto que inicialmente se pensó que dependía específicamente del extremo C-terminal del canal (Figuras I.22B y C) (Choi y cols., 1991; Hoshi y cols., 1991). Posteriormente se ha demostrado que esta inactivación depende de cambios conformacionales en la boca externa del poro que implican también la participación del filtro de selectividad (López-Barneo y cols., 1993; Rasmusson y cols., 1998). La inactivación tipo-C se diferencia de la tipo-N en que es un mecanismo en el que las cuatro subunidades del canal actúan de manera cooperativa, mientras que los dominios inactivantes tipo-N actúan independientemente (Ogielska y cols., 1995; Panyi y cols., 1995). La inactivación tipo-C, al igual que la inactivación tipo-N, es independiente de voltaje a potenciales a los que la activación es completa, lo que sugiere que están acopladas a la activación. (Hoshi y cols., 1990; Rasmusson y cols., 1995). Además, la recuperación de ambos tipos de inactivación es voltaje dependiente, debido al descenso del segmento S4 (Rasmusson y cols., 1995) de manera similar al mecanismo propuesto para el modelo de “bola y cadena” (Rasmusson y cols., 1995).

Sin embargo, la inactivación tipo-C se puede diferenciar fácilmente de la tipo-N ya que no es sensible a la perfusión intracelular con TEA (Hoshi y cols., 1991; López-Barneo y cols.,

1993) y es sensible a la concentración y naturaleza del catión permeable en el medio extracelular (MacKinnon y Yellen, 1990). La cinética de la inactivación tipo-C se retrasa al aumentar la  $[K^+]_e$ , debido a la interacción del  $K^+$  con un sitio de alta afinidad situado en la cara externa del poro iónico del canal, que impide que se produzca el cierre de la boca del canal, retrasando la inactivación (López-Barneo y cols., 1993). Este mecanismo se conoce como “pie en la puerta”.

### 2.3.3.c. Principales corrientes generadas a través de canales Kv que intervienen en el PA cardíaco

Gracias a estudios realizados con la técnica de *patch-clamp* en miocitos auriculares y ventriculares, se han identificado al menos 4 corrientes de  $K^+$  generadas a través de canales Kv implicadas en el PA cardíaco: la  $I_{to1}$ , la  $I_{Kur}$ , la  $I_{Kr}$  y la  $I_{Ks}$ .

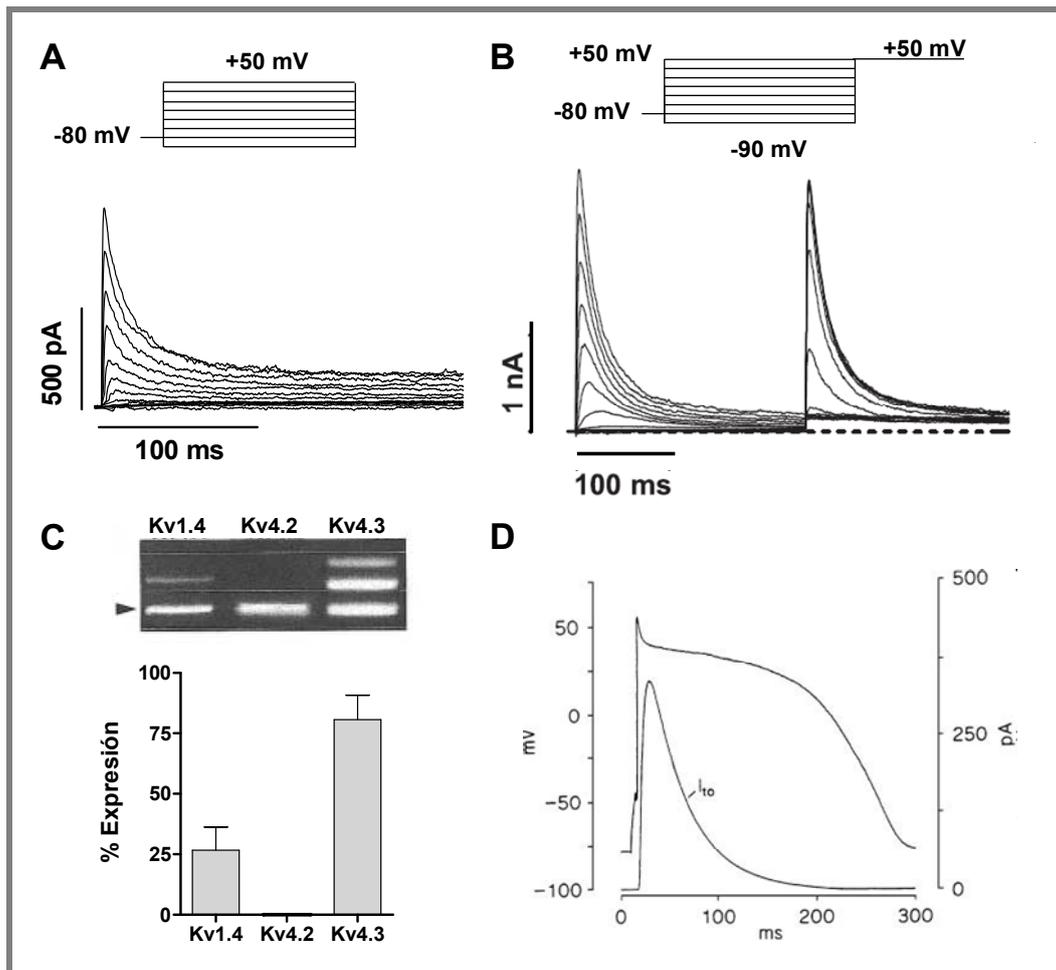
#### I. La $I_{to}$

La corriente transitoria de salida de  $K^+$  fue descrita por primera vez en fibras de Purkinje de oveja, donde su actividad era evidente en la primera fase de repolarización del PA (Dudel, 1967; Fozzard 1973). Al principio se pensó que era una corriente debida a la entrada de  $Cl^-$ , aunque más tarde se describió que está formada en realidad por dos componentes bien diferenciados, la  $I_{to1}$  y la  $I_{to2}$ , donde sólo la  $I_{to1}$  es una corriente de  $K^+$ , sensible a 4-aminopiridina (4-AP) e independiente de  $Ca^{2+}$ , mientras que la  $I_{to2}$  es una corriente de  $Cl^-$  activada por  $Ca^{2+}$  y de menor magnitud que la  $I_{to1}$  (Siegelbaum y cols., 1977; Kenyon y Gibbons, 1979; Coraboeuf y Carmeliet, 1982; Hiraoka y Kawano, 1989). La  $I_{to1}$  es responsable de la rápida repolarización del PA durante la fase 1, por lo que determina la altura y la duración de la fase de meseta (Nerbonne, 2000; Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004b; Niwa y Nerbonne, 2010).

#### I.a. Características de la $I_{to1}$

La  $I_{to1}$  se activa (alcanza su máxima amplitud en 5-20 ms) e inactiva muy rápidamente en respuesta a una despolarización (Figura I.23), siendo su reactivación también muy rápida ( $\approx 50$  ms) (Litovsky y Antzelevitch, 1988; Fermi y cols., 1992).

La amplitud de la  $I_{to1}$  es dependiente de la frecuencia cardíaca, por lo que su papel en el control de la DPA es más importante a frecuencias cardíacas lentas. Además, en las células en las que coexiste con las corrientes de  $K^+$  rectificadoras tardías, la inhibición de la  $I_{to1}$  desplaza la fase 2 del PA hacia valores más positivos, lo que acelera la inactivación de la  $I_{Ca,L}$  y la activación de las corrientes de salida de  $K^+$ , dando como resultado un acortamiento de la DPA (Fermini y cols., 1992; Carmeliet, 1993; Courtemanche y cols., 1999; Burashnikov y cols., 2004).

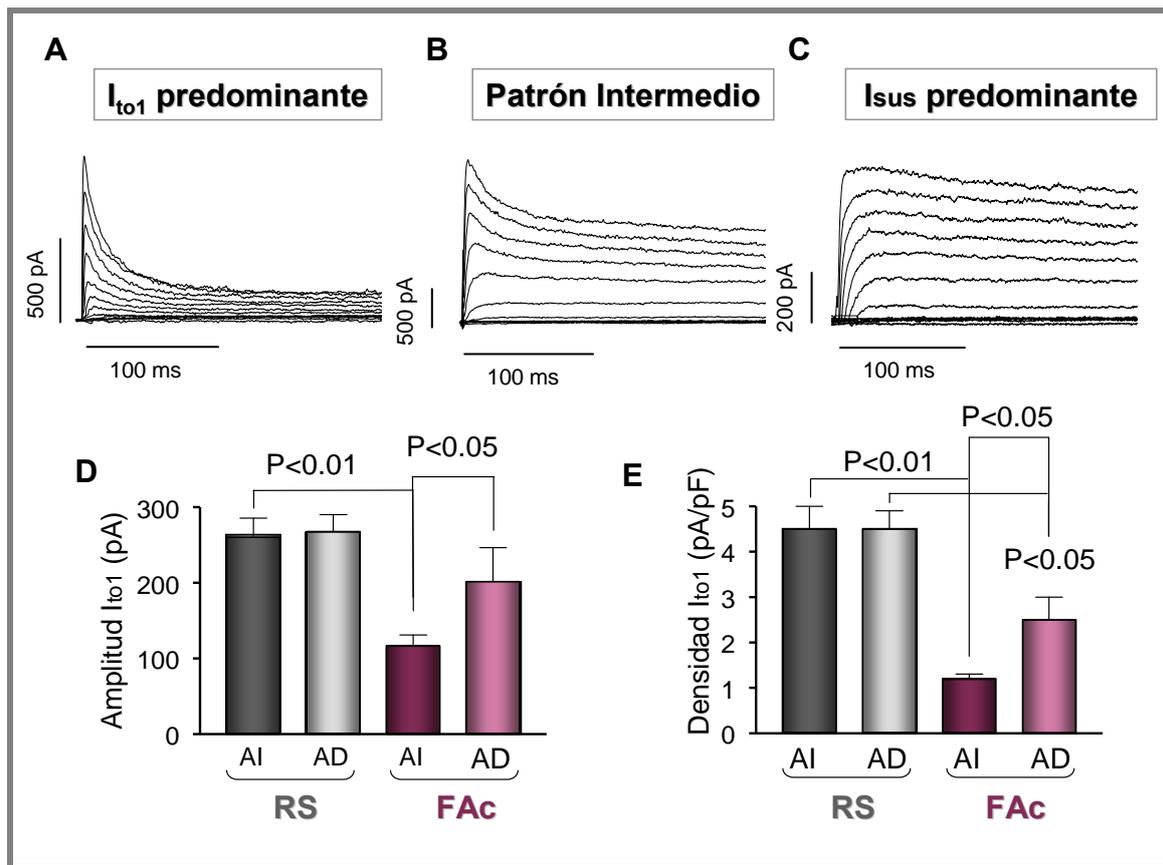


**Figura I.23. Características de la  $I_{to1}$ .** (A)  $I_{to1}$  registrada en miocitos auriculares humanos en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. (B) Corriente generada por canales Kv4.3-KChIP2a registrada en células CHO en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. (C) Detección por PCR de los distintos tipos de canales que generan la  $I_{to1}$  auricular humana (panel superior) y representación de la expresión relativa de su ARNm (panel inferior). En el panel superior, la flecha corresponde a la banda de control interno. (D) Representación teórica del comportamiento de la  $I_{to1}$  durante el PA ventricular [Adaptadas de Caballero y cols., 2010a (A), Caballero y cols., 2004a (B), Bertaso y cols., 2002 (C), Patel y Campbell, 2005 (D)]

Se ha registrado la  $I_{to1}$  en miocitos cardiacos de diferentes especies animales como la rata (Josephson y cols., 1984; Boyle y Nerbonne, 1992), el ratón (Benndorf y cols., 1987), el conejo (Clark y cols., 1988; Giles e Imaizumi, 1988), el perro (Tseng y Hoffman, 1989), el

gato (Furukawa y cols., 1990) o el hurón (Campbell y cols., 1993a y 1993b), además de en miocitos humanos (Escande y cols., 1987; Beuckelmann y cols., 1993; Näbauer y cols., 1993; Varro y cols., 1993; Wettwer y cols., 1993; Caballero y cols., 2010a; de la Fuente y cols., 2012). En el miocardio humano, la densidad de la  $I_{to1}$  es  $\approx 6$  veces mayor en el tejido auricular y en las fibras de Purkinje que en el ventrículo, mientras que dentro de éste, la  $I_{to1}$  presenta un gradiente transmural de expresión (epicardio > células M > endocardio, siendo  $\approx 3-4$  veces mayor en el epicardio que en el endocardio) (Wettwer y cols., 1994; Näbauer y cols. 1996; Li y cols., 1998). Recientemente nuestro grupo ha demostrado que los miocitos humanos de AD y de aurícula izquierda (AI) de pacientes en RS son eléctricamente heterogéneos (Caballero y cols., 2010a). Aproximadamente el 35% de los miocitos de las muestras auriculares de pacientes en RS mostraron una corriente de salida de  $K^+$  compuesta por un componente de rápida activación e inactivación identificada como la  $I_{to1}$  (Figura I.24A). En el 20% de las células no existía  $I_{to1}$ , pero aparecía un componente de rápida activación y que no inactivaba, denominado corriente sostenida o  $I_{sus}$  que está formado en su mayor parte por  $I_{Kur}$  (más del 70%) (Figura I.24C). En el 45% de las células de la AI se detectó un patrón intermedio, es decir, las células mostaban tanto  $I_{to1}$  como  $I_{sus}$  (Figura I.24B). Esta heterogeneidad estaba acompañada también por diferencias en el tamaño celular (las células  $I_{to1}$  predominantes eran más pequeñas que las  $I_{sus}$  predominantes). Además, las diferencias en las corrientes repolarizantes se reflejaban en sus correspondientes PA, como ya se había demostrado en AD (Wang y cols., 1993). Es importante destacar que en RS, la distribución de los tres tipos celulares era idéntica en ambas aurículas (Caballero y cols., 2010a).

El remodelado eléctrico inducido por la FA crónica (FAC) afecta de forma profunda y diferenciada a las corrientes repolarizantes voltaje-dependientes en ambas aurículas. La presencia de FAC produce una disminución del porcentaje de células con patrón  $I_{to1}$  predominante en ambas aurículas, sin embargo, esa disminución estaba acompañada por un aumento del porcentaje de células con patrón intermedio en el caso de la AI, mientras que en la AD, el patrón celular aumentado era el  $I_{sus}$  predominante. Además, la presencia de FAC promovía una mayor disminución de la amplitud y de la densidad de la  $I_{to1}$  en la AI que en la AD, resultando en una mayor densidad de la  $I_{to1}$  en la AD (Figura I.24D y E). Por tanto, la FAC produjo un gradiente AD-AI en la densidad de la  $I_{to1}$ , inexistente en RS. Es decir, la FAC estaba aumentando la diferencia interauricular de la  $I_{to1}$  (Caballero y cols., 2010a).



**Figura I.24. Tipos celulares identificados en miocitos humanos auriculares y amplitud y densidad de la  $I_{to1}$  en tejido auricular de pacientes en RS y con FAc. (A-C) Familias de trazos registrados en tres células diferentes obtenidas de muestras de aurícula derecha (AD) y procedentes de un paciente en RS. Amplitud (D) y densidad (E) de la  $I_{to1}$  medidas a +30 mV en muestras de AD y de aurícula izquierda (AI) de pacientes en RS y con FAc. [Modificado de Caballero y cols., 2010a]**

### I.b. Composición de los canales que generan la $I_{to1}$

Existen dos fenotipos de corriente transitoria: una  $I_{to1}$  lenta ( $I_{to1,s}$ ) y una  $I_{to1}$  rápida ( $I_{to1,f}$ ). Ambos fenotipos se pueden distinguir en función de sus propiedades biofísicas, moleculares y farmacológicas (Tabla I.10) (Nerbonne y Kass, 2005). Además, se observa un patrón de expresión para los dos fenotipos según la región del miocardio que se estudia: la  $I_{to1,s}$  se expresa fundamentalmente en regiones que presentan una DPA más prolongada (endocardio, ventrículo izquierdo, septo y ápex), mientras que la  $I_{to1,f}$  se expresa mayoritariamente en aurícula (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004b; Niwa y Nerbonne, 2010).

Se han identificado tres subunidades  $\alpha$  como posibles responsables de los diferentes fenotipos de la  $I_{to1}$  (Kv1.4, Kv4.2 y Kv4.3), aunque las diferencias observadas entre la corriente generada por cada una de estas subunidades  $\alpha$  y las corrientes nativas sugieren la participación adicional de una o varias subunidades auxiliares (Tabla I.10).

### *I.b.1. Composición de la $I_{to1,s}$*

- Subunidad  $\alpha$

La subunidad  $\alpha$  Kv1.4 genera un corriente de rápida activación, con una cinética de inactivación biexponencial y una lenta recuperación de la inactivación (constante de tiempo  $\approx$  s). Además, presenta una acumulación de la inactivación tras aplicar pulsos repetidos a frecuencias altas, no es sensible a la toxina Heteropoda (HpTXs, aislada del veneno de la araña *Heteropoda venatoria*), ni a las *phrixotoxinas* (PaTXs, aislada del veneno de la tarántula *Phrixotrichus aurata*) y la 4-AP bloquea el estado abierto de este canal (Tseng-Crank y cols., 1990; Oudit y cols., 2001; Nerbonne y Kass, 2005). Debido a todas estas características (Tabla I.10), se cree que la corriente generada a través de los canales Kv1.4 es la responsable de la corriente nativa  $I_{to1,s}$  (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004b; Niwa y Nerbonne, 2009). De hecho, en miocitos ventriculares de ratones Kv1.4<sup>-/-</sup> se ha demostrado la pérdida del componente lento de la  $I_{to1}$ , pero no del componente rápido (London y cols. 1998).

- Subunidad reguladoras

Las corrientes generadas por los canales formados por 4 subunidades  $\alpha$  Kv1.4 reproducen casi todas las propiedades de la  $I_{to1,s}$  salvo la activación que se produce a potenciales mucho más negativos que la corriente nativa (Serôdio y cols., 1996). Debido a ello, se ha sugerido que alguna subunidad reguladora puede estar mediando en esta diferencia. Tal y como hemos mencionado las subunidades Kv $\beta$ 1 (Kv $\beta$ 1.2, Kv $\beta$ 1.3 y/o Kv $\beta$ 2) pueden interactuar con los canales Kv1.x pudiendo regular el canal (Morales y cols., 1995; Deal y cols., 1996). Así, la subunidad Kv $\beta$ 1.3 acelera tanto el componente rápido como el lento de la inactivación y retrasa la recuperación de la inactivación del canal Kv1.4 (Castellino y cols., 1995; Morales y cols., 1995).

### *I.b.2. Composición de la $I_{to1,f}$*

- Subunidades  $\alpha$

Las subunidades  $\alpha$  Kv4.2 y Kv4.3 generan una corriente que se activa rápidamente y que se inactiva siguiendo una cinética multiexponencial y que presenta una rápida recuperación de la inactivación, en un rango entre 10 y 100 ms, por lo que no presenta acumulación de la

inactivación. Esta corriente es sensible a HpTXs y a las PaTXs y, en este caso, la 4-AP bloquea el estado cerrado del canal. (Serôdio y cols., 1996, Nerbonne 2000; Oudit y cols., 2001; Nerbonne y Kass, 2005). Además, en miocitos ventriculares de ratones  $Kv4.2^{-/-}$  se ha visto que presentan una reducción significativa del componente rápido de la  $I_{to1}$  (Barry y cols., 1998; Wickenden y cols., 1999). Las subunidades  $\alpha$  Kv4.2 y Kv4.3 generan una corriente cuyas propiedades farmacológicas coinciden con las observadas en la  $I_{to1,f}$  nativa (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004b; Niwa y Nerbonne, 2010), pero no mimetiza las propiedades cinéticas de la corriente a través de estos canales. Así, aunque la recuperación de la inactivación de Kv4.2 y Kv4.3 es 10 veces más rápida que la de los canales Kv1.4 o la corriente nativa  $I_{to1,s}$ , ésta sigue siendo 5 veces más lenta que la de la  $I_{to1,f}$  (Patel y Campbell, 2005), lo que sugiere la participación de subunidades auxiliares.

$I_{to}$	Canal	$\tau_{Act}$ (ms)	$\tau_{Inact}$ (ms)	$\tau_{Rec}$ (ms)	Tejido	Acción 4-AP	Especie
$I_{to1,s}$	<b>Kv1.4</b>	2-10	80-200	1000-2000	V	Abierto	Cj, H, Hr, R, Rta
$I_{to1,f}$	<b>Kv4.3</b> <b>Kv4.2</b>	2-10	25-80	25-80	A, V, Purk	Cerrado	G, H, Hr, P, R, Rta

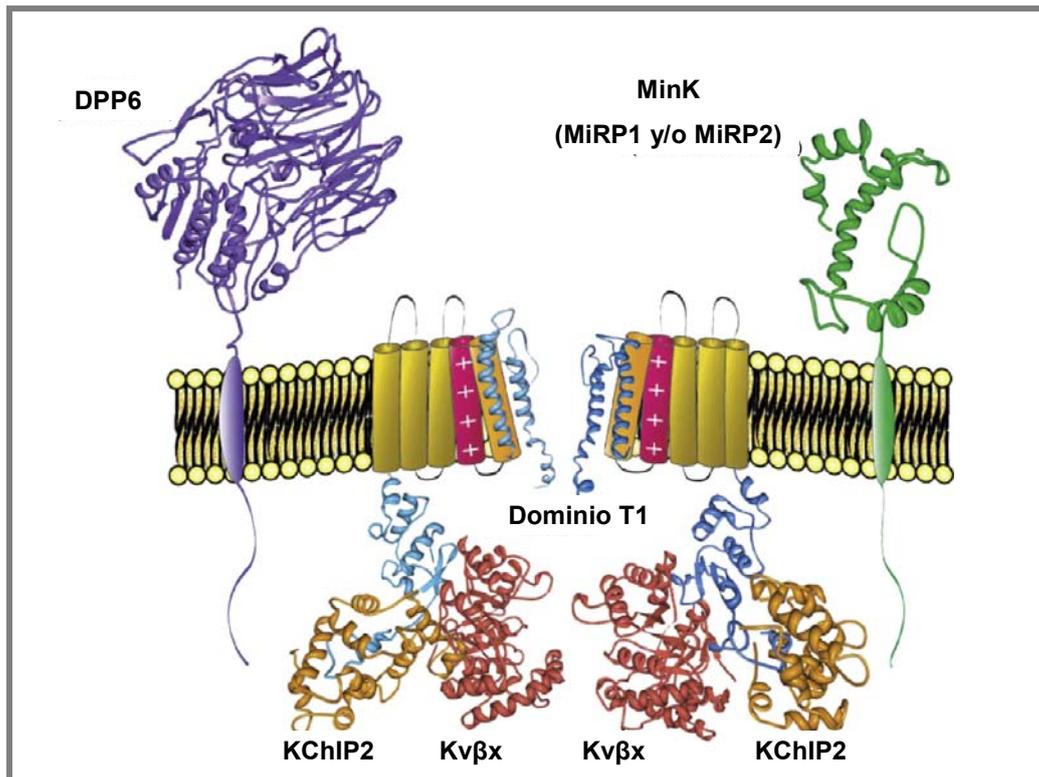
**Tabla I.10. Principales características de las corrientes  $I_{to1,f}$  e  $I_{to1,s}$ .** A: Aurícula. Act: Activación. Cj: Conejo. G: Gato. H: Hombre. Hr: Hurón. Inact: Inactivación. P: Perro. Purk: Purkinje. R: Ratón. Rec: Recuperación de la inactivación. Rta: Rata. V: Ventrículo. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

En el corazón humano, las subunidades  $\alpha$  Kv4.3 son las responsables de la  $I_{to1,f}$  (Dixon y cols., 1996; Kong y cols., 1998; Dilks y cols., 1999). En el ventrículo humano existen dos variantes de este canal: una isoforma larga o Kv4.3-L y una isoforma corta o Kv4.3-S (Kong y cols., 1998). La secuencia del canal Kv4.3 está altamente conservada ya que la isoforma humana sólo presenta tres aminoácidos diferentes al de rata (Dilks y cols., 1999). La dependencia de voltaje de las variantes de hKv4.3 expresadas en células de ovario de hámster chino (*Chinese Hamster Ovary cells*, CHO) se asemeja a las de la  $I_{to1,f}$  registrada en miocitos ventriculares humanos (Figura I.23) (Beuckelmann y cols., 1993; Wettwer y cols., 1993 y 1994; Nábauer y cols., 1993 y 1996; Amos y cols., 1996). El rango de voltaje de activación de esta corriente es similar en las corrientes nativas y en los canales clonados, apareciendo a potenciales más positivos de -40 mV y con un punto medio de activación de 10 mV. Las características de la inactivación son también similares (Beuckelmann y cols., 1993; Wettwer y cols., 1993 y 1994; Nábauer y cols., 1993 y 1996; Amos y cols., 1996; Kong y cols., 1998).

- Subunidades reguladoras

Las primeras subunidades auxiliares que se relacionaron con la modulación de la  $I_{to1,f}$  fueron las subunidades KChIP, concretamente la KChIP2 (Bähring y cols., 2001; Kuo y cols., 2001; Rosati y cols., 2001). De hecho, se ha demostrado que los ratones KChIP2<sup>-/-</sup> no presentan  $I_{to1,f}$  (Kuo y cols., 2001). Además, el ARNm de KChIP2 en humano y perro es  $\approx 25$  veces más abundante en el epicardio que en el endocardio, lo que sugiere que la KChIP2 podría jugar un papel importante en el gradiente transmural de la  $I_{to1}$  (Rosati y cols., 2001; Zicha y cols., 2004). La coexpresión de las proteínas KChIP con canales Kv4.x incrementa de forma muy marcada la expresión de dichos canales en la membrana de la célula, lo que funcionalmente se puede observar como un aumento en la amplitud/densidad del pico de corriente sin modificar la conductancia del canal único (Bähring y cols., 2001). Además, la proteína KChIP retrasa la inactivación de la corriente y acelera la recuperación de la inactivación, pero tienen un efecto mínimo sobre la cinética y la dependencia de voltaje de la activación y de la inactivación de los canales Kv4.x (Tabla I.11) (Bähring y cols., 2001; Deschênes y Tomaselli, 2002). Se sabe que los residuos del extremo N-terminal que preceden al dominio T1 de la subunidad  $\alpha$  Kv4.3 son esenciales para el ensamblaje con (Figura I.23) (An y cols., 2000; Shibata y cols., 2003) y se ha propuesto que cada subunidad KChIP podría unirse lateralmente con dos dominios T1 del extremo N-terminal de cada subunidad Kv4.3 (Pioletti y cols., 2006; Wang y cols., 2007).

Las proteínas minK y MiRP también modulan las propiedades cinéticas y dependientes de voltaje cuando se coexpresan en sistemas heterólogos con los canales Kv4.2 y Kv4.3 (Figura I.25) (Zhang y cols., 2001; Deschênes y Tomaselli, 2002; Lundby y Olesen, 2006; Radicke y cols., 2006 y 2008; Delpón y cols., 2008; Liu y cols., 2008). En miocitos auriculares humanos se ha descrito, que MiRP2 coinmunoprecipita con los canales Kv4.3 en experimentos realizados (Delpón y cols., 2008). En experimentos donde se expresaban de forma heteróloga estas proteínas, se observó que la subunidad MiRP2 disminuía la densidad de la corriente Kv4.3 tanto cuando se coexpresaba como cuando no, con la subunidad KChIP2 (Tabla I.11) (Jiang y cols., 2004; Lundby y Olesen, 2006; Delpón y cols., 2008). Además, una mutación en la proteína MiRP2 relacionada con la aparición de síndrome de Brugada revierte los efectos inhibitorios de esta proteína sobre los canales Kv4.3 dando lugar a un incremento de la corriente generada por este canal (Delpón y cols., 2008), lo que demuestra su importancia en la  $I_{to1,f}$  humana.



**Figura I.25. Dibujo esquemático del canal Kv4.3 con sus posibles subunidades auxiliares.** [Adaptada de Niwa y Nerbonne, 2010]

Las glicoproteínas DPP6 y DPP10 regulan y se coexpresan con los canales Kv4.2 y Kv4.3 en neuronas (Figura I.25) (Nadal y cols., 2003; Jerng y cols., 2004; Li y cols., 2006a), por lo que su presencia en el miocardio humano sugiere también su posible participación en la  $I_{to1,f}$  (Radicke y cols., 2005 y 2007). Se ha descrito que su coexpresión aumenta la expresión en la superficie celular de subunidades  $\alpha$  Kv4, desplaza la dependencia de voltaje de la activación e inactivación hacia potenciales más negativos y que acelera la activación, inactivación y recuperación de la inactivación del canal (Tabla I.11) (Radicke y cols., 2005; Amarillo y cols., 2008).

Por último, las subunidades Kv $\beta$ 1, Kv $\beta$ 2, Kv $\beta$ 3, KChAP y Nav $\beta$ 1 también son capaces de modular los canales Kv4.2 y Kv4.3 *in vitro* (Figura I.23) (Wible y cols., 1998; Pérez-García y cols., 1999; Kuryshev y cols., 2000; Yang y cols., 2001). Se ha descrito que las subunidades Kv $\beta$  aumentan la expresión de los canales Kv4.3 sin alterar sus propiedades cinéticas (Yang y cols., 2001). La subunidad  $\beta$ 1 del canal de Na<sup>+</sup> puede interactuar con el canal Kv4.3 produciendo un aumento en la densidad del pico de la corriente, una aceleración de la inactivación y un retraso en la recuperación de la inactivación (Tabla I.11) (Deschênes y Tomaselli, 2002; Deschênes y cols., 2008).

Subunidad $\alpha$	Densidad de corriente	Inactivación	Recuperación de la inactivación	Dependencia de voltaje inactivación
<b>KChIP2</b>	↑	retrasa	acelera	-
<b>MiRP1</b>	↑	retrasa	-	-
<b>MiRP2</b>	↓	retrasa	-	-
<b>DPP6</b>	↑	acelera	acelera	hiperpolariza
<b>Kv<math>\beta</math></b>	↑	-	retrasa	hiperpolariza
<b>Nav<math>\beta_1</math></b>	↑	acelera	retrasa	hiperpolariza

**Tabla I.11. Modulación por subunidades auxiliares de la corriente generada por canales Kv4.3.** Aumento o descenso de la amplitud de la corriente, enlentecimiento o aceleración del proceso de inactivación del canal, enlentecimiento o aceleración de la recuperación de la inactivación o desplazamiento hacia potenciales más negativos de la dependencia de voltaje de la inactivación del canal para diferentes subunidades auxiliares que se asocian a la subunidad  $\alpha$  Kv4.3.

### *I.c. Regulación de la $I_{to1}$*

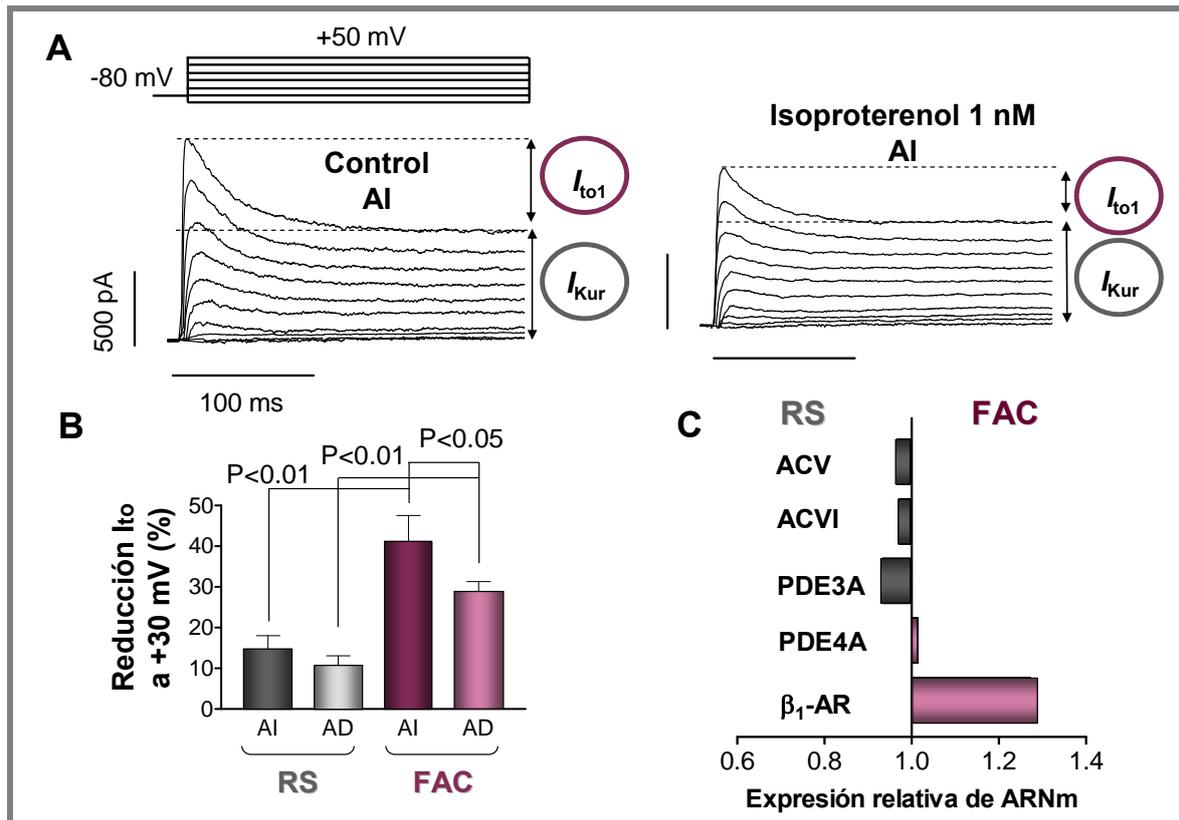
La fosforilación, tanto a través de la proteína quinasa A (PKA) como de la proteína quinasa C (PKC), altera las propiedades del canal que genera la  $I_{to1}$ , modificando tanto la cinética, como la expresión del canal en la membrana celular (Tamargo y cols., 2004b; Patel y cols., 2005). El activador inespecífico de la serina/treonina y tirosina quinasa PMA inhibe la corriente generada a través del canal Kv4.2 y Kv4.3, al igual que la corriente nativa  $I_{to1}$ , efecto que se suprime mediante la acción de la queleritrina (inhibidor de la PKC) o de la estaurosporina (inhibidor inespecífico de las serina/treonina quinasas). La activación de la PKC aumenta las constantes de tiempo de inactivación y retrasa el curso temporal de la recuperación de la inactivación de la  $I_{to1}$  (Nakamura y cols., 1997). Hay que resaltar que la variante del canal Kv4.3-L presenta una inserción de 19 aminoácidos que contiene dos sitios consenso para la fosforilación por PKC, lo que sugiere la posibilidad de que esta variante presente un tipo de regulación específica (Xie y cols., 2009). Así, la corriente generada por la coexpresión de la variante Kv4.3-L junto a receptores  $\alpha$ -adrenérgicos es inhibida por ésteres de forbol y agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos y este efecto es revertido tanto en presencia de inhibidores de la PKC como al introducir mutaciones en los sitios consenso para la fosforilación del canal (Po y cols., 2001). Sin embargo, este efecto no se observa con la coexpresión de la variante corta Kv4.3-S. Es probable que la isoforma de la PKC que está mediando en la regulación tanto de canales Kv4.3 como de la corriente nativa  $I_{to1}$  sea la  $\alpha$  (Scholz y cols., 2011).

La CaMKII se expresa de forma abundante en el corazón, siendo la isoforma predominante la  $\delta$ -CaMKII (Tobimatsu y cols., 1989). La CaMKII juega también un

importante papel en la regulación de la  $I_{to1}$ , acelerando la inactivación de los canales que generan esta corriente y retrasando la recuperación de la misma (Tessier y cols., 1999; Colinas y cols., 2006). Se ha descrito también que la regulación de la  $I_{to1}$  por esta quinasa depende de la expresión de otro tipo de proteínas denominadas guanilato-quinasas asociadas a membrana (MAGUKs), en concreto la SAP97 que se expresa en miocardio (El-Haou y cols., 2009) y que se ha demostrado que interacciona con otros canales dependientes de voltaje de la familia Shaker (Leonoudakis y cols., 2001; Godreau y cols., 2002; El-Haou y cols., 2009). Además diversos mediadores celulares como la endotelina-1, los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos y la angiotensina II, modulan la expresión y la magnitud de la  $I_{to1}$ . Los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos reducen la  $I_{to1}$  en miocitos ventriculares de rata (Apkon y Nerbonne, 1988). La fenilefrina y el carbacol sólo inhiben la corriente generada por el canal Kv4.3 cuando éste se coexpresa con  $\alpha$ 1-adrenoreceptores o receptores muscarínicos M1, respectivamente, lo que sugiere que el efecto estaba mediado por la activación de la PKC (Nakamura y cols., 1997). Por otra parte, la angiotensina II inhibe la  $I_{to1}$  en miocitos ventriculares de rata, efecto que se prevenía por el PD123391, un antagonista selectivo de receptores de angiotensina II. Esta inhibición se suprimía con ácido okadaico, un inhibidor de la serin-treonina-fosfatasa 2A, sugiriendo que la estimulación de los receptores de angiotensina II inhibe la  $I_{to1}$  a través de la desfosforilación producida por esta fosfatasa (Caballero y cols., 2004a).

Se ha descrito también la regulación  $\beta$ -adrenérgica sobre la  $I_{to1}$  en miocitos ventriculares de rata y en miocitos auriculares humanos (Zhang y cols., 2010; de la Fuente y cols., 2012). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado por primera vez que la estimulación  $\beta$ -adrenérgica inhibe la  $I_{to1}$  en miocitos auriculares humanos. Esta inhibición estaba mediada por la activación secuencial de la adenilato ciclasa (AC) y de la PKA (de la Fuente y cols., 2012).

En los miocitos que provenían de pacientes en RS, los efectos observados sobre la  $I_{to1}$  tras la estimulación  $\beta$ -adrenérgica eran cualitativa y cuantitativamente iguales en las muestras de AI que en las de AD (Figura I.26B). La expresión del ARNm tanto de los receptores  $\beta$  como de las principales enzimas implicadas en la respuesta  $\beta$ -adrenérgica (AC tipo V y VI y fosfodiesterasas [PDE] 3A y 4A) en el miocardio humano, tampoco era diferente entre ambas aurículas. Al comparar estos efectos con los efectos que producía el isoproterenol en muestras auriculares de pacientes con FAc se vió que la FAc potenciaba la inhibición de la  $I_{to1}$  inducida por isoproterenol, preferentemente en la AI. Esta potenciación era debida a un aumento en la expresión del receptor  $\beta$ 1-adrenérgico (Figura I.26C) (de la Fuente y cols., 2012).



**Figura 1.26. Regulación  $\beta$ -adrenérgica de la  $I_{to1}$ .** (A) Familia de trazos obtenidos tras aplicar el protocolo de pulsos de la parte superior, en un miocito obtenido de una muestra de auricular izquierda (AI) de un paciente con FAC, en situación control y en presencia de isoproterenol 1 nM. (B) Porcentaje de reducción de la  $I_{to1}$  en muestras de AI y aurícula derecha (AD) de pacientes en RS y con FAC. (C) Gráfico de barras que muestra la expresión relativa de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta_1$ -AR), de la adenilato ciclasa tipo V y VI (ACV y VI) y de las fosfodiesteras 3A y 4A (PDE3A y 4A) [Adaptada de de la Fuente y cols., 2012].

#### *I.d. Propiedades farmacológicas de la $I_{to1}$*

Como se ha mencionado anteriormente, la  $I_{to,f}$  y la  $I_{to,s}$  se pueden diferenciar atendiendo a sus características farmacológicas. La 4-AP bloquea los dos componentes, pero lo hace de manera significativamente diferente. El bloqueo de la  $I_{to,s}$  presenta las características clásicas de un bloqueo de estado abierto del canal, es decir, produce un bloqueo uso-dependiente con un bloqueo tónico mínimo y una aceleración de la inactivación. Sin embargo, la 4-AP bloquea el estado cerrado del canal que genera la  $I_{to,f}$  (Patel y Campbell, 2005). El bloqueo del estado cerrado no sólo se manifiesta en la reducción de la amplitud del pico de la  $I_{to,f}$ , sino que también es apreciable en el enlentecimiento de la cinética de activación e inactivación (Campbell y cols., 1993a y b; Patel y Campbell, 2005). El uso de diversa toxinas también permite la identificación del fenotipo de la  $I_{to1}$ . La HpTX, a la concentración de 150 nM no presenta ningún efecto sobre la  $I_{to,s}$  registrada en miocitos endocárdicos de hurón y ventriculares de ratón; sin embargo inhibe significativamente la  $I_{to,f}$  de miocitos epicárdicos

registrada en las mismas especies (Guo y cols., 1999; Xu y cols., 1999). Otras toxinas que interactúan específicamente con la  $I_{to,f}$  son las PaTXs, (Diochot y cols., 1999).

Fármaco	$I_{to1}$	Kv4.2/Kv4.3	Preparación	Referencia
4-AP	1.15 mM		MAH	Wang y cols., 1995b
Ambasalida	23 $\mu$ M		MAH	Koidl y cols., 1996
Amiodarona	4.9 $\mu$ M		MVRta	Guo y cols., 1997
Astemizol	>1 $\mu$ M		MVRta	Berul y Morad; 1995
AVE0118		23 $\mu$ M	CHO	Gögelein y cols., 2004
AZD7009	23 $\mu$ M		CHO	Persson y cols., 2005
Azimilida	100 $\mu$ M (60%)		MAH	Chen y cols., 2002
Bupivacaína	22 $\mu$ M	20 $\mu$ M (45.4%)	MVRta	Castle, 1990; Glez y cols., 2001
Ác. Canrenólico	17.2 nM		Ltk	Gómez y cols., 2005
Cloroquina	10 $\mu$ M		MVG	Schez-Chapula y cols., 1999
Cromanol 293B	24 $\mu$ M		MVC	Bosch y cols., 1998
Clofilio	0.5 $\mu$ M		MVRta	Castle, 1991
Diltiazem		63 nM/110 uM	CHO	Caballero y cols., 2004b
Disopirimida	259 $\mu$ M		MVRta	Schez-Chapula y cols., 1999
E-4031	>50 $\mu$ M		HAM	Feng y cols., 1997a
Espironolactona		47.1 $\mu$ M	Ltk	Gómez y cols., 2005
Flecainida	26 $\mu$		MVRta	Dixon y cols., 1996
HMR1556	10 $\mu$ M (25%)		MVC	Gögelein y cols., 2000
Imipramina	3.7 $\mu$ M		MACj	Delpón y cols., 1992
Indapamida	98 $\mu$ M		MAP	Lu y cols., 1998
LY97241	0.9 $\mu$ M		MVRta	Castle, 1991
Nicotina	270 nM	40 nM	OX, MVP	Wang y cols., 2000a
Nifedipino	> 30 $\mu$ M		MVRta	Jahnel y cols., 1994
Propafenona	3.9-4.8 $\mu$ M		MAH, MAC	Gross y Castle, 1998
Quinidina	5-10 $\mu$ M		MAH	Yue y cols., 2000
Risperidona	>30 $\mu$ M		MVC	Gluais y cols., 2002
RP58866	2.3 $\mu$ M		MVP	Yang y cols., 1999
RSD1235	30 $\mu$ M		HEK	Fedida y cols., 2005
D-Sotalol	>0.5 mM		MAH	Feng y cols., 1997a
Tedisamilo	6 $\mu$ M		MVRta	Dukes y cols., 1989
Terfenadina	>1 $\mu$ M		MVRta	Berul y Morad, 1995
Terikalant	>2 $\mu$ M		MVRta	McLarnon y Xu, 1995
Verapamilo	>30 $\mu$ M		MVRta	Jahnel y cols., 1994
Vernakalant		30 $\mu$ M		Tian y Frishman, 2011

**Tabla I.12:  $CI_{50}$  de los fármacos que bloquean la  $I_{to1}$ .** C: Cobayo. Cj: Conrjo. G: Gato. H: Humanos. Ltk: fibroblastos de ratón. MA: Miocitos Auriculares. MV Miocitos Ventriculares. OX Oocitos Xenopus. P:Perro. Rta: Rata. (porcentaje entre paréntesis = bloqueo producido por la concentración indicada) [Adaptada de Tamargo y cols., 2004b]

La quinidina y la propafenona producen un bloqueo del estado abierto del canal y aceleran la inactivación de la  $I_{to1}$  (Wang y cols., 1995b). Además la quinidina produce un bloqueo frecuencia-dependiente de la  $I_{to1}$  que es consecuencia de una lenta disociación del fármaco del canal (Slawsky y Castle, 1994; Wang y cols., 1995b). El vernakalant también reduce la  $I_{to1}$  de

forma frecuencia-dependiente haciendo que en pacientes que presentan taquiarritmias auriculares se produzca una prolongación selectiva de la repolarización de la aurícula (Tian y Frishman, 2011) La tabla I.12 muestra la potencia de bloqueo, expresada en  $CI_{50}$  de diferentes fármacos sobre la  $I_{to1}$ .

Se ha propuesto que los bloqueantes de la  $I_{to1}$  prolongan la DPA en miocitos auriculares humanos (Shibata y cols., 1989) y en músculo isquémico ventricular (Mubagwa y cols., 1994). Sin embargo, el bloqueo de la  $I_{to1}$  puede despolarizar el  $E_m$  de la fase de meseta lo que puede favorecer la inactivación de la  $I_{CaL}$  y acelerar la activación de las corrientes de salida de  $K^+$  rectificadoras tardías. En consecuencia, la reducción de la densidad de la  $I_{to1}$  puede resultar en un acortamiento de la DPA ventricular (Shibata y cols., 1989; Mubagwa y cols., 1994; Oudit y cols., 2001).

Además, la distribución heterogénea de la corriente puede aumentar la disparidad de la DPA e incluso puede iniciar o perpetuar las arritmias por reentrada (Antzelevitch y cols., 1991). Por todo ello, es necesario ampliar el conocimiento sobre el papel de la  $I_{to1}$  en el control de la repolarización del PA humano y así poder utilizar esta corriente como una diana terapéutica eficaz.

#### *I.e. La $I_{to1}$ en diversas patologías*

En situaciones como la insuficiencia cardíaca, la hipertrofia cardíaca, la isquemia miocárdica y el infarto de miocardio se produce una prolongación de la DPA (Kääb y cols., 1998; Tomaselli y Marbán, 1999; Oudit y cols., 2001). En la hipertrofia cardíaca, esta prolongación se correlaciona con una disminución de la  $I_{to1}$  y de los niveles de ARNm de Kv4.2 y Kv4.3 (Potreau y cols., 1995; Meszaros y cols., 1996; Nattel y cols., 2010). También se ha descrito una disminución de la  $I_{to1}$  y de los niveles de ARNm de Kv4.2 y Kv4.3 tras un infarto de miocardio (Kaprielian y cols., 1999; Huang y cols., 2000).

De igual forma, tanto la corriente  $I_{to1}$  como la expresión de Kv4.3 se encuentran significativamente disminuidas en pacientes con FA (Van Wagoner y cols., 1997; Bosch y cols., 1999; Grammer y cols., 2000; Workman AJ y cols., 2001; Michael G y cols., 2009; Nattel y cols., 2010). Esta arritmia se caracteriza por un acortamiento del periodo refractario y de la DPA auriculares, un aumento de la dispersión del periodo refractario y una pérdida de la capacidad de adaptación de la DPA a los cambios de frecuencia (Nattel y cols., 2008; Kourliouros y cols., 2009). Estas alteraciones en las propiedades eléctricas de la aurícula (remodelado eléctrico) son consecuencia de trastornos en la expresión de los canales iónicos

(Nattel y cols., 2008; Michael y cols., 2009). Nuestro grupo ha demostrado que ese remodelado eléctrico no afecta por igual a la AD que a la AI. La FAc disminuye la  $I_{to1}$  y la  $I_{Kur}$  de forma diferente en cada aurícula (Caballero y cols., 2010a). Como se ha comentado previamente la FAc aumenta la diferencia interauricular de la  $I_{to1}$  ya que la presencia de FAc promovía una mayor disminución de la amplitud y de la densidad de la  $I_{to1}$  en la AI que en la AD, (Caballero y cols., 2010a).

De forma teórica se había postulado que el Síndrome de Brugada podría ser consecuencia de una disminución de las corrientes despolarizantes ( $I_{Na}$  e  $I_{Ca,L}$ ) o de un aumento de las repolarizantes ( $I_{to1}$ ) que actúan durante la fase de meseta del PA (Di Diego y cols., 2002). Recientemente se ha identificado la primera mutación en KCND3 que produce un aumento de función implicada en la aparición de Síndrome de Brugada. Esta mutación produce un aumento en la densidad del pico de la  $I_{to1}$  en el ventrículo izquierdo precisamente donde la expresión de KCND3 es mayor (Giudicessi y cols., 2011).

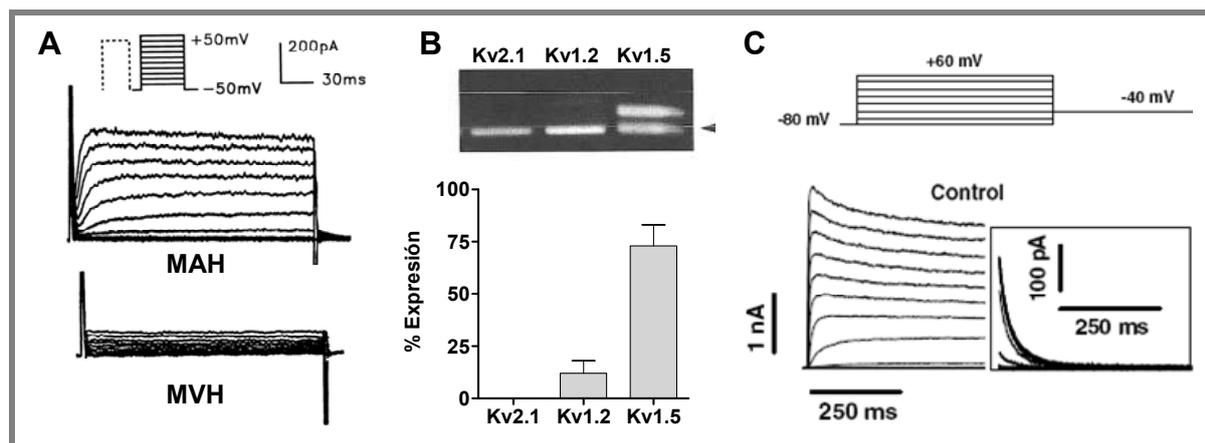
## *II. La $I_{Kur}$*

Las células auriculares presentan una corriente de salida de  $K^+$  denominada  $I_{Kur}$  que se activa en el rango de potenciales de la fase de meseta del PA (Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Amos y cols., 1996; Feng y cols., 1998a). Su exclusiva presencia en el tejido auricular contribuye a que la DPA en este tejido sea más breve que en el ventricular (Feng y cols., 1998b; Tamargo y cols., 2009).

### *II.a. Características de la $I_{Kur}$*

La  $I_{Kur}$  se activa rápidamente (<10 ms) y presenta una inactivación parcial o incluso no presenta inactivación alguna durante el curso temporal del PA (Figura I.27A) (Apkon y Nerbonne, 1991; Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996b; Tamargo y cols., 2004b). La recuperación de la inactivación también es un proceso muy lento, lo que tiene gran importancia para explicar la dependencia de frecuencia de esta corriente a potenciales de membrana fisiológicos (Feng y cols., 1998a y b).

En humanos, la  $I_{Kur}$  se ha registrado en el tejido auricular, pero no en el ventricular (Figura I.27A) (Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996b), por lo que se ha propuesto como diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de arritmias auriculares (Brendel y Peukert, 2002; Nattel, 2002; Tamargo y cols., 2009).



**Figura I.27. Características de la  $I_{Kur}$ .** (A)  $I_{Kur}$  registrada en miocitos auriculares humanos (MAH) tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. Tras aplicar el mismo protocolo en miocitos ventriculares humanos (MVH), la  $I_{Kur}$  no aparece. (B) Detección por PCR de canales Kv que generan corrientes tipo  $I_{Kur}$  en muestras auriculares humanas (panel superior) y representación de la expresión relativa del ARNm de cada uno (panel inferior). En el panel superior, la flecha corresponde a la banda del control interno. (C) Corriente generada por canales Kv1.5 humanos expresados en células *Ltk* tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. [Adaptadas de Li y cols., 1996b (A), Bertaso y cols., 2002 (B) y Gómez y cols., 2005 (C)]

### II.b. Composición de los canales que generan la $I_{Kur}$

Existen diversas subunidades  $\alpha$  Kv que generan corrientes similares a la  $I_{Kur}$  (Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1, Kv3.1), aunque sus propiedades farmacológicas son diferentes (Tabla I.13). La sensibilidad a 4-AP y la resistencia al TEA y a la dendrotoxina (DTX) de la  $I_{Kur}$  humana y de ratón parecen indicar que es la subunidad  $\alpha$  Kv1.5 la responsable de generar esta corriente en ambas especies (Nattel y cols., 1999). Por el contrario, en el perro (Kv3.1) o en la rata (Kv1.2 en aurículas y Kv2.1 en ventrículos) parecen estar implicadas otras subunidades  $\alpha$  Kv (Roberds y cols., 1993; Snyders y cols., 1993; Grissmer y cols., 1994; Mathie y cols., 1998).

Subunidad $\alpha$	Gen	4-AP ( $\mu$ M)	TEA (mM)	DTX (nM)	CTX (nM)
Kv1.2	KCNA2	200-800	10-560	1-17	14
Kv1.5	KCNA5	50-250	330	>200	>100
Kv2.1	KCNB1	500	6-10		
Kv3.1	KCNC1	29	0.1-0.2	>1000	>1000

**Tabla I.13. Propiedades farmacológicas de los distintos canales Kv responsables de la  $I_{Kur}$ .** 4-AP: 4-Aminopiridina. CTX: Caribdotoxina. DTX: Dendrotoxina. TEA: Tetraetilamonio. [Adaptada de Nattel y cols., 1999]

La expresión de canales Kv1.5 humanos en sistemas heterólogos permite registrar una corriente rectificadora tardía que presenta las características biofísicas y farmacológicas de la  $I_{Kur}$  (Figura I.26). Aunque la proteína Kv1.5 se expresa en igual proporción en aurícula y en ventrículo humano, sólo forman canales funcionales en la aurícula (Fedida y cols., 1993;

Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996b). Además, en miocitos auriculares humanos cultivados en los que se usan oligonucleótidos antisentido (AsODN, *Antisense oligonucleotides*) contra el ARNm de la subunidad Kv1.5 no se registra la  $I_{Kur}$  (Feng y cols., 1997b), confirmando el papel de Kv1.5 en la corriente nativa.

Se ha descrito que las subunidades  $\alpha$  de la familia Kv1 (como Kv1.5) se pueden asociar con miembros de la familia de subunidades Kv $\beta$  (England y cols., 1995; Accili y cols., 1997; Martens y cols., 1999), siendo las subunidades Kv $\beta$ 1 y Kv $\beta$ 2 las que se expresan en el miocardio humano (McCormack y cols., 1999). Cuando se coexpresan con Kv1.5, las subunidades Kv $\beta$ 1 participan en la regulación del canal proporcionando sitios de interacción para quinasas (PKA, PKC) (Kwak y cols., 1999) y modificando la inhibición producida por diferentes fármacos como la quinidina o la bupivacaína (González y cols., 2002). Por su parte, la asociación de la subunidad Kv $\beta$ 2.1 con canales Kv1.5 disminuye la expresión en la membrana, aumenta el grado de la inactivación lenta y desplaza el punto medio de la curva de activación hacia potenciales más negativos (Uebele y cols., 1996; Accili y cols., 1997).

### *II.c. Regulación de la $I_{Kur}$*

El canal Kv1.5 y las subunidades Kv $\beta$  poseen múltiples sitios de fosforilación para la PKA y la PKC. En miocitos auriculares humanos la  $I_{Kur}$  está regulada tanto por la estimulación  $\alpha$ - como  $\beta$ -adrenérgica, que presentan efectos opuestos (Nattel y cols., 1999). La  $I_{Kur}$  registrada en miocitos auriculares procedentes de pacientes tanto en RS como con FA, no se ve modificada por el isoproterenol a la concentración de 1 nM (de la Fuente y cols., 2012), que sólo aumenta cuando se emplean concentraciones mayores de 10 nM (Li y cols., 1996b; de la Fuente y cols., 2012). Este efecto es mimetizado por la estimulación directa de la adenilil ciclasa (AC) y suprimido por un péptido inhibidor de la PKC, el bisindolilmaleimida (Li y cols., 1996b).

Distintos estudios indican que la coexpresión de Kv $\beta$ 1.3 con el canal Kv1.5 es necesaria para el aumento de la corriente mediado por PKA (Kwak y cols., 1999) mientras que la subunidad Kv $\beta$ 1.2 aumenta el efecto inhibidor sobre la corriente de la PKC (Williams y cols., 2002).

La coexpresión de los canales Kv1.5 con receptores que estimulan la fosfolipasa C (PLC), como el receptor humano de la trombina y el de serotonina 5-HT<sub>1c</sub>, inhibe la amplitud de la  $I_{Kur}$  sin modificar la cinética ni la dependencia de voltaje de la activación (Timpe y Fantl, 1994). La inyección simultánea del inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y PMA reproduce la

modulación recién comentada, sugiriendo que estos receptores pueden modular el canal Kv1.5 al activar la PLC.

Además, los canales Kv1.5 también pueden ser regulados por el óxido nítrico (NO) a través de la vía GMPc/PKG. Donadores de NO como el SNAP disminuyen la corriente generada por estos canales de manera concentración dependiente (Núñez y cols., 2006).

#### *II.d. Propiedades farmacológicas de la $I_{Kur}$*

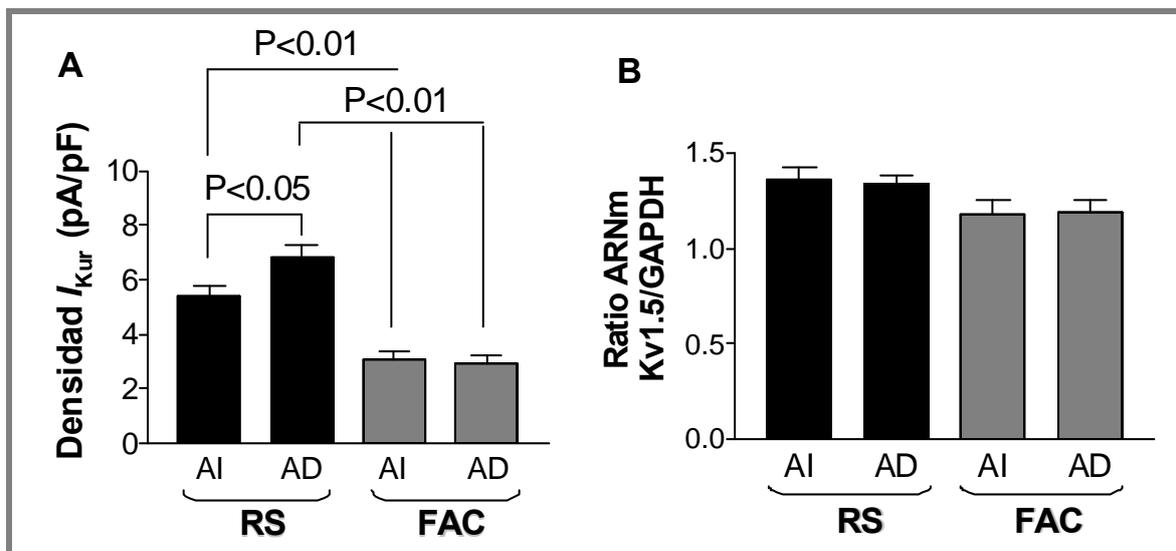
La  $I_{Kur}$  es una corriente relativamente insensible a TEA,  $Ba^{2+}$ , antiarrítmicos de la clase III y algunas de las metanosulfonidas, pero es altamente sensible a 4-AP (Snyders y cols. 1993; Wang y cols. 1993; Grissmer y cols., 1994; Wang y cols., 1995b; Feng y cols., 1997a; Tamargo y cols., 2004b). La inhibición selectiva de  $I_{Kur}$  con 4-AP, prolonga la DPA en el tejido auricular humano pero no modifica el periodo refractario ventricular en el perro.

Los estudios de mutagénesis han demostrado que los residuos Thr507, Leu510, Val514 del S6 son críticos en la unión de quinidina (Yeola y cols., 1996), benzocaína (Caballero y cols., 2002) y bupivacaína (Franqueza y cols., 1997). Pero también se ha demostrado que en la boca externa del canal formado por el lazo P y por las regiones adyacentes de los segmentos S5 y S6 se encuentran diversos sitios de unión para fármacos (Carmeliet, 1998; Nerbonne, 2000; Tamargo y cols., 2004b).

Dado que la  $I_{Kur}$  es una corriente exclusivamente auricular, se ha propuesto que los fármacos que actúen como inhibidores selectivos de esta corriente podrían ser útiles en el tratamiento de las arritmias auriculares y que además, carecerían de efectos adversos a nivel ventricular (Brendel y Peukert, 2002; Nattel, 2002). Los principales inhibidores selectivos de la  $I_{Kur}$  que se han identificado son NIP-142, S9947, AVE0118, S0100176, S20951 y vernakalant. Estas moléculas no modifican el intervalo QT, prolongan significativamente el periodo refractario auricular (izquierdo > derecho) y disminuyen la vulnerabilidad de la AI e incluso revierten la FA a RS (Matsuda y cols., 2001; Brendel y Peukert, 2002; Knobloch y cols., 2002; Blaauw y cols., 2004; Dorian y cols., 2007). Desafortunadamente, existen pocos datos clínicos sobre la seguridad y eficacia de estos fármacos. Sin embargo existen datos esperanzadores. Wettwer y colaboradores demostraron que el bloqueo de la  $I_{Kur}$ , tanto por el 4-AP como por el AVE0118, desplazaba a potenciales más positivos la fase de meseta del PA tanto en pacientes en RS como en pacientes con FA (Wettwer y cols., 2004). Además, ambos fármacos prolongan la DPA en pacientes con FA, no así en pacientes en RS.

### II.e. La $I_{Kur}$ en diversas patologías y canalopatías asociadas a los canales Kv1.5

Los niveles de expresión de los canales iónicos no son un parámetro fijo sino que varía dependiendo de diversos factores. Así, en ratas, tras un infarto de miocardio, la expresión del gen Kv2.1 disminuye con los correspondientes cambios en la corriente (Qin y cols., 1996). Se ha demostrado que la densidad de  $I_{Kur}$  registrada en miocitos auriculares humanos disociados de muestras de pacientes en RS es mayor en la AD que en la AI. (Caballero y cols., 2010a). Al contrario de lo que ocurría con la  $I_{to1}$ , la FAC produce una disminución en la amplitud y la densidad de la  $I_{Kur}$  más marcada en la AD que en la AI (Figura I.28A). Por tanto, la FAC aumenta la diferencia interauricular en las corrientes repolarizantes (Caballero y cols., 2010a). Aunque se ha descrito que la disminución de la densidad de la corriente se debía a una disminución en la expresión tanto del ARNm como de la proteína Kv1.5 (Van Wagoner y cols., 1997), recientemente nuestro grupo ha descrito que no hay diferencias significativas en la expresión del ARNm de los canales Kv1.5 entre pacientes en RS y con FA (Figura I.28B). (Caballero y cols., 2010a).



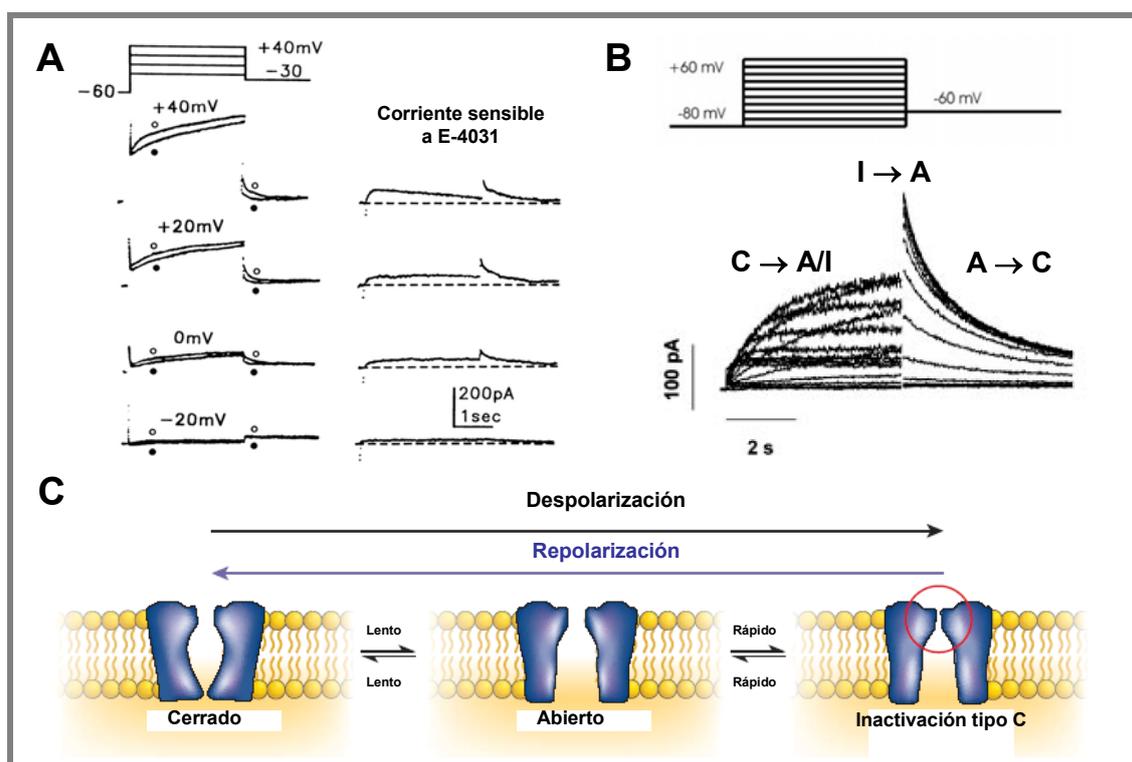
**Figura I.28. Distribución auricular de la  $I_{Kur}$ .** (A) Densidad de  $I_{Kur}$  registrada a +30 mV en miocitos obtenidos de muestras de aurícula izquierda (AI) y derecha (AD) procedente de pacientes en RS y con FA crónica. (B) Histograma del análisis densitométrico de la expresión del ARNm de Kv1.5 normalizada con respecto a la expresión del ARNm. [Adaptada de Caballero y cols., 2010a].

Por otro lado, se ha identificado un polimorfismo en la región C-terminal del canal (P532L) que aparece con una frecuencia de 1.1% en la población afroamericana (Drolet y cols., 2005; Simard y cols., 2005). En estos individuos la  $I_{Kur}$  generada es prácticamente idéntica a la nativa, sin embargo presenta una sensibilidad menor a fármacos antiarrítmicos como quinidina y propafenona (Simard y cols., 2005). También se ha descrito una mutación

(E375X) en el gen KCNE5 que produce una pérdida de función del canal Kv1.5 y que se relaciona con la aparición de FA familiar (Olson y cols., 2006).

### III. La $I_{Kr}$

El componente rápido de la corriente de salida de  $K^+$  con rectificación tardía contribuye a la fase 3 de la repolarización y juega un importante papel en el control de la DPA y del periodo refractario (Hancox y cols., 1998; Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004b, Sanguinetti, 2010). La importancia de la  $I_{Kr}$  se ha puesto de manifiesto gracias a diferentes patologías en las que se producen mutaciones tanto en la subunidad  $\alpha$  (Sanguinetti y cols., 1995 y 1996a) como en las subunidades  $\beta$  (Abbott y cols., 1999), que se pueden manifestar como SQT1 congénitos o adquiridos (Splawski y cols., 2000; Tamargo, 2000) y que se han relacionado con un aumento del riesgo de sufrir arritmias. Además, la  $I_{Kr}$  es la diana terapéutica de los fármacos antiarrítmicos de clase III (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Spector y cols., 1996a; Nattel y Singh, 1999).



**Figura I.29. Características de la  $I_{Kr}$ .** (A) Corriente registrada en miocitos ventriculares humanos en ausencia (○) y en presencia (●) de E-4031 tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior izquierda y corriente sensible al E-4031 correspondiente a la  $I_{Kr}$ , (derecha). (B) Registro de la corriente generada por subunidades Kv11.1 registrada en células CHO tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. Se muestran las transiciones entre las diferentes conformaciones del canal (A: Activo. C: Cerrado. I: Inactivo). (C) Representación esquemática de los distintos estados del canal Kv11.1. [Adaptadas de Li y cols., 1996a (A), Caballero y cols., 2003 (B) y Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006 (C)]

### III.a. Características de la $I_{Kr}$

Con la despolarización del  $E_m$ , la amplitud de la  $I_{Kr}$  va aumentando progresivamente hasta alcanzar un máximo a potenciales entre 0 y +10 mV. A potenciales más positivos, la amplitud disminuye debido a que la inactivación del canal tiene lugar más rápidamente que la activación (Figura I.29) (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Li y cols., 1996a; Spector y cols., 1996b; Smith y cols., 1996; Hancox y cols., 1998; Tseng, 2001). Sin embargo, cuando la repolarización alcanza valores de  $E_m$  negativos (en la fase 3 del PA), los canales que generan la  $I_{Kr}$  se recuperan rápidamente de la inactivación y vuelven a entrar en el estado abierto (la velocidad de recuperación de la inactivación a través del estado abierto es más rápida que la de deactivación), lo que da lugar a una corriente de gran tamaño que facilita la repolarización final del PA (Figura I.29) (Hancox y cols., 1998; Tseng, 2001). Por todo ello, el grado de activación de la  $I_{Kr}$  durante la fase 2 viene determinado por la dependencia de voltaje y de tiempo de la activación de los canales, mientras que en la fase 3 su participación está determinada por la recuperación de la inactivación y la deactivación de los mismos (Tseng, 2001). Tanto las características biofísicas como la distribución de los canales que generan la  $I_{Kr}$  son específicas de cada especie. Así, la densidad de la  $I_{Kr}$  en el miocardio humano es mayor en el ventrículo que en la aurícula, mientras que en la rata y el cobayo ocurre lo contrario (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1991; Pond y cols., 2000; Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004b).

### III.b. Composición de los canales que generan la $I_{Kr}$

La subunidad  $\alpha$  Kv11.1 (antiguamente denominada hERG, *human ether-à-go-go related gene*) es la responsable de la generación de la  $I_{Kr}$  (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990 y 1991). Además de en el miocardio, esta subunidad se expresa en sistema nervioso, músculo liso y células tumorales (Curran y cols., 1995; Tseng, 2001). La subunidad Kv11.1 presenta, al menos, dos isoformas debidas a modificaciones postranscripcionales en su extremo N-terminal (hERG1a y hERG1b) con diferentes propiedades biofísicas (London y cols., 1997; Wang y cols., 2000c), y se piensa que ambas isoformas se ensamblan en el miocardio para formar un canal heterotetramérico (Jones y cols., 2004). Sin embargo, la  $I_{Kr}$  nativa y la corriente generada por los canales Kv11.1 ( $I_{Kv11.1}$ ) expresados en sistemas heterólogos se diferencian en el *gating* y la conductancia del canal, así como en la regulación por la  $[K^+]_e$ .

(Tseng, 2001; Tristani-Firouzi y Sanguinetti, 2003), sugiriendo la participación de subunidades auxiliares en la generación de esta corriente.

La utilización de AsODN contra el ARNm de minK producía una disminución en la amplitud de la  $I_{Kr}$  en células AT-1, una línea tumoral de miocitos auriculares, lo que sugería la implicación de esta subunidad en la formación de los canales que generan esta corriente (Yang y cols., 1995). De hecho, la amplitud de la  $I_{Kr}$  era significativamente menor en los cardiomiocitos de ratones minK<sup>-/-</sup> que en los de ratones control. Además, la posterior coexpresión de minK en dichos miocitos producía el aumento de la  $I_{Kr}$  (Kupersmidt y cols., 1999). La coexpresión de minK también aumentaba la amplitud de la  $I_{Kv11.1}$  en células HEK293 (McDonald y cols., 1997).

Por otro lado, las subunidades Kv11.1 y MiRP1 son capaces de formar complejos estables *in vitro* (Abbott y cols., 1999; Cui y cols., 2000). MiRP1 se expresa en fibras de Purkinje y células del nodo del seno, mientras que a nivel auricular y ventricular su expresión es muy baja (Lundquist y cols., 2005), por lo que se ha sugerido que sólo interacciona con las subunidades  $\alpha$  Kv11.1 en el sistema de conducción (Weerapura y cols., 2002). La importancia de MiRP1 en la generación de la  $I_{Kr}$  se ha puesto de manifiesto tras la descripción de mutaciones en el gen que codifica esta proteína, ya que producen la disminución de la  $I_{Kr}$  y se relacionan con la aparición de SQT6 (Abbott y cols., 1999; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003).

### *III.c. La $I_{Kr}$ en diversas patologías*

En un modelo canino de infarto, la densidad de la  $I_{Kr}$  y los niveles de ARNm de Kv11.1 se encuentran reducidos en miocitos ventriculares (Jiang y cols., 2000). Sin embargo, 48 horas después del infarto, la densidad de la  $I_{Kr}$  aumenta en las células de Purkinje subendocárdicas, lo que ocasiona que se genere un gradiente en la repolarización ventricular. Esta heterogeneidad en la repolarización puede aumentar los efectos proarrítmicos de ciertos fármacos en pacientes con infarto de miocardio. Además, tanto la hiperglucemia como la hipoglucemia inhiben la corriente generada por canales Kv11.1 y pueden causar prolongación del QT y arritmias ventriculares, ya que el ATP proveniente de la glicolisis y de la fosforilación oxidativa es crítico para la función de estos canales (Zhang y cols., 2003).

### *III.d. Canalopatías asociadas a las subunidades Kv11.1 y MiRP1*

Diferentes mutaciones en los genes que codifican las subunidades Kv11.1 y MiRP1 se han relacionado con la aparición de SQTl y SQTC.

Se conocen más de 200 mutaciones en el gen que codifica la subunidad Kv11.1 (KCNH2) asociadas al SQTl (SQTl2). El SQTl2 representa un 30-35% de los casos de SQTl y es el que mayor mortalidad presenta (Roberts, 2006). Todas las mutaciones identificadas producen una disminución de la  $I_{Kr}$  ocasionada por la pérdida/disminución en la función del canal Kv11.1 (Curran y cols., 1995; Zhou y cols., 1998; Splawski y cols., 2000; Tseng, 2001; Rajamani y cols., 2002; Kass y Moss, 2003; Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006, Sanguinetti, 2010; Amorós y cols., 2011). Una de ellas ha sido descrita recientemente por nuestro grupo. Caracterizamos una mutación sin sentido asociada a SQTl2 producida por la sustitución de un Glu por una Gly en la posición 637 identificada en una familia española. Esta mutación abolía la rectificación interna mediante la supresión de la inactivación tipo C del canal Kv11.1 y eliminaba la selectividad por el  $K^+$ . Estas alteraciones producían una marcada disminución de la amplitud de la corriente durante el PA lo que explicaba la prolongación del intervalo QT que se observaba en los pacientes que presentaban esta mutación (Amorós y cols., 2011).

También se han descrito mutaciones en el gen que codifica la subunidad MiRP1 (KCNE2) asociadas a la aparición del SQTl6 (Abbott y cols., 1999; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003).

La inhibición farmacológica de la  $I_{Kr}$  está relacionada con la aparición de un tipo de SQTl que se denomina “SQTl adquirido” (De Bruin y cols., 2005; Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006). Esta disminución de la  $I_{Kr}$  debida a fármacos está relacionada tanto con el bloqueo de los canales Kv11.1 que la generan (Mitcheson y cols., 2000), como con la inhibición del transporte a membrana de los mismos (Dennis y cols., 2007). En ambos casos, se produce un aumento de la DPA ventricular que prolonga el intervalo QT y el periodo refractario y favorece el desarrollo de pospotenciales tempranos (Sanguinetti y cols., 1996a; De Bruin y cols., 2005; Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006). Además, el aumento de la DPA que se produce es mayor en las células M que en el tejido subepicárdico y subendocárdico del ventrículo, lo que aumenta la dispersión de la repolarización ventricular (Haverkamp y cols., 2000; Tseng, 2001; Redfern y cols., 2003).

Por último, existen mutaciones en el gen KCNH2 relacionadas con la aparición del síndrome de QT corto tipo 1 (SQTC1) (Brugada y cols., 2004). El SQTC se caracteriza por un acortamiento del intervalo QT del ECG ( $\leq 320$  ms) y una marcada aceleración de la

repolarización lo que predispone a padecer FA, FV y muerte súbita (Gussak y cols., 2000; Brugada y cols., 2004; Bjerregaard y Gussak, 2005). Hasta ahora se han descrito dos mutaciones relacionadas con el SQTc1, que consisten en la sustitución de una Asn por una Lys en posición 588 (Brugada y cols., 2004; Hong y cols., 2005) y una Thr por una Ile en posición 618 (Sun y cols., 2011). Ambas mutaciones producen un aumento de la corriente de salida de  $K^+$ , lo que se traduce en un acortamiento del intervalo QT (Brugada y cols., 2004; Schimpf y cols., 2005; Sun y cols., 2011).

#### *IV. La $I_{Ks}$*

El componente lento de la corriente de salida de  $K^+$  con rectificación tardía participa fundamentalmente en la fase 3 de los PA auriculares y ventriculares (Jespersen y cols., 2005; Tamargo y cols., 2004b). La importancia de la  $I_{Ks}$  en la repolarización se pone de manifiesto porque las mutaciones en los genes que codifican los canales que generan esta corriente están relacionadas con la aparición de diversos síndromes arritmogénicos (SQTL, SQTC, FA).

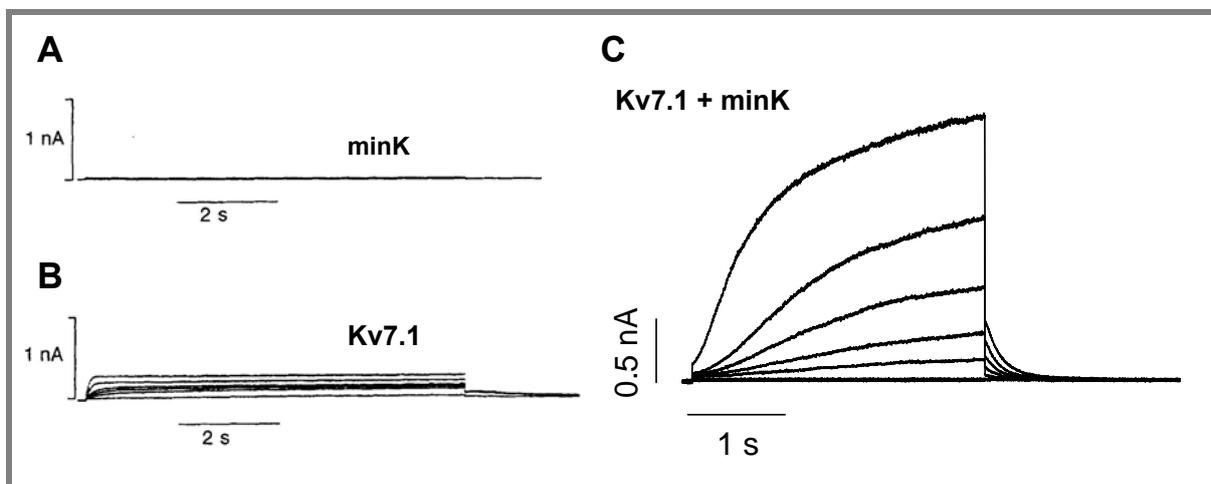
##### *IV.a. Características de la $I_{Ks}$*

La  $I_{Ks}$  se activa a potenciales más positivos de -30 mV y alcanza la mitad de su activación máxima a +20 mV (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Kurokawa y cols., 2001). La cinética de activación de la  $I_{Ks}$  es muy lenta y su amplitud máxima en estado estable (unas 10 veces mayor que la de la  $I_{Kr}$ ) sólo se alcanza con despolarizaciones extremadamente prolongadas (Mitcheson y Sanguinetti, 1999), mientras que su cinética de desactivación es muy lenta y dependiente de voltaje (Virag y cols., 2001). La  $I_{Ks}$  es la principal responsable del control de la DPA ventricular a frecuencias rápidas, ya que, al aumentar la frecuencia cardíaca, los canales que generan la  $I_{Ks}$  tienen menos tiempo para desactivarse y se acumulan en el estado abierto, propiciando una repolarización más rápida y el acortamiento de la DPA (Jurkiewicz y Sanguinetti, 1993; Delpón y cols., 1995).

##### *IV.b. Composición de los canales que generan la $I_{Ks}$*

La subunidad  $\alpha$  Kv7.1 (antiguamente denominada KvLQT1) se ensambla con la subunidad auxiliar minK para generar una corriente que se activa lentamente y cuyas características se corresponden con la  $I_{Ks}$  nativa (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols.,

1996b). La expresión en sistemas heterólogos de la subunidad  $\alpha$  Kv7.1 genera una corriente ( $I_{Kv7.1}$ ) que se activa rápidamente y se inactiva lentamente (Figura I.30B) y cuyas características son claramente diferentes a las de la  $I_{Ks}$  nativa (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b; Lee y cols., 1997). Por otro lado, la expresión de minK por sí sola no forma ningún canal funcional (Figura I.30A). Sin embargo, la coexpresión de ambas subunidades produce un incremento de la corriente generada, un retraso de la activación del canal y la desaparición de la inactivación, de manera que se obtiene una corriente con características muy similares a la  $I_{Ks}$  nativa (Figura I.30C) (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). Además, la presencia de minK modifica la sensibilidad al pH intracelular y a la temperatura (Unsold y cols., 2000) y aumenta la conductancia de los canales Kv7.1 (Pusch, 1998), así como su afinidad tanto por los inhibidores (cromanol 293B, HMR-1556, XE991) como por los activadores (el ácido mefenámico y los ácidos láurico, oléico y docosahexanoico) de la  $I_{Ks}$  (Busch y cols., 1997; Unsold y cols., 2000; Wang y cols., 2000b). Actualmente se acepta que la  $I_{Ks}$  se genera a través de canales formados por 4 subunidades  $\alpha$  Kv7.1 ensambladas con, al menos, 2 subunidades auxiliares minK (Chen y cols., 2003a) a través de un dominio en la región C-terminal de Kv7.1 (Schmitt y cols., 2000).



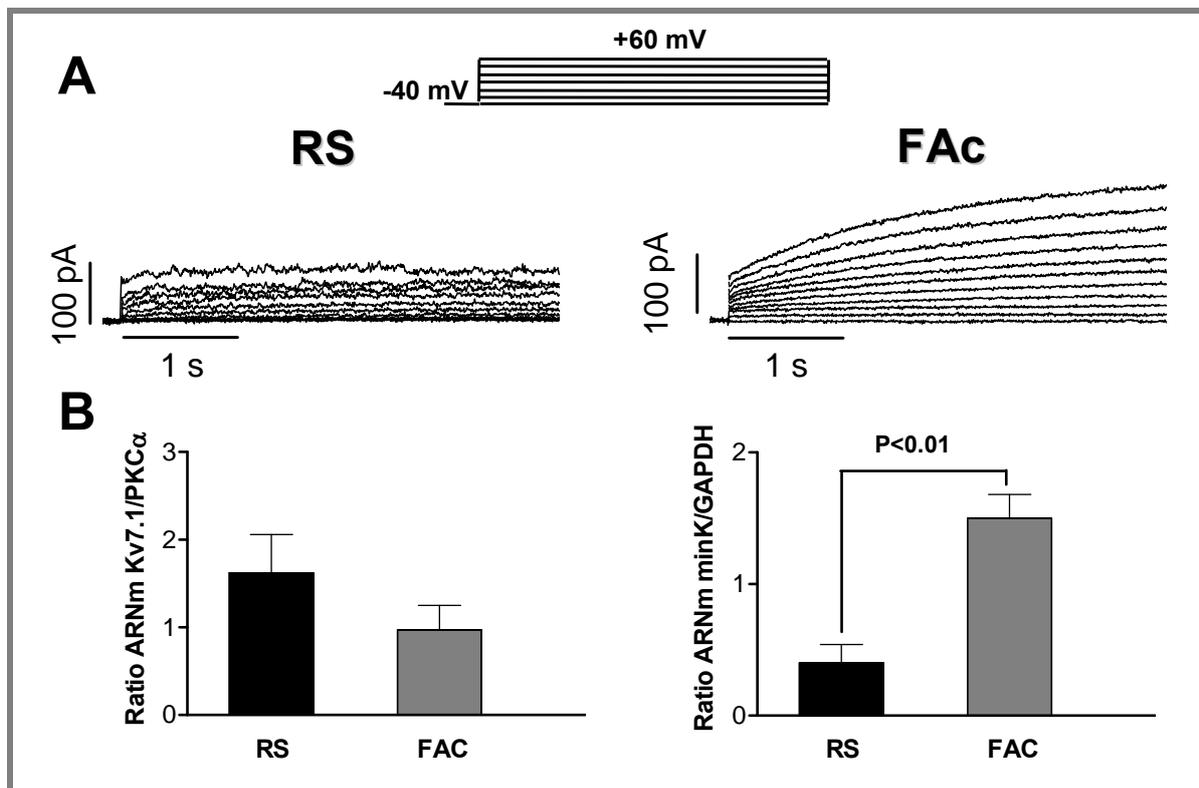
**Figura I.30. Características de la  $I_{Ks}$ .** (A y B) Corrientes registradas en células de mamífero transfectadas sólo con las subunidades minK (A) y Kv7.1 (B). (C) Corriente registrada en nuestro laboratorio con ambas subunidades a la vez. [Adaptadas de Sanguinetti y cols., 1996b (A y B)]

Hasta el momento se han identificado en el corazón 6 isoformas diferentes de Kv7.1 debidas a modificaciones postranscripcionales, siendo las isoformas 1 y 2 las de mayor expresión en el miocardio (Lee y cols., 1997; Pereon y cols., 2000). Además, se ha descrito que la subunidad Kv7.1 puede asociarse *in vitro* con los otros 4 miembros de la familia de

proteínas codificadas por los genes KCNE (MiRP1 a MiRP4) (McCrossan y Abbott, 2004; Bendahhou y cols., 2005).

#### IV.c. La $I_{Ks}$ en diversas patologías

Nuestro grupo ha descrito por primera vez, que la presencia de FAc aumenta tanto la amplitud como la densidad de la  $I_{Ks}$  en ambas aurículas por igual (Figura I.31A) (Caballero y cols., 2010a). Se habían descrito diferentes resultados (tanto aumentos como disminuciones) en cuanto a la expresión de Kv7.1 y de minK en FAc (Bosch y cols., 1999; Lai y cols., 1999; Gaborit y cols., 2005; Michael y cols., 2009). Nuestros resultados coinciden con aquellos que demostraban que en presencia de FAc se produce una disminución de la expresión de Kv7.1 y un aumento de la expresión de minK (Figura I.31B) (Caballero y cols., 2010a).



**Figura I.31. Aumento de la  $I_{Ks}$  en FA.** Corriente  $I_{Ks}$  registrada aplicando el protocolo de pulsos de la parte superior, en miocitos auriculares humanos de pacientes en RS y con FAc (A). Histograma del análisis densitométrico del ARNm Kv7.1 y minK en muestras procedentes de pacientes en RS y con FA (B) [Adaptadas de Caballero y cols., 2010a]

#### *IV.d. Canalopatías asociadas a las subunidades Kv7.1 y minK*

Diferentes mutaciones en los genes que codifican las subunidades Kv7.1 y minK se han relacionado con la aparición de SQTL, Síndrome de Jarwel Langer Nielsen (SJLN, variante autosómica recesiva del SQTL), SQTC y FA familiar.

Los SQTL asociados a la  $I_{Ks}$  se deben a mutaciones en los genes que codifican las subunidades Kv7.1 y minK (SQTL1 y SQTL5, respectivamente) y se caracterizan por una pérdida/disminución en la función de los canales resultantes (Chouabe y cols., 1997; Schulze-Bahr y cols., 1997; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003). De todas ellas, las mutaciones en la subunidad Kv7.1 son responsables de alrededor del 50% de los casos de SQTL (Roberts, 2006). Además, se ha descrito una mutación en el gen que codifica la proteína yotiao (proteína de anclaje para la PKA, AKAP, *A-Kinase Anchoring Protein*) que también cursa con prolongación del intervalo QT (SQTL11) (Chen y cols., 2007). La regulación  $\beta$ -adrenérgica de la  $I_{Ks}$  requiere el ensablaje de la proteína yotiao con la subunidad  $\alpha$  Kv7.1 (Marx y cols., 2002).

Existen además otras mutaciones en los genes KCNQ1 y KCNE1 relacionadas con la aparición de SJLN, que se caracterizan por una pérdida/disminución en la función de los canales que se forman (Chouabe y cols., 1997; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003).

Por otra parte, se ha descrito una mutación en la subunidad  $\alpha$  Kv7.1 (V307L) que produce una ganancia de función del canal y que está relacionada con la aparición de SQTC (SQTC2) (Belloq y cols., 2004) y mutaciones en Kv7.1 (Chen y cols., 2003b) y MiRP1 (Yang y cols., 2004) que se caracterizan también por producir una ganancia de función de los canales que generan y que se han asociado con la aparición de FA familiar.

### **3. FIBRILACIÓN AURICULAR**

La FA es una taquiarritmia supraventricular caracterizada por una activación auricular descoordinada y la presencia en el ECG de una actividad auricular rápida (>350 latidos/min) de amplitud variable, que conduce a un deterioro de la función mecánica y a una respuesta ventricular irregular (Chugh y cols., 2001; Peters y cols., 2002; Nattel, 2002; Maisel y Stevenson, 2003; Fuster y cols., 2006; Camm y cols., 2010 y 2012).

La FA, tal como establecen el *American College of Cardiology*, la *American Heart Association* y la *European Society of Cardiology*, se clasifica en: a) FA de primer diagnóstico, cuando el paciente presenta FA por primera vez, sin tener en cuenta la duración de la arritmia ni la persistencia y severidad de los síntomas; b) FA paroxística, caracterizada por la aparición de episodios que duran menos de 7 días, con carácter autolimitado y que no requiere medicación; c) FA persistente, en la que la arritmia suele durar más de una semana y puede requerir cardioversión farmacológica o eléctrica para restaurar el RS, y d) FA permanente o crónica, de duración superior a 6 meses y que no responde a cardioversión.

La FA es la arritmia cardiaca de mayor prevalencia en la población general (1-2%) y la que más hospitalizaciones y gastos sanitarios origina (Benjamin y cols., 1998; Chugh y cols., 2001; Fuster y cols. 2006). El número de casos de FA aumenta con la edad, desde un 0.5% de prevalencia en pacientes de entre 40-50 años, en torno a un 10 % en pacientes de 80 años y más de un 18% en pacientes de más de 85 años (Fuster y cols., 2006; Camm y cols., 2010). Más de 6 millones de europeos padecen esta arritmia y debido al progresivo envejecimiento de la población, se estima que su prevalencia se duplique en los próximos 50 años (Miyasaka y cols., 2006; Heeringa y cols., 2006; Camm y cols., 2010; Lip y cols., 2012).

La FA duplica la mortalidad del paciente independientemente de otros factores de riesgo diagnosticados (Stewart y cols., 2002). Se diagnostica en un 15-35% de los pacientes con insuficiencia cardiaca (Maisel y Stevenson, 2003) y además, provoca un aumento en el número de casos de infarto (aproximadamente el 20% se deben a FA) (Kirchof y cols., 2007). La FA desorganiza completamente la contractilidad auricular provocando la aparición de zonas de flujo turbulento y otras donde se produce remansamiento sanguíneo, favoreciendo la aparición de trombos intra-auriculares hasta en un 26% de los pacientes, lo que explica, parcialmente, el aumento de la incidencia de eventos tromboembólicos e ictus producido por la FA (5.3% vs. 0.8% en pacientes tratados con antiagregantes y anticoagulantes) (Atrial Fibrillation Investigators, 1994; Stoddard y cols., 1995; Wolf y cols., 1996).

### **3.1. Génesis de la FA**

A pesar del esfuerzo dedicado al estudio de la FA, no se ha identificado un factor único que pueda considerarse *per se* la causa de la génesis y del mantenimiento de la FA. Los datos disponibles hasta el momento, sugieren que la patogénesis de la FA es multifactorial. Se puede deber bien a la aparición de un foco ectópico con actividad eléctrica automática (localizado generalmente en las venas pulmonares) que produce frentes de onda a elevadas

frecuencias que se conducen al resto de la aurícula de forma fibrilatoria, o bien, a la invasión de las aurículas por múltiples fuentes de reentrada de forma simultánea y desorganizada (reentrada por múltiples ondas). Ambos mecanismos no son excluyentes entre sí y de hecho es probable que puedan coexistir siendo los causantes de la aparición y del mantenimiento de la FA (Nattel, 2002; Fuster y cols., 2006; Kourliouros y cols., 2009).

Estos dos mecanismos electrofisiológicos consisten en:

A) *Reentrada por múltiples ondas*. En esta hipótesis, todo el miocardio auricular participa en el mantenimiento de frentes simultáneos de activación que continuamente giran, se dividen, se fusionan o se extinguen. Este mecanismo de reentrada implica el fraccionamiento de los frentes de onda que se propagarían por las aurículas y se autoperpetuarían como “ondas hijas” (Moe y Abildskov, 1959, Moe y cols., 1964). Aunque esta hipótesis se postuló en los años 60, el soporte experimental de esta teoría no llegó hasta los años 80, gracias a los experimentos de Allesie y colaboradores. Estos autores demostraron la existencia de múltiples ondas de propagación que provocaban una actividad auricular turbulenta (Allesie y cols., 1985; Jalife, 2011) y que eran necesarios entre 4 y 6 frentes de onda para que la FA se pudiera mantener (Allesie y cols., 1985; Comtois y cols., 2005; Jalife, 2011). Según este modelo, el número de ondas presentes para el mantenimiento de la FA depende del periodo refractario, de la masa de la aurícula y de la velocidad de conducción en diferentes partes de la misma (Rensma y cols., 1988). Es decir, todo el miocardio auricular participa en el mantenimiento de frentes simultáneos que invaden las aurículas de forma caótica sin seguir un patrón. Además, los registros simultáneos mediante múltiples electrodos apoyaron la hipótesis de los múltiples frentes de onda en seres humanos (Cox y cols., 1991). Sin embargo, estudios cartográficos experimentales y clínicos pusieron en duda este mecanismo como única causa de FA (Mandapati y cols., 2000; Sanders y cols., 2005).

B) *Origen focal de la FA*. El origen focal de la FA estaba basado en modelos experimentales en los que se demostraba que la arritmia persiste en regiones aisladas en el miocardio auricular. Ya a principios del siglo XX, Winterberg y cols. postularon que la FA se producía por un foco ectópico cuya actividad se conducía al resto de la aurícula (Winterberg, 1907). Cincuenta años después, Scherf recuperó la teoría de la existencia de un foco automático para explicar la génesis de la FA (Scherf, 1958). Sin embargo, en los años 60 la teoría dominante era la de la reentrada por múltiples ondas y, por ello, no se prestó más atención a la teoría focal hasta los trabajos del Dr. Haïssaguerre. En estos trabajos se describían casos de FA paroxística en pacientes debidos a descargas focales repetitivas desde las venas pulmonares que podían ser suprimidas mediante la ablación del foco de origen

(Haïssaguerre y cols., 1998). Estudios cartográficos de FA en corazones de oveja apuntaban a un generador primario local, que consistía en un pequeño circuito de reentrada, o bien un foco activo ectópico (Morillo y cols., 1995; Mansour y cols., 2001). Los focos situados en la aurícula izquierda parecían tener una particular importancia, probablemente relacionada con la localización de las venas pulmonares en la aurícula izquierda. Otra teoría sobre el origen focal de la FA a nivel de las venas pulmonares, consiste en la existencia de un único, o un pequeño número de circuitos de microentrada o “rotores”. Winefree definió como *rotor* a la rotación estable de reacción y difusión que rodea a un pivote (Winfree, 1978). Estos pivotes o singularidades de fase se crean tras la rotura de un frente de onda al encontrarse en su propagación con tejido refractario o con un obstáculo anatómico. En ese punto de ruptura, el frente de propagación se curva y se enlentece hasta llegar a converger con su propia cola de refractariedad, creándose un rotor de activación.

Estos rotores se mantienen por sí mismos pero requieren estar anclados anatómicamente a un tejido muscular cardíaco heterogéneo (Samie y cols., 2001; Jalife y cols., 2002). Hocini y cols., concluyeron que el tejido miocárdico de las venas pulmonares se caracteriza por una anisotropía mucho mayor que la del resto del miocardio condicionado por la compleja disposición de los haces de fibras miocárdicas que cambian de dirección en muchos puntos. Esta característica determina las grandes diferencias en la velocidad de conducción del impulso en las porciones de epicardio y endocardio que rodean las venas pulmonares. Además, en el tejido conviven PAs extraordinariamente breves con otros normales y prolongados. La marcada anisotropía y la heterogeneidad en la repolarización (Hocini y cols., 2002) son el sustrato perfecto para que cualquier extrasístole (generada en las células automáticas de la zona) desencadene un rotor. Aunque no universalmente aceptada, la teoría de los rotores se ha convertido en una importante explicación mecanística de la FA (Voigt y cols., 2010; Skanes, 2009; Jalife, 2011; Narayan y cols., 2012).

El análisis de la dinámica de los rotores ha demostrado que el aumento de la  $I_{K1}$  acelera y estabiliza los rotores en modelos de FA crónica, mientras que el bloqueo individual de la  $I_{Kur}$  y de la  $I_{to1}$ , pero no de la  $I_{Kr}$  ni de la  $I_{Ks}$ , produce la terminación de los rotores debido a la prolongación en la fase de meseta en lugar de la fase terminal del PA (Pandit y cols., 2005).

Afortunadamente, es posible identificar las regiones de actividad periódica mediante análisis espectral de alta resolución. En la mayoría de los casos experimentales, la pared posterior de la AI es la que alberga las fuentes con actividad espacio-temporal organizada de forma más rápida. (Mandapati y cols., 2000; Kalifa y cols., 2006). Los frentes de onda generados por estas fuentes toman patrones de conducción espacialmente complejos a medida

que se acercan a la AD, y en conjunto, se manifiestan como un patrón de conducción fibrilatoria (Berenfeld y cols., 2002). El aporte experimental a la idea de que la mayoría de las fuentes de FA se localiza en la AI viene de estudios en pacientes que muestran que el aislamiento quirúrgico de las venas pulmonares es una estrategia efectiva para parar la FA paroxística (Medi y cols., 2010).

### 3.2. Causas y condiciones asociadas a la FA

En los últimos años se han demostrado diversas causas y condiciones asociadas a la FA:

- Causas reversibles. La FA puede ser un proceso temporal asociado a la ingesta de alcohol, cirugía cardíaca/coronaria, infarto de miocardio, pericarditis, miocarditis, embolismo pulmonar y otras enfermedades pulmonares, hipertiroidismo y otros desórdenes metabólicos. Por lo general, en estos casos, el tratamiento de la causa termina con el episodio de FA (Fuster y cols., 2006; Camm y cols., 2010).

- FA sin enfermedad cardíaca asociada. Aproximadamente el 30-45% de los casos de FA paroxística y el 20-25% de los casos de FA permanente se producen en pacientes jóvenes sin ninguna enfermedad cardiovascular previa (Levy y cols., 1999). Por otra parte, la edad aumenta el riesgo de desarrollar FA, posiblemente debido al envejecimiento del tejido miocárdico y a los trastornos en la conducción derivados del mismo (Camm y cols., 2010).

- FA asociada a enfermedad cardíaca. Las enfermedades cardíacas más comunes que se asocian a la FA son 13 las valvulopatías, la insuficiencia cardíaca, la cardiopatía isquémica y la HTA, en particular cuando hay hipertrofia del ventrículo izquierdo. Además, la FA también puede estar asociada a miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada y cardiopatías congénitas (Fuster y cols., 2006; Camm y cols., 2010).

- La obesidad es un importante factor de riesgo independiente para desarrollar FA, ya que en los pacientes obesos se produce una dilatación de la AI, lo que crea un sustrato idóneo para el mantenimiento de la arritmia (Frost y cols., 2005). En el estudio *Europace*, un 25% de los sujetos con FA, tenían un IMC >27.5 (indicador de obesidad moderada) (Nabauer y cols., 2009).

- FA familiar o genética. La FA familiar es más frecuente de lo que se pensó previamente, pero debe diferenciarse de la FA secundaria a otras cardiomiopatías familiares. Se han descrito formas de FA asociadas con mutaciones en el gen que codifica el péptido natriurético auricular (Hodgson-Zingman y cols., 2008), mutaciones de pérdida de función en

el gen que codifica la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio (*SCN5A*) (Amin y cols., 2010), o de ganancia de función en el gen *KCNQ1* y en el *KCNJ2*, que codifican las subunidades  $\alpha$  del canal de potasio Kv7.1 y del canal con rectificación interna Kir2.1, respectivamente (Chen y cols., 2003b; Xia y cols., 2005), y en el del gen que codifica su subunidad accesoria MiRP1 (Yang y cols., 2004), provocando un aumento de la  $I_{Ks}$ .

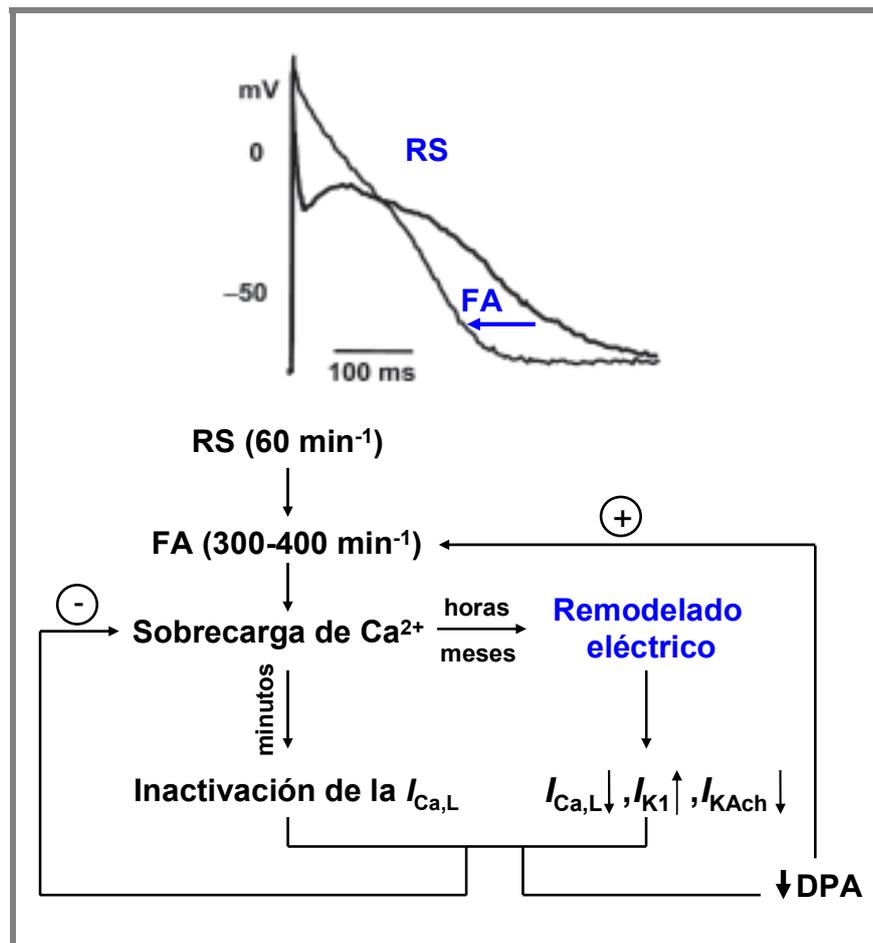
- Influencia del sistema nervioso autónomo de FA. El equilibrio entre las influencias simpáticas y vagales es un importante predictor de FA. Descargas simultáneas simpático-vagales contribuyen al desarrollo y mantenimiento de arritmias auriculares, ya que aumentan tanto la  $I_{CaL}$ , como la liberación espontánea de  $Ca^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico, acortando la DPA, y esto no sólo ocurre en FA paroxística, sino que pueden promover la cronificación de la misma (Shen y cols., 2012). Por lo general, la FA por mediación vagal se presenta por la noche o después de las comidas, mientras que la FA de tipo adrenérgico ocurre típicamente durante el día (Maisel, 2003). Nuevas estrategias que incluyen la ablación y la estimulación neural pueden reducir la actividad nerviosa arritmogénica, pero es necesario un mayor conocimiento de las mismas para poder ser aplicadas a nivel clínico (Shen y cols., 2012).

### 3.3. Remodelado en la FA

La propia FA provoca una alteración de las propiedades auriculares, tanto a nivel electrofisiológico como a nivel estructural, promoviendo su mantenimiento y recurrencia ya que hace que la aurícula se convierta en el sustrato idóneo para la perpetuación de la arritmia. Así pues, se puede decir que la FA promueve la FA (*AF begets AF*) (Wijffels y cols., 1995; Nattel y cols., 2000; Workman y cols., 2001; Krogh-Madsen y cols., 2012) Esta adaptación fisiopatológica de las aurículas al ritmo fibrilatorio se denominó *remodelado auricular*. Más específicamente, los cambios que afectan a la excitabilidad y la actividad eléctrica de los miocitos auriculares se denominaron *remodelado eléctrico* y los cambios en el tamaño de la cámara, depósito de colágeno y estructura en general, se denominaron *remodelado estructural* (Van Wagoner y Nerbonne, 2000).

### 3.3.1. Remodelado eléctrico

El remodelado eléctrico consiste, fundamentalmente, en el acortamiento de la DPA y del periodo refractario auricular a todas las frecuencias de estimulación, lo que permite que un mayor número de frentes de onda de excitación convivan simultánea y desordenadamente en la aurícula (Figura I.32) (Wijffels y cols., 1995; Nattel y cols., 2000; Allessie y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004a; Dobrev, 2006; Schotten y cols., 2011; Wakili y cols., 2011; de la Fuente y cols., 2012).



**Figura I.32. Hipótesis de la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en el remodelado eléctrico de la FA.** Los miocitos se adaptan a la taquicardia auricular disminuyendo la carga de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto ocurre mediante la reducción de la  $I_{\text{Ca,L}}$ , y todas las modificaciones en las corrientes de potasio que conforman el remodelado eléctrico, pero a expensas del acortamiento en la DPA y por lo tanto, de una mayor susceptibilidad a la recurrencia y cronificación de la FA. [Adaptada de Dobrev 2006].

El acortamiento de la DPA y la pérdida de la adaptación a la frecuencia son detectables tanto en tejido auricular como en miocitos auriculares de pacientes con FAc (Boutjdir y cols., 1986). Este acortamiento es debido a cambios en la expresión y en las propiedades de los canales iónicos responsables de las corrientes que generan el PA auricular (Van Wagoner y

cols., 1999; Nattel y cols., 2000; Gaborit y cols., 2005; Schotten y cols., 2011; Wakili y cols., 2011; Michael y cols., 2009; de la Fuente y cols., 2012). De hecho, se ha descrito que el remodelado eléctrico puede ocurrir tanto a nivel de la expresión de los canales iónicos como por la alteración de las propiedades de los mismos (Kumagai y cols., 1991; Elvan y cols., 1999; Ausma y cols., 1997; Gaspo y cols., 1997; Van Wagoner y cols., 1999; Nattel y cols., 2000; Van der Velden y cols., 2000; Goette y Lendeckel, 2004; Gaborit y cols., 2005). Así, la amplitud de la principal corriente de entrada de la fase de meseta, la  $I_{Ca,L}$ , se reduce un 70% en pacientes con FA (Van Wagoner y cols., 1999; Bosch y cols., 1999) como consecuencia de una disminución en la expresión del ARNm y de la proteína Cav1.2 que forma el canal (Brundel y cols., 1999 y 2001; Gaborit y cols., 2005). La disminución en la  $I_{Ca,L}$ , es un mecanismo compensatorio para evitar la sobrecarga en la concentración de  $Ca^{2+}$  que se produce en la FA. En cuanto a la  $I_{Na}$ , se ha descrito que permanece inalterada (Bosch y cols., 1999) y que la expresión de la subunidad  $\alpha$  de los canales de  $Na^+$  no se ve modificada por la presencia de FA (Brundel y cols., 2001), por tanto se cree que las alteraciones en la  $I_{Na}$  no contribuyen al remodelado eléctrico que produce la FA.

En lo que respecta a los canales de salida de  $K^+$ , la FA produce una marcada disminución de la  $I_{to}$ , atribuida a una disminución en el nivel de ARNm y en la expresión de la proteína Kv4.3 (Van Wagoner y cols., 1999; Bosch y cols., 1999; Brundel y cols., 2001; Workman y cols., 2001; Michael y cols., 2009; Caballero y cols., 2010a; Nattel y cols., 2010). En cuanto a la  $I_{Kur}$ , se ha descrito que, aunque los niveles de ARNm de Kv1.5 no se modifican, la cantidad de proteína se reduce en pacientes con FAc debido a un proceso proteolítico, haciendo que la  $I_{Kur}$  también se vea disminuida (Van Wagoner y cols., 1999; Bosch y cols., 1999; Brundel y cols., 2001; Christ y cols., 2008; Caballero y cols., 2010a). Esta reducción de la  $I_{Kur}$  y de la  $I_{to}$  no era predecible en un primer momento, ya que la reducción de estas corrientes prolonga la DPA y el periodo refractario y, sin embargo, en la FA lo que se observa es un acortamiento muy marcado de la DPA. Se ha propuesto que la disminución de estas corrientes podría ser un mecanismo de defensa celular en un intento de contrarrestar el acortamiento de la DPA provocado por la disminución de la  $I_{Ca,L}$ .

La FAc no modifica la  $I_{Kr}$  auricular (Bosch y cols., 1999; Caballero y cols., 2010a). En cuanto a la  $I_{Ks}$ , nuestro grupo ha descrito recientemente y por primera vez, cómo la FAc produce un marcado aumento de esta corriente (Caballero y cols., 2010a). La  $I_{Ks}$  se acumula a frecuencias elevadas debido a su lenta cinética de desactivación, es decir, cuanto más rápida sea la frecuencia cardiaca, mayor será la salida de  $K^+$ , y por tanto, más corta la DPA, favoreciendo el mantenimiento de la conducción fibrilatoria (Muñoz y cols., 2007). El

aumento de la  $I_{Ks}$  parece ser debido a un aumento de la expresión de la subunidad minK (Caballero y cols., 2010a).

La FAc produce importantes alteraciones en las corrientes de potasio con rectificación interna. La  $I_{K1}$  aumenta marcadamente con la FAc, debido a un aumento en la expresión de los canales Kir2.1, responsables de la generación de esta corriente y a un aumento en la probabilidad de apertura del canal (Bosch y cols., 1999; Workman y cols., 2001; Dobrev y cols., 2001; Gaborit y cols., 2005; Voigt y cols., 2010). Por otra parte, se ha descrito que los pacientes con FAc presentan una activación constitutiva de la  $I_{KAch}$  en comparación con los pacientes en RS, a pesar de que se observa una disminución tanto del ARNm como de las proteínas Kir3.1 y 3.4, formadoras de los canales responsables de esta corriente (Brundel y cols., 2001). Esta activación constitutiva es debida a una fosforilación anormal del canal mediada por PKC (Cha y cols., 2006; Dobrev y cols., 2005; Schotten y cols., 2011).

Todas estas modificaciones favorecerían la coexistencia de múltiples frentes de onda invadiendo desordenadamente la aurícula, a la par que la aparición de microcircuitos de reentrada (rotores) (Mandapati y cols., 2000; Samie y cols., 2001).

### 3.3.2. Remodelado estructural y contráctil

La FA se acompaña de alteraciones estructurales progresivas del tejido auricular, como la dilatación y la fibrosis, que crean un substrato perfecto para el mantenimiento de la FA, aumentando el tamaño de la aurícula y disminuyendo la velocidad de conducción del impulso eléctrico, respectivamente (Henry y cols., 1976; Ausma y cols., 1997; Allessie y cols., 2001). Hoy en día, la dilatación auricular es considerada como uno de los principales mecanismos que determinan la iniciación y la perpetuación de la FA.

A nivel celular, los cambios fundamentales en los miocitos auriculares son: a) aumento del tamaño, b) aumento del glucógeno perinuclear, c) pérdida central de los sarcómeros (miolisis), d) alteración en la expresión de conexinas (Takeuchi y cols., 2006), e) cambios en la forma de las mitocondrias, f) distribución homogénea de la cromatina nuclear y g) cambios en la calidad y la localización de las proteínas estructurales celulares (Allessie y cols., 2002; Aldhoon y cols., 2010). Obviamente, las alteraciones en la estructura de la aurícula no están exclusivamente relacionadas con la FA, y hay que tener en cuenta que la mayoría de los pacientes con FAc son personas de edad avanzada y/o padecen otras enfermedades cardiovasculares que afectan a la estructura cardiaca. Sin embargo, se ha descrito que en pacientes con FA aislada existe una patología auricular que conlleva necrosis de los miocitos,

miocarditis y fibrosis (Frustaci y cols., 1991 y 1997). Dentro de todos los factores que afectan a la estructura del miocardio auricular, los que han sido estudiados más extensamente son la fibrosis auricular y la alteración en la expresión de conexinas. Se cree que el primero es uno de los factores más importantes en la formación del sustrato para la FA (Nattel, 2004).

Por otra parte, se ha comprobado el papel de la inflamación y de las especies reactivas de oxígeno en la FA. Coincidiendo con las recurrencias de FA en el segundo o tercer día postoperatorio (Bruins y cols., 1997), tanto en pacientes con FA persistente como paroxística (Aviles y cols., 2003) se ha encontrado un aumento muy marcado en las concentraciones de la proteína C reactiva, un importante marcador de inflamación. Por otro lado, los principales efectores del daño oxidativo auricular parecen ser la NADPH-oxidasa miocárdica y la NO sintasa endotelial (Kim y cols., 2005b). Un análisis del perfil de transcripción genética del tejido auricular de pacientes con FA mostraba una tendencia a la expresión de genes prooxidativos (Kim y cols., 2003). Además, se ha demostrado que el daño oxidativo en el miocardio auricular de pacientes con FA se debe principalmente a la acción local de radicales hidroxilo y peroxinitrito (Mihm y cols., 2001).

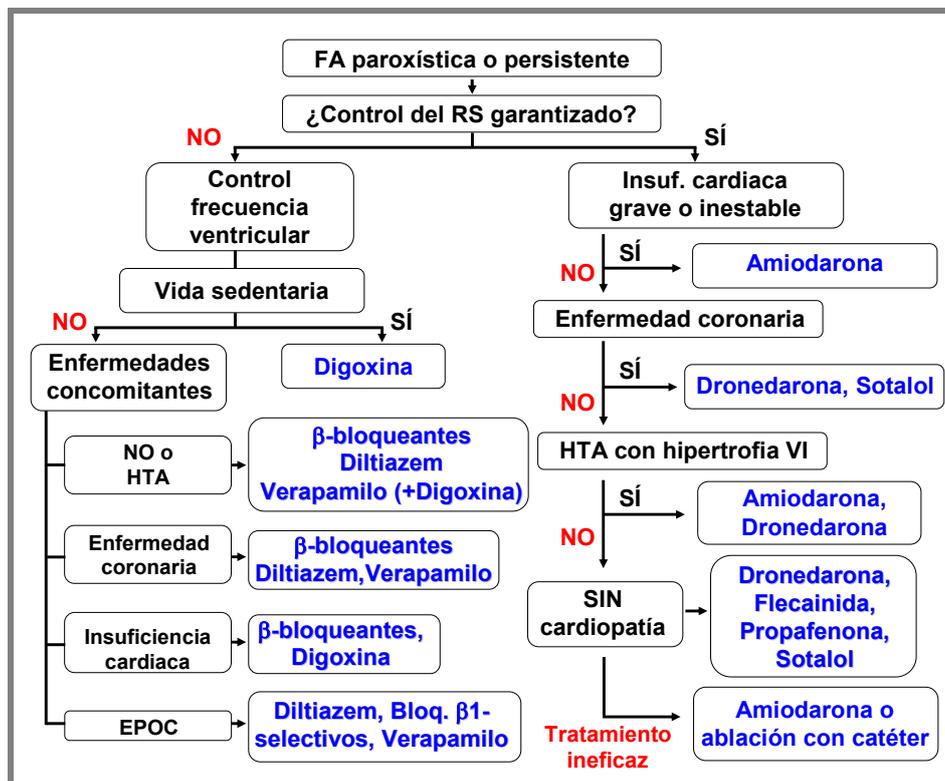
Además del remodelado estructural, se produce un remodelado mecánico caracterizado por la pérdida de la contractilidad auricular lo cual provoca el estasis sanguíneo en la cavidad, lo que contribuye significativamente al riesgo de tromboembolismo asociado a FA (Berger y Schweitzer, 1998). La pérdida de contractilidad auricular también potencia la dilatación auricular progresiva durante la FA y podría contribuir a la posterior estabilización de la arritmia (Schotten y cols., 2004).

### **3.4. Tratamiento farmacológico de la FA**

La falta de tratamiento y/o episodios previos no detectados de FA inducen cambios electrofisiológicos y estructurales en el miocardio, haciendo que la restauración del RS sea cada vez más difícil. En estudios de seguimiento a largo plazo se ha descrito que una proporción significativa de pacientes con FA paroxística progresaron a FA crónica (Kato y cols., 2004; de Vos y cols., 2010). El remodelado eléctrico producido por la FA puede ser revertido en algunos pacientes si se mantiene el RS desde etapas tempranas, lo que sugiere que un diagnóstico precoz y un tratamiento adecuado de la FA son críticos (Hobbs y cols., 2000; Aliot y cols., 2011).

Aunque se han desarrollado varias aproximaciones terapéuticas no farmacológicas (cirugía, ablación con catéter, cardioversión eléctrica), la terapia con fármacos antiarrítmicos

es el soporte principal del tratamiento de la FA (Tamargo y cols., 2009). El tratamiento farmacológico de la FA recomendado en las guías terapéuticas actuales presenta dos estrategias principales: a) la restauración y mantenimiento del RS, mediante el uso de antiarrítmicos de clase I (fundamentalmente, propafenona y flecainida) y de clase III (amiodarona y sotalol) o b) permitir el desarrollo de la FA pero controlar el ritmo ventricular, mediante el uso de fármacos bloqueantes del nodo AV (bloqueantes del canal de  $Ca^{2+}$ : diltiazem y verapamilo, beta-bloqueantes y amiodarona). La decisión de qué estrategia seguir depende de varios factores, incluyendo el patrón de presentación y la presencia o ausencia de otras condiciones previas (Figura I.33). Además, es esencial, en combinación con cualquiera de las dos estrategias, tratar al paciente con fármacos anticoagulantes para evitar trombosis y accidentes cerebro-vasculares (Fuster y cols., 2006; Tamargo y cols., 2009; Aliot y cols., 2011; Camm y cols., 2010; Lip y cols., 2012).



**Figura I.33. Elección de fármacos antiarrítmicos en función de patología subyacente.** Algoritmos de los tratamientos para el control de la frecuencia ventricular en FA (parte izquierda) y para el control del RS (parte derecha). EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica, HTA: hipertensión arterial, VI: ventrículo izquierdo. [Adaptada de Lip y cols., 2012].

En general, los fármacos antiarrítmicos utilizados actualmente para el tratamiento de la FA son útiles, pero su efecto es limitado, debido, principalmente al remodelado auricular causado por la FA (Cosío y Delpón, 2002; Tamargo y cols., 2004a). Es necesario que se sigan

buscando nuevas estrategias que mejoren la eficacia del tratamiento (cardioversión farmacológica temprana a RS, acortamiento de la duración de los episodios y prevención de las recurrencias) y que los posibles nuevos fármacos que se desarrollen disminuyan los efectos adversos ventriculares graves y potencialmente mortales de los fármacos antiarrítmicos clásicos (fibrilación ventricular e insuficiencia cardiaca congestiva). Existen nuevos fármacos en desarrollo, como el vernakalant y la dronedarona que parecen prometedores (Prystowsky y cols., 2010). Sin embargo, el avance en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la génesis y mantenimiento de la FA es la herramienta indispensable para la búsqueda de nuevos fármacos antiarrítmicos con un perfil de efecto y seguridad adecuados.

#### **4. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE**

Numerosos estudios realizados en las dos últimas décadas han demostrado la existencia de un sistema cannabinoide endógeno (SCE) en mamíferos (Pertwee, 1997; Di Marzo y Deutsch, 1998; Hillard, 2000; Howlett y cols., 2002). Desde entonces, y debido al creciente interés que el SCE ha generado, se ha estudiado la implicación de este sistema en gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos, lo que ha posibilitado la intervención sobre el mismo con fines terapéuticos (Baker y cols., 2003; Iversen, 2003; Di Marzo y cols., 2004; Ben Amar, 2006; Di Marzo y Petrocellis, 2006; Di Marzo y Petrosino, 2007). El SCE es un sistema regulador capaz de controlar la actividad motora, la memoria y el aprendizaje, el apetito, la emesis, la nocicepción, la presión arterial y el sueño entre otros procesos (Howlett y cols., 2002; Pertwee, 2005a; Pacher y cols., 2006; Mackie, 2008a). La modulación farmacológica del SCE permite por tanto un nuevo abordaje de diversas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, la esclerosis múltiple/lateral amiotrófica o el Alzheimer (Romero y Orgado, 2009), trastornos de la alimentación como la anorexia (Monteleone y cols., 2008) o la obesidad (Wang y Ueda, 2008), trastornos gastrointestinales como la diverticulosis o la colitis ulcerosa (Smid, 2008), fenómenos compulsivos relacionados con la adicción a drogas (Ross y Peselow, 2009), enfermedades cardiovasculares como la HTA (Pacher y cols., 2008) o la aterosclerosis (Fisar, 2009), y diferentes tipos de cáncer (Pisanti y Bifulco, 2009) entre otros (Pacher y cols., 2006; Di Marzo y Petrosino, 2007; Kogan y Mechoulam, 2007; Pacher y Steffens, 2009; Pertwee, 2009; Macarrone y cols., 2010; Miller y Devi, 2011).

El SCE está formado por los ligandos endógenos o *endocannabinoides*, las enzimas encargadas de su síntesis y degradación y sus receptores específicos.

#### 4.1. Endocannabinoides y análogos

Los endocannabinoides se definen como compuestos endógenos, producidos en diferentes órganos y tejidos, capaces de unirse a los receptores cannabinoides (receptores CB). Se han identificado varios tipos de cannabinoides endógenos, todos de naturaleza lipídica y derivados de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Dadas las propiedades hidrófobas de estos compuestos, durante algún tiempo existió la idea de que sus efectos podrían ser consecuencia de una interacción con los componentes lipídicos de la membrana celular. Este mecanismo sería similar al propuesto en la década de los setenta para algunos anestésicos, los cuales producían una desorganización de la fase lipídica con un aumento en la fluidez de la membrana plasmática. La resolución de la estructura de los endocannabinoides demostró posteriormente que este mecanismo sólo podía justificar una pequeña parte de los efectos producidos por estos compuestos.

La mayoría de los endocannabinoides están formados por una etanolamina unida mediante un enlace tipo amida a un ácido graso (Figura I.34). El primer endocannabinoide descubierto fue la anandamida (AEA, Devane y cols., 1992) que es la etanolamida del ácido araquidónico (AA, C<sub>20</sub>:4 $\Delta^{5,8,11,14}$ ).

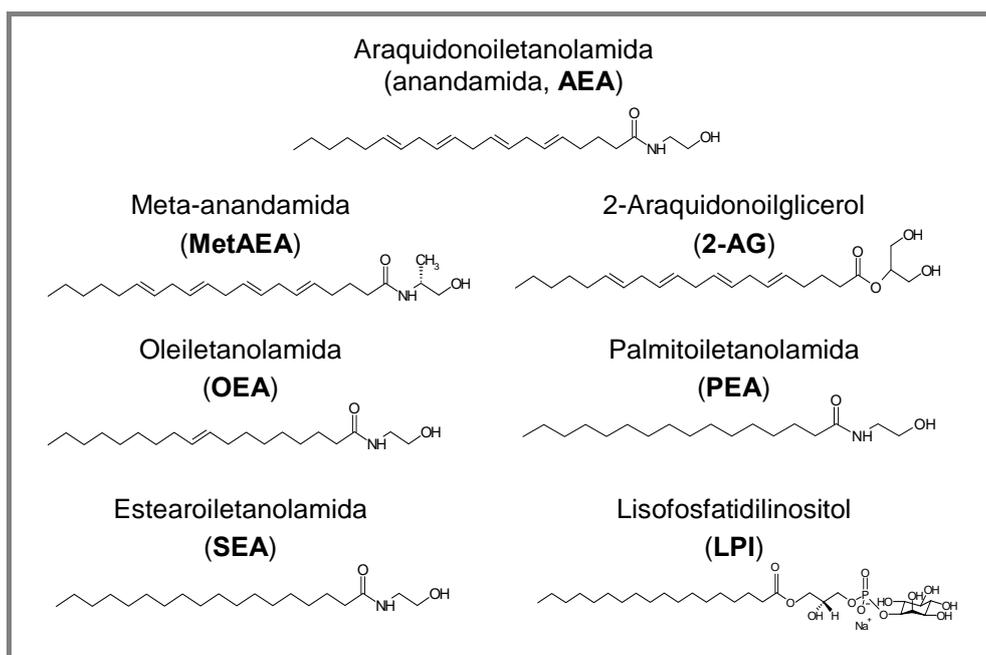


Figura I.34. Estructuras químicas de los endocannabinoides y sus análogos utilizados en el presente estudio.

La AEA es el agonista cannabinoide por excelencia. Su nombre procede del sánscrito “ananda” que significa felicidad, entretenimiento, placer. Tiene actividad farmacológica y efectos comportamentales muy parecidos a los del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC), el principal cannabinoide bioactivo de la planta *Cannabis sativa*. La AEA es un agonista parcial de receptores CB1 (Felder y cols., 1993; Frider y Mechoulam 1993) y CB2 en los que exhibe una menor actividad intrínseca (Tabla I.14) (Bayewitch y cols., 1995; Griffin y cols., 1998; Pertwee, 1999). La AEA ha sido identificada en cerebro y en tejidos periféricos humanos y de rata. Hay pequeñas cantidades de AEA en corazón humano y aparecen trazas en suero, plasma y líquido cefalorraquídeo (Felder y cols., 1996; Felder y Glass, 1998; Schmid y cols., 2000; Schreiber y cols., 2007).

A nivel experimental, y debido a su rápida hidrólisis por parte de la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH, *fatty acid amide hidrolase*), en muchas ocasiones se utiliza la R-(+)-meta-anandamida (MetAEA), un compuesto sintético estable que no puede ser hidrolizado por la FAAH (Abadji y cols., 1994; Lin y cols., 1998).

El 2-araquidonoilglicerol (2-AG) es un éster resultante de la reacción entre el AA y una molécula de glicerol (Figura I.34). Fue aislado por primera vez de intestino de perro (Mechoulam y cols., 1995) y tiene capacidad para unirse a receptores CB1 y CB2 (Mechoulam y cols., 1995; Sugiura y cols., 1995 y 1997). Se ha descrito que presenta mayor actividad intrínseca tanto en receptores CB1 como CB2 que la AEA (Pertwee, 1999; Gonsiorek y cols., 2000; Savinainen y cols., 2001). La presencia del 2-AG se ha detectado en corazón, cerebro, intestino, páncreas, bazo, hígado, pulmón, riñón, plasma y células endoteliales (Schmid y cols., 2000; Sugiura y cols., 1998; Sugiura y Waku, 2000).

La AEA y el 2-AG son los dos endocannabinoides de los que más datos se disponen, habiéndose propuesto su posible mecanismo de acción como neuromoduladores actuando cerca de sus sitios de biosíntesis (Di Marzo, 1999). Se ha propuesto que la activación de los receptores CB1 presinápticos por parte de estos endocannabinoides reduciría la actividad neuronal a través del bloqueo de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. Alternativamente, la activación de los receptores CB1 podría incrementar la entrada de  $K^+$ , lo que haría disminuir la excitabilidad neuronal y, en definitiva, la propagación del impulso nervioso (Hoffman y Lupica, 2000; Freund y cols., 2003; Piomelli 2003; Mackie, 2006).

El L- $\alpha$ -lisofosfatidilinositol (LPI) es un fosfolípido endógeno presente en diversos tejidos que ha sido propuesto como un nuevo ligando para el receptor GPR55 (Brown, 2007; Oka y cols 2007; Ryberg y cols., 2007). El LPI, al igual que la AEA o el 2-AG, se libera al medio extracelular para actuar como un compuesto autocrino o paracrino interviniendo en gran

variedad de funciones celulares como la modulación de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Corda y col., 2002) y de la actividad mitógena en células epiteliales (Falasca y Corda, 1994) o la estimulación de la proliferación celular (Falasca y cols., 1995).

Previamente al aislamiento de la AEA ya se disponía de información sobre la presencia en animales superiores de otros compuestos con estructuras parecidas (comparten un grupo amida unido a un ácido graso) como la oleoiletanolamida (OEA), la palmitoiletanolamida (PEA) o la estearoiletanolamida (SEA). Estos compuestos que no se unen o que tienen muy baja afinidad por CB1 y CB2 se clasifican como *análogos de endocannabinoides*, ya que se ha demostrado que actúan potenciando los efectos de algunos endocannabinoides (Ben Shabat y cols., 1998; Lambert y Di Marzo, 1999; Smart y cols., 2002; Franklin y cols., 2003) probablemente interfiriendo en su ruta de degradación, ya que todos ellos son susceptibles de ser hidrolizados por la FAAH (Jonsson y cols., 2001; Mackie y Stella, 2006; Dalle Carbonare y cols., 2008).

La PEA está formada por la unión del ácido palmítico (AP, C16:0) con un grupo etanolamida (Figura I.34), cuya presencia fue descrita por primera vez en cerebro, hígado y músculo esquelético de ratas (Bachur y cols., 1965). Posteriormente, se ha descrito su participación en procesos inflamatorios y en la actividad del sistema inmune (Facci y cols., 1995), en el control del dolor (Calignano y cols., 1998) y en procesos neuroprotectores (Skaper y cols., 1996; Lambert y cols., 2001; Hansen, 2010). Estos efectos desaparecían en presencia del antagonista CB2 SR144528 y puesto que se sabía que la PEA no tenía afinidad por estos receptores (Tabla I.14) (Showalter et al., 1996; Lin y cols., 1998; Ryberg y cols., 2007) se propuso que dichos efectos podrían ser debidos a la activación de un receptor *CB2-like* (Calignano y cols., 1998; Jaggar y cols., 1998). Sin embargo, el grupo de Di Marzo propuso que la PEA actuaba inhibiendo la expresión de la FAAH, lo que resultaría en un aumento en los niveles de AEA (Di Marzo y cols., 2001; De Petrocellis y cols., 2002).

La OEA se sintetiza principalmente en el intestino delgado de diversas especies animales (Rodríguez de Fonseca y cols., 2001). Está formada por una cadena hidrocarbonada de 18 átomos de carbono con una insaturación en el carbono 9 (ácido oléico, AO, C18:1 $\Delta^9$ ) y una etanolamida (Figura I.34). A pesar de su evidente similitud estructural con la AEA, no tiene afinidad por receptores CB (Tabla I.14) (Lin et al., 1998; Howlett, 2002). El efecto principal que se le atribuye es el de producir anorexia (Rodríguez de Fonseca y cols., 2001) a través de la activación del receptor nuclear activado por proliferador de peroxisomas (PPAR, *peroxisome proliferator-activated receptor*) (Fu y cols, 2003; Lo Verme y cols., 2005).

La SEA, formada por un ácido esteárico (AS, C18:0) y una etanolamida (Figura I.34), ha sido detectada en cerebro de rata, ratón, y humano a niveles más altos que la AEA y se le ha atribuido un efecto antiinflamatorio (Dalle Carbonare y cols., 2008). Aunque presenta poca afinidad por los receptores CB (Lin et al., 1998; Maccarrone y cols., 2002), la SEA se comporta como un análogo de endocannabinoides en experimentos realizados en ratón potenciando los efectos de la AEA (Maccarrone y cols., 2002).

Compuesto	CB1 CE <sub>50</sub> (nM)	CB2 CE <sub>50</sub> (nM)	GPR55 CE <sub>50</sub> (nM)	Referencia
<b>AEA</b>	543	1940	-	Felder y cols., 1995
	252	581	-	Mechoulam y cols., 1995
	61	1930	-	Lin y cols., 1998
	71.7	279	-	Hillard y cols., 1999
	31	27	18	Ryberg y cols., 2007
	-	-	>30 000*	Kapur y cols., 2009
<b>MetAEA</b>	28.3	868	-	Goutopoulos y cols., 2001
	17.9	868	-	Lin y cols., 1998
	-	-	>30 000*	Kapur y cols., 2009
<b>LPI</b>	-	-	1000	Oka y cols., 2007
	-	-	1200*	Kapur y cols., 2009
<b>PEA</b>	>30 000	19 800	4	Ryberg y cols., 2007
	-	-	>30 000*	Kapur y cols., 2009
<b>OEA</b>	>30 000	>30 000	440	Ryberg y cols., 2007
<b>2-AG</b>	472	1400	-	Mechoulam y cols., 1995
	58.3	145	-	Ben Shabat y cols., 1998
	519	618	3	Ryberg y cols., 2007
	-	-	>30 000*	Kapur y cols., 2009
<b>WIN55,212-2</b>	9.94	16.2	-	Rinaldi-Carmona y cols., 1994
	1.89	0.28	-	Showalter y cols., 1996
	4.4	1.2	-	Hillard y cols., 1999
	9.87	0.29	-	Iwamura y cols., 2001
	18	1	>30 000*	Ryberg y cols., 2007
<b>SR141716</b>	11.8	13200	-	Felder y cols., 1998
	5.6	>1000	-	Rinaldi-Carmona y cols., 1994
	-	-	3900*	Kapur y cols., 2009
<b>AM281</b>	12	4200	-	Lan y cols.; 1999
	-	-	>30 000	Ryberg y cols., 2007
<b>AM630</b>	5152	31.2	-	Ross y cols., 1999

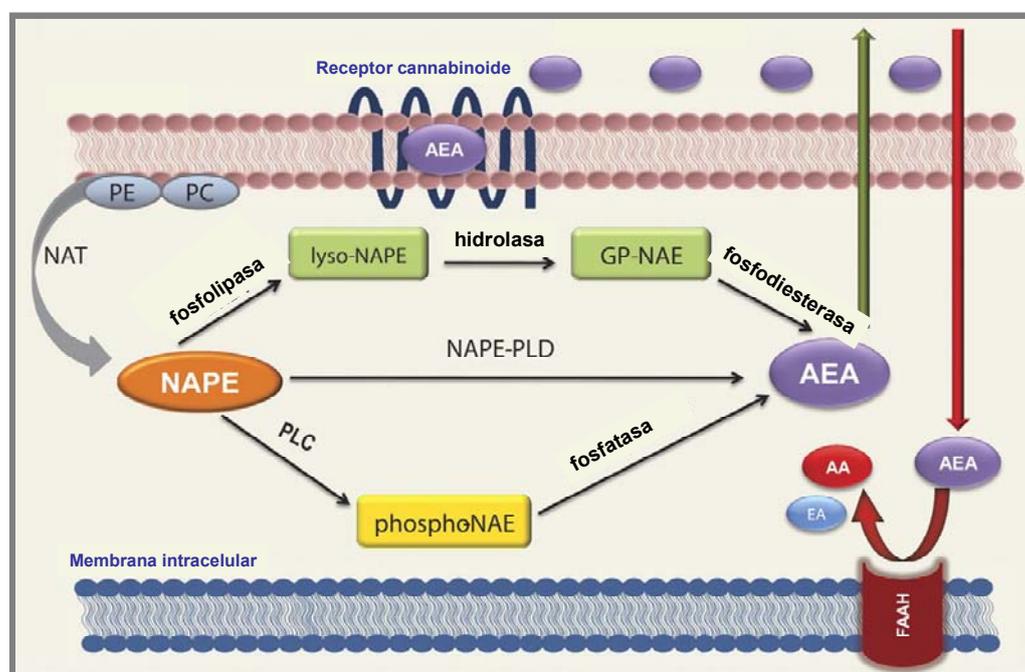
Tabla I.14. Perfil de la eficacia funcional (fijación a [<sup>35</sup>S]GTPγS) de los principales agonistas/antagonistas de los receptores CB1, CB2 y GPR55. [Adaptada de Ryberg y cols., 2007]. \* CE<sub>50</sub> calculada mediante ensayos con β-arrestina.

#### 4.2. Síntesis, transporte y degradación de los endocannabinoides

Los endocannabinoides se sintetizan “a demanda” a partir de componentes de las membranas celulares siendo, en este sentido, similares a otros mediadores como los leucotrienos o las prostaglandinas y diferentes a los neurotransmisores clásicos, que se almacenan en vesículas antes de ser liberados. Los endocannabinoides se sintetizan y liberan

en respuesta a un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  producida por una despolarización o tras la activación de un receptor metabotrópico acoplado a proteínas G, lo que sugiere que se producen en momentos de gran actividad del SNC (Mackie, 2006). Inmediatamente después de su síntesis, son rápidamente recaptados al interior celular para su posterior degradación por enzimas hidrolíticas intracelulares (Maccarrone y cols., 1998; Di Marzo, 1999; Piomelli y cols., 1999; Hillard y Jarrahian, 2000).

Existen varias hipótesis sobre el mecanismo de biosíntesis de la AEA, aunque la más aceptada es la que propone su formación a partir de la fosfatidiletanolamina presente en las membranas tras ser hidrolizada por fosfodiesterasas (Figura I.35) (Schmid y cols., 1983; Sugiura y cols., 2002). Esta ruta también es la ruta de síntesis de otras etanolamidas como la PEA, la OEA o la SEA (Schmid y cols., 1990), aunque en el caso de la PEA se ha descrito que su síntesis puede ser independiente de la producción de AEA o de 2-AG ya que se ha aislado una enzima hidrolítica distinta de la FAAH y específica para ella (NAAA, *N-acylethanolamine-hydrolysing acid amidase*) (Ueda y cols., 2001; Brown 2007). La síntesis de AEA también puede producirse conjuntamente con estos compuestos a partir de sus correspondientes ácidos grasos (AA, AP y AO) y un grupo etanolamina (Deutsch y Chin, 1993).



**Figura I.35. Esquema de biosíntesis y degradación de la AEA.** La formación de AEA puede ocurrir de tres formas: por conversión directa por la acción de la NAPE-PLD, a través de fosfolipasas con un paso previo donde interviene la PLC, y una tercera vía donde intervienen fosfolipasas, hidrolasas y fosfodiesterasa para finalmente formar la AEA. La enzima intracelular FAAH se encarga de la degradación de la AEA, dando lugar a AA y EA. AA: ácido araquidónico; EA: etanolamida; NAPE: N-araquidonoil-fosfatidiletanolamida; NAT: N-acetiltransferasa PC: fosfatidilcolina; PE fosfatidiletanolamida; PLC: fosfolipasa C, PLD: fosfolipasa D. [Adaptada de Snider y cols., 2010].

La biosíntesis del 2-AG se produce fundamentalmente a partir de fosfolípidos de membrana que contienen AA a través de la acción de fosfolipasas y diacilglicerol lipasas que están localizadas en la membrana plasmática y son estimuladas por  $\text{Ca}^{2+}$  y glutatión (Sugiura y cols., 1995; Bisogno y cols., 2003).

La degradación de los endocannabinoides tiene lugar en el citoplasma, por lo que es necesario que estos compuestos entren en el interior de la célula. A pesar de que hay controversia sobre si existe o no un sistema específico de transporte para la AEA, sí que hay un consenso sobre sus características: es un proceso rápido, saturable y dependiente de temperatura y puede ser regulado por diversos segundos mensajeros y vías de señalización (Di Marzo y cols., 1994; Hillard y cols., 1997; Piomelli y cols., 1999; Maccarrone y cols., 2000; Rakhshan y cols., 2000). Existen varias hipótesis sobre el mecanismo de recaptación de la AEA al interior celular. Al ser un compuesto lipídico podría atravesar la membrana por difusión facilitada, mecanismo que puede ser inhibido farmacológicamente (Piomelli y cols., 1999; Jarrahian y cols., 2000). Sin embargo se han obtenido datos muy sólidos de la existencia de un transporte mediado a través de una proteína transportadora (Beltramo 1997; Beltramo y Piomelli 2000; Hillard y Jarrahian, 2000; Moore y cols. 2005) que también estaría presente en el aparato cardiovascular (Calignano y cols., 1997). Este mecanismo de transporte podría ser bidireccional y funcionar tanto para introducir los endocannabinoides liberados como para liberarlos tras su síntesis (Di Marzo y Petrosino, 2007). También se ha propuesto que estos compuestos podrían ser recaptados por un mecanismo rápido de endocitosis tras concentrarse en *lipid rafts* (balsas lipídicas) ricos en caveolina (McFarland y cols., 2004; Dainese y cols., 2007).

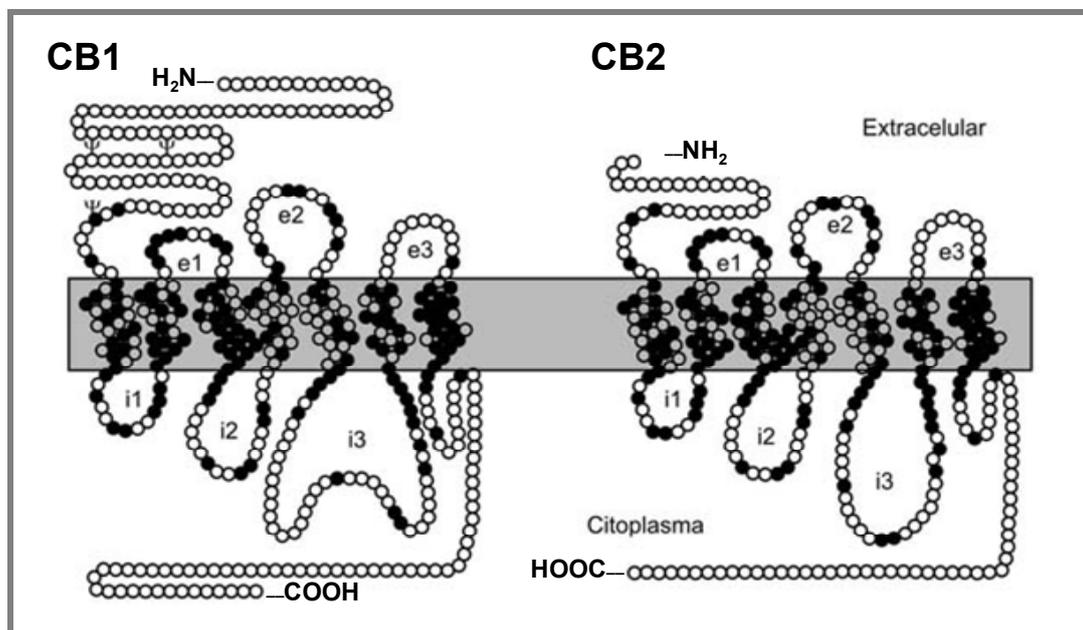
El 2-AG podría utilizar el mismo sistema de transporte que la AEA (Beltramo y Piomelli, 2000; Hajos y cols., 2004) o podría ser recaptado por un transportador similar, pero específico para este endocannabinoides (Bisogno y cols., 2001).

Una vez dentro de la célula, la AEA es hidrolizada por la acción de la FAAH dando lugar a AA y etanolamina. Ésta es una enzima intracelular que ha sido purificada, clonada y secuenciada en distintas especies como rata, ratón, cerdo y humano (Deutsch y Chin, 1993; Ueda y cols., 1995; Cravatt y cols., 1996; Giang y Cravatt, 1997; Maccarrone y cols., 1998; Di Marzo, 1999). Su actividad es relativamente selectiva para amidas y ésteres de ácidos grasos de cadena larga, por lo que esta enzima también puede hidrolizar el 2-AG (Di Marzo y cols., 1998; Goparaju y cols., 1999), aunque es la monoacilglicerol lipasa (MAGL) la que realiza esta función mayoritariamente, convirtiendo este endocannabinoides en AA y glicerol (Konrad y cols., 1994).

Recientemente se ha propuesto un nuevo concepto sobre la posible acumulación de la AEA: tras ser recaptada desde el exterior celular se une a una proteína específica (Kaczocha y cols., 2009; Oddi y cols., 2009) que la transporta hasta unas organelas denominadas adiposomas donde se acumularía (Oddi y cols., 2008). Los adiposomas, además de cómo lugar de almacenamiento, servirían de soporte para el tráfico, el metabolismo y la señalización de este endocannabinoide (Macarrone y cols., 2010).

### 4.3. Receptores cannabinoides

Hasta el momento hay dos tipos de receptores identificados: el receptor CB1 (Matsuda y cols., 1990) y el receptor CB2 (Munro y cols., 1993). En 2006 se identificó un posible nuevo receptor CB distinto de los dos anteriores, el receptor GPR55, al que también se pueden unir los endocannabinoides (Baker y cols., 2006). Todos ellos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPR, *G protein coupled receptors*) y se caracterizan por tener un dominio N-terminal extracelular, un dominio C-terminal intracelular y siete dominios transmembrana (Figura I.36).



**Figura I.36. Representación esquemática de la estructura de los receptores CB1 y CB2.** Los receptores cannabinoides están formados por siete dominios transmembrana, un dominio amino-terminal extracelular y un dominio carboxi-terminal intracelular.

El receptor CB1 está compuesto por 472 aminoácidos (Figura I.36). Se han descrito dos variantes de *splicing* de este receptor en la parte N-terminal (Shire y cols., 1995; Rinaldi-Carmona y cols., 1996; Ryberg y cols., 2005). Presenta una homología en su secuencia

peptídica del 97-99% entre especies y se ha clonado de diferentes especies como rata, ratón y humano (Howlett y cols., 2002). Este receptor es el que media los efectos psicotrópicos del THC. El estudio de la estructura del receptor CB1 ha servido para desarrollar numerosas moléculas con gran afinidad por él. El ejemplo más importante podría ser el rimonabant (SR141716A, RMB, Acomplia, Sanofi-Aventis), un fármaco diseñado para el tratamiento de la obesidad que además parecía mejorar el perfil lipídico de los pacientes; sin embargo tuvo que ser retirado por los graves trastornos neuropsiquiátricos que producía (Moreira y Crippa, 2009; King 2010; Topol y cols., 2010).

El receptor CB1, tanto en especies animales como en humanos, está ampliamente distribuido por el sistema nervioso central (SNC), destacando su presencia en los ganglios basales, cerebelo, neocórtex e hipocampo, una zona esencial en procesos de aprendizaje y memoria (Herkenham y cols., 1991, Westlake y cols., 1994; Glass y cols., 1997). También se expresa a nivel periférico, por ejemplo en miocardio (Bonz y cols., 2003; Bátakai y cols., 2004b; Mukhopadhyay y cols., 2007), testículos (Gérard y cols., 1991), células endoteliales y músculo liso (Liu y cols., 200; Rajesh y cols., 2008b), tejido adiposo (Cota y cols., 2003; Engeli y cols., 2005; Roche y cols., 2006), hígado (Engeli y cols., 2005; Siegmund y cols., 2005; Mallat y cols., 2008) y tracto gastrointestinal (Pertwee, 2001).

El receptor CB2 esta compuesto por 360 aminoácidos (Figura I.36) y presenta un homología del 48% con el receptor CB1 (Munro y cols., 1993). Se ha clonado de rata y de ratón, presentando una homología respecto al humano de un 93 y un 82% respectivamente (Griffin y cols., 2000).

El receptor CB2 juega un importante papel en la respuesta inmune e inflamatoria, expresándose abundantemente en células mieloides, hematopoyéticas, macrófagos y monocitos (Munro y cols., 1993; Pertwee, 1997; Klein y cols., 2003, Massi y cols., 2006). Algunos autores también han descrito su presencia en neuronas y astrocitos del sistema nervioso, especialmente en situaciones patológicas y neuroinflamatorias (Sagan y cols., 1999; Van Sickle y cols., 2005; Orgado y cols., 2009). Se ha identificado también en células musculares lisas y endoteliales (Rajesh y cols., 2007 y 2008a), en hígado (Engeli y cols., 2005; Siegmund y cols., 2005; Mallat y cols., 2008) y en otros tejidos como timo, médula ósea, pulmón, útero, ovarios y páncreas (Galiègue y cols., 1995). Incluso se ha descrito su presencia en placas de ateroma, donde su estimulación por parte del THC inhibe su progresión (Steffens y cols., 2005). El receptor CB2 también está presente en tejido cardiaco (Lépicier y cols., 2003; Shmist y cols., 2006; Mukhopadhyay y cols., 2007; Weis y cols., 2010).

La estimulación de los receptores CB modula la activación de diversas vías de señalización, dependiendo del agonista, el tejido y la especie animal utilizada.

La vía de señalización principal del receptor CB1 se debe a la interacción con proteínas G del subtipo Gi/o. Su acoplamiento a este tipo de proteínas conduce, entre otros procesos, a la inhibición de la enzima AC, disminuyendo los niveles intracelulares de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y, por consiguiente, disminuyendo la capacidad de fosforilación de las quinasas dependientes de AMPc, como la PKA (Howlett y cols., 1986; Glass y Felder, 1997; Pertwee, 1997; Howlett y cols., 2002). La inhibición de la AC es sensible al antagonista de receptores CB1 SR141716 y a toxina pertussis (PTX), confirmando así la implicación de la proteína Gi/o. Sin embargo, también se ha demostrado que los receptores CB1 pueden acoplarse a proteínas Gs. En células CHO que expresaban el receptor CB1 y en las que la proteína Gi/o estaba previamente bloqueada con PTX, la estimulación del receptor producía la activación de la proteína Gs observándose un aumento de la actividad de la AC y de los niveles de AMPc (Glass y Felder, 1997; Bonhaus y cols., 1998). Los efectos de los endocannabinoides sobre los niveles celulares de AMPc también se pueden explicar por la isoforma de la AC presente en el tejido analizado. En células COS-7 transfectadas con diversas isoformas de la AC, se vio que la estimulación de los receptores CB1 inhibía las AC tipo I, V, VI y VIII y estimulaba los tipos II, IV y VII (Rhee y cols., 1998).

Existen múltiples estudios que demuestran que los endocannabinoides y sus análogos activan también la cascada de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) debido al acoplamiento del receptor CB1 a Gi/o (Howlett y cols., 2002). Esta activación puede ser a través de las diferentes vías correspondientes a los diferentes miembros de la familia de las MAPK como son ERK (*extracellular signalling-regulated kinase*) a través de la fosforilación y activación de sus dos isoformas p42 y p44 (Bouaboula y cols., 1995; Wartmann y cols., 1995; Sánchez y cols., 1998; Galve-Roperh y cols., 2002), JNK/SAPK (*Jun amino-terminal kinases/stress-activated kinases*) (Liu y cols., 2000; Rueda y cols., 2000) y p38 (Liu y cols., 2000; Derkinderen y cols., 2001). Todos los efectos se inhiben con SR141716 y PTX. La activación de la primera de las subfamilias mencionada se relaciona con el crecimiento y división celular, mientras que las otras dos se activan por señales de estrés y citoquinas inflamatorias y están relacionadas con muerte celular y patologías del sistema inmune (Johnson y Lapadat, 2002).

Además, la activación de los receptores CB1 modula varios tipos de canales iónicos a través de proteínas Gi/o: inhibe corrientes generadas por canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N y P/Q (Twitchell y cols., 1997) y canales de  $\text{K}^+$  de tipo D (Mu y cols., 1999; Schweitzer y cols.,

2000) y, por otro lado, activa canales de  $K^+$  tipo A (Deadwyler y cols., 1995; Mu y cols., 1999) y canales de  $K^+$  rectificadores internos (Mackie y cols., 1995). Se conoce también la modulación directa que los endocannabinoides pueden ejercer sobre algunos canales iónicos en tejido nervioso o tejido muscular liso (Van der Stelt y Di Marzo, 2005; Oz, 2006) (ver apartado I.3.4.2 Efectos de los endocannabinoides sobre diversos canales iónicos).

También se ha descrito que la estimulación del receptor CB1 por sus agonistas en diferentes preparaciones neuronales y en células musculares lisas, activa la PLC. La activación de la PLC resulta en la hidrólisis del  $PIP_2$  dando lugar a la formación de los segundos mensajeros inositol-trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG) (Sugiura y cols., 1997; Mombouli y cols., 1999; De Petrocellis y cols., 2007) que producen un aumento en la concentración intracelular de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) y la activación de la proteína quinasa C (PKC) respectivamente. Este efecto se inhibe por SR141716, PTX y U73122 (inhibidor de la PLC) y podría ser vía proteína  $Gi/o$  (Lograno y Romano, 2004) o a través de  $Gq$  (Lauckner y cols., 2005).

Los receptores CB1, además, pueden modular el metabolismo de esfingolípidos haciendo aumentar los niveles de ceramida, bien a través de la activación de la hidrólisis de estos compuestos (Sánchez y cols., 1998, 2001) o bien mediante el aumento de la síntesis “de novo” de ceramida (Gómez del Pulgar y cols., 2002).

Al igual que ocurre con los receptores CB1, los receptores CB2 pueden modular la actividad de la AC. Este efecto es inhibitorio y se bloquea con PTX, sugiriendo la participación de proteínas  $Gi/o$  (Bayewitch y cols., 1995; Slipetz et al., 1995). Además, la estimulación de este receptor puede activar la vía de las MAPK, tanto la p42/p44 como la p38 (Bouaboula y cols., 1996; Kobayashi y cols., 2001; Brown y cols., 2002; Carrier y cols., 2004) y aumentar la  $[Ca^{2+}]_i$  a través de la vía PLC- $IP_3$  (Zoratti y cols., 2003). Sin embargo, y al contrario que en los receptores CB1, los receptores CB2 no parecen estar acoplados a proteínas  $G_s$  (Glass y Felder 1997; Calandra y cols., 1999). Hasta hace poco no parecía que la estimulación del receptor CB2 modulase canales iónicos (Felder y cols., 1995; McAllister y cols., 1999; Pertwee, 1997) pero recientemente se ha descrito que la estimulación del receptor CB2 en miocitos ventriculares de rata puede modular la  $I_{KATP}$  (Li y cols., 2012).

#### 4.3.1. Receptores no-CB1/no-CB2 o receptores *CB-like*

Recientemente, se ha propuesto la existencia de otros receptores de cannabinoides distintos de CB1 y CB2 (no-CB1/no-CB2, *CB-like*) (Bátkai y cols., 2004a; Begg y cols.,

2005; Mackie y Stella, 2006; Brown 2007; De Petrocellis y Di Marzo 2010). Por ejemplo, se han descrito efectos farmacológicos de la AEA y del WIN55,212-2 en cerebro de ratones transgénicos deficientes en receptores CB1 y CB2 (Di Marzo y cols., 2000; Breivogel y cols., 2001; Hoffman y cols., 2005). De forma similar se ha descrito la presencia de un receptor no-CB1/no-CB2 para la AEA en el endotelio vascular (Járai y cols., 1999; Begg y cols., 2005). La AEA y diferentes análogos inducían vasodilatación en arterias mesentéricas de ratón y este efecto se bloqueaba con SR141716 pero no con capsazepina (descartando que el efecto se debiese a la unión a receptores vanilloides) y los mismos resultados se obtuvieron en ratones deficientes en los receptores CB1 y CB2 (Járai y cols., 1999; Wagner y cols., 1999; Offertáler y cols., 2003; Bátakai y col., 2004a; Begg y cols., 2005), postulándose así la existencia de un receptor CB endotelial. Estos nuevos receptores podrían estar implicados en la modulación de la transmisión sináptica (Di Marzo y cols., 2000; Breivogel y cols., 2001; Hoffman y cols., 2005), del aparato cardiovascular (Járai y cols., 1999; Offertáler y cols., 2003; Begg y cols., 2005) y del sistema inmune (Jaggar y cols., 1998; Brown 2007).

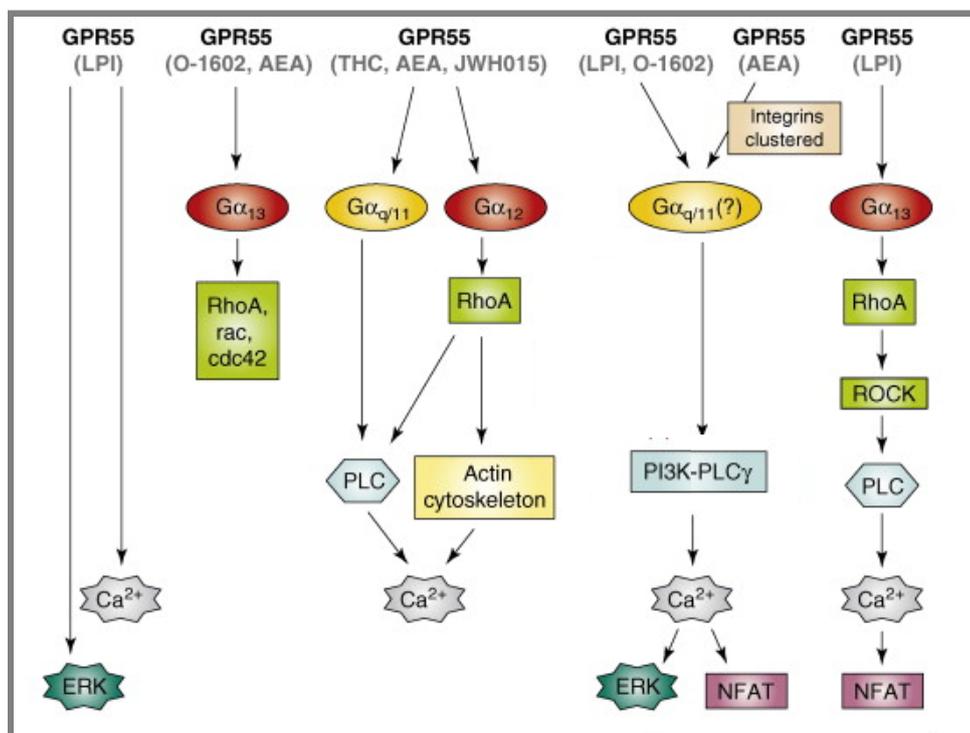
El receptor que surgió como principal candidato de receptor de endocannabinoides no-CB1/no-CB2 fue el receptor huérfano acoplado a proteínas G, GPR55, que puede ser activado por AEA y 2-AG, pero también por compuestos como la PEA o la OEA aunque su ligando endógeno natural es el LPI (Sawzdargo y cols, 1999; Baker y cols., 2006; Oka y cols., 2007; Pertwee, 2007; Ryberg y cols., 2007) (Tabla I.14).

El receptor GPR55 está compuesto por 319 aminoácidos. Presenta una homología en la secuencia peptídica muy baja con los receptores CB1 (13%) y CB2 (14%) (Swazdargo y cols., 1999; Baker y cols., 2006). Se expresa en diversos órganos y tejidos como en glándulas adrenales, tracto gastrointestinal, bazo y cerebro (Sawzdargo y cols, 1999; Ryberg y cols., 2007), y también en células endoteliales humanas (Waldeck-Weiermair y cols., 2008; Bondarenko y cols., 2010). Sin embargo, hasta la fecha no se ha detectado su presencia en miocardio.

Al ser activado, el receptor GPR55 se une a proteínas  $G\alpha_{13}$  (Ryberg y cols., 2007), aunque también se puede unir a  $Gq$  o  $G\alpha_{12}$  (Lauckner y cols., 2008). A través de esta vía inhibe la corriente de  $K^+$  tipo M en neuronas de ratón, lo que provoca el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  y el correspondiente aumento en la excitabilidad neuronal que desencadena la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el retículo endoplásmico mediada a través de receptores de IP3 y RyR2 y la activación de la PLC y de proteínas G pequeñas ( $\rho A$ ,  $cdc42$  y  $rac1$ ) (Oka y cols., 2007; Lauckner y cols., 2008; Henstridge y cols., 2009; Kapur y cols., 2009). También se ha demostrado un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  vía PLC en células endoteliales tras la estimulación del

receptor GPR55 con LPI y con AEA (Waldeck-Weiermair y cols., 2008; Bondarenko y cols., 2010) (Figura I.37).

Recientemente se han descrito otras vías de señalización en las que el LPI, a través de su unión a GPR55, activa ERK y p38 de la ruta de las MAPK (Kapur y cols., 2009; Pietr y cols., 2009; Henstridge y cols., 2010; Oka y cols., 2010).



**Figura I.37 Vías de señalización propuestas para GPR55.** Cascadas de señalización intracelular tras la activación del receptor GPR55 por diferentes ligandos. NFAT, nuclear factor of activated T cells; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PLC, phospholipase C; ROCK, Rho-associated protein kinase. [Adaptada de Ross 2009].

Los datos existentes sobre el receptor GPR55 y la farmacología de sus ligandos es complicada y muy variada y los datos sobre los mecanismos de señalización que desencadena este receptor son contradictorios ya que los resultados obtenidos varían según el modelo de estudio utilizado.

El receptor GPR119 es un receptor huérfano que se expresa fundamentalmente en el páncreas y en el tracto gastrointestinal (Chu y cols., 2007; Lauffer y cols., 2009) y que está acoplado probablemente a proteínas Gs (Godlewski y cols., 2009). La OEA es su principal ligando endógeno en experimentos “in vitro” (Overton y cols., 2006) y parece ser que participa en el control de la homeostasis de la glucosa y en la obesidad (Ning y cols., 2008; Schwartz y cols., 2008; Godlewski y cols., 2009).

#### 4.4. Acciones de los endocannabinoides

El SCE es un sistema modulador que actúa principalmente sobre el sistema nervioso (Katona y Freund, 2008; Mackie, 2008b; Solinas y cols., 2008; Kano y cols., 2009), el inmune (Centonze y cols., 2008; Pandey y cols., 2009; Tanasescu y Constantinescu, 2010) y el endocrino (Bellocchio y cols., 2008; Cota, 2008; Maccarrone, 2009; Di Marzo y cols., 2011).

##### 4.4.1. Acciones cardiovasculares de los endocannabinoides

En los últimos 10 años se ha puesto de manifiesto su importancia en la regulación del sistema cardiovascular (Hillard, 2000; Randall y cols., 2002; Bonz y cols., 2003; Pacher y cols., 2005a, 2005b; Ashton y Smith, 2007; Bátkai y Pacher, 2009; Hiley, 2009; Pacher y Steffens, 2009). Entre otros efectos, se ha descrito que el SCE interviene en la regulación de la presión arterial, la frecuencia y contractilidad cardíacas o en la ingesta y el síndrome metabólico (con la consiguiente repercusión en patologías asociadas a la obesidad; Quercioli y cols., 2011), y en procesos como la isquemia/reperfusión o la aterosclerosis. Sin embargo hasta la fecha no hay datos sobre la participación del SCE en la regulación de la actividad eléctrica cardíaca.

Se ha demostrado la presencia de receptores CB1 y CB2 en el miocardio humano, de rata y de ratón (Bonz y cols., 2003; Lèpicier y cols., 2003; Bátkai y cols., 2004b; Shmist y cols., 2006; Mukhopadhyay y cols., 2007; Weis y cols., 2010). Los receptores CB1 parecen jugar un importante papel en la regulación cardiovascular, mientras que los receptores CB2 parecen ser los responsables de los efectos de los endocannabinoides sobre el preconditionamiento isquémico.

Existe una marcada variabilidad en el tipo de respuesta producida por los endocannabinoides sobre la presión arterial, la contractilidad y la frecuencia cardíacas, dependiendo del modelo, estado de consciencia, vía de administración y especie animal utilizada (Mendizábal y Adler-Graschinsky, 2007; Wheal y Randall, 2009). Ya en 1979 se describió el efecto trifásico del THC sobre la presión arterial en ratas anestesiadas: una reducción inicial de la frecuencia y contractilidad cardíacas y de la presión arterial, seguida de un aumento de la presión arterial y de la contractilidad cardíaca y, finalmente, de una prolongada reducción de la presión arterial (Siqueira y cols., 1979). Más tarde se comprobó que la AEA y otros endocannabinoides administrados por vía intravenosa en animales anestesiados producían la misma respuesta trifásica (Varga y cols., 1995; Jári y cols., 2000;

Pacher 2004, 2005a). La bradicardia inicial y la hipotensión asociada parecen ser efectos vagales, ya que se pueden bloquear con atropina o mediante una vagotomía cervical (Varga y cols., 1995, 1996) y la última fase parece estar mediada a través de receptores CB1 presinápticos que disminuyen el tono simpático periférico (Varga y cols., 1995, 1996; Lake y cols., 1997), ya que se comprobó que en animales *knock out* para CB1 este efecto desaparecía (Ledent y cols., 1999). Sin embargo, también podría estar implicado un efecto vasodilatador directo, ya que se ha visto que algunos agonistas sintéticos reducen la presión arterial tras haber bloqueado previamente el sistema nervioso simpático (Vidrio y cols., 1996; Lake y cols., 1997). En animales conscientes, la respuesta hipotensora tardía desaparece casi por completo. Por tanto esta respuesta podría deberse a los efectos del anestésico (que bloquearían en parte los efectos centrales de los endocannabinoides) o a posibles diferencias en el tono vegetativo (Gardiner y cols., 2002; Randall y cols., 2002, 2004; Wheal y cols., 2007).

La acción vasodilatadora de los endocannabinoides también podría explicarse por mecanismos independientes de la activación de los receptores CB1 como la estimulación de receptores no-CB1/no-CB2 que podrían localizarse en células endoteliales (Járai y cols., 1999; Wagner y cols., 1999; Ford y cols., 2002; Bátakai y cols., 2004a). Su estimulación podría provocar la liberación de NO, lo que facilitaría la apertura de canales de  $K^+$ , produciría una hiperpolarización del  $E_m$  y un efecto vasodilatador (Jarai y cols., 1999; Begg y cols., 2003). Otros posibles mecanismos de acción serían la activación de receptores vanilloides (Högestatt y Zygmunt 2002; Ho y Hiley, 2003), la biotransformación de AEA en prostanoides vasodilatadores (Grainger y Boachie-Ansah, 2001) o la activación de canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  (BKCa) (White y cols., 2001).

Se ha descrito también que, dependiendo del receptor estimulado, se producen efectos opuestos sobre la contractilidad en aurícula aislada de rata: se observaba una reducción de la contractilidad producida por agonistas del receptor CB1 que se correlacionaba con una disminución en los niveles de AMPc, la estimulación de la NO sintasa y un acúmulo de GMPc, mientras que, la activación de los receptores CB2 aumentaba la contractilidad y los niveles cardiacos de AMPc (Sterin-Borda, 2005).

En experimentos realizados en tejido auricular humano, se ha visto que la AEA y otros cannabinoides sintéticos producen una disminución dosis-dependiente de la contractilidad, que se revertía con el antagonista de receptores CB1 AM251, lo cual implicaba que los efectos inotrópicos negativos observados en el miocardio estarían mediados a través de CB1 (Bonz y cols., 2003). Finalmente, la administración aguda de cannabinoides en sujetos sanos

produce una respuesta taquicardizante, opuesta a la bradicardia observada en animales conscientes o anestesiados (Jones, 2002).

En ratas normotensas la administración de SR141716 o de inhibidores de la FAAH como el URB597 o del transporte de AEA no modifican la presión arterial (Varga y cols., 1995; Lake y cols., 1997; Bátakai y cols., 2004b). Además, los ratones *knock out* para CB1 y FAAH no presentaban cambios en la presión arterial o en la frecuencia cardiaca con respecto a sus controles (Jarai y cols., 1999; Ledent y cols., 1999; Mendizábal y Adler-Graschinsky, 2007). Todo ello sugiere que en condiciones normales los endocannabinoides no participan en el control de la presión arterial o de la función cardiaca. Sin embargo, en ratas espontáneamente hipertensas y en otros modelos de HTA, aumentaba la expresión de los receptores CB1 a nivel vascular-endotelial y cardiaco y la AEA y el URB597 normalizaban la presión arterial y disminuían la frecuencia y la contractilidad cardiacas (Lake y cols., 1997; Bátakai y cols., 2004b; Wheal y cols., 2007). Por el contrario, el SR141716 en estos animales aumentaba la presión arterial, la contractilidad ventricular, la presión intraventricular y el índice cardiaco (Bátakai y cols., 2004a). Estos resultados indicaban que en situaciones de hipertensión aumenta la expresión de los receptores CB1 y la activación del sistema endocannabinoide, lo que podría constituir un mecanismo de compensación que limitaría el incremento de la presión arterial y de la contractilidad cardiaca, y desde este punto de vista la modulación de los endocannabinoides podría representar una nueva estrategia terapéutica en el tratamiento de la HTA (Bátakai y cols., 2004a y b; Pacher y cols., 2006; Mendizábal y Adler-Graschinsky, 2007). Por otro lado, el que la activación de los receptores CB1 produzca esta respuesta hipotensora (Varga y cols., 1996) ha permitido implicar al SCE en estados patológicos que cursan con hipotensión arterial, tales como los cuadros de choque (hemorrágico, endotóxico o cardiaco [Wagner y cols., 1997; Wang y cols., 2001b; Bátakai y cols., 2004a; Mukhopadhyay y cols., 2007] o la cirrosis hepática [Bátakai y cols., 2001]).

En los estudios RIO, en los pacientes obesos hipertensos así como en el subgrupo de pacientes diabéticos o con hiperlipidemias tratados durante un año con RMB, se producía una disminución muy marcada en su presión arterial, mientras que este efecto no se observó en pacientes obesos normotensos (Ruilope y cols., 2008).

Por su parte, la presencia del receptor CB2 en el miocardio se ha relacionado con la puesta en marcha de mecanismos cardioprotectores en modelos de isquemia/reperfusión (Bouchard y cols., 2003; Montecucco y cols., 2009). El preconditionamiento isquémico es un fenómeno de protección natural inducido por uno o varios períodos breves de isquemia-reperfusión que protege al corazón del daño provocado por una posterior isquemia prolongada, reduciendo el

tamaño del infarto, las arritmias y la disfunción mecánica o “atontamiento” post-isquémico. En 2001, Lagneux y Lamontagne describieron por primera vez la implicación del SCE en un modelo de isquemia desarrollado en corazones aislados de rata. El antagonista de receptores CB2 SR144528 (pero no el antagonista de receptores CB1 SR141716) reducía la cardioprotección inducida previamente con lipopolisacáridos (Lagneux y Lamontagne 2001). Igualmente, la activación de los receptores CB2 estaba implicada en la reducción del área de infarto producida por el estrés térmico aplicado antes del periodo de isquemia, ya que este efecto era prevenido con SR144528, pero no con SR141716A (Joyeux y cols., 2002). Posteriormente, se han descrito efectos cardioprotectores de diferentes endocannabinoides como el 2-AG o la PEA y otros agonistas de los receptores CB2 en modelos animales “in vivo” y “ex vivo”. Estos compuestos reducían el área infartada y mejoraban la función ventricular (Lépiciér y cols., 2003; Wagner y cols., 2006; Defer y cols., 2009). En casi todos los estudios publicados el efecto cardioprotector que ejercen los endocannabinoides está mediado a través del receptor CB2, aunque en los últimos años también se ha descrito que el receptor CB1 podría estar implicado (Lépiciér y cols., 2006, Wagner y cols., 2006; Mendizábal y Adler-Graschinsky, 2007).

#### 4.4.2. Efectos de los endocannabinoides sobre diversos canales iónicos

Los endocannabinoides y sus análogos modulan diferentes canales iónicos y transportadores y aumentan la  $[Ca^{2+}]_i$ , efectos que explicarían la capacidad de estos compuestos para modular la liberación de diversos neurotransmisores y la excitabilidad neuronal (Bouaboula y cols., 1999; Howlett y cols., 2004; Pacher y cols., 2006; Demuth y Molleman, 2006). La mayoría de esos efectos están mediados a través de la estimulación del receptor CB1 (Mackie y cols., 1993; Deadwyler y cols., 1995; Twitchell y cols., 1997; Mu y cols., 1999 y 2000; Schweitzer, 2000; Li y cols., 2009; Pertwee, 2010) aunque también pueden ejercer sus efectos de forma directa. De hecho, se ha demostrado que estos compuestos pueden modular diferentes canales como, por ejemplo, los de  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  o  $K^+$  de una forma directa e independiente de receptor (Van der Stelt y Di Marzo, 2005; Oz, 2006; Pertwee y cols., 2010).

*I. Canales de  $Ca^{2+}$ :* La AEA, la MetAEA, el 2-AG y el AA inhiben la corriente generada por canales de  $Ca^{2+}$  tipo L ( $Ca_v1$ ) en músculo esquelético de conejo. Este efecto no se revierte ni con SR141716, ni PTX, ni es reproducido por otros compuestos como el THC o el WIN55,212-2 (Jarrahian y Hillard 1997; Oz y cols., 2000 y 2004). Se ha descrito también que

la AEA puede modular esta corriente en miocitos ventriculares de rata a través de la estimulación del receptor CB1 (Li y cols., 2009).

La AEA y diferentes ácidos grasos (pero no otros endocannabinoides como el 2-AG) inhiben la corriente generada por canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T ( $\text{Ca}_v3$ ) en líneas celulares y producen una aceleración de la inactivación y un desplazamiento de la curva de inactivación hacia potenciales más negativos de estos canales (Chemin y cols., 2001, 2007). La AEA producía efectos similares en canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N ( $\text{Ca}_v2.2$ ), persistiendo los efectos en presencia de SR141716 y de PTX. El 2-AG no producía, sin embargo, este mismo efecto (Guo e Ikeda, 2004). Se ha demostrado también que el WIN55,212-2 a concentraciones menores de 1  $\mu\text{M}$  en cultivos de neuronas de hipocampo de rata, bloqueaba los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N y P/Q ( $\text{Ca}_v2.1$ ) mediante la activación de receptores CB1, y que a concentraciones mayores lo hace de una manera directa por lo que dependiendo del rango de concentraciones sería posible que los endocannabinoides bloquearan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de mecanismos dependientes e independientes de receptor (Shen y Thayer 1998).

*II. Canales de  $\text{Na}^+$* : La AEA y el WIN55,212-2 inhiben la corriente generada por canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a TTX en neuronas de rata y ratón a concentraciones micromolares (Nicholson y cols, 2003; Kim y cols., 2005a). Este efecto se potenciaba tras inhibir la FAAH y se bloqueaba parcialmente con el antagonista del receptor CB1 AM251 lo que sugería un efecto directo sobre el canal independiente de CB1 (Nicholson y cols., 2003). El AA y el 2-AG también bloqueaban estos canales en neuronas produciendo una disminución de la excitabilidad neuronal (Lee y cols., 2002; Duan y cols., 2008).

*III. Canales de  $\text{K}^+$* : Se ha descrito que a través de la estimulación del receptor CB1 transfectado en diferentes sistemas de expresión (células de cultivo HEK293, oocitos de *Xenopus* y cultivos de neuronas), la AEA y el WIN55,212-2 activaban canales regulados por proteínas G que generan una corriente rectificadora interna (GIRK) (Henry y Chavkin, 1995). Este efecto se bloqueaba con bario, SR141716 y tras la estimulación de la PKC con PMA (McAllister y cols., 1999), pero era independiente de la vía AC-AMPC-PKA (Robbe y cols., 2001).

En neuronas de hipocampo, WIN55,212-2 aumenta una corriente de salida de  $\text{K}^+$  voltaje-dependiente tipo-A ( $I_A$ ) (Deadwyler y cols., 1995) y disminuye la corriente tipo-M ( $I_M$ ) (Schweitzer y cols., 2000). Estos efectos se bloqueaban con SR141716A, PTX y activadores de la PKA (Hampson y cols., 1995; Mu y cols., 1999 y 2000).

La AEA produce relajación en arterias coronarias aisladas de rata, efecto que no se debía ni a la activación de receptores CB ni a la biotransformación de la AEA en derivados

vasoactivos, sino a la activación de canales BKCa (White y cols., 2001). Los efectos aparecían cuando los compuestos se aplicaban de forma extracelular y no se revertían con SR141716 (Van den Bossche y Vanheel, 2000). En estudios recientes, se ha visto que el LPI (Bondarenko y cols., 2011) y la MetAEA (Sade y cols., 2006) también pueden modular la actividad del canal BKCa. El LPI producía además una inhibición de canales no selectivos para cationes y de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de forma independiente de la activación del receptor GPR55 en células endoteliales (Bondarenko y cols., 2010). En el segundo estudio mencionado, la MetAEA producía un aumento en la actividad de la corriente generada por canales BKCa en células HEK293. Esta potenciación no se veía modificada por los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, por antagonistas de receptores CB1 o CB2, ni por PTX (Sade y cols., 2006).

Se ha descrito también que la AEA inhibe la corriente generada por canales Kv1.2 expresados en fibroblastos de ratón, acelerando además la cinética de inactivación de estos canales (Poling y cols., 1996). El efecto no se bloqueaba con PTX ni con SR141716. La AEA, aplicada por la cara extracelular de la membrana en la configuración de *outside-out* de la técnica de *patch-clamp*, no producía efecto, mientras que al ser aplicada por la parte citoplasmática producía una marcada inhibición de la corriente, indicando que la AEA actuaría en este caso intracelularmente (Poling y cols., 1996). Efectos similares se han descrito en otros estudios donde la AEA inducía una rápida y completa inactivación de la corriente generada por canales Kv3.1 (Oliver y cols., 2004). Además la AEA también actuaba sobre otros canales como los Kv1.1+Kv $\beta$ 1.1 o los Kv3.4 y sin embargo no modificaba los canales KCNQ2/3 (Oliver y cols., 2004).

Recientemente se ha descrito la modulación de la  $I_{\text{KATP}}$  registrada en miocitos ventriculares de rata través de la estimulación del receptor CB2. La AEA aumenta la corriente  $I_{\text{KATP}}$  de forma dependiente de concentración. Este efecto no se prevenía con AM251 pero sí con el antagonista de receptores CB2 AM630 (Li y cols., 2012). Anteriormente ya se había descrito la modulación de esta corriente de forma independiente de receptor por el AA, lo que podía ejercer efectos cardioprotectores durante procesos de isquemia-reperfusión (Lu y cols., 2001; Nithipatikom y cols., 2006).

En otro importante estudio, la AEA y la MetAEA producían una potente inhibición de la corriente generada por canales TASK-1 mientras que no producía efecto sobre otros canales de la misma familia (TWIK, TREK, TRAAK). Ese efecto no se revertía con SR141716 y tampoco era reproducido por otros endocannabinoides como el 2-AG o la PEA (Maingret y cols., 2001).



## **II. OBJETIVOS**



El SCE es un sistema modulador que actúa sobre el sistema neurotransmisor, el inmune y el endocrino, aunque sus efectos pueden extenderse a muchos otros aparatos y sistemas como por ejemplo el cardiovascular. Los endocannabinoides pueden ser sintetizados en el corazón y se ha descrito que pueden regular la contractilidad y la frecuencia cardíacas, sin embargo no se dispone de datos a cerca de la posible modulación que estos compuestos pueden ejercer sobre los canales iónicos y la actividad eléctrica cardíaca. Los endocannabinoides no se almacenan sino que son producidos “a demanda”, estando su síntesis estimulada en situaciones de daño tisular. Por lo tanto, parece razonable asumir que, en el miocardio, la síntesis de estos compuestos aumentará en situaciones patológicas como la FA, en la que se produce inflamación, estrés oxidativo, fibrosis intersticial y apoptosis. Además, se ha demostrado que la síntesis de endocannabinoides en tejido nervioso, aumenta al estimularlo a altas frecuencias y al aumentar la  $[Ca^{2+}]_i$ , condiciones ambas, que también están asociadas a la FA.

Por otra parte, se ha demostrado que la FA, *per se*, altera las propiedades electrofisiológicas, histológicas y contráctiles auriculares, de modo que promueve su propio mantenimiento y recurrencia, un fenómeno denominado *remodelado auricular*. La alteración de las propiedades eléctricas consiste, fundamentalmente, en un acortamiento no uniforme de la DPA y del periodo refractario auricular, lo que permite que un mayor número de frentes de onda de excitación coexistan simultánea y desordenadamente en la aurícula. El acortamiento del PRA y la pérdida de la adaptación de la DPA a la frecuencia se deben a cambios en los niveles de expresión de los canales que generan las corrientes que participan en la repolarización auricular. De entre las corrientes implicadas en la repolarización, la corriente transitoria de salida de  $K^+$   $I_{to1}$  es la principal responsable de la rápida y temprana repolarización auricular y determina además, el tamaño y la duración de la fase de meseta del PA cardíaco.

Hasta este momento se desconocen los efectos que producen los endocannabinoides sobre la actividad eléctrica auricular en condiciones fisiológicas y/o patológicas como la FA. En este sentido sería interesante analizar los efectos de estos compuestos sobre los canales Kv4.3 que generan la  $I_{to1}$  y que están implicados en la repolarización del PA auricular y en el remodelado eléctrico auricular.

Por todo ello, los objetivos de la presente Tesis Doctoral fueron:

1. Analizar los efectos de los endocannabinoides y sus análogos sobre los canales Kv4.3 expresados en líneas celulares de mamífero.
2. Identificar la presencia de receptores CB1, CB2 y GPR55 en muestras de tejido auricular de pacientes en RS y compararlo con la de las muestras de pacientes con FA.
3. Analizar los efectos de los endocannabinoides y sus análogos sobre los canales Kv4.3 a través de la estimulación selectiva de los receptores CB expresados en líneas celulares de mamífero.
4. Analizar los efectos, tanto directos como mediados a través de los receptores CB, de los endocannabinoides y sus análogos sobre la corriente nativa  $I_{to1}$ , registrada en miocitos auriculares humanos disociados enzimáticamente.
5. Identificar la cascada de eventos intracelulares responsables de los posibles efectos a través de los receptores CB sobre los canales Kv4.3.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. Técnica de fijación de voltaje en parche de membrana (*patch-clamp*)

La técnica de fijación de voltaje (*voltage-clamp*) comenzó a utilizarse en los años 80 para el estudio de corrientes iónicas en células aisladas y se caracteriza por permitir mantener de forma estable el potencial de parte o de toda la membrana de la célula y registrar la corriente generada a través de los canales iónicos presentes en ella tras la aplicación de un pulso hiper o despolarizante (Hamill y cols., 1981). Esta técnica se basa en la formación de un sello de alta resistencia (un “gigasello”,  $\approx 20 \text{ G}\Omega$ ) entre la luz de una micropipeta de vidrio y la membrana de una célula (Figura III.1). La micropipeta se llena con una solución (“solución interna”) cuya composición varía en función de la corriente objeto de estudio. A través de la micropipeta, se inyecta la corriente necesaria para fijar el  $E_m$  al valor deseado y, al mismo tiempo, se registra la corriente generada tras la aplicación de pulsos hiper o despolarizantes (Hamill y cols., 1981). La técnica de fijación de voltaje presenta diferentes configuraciones (Figura III.2):

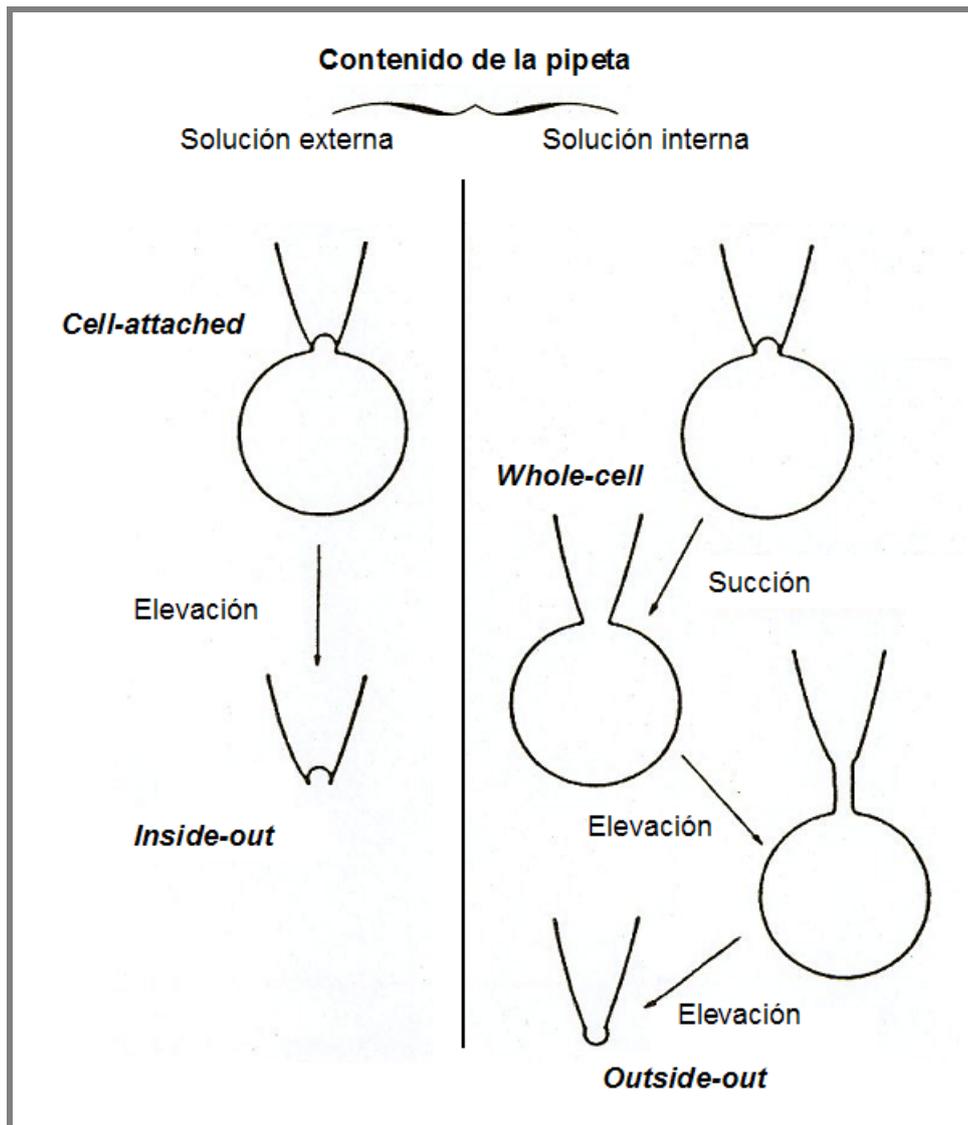
- a) Configuración de parche sobre célula entera, *cell-attached* u *on-cell patch*.
- b) Configuración de célula entera o *whole-cell patch*.
- c) Configuración de parche interior-fuera o *inside-out patch*.
- d) Configuración de parche exterior-fuera o *outside-out patch*.



**Figura III.1. Formación de un sello de alta resistencia.** Se muestran una micropipeta de vidrio y una célula en el transcurso de la formación de un sello de alta resistencia o “gigasello”.

Una vez que se ha puesto en contacto la micropipeta con la superficie de la membrana celular, se aplica una ligera succión, con lo que la porción de la membrana incluida en la luz de la micropipeta se invagina y se forma el sello de alta resistencia. Ésta es la configuración de “parche de membrana sobre célula entera” (*cell-attached* u *on-cell patch*) que permite el registro de la corriente iónica unitaria o microscópica ( $i$ ), generada por la activación de un único canal (*single channel*) presente en el parche de membrana. Esta configuración presenta

la ventaja de ser la más fisiológica de las cuatro mencionadas porque no modifica el medio intracelular y es la más adecuada para estudios que requieran la participación de todos los sistemas celulares moduladores del canal iónico. Su principal desventaja es que no permite determinar el PR (un indicador de la situación fisiológica de la célula) ya que los valores a los que se fija son relativos al potencial de membrana de la célula. Este problema se minimiza perfundiendo las células con una solución externa despolarizante que mantiene el potencial de reposo celular en 0 mV.



**Figura III.2. Configuraciones de la técnica de patch-clamp.** Esquema que ilustra la metodología para conseguir las diferentes configuraciones de los sellos mediante la técnica de patch-clamp.

A partir de la configuración de “parche de membrana sobre célula entera”, y aplicando una ligera succión adicional, se puede romper la porción de membrana invaginada en la luz de la micropipeta y conseguir la configuración de “célula entera” (*whole-cell patch*). Tras la

rotura del parche de membrana, la solución interna de la micropipeta entra en contacto con el medio intracelular y, al ser mucho mayor su volumen en comparación con el volumen celular, se produce un recambio casi inmediato de la composición del mismo, es decir, se produce una diálisis intracelular. En estas condiciones es posible fijar el  $E_m$  al valor deseado y, tras la aplicación de los protocolos experimentales adecuados, registrar la corriente iónica resultante de la actividad de todos los canales presentes en la membrana celular o corriente macroscópica ( $I$ ). Esta configuración permite controlar y modificar a voluntad el medio intracelular, pero también diluye los mediadores intracelulares responsables de la regulación de los canales iónicos. Para minimizar este problema, la solución interna de la micropipeta se complementa con ATP y otros mediadores que, en condiciones fisiológicas, mantienen la función de los canales iónicos. Otra posibilidad para minimizar la dilución de los mediadores celulares es utilizar la configuración de “parche de membrana perforado”. Para ello, se añade a la solución interna un antibiótico (nistatina, anfotericina B) que, una vez que se ha formado el sello de alta resistencia en *cell-attached*, va formando pequeños poros en la membrana de la célula, permitiendo así el paso de iones monovalentes. De esta forma, la resistencia de acceso va disminuyendo paulatinamente, mientras que la amplitud de la corriente registrada va aumentando, hasta que ambos parámetros alcanzan valores estables al cabo de  $\approx 30$  min, momento en el se empieza a registrar la corriente iónica objeto de estudio.

Partiendo de la configuración de parche de membrana sobre célula entera, y elevando la célula del fondo del baño, se puede separar el parche de membrana incluido en la luz de la micropipeta del resto de la célula, quedando así el lado citosólico de la membrana expuesto al medio externo y el lado extracelular en contacto con la solución interna de la micropipeta. Ésta es la configuración de “parche de membrana interior-fuera” (*inside-out patch*).

La última configuración es la de “parche de membrana exterior-fuera” (*outside-out patch*) que se obtiene a partir de la configuración de célula entera. En esta configuración, la cara extracelular de la membrana es la que queda en contacto con la solución externa. Estas dos últimas configuraciones son las también llamadas “de parche escindido” y permiten el registro de corrientes unitarias. Ambas son adecuadas para el estudio del mecanismo de acción de fármacos o mediadores que actúen selectivamente sobre las superficies extra o intracelular de la membrana. Sin embargo, presentan el inconveniente de que desligan los canales iónicos del contenido citosólico que modula su actividad.

En la presente Tesis Doctoral, las corrientes fueron registradas utilizando la configuración de célula entera (*whole-cell*) de la técnica de *patch-clamp*.

## 2. Compuestos

La AEA, la MetAEA, el LPI, el AA, el AP, el AS, la SEA, el AO (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Misuri, EE.UU.), el 2-AG y la OEA (Tocris Bioscience, Ellisville, Misouri, EE.UU.) se disolvieron en etanol, mientras que la PEA y el WIN55,212-2 (ambos de Sigma-Aldrich) se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). El RMB (antagonista CB1 proporcionado amablemente por Sanofi-Aventis, Francia), el AM630 (antagonista CB2), el AM281 (antagonista CB1), y el URB-597 (inhibidor de la FAAH) (Tocris Bioscience) se disolvieron también en DMSO. En algunos experimentos, el EGTA fue sustituido por BAPTA 20 mM (Sigma-Aldrich) en la solución interna. Para el estudio de las vías de señalización se utilizaron diferentes inhibidores enzimáticos: KN93 (Calciochem, Merk Chemicals, Darmstadt, Alemania) y queleritrina (Sigma-Aldrich) solubles en agua y U73122, U73343 y estaurosporina todos ellos de Sigma-Aldrich y disueltos en etanol.

En todos los casos se hicieron inicialmente soluciones madre de 10 mM en el solvente adecuado y las diluciones posteriores se realizaron inmediatamente antes de cada experimento en solución externa o interna hasta obtener la concentración final deseada.

En experimentos preliminares se comprobó que las concentraciones finales de los solventes utilizados para la obtención de las soluciones madre de cada uno de los compuestos en las diferentes soluciones externas empleadas no modificaban la amplitud de la corriente estudiada.

## 3. Registro de la $I_{Kv4.3}$ en sistemas de expresión heterólogos

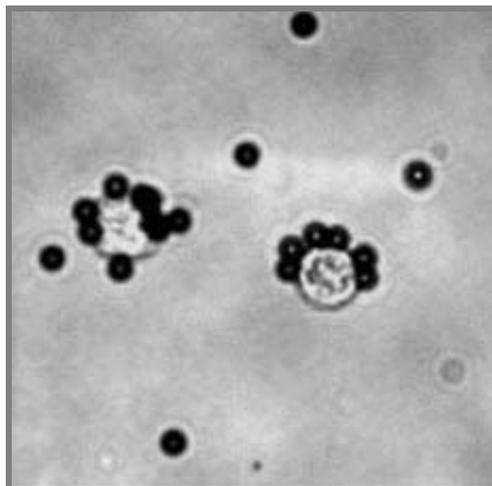
### 3.1. Cultivo celular

En nuestros experimentos se utilizaron células CHO proporcionadas por el Dr. Wettwer y la Dra. Ravens de la Universidad Técnica de Dresden (Dresden, Alemania) que expresan de forma estable el ADNc que codifica la expresión de la subunidad  $\alpha$  hKv4.3-L y la subunidad auxiliar hKChIP2a, (clonado de tejido humano, amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e incorporado al vector pcDNA3.1) (Radicke y cols., 2005). La corriente registrada en estas células está generada por canales formados por ambas subunidades ( $I_{Kv4.3}$ ). Estas células, que no expresan ningún tipo de receptor CB de forma endógena (Gómez del Pulgar y cols., 2000), presentan una pequeña proporción de canales de  $Na^+$  endógenos (Lalik y cols., 1993), aunque la amplitud de las corrientes generadas a través

de los mismos es demasiado pequeña para interferir en el registro de las corrientes de  $K^+$  generadas por los canales Kv4.3. Además, estas células representan un buen modelo para el estudio de canales de  $K^+$ , ya que no presentan ninguna corriente de este tipo (Yu y Kerchner, 1998). Las células CHO eran cultivadas en placas de Petri de 60 mm de diámetro con medio ISCOVE (Biochrom, Berlín, Alemania) enriquecido con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 1% de glutamina, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de zeocina y 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de G418 (un análogo de neomicina; Gibco) (Radicke y cols., 2005; Gómez y cols., 2008) para prevenir contaminaciones bacterianas.

En algunos experimentos se transfectaron las células CHO de forma transitoria con los ADNc que codifican para las proteínas MiRP2 (1.6  $\mu\text{g}$ ) y DPP6 (1.0  $\mu\text{g}$ ) usando el método del FuGENE 6 (Roche Diagnostics, Barcelona, España) (Delpón y cols., 2008; Gómez y cols., 2008; Radicke y cols., 2008). Los vectores de expresión con el ADNc de estas dos proteínas fueron proporcionados por el Dr. Antzelevitch, (Masonic Medical Research Laboratory, Utica, New York, EE.UU) y la Dra. Ravens, respectivamente. Fueron clonados de tejido humano, amplificados mediante PCR e incorporados al vector pIRES2 en el caso de MiRP2 (Delpón y cols., 2008) y en el vector pRC/RSV para DPP6 (Radicke y cols., 2005).

El método de transfección del FuGENE 6 consiste en la incubación de una mezcla de FuGENE 6, del vector de expresión con el gen de interés y del ADNc del antígeno de superficie CD8 (0.5  $\mu\text{g}$ ) expresado en el vector EBOPcD, en presencia de medio de cultivo sin suero y sin antibiótico. El FuGENE 6 está compuesto por una mezcla de lípidos que propicia la incorporación del ADNc a las células y permite así la expresión en la membrana de las proteínas objeto de estudio. Con estos vectores de expresión, una mezcla con una relación de 3 a 1 (un volumen de FuGENE 6 por cada  $\mu\text{g}$  de ADNc) fue la que proporcionó una transfección más eficaz. Para la selección de las células que habían incorporado los vectores, éstas se incubaban con una solución de microesferas de poliestireno unidas a anticuerpos anti-CD8 (Dynabeads® CD8, Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.). Los anticuerpos anti-CD8 se unen a las células que presentan en su membrana el antígeno de superficie CD8, células que, en la mayoría de los casos, también presentan el canal objeto de estudio. De este modo, para la realización de los experimentos, las células se seleccionaban mediante su observación al microscopio por la presencia en la membrana de las microesferas de poliestireno (Figura III.3).



**Figura III.3. Identificación de las células CHO que expresan el antígeno CD8 en su membrana.** Células CHO transfectadas con el plásmido EBO-pcD leu2 identificadas mediante anticuerpos anti-CD8 unidos a microesferas de poliestireno (DynaBeads M-450).

Tras incubar la mezcla durante 30 min, ésta se añadía a las células en cultivo, permitiendo que el ADNc adherido al FuGENE 6 se introdujese en las células. Transcurridas 48 h, tiempo durante el cual se producía la transcripción del ADNc y la expresión en la membrana de las proteínas a estudiar, las células se barrían de la placa con rascadores de goma, procedimiento mediante el cual la mayoría de las células permanecían intactas. Tras dejar reposar la suspensión de células durante 1 h a temperatura ambiente, se comenzaban los experimentos electrofisiológicos (Delpón y cols., 2008; Gómez y cols., 2008; Radicke y cols., 2008).

Para el estudio de los efectos que produce la estimulación selectiva de los receptores CB se utilizaron células CHO que expresan de forma estable el receptor CB1 (CHO-CB1) y el receptor GPR55 (CHO-GPR55). Estas líneas celulares fueron proporcionadas por el Dr. Guzmán (Universidad Complutense de Madrid, España) y por el Dr. Ken Mackie (Universidad de Washington, Seattle, EE.UU.), respectivamente. Para su cultivo en placas de 60 mm de diámetro se utilizaba medio DMEM que contenía 400 µg/mL de G418 y SFB al 10%. El medio de cultivo de las células CHO-CB1 se complementaba con aminoácidos no esenciales en MEM al 1% (Rueda y cols., 2000), mientras que el medio de cultivo de las células CHO-GPR55 se suplementaba con una mezcla de antibióticos (800 UI de penicilina y 200 µg/mL de estreptomicina) (Lauckner y cols., 2008).

Las células CHO-CB1 y CHO-GPR55 fueron transfectadas de forma transitoria con el ADNc que codifica la expresión del canal Kv4.3 (3 µg) usando también el método del FuGENE 6. El vector de expresión pBK<sub>CMV</sub> con el ADNc del canal Kv4.3 fue proporcionado por el Dr. McKinnon de la Universidad de Nueva York (Stony Brook, NY, EE.UU.) quién lo clonó y lo caracterizó electrofisiológicamente. El canal Kv4.3 fue clonado de corazón de rata

(Dixon y cols., 1996). Este canal presenta una homología a nivel de secuencia nucleotídica del 91% con respecto del humano, difiriendo tan sólo en tres aminoácidos (Glu152, Ser540 y Thr646 en rata vs. Asp152, Pro540 y Ala646 en humano).

Todas la líneas celulares se mantenían a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5% y eran tratadas con tripsina (0.5 mg/mL) cada 4-5 días (Delpón y cols., 2008; Gómez y cols., 2008; Radicke y cols., 2008).

### 3.2. Técnicas electrofisiológicas de registro en sistemas de expresión heterólogos

Se colocó una alícuota de la suspensión de células transfectadas en una cámara de 0.5 mL montada sobre una platina de un microscopio invertido (Nikon TMS; Nikon Co., Tokio, Japón). Después de que las células se asentaran en el fondo de la misma, las células CHO fueron perfundidas a una velocidad de flujo de 1 mL/min con solución externa (ver composición en el apartado 2.3). Todos los experimentos fueron realizados a una temperatura de 22-24 °C. Tras haber obtenido los registros de  $I_{Kv4.3}$  en situación control, se cambió la solución externa por otra que contenía la concentración deseada de los diferentes compuestos estudiados. Posteriormente, se dejó un periodo de equilibrio de 10 min antes de analizar los efectos de los mismos.

La  $I_{Kv4.3}$  fue registrada utilizando la configuración de célula entera (*whole-cell*) de la técnica de *patch-clamp* (Vaquero y cols., 2007; Delpón y cols., 2008; Gómez y cols., 2008; Radicke y cols., 2008), utilizando un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, California, EE.UU.). En las condiciones experimentales utilizadas, las corrientes permanecían estables durante más de 40 min (Delpón y cols., 2008; Gómez y cols., 2008; Radicke y cols., 2008). Las micropipetas fueron obtenidas a partir de tubos capilares de borosilicato de 1.0 y 0.5 mm de diámetro exterior e interior, respectivamente (GD1; Narishige Co Ltd, Tokio, Japón) utilizando un estirador horizontal de micropipetas programable (P-2000; Sutter Instruments Co., Novato, California, EE.UU.) y posteriormente pulidas en una microforja (MF-83; Narishige) hasta alcanzar el tamaño deseado. Para asegurar la calidad de la fijación del voltaje, la resistencia de las micropipetas utilizadas una vez llenas con la solución interna y sumergidas en la solución externa fue inferior a 3.5 MΩ. Los artefactos de corriente capacitativa generados al aplicar pulsos simétricos de 10 mV se registraron a 50 kHz (filtrados a 10 kHz) para el cálculo posterior de la capacitancia y la resistencia de acceso a la célula. Posteriormente, las resistencias en serie se compensaron manualmente utilizando la

unidad de compensación de resistencias en serie del amplificador Axopatch, alcanzándose una compensación  $\approx 80\%$ .

En las células CHO, células CHO-CB1, y CHO-GPR55 se midieron los valores de capacitancia celular media, la resistencia de acceso media no compensada y la amplitud máxima de la  $I_{Kv4.3}$  a +50 mV (Tabla III.2). En nuestras condiciones experimentales los errores de voltaje debidos a las resistencias en serie fueron mínimos ( $< 5$  mV).

Además, la baja capacitancia permitió un rápido control de la fijación del voltaje. Las corrientes se registraron a una frecuencia de muestreo de 4 kHz, se filtraron a 2 kHz y se almacenaron en el disco duro de un ordenador para su posterior análisis.

### 3.3. Soluciones, protocolos experimentales y análisis de resultados

Para el registro de la  $I_{Kv4.3}$ , la solución externa contenía (en mM): NaCl 136, KCl 4,  $CaCl_2$  1.8,  $MgCl_2$  1, HEPES 10 y glucosa 10 (ajustado a pH=7.4 con NaOH). Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): K-aspartato 80, KCl 42,  $KH_2PO_4$  10, MgATP 5, fosfocreatina 3, HEPES 5 y EGTA 5 (ajustado a pH=7.2 con KOH).

La generación de protocolos, la adquisición de datos y el análisis de los mismos fueron llevados a cabo mediante el uso del software PCLAMP 10.0 y de sus aplicaciones CLAMPEX y CLAMPFIT (Molecular Devices).

El potencial de fijación (*holding potential*) se mantuvo a -80 mV y el intervalo de tiempo entre los distintos protocolos de estimulación fue de al menos 30 s para evitar la acumulación de la inactivación de la corriente y/o el acúmulo del bloqueo producido por los compuestos utilizados si éste fuese frecuencia-dependiente. El protocolo para obtener la relación I-V consistió en pulsos de 250 ms, los cuales se aplicaron en incrementos de 10 mV entre -90 y +50 mV. A potenciales de membrana más negativos de -40 mV, se obtenía una “corriente de fuga” (*leak current*) cuya amplitud aumentaba linealmente con la despolarización. Para los restantes potenciales de membrana, la amplitud de la corriente generada se corregía sustrayendo el valor de la corriente de fuga calculado para cada potencial a partir de la extrapolación de la regresión lineal. Cuando los compuestos objeto de estudio producían una significativa aceleración de la inactivación, la disminución de la amplitud del pico de corriente no era un índice válido para representar adecuadamente el grado de inhibición en estado estacionario. Por lo tanto, para una mejor caracterización del bloqueo en estado estable producido por estos compuestos, se utilizó como índice del mismo la disminución de la carga

total que atraviesa la membrana a través de los canales Kv4.3+KChIP2 a +50 mV ( $Q_{Kv4.3}$ ), calculada como la integral del área bajo los trazos de corriente a dicho potencial de membrana. Posteriormente, se representó la carga en función del potencial de membrana y se obtuvieron las relaciones carga-voltaje (relaciones Q-V).

Las curvas de inactivación de la  $I_{Kv4.3}$  fueron obtenidas utilizando un protocolo experimental de doble pulso. Primero se aplicaba un pulso de 250 ms desde -80 mV hasta potenciales comprendidos entre -90 mV y +50 mV, que era seguido de un pulso test de 250 ms a +50 mV. Las curvas de inactivación se obtenían representando la amplitud del pico de corriente generado por el pulso test en función del potencial de membrana del primer pulso. Las curvas de inactivación fueron ajustadas mediante una ecuación de Boltzmann:

$$y = A / \{1 + \exp [(V_h - E_m)/k]\} \quad (\text{III.1})$$

donde A es la amplitud,  $V_h$  el punto medio de inactivación,  $E_m$  el potencial de membrana y  $k$  representa el valor de la pendiente de la curva.

Para describir la cinética de activación e inactivación de las corrientes durante la despolarización, se utilizó un análisis exponencial, ajustando los trazos de la corriente registrada a +50 mV desde el final del tramo sigmoidal hasta el pico máximo de corriente y desde el pico máximo de corriente hasta el final del pulso, respectivamente, a la siguiente ecuación:

$$y = C + A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) + \dots + A_n \exp(-t/\tau_n) \quad (\text{III.2})$$

donde  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  y  $\tau_n$  son las constantes de tiempo del sistema,  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_n$  son las amplitudes de cada uno de los componentes de la exponencial y C es el valor basal. El procedimiento de ajuste utilizado fue un algoritmo no lineal de mínimos cuadrados (Gauss-Newton); los resultados obtenidos fueron representados en formato lineal y semilogarítmico. La bondad del ajuste fue estimada mediante el criterio de  $\chi^2$ , eliminándose aquellos ajustes en los que aparecían desviaciones sistemáticas no aleatorizadas.

La dependencia de voltaje de la activación de los canales Kv4.3 o conductancia (G) se determinó mediante la relación:

$$G = I / (E_m - E_I) \quad (\text{III.3})$$

donde I es la amplitud de la corriente generada al aplicar los pulsos a los diferentes potenciales de membrana ( $E_m$ ) y  $E_I$  es el potencial de inversión ( $-72.4 \pm 6.4$  mV,  $n=6$ ) (Moreno y cols., 2003).

Las curvas de activación o curvas conductancia-voltaje se obtenían representando la conductancia frente al potencial de membrana correspondiente y se ajustaron a una ecuación de Boltzmann obteniéndose los valores de  $V_h$  y  $k$  de las curvas.

La fracción de bloqueo ( $f$ ) producido por cada compuesto fue definida como:

$$f = 1 - I_{\text{Compuesto}} / I_{\text{Control}} \quad (\text{III.4})$$

Para describir la interacción fármaco-canal, se escogió el modelo más común, en el que se asume que la molécula de fármaco (F) interacciona con el receptor (R) en una reacción bimolecular reversible formando el complejo fármaco-receptor (FR):



En situación de equilibrio:  $[\text{F}][\text{R}]/[\text{FR}] = K_D = l/k$

La reacción descrita por este modelo obedece a los principios de la ley de acción de masas (Weiland y Molinoff, 1981). Por tanto, la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ , concentración que produce una inhibición de la corriente del 50%) fue obtenida al ajustar la ecuación de Hill a la fracción de bloqueo ( $f$ ) obtenida en presencia de distintas concentraciones de fármaco  $[\text{D}]$  fijando el coeficiente de Hill ( $n_H$ ) a 1 y el máximo al 100%:

$$f = 1 / \{1 + (CI_{50}/[\text{D}])^{n_H}\} \quad (\text{III.6})$$

#### 4. Registro de la $I_{\text{tot}}$ en miocitos auriculares humanos

El estudio del que se obtuvieron las muestras de orejuelas auriculares humanas fue aprobado por el Comité de Investigación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid (CNIC-13) y se adecuaba a los principios descritos en la Declaración de Helsinki. Las muestras de tejido auricular (orejuela derecha) se obtuvieron de pacientes ( $n=21$ ) que iban a ser sometidos a cirugía cardíaca con circulación extracorpórea. Antes de la operación, los pacientes recibieron y firmaron un consentimiento donde se les informaba de los fines experimentales a los que iba a ser destinada la muestra. Las muestras se dividieron en dos grupos: muestras procedentes de pacientes en RS y muestras procedentes de pacientes con FAc. Las características de los pacientes de los que se obtuvieron las muestras tanto para

realizar los experimentos de electrofisiología como los de extracción de ARNm se resumen en la Tabla III.1.

	RS	FAc
Pacientes ( <i>n</i> )	14	7
Edad (años)	65±2	69±3
M/F ( <i>n</i> )	10/4	6/1
Cardiopatía		
Valvular ( <i>n</i> )	6	3
Isquémica ( <i>n</i> )	2	2
Combinada ( <i>n</i> )	6	2
Hipertensión ( <i>n</i> )	6	2
Insuficiencia cardíaca	3	2
Diabetes mellitus ( <i>n</i> )	1	2
Dislipidemia ( <i>n</i> )	7	2
Diámetro AI (cm)	4.1±0.3	4.8±0.2*
Fracción de eyección (%)	54.0±2.4	45.3±3.0*
Clase Funcional NYHA		
I ( <i>n</i> )	2	1
II ( <i>n</i> )	8	2
III ( <i>n</i> )	4	3
IV ( <i>n</i> )	0	1
Creatinina (mg/dL)	1.0±0.1	0.85±0.1
Presión Sistólica Pulmonar (mm Hg)	56.3±4.9	47.5±5.2
Tratamiento		
Beta bloqueantes ( <i>n</i> )	8	4
IECA/ARAII ( <i>n</i> )	5	3
Estatinas ( <i>n</i> )	7	3
Ácido acetilsalicílico ( <i>n</i> )	4	3
Digoxina ( <i>n</i> )	1	1
Antagonistas del calcio ( <i>n</i> )	0	1
Diuréticos ( <i>n</i> )	4	5
Espironolactona ( <i>n</i> )	0	2
Anticoagulantes orales ( <i>n</i> )	1	5

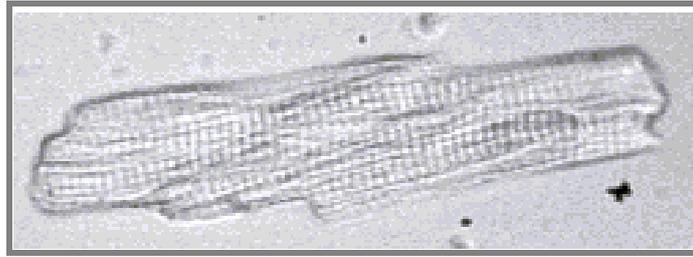
**Tabla III.1. Características de los pacientes.** M, masculino; F, femenino; AI, aurícula izquierda; NYHA, New York Heart Association; IECA, inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina II; ARAII, antagonistas de los receptores tipo 1 de la angiotensina II. \* P<0.05 vs. pacientes en RS.

#### 4.1. Disociación de miocitos auriculares humanos

Para la disociación de las muestras se utilizó un protocolo de uso común en nuestro grupo de investigación (Gómez y cols., 2008; Gómez y cols., 2009; Barana y cols., 2010; Caballero y cols., 2010a; Caballero y cols., 2010b; de la Fuente y cols., 2012).

Las muestras se obtenían en el quirófano y se transportaban en solución *Tyrode* “cero calcio” (*Tyrode* 0  $\text{Ca}^{2+}$ , de composición [en mM]: NaCl 100, KCl 10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{MgSO}_4$  5, taurina 50, MOPS 5, glucosa 20), suplementada con 2,3-butanodiona monoxima 30 mM (ajustado a pH=7.0 con NaOH). Una vez en el laboratorio, donde se realizaba la disociación, y tras la eliminación del tejido fibroso, la muestra se cortaba en pequeños trozos ( $\approx 1 \text{ mm}^3$ ) y se realizaban 4 lavados de 3 min cada uno en *Tyrode* 0  $\text{Ca}^{2+}$ , en un baño a 37°C y con burbujeo de  $\text{O}_2$ . Una vez lavados, los trozos se mantuvieron en la misma solución a la que se añadía colagenasa tipo I (254 U/mL; Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, EE.UU.) y proteasa tipo XXIV (0.5 mg/mL; Sigma-Aldrich). Pasados 15 min, se añadía  $\text{Ca}^{2+}$  (0.2 mM) y se mantenía en las mismas condiciones de temperatura y burbujeo durante otros 30 min. Transcurrido este tiempo, el tejido se filtraba y se resuspendía en *Tyrode* 0  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de colagenasa, pero sin proteasa. Mientras la muestra se trataba sólo con colagenasa se tomaban alícuotas cada 3 min para su observación al microscopio. Cuando tanto el número de miocitos como su morfología eran los idóneos (Figura III.4), se paraba la reacción enzimática filtrando la muestra. A continuación, se resuspendía la muestra con un pipeteador durante 4-5 min en “solución de almacenamiento” (composición en mM: KCl 20,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10, glucosa 10, K-glutamato 70, ácido  $\beta$ -hidroxibutírico 10, taurina 10, EGTA 10 y albúmina 1 [ajustado a pH=7.4 con KOH]). Pasados  $\approx 5$  min se filtraba de nuevo la muestra y se volvía a resuspender en solución de almacenamiento. Por último, se añadían concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en tres pasos: el primero para obtener una concentración de 0.2 mM; tras 10 min se aumentaba la concentración hasta 0.3 mM; y en el tercer paso, tras otros 10 min, hasta una concentración final de 0.5 mM.

Los miocitos se dejaban reposar durante 1 h a 4°C hasta su posterior utilización para la obtención de los registros electrofisiológicos, siempre dentro de las siguientes 8 h.



**Figura III.4.** Miocito auricular humano disociado enzimáticamente en nuestro laboratorio.

#### 4.2. Técnicas de registro de la $I_{to1}$ en miocitos auriculares humanos

La  $I_{to}$  está formada en realidad por dos componentes bien diferenciados, la  $I_{to1}$  y la  $I_{to2}$ , donde sólo la  $I_{to1}$  es una corriente de  $K^+$ , ya que la  $I_{to2}$  es una corriente de  $Cl^-$  activada por  $Ca^{2+}$  (Kenyon y Gibbons, 1979; Coraboeuf y Carmeliet, 1982; Hiraoka y Kawano, 1989).

El registro de la  $I_{to1}$  se realizaba de manera similar a como se ha explicado en el apartado III.3.2 para el registro de la  $I_{Kv4.3}$ . Se colocaba una alícuota de la suspensión de los miocitos humanos disociados enzimáticamente en la cámara montada sobre la platina del microscopio invertido. Para la obtención de los registros se utilizó un amplificador Axopatch 200B. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (22-24°C). La generación de protocolos, la adquisición de datos y el análisis de los mismos fueron llevados a cabo mediante el uso del software PCLAMP 10.0 y de sus aplicaciones CLAMPEX y CLAMPFIT.

Las micropipetas empleadas en los registros fueron obtenidas como se ha descrito en el apartado 3.2. Para asegurar la calidad de la fijación del voltaje, la resistencia de las micropipetas utilizadas, una vez que se rellenaban con la solución interna y se sumergían en la solución externa, era de 2-4 M $\Omega$ .

Los valores medios de la amplitud máxima de la  $I_{to1}$ , la resistencia de acceso no compensada y la capacitancia de los miocitos auriculares humanos se recogen en la Tabla III.2.

#### 4.3. Soluciones y protocolos experimentales

Para el registro de la  $I_{to1}$  en miocitos auriculares humanos, la solución externa contenía (en mM): NaCl 120, KCl 20,  $CaCl_2$  1,  $MgCl_2$  1, HEPES 10 y glucosa 10 (ajustado a pH=7.4 con NaOH). A dicha solución se le añadía 4-AP (50  $\mu$ M), nifedipino (1  $\mu$ M) y atropina (1  $\mu$ M) para inhibir la  $I_{Kur}$ ,  $I_{Ca,L}$  e  $I_{K,ACh}$ , respectivamente. En algunos experimentos se añadió también

a la solución externa RMB (1  $\mu\text{M}$ ) o AM281 (1  $\mu\text{M}$ ) y AM630 (1  $\mu\text{M}$ ) para bloquear los receptores CB1 y CB2, respectivamente. Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): K-aspartato 80, KCl 42,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10, Mg-ATP 5, fosfocreatina 3, HEPES 5 y EGTA 5 (ajustado a  $\text{pH}=7.2$  con KOH).

El protocolo para registrar la  $I_{\text{to1}}$  auricular humana consistió en un prepulso de 25 ms de duración a -30 mV para inactivar la  $I_{\text{Na}}$ , seguido de pulsos de 250 ms de duración desde -90 hasta +50 mV en incrementos de 10 mV desde un potencial de fijación de -80 mV. Para la construcción de las relaciones Q-V, se representaba la carga total que atravesaba la membrana a través de los canales que generan la  $I_{\text{to1}}$  a +50 mV ( $Q_{\text{to1}}$ ), calculada como la integral del área bajo los trazos de corriente a dicho potencial.

Corriente	Amplitud máxima (nA) a +50 mV	Resistencia de acceso no compensada ( $\text{M}\Omega$ )	Capacitancia celular (pF)	Número de células (n)
$I_{\text{Kv4.3}}$	2.4 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2	9.2 $\pm$ 0.7	42
$I_{\text{Kv4.3-CB1}}$	2.8 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 0.6	25
$I_{\text{Kv4.3-GPR55}}$	2.5 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.2	8.7 $\pm$ 0.3	51
$I_{\text{to1}}$	0.9 $\pm$ 0.07	3.9 $\pm$ 0.6	81.3 $\pm$ 17.9	15

**Tabla III.2. Valores medios de las amplitudes máximas de las corrientes registradas, y de las resistencias de acceso no compensadas y las capacitancias de las células utilizadas.** Los datos representan la media $\pm$ EEM del número de experimentos (n) que se mencionan. En estas condiciones, los errores de voltaje debidos a las resistencias en serie eran mínimos (<5 mV).

## 5. Medidas de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario y con resolución temporal

Una suspensión de  $1\text{-}3 \times 10^6$  células CHO en 1 mL de solución externa se incubó a 20°C durante 15 min en oscuridad con la sonda fluorescente 2-carboxietil-1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (PA-DPH; Molecular Probes, Invitrogen) a una concentración de 2  $\mu\text{M}$ . La sonda fue disuelta en DMSO hasta obtener una solución madre de 1 mM. A continuación, las células se incubaron con los diferentes compuestos estudiados AEA, 2-AG, LPI y PEA a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  y la sonda PA-DPH (2  $\mu\text{M}$ ) durante 20 min.

Las medidas de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario ( $r_{\text{ss}}$ ) fueron realizadas a 20°C en un espectrofluorímetro contador de fotones ISS-PC1 con polarizadores Glan-Taylor, usando cubetas de 5x5 mm y anchos de banda de excitación y emisión de 2 nm y 10 nm, respectivamente ( $\lambda_{\text{exc}}= 375$  nm y  $\lambda_{\text{em}}= 450$  nm). La anisotropía de fluorescencia en estado estacionario se define como:

$$r_{ss} = (I_{par} - I_{per} \times G) / (I_{par} + 2 \times G \times I_{per}) \quad (III.7)$$

donde  $I_{par}$  e  $I_{per}$  son las intensidades polarizadas de emisión vertical y horizontal, respectivamente, obtenidas por excitación polarizada vertical y  $G$  es un factor que tiene en cuenta la diferencia en la eficiencia de detección de las dos intensidades polarizadas. La intensidad total de fluorescencia y la  $r_{ss}$ , registrada en función del tiempo, alcanzaron valores estables a los 3-5 min y se mantuvieron constantes, al menos, durante 1 h.

Las medidas de anisotropía e intensidad de fluorescencia con resolución temporal fueron llevadas a cabo usando una versión modificada de un contador de unidades de fotones (Lillo y cols., 2002) y un diodo láser PicoQuant 375 nm como fuente de excitación, con una resolución temporal de 12.2 ps por canal (Guizy y cols., 2008; Barana y cols., 2010). La longitud de onda de emisión era de 450 nm (8 nm de ancho de banda). Además, se incluyó en la parte de la emisión un filtro adicional de 418 nm para minimizar la dispersión de la señal de fluorescencia. Para la medida de los tiempos de vida media se registró la disminución de la intensidad de la muestra con luz de excitación polarizada verticalmente y con el polarizador de emisión en posición de “ángulo mágico” ( $54.7^\circ$ ),  $I_m(t)$ . Dicha disminución se calculó mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados realizado con un programa desarrollado para tal fin por GLOBALS Unlimited (Urbana, Illinois, EE.UU.) (Beechem y cols., 1992). La disminución progresiva de la anisotropía de fluorescencia con resolución temporal [ $r(t)$ ] se determinó mediante el análisis simultáneo de los componentes de emisión  $I_{par}(t)$  e  $I_{per}(t)$ , asumiendo una función monoexponencial con una anisotropía residual o límite ( $r_\infty$ ), mediante la ecuación:

$$r(t) = (r_0 - r_\infty) \sum \beta_i \exp(-t/\phi_i) + r_\infty \quad (III.8)$$

donde  $\phi_i$  son los tiempos de relajación correspondientes al movimiento rotacional restringido de la sonda de fluorescencia en la membrana (Kinosita y cols., 1984; Mateo y cols., 1991, 1993; Guizy y cols., 2008; Barana y cols., 2010) y  $\beta_i$  (factores preexponenciales) son las amplitudes normalizadas. El valor de  $r_0$  (propiedad espectroscópica de los derivados del DPH) fue previamente determinado de manera experimental ( $0.390 \pm 0.003$ ) (Mateo y cols., 1993). La distribución de los residuos ponderados se empleó para juzgar la bondad del ajuste.

## 6. Determinación del índice de complejidad

El grado de complejidad de cada compuesto se calculó mediante la ecuación de Bertz/Hendrickson/Ihlenfeldt que considera tanto el tamaño de la molécula como la presencia y naturaleza de los diferentes grupos reactivos presentes en cada compuesto:

$$C = C_{\eta} + C_E \quad (\text{III.9})$$

donde  $C_{\eta}$  es el término principal y mide la complejidad del esqueleto de la molécula y se calcula como:

$$C_{\eta} = 2\eta \log_2 \eta - \sum_i \eta_i \log_2 \eta_i \quad (\text{III.10})$$

Cada valor de  $\eta_i$  se calcula como:

$$\eta_i = \frac{1}{2} (4-h) (3-h) \quad (\text{III.11})$$

donde  $h$  es el número de hidrógenos del átomo  $i$ .

El valor de  $\eta$  para la molécula entera se puede calcular con la siguiente ecuación:

$$\eta = \frac{1}{2} \sum_i (4-h_i)(3-h_i) - D - 3T \quad (\text{III.12})$$

donde  $h_i$  es el número de hidrógenos del átomo  $i$ ,  $D$  el número de dobles enlaces y  $T$  el número de triples enlaces.

$C_E$  es el llamado término de simetría y su valor depende de la diversidad de elementos presentes en la molécula y se calcula como:

$$C_E = E \log_2 E - \sum_j E_j \log_2 E_j \quad (\text{III.13})$$

siendo  $E$  el número total de átomos no hidrogenados y  $E_j$  el número de átomos del elemento  $j$ .

## 7. Análisis de la expresión del ARNm de los receptores CB

### 7.1. Extracción de ARNm

Las muestras de tejido auricular (orejuela derecha) que se obtuvieron de los pacientes que fueron sometidos a cirugía cardíaca se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y fueron almacenadas a  $-80$  °C antes de su procesamiento. Una vez recopiladas todas las muestras ( $n=7$  RS y  $n=7$  FA), primero se homogeneizaron (homogeneizador Ultra Turrax T18 IKA, Staufen, Alemania) y después se extrajo el ARN mensajero (ARNm) total mediante el kit RNeasy midi kit (Qiagen, Valencia, California, EE.UU.). La cantidad de ARNm se cuantificó

por fotometría ( $\lambda = 260$  nm) y la pureza se verificó usando el ratio 260/280 al medir las muestras en el Nano-Drop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU).

## 7.2. Identificación de receptores CB en muestras auriculares humanas

La determinación de la presencia de los receptores CB1, CB2 y GPR55 se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (*Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR*) utilizando el kit OneStep RT-PCR (Qiagen) y un termociclador (*Mastercycler pro*; Eppendorf, Alemania).

Los cebadores (*primers*) sentido (*forward, Fw*) y antisentido (*reverse, Rv*) específicos para los receptores CB y para la PKC $\alpha$ , utilizada como control interno, se diseñaron a partir de las secuencias genéticas obtenidas de GenBank DNA sequences database (Tabla III.3) y fueron sintetizados por Roche Diagnostics vía TIB-MOLBIOL (Berlín, Alemania). La temperatura de hibridación fue de 55°C y las temperaturas de fusión (*Theoretical primer melting temperature, Tm*) para cada cebador específico aparecen reflejadas en la tabla III.3.

Los experimentos de RT-PCR se realizaron al menos tres veces para cada muestra partiendo de 0.5  $\mu$ g de RNAm total.

Receptor	Primer Fw 5'→3'	Tm (°C)	Primer Rv 3'→5'	Tm (°C)
CB1	AAGACCCTGGTCCTGATCCT	56.6	CGCAGGTCCTTACTCCTCAG	56.8
CB2	TAGACACGGACCCCCTTTTG	56.6	TTCTCCCAAGTCCCTCATTG	55.6
GPR55	AAGAACCACAGACCAGGTG	57.2	CTCTGCCCAAGACACTCTCC	56.5
PKC $\alpha$	CCTTAGGCGAGTGTGGTGA	56.5	CTTCTCTGGCTCCTTCCTGA	55.6

Tabla III.3. Secuencias de los primers usados en la PCR.

La PCR se realizó en las siguientes condiciones: 1 ciclo de 30 min a 50°C (retrotranscripción), 1 ciclo de 15 min a 95°C (activación de la polimerasa), 40 ciclos compuestos cada uno por tres pasos: 1 min a 94°C para la desnaturalización del ADN, 1 min a 55°C para el proceso de hibridación y 1 min a 72°C para la elongación. Por último y tras un último paso de extensión a 72°C durante 10 min, los productos de la PCR fueron separados en geles de agarosa al 1.8% que contenían 0.5 ng/mL de bromuro de etidio. La cuantificación densitométrica se realizó utilizando un revelador Kodak 1500 Gel Logic y su programa de

análisis (Eastman Kodak, Rochester, NY, EE.UU.) tomando la intensidad de la banda como parámetro comparativo.

### 7.3. Cuantificación de la expresión de receptores CB en muestras auriculares humanas

La cantidad de ADN presente en las muestras obtenidas de pacientes en RS y con FA se determinó mediante PCR cuantitativa (qPCR). Los cebadores necesarios para la determinación por qPCR de los receptores CB, la enzima ADN polimerasa (AmpliAq Gold® DNA Polymerase, Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU), así como la sonda fluorescente TaqMan® (contiene una sonda “reporter” en el extremo 5’ de un oligonucleótido y una sonda “quencher” en el extremo 3’) fueron sintetizados por Applied Biosystems. Se utilizó el gen constitutivo ARN ribosómico (ARNr) 18S como control interno. La qPCR fue llevada a cabo en el servicio de genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas (CSIC) utilizando el equipo 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) en las siguientes condiciones: 1 ciclo de 10 minutos a 95°C (activación de la polimerasa) y 40 ciclos compuestos por dos pasos cada uno de ellos: uno de 15 segundos a 95 °C (desnaturalización) y otro de 1 min a 60°C (hibridación y elongación).

El análisis de los resultados de la qPCR se realizó con el software Real Time PCR SDS 2.2.2 (Applied Biosystems) por triplicado y se utilizó el método de la comparación de los valores del ciclo límite crítico (Ct, ciclo umbral en el que la fluorescencia de la muestra se hace detectable por encima del fondo) que se define como:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (III.14)$$

siendo  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  muestra referencia –  $\Delta Ct$  muestra estudio y  $\Delta Ct = Ct$  muestras –  $Ct$  control endógeno.

En nuestro caso se calcularon los valores de  $\Delta Ct$  del receptor CB1, CB2 y GPR55, normalizando sus valores al de los Ct del control endógeno (ARNr 18S), de las muestras de pacientes con FAc (muestra estudio) respecto a los  $\Delta Ct$  de los mismos receptores en muestras de pacientes en RS (muestra referencia).

## 8. Análisis estadístico de los resultados.

En cada serie homogénea de experimentos se calculó la media, la desviación estándar (DE) y el error estándar de la media (EEM). Los datos que aparecen en las distintas tablas y

representaciones gráficas de esta Tesis Doctoral se han expresado como la media $\pm$ EEM para un determinado número (n) de experimentos.

Los datos obtenidos tras la exposición a los distintos compuestos fueron comparados con aquellos obtenidos en situación control. Las comparaciones realizadas a un único voltaje fueron llevadas a cabo mediante la prueba *t* de Student. Para analizar el bloqueo a distintos voltajes, a diferentes concentraciones de los compuestos ensayados y para comparar resultados entre más de dos grupos de experimentos se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un test de Newman-Keuls. Se consideraron como significativas aquellas diferencias para las que el valor de *P* resultó ser menor de 0.05.

Para la realización del análisis estadístico y la composición de las figuras de esta Tesis Doctoral se emplearon la aplicación CLAMPFIT del paquete informático PCLAMP (v9.0 y v10.0) (Molecular Devices), las aplicaciones Excel y PowerPoint del paquete informático Microsoft Office 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EE.UU.) y el programa Prism (v3.0 y v4.0) (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.).



## **IV. RESULTADOS**



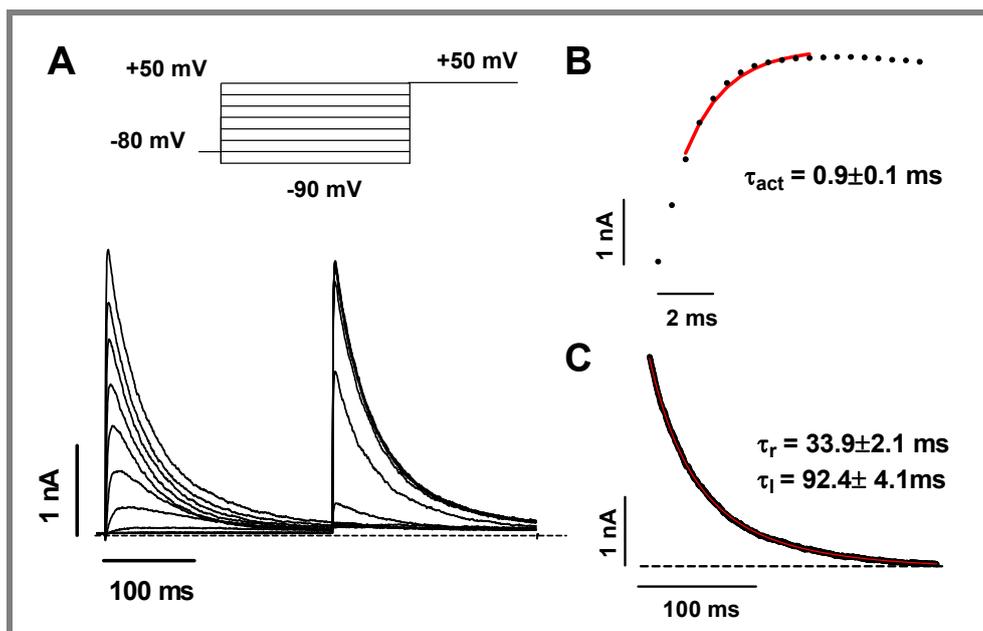
Los resultados de la presente Tesis Doctoral se han dividido en dos apartados. En el primero de ellos se describen los efectos directos de diferentes endocannabinoides y etanolamidas con actividad cannabimimética sobre los canales Kv4.3+KChIP2a cardiacos humanos expresados de forma estable en células CHO, así como de los ácidos grasos correspondientes a cada una de las etanolamidas. En el segundo apartado, se describen los efectos de los cannabinoides sobre la  $I_{Kv4.3}$  mediados por la activación de los receptores CB1 y GPR55, así como las vías de señalización responsables de los mismos.

### **1. Características electrofisiológicas de la $I_{Kv4.3}$**

Las características funcionales de los canales Kv4.3 expresados en células de mamífero se corresponden con bastante fidelidad, aunque no en su totalidad, con las de la corriente  $I_{to1}$  registrada en células nativas (Dixon y cols., 1996, Caballero y cols., 2004a; Nerbonne y Kass, 2005; Gómez y cols., 2008; Caballero y cols., 2010a).

En nuestros experimentos, hemos utilizado células que expresan de forma estable el ADNc que codifica la expresión del canal Kv4.3 y la subunidad auxiliar KChIP2a. Estas dos proteínas integran los canales que generan la  $I_{to1}$  en los miocitos cardiacos humanos (An y cols., 2000; Kuo y cols., 2001; Rosati y cols., 2001; Gómez y cols., 2008; Caballero y cols., 2010a), aunque otras proteínas pueden participar también en la corriente generada en las células nativas (Delpón y cols., 2008).

En la figura IV.1A, se muestra un familia de trazos de  $I_{Kv4.3}$  obtenidos al aplicar el protocolo de doble pulso que se muestra en la parte superior de la figura y que consistía en un primer pulso de 250 ms de duración desde -80 mV hasta potenciales comprendidos entre -90 y +50 mV, en incrementos de 10 mV, seguido de un pulso test de 250 ms de duración a +50 mV. A potenciales más positivos de -30 mV se registraba una corriente cuya amplitud aumentaba según el pulso despolarizante era más positivo, hasta alcanzar un valor máximo de  $2464 \pm 172$  pA ( $n=42$ ) a +50 mV. Por el contrario, al aplicar el segundo pulso o pulso test, registrábamos una corriente cuya amplitud era tanto mayor cuanto más negativo era el potencial del pulso previo, ya que a potenciales negativos, es mayor la fracción de canales disponibles para ser activados.



**Figura IV.1. Características electrofisiológicas de la corriente generada por los canales Kv4.3+KChIP2a.** (A) Trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrados tras aplicar un primer pulso de 250 ms desde un potencial de fijación de -80 mV hasta potenciales comprendidos entre -90 y +50 mV, seguido de un segundo pulso o pulso test de 250 ms a +50 mV. (B) Ajuste monoexponencial del tramo inicial del trazo de corriente a +50 mV. (C) Ajuste biexponencial de la caída de la corriente a +50 mV. En A y C, la línea discontinua indica el nivel de corriente cero.

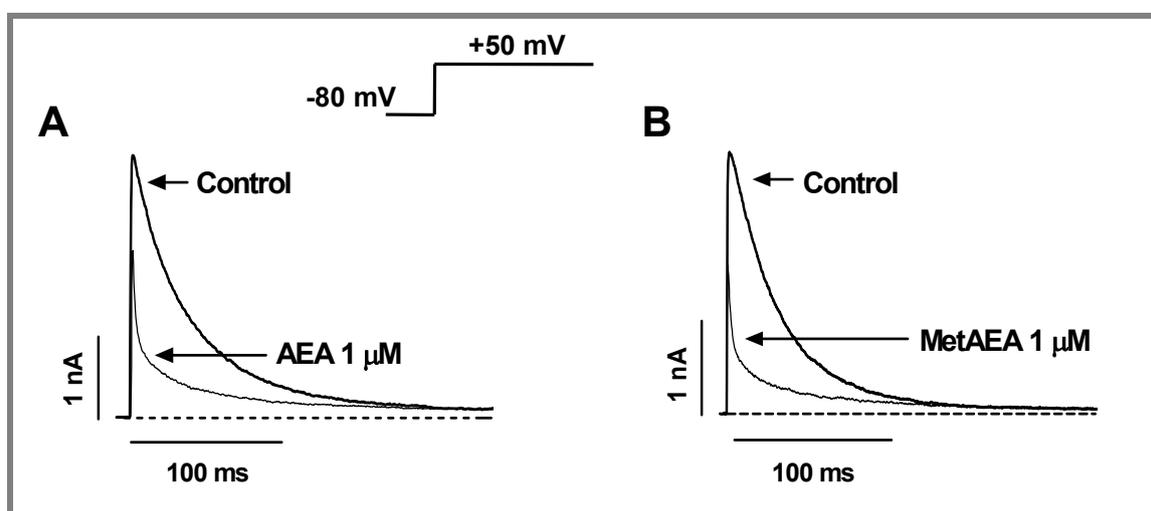
La  $I_{Kv4.3}$  generada en respuesta a un pulso despolarizante aumenta rápidamente hasta llegar a un máximo de corriente como consecuencia del paso del canal desde el estado cerrado al abierto (activación). Para analizar la cinética de activación se ajustó una función monoexponencial a la fase de ascenso de los trazos de la corriente, lo que nos permitió obtener la constante de tiempo de activación ( $\tau_{act}$ ) que resultó ser de  $0.9 \pm 0.1$  ms a +50 mV ( $n=42$ ) (Figura IV.1B). Una vez alcanzado el máximo de corriente, la amplitud de la  $I_{Kv4.3}$  disminuye rápida y completamente durante la aplicación del pulso despolarizante debido al paso de los canales desde el estado abierto al inactivo (inactivación). El ajuste de una función biexponencial (Ecuación III.2) a la fase de caída de los trazos de la corriente registrada a +50 mV permitió obtener dos constantes de tiempo de inactivación, una rápida ( $\tau_r$ ) de  $27.0 \pm 6.3$  ms y otra lenta ( $\tau_l$ ) de  $95.6 \pm 12.1$  ms ( $n=42$ ) (Figura IV.1C).

## 2. Efectos directos de los endocannabinoides y análogos de cannabinoides sobre los canales Kv4.3 +KChIP2a

### 2.1. Efectos de la AEA y la MetAEA sobre los canales Kv4.3+KChIP2a

La AEA es un endocannabinoide que se hidroliza a etanolamina y AA por la acción de la enzima intracelular FAAH. La formación de AA puede ser el punto de partida de la formación de diversos compuestos derivados de este ácido graso con funciones biológicas múltiples (Guindon y Hohmann, 2008). Para comprobar que los efectos observados en presencia de AEA se debían a este compuesto y no a algún producto de su degradación, en todos los grupos de experimentos se compararon los efectos de la AEA con los de su análogo no hidrolizable, la MetAEA.

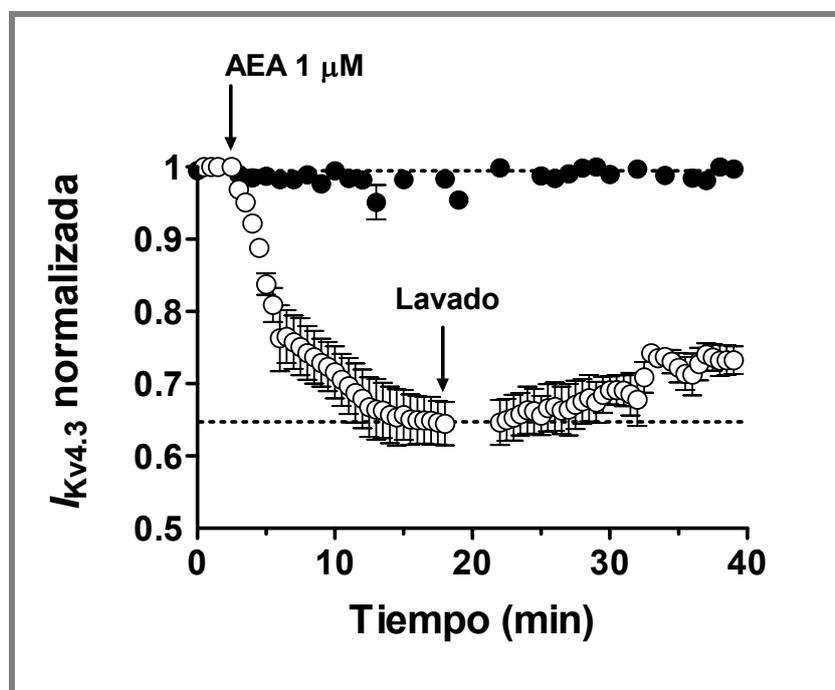
En la figura IV.2A y B se representan trazos de  $I_{Kv4.3}$  obtenidos al aplicar pulsos de 250 ms de duración desde un potencial de fijación de  $-80$  mV hasta  $+50$  mV en situación control y en presencia de AEA (A) y de su análogo MetAEA (B), a la concentración de  $1 \mu\text{M}$ . La AEA  $1 \mu\text{M}$  disminuyó la amplitud del pico de corriente en un  $37.5 \pm 6.3\%$  ( $n=5$ ,  $P < 0.05$  vs. control). La MetAEA producía efectos muy similares a los observados con la AEA, de tal forma que reducía la amplitud del pico de la  $I_{Kv4.3}$  en un  $47.5 \pm 2.9\%$  ( $P > 0.05$  vs. AEA).



**Figura IV.2.** Efectos de la AEA y la MetAEA sobre la  $I_{Kv4.3}$ . Trazos de corriente  $I_{Kv4.3}$  registrados tras aplicar pulsos de 250 ms desde  $-80$  hasta  $+50$  mV en ausencia y presencia de AEA (A) y MetAEA (B) a la concentración de  $1 \mu\text{M}$ . Las líneas discontinuas representan el nivel de corriente cero.

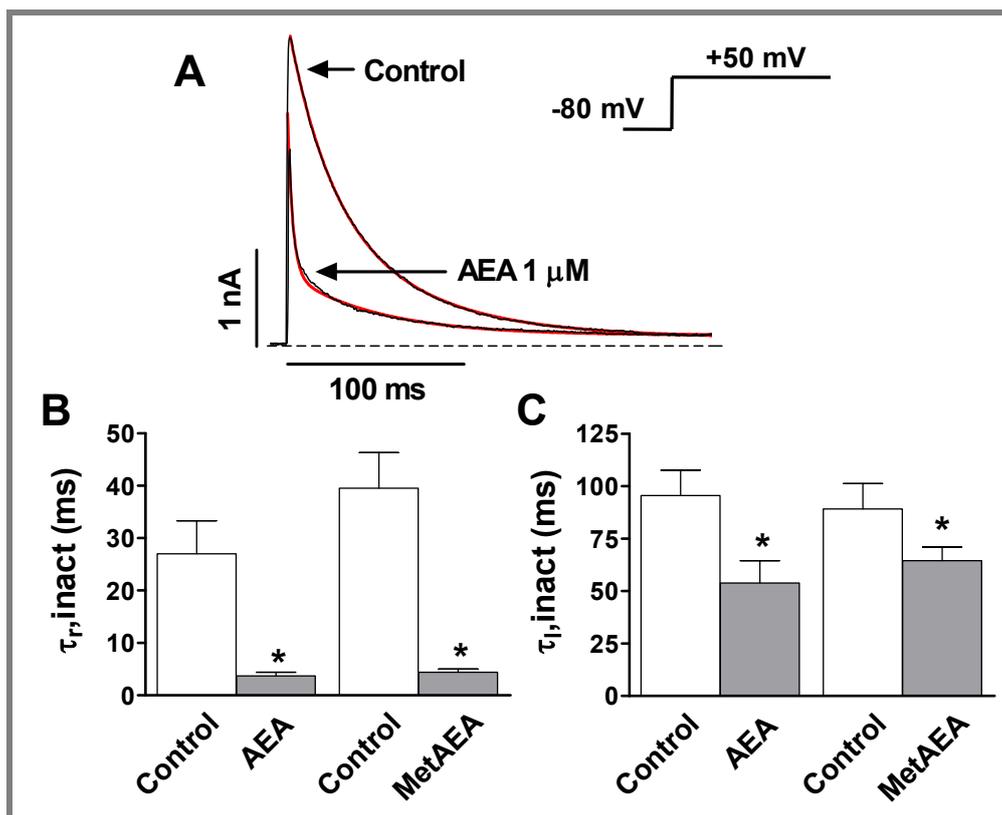
El curso temporal de la aparición de la inhibición de la  $I_{Kv4.3}$  producido por la AEA fue lento ya que el bloqueo alcanzaba el estado estable a los 12 min. Además, el efecto no se revertía completamente al perfundir las células con solución carente de compuesto

( $I_{AEA}/I_{Control}=0.63\pm 0.006$  después de más de 20 min de lavado de la AEA). La figura IV.3 muestra el curso temporal de aparición y desaparición del bloqueo producido por la AEA a la concentración de  $1\ \mu\text{M}$ . Idénticos resultados se obtuvieron con la MetAEA.



**Figura IV.3. Efecto de la AEA sobre la  $I_{Kv4.3}$  en función del tiempo.** Curso temporal de aparición y desaparición del bloqueo producido por la AEA a la concentración de  $1\ \mu\text{M}$ . Los círculos negros representan la  $I_{Kv4.3}$  a  $+50\ \text{mV}$  en función del tiempo en ausencia de los endocannabinoides. Los círculos blancos representan la  $I_{Kv4.3}$  normalizada durante los registros en situación control, después de la perfusión con  $1\ \mu\text{M}$  de AEA y, finalmente después del lavado con solución carente de AEA. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $\geq 4$  experimentos.

Como se muestra en la figura IV.4, la AEA aceleró el curso temporal de la inactivación, disminuyendo significativamente los valores de  $\tau_r$  y de  $\tau_i$  hasta  $3.7\pm 0.7\ \text{ms}$  y  $53.9\pm 10.6\ \text{ms}$  ( $P<0.05$  vs. control), respectivamente (Figuras IV.4A y B) lo cual sugiere que bloqueaba el estado abierto del canal. La MetAEA producía efectos muy similares a los observados con la AEA, de tal forma que disminuía significativamente los valores de las constantes  $\tau_r$  y  $\tau_i$  ( $n=5$ ,  $P<0.05$  vs. control) (Figuras IV.4A y B).

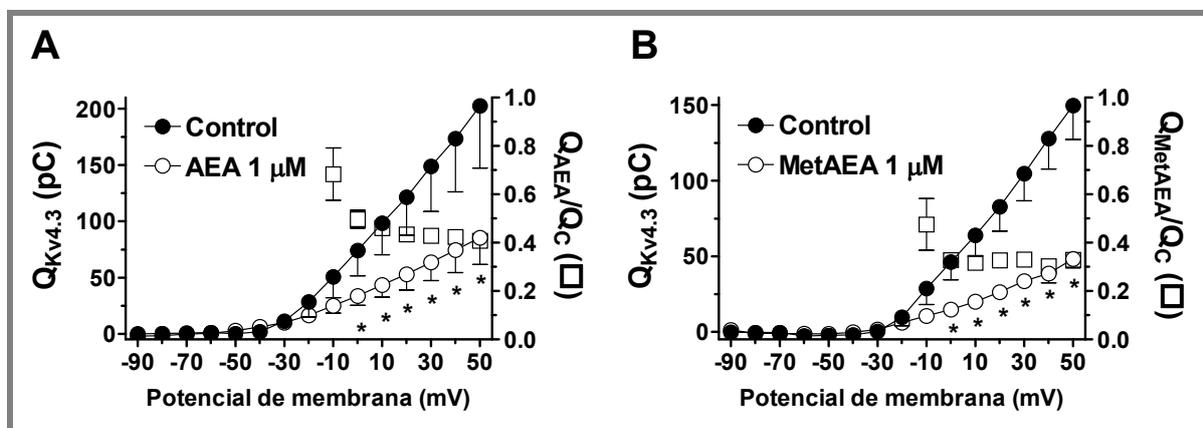


**Figura IV.4.** Efectos de los endocannabinoides sobre la cinética de la inactivación del canal Kv4.3+KChIP2a. (A) Ajuste biexponencial (en rojo) sobre los trazos de la corriente (en negro) a +50 mV en condiciones control y en presencia de AEA. La línea discontinua indica el nivel de corriente cero. (B y C) Constantes de tiempo de los componentes rápido ( $\tau_r$ , B) y lento ( $\tau_l$ , C) de la inactivación obtenidos tras ajustar una función biexponencial a los trazos de corriente a +50 mV en condiciones control y en presencia de AEA y MetAEA (1  $\mu$ M). Cada barra representa la media $\pm$ EEM de 5 experimentos. \*P < 0.05 vs. control.

Ambos compuestos producían una significativa aceleración de la inactivación, por lo que la disminución de la amplitud del pico de corriente no era un índice válido para representar adecuadamente el grado de inhibición en estado estacionario. Por tanto, para una mejor caracterización del bloqueo en estado estable, se utilizó como índice del mismo la disminución de la carga total que atravesaba la membrana a través de los canales Kv4.3+KChIP2a durante el pulso de 250 ms a +50 mV ( $Q_{Kv4.3}$ ), calculada como la integral del área bajo los trazos de corriente a dicho potencial de membrana. De esta manera la AEA y la MetAEA, a la concentración de 1  $\mu$ M, reducían la  $Q_{Kv4.3}$  a + 50 mV en un  $65.8\pm 3.5\%$  y un  $70.0\pm 3.2\%$ , respectivamente (P < 0.05 vs. control).

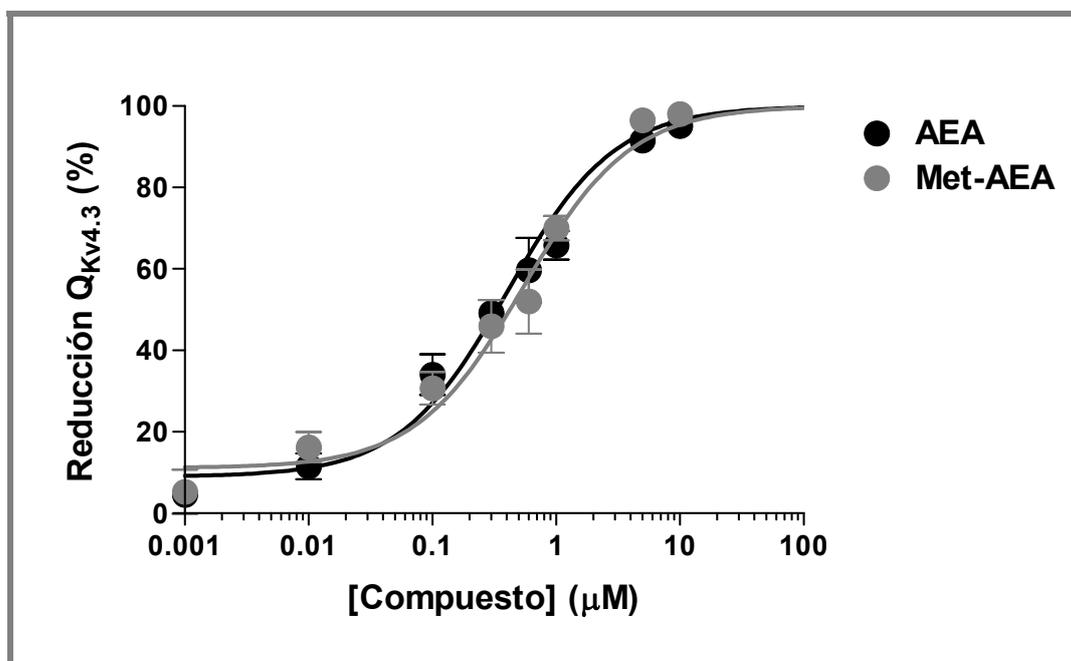
Las figuras IV.5A y B muestran las relaciones carga-voltaje (Q-V) en situación control y en presencia de AEA (1  $\mu$ M) y MetAEA (1  $\mu$ M), respectivamente, obtenidas al representar la  $Q_{Kv4.3}$  en función del potencial de membrana. La AEA y la MetAEA reducían la  $Q_{Kv4.3}$  de forma significativa a potenciales más positivos de -10 mV. Los cuadrados blancos representan los valores de carga relativa (cociente de la  $Q_{Kv4.3}$  en presencia y en ausencia de los diferentes

compuestos [ $Q_{COMP}/Q_C$  representados) en función del potencial de membrana. Se puede observar que el bloqueo aparecía a potenciales de membrana entre -20 y 0 mV coincidiendo con los potenciales a los que se produce la apertura de los canales  $Kv4.3+KChIP2a$ , lo que sugiere que los compuestos se unen al canal cuando éste pasa al estado abierto.



**Figura IV.5. Efectos de la AEA y la MetAEA sobre la  $I_{Kv4.3}$ .** Relaciones carga-voltaje en ausencia y en presencia de AEA (A) y MetAEA (B) a la concentración de 1  $\mu$ M. Los cuadrados blancos representan la carga relativa resultado del cálculo del cociente entre la carga en presencia de cada uno de los compuestos y la carga en situación control. Cada punto representa la media $\pm$ EEM de 5 experimentos. \*P < 0.05 vs. control.

La figura IV.6 muestra las curvas concentración-respuesta obtenidas al representar la disminución de la  $Q_{Kv4.3}$  a +50 mV en función de las distintas concentraciones de compuesto estudiadas (1 nM-10  $\mu$ M).

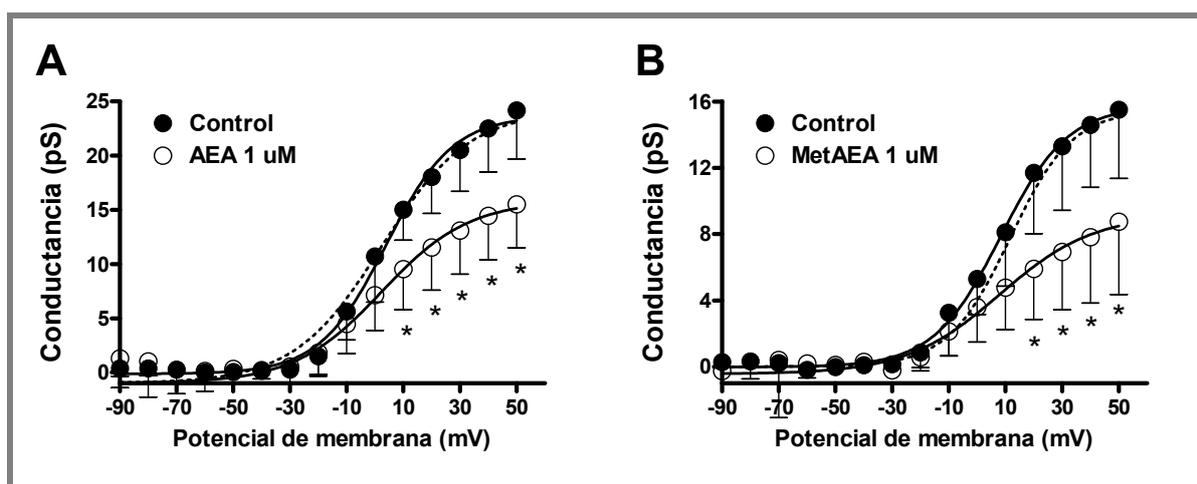


**Figura IV.6. Curvas concentración-respuesta para la AEA y MetAEA.** Reducción de la carga total que atraviesa la membrana a través de los canales  $Kv4.3+KChIP2a$  a +50 mV en función de la concentración de AEA (negro) y de MetAEA (gris). Las líneas continuas representan el ajuste de la ecuación de Hill a los datos experimentales. Cada punto representa la media $\pm$ EEM de  $\geq$  4 experimentos.

Ajustando la ecuación de Hill a los datos (Ecuación III.6) y fijando el  $n_H$  a 1 y el efecto máximo al 100%, se obtuvieron los valores de  $CI_{50}$  para la AEA ( $0.4 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ) y para la MetAEA ( $0.5 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ). Como se puede observar, la potencia de la AEA y de la MetAEA para bloquear los canales Kv4.3+KChIP2a es muy similar, lo que sugiere que los efectos observados con AEA son atribuibles a dicho endocannabinoide y no a sus productos de degradación.

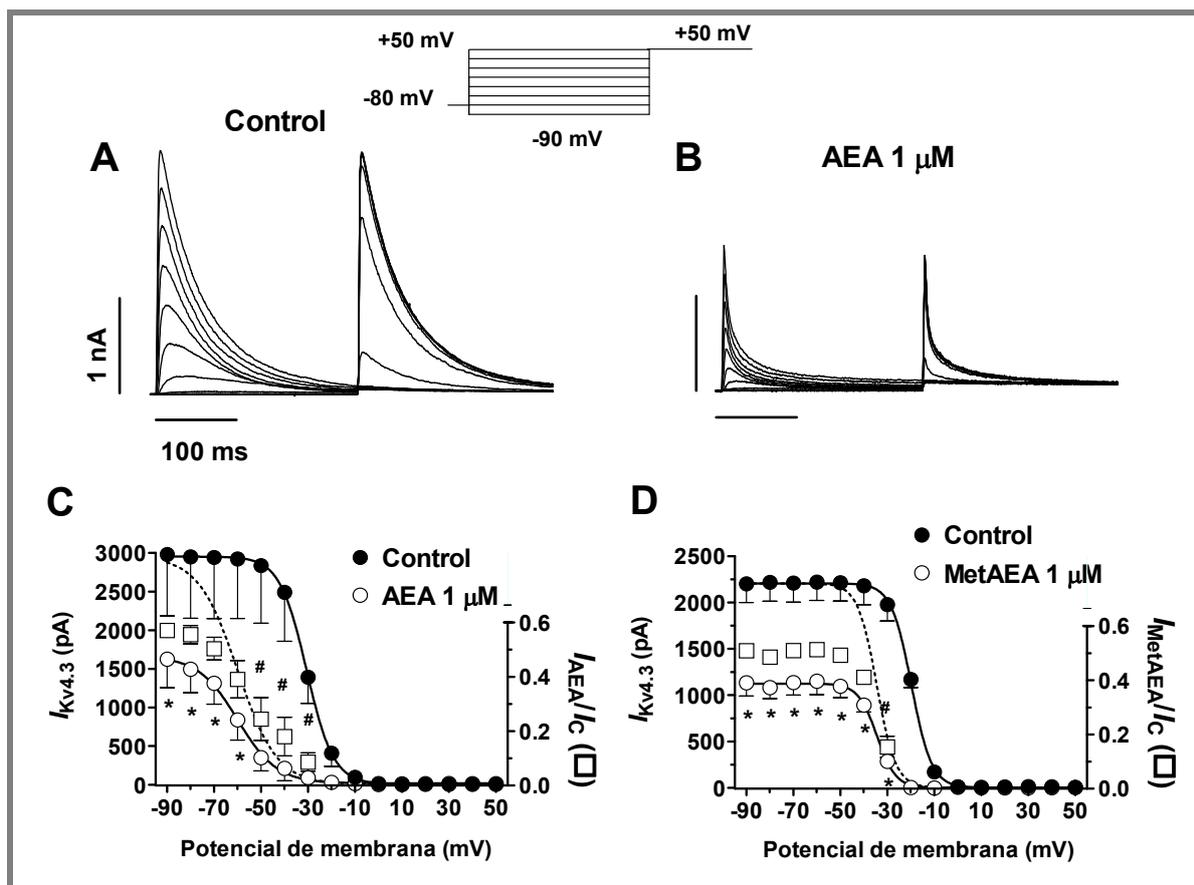
Para analizar en mayor profundidad la interacción de la AEA con los canales Kv4.3+KChIP2a, se estudiaron sus efectos sobre la dependencia de voltaje de la activación y de la inactivación del canal.

Para estudiar la dependencia de voltaje de la activación del canal se construyeron las curvas conductancia-voltaje representando la conductancia frente al potencial de membrana en situación control y en presencia de AEA y MetAEA (Figuras IV.7A y B). La conductancia se calculó utilizando la Ecuación III.3, corrigiendo la amplitud de la corriente a los cambios de la fuerza electromotriz. Para calcular los valores del punto medio ( $V_h$ ) y de la pendiente ( $k$ ) de la curva de activación se ajustó una función de Boltzmann (Ecuación III.1) a los datos experimentales en situación control y en presencia de AEA y MetAEA. La reducción de la conductancia que produjo la AEA y la MetAEA era estadísticamente significativa a potenciales comprendidos entre +10 y +50 mV, sin embargo ninguno de los compuestos desplazaba significativamente la curva de activación lo que indicaba que no modifica la dependencia de voltaje del proceso.



**Figura IV.7. Efectos de la AEA y la MetAEA sobre la dependencia de voltaje de la activación de la  $I_{Kv4.3}$ .** Curvas de activación de los canales Kv4.3+KChIP2a en ausencia y en presencia de AEA (A) y MetAEA (B) a la concentración de  $1 \mu\text{M}$ . Las líneas continuas representan el ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos experimentales. Las líneas discontinuas representan las curvas de activación en presencia de cada compuesto normalizadas respecto a la amplitud control. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 5 experimentos. \* $P < 0.05$  vs. control.

Para analizar la dependencia de voltaje de la inactivación de los canales Kv4.3+KChIP2a se construyeron las llamadas curvas de inactivación. En la figura IV.8 se muestra una familia de trazos de  $I_{Kv4.3}$  en situación control (Panel A) y en presencia de AEA 1 $\mu$ M (Panel B) obtenidos al aplicar el protocolo de doble pulso que se muestra en la parte superior de la figura. Las curvas de inactivación (Figuras IV.8C y D) se construyeron representando la amplitud de la corriente obtenida con el pulso test a +50 mV frente al potencial de membrana del pulso precedente en ausencia y en presencia de AEA (C) y MetAEA (D). El ajuste de una función de Boltzmann (Ecuación III.1) a los datos experimentales permitió calcular los valores los valores de  $V_h$  y de  $k$  de la curva de inactivación en situación control y en presencia de cada compuesto. Como se puede observar, tanto la AEA como la MetAEA disminuyeron de forma significativa la  $I_{Kv4.3}$  registrada a +50 mV tras la aplicación de los pulsos previos comprendidos entre -90 y -30 mV. Además, la AEA (Figura IV.8A) y la MetAEA (Figura IV.8B) modificaron la dependencia de voltaje de la inactivación, desplazando significativamente la curva de inactivación a potenciales más negativos, siendo los valores de  $V_h$  en situación control y en presencia de AEA de  $-23.8 \pm 4.4$  y  $-44.1 \pm 6.0$  mV, respectivamente ( $n=5$ ,  $P < 0.05$ ) (Tabla IV.1). Sin embargo, el valor de  $k$  no se vio modificado en ningún caso ( $n=5$ ,  $P > 0.05$ ) (Tabla IV.1). Los cuadrados blancos representan el cociente de la amplitud de la corriente registrada en presencia y en ausencia de AEA (panel C) y MetAEA (panel D) en función del potencial de membrana. Los datos demuestran que el bloqueo aumentaba significativamente en el rango de potenciales en los que se produce la inactivación del canal y sugieren que la inactivación de los canales Kv4.3+KChIP2a también aumentaba la afinidad de los endocannabinoides por los mismos.



**Figura IV.8.** Efectos de la AEA y la MetAEA sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de la  $I_{Kv4.3}$ . (A y B) Familia de trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrados en células CHO tras aplicar un primer pulso de 250 ms desde un potencial de fijación de -80 mV hasta potenciales comprendidos entre -90 y +50 mV, seguido de un pulso test de 250 ms a +50 mV en ausencia (A) y en presencia de AEA 1  $\mu$ M (B). (C y D) Curvas de inactivación de los canales  $Kv4.3+KChIP2a$  en ausencia y en presencia de AEA (C) y MetAEA (D) a la concentración de 1  $\mu$ M. Las líneas continuas representan el ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos experimentales. Las líneas discontinuas representan las curvas de inactivación en presencia de cada compuesto normalizadas respecto a la amplitud control. Los cuadrados representan la corriente relativa. Cada punto representa la media $\pm$ EEM de 5 experimentos. \*P < 0.05 vs. control. #P < 0.05 vs. datos obtenidos a -90 mV.

Compuestos (1 $\mu$ M)	$V_{h, inact}$ (mV)		$k_{inact}$	
	Control	Compuesto	Control	Compuesto
AEA	-23.8 $\pm$ 4.4	-44.1 $\pm$ 6.0*	4.9 $\pm$ 0.1	4.8 $\pm$ 0.4
MetAEA	-19.4 $\pm$ 1.0	-33.8 $\pm$ 1.5*	4.1 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.1

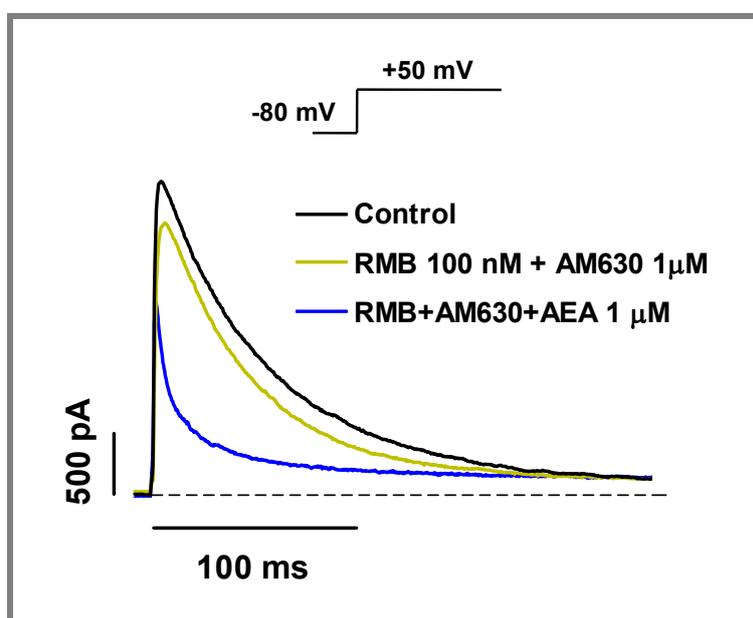
**Tabla IV.1.** Efectos sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de la  $I_{Kv4.3}$ .  $V_h$  y  $k$  son los valores de los puntos medios y las pendientes, respectivamente, obtenidos mediante el ajuste de una ecuación de Boltzmann a las curvas de inactivación en situación control y en presencia de AEA y MetAEA. Los datos representan la media $\pm$ EEM de 5 experimentos. \*P < 0.05 vs. control.

### 2.1.1. Posible implicación de los receptores CB en los efectos de la AEA sobre la $I_{Kv4.3}$

Se había descrito con anterioridad que las células CHO no expresan de forma endógena receptores CB en su membrana (Gómez del Pulgar y cols., 2000), lo que hace poco probable que la estimulación de alguno de esos receptores participe en los efectos de la AEA o de la MetAEA sobre la  $I_{Kv4.3}$ . A pesar de ello, para confirmar que los efectos que acabamos de describir eran independientes de la activación de los receptores CB1 y/o CB2, estudiamos los efectos de la AEA en presencia de RMB (100 nM) y AM630 (1  $\mu$ M), antagonistas selectivos de los receptores CB1 y CB2, respectivamente.

Los resultados demuestran que en estas condiciones la inhibición producida por la AEA (67.8 $\pm$ 4.3%) no era diferente de la producida en ausencia de los dos antagonistas (n=4, P>0.05 vs. 65.8 $\pm$ 3.5%) (Figura IV.9). Más aún, en presencia de RMB y de AM630, la AEA también acelera el proceso de inactivación disminuyendo significativamente la  $\tau_r$  y la  $\tau_i$  (3.7 $\pm$ 0.7 vs. 4.6 $\pm$ 0.4 y 53.9 $\pm$ 10.6 vs. 53.1 $\pm$ 9.6, respectivamente, n=4, P>0.05).

Por tanto, podemos asumir que los efectos anteriormente descritos de la AEA sobre la  $I_{Kv4.3}$  no están mediados por la activación de receptores CB1 o CB2.

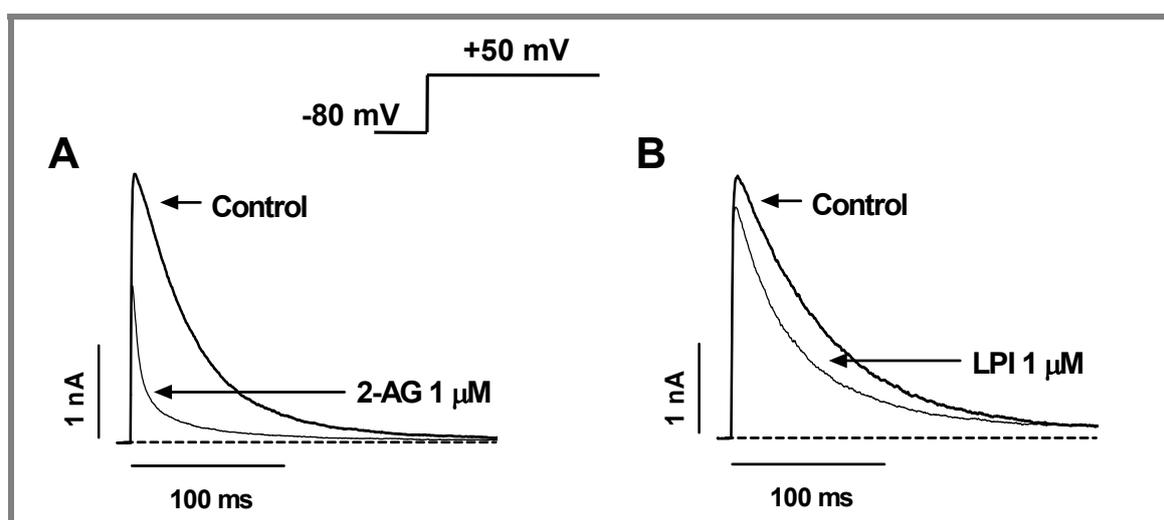


**Figura IV.9.** Efectos de la AEA sobre la  $I_{Kv4.3}$  en presencia de antagonistas de receptores CB. Trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrados tras aplicar pulsos de 250 ms a +50 mV en condiciones control y tras la perfusión de RMB+AM630 en ausencia y en presencia de AEA (1  $\mu$ M). La línea discontinua representa el nivel de corriente cero.

## 2.2. Efectos del 2-AG y del LPI sobre los canales Kv4.3+KChIP2a

Se estudiaron a continuación los efectos del 2-AG sobre los canales Kv4.3+KChIP2a ya que este compuesto, según algunos autores, podría ser el verdadero agonista endógeno de los receptores CB (Stella y cols., 1997; Sugiura y cols., 2006; Di Marzo y Maccarrone, 2008). De hecho, la actividad intrínseca del 2-AG al unirse con los receptores CB1 y CB2 es mayor que la de la AEA (Pertwee, 1999), sus niveles plasmáticos son mayores (Sugiura y Waku, 2000), y se comporta como agonista total frente a CB1 y CB2 (Gonsiorek y cols., 2000 Savinainen y cols., 2001). Además, también se estudiaron los efectos del LPI por ser uno de los fosfolípidos endógenos propuesto como ligando para el receptor GPR55 (Oka y cols., 2007; Ryberg y cols., 2007).

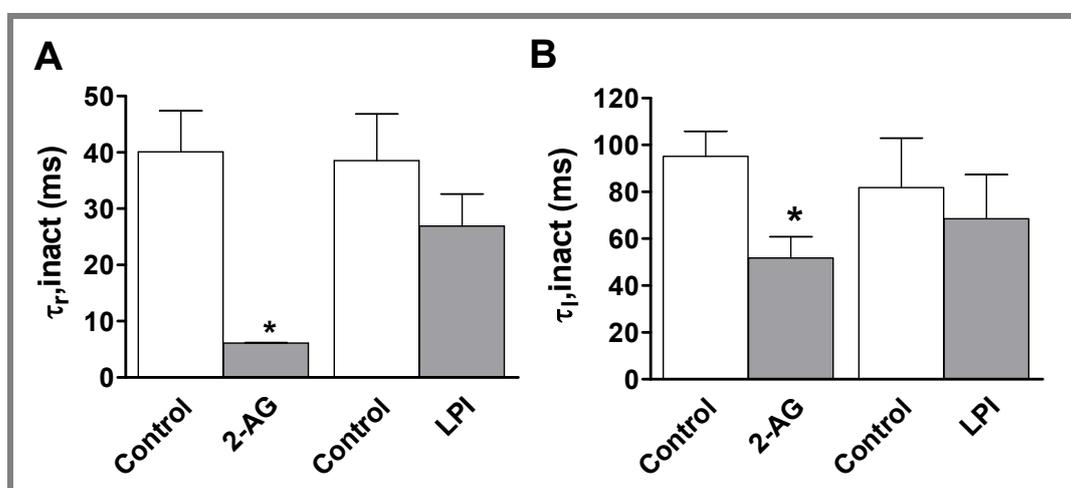
En la figura IV.10 se representan trazos de  $I_{Kv4.3}$  obtenidos al aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura, en situación control y en presencia de 2-AG (Panel A) y LPI (Panel B), a la concentración de 1  $\mu\text{M}$ . El 2-AG producía efectos similares a los observados con la AEA, de tal forma que reducía la amplitud del pico de la  $I_{Kv4.3}$  en un  $38.0 \pm 5.2\%$  ( $n=5$ ,  $P < 0.05$  vs. control) (Figura IV.10A). Por su parte, el LPI se comportó como un bloqueante de los canales Kv4.3+KChIP2a mucho menos potente de tal forma que disminuía discretamente el pico de la corriente registrada a +50 mV ( $6.2 \pm 2.0\%$ ,  $n=5$ ,  $P > 0.05$  vs. control).



**Figura IV.10. Efectos del 2-AG y del LPI sobre la  $I_{Kv4.3}$ .** Trazos de corriente registrados tras aplicar pulsos de 250 ms desde -80 hasta +50 mV en ausencia y presencia de 2-AG (A) y LPI (B) a la concentración de 1  $\mu\text{M}$ . Las líneas discontinuas representan el nivel de corriente cero.

Como ocurría en el caso de la AEA y de la MetAEA, el curso temporal de la aparición de la inhibición de la  $I_{Kv4.3}$  producida por el 2-AG y por el LPI fue lento y el efecto no se revertía por completo al perfundir las células con solución carente de compuesto.

Además, el 2-AG aceleraba la inactivación del canal de forma significativa ( $n=5$ ,  $P<0.05$  vs. control) (Figura IV. 10A y IV.11). En este caso también se calculó la reducción en la  $Q_{Kv4.3}$  para una mejor caracterización del bloqueo en estado estable, que fue un  $81.6\pm 1.6\%$  a  $+50$  mV ( $n=5$ ,  $P<0.05$  vs. control). Aunque el LPI no modificó significativamente el curso temporal de la inactivación ( $n=5$ ,  $P>0.05$  vs. control) (Figuras IV.10B y IV.11) se calculó también la reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  a  $+50$  mV producida por este compuesto que fue del  $20.8\pm 4.9\%$  ( $n=5$ ,  $P>0.05$  vs. control).



**Figura IV.11.** Efectos de los endocannabinoides sobre la cinética de la inactivación del canal  $Kv4.3+KChIP2a$ . Constantes de tiempo de los componentes rápido ( $\tau_r$ , A) y lento ( $\tau_l$ , B) de la inactivación obtenidos tras ajustar una función biexponencial a los trazos de corriente a  $+50$  mV en condiciones control y en presencia de los diferentes compuestos ( $1 \mu\text{M}$ ). Cada barra representa la media $\pm$ EEM de 5 experimentos. \* $P < 0.05$  vs. control.

Las figuras IV.12A y B muestran las relaciones Q-V en situación control y en presencia de 2-AG y LPI, respectivamente. El 2-AG reducía la  $Q_{Kv4.3}$  de forma significativa a potenciales entre 0 y  $+50$  mV, mientras que la reducción producida por el LPI de la  $Q_{Kv4.3}$  no alcanzaba significación estadística a ningún potencial. Se calcularon los valores de carga relativa ( $Q_{\text{COMP}}/Q_C$ , cuadrados blancos), a los diferentes valores de potencial de membrana. Al igual que ocurría con la AEA, el bloqueo que producía el 2-AG aparecía a potenciales de membrana que coinciden con los potenciales a los que se produce la apertura de los canales  $Kv4.3+KChIP2a$  (entre  $-20$  y  $0$  mV), lo que sugiere que el 2-AG se une al canal cuando éste pasa al estado abierto.

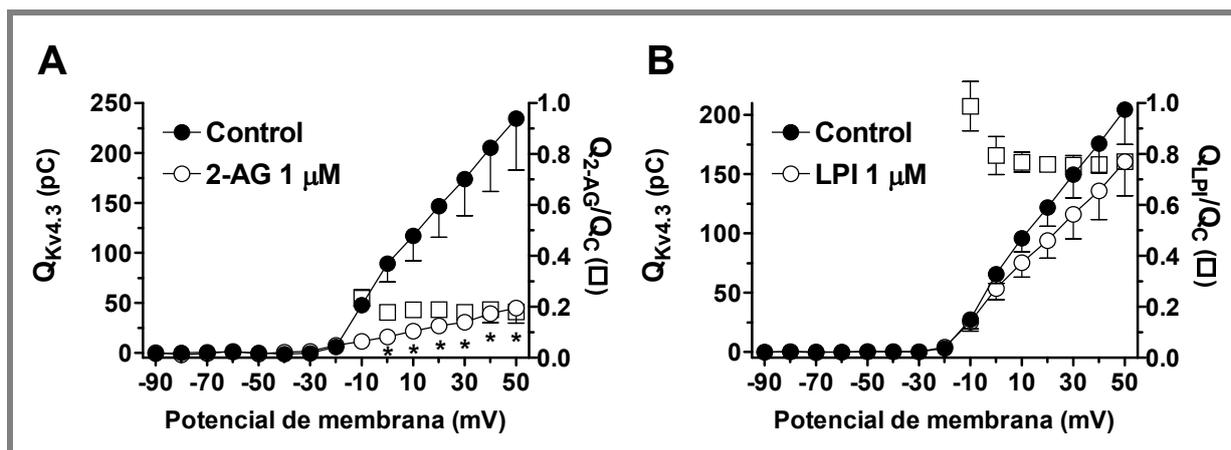


Figura IV.12. Efectos del 2-AG y del LPI sobre la  $I_{Kv4.3}$ . Relaciones carga-voltaje en ausencia y en presencia de 2-AG (A) y LPI (B) a la concentración de 1  $\mu$ M. Los cuadrados blancos representan la carga relativa resultado del cálculo del cociente entre la carga en presencia de cada uno de los compuestos y la carga en situación control. Cada punto representa la media $\pm$ EEM de 5 experimentos. \* $P < 0.05$  vs. control.

La figura IV.13 muestra las curvas concentración-respuesta obtenidas al representar la disminución de la  $Q_{Kv4.3}$  a +50 mV en función de las distintas concentraciones de compuesto estudiadas (1 nM-10  $\mu$ M). De los ajustes de la ecuación de Hill a los datos (Ecuación III.6) se obtuvieron los valores de  $CI_{50}$  para el 2-AG ( $0.3 \pm 0.01$   $\mu$ M) y para el LPI ( $8.0 \pm 0.9$   $\mu$ M). Se puede observar que el 2-AG es más potente que el LPI como bloqueante de los canales  $Kv4.3+KChIP2a$ .

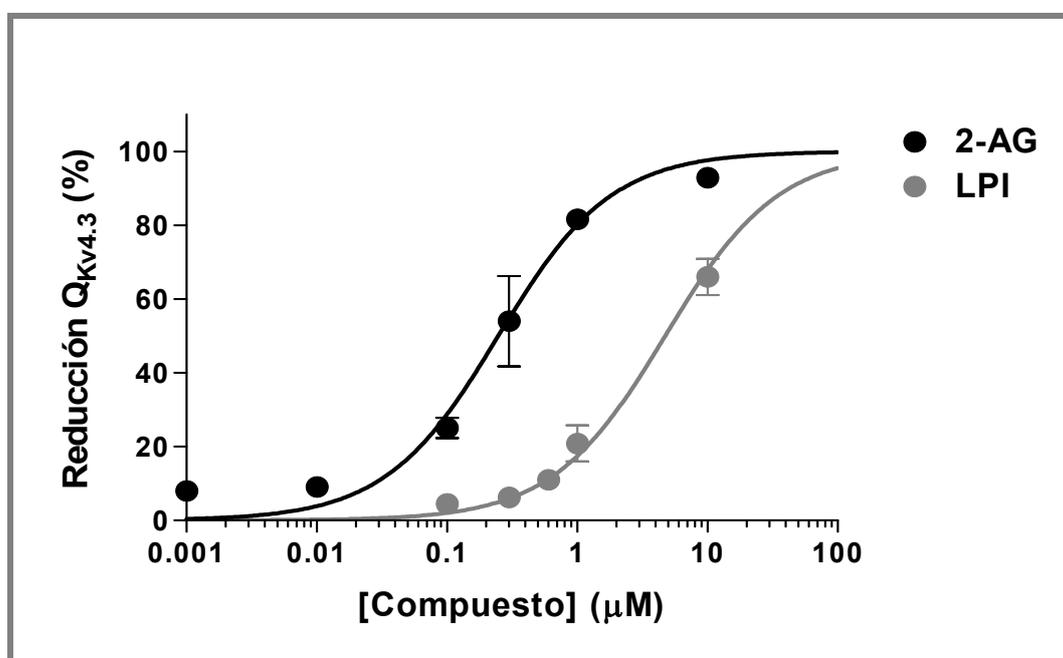
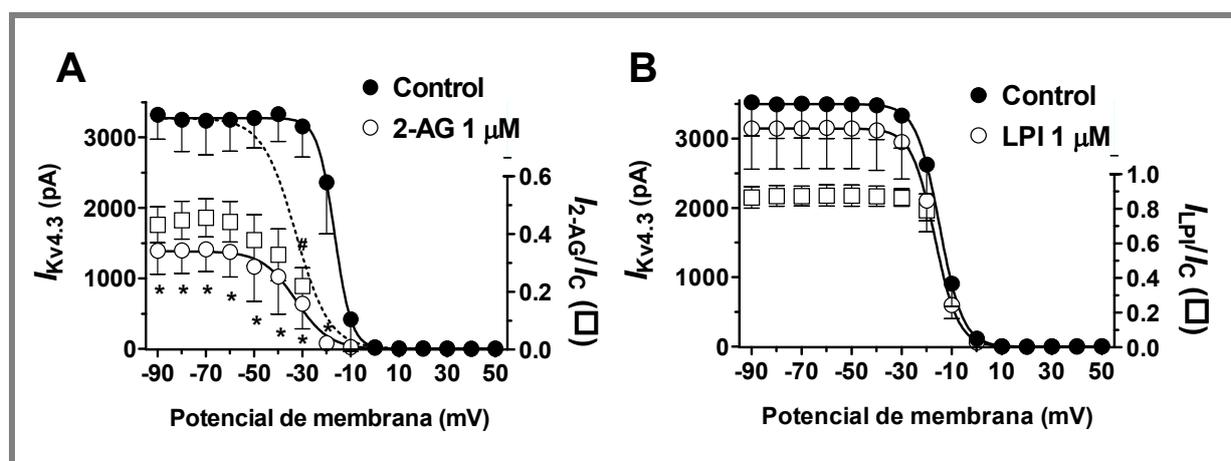


Figura IV.13. Curvas concentración-respuesta para el 2-AG y el LPI. Reducción de la carga total que atraviesa la membrana a través de los canales  $Kv4.3+KChIP2a$  a +50 mV en función de la concentración de 2-AG (negro) y de LPI (gris). Las líneas continuas representan el ajuste de la ecuación de Hill a los datos experimentales. Cada punto representa la media $\pm$ EEM de  $\geq 4$  experimentos.

A continuación se estudiaron los efectos del 2-AG y del LPI sobre la dependencia de voltaje de la inactivación del canal. En la figura IV.14 se muestran las curvas de inactivación de los canales Kv4.3+KChIP2a en ausencia y en presencia de 2-AG (Panel A) y de LPI (Panel B), a la concentración de 1  $\mu$ M. El 2-AG desplazó significativamente la curva de inactivación hacia potenciales más negativos, siendo los valores de  $V_h$  en situación control y en presencia de 2-AG de  $-16.8 \pm 1.3$  y  $-28.7 \pm 0.1$  mV, respectivamente ( $n=5$ ,  $P < 0.05$ ) (Tabla IV.2). Sin embargo, el valor de  $k$  no se vio modificado de forma significativa. Por el contrario, el LPI no modificó la dependencia de voltaje de la inactivación. Como puede observarse el 2-AG, pero no el LPI, reducía la amplitud de la  $I_{Kv4.3}$  registrada a +50 mV tras la aplicación de los pulsos previos comprendidos entre -90 y -20 mV. Los cuadrados blancos representan el cociente de la amplitud de la corriente registrada en presencia y en ausencia de los diferentes compuestos [ $I_{COMP}/I_C$ ] en función del potencial de membrana. Al igual que ocurría con la AEA, el aumento del bloqueo que produce el 2-AG en el rango de potenciales en los que se produce la inactivación del canal, sugiere que la inactivación de los canales Kv4.3 también aumenta la afinidad del 2-AG por los mismos.



**Figura IV.14. Efectos del 2-AG y del LPI sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de la  $I_{Kv4.3}$ .** Curvas de inactivación de los canales Kv4.3 en ausencia y en presencia de 2-AG (A) y LPI (B) a la concentración de 1  $\mu$ M. Las líneas continuas representan el ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos experimentales. Las líneas discontinuas representan las curvas de inactivación en presencia de cada compuesto normalizadas respecto a la amplitud control. Los cuadrados representan la corriente relativa. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 5 experimentos. \* $P < 0.05$  vs. control. # $P < 0.05$  vs. datos obtenidos a -90 mV.

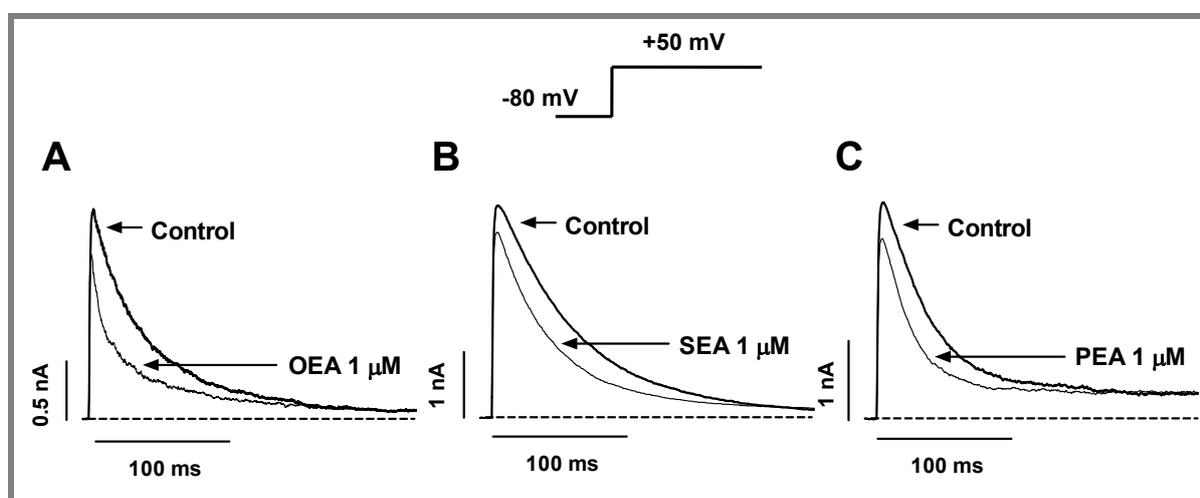
Compuestos (1 $\mu$ M)	$V_h$ inact (mV)		$k$ inact	
	Control	Compuesto	Control	Compuesto
2-AG	$-16.8 \pm 1.3$	$-28.7 \pm 0.1^*$	$4.3 \pm 1.1$	$4.4 \pm 0.9$
LPI	$-14.8 \pm 1.3$	$-15.7 \pm 2.3$	$4.2 \pm 0.2$	$4.0 \pm 0.1$

**Tabla IV.2. Efectos sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de la  $I_{Kv4.3}$ .**  $V_h$  y  $k$  son los valores de los puntos medios y las pendientes, respectivamente, obtenidos mediante el ajuste de una ecuación de Boltzmann a las curvas de inactivación. Los datos representan la media  $\pm$  EEM de 5 experimentos. \* $P < 0.05$  vs. control.

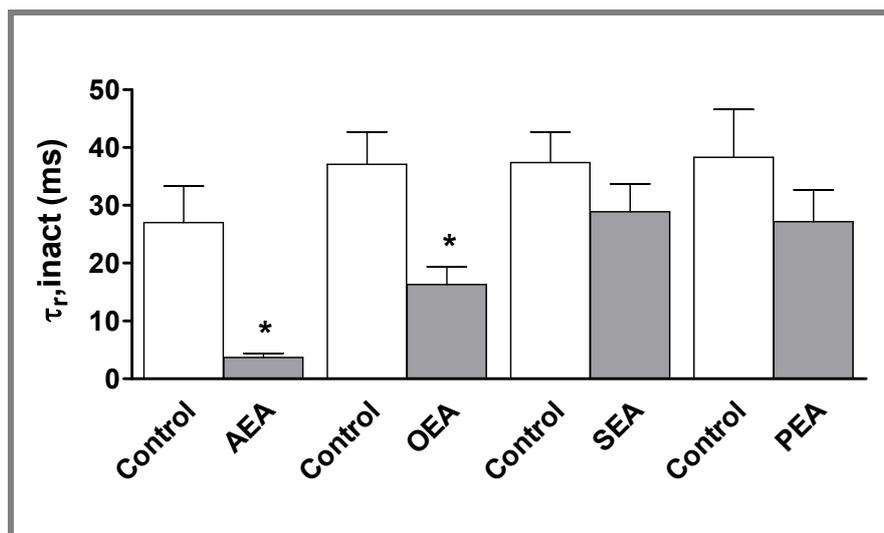
### 2.3. Efectos de la OEA, la SEA y la PEA sobre los canales Kv4.3+KChIP2a

En este grupo de experimentos se estudiaron los efectos de otras etanolamidas (OEA, SEA y PEA) propuestas como análogos de cannabinoides o compuestos cannabinomiméticos. Estos compuestos presentan actividades biológicas similares a los cannabinoides pero se unen con mucha menor afinidad a los receptores CB (Ryberg y cols., 2007; Di Marzo y cols., 2001; Smart y cols., 2002; Maccarrone y cols., 2002; Hansen 2010).

En la figura IV.15 se representan trazos de  $I_{Kv4.3}$  obtenidos al aplicar pulsos de 250 ms de duración desde un potencial de fijación de  $-80$  mV hasta  $+50$  mV en situación control y en presencia de OEA, SEA y PEA a la concentración de  $1 \mu\text{M}$ . La OEA reducía de forma significativa el pico de corriente registrada a  $+50$  mV ( $28.8 \pm 7.6\%$ ) y aceleraba, además, el curso temporal de la inactivación (Figura IV.16), siendo la reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  de un  $43.5 \pm 7.6\%$  ( $n=5$ ,  $P < 0.05$  vs. control a  $+50$  mV) (Figura IV.13A). Por su parte la SEA y la PEA reducían discretamente el pico de corriente registrada a  $+50$  mV ( $12.6 \pm 3.5\%$  y  $7.6 \pm 2.0\%$ , respectivamente) sin modificar el curso temporal de la inactivación ( $n=5$ ,  $P > 0.05$  vs. control) (Figuras IV.15B y C y IV.16).

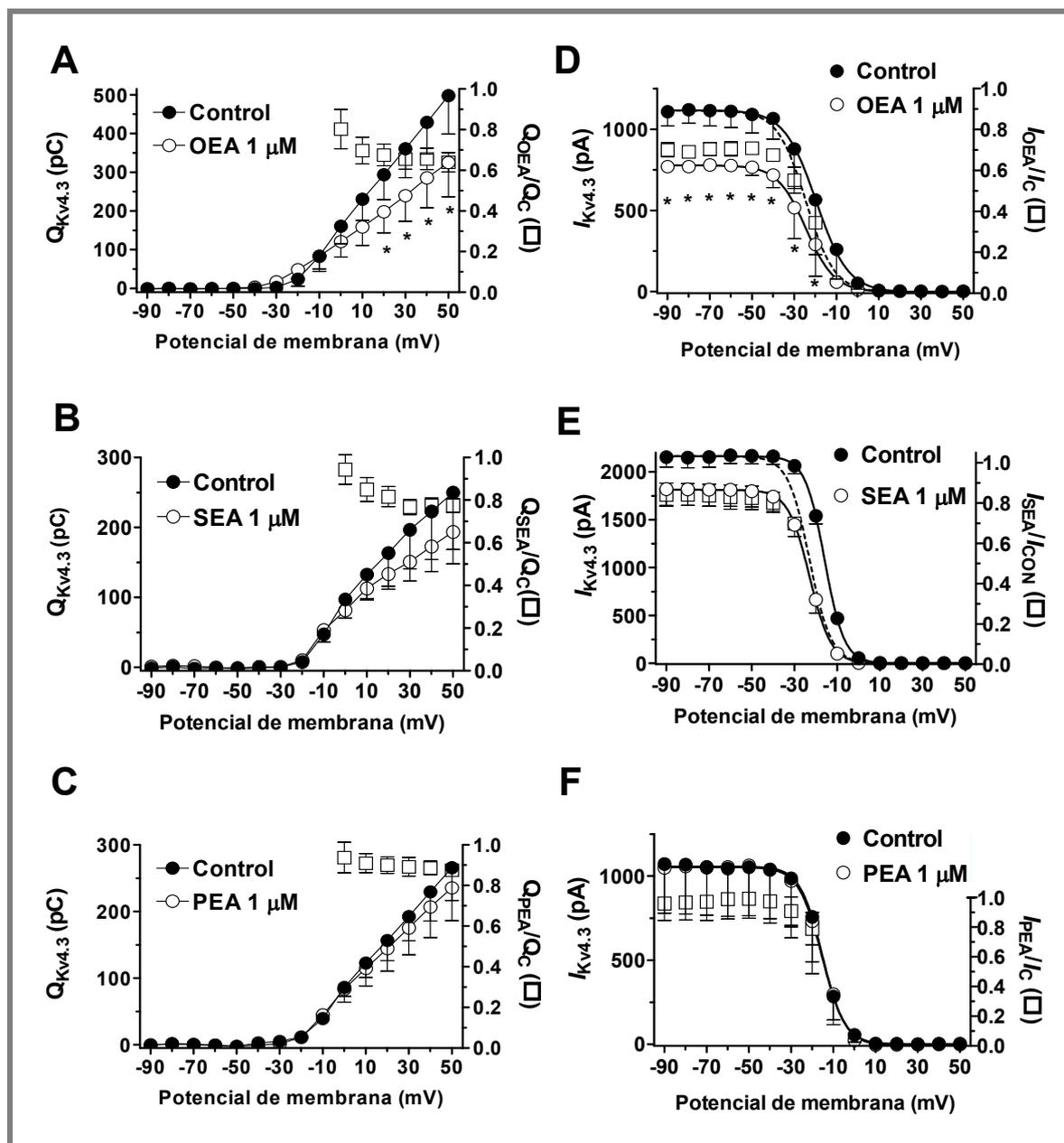


**Figura IV.15. Efectos de la OEA, la SEA y la PEA sobre la  $I_{Kv4.3}$ .** Trazos de corriente registrados tras aplicar pulsos de 250 ms desde  $-80$  hasta  $+50$  mV en ausencia y presencia de OEA (A), SEA (B) y PEA (C) a la concentración de  $1 \mu\text{M}$ . Las líneas discontinuas representan el nivel de corriente cero.



**Figura IV.16. Efectos de las etanolamidas sobre la cinética de la inactivación del canal Kv4.3+KChIP2a.** Constantes de tiempo del componente rápido de la inactivación ( $\tau_r$ ) obtenidos tras ajustar a una función exponencial los trazos de corriente en condiciones control y en presencia de las etanolamidas estudiadas. Cada barra representa la media $\pm$ EEM de  $\geq 4$  experimentos. \*P < 0.05 vs. control.

Al igual que para los compuestos anteriores, se representaron las curvas Q-V (Figura IV.17A-C) y las curvas de inactivación (Figura IV.17D-F) de los canales Kv4.3+KChIP2a en ausencia y en presencia de las tres etanolamidas, para estudiar los posibles efectos sobre la dependencia de voltaje de la activación e inactivación.



**Figura IV.17. Efectos de las etanolamidas sobre la  $I_{Kv4.3}$ .** (A-C) Relaciones carga-voltaje en ausencia y en presencia de OEA (A), SEA (B) y PEA (C) a la concentración de 1  $\mu$ M. (D-F) Curvas de inactivación de los canales en ausencia y en presencia de OEA (D), SEA (E) y PEA (F) a la concentración de 1  $\mu$ M. Las líneas continuas representan el ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos experimentales. Las líneas discontinuas representan las curvas de inactivación en presencia de cada compuesto normalizadas respecto a la amplitud máxima en control. Los cuadrados representan la corriente relativa calculada como el cociente entre la corriente en presencia de cada compuesto y la corriente en situación control. Cada punto representa la media $\pm$ EEM de 5 experimentos. \*P < 0.05 vs. control.

La OEA reducía la  $Q_{Kv4.3}$  a potenciales entre +20 y +50 mV (A) y disminuía significativamente la amplitud de la corriente registrada a +50 mV tras la aplicación de los pulsos más negativos de -10 mV (D). Además, como ocurría con la AEA, la OEA desplazaba la dependencia de voltaje de la inactivación hacia potenciales más negativos de forma significativa sin modificar los valores de  $k$  (D) (Tabla IV.3). Por el contrario, la SEA (B) y la

PEA (C) no reducían significativamente la  $Q_{Kv4.3}$  a ningún potencial, ni modificaron la dependencia de voltaje de la inactivación (Paneles E y F) (Tabla IV.3). Al igual que en los casos anteriores, en la figura IV.17 aparece representado mediante cuadrados blancos el cociente de la amplitud de la corriente registrada en presencia y en ausencia de los diferentes compuestos [ $I_{COMP}/I_C$ ] en función del potencial de membrana.

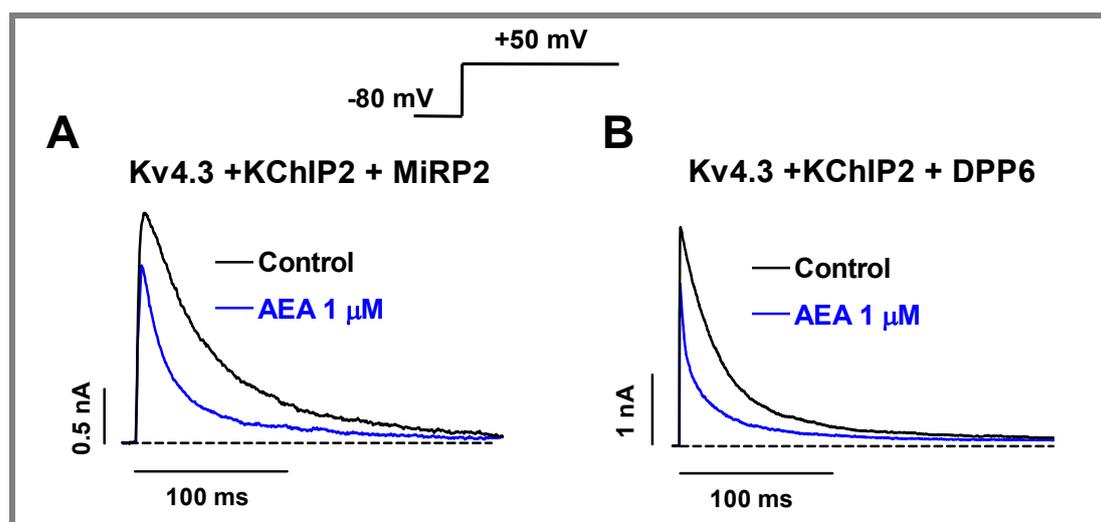
Compuestos (1 $\mu$ M)	Experimentos (n)	$V_{h \text{ inact}}$ (mV)		$k_{\text{ inact}}$ (mV)	
		Control	Compuesto	Control	Compuesto
AEA	5	-23.8 $\pm$ 4.4	-44.1 $\pm$ 6.0*	4.9 $\pm$ 0.1	4.8 $\pm$ 0.4
OEA	5	-16.7 $\pm$ 2.5	-32.6 $\pm$ 6.1*	4.5 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.2
SEA	5	-15.3 $\pm$ 0.4	-20.0 $\pm$ 1.2	4.4 $\pm$ 0.2	4.5 $\pm$ 0.2
PEA	5	-15.2 $\pm$ 3.3	-19.5 $\pm$ 5.0	4.7 $\pm$ 1.0	4.5 $\pm$ 0.9

**Tabla IV.3. Efectos de las etanolamidas estudiadas sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de la  $I_{Kv4.3}$ .**  $V_h$  y  $k$  son los valores de los puntos medios y las pendientes, respectivamente, obtenidos mediante el ajuste a una ecuación de Boltzmann a las curvas de inactivación. Los datos representan la media $\pm$ EEM de  $\geq 4$  experimentos. \*P <0.05 vs control.

#### 2.4. Importancia de las subunidades auxiliares sobre los efectos de los endocannabinoides

Como se ha descrito en la introducción, los canales que generan la  $I_{to1}$  en el miocardio humano, son complejos macromoleculares formados por la subunidad  $\alpha$  Kv4.3 y subunidades auxiliares como KChIP2 (Nerbonne y Kass, 2005), MiRP2 (Radicke y cols., 2006; Delpón y cols., 2008) y DPP6 (Radicke y cols., 2005; Niwa y Nerbonne, 2010). Por otro lado, se ha demostrado que estas subunidades auxiliares modulan los efectos producidos por algunos ácidos grasos sobre distintos canales de  $K^+$ . Por ejemplo, los efectos de diferentes ácidos grasos sobre la corriente rectificadora de  $K^+$  de activación lenta cardiaca ( $I_{Ks}$ ) dependen de la presencia de la subunidad  $\beta$  minK (codificada por el gen KCNE1) (Doolan y cols., 2002). Por ello, a continuación se estudiaron los efectos de la AEA sobre la  $I_{Kv4.3}$  en presencia de DPP6, y de MiRP2.

Para la realización de este grupo de experimentos, se transfectó transitoriamente en las células CHO que ya expresaban de forma estable el canal Kv4.3+ KChIP2a, el ADNc que codificaba para MiRP2 y DPP6. Tal y como se había descrito previamente (Radicke y cols., 2008; Delpón y cols., 2008) la presencia de DPP6 acelera, mientras que la presencia de MiRP2 retrasa la inactivación de los canales Kv4.3+KChIP2a ( $\tau_r = 17.1 \pm 1.4$  y  $46.8 \pm 3.4$  ms, respectivamente).



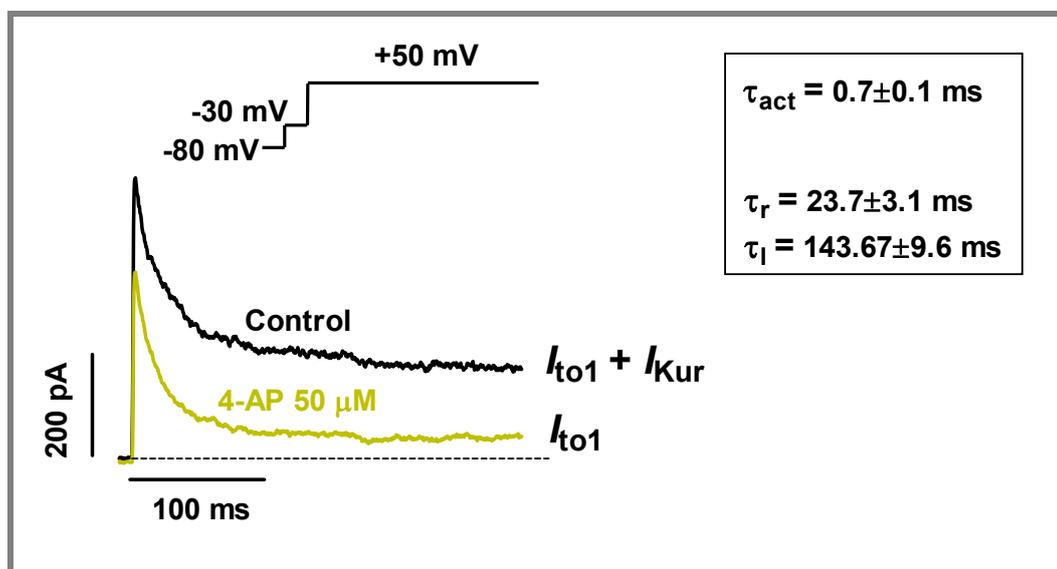
**Figura IV.18. Modulación de los efectos de la AEA sobre la  $I_{Kv4.3}$  por las subunidades MiRP2 y DPP6.** (A) Trazos de corriente registrados a +50 mV generados por canales formados por la coexpresión de las subunidades Kv4.3+KChIP2a+MiRP2 en ausencia y en presencia de AEA 1  $\mu$ M. (B) Trazos de corriente registrados a +50 mV generados por canales formados por la coexpresión de las subunidades Kv4.3+KChIP2a+DPP6 en ausencia y en presencia de AEA 1  $\mu$ M.

Como se muestra en la figura IV.18 la AEA (1  $\mu$ M) redujo el pico de la corriente generada por canales Kv4.3+KChIP2a+MiRP2 (Panel A) y Kv4.3+KChIP2a+DPP6 (Panel B) en un  $27.0 \pm 5.0\%$  y un  $21.9 \pm 3.1\%$ , respectivamente. Además, produjo una aceleración significativa de la constante rápida de la inactivación en ambos casos ( $4.0 \pm 1.0$  y  $12.6 \pm 2.7$  ms, respectivamente,  $n=5$ ,  $P < 0.05$  vs. control). La reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  a +50 mV producida por la AEA en canales Kv4.3+KChIP2a+MiRP2 y Kv4.3+KChIP2a+DPP6 resultó ser de un  $61.42 \pm 2.1\%$  y  $54.3 \pm 3.6\%$ , respectivamente, disminución similar a la producida en los canales Kv4.3+KChIP2a ( $P > 0.05$  vs.  $65.8 \pm 3.5\%$ ).

### 3. Efectos directos de la AEA sobre la corriente auricular humana $I_{to1}$

Como se ha mencionado previamente, los canales Kv4.3+KChIP2a reproducen la arquitectura de los canales cardiacos humanos que generan la corriente  $I_{to1}$  nativa (An y cols., 2000; Kuo y cols., 2001; Rosati y cols., 2001). En la figura IV.19 se muestran los trazos de corriente de salida de  $K^+$  registrados en miocitos auriculares humanos disociados enzimáticamente. En la parte superior de la figura se muestra el protocolo utilizado para el registro de la  $I_{to1}$ , que consistía en un pulso de 250 ms de duración desde -80 mV hasta +50 mV, tras un prepulso de 25 ms a -30 mV para inactivar la  $I_{Na}$ . La corriente registrada en estas condiciones es la suma de, al menos, dos corrientes de  $K^+$ , la  $I_{to1}$  y la  $I_{Kur}$ , que presentan una

dependencia de voltaje de activación similar pero con distinta sensibilidad farmacológica. Aprovechando esta última propiedad, la  $I_{to1}$  se registró en presencia de 4-AP, que a la concentración de 50  $\mu\text{M}$  inhibe selectivamente la  $I_{Kur}$  (Tamargo y cols., 2004). La solución externa contenía también nifedipino (1  $\mu\text{M}$ ) y atropina (1  $\mu\text{M}$ ) para inhibir la  $I_{Ca,L}$  e  $I_{K,ACh}$ , respectivamente.



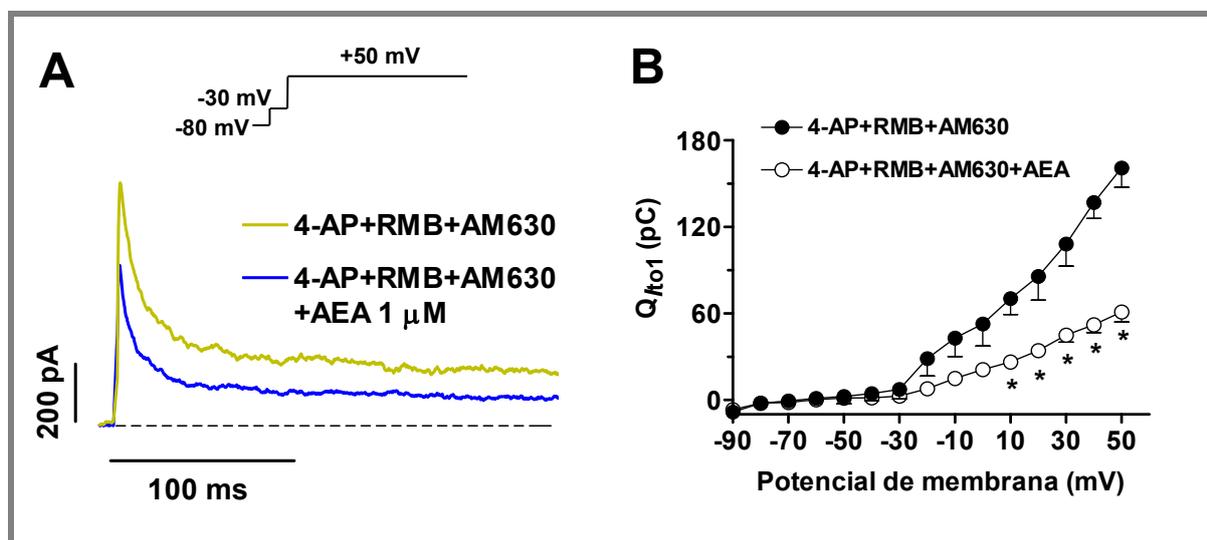
**Figura IV.19. Características de la  $I_{to1}$ .**  $I_{to1}$  registrada en miocitos auriculares humanos en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. El trazo negro es la corriente control (suma de la  $I_{to1}$  y la  $I_{Kur}$ ) y el trazo amarillo es la  $I_{to1}$  registrada tras la aplicación de 4-AP 50  $\mu\text{M}$ .

Además, para estudiar los efectos directos producidos por la AEA sobre la  $I_{to1}$  registrada en miocitos auriculares humanos, era preciso antagonizar los receptores CB1 y CB2, por lo que la solución externa control también contenía RMB y AM630, antagonistas selectivos de dichos receptores.

En este grupo de experimentos, en presencia de 4-AP, la adición simultánea de RMB y de AM630 disminuyó el pico de corriente en un  $16.6 \pm 4.1\%$  y aceleró la cinética de la fase rápida de inactivación de la  $I_{to1}$  de forma significativa (desde  $37.9 \pm 3.8$  hasta  $21.3 \pm 3.1$  ms,  $n=5$ ,  $P < 0.05$ ), mientras que no modificó la fase lenta de la inactivación. Estos efectos hacen que se produzca una disminución de la carga total que atraviesa la membrana a través de los canales que generan la  $I_{to1}$  a +50 mV ( $Q_{I_{to1}}$ ) de un  $31.1 \pm 9.4\%$ . En estas condiciones, la AEA a la concentración de 1  $\mu\text{M}$ , disminuyó el pico de corriente en un  $31.6 \pm 4.9\%$  (Figura IV.20A) y aceleró la cinética de inactivación de la  $I_{to1}$ , disminuyendo los valores tanto de la constante de tiempo rápida como la lenta ( $\tau_r = 13.5 \pm 3.2$  ms y  $\tau_l = 132.0 \pm 32.4$  ms,  $n=5$ ,  $P < 0.05$  vs 4-AP+RMB+AM630). Como resultado, la AEA redujo la  $Q_{I_{to1}}$  en presencia de los antagonistas

CB1 y CB2, en un  $62.2 \pm 2.5\%$ , reducción similar a la que producía la AEA de la  $I_{Kv4.3}$  ( $65.8 \pm 3.5\%$ ,  $P > 0.05$ ).

En la figura IV.20B se muestran las relaciones Q-V en ausencia y en presencia de AEA 1  $\mu\text{M}$ , observándose una reducción significativa de la  $Q_{I_{to1}}$  a potenciales más positivos de +10 mV.



**Figura IV.20. Efectos de la AEA sobre la  $I_{to1}$ .** (A) Trazos de  $I_{to1}$  auricular humana registrados a +50 mV en presencia de 4-AP (50  $\mu\text{M}$ ), RMB (1  $\mu\text{M}$ ) y AM630 (1  $\mu\text{M}$ ) con y sin AEA (1  $\mu\text{M}$ ). Para registrar la  $I_{to1}$  se utilizó un protocolo con un prepulso a -30 mV de 25 ms para inactivar la  $I_{Na}$  seguido de pulsos de 250 ms desde -90 hasta +50 mV). (B) Curvas Q-V para la  $I_{to1}$  en ausencia y presencia de AEA 1  $\mu\text{M}$ . Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 5 experimentos. \* $P < 0.05$  vs. 4-AP+RMB+AM630.

Los resultados obtenidos en estos experimentos han permitido demostrar que la AEA inhibe la corriente nativa generada en los miocitos auriculares humanos y que los efectos sobre ésta son similares a los observados sobre los canales  $Kv4.3+KChIP2a$  expresados en células CHO.

#### 4. Estudio de la relación de la estructura y de la liposolubilidad de los endocannabinoides con sus efectos sobre la $I_{Kv4.3}$

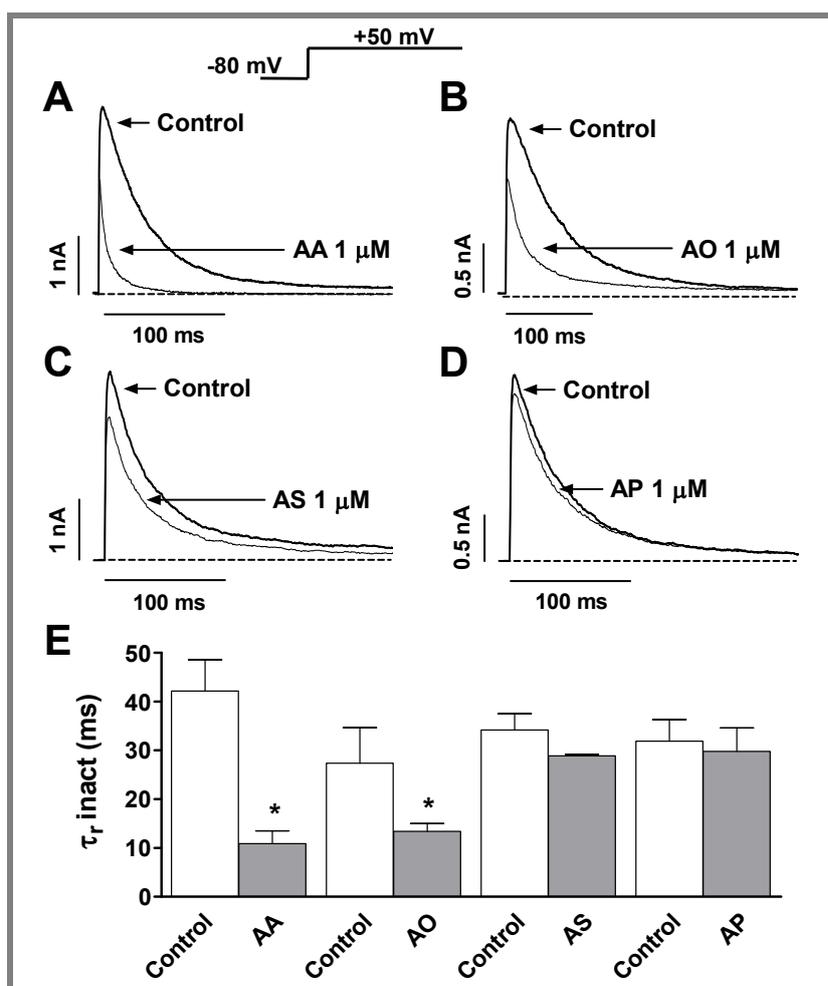
La AEA y los análogos de cannabinoides OEA, SEA y PEA están formados por una cadena hidrocarbonada de longitud variable con un grupo etanolamida en uno de sus extremos. Variaciones en esta estructura general, confiere a estos compuesto una diferente liposolubilidad. Para poder hacer un análisis adecuado de la posible relación estructura/liposolubilidad-actividad, se estudiaron los efectos sobre la  $I_{Kv4.3}$  de los ácidos

grasos a partir de los cuales se sintetizan sus etanolamidas correspondientes [ácido araquidónico (AA), ácido oléico (AO), ácido esteárico (AS) y ácido palmítico (AP)].

#### 4.1. Efectos de los ácidos grasos AA, AO, AS y AP sobre los canales Kv4.3+KChIP2a

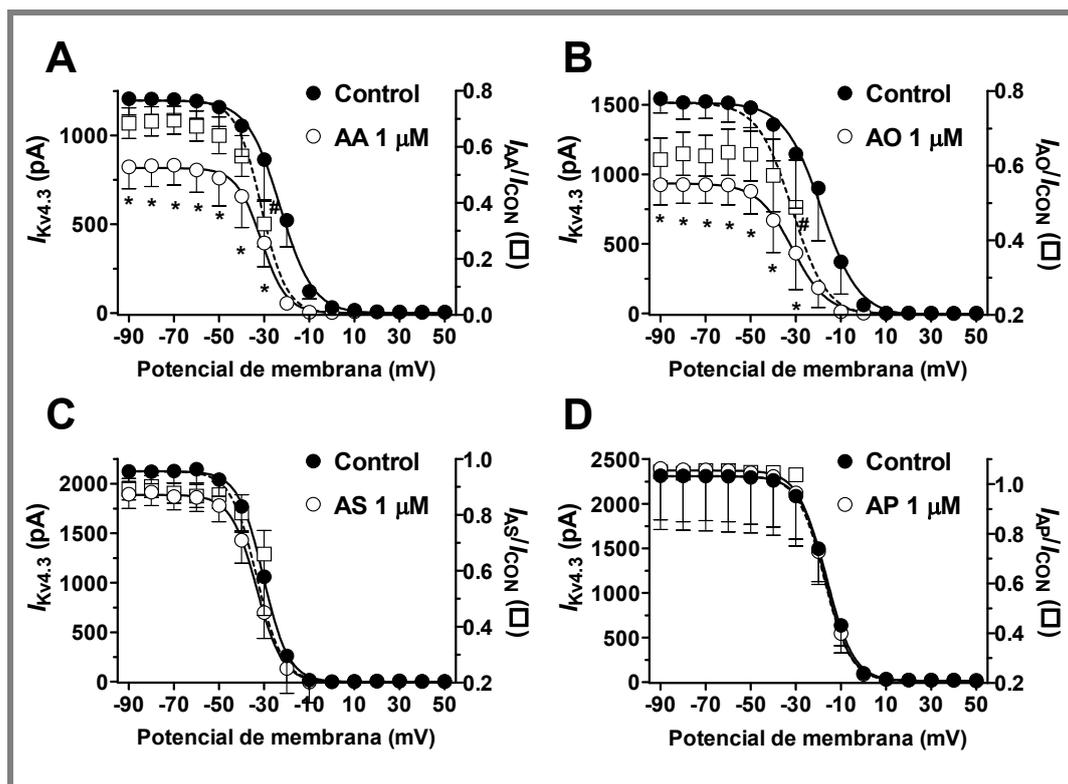
En la figura IV.21 se representan los trazos de  $I_{Kv4.3}$  obtenidos al aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura en presencia y en ausencia de los diferentes ácidos grasos estudiados. Sólo el AA (Panel A) y el AO (Panel B) produjeron una reducción significativa de la amplitud del pico de la corriente ( $39.6 \pm 5.6\%$  y  $37.9 \pm 5.4\%$ , respectivamente,  $n=5$ ,  $P < 0.05$  vs. control). Ambos compuestos modificaron el curso temporal de la inactivación reduciendo los valores de  $\tau_r$  desde  $42.2 \pm 6.4$  y  $27.4 \pm 7.3$  ms hasta  $10.9 \pm 2.6$  y  $13.4 \pm 1.6$  ms para el AA y el AO, respectivamente, ( $n=5$ ,  $P < 0.05$ ) sin modificar los valores del componente lento de la inactivación.

Por su parte, el AS (Panel C) y el AP (Panel D) produjeron una ligera reducción del pico de corriente a +50 mV ( $18.1 \pm 1.7\%$  y  $3.6 \pm 0.6\%$ , respectivamente) y no modificaron la cinética de la inactivación del canal Kv4.3+KChIP2a (Figura IV.E). Se calculó también, para todos ellos, la reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  que resultó ser del  $73.3 \pm 3.9\%$ ,  $43.9 \pm 9.4\%$ ,  $30.9 \pm 0.8\%$  y  $5.4 \pm 1.8\%$  para el AA, AO, AS y AP, respectivamente.



**Figura IV.21. Efectos de los ácidos grasos sobre la  $I_{Kv4.3}$ .** (A-D) Trazos de corriente registrados tras aplicar pulsos de 250 ms desde -80 hasta +50 mV en ausencia y presencia de AA (A), AO (B), AS (C) y AP (D) a la concentración de 1  $\mu$ M. Las líneas discontinuas representan el nivel de corriente cero. (E) Constantes de tiempo del componente rápido de la inactivación ( $\tau_r$ ) obtenidos tras ajustar a una función exponencial los trazos de corriente en condiciones control y en presencia de los ácidos grasos estudiados. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de  $\geq 4$  experimentos. \* $P < 0.05$  vs. control.

A continuación se analizaron los efectos de estos cuatro ácidos grasos sobre la dependencia de voltaje de la inactivación. Como se puede observar en la figura IV.22, sólo el AA (Panel A) y el AO (Panel B) disminuyeron de forma significativa la amplitud de la  $I_{Kv4.3}$  registrada a +50 mV tras la aplicación de pulsos previos comprendidos entre -90 y -30 mV ( $n=5$ ,  $P < 0.05$  vs. control).



**Figura IV.22. Efectos del AA, AO, AS y AP sobre la dependencia de voltaje de la  $I_{Kv4.3}$ .** Curvas de inactivación de los canales  $Kv4.3+KChIP2a$  en ausencia y en presencia de AA (A), AO (B), AS (C) y AP (D) a la concentración de  $1 \mu M$ . Las líneas continuas representan el ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos experimentales. Las líneas discontinuas representan las curvas de inactivación en presencia de cada compuesto normalizadas respecto a la amplitud del control. Los cuadrados representan la corriente relativa. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $\geq 4$  experimentos. \* $P < 0.05$  vs. control. # $P < 0.05$  vs. datos obtenidos a  $-90$  mV.

Aquellos ácidos grasos que inhibían de forma significativa la amplitud del pico de corriente y aceleraban el curso temporal de la inactivación (Figura IV.21E) eran los compuestos que también modificaban la dependencia de voltaje de la inactivación, desplazando la curva hacia potenciales más negativos. Así, el AA y el AO desplazaban el punto medio de la curva de la inactivación desde  $-24.4 \pm 4.8$  hasta  $-34.4 \pm 4.4$  mV ( $n=5$ ,  $P < 0.05$ ) y desde  $-21.7 \pm 7.2$  mV hasta  $-33.8 \pm 5.5$  mV ( $n=5$ ,  $P < 0.05$ ), respectivamente (Figuras IV.22A, B y Tabla IV.4). Por el contrario el AS y el AP no modificaban la dependencia de voltaje de la inactivación de los canales  $Kv4.3+KChIP2a$  (Figuras IV.22C, D y Tabla IV.4).

Compuestos (1 $\mu$ M)	Experimentos (n)	$V_{h \text{ inact}}$ (mV)		$k_{\text{ inact}}$ (mV)	
		Control	Compuesto	Control	Compuesto
AA	5	-24.4 $\pm$ 4.8	-34.4 $\pm$ 4.4*	4.8 $\pm$ 0.1	4.4 $\pm$ 0.2
AO	5	-21.7 $\pm$ 7.2	-33.8 $\pm$ 5.5*	4.4 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 0.4
AS	4	-23.4 $\pm$ 2.5	-24.1 $\pm$ 2.3	4.8 $\pm$ 0.9	4.6 $\pm$ 0.3
AP	4	-16.1 $\pm$ 3.5	-17.3 $\pm$ 3.3	4.6 $\pm$ 0.3	4.4 $\pm$ 0.1

**Tabla IV.4. Efectos de los ácidos grasos estudiados sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de la  $I_{Kv4.3}$ .**  $V_h$  y  $k$  son los valores de los puntos medios y las pendientes, respectivamente, obtenidos mediante el ajuste a una ecuación de Boltzmann a las curvas de inactivación. Los datos representan la media $\pm$ EEM de  $\geq 4$  experimentos. \*P <0.05 vs. control.

## 4.2. Relación estructura-actividad

Desde el punto de vista estructural, los endocannabinoides y los análogos estudiados se diferencian principalmente en la presencia/ausencia del grupo etanolamida, la longitud de la cadena hidrocarbonada y la presencia/ausencia de dobles enlaces (Tabla en la Figura IV.23). Por lo tanto, a continuación, se compararon los efectos producidos por la AEA, la OEA, la SEA y la PEA sobre las características electrofisiológicas de la  $I_{Kv4.3}$  con los que producían los ácidos grasos de los que provienen: el AA, el AO, el AS y el AP.

Para ello, se representaron conjuntamente las curvas concentración-respuesta (Figura IV.23). Del ajuste de la ecuación de Hill a los datos (Ecuación III.6) se obtuvieron los valores de  $CI_{50}$ . Los compuestos más potentes fueron el AA, la AEA y el 2-AG, presentando valores de  $CI_{50}$  de 0.3 $\pm$ 0.02  $\mu$ M, 0.4 $\pm$ 0.01  $\mu$ M y 0.3 $\pm$ 0.01  $\mu$ M, respectivamente. Por el contrario, la PEA y el AP produjeron un bloqueo inferior al 40% a la concentración más alta estudiada, lo que impidió utilizar la ecuación de Hill para el cálculo de la  $CI_{50}$ .

Los resultados sugieren que la diferencia obtenida en la potencia de bloqueo viene determinada por la longitud de la cadena hidrocarbonada de la molécula, de manera que la potencia aumenta al aumentar la longitud de la cadena. Sin embargo la presencia del grupo etanolamida no influye en la potencia ya que a igualdad en la longitud de la cadena, las etanolamidas y los ácidos grasos presentan la misma potencia de bloqueo de los canales  $Kv4.3+KChIP2a$ . Además, también es determinante la presencia de dobles enlaces en la molécula ya que, a igualdad en el número de átomos de carbono, los compuestos con mayor número de insaturaciones son los que producen una mayor reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  (OEA frente a SEA y AO frente a AS).

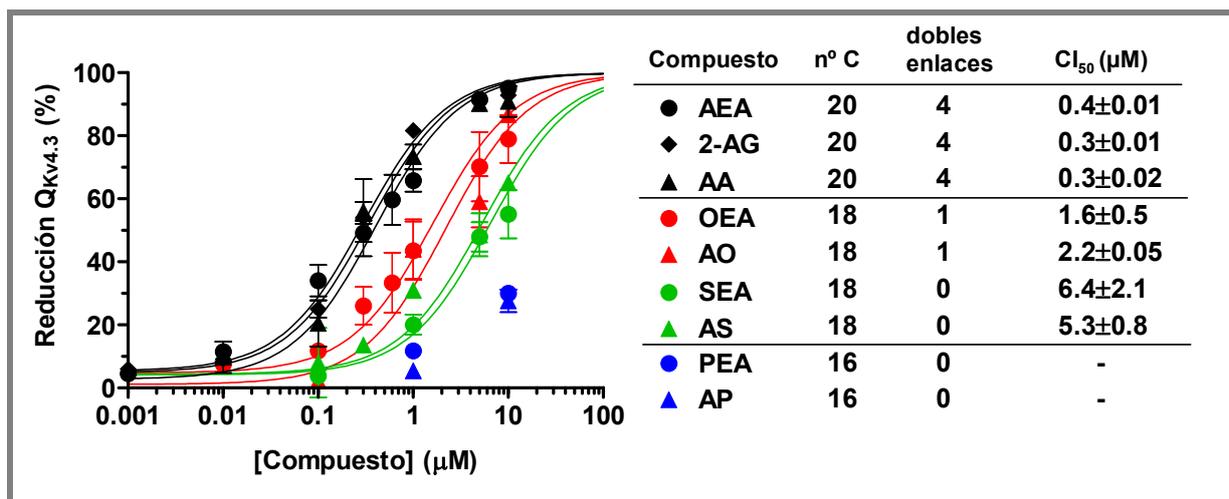


Figura IV.23. Curvas concentración-respuesta para las etanolamidas y los ácidos grasos. Reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  a +50 mV en función de la concentración de los compuestos estudiados. Las líneas continuas representan el ajuste de la ecuación de Hill a los datos experimentales. Cada punto representa la media±EEM de  $\geq 4$  experimentos.

Para analizar en mayor profundidad estos resultados se representó la “complejidad” de cada molécula frente a su  $CI_{50}$  (Figura IV.24). Este parámetro considera el tamaño de la molécula, la presencia y naturaleza de los diferentes grupos reactivos de cada compuesto y la presencia de dobles enlaces y se calculó mediante la ecuación de Bertz/Hendrickson/Ihlenfeldt (Ecuación III.9). Analizando etanolamidas y ácidos grasos por separado, se puede observar, que un mayor grado de complejidad en los compuestos estudiados se relaciona con una mayor potencia de bloqueo ( $r^2=0.9826$  para ácidos grasos y  $0.8933$  para etanolamidas).

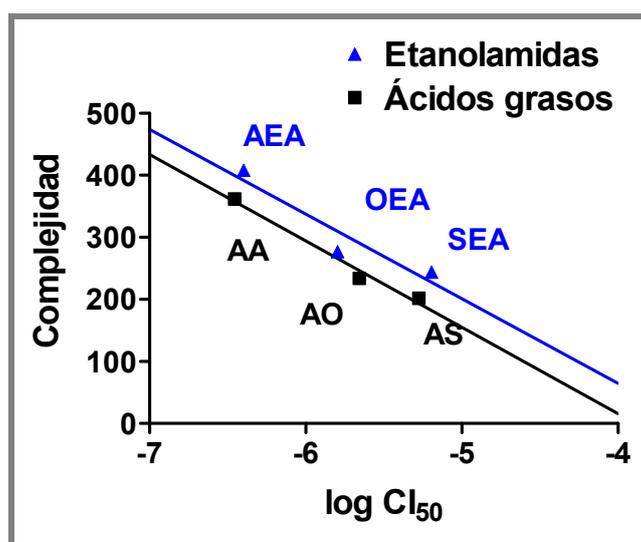


Figura IV.24. Relación estructura-actividad de etanolamidas y ácidos grasos. Complejidad de cada compuesto representada frente a su  $CI_{50}$  correspondiente.

### 4.3. Papel de la liposolubilidad de los endocannabinoides y sus análogos en los efectos sobre la $I_{Kv4.3}$

Para establecer la posible relación entre la potencia de bloqueo que producen los endocannabinoides y análogos sobre los canales  $Kv4.3+KChIP2a$  con la liposolubilidad que éstos presentan, se calculó el índice de liposolubilidad de cada compuesto usando el coeficiente de partición ( $\log P$ ) para las etanolamidas y el de distribución ( $\log D$  a  $pH=7.4$ ) para los ácidos grasos. Estos coeficientes se representaron frente a las  $CI_{50}$  obtenidas para cada compuesto. Como se muestra en la figura IV.25 no existe relación directa entre la liposolubilidad de las etanolamidas y ácidos grasos y la potencia con la que bloquean el canal  $Kv4.3+KChIP2a$ .

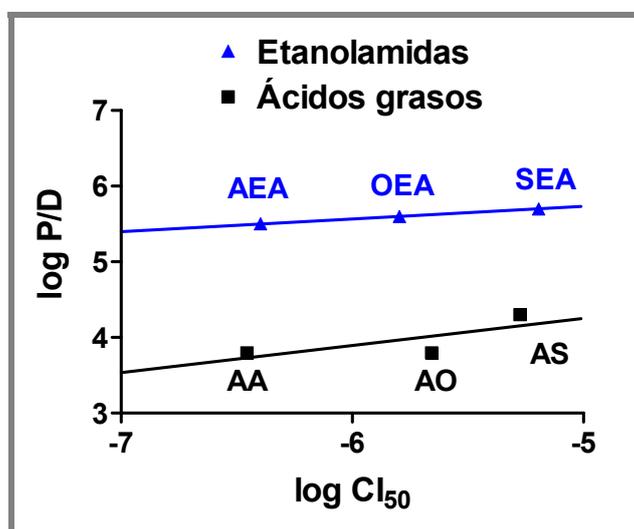


Figura IV.25. Relación liposolubilidad-actividad de etanolamidas y ácidos grasos. Coeficientes de partición ( $\log P$ ) o de distribución ( $\log D$ ) de cada compuesto representado frente a su  $CI_{50}$  correspondiente.

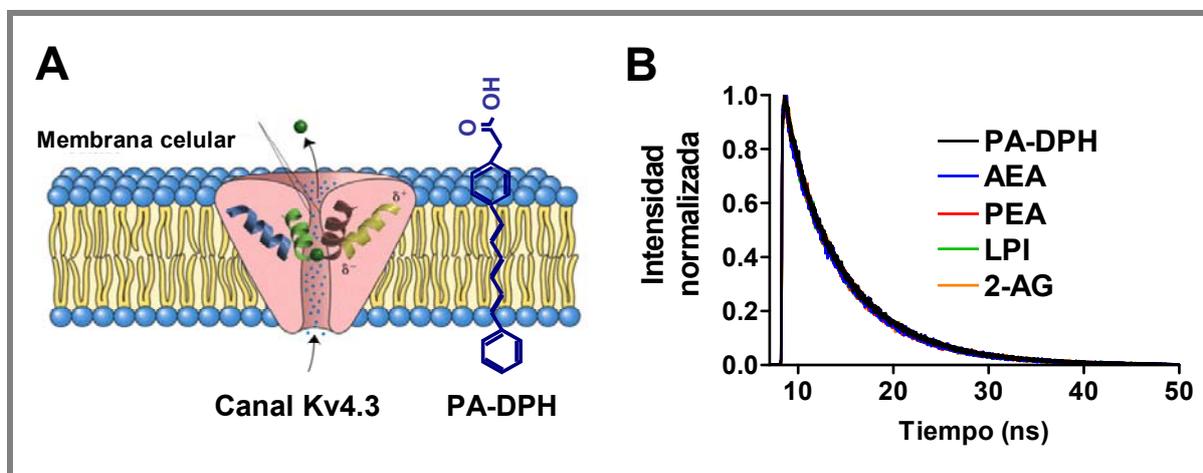
### 5. Mecanismo de acción del bloqueo producido por la AEA sobre los canales $Kv4.3+KChIP2a$

Previamente, se han descrito los efectos directos de compuestos endocannabinoides y cannabinomiméticos sobre los canales  $Kv4.3+KChIP2a$  (apartado 2) y cómo la estructura química de estos compuestos determina la potencia de su efecto (apartado 3). A continuación, se analizaron los posibles mecanismos implicados en los efectos directos de la AEA sobre la  $I_{Kv4.3}$ .

### 5.1. Modificaciones en las propiedades dinámicas y estructurales de la membrana

Algunos autores han sugerido que los endocannabinoides y sus análogos pueden afectar indirectamente a las proteínas de membrana (incluidos los canales iónicos) mediante una perturbación inespecífica de la membrana celular (Andersen y cols., 2007; Bruno y cols., 2007). Para comparar la posible modificación que estos compuestos podrían estar produciendo sobre las propiedades dinámicas y estructurales de la membrana celular (fluidez, orden y microviscosidad), se midieron los cambios en la anisotropía de fluorescencia inducidos por la AEA, el 2-AG, el LPI y la PEA a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  en células CHO que expresaban de forma estable los canales Kv4.3+KChIP2a.

La fluidez de la membrana se caracterizó mediante la cuantificación de la velocidad y la amplitud del movimiento rotacional de la sonda lipofílica PA-DPH (Guizy y cols., 2008; Barana y cols., 2010). Esta sonda es una molécula con una cabeza polar aniónica, una cola hidrofóbica y de dimensiones parecidas a las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos de membrana (Figura IV.26A). El PA-DPH se incorpora en la membrana y queda anclado en la superficie de la bicapa lipídica con el cromóforo fluorescente (DPH) paralelo a las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos circundantes.

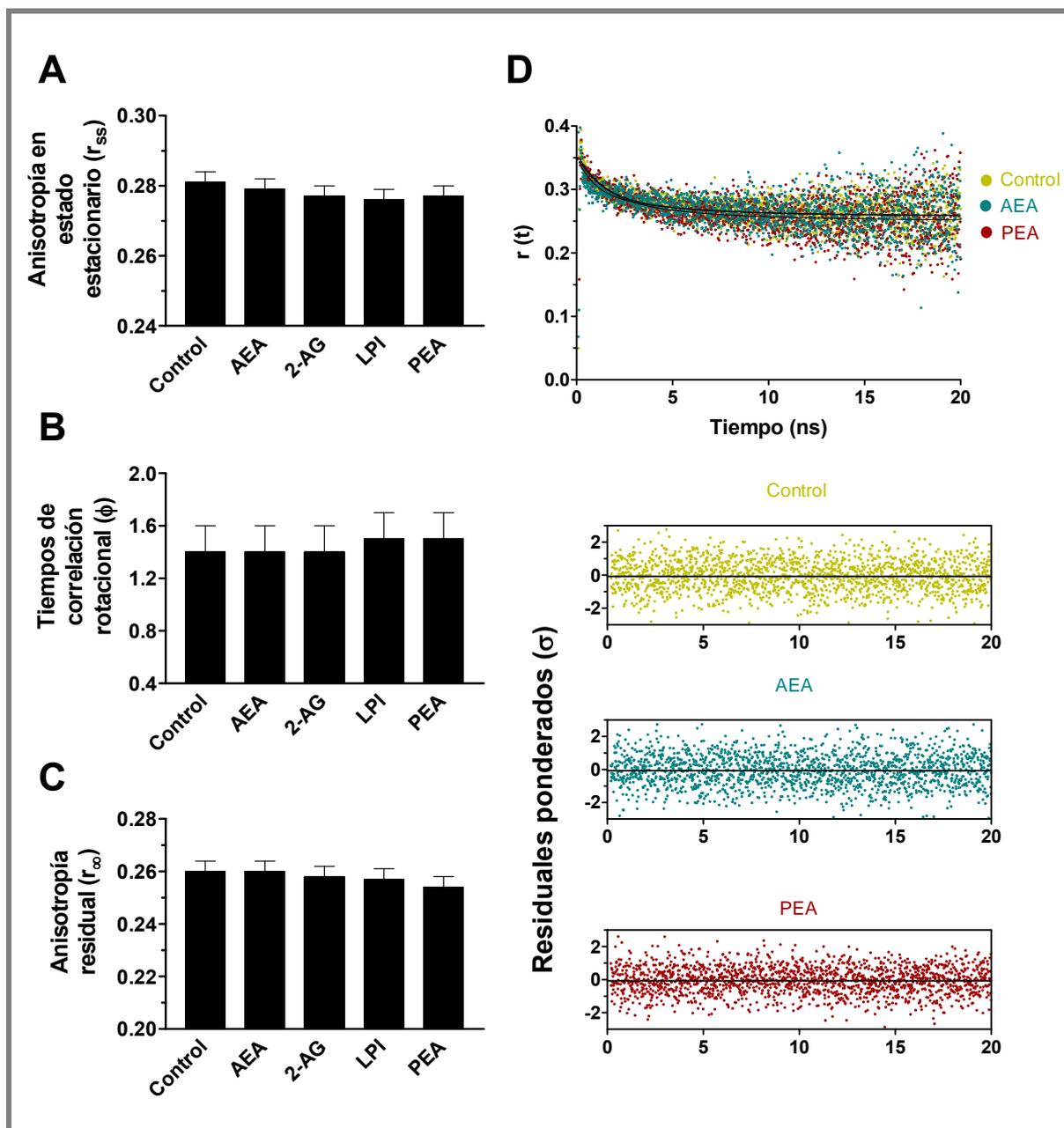


**Figura IV.26. Efecto de los endocannabinoides sobre el tiempo de la vida media de fluorescencia de la sonda PA-DPH.** (A) Representación esquemática de una porción de membrana celular y la disposición de un canal iónico y la sonda PA-DPH. (B) Ajuste exponencial a la cinética de de la fluorescencia de la sonda PA-DPH en situación control (negro) y en presencia de AEA (azul), PEA (rojo), LPI (verde) y 2-AG (naranja), todos ellos a la concentración de 1  $\mu\text{M}$ .

En la figura IV.26B se muestra el ajuste de una función exponencial a la disminución de la intensidad de la fluorescencia de la sonda PA-DPH en condiciones control, lo que permitió obtener dos componentes: uno mayoritario (aproximadamente, el 92% de la intensidad total) con un valor de vida media de 6.8 ns, y un componente de menor amplitud con una vida

media de 2.1 ns. Ninguno de los compuestos estudiados modificó de forma significativa la cinética de fluorescencia de la sonda incorporada en la membrana.

A continuación se midió la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario ( $r_{ss}$ ) de la sonda PA-DPH (2  $\mu$ M) incorporada a las células CHO en condiciones control ( $0.281 \pm 0.003$ ) y tras 20 minutos de incubación con AEA, 2-AG, LPI y PEA (1  $\mu$ M). Como se muestra en la figura IV.27A, ninguno de los compuestos modificó la  $r_{ss}$ . Este parámetro proporciona información acerca de la organización de la membrana, tanto estructural (orden lipídico) como dinámica (microviscosidad). Para poder cuantificar estos dos componentes por separado se realizaron experimentos adicionales para medir la anisotropía de fluorescencia con resolución temporal [ $r(t)$ ] que permite obtener el tiempo de correlación rotacional ( $\phi$ ), que es un índice de la microviscosidad, y el valor de anisotropía límite o residual ( $r_{\infty}$ ), un índice del orden lipídico. En la figura IV.27D se muestra el descenso en la  $r(t)$  de la sonda PA-DPH en condiciones control y en presencia de AEA o PEA junto con el ajuste de la ecuación III.8 a los datos. Se puede observar que la  $r(t)$  decaía en unos pocos ns hasta un valor de  $r_{\infty}$  con una constante de tiempo que representa el valor de  $\phi$ . La incubación de las células con AEA, 2-AG, LPI y PEA durante 20 min no modificó los valores ni de  $\phi$  ( $1.4 \pm 0.2$  ns) ni de  $r_{\infty}$  ( $0.26 \pm 0.004$ ) (Figuras IV.27B y C). Resultados similares se obtuvieron cuando los compuestos se incubaron durante 120 min.

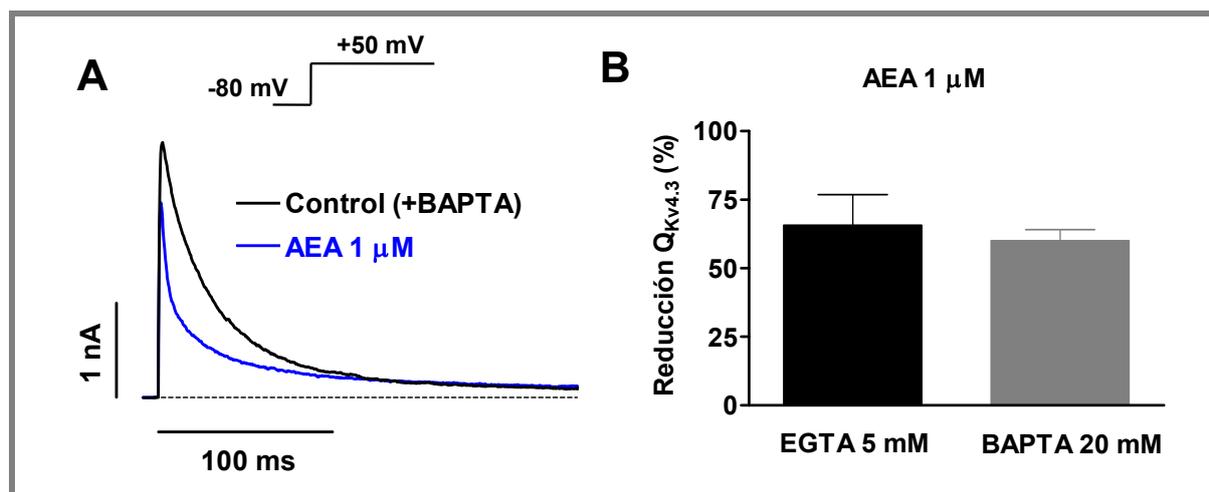


**Figura IV.27. Efectos de los endocannabinoides sobre las propiedades dinámicas y estructurales de la membrana.** Valores medios de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario ( $r_{ss}$ , A), de tiempos de correlación rotacional ( $\phi$ , B) y anisotropía residual ( $r_{\infty}$ , C) de la sonda PA-DPH (1  $\mu$ M) incorporada a las células CHO, medidos en condiciones control y tras incubar con AEA, 2-AG, LPI y PEA durante 20 min todos ellos a la concentración de 1  $\mu$ M. (D) Medida en la anisotropía de fluorescencia en tiempo real [ $r(t)$ ] con resolución temporal de la sonda PA-DPH incorporada a las células CHO en condiciones control y en presencia de AEA o PEA.  $\lambda_{ex}=375$  nm,  $\lambda_{em}=450$  nm. Las líneas continuas representan el ajuste de la ecuación III.8. En la parte inferior se muestra la distribución de residuos ponderados empleada para juzgar la bondad del ajuste.

Estos resultados sugieren que en nuestras condiciones experimentales los endocannabinoides no modificaban las propiedades de la membrana. Por lo tanto, la diferencia en la potencia del efecto de los endocannabinoides estudiados no era atribuible a una perturbación de la membrana celular.

## 5.2. Implicación del calcio intracelular

En neuronas de hipocampo se ha descrito que los endocannabinoides pueden reducir (Zhuang y cols., 2005) o aumentar (Lauckner y cols., 2005) la  $[Ca^{2+}]_i$  debido a la estimulación de los receptores de rianodina. Esta modificación de la  $[Ca^{2+}]_i$  activa diferentes vías de señalización intracelulares que podrían estar modificando la  $I_{Kv4.3}$ . Por lo tanto, para comprobar si los efectos observados se debían a cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  producidos por los endocannabinoides, se estudiaron los efectos de la AEA en presencia de BAPTA, incluyendo este potente quelante intracelular de  $Ca^{2+}$  en la solución interna a una concentración de 20 mM. Los resultados demuestran que, en las células dializadas con BAPTA, la AEA reducía la  $Q_{Kv4.3}$  a +50 mV en un  $60.1 \pm 4.0\%$  (Figura IV.28A), una reducción que no es estadísticamente diferente de la producida por la AEA en células dializadas con EGTA ( $n=5$ ,  $P > 0.05$  vs.  $65.8 \pm 3.5\%$ ) (Figura IV.28B).



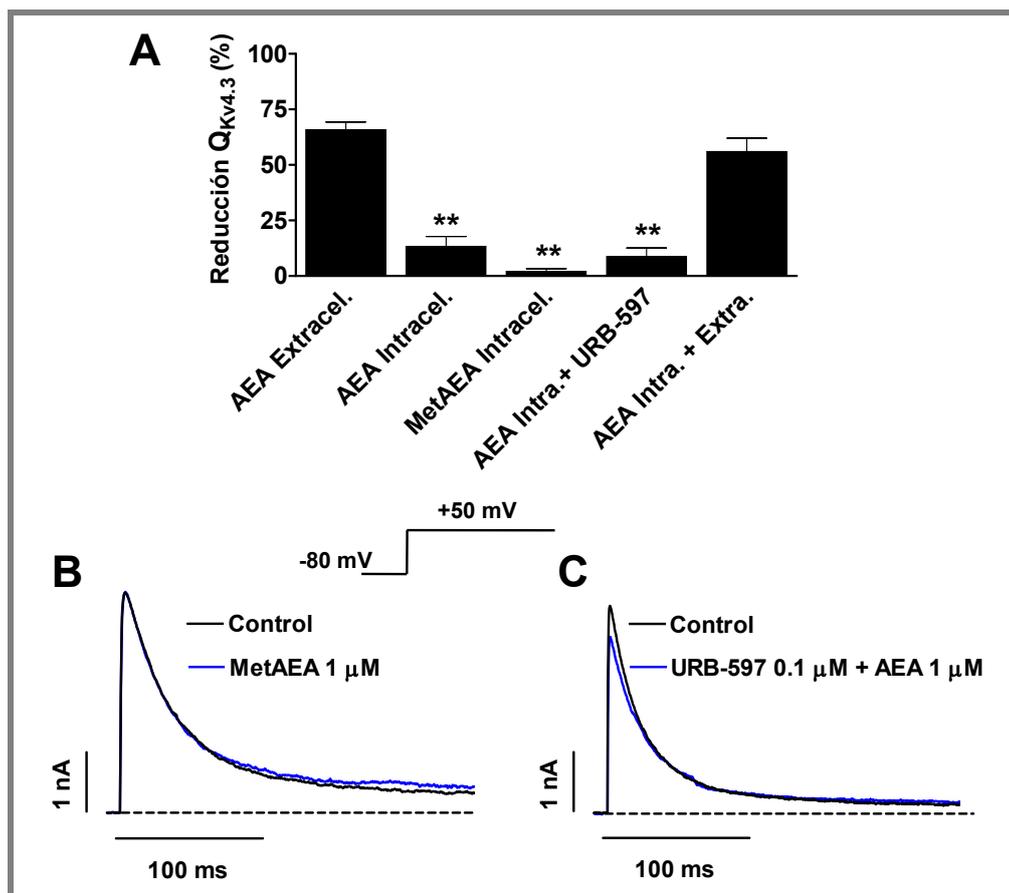
**Figura IV.28. Efectos de la AEA sobre la  $I_{Kv4.3}$  en presencia de un quelante de  $Ca^{2+}$ .** (A) Trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrados tras aplicar pulsos de 250 ms desde -80 a +50 mV en ausencia y presencia de 1  $\mu M$  de AEA. La línea discontinua representa el nivel de corriente cero. La solución interna que dializaba la célula contenía BAPTA 20 mM. (B) Porcentaje de reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  a +50 mV producida por 1  $\mu M$  de AEA en células dializadas con solución interna que contenía EGTA o BAPTA.

## 5.3. Sitio de unión de la AEA en los canales $Kv4.3+KChIP2a$

En estudios previos, se ha descrito que el bloqueo que ejercen algunos endocannabinoides y ácidos grasos sobre diferentes canales aparecía sólo cuando eran aplicados en la cara extracelular (Honoré y cols., 1994; Poling y cols., 1996; Oliver y cols., 2004; Guizy y cols., 2008; Barana y cols., 2010) o en la cara intracelular de la membrana (Chemin y cols., 2001; Moreno-Galindo y cols., 2010). Por lo tanto, a continuación, se compararon los efectos

producidos por la AEA (1  $\mu\text{M}$ ) sobre los canales Kv4.3+KChIP2a cuando se aplicaba extracelularmente o añadiéndola en la solución interna que dializa las células (aplicación intracelular). Para la realización de estos experimentos, rellenábamos la punta de la micropipeta con solución interna normal y el resto con solución interna con AEA (1  $\mu\text{M}$ ). La corriente registrada justo después de la apertura del sello de alta resistencia se consideró el registro en situación control puesto que transcurren unos pocos segundos hasta que se alcanza el estado estable con la diálisis celular.

La AEA aplicada intracelularmente producía un bloqueo significativamente menor ( $12.6 \pm 2.1\%$ ) que el producido cuando se añadía a la solución externa ( $n=4$ ,  $P < 0.01$  vs.  $65.8 \pm 3.5\%$ ) (Figura IV.29A) y no modificaba las constantes cinéticas de la inactivación (Tabla IV.5). Sin embargo, era posible que la disminución del efecto producido por la AEA cuando se añadía a la solución interna se debiera a la inactivación del endocannabinoide por enzimas intracelulares, por lo que posteriormente se realizaron dos grupos adicionales de experimentos. Primero, se estudiaron los efectos de la MetAEA (el análogo no hidrolizable de la AEA) aplicada intracelularmente y en un segundo grupo de experimentos, se estudiaron los efectos producidos por la AEA aplicada intracelularmente en presencia de URB-597, un inhibidor de la FAAH (la principal enzima responsable de la degradación de la AEA). Las células CHO transfectadas de forma estable con el canal Kv4.3+KChIP2a fueron incubadas con URB-597 (0.1  $\mu\text{M}$ ) durante 20 minutos antes de comenzar el análisis electrofisiológico.



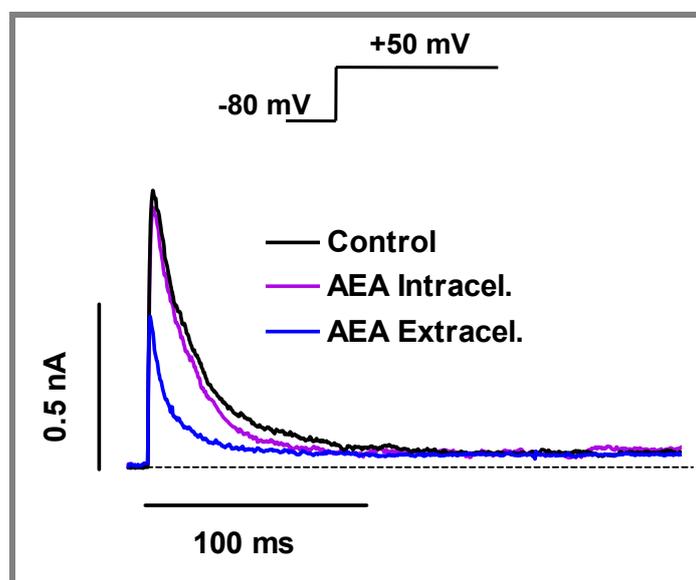
**Figura IV.29. Interacción de la AEA con el canal Kv4.3+KChIP2a.** (A) Porcentaje de reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  a +50 mV producida en las diferentes situaciones experimentales estudiadas (\*\* $P < 0.01$  vs. AEA extracel). (B) Trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrados a +50 mV en situación control (primer pulso tras romper el sello) y en presencia de 0.1  $\mu$ M de URB-597 y 1  $\mu$ M de AEA en la solución intracelular. (C) Trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrados a +50 mV en situación control (primer pulso tras romper el sello) y en presencia de 1  $\mu$ M de MetAEA en la solución intracelular. La línea discontinua representa el nivel de corriente cero.

Como se puede observar en la figura IV.29A, la MetAEA aplicada de forma intracelular reducía la  $Q_{Kv4.3}$  un  $2.0 \pm 1.3\%$  a +50 mV y además, al inhibir la FAAH, la AEA aplicada intracelularmente reducía la  $Q_{Kv4.3}$  sólo en un  $8.7 \pm 3.9\%$  a +50 mV. En ambos casos las cinéticas de la inactivación no se vieron modificadas (Figura IV.29B y C y Tabla IV.5). Estos resultados demuestran que en nuestras condiciones experimentales, los efectos de la AEA son efectivamente menores cuando se aplica intracelularmente y que esta disminución del efecto no es debida a la biotransformación de la AEA por la FAAH. Por tanto nuestros resultados sugieren que el sitio de interacción de la AEA con la proteína que forma el canal se encuentra localizado en la cara extracelular del mismo.

Compuestos	$\tau_r$ inactivación (ms)		$\tau_l$ inactivación (ms)	
	Control	Compuesto	Control	Compuesto
AEA Intracel.	24.4±4.0	19.2±2.3	89.3±18.4	69.6±13.3
MetAEA Intracel.	16.0±2.6	14.7±2.2	108.9±18.1	104.3±13.5
AEA Intracel. + URB-597	19.6±2.7	17.4±2.0	95.8±10.8	90.2±19.2

**Tabla IV.5. Efectos de la aplicación intracelular de la AEA, la MetAEA y la AEA en presencia de URB-597 sobre la cinética de inactivación de la  $I_{Kv4.3}$ .** Constantes de tiempo del componente rápido ( $\tau_r$ ) y lento ( $\tau_l$ ) de la inactivación obtenidos tras ajustar a una función exponencial los trazos de corriente en condiciones control y en presencia de AEA (1 $\mu$ M) y MetAEA (1 $\mu$ M) aplicadas intracelularmente y de AEA (1 $\mu$ M) aplicada intracelularmente en presencia de URB-597 (0.1 $\mu$ M). Los datos representan la media±EEM de 4 experimentos.

Para comprobar que era necesaria la aplicación extracelular de la AEA para observar sus efectos sobre la  $I_{Kv4.3}$ , se realizó un último grupo de experimentos en los que se estudiaron los efectos de la AEA aplicada normalmente en la solución extracelular pero en células que previamente habían sido dializadas con AEA. En estos experimentos, la aplicación extracelular de AEA (1  $\mu$ M) en células dializadas con AEA intracelularmente producía una inhibición del pico del corriente de un 46.5±7.7% y aceleraba de forma significativa las constantes rápidas de la inactivación (la  $\tau_r$  desde 19.2±2.3 hasta 6.8±1.4 ms y la  $\tau_l$  desde 69.6±13.3 hasta 48.2±8.8 ms, n=4, P<0.05) (Figura IV.30). Al calcular la reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  en estas condiciones (60.2±5%) se pudo comprobar que no era significativamente diferente a la producida en las células no dializadas (n=4, P>0.05 vs. 65.8±3.5%).



**Figura IV.30. Efectos de la AEA aplicada intra y extracelularmente sobre la  $I_{Kv4.3}$ .** Trazos de corriente registrados a +50 mV en presencia de 1  $\mu$ M de AEA en la solución interna inmediatamente tras la rotura del sello (situación control), tras alcanzar el estado estable (AEA intracel) y tras la aplicación de una solución 1  $\mu$ M de AEA (AEA extracel). La línea discontinua representa el nivel de corriente cero.

Estos resultados confirman que los efectos de la AEA son producidos al interactuar con la cara extracelular del canal.

## **6. Efectos mediados a través de receptor de los endocannabinoides y análogos de cannabinoides sobre los canales Kv4.3**

La mayoría de los estudios que describen los efectos de los endocannabinoides sobre el aparato cardiovascular están mediados a través de la interacción de estos compuestos con sus receptores (Hillard, 2000; Randall y cols., 2002; Pacher y cols., 2005a y b y 2006; Ashton y Smith, 2007). Se ha descrito que los endocannabinoides pueden regular la función cardíaca a través de la activación de receptores CB1 (Lake y cols., 1997; Varga y cols., 1995; Bátkai y cols., 2004b; Wheal y cols., 2007; Bátkai y Pacher, 2009) y que pueden disminuir la frecuencia y contractilidad cardíacas *in vivo* a través de la estimulación de otro tipo receptor, también acoplado a proteínas G, distinto de CB1 y/o CB2 (Járai y cols., 1999; Wagner y cols., 1999; Ford y cols., 2002; Bátkai y cols., 2004a). El receptor que surgió como principal candidato de receptor de endocannabinoides no-CB1/no-CB2 fue el GPR55 (Baker y cols., 2006; Oka y cols., 2007; Pertwee, 2007; Ryberg y cols., 2007; Waldeck-Weiermair y cols., 2008). Sin embargo se conoce muy poco sobre los efectos que la estimulación de estos receptores pueden ejercer sobre la actividad eléctrica cardíaca, por lo que, a continuación, quisimos estudiar los efectos de los endocannabinoides sobre la  $I_{Kv4.3}$  mediados a través de la estimulación de los receptores CB.

### **6.1. Análisis de la expresión de ARNm de receptores CB en muestras auriculares humanas.**

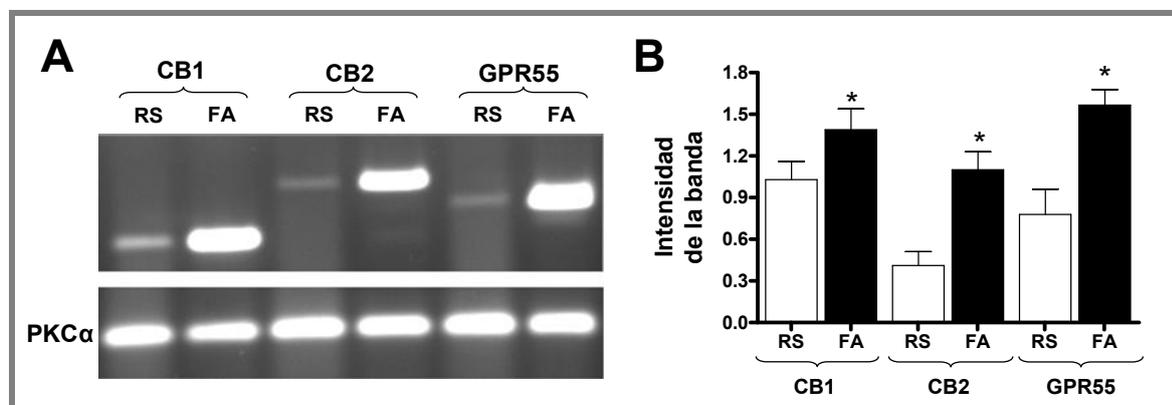
Se ha propuesto que el SCE se activa en diversas situaciones patológicas en las que se observa un aumento en la síntesis de endocannabinoides y/o en la expresión de sus receptores (Varga y cols., 1998; Wang y cols., 2001b, Pertwee, 2005; Naccarato y cols., 2010; Miller y Devi, 2011). En el miocardio de ratas espontáneamente hipertensas, la expresión de receptores CB1 se veía aumentada en comparación con su expresión en ratas normotensas (Bátkai y cols., 2004b) y en arterias de ratas y humanos, la expresión del receptor CB2 aumentaba en aquellas que presentaban placas de ateroma (Steffens y cols., 2005). Además, en los estudios RIO (Rimonabant in Obesity), los pacientes obesos tratados durante un año con RMB

presentaban una discreta reducción de la presión arterial, que aumentaba en el subgrupo de los pacientes diabéticos o con hiperlipidemia. Estos y otros resultados obtenidos en diferentes estudios (Miller y Devi, 2011) apuntan a una activación del SCE en ciertas patologías del aparato cardiovascular (Hiley, 2009; Quercioli y cols., 2011) por lo que quisimos saber si esto mismo podría ocurrir en el caso de la FAc. Para ello, a continuación, se investigó el nivel de expresión de los receptores CB1, CB2 y GPR55 en las muestras obtenidas de pacientes en RS y con FAc.

### 6.1.1. PCR semicuantitativa

Se llevó a cabo una RT-PCR a partir de ARNm de las muestras de OAD obtenidas de pacientes en RS y con FAc en las condiciones descritas en el apartado 7.1 y 7.2 de Material y métodos de la presente Tesis Doctoral.

Como ejemplo representativo, en la figura IV.31A se muestra la expresión de los receptores CB1, CB2 y GPR55 en las muestras auriculares obtenidas de un paciente en RS y de un paciente con FAc. Como control endógeno se utilizó la PKC $\alpha$  cuya expresión no se ve modificada en FAc (Voigt y cols., 2007).



**Figura IV.31. Expresión de los receptores CB1, CB2 y GPR55.** (A) Productos obtenidos de la amplificación de ADN por PCR en un gel de agarosa de muestras obtenidas de un paciente en RS y uno con FAc. Se usó como control interno la PKC $\alpha$ . (B) Gráfico de barras que muestra el análisis densitométrico del gel de agarosa de los receptores CB1, CB2 y GPR55 en muestras de pacientes en RS y con FAc. Los datos representan la media $\pm$ EEM de 7 muestras en cada grupo. \*P < 0.05 vs. RS.

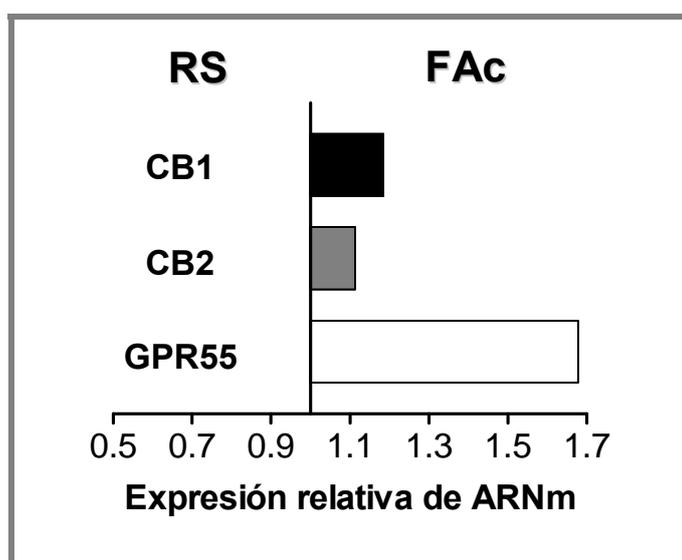
Como se puede observar, la expresión de ARNm de los tres receptores estudiados está aumentada en la muestra obtenida del paciente con FAc respecto a la del paciente en RS.

En la figura IV.31B se muestra el análisis densitométrico de todas las muestras. Los niveles de expresión del ARNm de los receptores CB1, CB2 y GPR55 están representados como la media de las intensidades de las bandas obtenidas de las muestras de pacientes en RS

(n=7) y en FAc (n=7). En el gráfico de barras se puede observar que la intensidad de las bandas de los receptores CB1, CB2 y GPR55 es significativamente mayor en las muestras de pacientes con FAc que en las obtenidas de pacientes en RS (Figura IV.31B). Estos resultados sugieren que en FAc aumenta la expresión de receptores CB1, CB2 y GPR55.

### 6.1.2. PCR cuantitativa

A continuación, quisimos cuantificar el nivel de expresión de los receptores. Para ello realizamos una PCR cuantitativa a tiempo real del ARNm de los receptores CB1, CB2 y GPR55 de las muestras obtenidas a partir de pacientes en RS y con FAc. La qPCR se llevó a cabo en un termociclador 7900HT Fast Real Time PCR System de Applied Biosystems con los oligonucleótidos y sondas correspondientes según las especificaciones de la casa comercial. Los cálculos se realizaron por el método de la comparación de los Ct (Ecuación III.14). Los niveles de ciclos umbral o Ct correspondientes al ARNm de los receptores CB se normalizaron al valor del control ARNr 18S. Posteriormente se transformaron a valores de expresión relativa mediante la ecuación  $(\text{media } \Delta\text{Ct}_{\text{RS}} - \text{media } \Delta\text{Ct}_{\text{FAc}}) = 2^{(\text{media } \Delta\text{Ct}_{\text{RS}} - \text{media } \Delta\text{Ct}_{\text{FAc}})}$ . De esta manera podíamos comparar los niveles de expresión de los tres receptores en las muestras obtenidas de pacientes con FAc respecto de las obtenidas de pacientes en RS (Figura IV.32).



**Figura IV.32. Cuantificación de la expresión de ARN de los receptores CB1, CB2 y GPR55.** Gráfico de barras que muestra el aumento relativo de la cantidad de ARN de muestras de pacientes con FAc respecto de las muestras de pacientes en RS. Los resultados fueron normalizados a la expresión del gen ARNr 18S (housekeeping gene).

Los resultados muestran que la expresión del receptor CB1, CB2 y GPR55 son un 18%, un 11% y un 67%, respectivamente mayores en las muestras obtenidas de pacientes con FAc que en las de pacientes en RS. Coincidiendo con los resultados obtenidos en la PCR semicuantitativa, la expresión relativa de los tres receptores es mayor en las muestras de pacientes con FAc que en las de pacientes en RS, siendo este aumento más marcado en el caso del receptor GPR55 (Figura IV.32).

Estos resultados demuestran que los receptores CB1, CB2 y GPR55 se expresan en tejido cardíaco auricular y que en muestras obtenidas de pacientes con FAc se expresan más que en muestras de pacientes en RS.

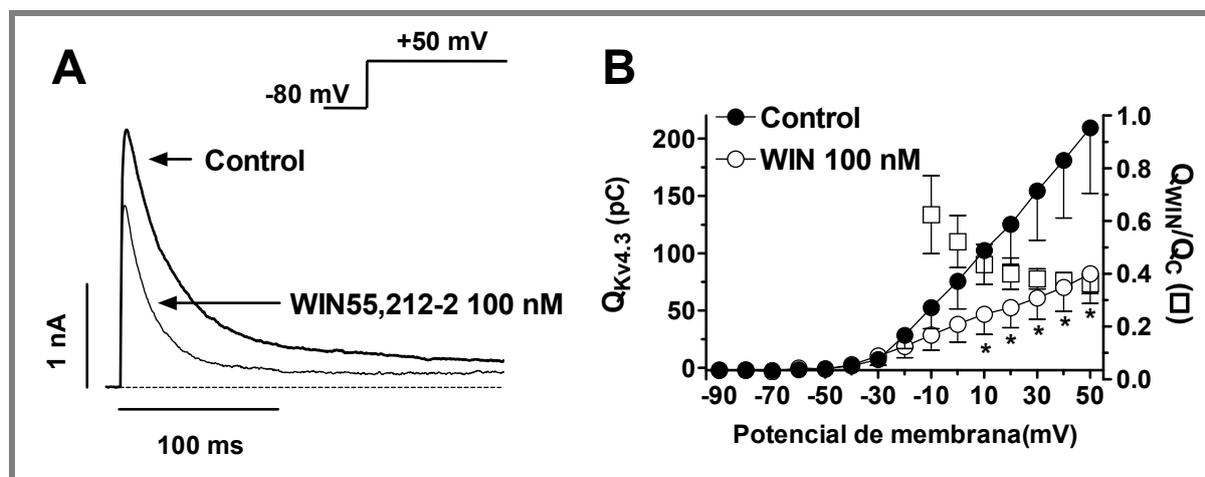
## 6.2. Efectos de la estimulación selectiva del receptor CB1 sobre la $I_{Kv4.3}$

Para la realización de este grupo de experimentos, se transfectó transitoriamente con el ADNc que codifica la expresión del canal Kv4.3 en células CHO que expresaban de forma estable el receptor CB1 (CHO-CB1) en su membrana y se analizaron los efectos del WIN55,212-2 sobre la  $I_{Kv4.3}$  mediados a través del receptor mediante la técnica del parche de membrana. Las células CHO transfectadas con el ADNc que codifica para el receptor CB1 de manera estable son un sistema de expresión bien estudiado y caracterizado y constituye un buen modelo para estudiar efectos mediados a través de este receptor (Rueda y cols., 2000).

Se eligió el WIN55,212-2 como agonista del receptor CB1 porque los efectos directos sobre el canal Kv4.3 eran menos marcados que los que ejercía la AEA (a la concentración de 100 nM la AEA reducía la  $Q_{Kv4.3}$  en un  $30.7 \pm 7.9\%$  mientras que el WIN55,212-2 la reducía sólo en un  $18.8 \pm 2.0\%$ ). De esta manera podíamos diferenciar mejor los efectos que podría ejercer el agonista sobre el canal a través de la estimulación del receptor CB1 de los que ejercía en ausencia de receptor. Además, el WIN55,212-2 presenta mayor actividad intrínseca que la AEA por el receptor CB1 (Ryberg y cols., 2007).

En la figura IV.33A se representan trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrados en células CHO-CB1, obtenidos al aplicar pulsos de 250 ms de duración desde un potencial de fijación de  $-80$  mV hasta  $+50$  mV en situación control y en presencia de WIN55,212-2 100 nM. A dicha concentración, el WIN55,212-2 produjo una disminución de la amplitud del pico de corriente medido a  $+50$  mV de un  $27.6 \pm 3.0\%$ . Además, aceleró el curso temporal de la inactivación, disminuyendo significativamente los valores de  $\tau_r$  y de  $\tau_i$  desde  $31.9 \pm 2.9$  hasta  $12.8 \pm 1.1$  ms y desde  $152.4 \pm 11.0$  hasta  $44.7 \pm 3.9$  ms, respectivamente ( $P < 0.05$  vs. control). Se calculó

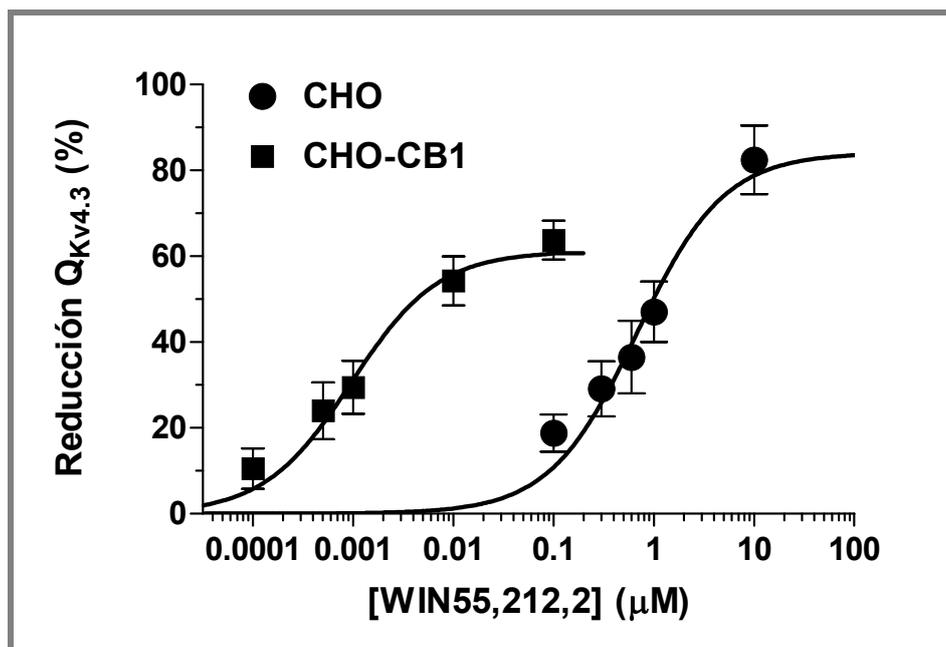
también la  $Q_{Kv4.3}$  para una mejor caracterización del bloqueo en estado estable, siendo la reducción de la carga a +50 mV de un  $63.7 \pm 4.5\%$ .



**Figura IV.33.** Efectos de la estimulación del receptor CB1 por el WIN55,212-2 sobre la  $I_{Kv4.3}$ . (A) Trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrados en células CHO-CB1 tras aplicar pulsos de 250 ms desde -80 hasta +50 mV en ausencia y en presencia de WIN55,212-2 a la concentración de 100 nM. (B) Relación carga-voltaje en ausencia y en presencia de WIN55,212-2 a la concentración de 100 nM. Los cuadrados representan la corriente relativa.

Se representaron, a continuación, las curvas Q-V en situación control y en presencia de WIN55,212-2 100 nM (Figura IV.33B), obtenidas al representar la disminución de la  $Q_{Kv4.3}$  en función del potencial de membrana. Se puede observar cómo el WIN55,212-2 reducía la  $Q_{Kv4.3}$  de manera significativa a potenciales más positivos de +10 mV (Figura IV.34B) y que el bloqueo representado como carga relativa (cuadrados blancos) aparecía a potenciales de membrana comprendidos entre -20 y +50 mV coincidiendo con los potenciales a los que se produce la apertura de los canales  $Kv4.3$ .

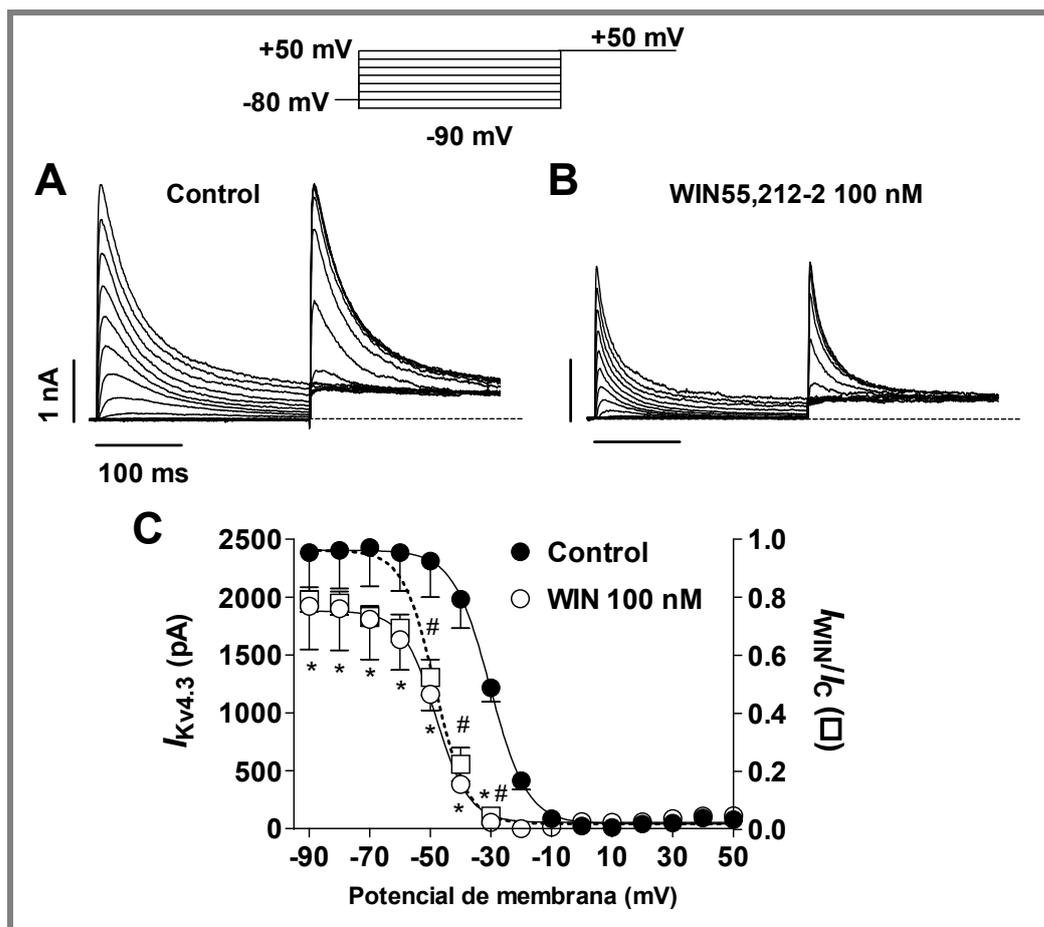
La figura IV.34 muestra la comparación entre la curva concentración-respuesta obtenida al representar la disminución de la  $Q_{Kv4.3}$  a +50 mV en función de las distintas concentraciones de WIN55,212-2 estudiadas (0.1 nM-10  $\mu$ M) en células CHO-CB1 y en células que no presentaban el receptor en su membrana. De esta manera podíamos comparar los efectos que ejerce el WIN55,212-2 sobre el canal  $Kv4.3$  mediados a través del receptor CB1 con los que producía de manera directa sobre el canal. Del ajuste de la ecuación de Hill a los datos (Ecuación III.6) y fijando el  $n_H$  a 1, se obtuvieron los valores de  $CI_{50}$  para cada una de las curvas que resultaron ser de  $0.9 \pm 0.3$  nM y  $0.7 \pm 0.1$   $\mu$ M, respectivamente existiendo diferencia significativa entre ambas ( $P < 0.05$ ).



**Figura IV.34.** Curvas concentración-respuesta para el WIN55,212-2. Reducción de la carga total que atraviesa la membrana a través de los canales  $Kv4.3$  a +50 mV en función de la concentración de WIN55,212-2 en células CHO (círculos) y en células CHO-CB1 (cuadrados). Las líneas discontinuas representan el ajuste de la ecuación de Hill a los datos experimentales. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $\geq 4$  experimentos.

Estos resultados demuestran que la estimulación de los receptores CB1 por el WIN55,212-2 produce efectos más potentes de los que producía de forma directa sobre la  $I_{Kv4.3}$ .

A continuación se analizaron los efectos mediados a través de la estimulación de los receptores CB1 sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de la  $I_{Kv4.3}$ . En la figura IV.35 se muestran familias de trazos representativos de  $I_{Kv4.3}$  registradas en células CHO-CB1 al aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior en situación control (Panel A) y en presencia de WIN55,212-2 a la concentración de 100 nM (Panel B). Las curvas de de inactivación de los canales  $Kv4.3$  se construyeron representando la amplitud de la corriente obtenida con el pulso test a +50 mV frente al potencial de membrana del pulso precedente en ausencia y en presencia de WIN55,212-2 100 nM (Figura IV.35C).



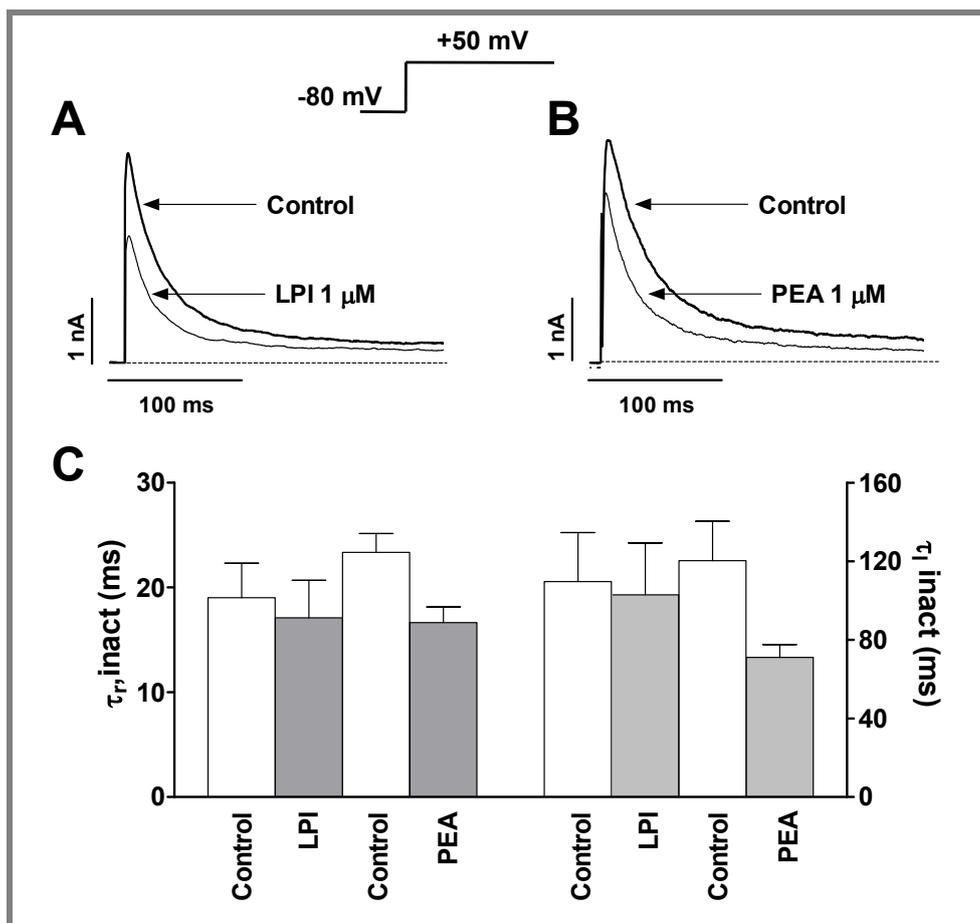
**Figura IV.35. Efectos del WIN55,212-2 a través de la estimulación del receptor CB1 sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de la  $I_{Kv4.3}$ .** (A y B) Familia de trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrados en células CHO-CB1 tras aplicar un primer pulso de 250 ms desde un potencial de fijación de -80 mV hasta potenciales comprendidos entre -90 y +50 mV, seguido de un pulso test de 250 ms a +50 mV en ausencia (A) y en presencia de WIN55,212-2 (B). (C) Curva de inactivación de los canales Kv4.3 transfectados en células CHO-CB1 en ausencia y en presencia de WIN55,212-2 a la concentración de 100 nM. Las líneas continuas representan el ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos experimentales. La línea discontinua representa la curva de inactivación en presencia del compuesto normalizada respecto a la amplitud control. Los cuadrados representan la corriente relativa. Cada punto representa la media $\pm$ EEM de  $\geq 4$  experimentos. \* $P < 0.05$  vs. control. # $P < 0.05$  vs. datos obtenidos a -90 mV.

El WIN55,212-2 disminuía de forma significativa la amplitud de la  $I_{Kv4.3}$  registrada a +50 mV tras la aplicación de los pulsos previos comprendidos entre -90 y -30 mV y desplazaba la dependencia de voltaje de la inactivación hacia potenciales más negativos de forma significativa ( $-46.8 \pm 2.4$  mV vs.  $-27.4 \pm 3.6$  mV,  $P < 0.05$ ) sin modificar los valores de  $k$  (Figura IV.35C). El cociente  $I_{WIN55,212-2}/I_C$  representado por los cuadrados blancos indica un aumento significativo del bloqueo producido por la estimulación de los receptores CB1 sobre la  $I_{Kv4.3}$  a potenciales más positivos de -60 mV coincidiendo con el rango de potenciales a los que se produce la inactivación del canal.

### 6.3. Efectos de la estimulación selectiva del receptor GPR55 por el LPI y la PEA sobre la $I_{Kv4.3}$

Como se ha mencionado previamente, en diversos estudios se ha sugerido que en el aparato cardiovascular debe existir al menos otro receptor para cannabinoides diferente al CB1 y CB2. Este receptor no-CB1/no-CB2, probablemente sea el receptor GPR55 (Baker y cols., 2006; Lauckner y cols., 2008; Waldeck-Weiermair y cols., 2008). Es un receptor acoplado a proteínas G que puede ser activado por AEA y 2-AG, pero también por compuestos como la PEA, aunque su ligando endógeno natural es el LPI (Sawzdargo y cols., 1999; Baker y cols., 2006; Oka y cols., 2007; Pertwee, 2007; Ryberg y cols., 2007). Anteriormente, en los Resultados de esta Tesis Doctoral, se ha descrito que el LPI y la PEA no son muy potentes para bloquear de forma directa los canales  $Kv4.3+KChIP2a$  ( $CI_{50}=5.2\pm 1.2 \mu M$  para el LPI y bloqueo del  $11.8\pm 2.0\%$  a la concentración de  $1 \mu M$  de PEA) por lo que estos compuestos eran una herramienta óptima para estudiar los posibles efectos mediados a través de la estimulación del receptor GPR55. Por tanto, a continuación, se analizaron los efectos del LPI y la PEA sobre la corriente  $I_{Kv4.3}$  registrada en células CHO que expresaban de forma estable el receptor GPR55 en su membrana (CHO-GPR55).

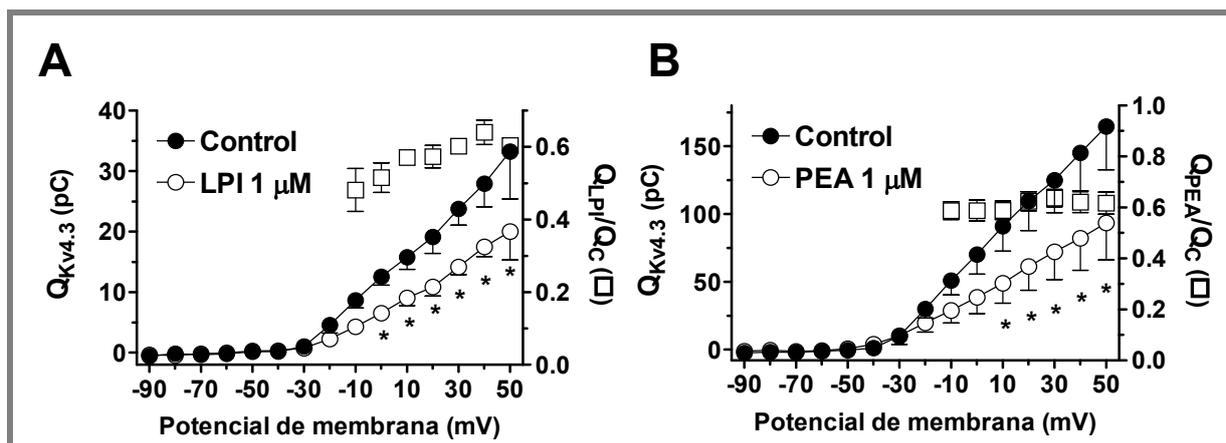
En las figuras IV.36A y B se muestran trazos representativos de la  $I_{Kv4.3}$  registrada en células CHO-GPR55, en situación control y en presencia de LPI (Panel A) y de PEA (Panel B), ambos a la concentración de  $1 \mu M$ . Los dos compuestos, a través de la estimulación del receptor GPR55, produjeron una inhibición del pico máximo de la  $I_{Kv4.3}$  de un  $40.8\pm 7.8\%$  y un  $36.3\pm 5.2\%$  respectivamente. El ajuste de una función biexponencial (Ecuación III.2) a los trazos de la corriente registrada a  $+50$  mV permitió obtener las dos constantes de tiempo de inactivación. Tanto el LPI como la PEA produjeron una disminución de los valores de  $\tau_r$  y  $\tau_l$ , pero en ningún caso se alcanzaba significación estadística (Figura IV.36C).



**Figura IV.36. Efectos de la estimulación del receptor GPR55 por el LPI y la PEA sobre la  $I_{Kv4.3}$ .** (A y B) Trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrados en células CHO-GPR55 tras aplicar pulsos de 250 ms desde -80 hasta +50 mV en ausencia y presencia de LPI (A) y de PEA (B) a la concentración de 1  $\mu$ M. (C) Constantes de tiempo de los componentes rápido ( $\tau_r$ , izquierda) y lento ( $\tau_l$ , derecha) de la inactivación obtenidos tras ajustar una función biexponencial a los trazos de corriente a +50 mV en condiciones control y en presencia de los diferentes compuestos (1  $\mu$ M). Cada barra representa la media $\pm$ EEM de  $\geq 4$  experimentos.

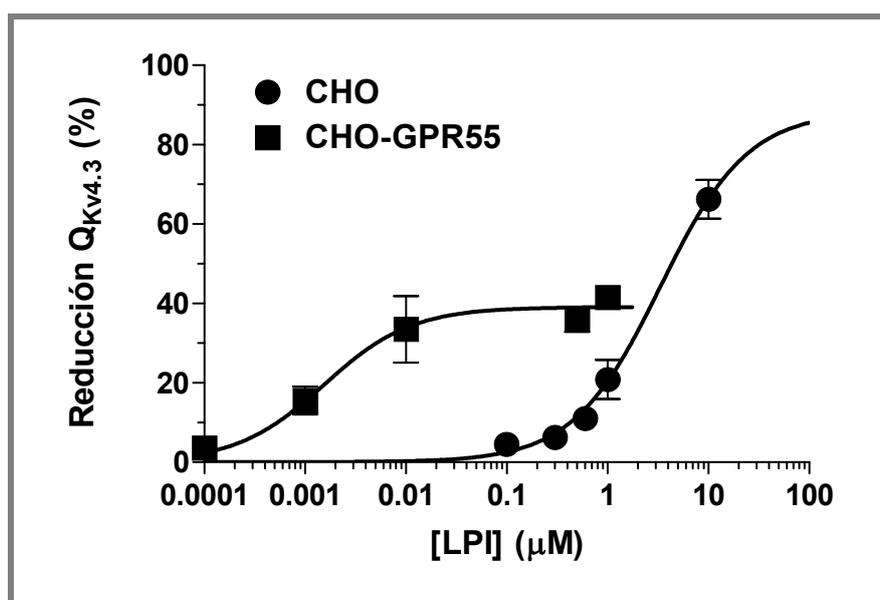
Aunque ninguno de los dos compuestos modificó de forma significativa la cinética de la inactivación del canal se calculó igualmente la reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  que producía el LPI y la PEA a través del receptor GPR55, que fue un  $41.5 \pm 2.1\%$  y un  $40.7 \pm 4.4\%$ , respectivamente.

En la figura IV.37 aparecen representadas las curvas Q-V en situación control y en presencia de LPI (Panel A) y de PEA (Panel B) obtenidas al representar la disminución de la  $Q_{Kv4.3}$  que producen ambos compuestos en función del potencial de membrana. Se puede observar que tanto el LPI como la PEA reducían la  $Q_{Kv4.3}$  de forma significativa a potenciales entre +10 y +50 mV. Este bloqueo aparece a potenciales de membrana que coinciden con los potenciales a los que se produce la apertura de los canales Kv4.3 (entre -20 y 0 mV).



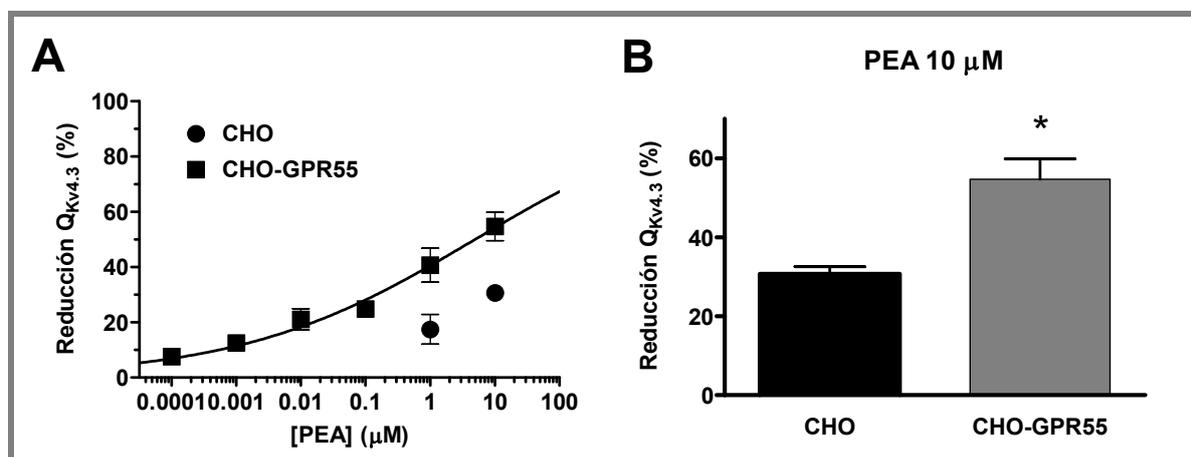
**Figura IV.37** Efectos dependientes de voltaje de la estimulación del receptor GPR55 por el LPI y la PEA sobre la  $I_{Kv4.3}$ . Relaciones carga-voltaje en ausencia y en presencia de LPI (A) y PEA (B) a la concentración de 1  $\mu\text{M}$ . Los cuadrados representan la corriente relativa calculada como el cociente entre la corriente en presencia de cada compuesto y la corriente en situación control. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $\geq 4$  experimentos. \* $P < 0.05$  vs. control.

En la figura IV.38 se muestra la comparación entre las curvas dosis-respuesta obtenidas al representar la reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  producida por el LPI en ausencia y en presencia del receptor GPR55, en función de las diferentes concentraciones del agonista. Como se puede observar, el efecto que produce el LPI al bloquear los canales  $Kv4.3$  a través de la estimulación del receptor GPR55 es mucho más potente que el que produce de forma directa sobre el canal, (los valores de la  $CI_{50}$  obtenidos al ajustar una ecuación de Hill a los datos, aparecen reflejados en la Tabla IV.6). Sin embargo el LPI es menos eficaz en el primer caso ya que a la dosis máxima sólo se conseguía una reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  de un  $\sim 40\%$ .



**Figura IV.38.** Curvas concentración-respuesta para el LPI. Reducción de la carga total que atraviesa la membrana a través de los canales  $Kv4.3$  a +50 mV en función de la concentración de LPI en células CHO (círculos) y en células CHO-GPR55 (cuadrados). Las líneas discontinuas representan el ajuste de la ecuación de Hill a los datos experimentales. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $\geq 4$  experimentos.

La PEA produjo una reducción concentración dependiente de la  $I_{Kv4.3}$  ( $CI_{50} = 80.0 \pm 1.2$  nM), que a la concentración máxima ensayada de  $10 \mu\text{M}$  alcanzó un  $54.7 \pm 5.1$  (Figura IV.39A). Comparando el bloqueo producido por la PEA en células carentes de receptores GPR55 se puede observar que la inhibición producida en células CHO-GPR55 era significativamente mayor (Figura IV.39B).



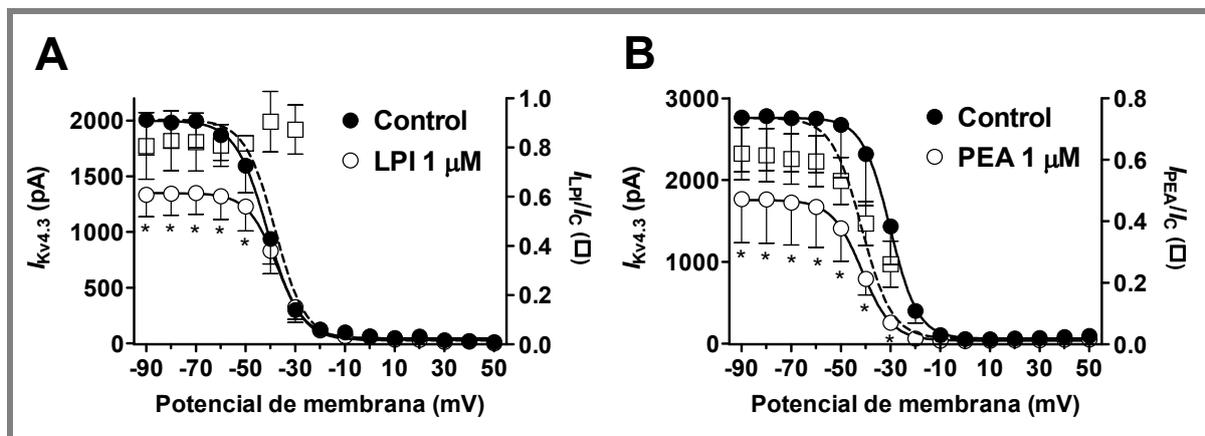
**Figura IV.39. Comparación de los efectos de la PEA sobre la  $I_{Kv4.3}$  mediados a través del receptor GPR55 con los producidos en ausencia del receptor.** (A) Reducción de la carga total que atraviesa la membrana a través de los canales  $Kv4.3$  a  $+50$  mV en función de las diferentes concentraciones de PEA en células CHO (círculos) y en células CHO-GPR55 (cuadrados). Las líneas discontinuas representan el ajuste de la ecuación de Hill a los datos experimentales. (B) Gráfico de barras que muestra la reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  producida por la PEA a la concentración de  $1 \mu\text{M}$  en ausencia y presencia del receptor GPR55. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $\geq 4$  experimentos.

Compuesto	$CI_{50}$	
	Efectos directos	Efectos mediados a través de receptor
LPI	$5.2 \pm 1.2 \mu\text{M}$	$1.4 \pm 0.2 \text{ nM}$
PEA	Bloqueo a $10 \mu\text{M}$ $30.7 \pm 1.8\%$	$80.0 \pm 1.2 \text{ nM}$

**Tabla IV.6. Comparación de los efectos del LPI y de la PEA sobre la  $I_{Kv4.3}$  mediados a través del receptor GPR55 con los producidos en ausencia del receptor.**  $CI_{50}$  calculadas para el LPI y la PEA en células CHO (efectos directos sobre el canal) o en células CHO-GPR55 (efectos mediados a través de la estimulación del receptor GPR55) Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $\geq 4$  experimentos.

A continuación se analizaron los efectos producidos por los endocannabinoides a través de la estimulación de los receptores GPR55 sobre la dependencia de voltaje de la inactivación de la  $I_{Kv4.3}$ . En la figura IV.40 aparecen representadas las curvas de inactivación construidas como la amplitud de la corriente obtenida con el pulso test a  $+50$  mV frente al potencial de membrana del pulso precedente, en ausencia y en presencia de LPI (Panel A) y de PEA (Panel B). El LPI producía una disminución significativa de la  $I_{Kv4.3}$  a potenciales comprendidos entre  $-90$  y  $-50$  mV y por su parte, la PEA inhibía la corriente a potenciales comprendidos entre  $-90$  y  $-30$  mV. El LPI no modificaba la dependencia de voltaje de la inactivación,

mientras que la PEA desplazaba de forma significativa hacia potenciales más negativos el  $V_h$  (desde  $-32.1 \pm 4.2$  mV hasta  $-40.5 \pm 4.9$  mV,  $P < 0.05$ ) sin modificar la  $k$  de la curva.



**Figura IV.40. Efectos dependientes de voltaje de la estimulación del receptor GPR55 por el LPI y la PEA sobre la  $I_{Kv4.3}$ .** Relaciones carga-voltaje en ausencia y en presencia de LPI (A) y PEA (B) a la concentración de  $1 \mu\text{M}$ . (C y D) Curvas de inactivación de los canales  $Kv4.3$  en ausencia y en presencia de LPI (C) y PEA (D) a la concentración de  $1 \mu\text{M}$ . Las líneas continuas representan el ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos experimentales. Las líneas discontinuas representan las curvas de inactivación en presencia de cada compuesto normalizadas respecto a la amplitud control. Los cuadrados representan la corriente relativa calculada como el cociente entre la corriente en presencia de cada compuesto y la corriente en situación control. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $\geq 4$  experimentos. \* $P < 0.05$  vs. control. # $P < 0.05$  vs. datos obtenidos a  $-90$  mV.

Los cuadrados blancos representan el cociente de la amplitud de la corriente registrada en presencia y en ausencia de los diferentes compuestos [ $I_{\text{COMP}}/I_C$ ] en función del potencial de membrana. Como se puede observar, la inhibición producida por la estimulación del receptor GPR55 mediante la PEA aumentaba significativamente en el rango de potenciales en los que se produce la inactivación del canal.

## 7. Efectos de la estimulación selectiva de los receptores CB1 y GPR55 sobre la corriente auricular humana $I_{to1}$

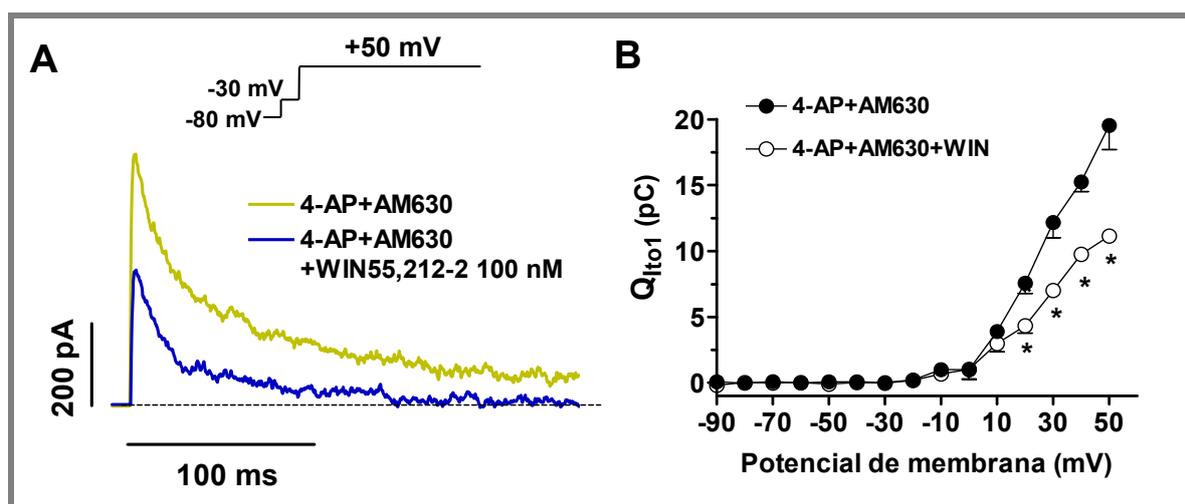
A continuación quisimos estudiar los posibles efectos mediados a través de los receptores CB1 y GPR55 sobre la  $I_{to1}$  generada en miocitos auriculares humanos.

En primer lugar, se analizaron los efectos mediados a través del receptor CB1 producidos por el WIN55,212-2 sobre la  $I_{to1}$  y en segundo lugar, los efectos mediados a través de la estimulación del receptor GPR55 sobre la corriente nativa por el LPI y la PEA.

### 7.1. Efectos de la estimulación selectiva del receptor CB1 por el WIN55,212-2 sobre la $I_{to1}$ .

En este grupo de experimentos la solución externa contenía AM630, un antagonista de receptores CB2, sin embargo no se añadió ningún compuesto antagonista de receptores GPR55 ya que no existe ninguno que sea suficientemente selectivo (Kapur y cols., 2009). Para estimular el receptor CB1 se seleccionó de nuevo el WIN55,212-2 porque carece de afinidad por receptores GPR55 (Ryberg y cols., 2007; Lauckner y cols., 2008). De esta forma podíamos analizar los efectos del WIN55,212-2 sobre la  $I_{to1}$  aislada a través de la estimulación selectiva del receptor CB1.

En la figura IV.41A se muestran los trazos de corriente de salida de  $K^+$  registrados al aplicar un pulso de 250 ms de duración desde -80 mV hasta +50 mV, tras un prepulso de 25 ms a -30 mV para inactivar la  $I_{Na}$  en presencia y en ausencia de WIN55,212-2.



**Figura IV.41. Efectos del WIN55,212-2 sobre la  $I_{to1}$  mediados a través del receptor CB1.** (A) Trazos de  $I_{to1}$  auricular humana registrados a +50 mV en presencia de 4-AP (50  $\mu$ M) y AM630 (1  $\mu$ M) en situación control y tras la adición de WIN55,212-2 (100 nM). (B) Curvas Q-V para la  $I_{to1}$  en ausencia y en presencia de WIN55,212-2 100 nM. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 5 experimentos. \* $P < 0.05$  vs. 4-AP+AM630.

En presencia de 4-AP y de AM630, la adición de WIN55,212-2 100 nM inhibía la amplitud del pico de corriente de la  $I_{to1}$  en un  $34.0 \pm 6.1\%$ , disminuyendo además, los valores de las constantes de tiempo rápida (desde  $21.5 \pm 5.1$  hasta  $13.5 \pm 3.6$  ms) y lenta (desde  $143.7 \pm 20.1$  hasta  $46.0 \pm 14.6$  ms) de la inactivación de forma significativa ( $n=5$ ,  $P < 0.05$ ). Como consecuencia de estos efectos, el WIN55,212-2 producía una disminución en la  $Q_{to1}$  a +50 mV de un  $54.3 \pm 1.2\%$ , inhibición que no era estadísticamente diferente de la producida sobre la  $I_{KV4.3}$  registrada en células CHO-CB1 ( $63.7 \pm 4.5\%$   $P > 0.05$ ). En la figura IV.41B se representan las relaciones Q-V en presencia y en ausencia de WIN55,212-2 100 nM, y como

se puede observar, el WIN55,212-2 reducía significativamente la  $Q_{I_{to1}}$  a potenciales más positivos de +10mV.

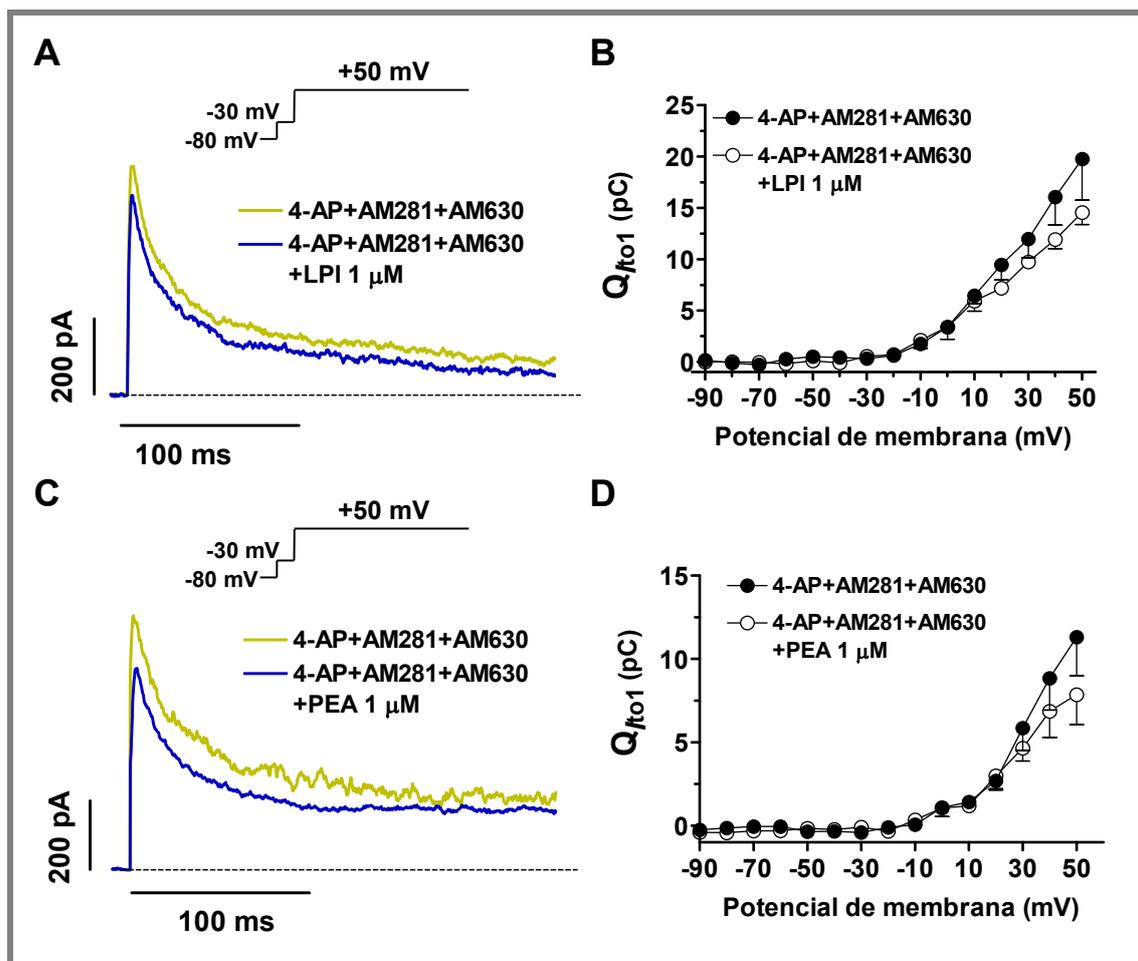
Los resultados obtenidos en estos experimentos demuestran que la estimulación del receptor CB1 de miocitos auriculares humanos inhibe la  $I_{to1}$ .

## **7.2. Efectos de la estimulación selectiva del receptor GPR55 por el LPI y la PEA sobre la $I_{to1}$**

A continuación, se analizaron los posibles efectos producidos sobre la  $I_{to1}$  registrada en miocitos auriculares humanos tras la estimulación del receptor GPR55 mediante el LPI y la PEA. La solución externa contenía AM630 (antagonista CB2) y como antagonista de receptores CB1, el AM281 (1  $\mu$ M). En este grupo de experimentos, descartamos la utilización de RMB puesto que se había descrito que es agonista de receptores GPR55 (Kapur y cols., 2009).

En la figura IV.42 A y C se muestran los trazos de corriente de salida de  $K^+$  registrados al aplicar un pulso de 250 ms de duración desde -80 mV hasta +50 mV, tras un prepulso de 25 ms a -30 mV para inactivar la  $I_{Na}$  en presencia y en ausencia de LPI (Panel A) y de PEA (Panel C). El LPI y la PEA, ambos a la concentración de 1  $\mu$ M, disminuyeron el pico de corriente en un  $19.1 \pm 3.3\%$  y un  $23.5 \pm 4.4\%$ , respectivamente sin modificar la cinética de la inactivación de la  $I_{to1}$ .

Se calculó, a continuación, la reducción de la  $Q_{I_{to1}}$  que produjeron el LPI y la PEA sobre la corriente nativa y se representaron estos valores en función del potencial de membrana. En los paneles B y D de la figura IV.42 se muestran las relaciones Q-V obtenidas en presencia de LPI (Panel B) y de PEA (Panel D), ambos a la concentración de 1  $\mu$ M. Se puede observar que ambos compuestos producen una cierta inhibición de la corriente a potenciales comprendidos entre +30 y +50 mV que no alcanza significación estadística. Los efectos producidos por los agonistas de receptores GPR55 sobre la  $I_{to1}$  en miocitos auriculares humanos son menos marcados que los producidos sobre la  $I_{Kv4.3}$  en células CHO-GPR55. Por tanto, los resultados obtenidos en sistemas heterólogos no se pudieron reproducir en células nativas, motivo por el cual, los efectos sobre la  $I_{Kv4.3}$  mediados a través del receptor GPR55 no fueron analizados en mayor profundidad.



**Figura IV.42. Efectos del LPI y de la PEA mediados a través del receptor GPR55 sobre la  $I_{to1}$ .** (A y C) Trazos de  $I_{to1}$  auricular humana registrados a +50 mV en presencia de 4-AP (50  $\mu$ M), AM281 (1  $\mu$ M) y AM630 (1  $\mu$ M) en situación control y tras la aplicación de LPI (A) y de PEA (C) ambos a la concentración de 1  $\mu$ M. (B y D) Curvas Q-V para la  $I_{to1}$  en ausencia y presencia de LPI (B) y de PEA (D). Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $\geq 4$  experimentos. \* $P < 0.05$  vs. 4-AP+ AM281+AM630.

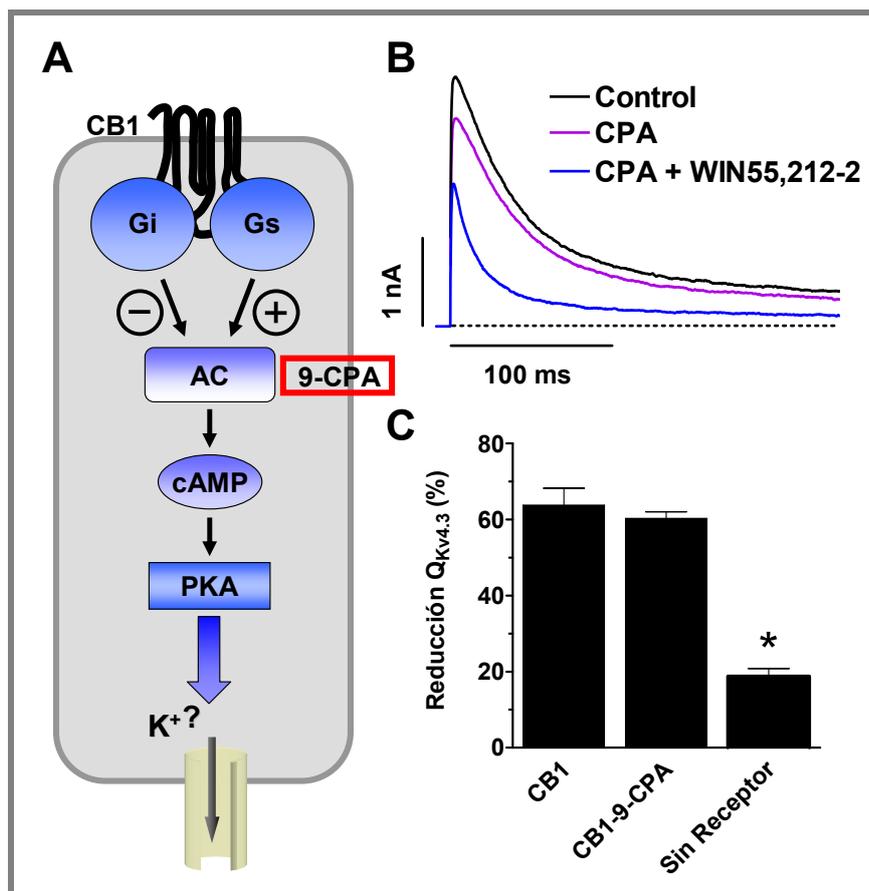
## 8. Identificación de la cascada intracelular responsable de los efectos del WIN55,212-2 sobre la $I_{Kv4.3}$

Tras la descripción de las características del bloqueo producido por el WIN55,212-2 de los canales  $Kv4.3$  a través de la estimulación del receptor CB1 quisimos identificar la/s ruta/s de señalización intracelular/es responsables del mismo.

En el canal  $Kv4.3$ , se han identificado diferentes sitios consenso de fosforilación para PKA, PKC, ERK y CaMKII (Dilks y cols., 1999; Van der Heyden y cols., 2006; Niwa y Nerbonne, 2010). Entre estas quinasas, la CaMKII ha surgido como una proteína clave en la regulación de la  $I_{to1}$  cardiaca (Sergeant y cols., 2005; Couchonnal y Anderson, 2008).

La estimulación del receptor CB1 provoca, en la mayor parte de los tipos celulares estudiados, la activación de proteínas Gi/o con la consiguiente inhibición de la AC, disminución de las concentraciones de AMPc e inactivación de la PKA (Figura IV.43A) (Howlett y cols., 2002). También se ha descrito que, en ganglios basales, en neuronas del estriado o en el corazón, la activación del receptor CB1, puede estimular la AC probablemente a través de proteínas Gs, produciendo un aumento en los niveles de AMPc y la activación de la PKA (Hillard y cols., 1990; Glass y Felder, 1997; Maneuf y Brotchie, 1997).

Para estudiar si los efectos producidos por la estimulación del receptor CB1 estaban mediados por la ruta AC/AMPc/PKA, realizamos un grupo de experimentos en los que se analizaron los efectos del WIN55,212-2 sobre la  $I_{Kv4.3}$  en presencia de 9-ciclopentil adenina (9-CPA, 100  $\mu$ M), un inhibidor específico de la AC. El panel B de la figura IV.43 muestra los registros de la corriente generada por canales Kv4.3 en células CHO-CB1 obtenidos en situación control, en presencia de 9-CPA y finalmente en presencia de 9-CPA y de WIN55,212-2 a la concentración de 100 nM. Puede observarse que en presencia de 9-CPA, el WIN55,212-2 produce una reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  ( $60.2 \pm 1.7\%$  a +50 mV) similar a la producida en ausencia del inhibidor de la AC ( $n=4$ ,  $P > 0.05$  vs.  $63.7 \pm 4.5\%$ ). Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio producido por la estimulación del receptor CB1 sobre la  $I_{Kv4.3}$  no está mediado por la activación de la vía AC/AMPc/PKA.



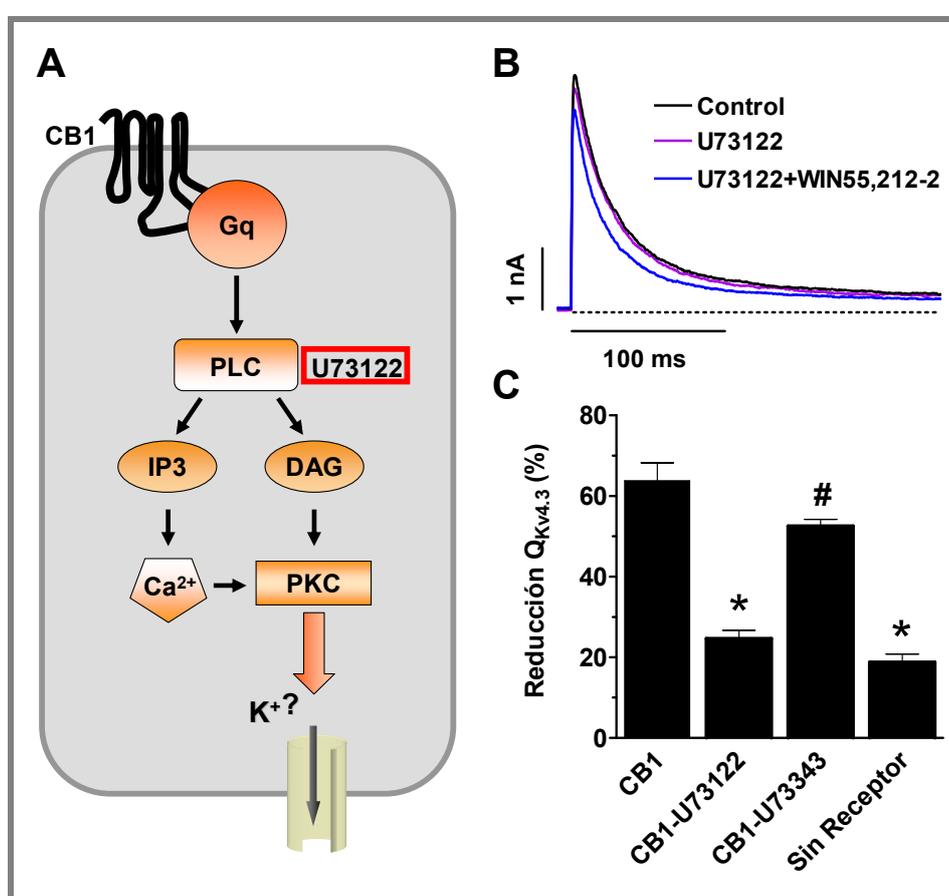
**Figura IV.43.** Esquema de la posible ruta intracelular de los efectos del WIN55,212-2 sobre la  $I_{Kv4.3}$  mediados a través del receptor CB1. (A) Diagrama en el que se muestra la vía intracelular AC/AMPC/PKA y la inhibición de la AC por 9-CPA. (B) Trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrada en células CHO-CB1 tras aplicar pulsos de 250 ms desde -80 mV hasta +50 mV en situación control (negro), en presencia del inhibidor de la AC, el 9-CPA sólo (morado) o asociado al WIN55,212-2 (azul). (C) Gráfico de barras que muestra la reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  producida por el WIN55,212-2 a través de la estimulación del receptor CB1 a la concentración de 100 nM en ausencia de 9-CPA, en presencia del inhibidor y la que produce de forma directa sobre el canal. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de  $\geq 4$  experimentos. \* $P < 0.05$  vs. CB1.

Otra de las vías de señalización activada por el receptor CB1 es la que produce la activación de proteínas Gq/11 dependientes de la PLC (Sugiura y cols., 1997; Mombouli y cols., 1999; Lauckner y cols., 2005; De Petrocellis y cols., 2007). Esta fosfolipasa hidroliza el PIP2 dando lugar a la formación de IP<sub>3</sub> y DAG, que producen un aumento en la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo endoplasmático y la activación de la PKC, respectivamente (Figura IV.44A).

En el siguiente grupo de experimentos registramos la  $I_{Kv4.3}$  en células CHO-CB1 en presencia del U73122 (2  $\mu$ M), un inhibidor inespecífico de PLC que no difunde a través de la membrana, por lo que lo añadimos a la solución interna que dializa las células. En el panel B de la figura IV.44 se muestra los registros de  $I_{Kv4.3}$  en células CHO-CB1 obtenidos en

situación control, tras la diálisis con U73122, y por último, en presencia de U73122 y de WIN55,212-2 a la concentración de 100 nM.

En estas condiciones el WIN55,212-2 produjo una reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  de un  $24.6 \pm 2.0\%$  que era significativamente menor que la reducción que producía en ausencia del inhibidor de la PLC ( $n=4$ ,  $P < 0.05$  vs. bloqueo producido por el WIN55,212-2 100 nM en células CHO-CB1 =  $63.7 \pm 4.5\%$ ) y muy similar a la reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  producida por el WIN55,212-2 de forma directa sobre el canal ( $n=4$ ,  $P > 0.05$  vs.  $18.8 \pm 2.0$ ) (Figura IV.44C). Los resultados sugieren que el efecto que producía el WIN55,212-2 sobre el canal  $Kv4.3$  a través de la estimulación del receptor CB1 estaba mediado por la activación de la PLC.

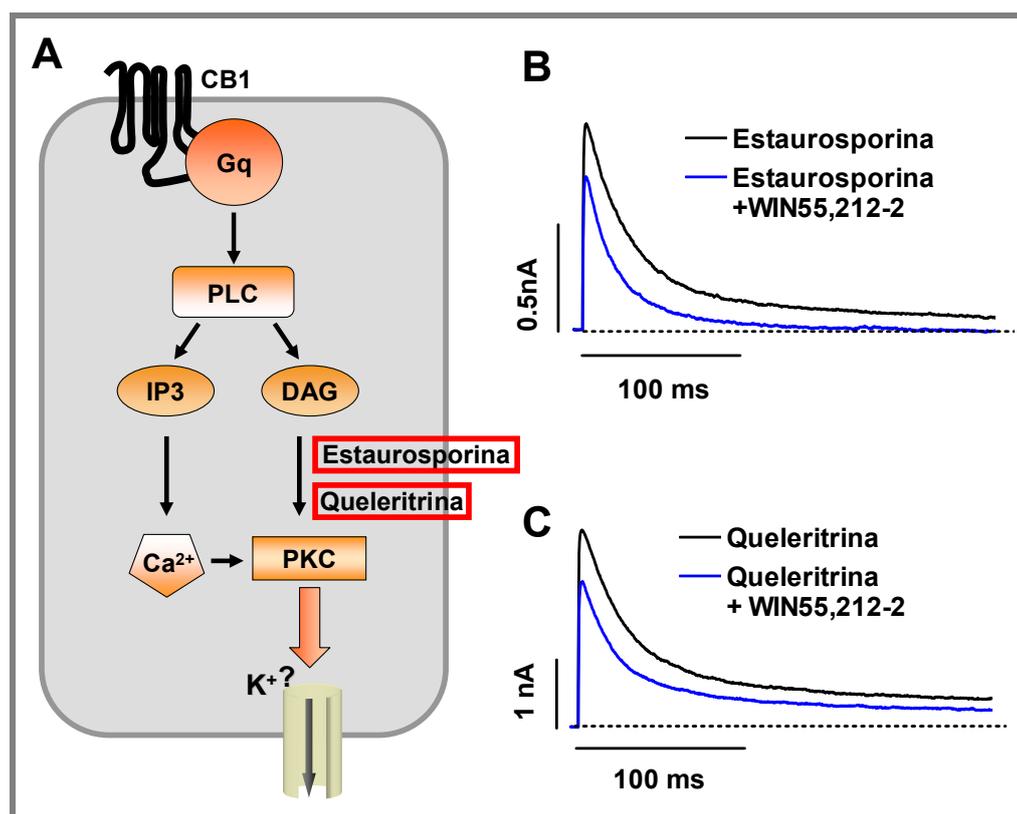


**Figura IV.44. Esquema de la posible ruta intracelular de los efectos del WIN55,212-2 sobre la  $I_{Kv4.3}$  mediados a través del receptor CB1.** (A) Diagrama en el que se muestra la vía intracelular PLC/IP3/DAG y la inhibición de la PLC por U73122. (B) Trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrada en células CHO-CB1, dializadas con U73122, tras romper el sello (negro), cuando los efectos del inhibidor han alcanzado el estado estable (morado) y en presencia de U73122 y de WIN55,212-2 (azul), tras aplicar pulsos de 250 ms desde -80 mV hasta +50 mV. (C) Gráfico de barras que muestra la reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  producida por el WIN55,212-2 a través de la estimulación del receptor CB1 a la concentración de 100 nM en ausencia de U73122, en presencia del inhibidor, en presencia del análogo inactivo U73343, y la que produce de forma directa sobre el canal. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de 4 experimentos. \* $P < 0.05$  vs. CB1; # $P < 0.05$  vs. CB1-U73122.

A continuación se analizaron los efectos del WIN55,212-2 en presencia del análogo inactivo del U73122, el U73343 (2  $\mu$ M). En estas condiciones el WIN55,212-2 a la concentración de 100 nM producía una disminución de la  $Q_{Kv4.3}$  del  $52.5 \pm 1.7\%$  que era significativamente mayor que la producida en presencia de U73122 ( $24.6 \pm 2.0\%$ ,  $n=4$ ,  $P < 0.05$ ) (Figura IV.44C). Estos resultados confirman la hipótesis de que la inhibición de la  $I_{Kv4.3}$  que produce el WIN55,212-2 a través de la estimulación del receptor CB1, está mediada en su totalidad por la activación de la PLC.

Una vez demostrada la participación de la PLC, quisimos determinar la implicación de la PKC en el efecto producido por el WIN55,212-2 sobre el canal Kv4.3 mediado a través de la estimulación del receptor CB1, utilizando para ello la estaurosporina y la queleritrina. Ambos compuestos son inhibidores de la PKC pero se diferencian en su potencia y en su selectividad. La estaurosporina es un potente inhibidor de la PKC ( $CI_{50} = 2.7$  nM) (Tamaoki y cols., 1986) aunque no es selectiva para esta quinasa pudiendo inhibir otras quinastas como la PKA (Rüegg y Burgess, 1989). La queleritrina, es menos potente ( $CI_{50} = 0.66$   $\mu$ M) pero más selectiva que otros inhibidores (Herbert y cols., 1990). Este inhibidor no difunde a través de la membrana, por lo que tuvimos que incluirlo en la solución interna. La corriente en situación control era la que se registraba justo después de la apertura del sello de alta resistencia. En la figura IV.45 se muestran trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrados a +50 mV en células CHO-CB1, en presencia de estaurosporina (1  $\mu$ M) (Panel A) o queleritrina (2  $\mu$ M) (Panel B) y en presencia de los inhibidores y de WIN55,212-2 (100 nM).

En estas condiciones, el WIN55,212-2 producía una disminución de la  $Q_{Kv4.3}$  del  $39.6 \pm 7.2\%$  y del  $35.9 \pm 2.6\%$  a +50 mV en presencia de estaurosporina y queleritrina, respectivamente. Como se puede observar el bloqueo producido por el WIN55,212-2 se vio significativamente reducido comparado con el efecto obtenido en ausencia de los inhibidores ( $n=4$ ,  $P < 0.05$  vs.  $63.7 \pm 4.5\%$ ).



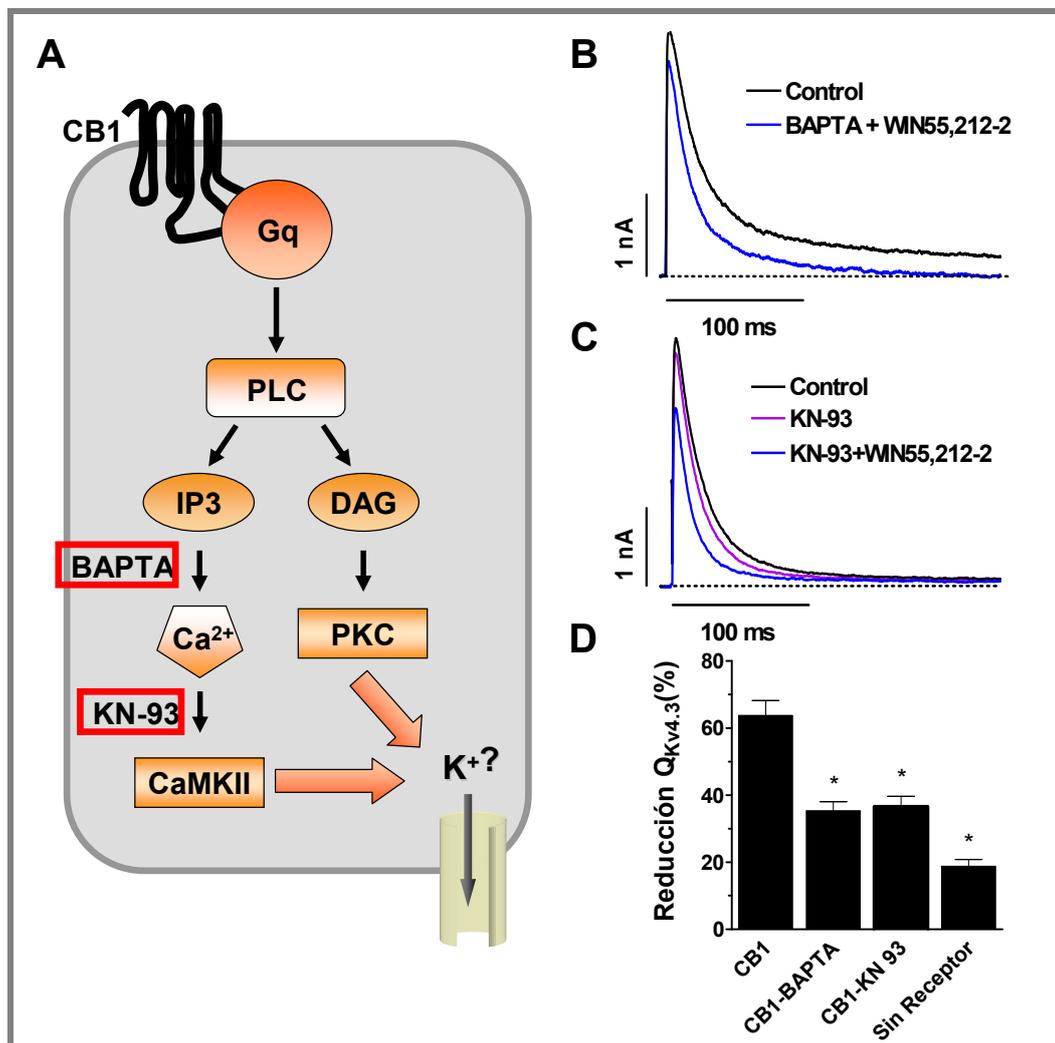
**Figura IV.45.** Esquema de la posible ruta intracelular de los efectos del WIN55,212-2 sobre la  $I_{Kv4.3}$  mediados a través del receptor CB1. (A) Diagrama en el que se muestra la vía intracelular PLC/IP3/DAG y la inhibición de la PKC por estaurosporina y queleritrina. (B) Trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrada en células CHO-CB1 tras aplicar pulsos de 250 ms desde -80 mV hasta +50 mV en situación control (negro) y en presencia de estaurosporina y de WIN55,212-2 (azul). (C) Trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrada en células CHO-CB1, dializadas con queleritrina, tras romper el sello y cuando los efectos del inhibidor han alcanzado el estado estable (negro) y en presencia de queleritrina y de WIN55,212-2 (azul), tras aplicar pulsos de 250 ms desde -80 mV hasta +50 mV.

Estos resultados sugieren que, a pesar de que la activación de la PLC es responsable de los efectos producidos por la estimulación de receptores CB1 sobre el canal, sólo parte de éstos eran consecuencia de la activación de la PKC.

Para averiguar qué otro mecanismo podría estar implicado en el efecto inhibitorio del WIN55,212-2, estudiamos a continuación la posible participación de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular, ya que se ha demostrado que el aumento de los niveles de IP<sub>3</sub> puede ser responsable de la movilización de  $Ca^{2+}$  desde el retículo endoplasmático (Berridge, 2009) (Figura IV.46A). Por ello, a continuación, se realizó un grupo de experimentos en los que se sustituyó en la solución interna el EGTA por BAPTA 20 mM, un potente quelante de  $Ca^{2+}$  y se registró la  $I_{Kv4.3}$  en células CHO-CB1 a +50 mV en situación control y presencia de BAPTA y de WIN55,212-2 a la concentración de 100 nM (Figura IV.46B).

En estas condiciones el WIN55,212-2 redujo la  $Q_{Kv4.3}$  en un  $35.3 \pm 2.7\%$  bloqueo que era significativamente menor que el que producía en ausencia de BAPTA ( $n=4$ ,  $P < 0.05$  vs.  $63.7 \pm 4.5\%$ ). Estos resultados sugieren que la estimulación del receptor CB1 activa la PLC lo

que aumenta la  $[Ca^{2+}]_i$ , lo cual, a su vez, es responsable de parte de los efectos inhibitorios producidos por el WIN55,212-2.



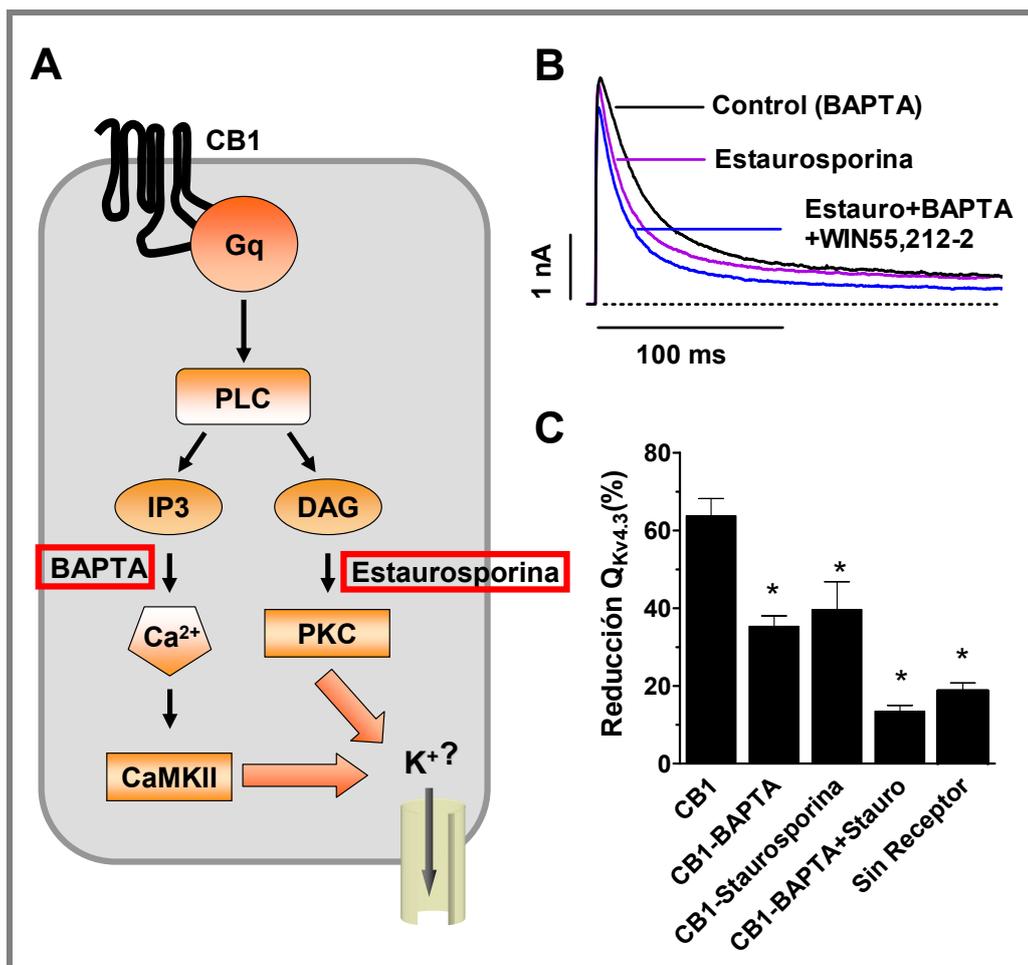
**Figura IV.46.** Esquema de la posible ruta intracelular de los efectos del WIN55,212-2 sobre la  $I_{Kv4.3}$  mediados a través del receptor CB1. (A) Diagrama en el que se muestra la vía intracelular PLC/IP3/DAG, la inmovilización de la  $[Ca^{2+}]_i$  con BAPTA y la inhibición de la CaMKII por KN-93. (B) Trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrada en células CHO-CB1, sustituyendo el EGTA de la solución interna por BAPTA, en situación control (negro) y en presencia de WIN55,212-2 (azul), tras aplicar pulsos de 250 ms desde -80 mV hasta +50 mV. (C) Trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrada en células CHO-CB1, en situación control (negro), en presencia de KN-93 solo (morado) y en presencia de KN-93 y WIN55,212-2 (azul), tras aplicar pulsos de 250 ms desde -80 mV hasta +50 mV. (D) Gráfico de barras que muestra la reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  producida por el WIN55,212-2 a través de la estimulación del receptor CB1 a la concentración de 100 nM en ausencia de inhibidores, en presencia del quelante de  $Ca^{2+}$  intracelular, en presencia del inhibidor de la CaMKII, y la producida de forma directa sobre el canal. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de 4 experimentos. \* $P < 0.05$  vs. CB1.

Como se ha mencionado anteriormente, una de las quinasas que parece ser crítica en la regulación de la  $I_{to1}$  cardíaca es la CaMKII (Tessier y cols., 1999; Couchonnal y Anderson, 2008) y cuya actividad depende de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Sergeant y cols., 2005). Por tanto, quisimos

saber si los efectos que producía el WIN55,212-2 se debían, en parte, a la activación de esta quinasa o si eran consecuencia directa del aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

En la figura IV.46C se muestran trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrados en células CHO-CB1, en presencia del inhibidor de la CaMKII, el KN-93 (10  $\mu$ M) solo y en presencia de WIN55,212-2 a la concentración de 100 nM. En estas condiciones, el WIN55,212-2 producía una reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  del  $36.6 \pm 3.0$  que era significativamente menor que la que se obtuvo en ausencia del inhibidor ( $n=4$ ,  $P < 0.05$  vs.  $63.7 \pm 4.5\%$ ) (Figura IV.45D). Estos resultados sugieren que el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  producido por la activación de la PLC estimula la CaMKII, lo cual es responsable de parte de la inhibición de la  $I_{Kv4.3}$  producida por la activación del receptor CB1.

De esta forma, sería posible pensar que el WIN55,212-2 activase la PLC y que el consiguiente aumento de IP<sub>3</sub> y DAG resultaran en la inhibición de la  $I_{Kv4.3}$  a través de dos mecanismos puestos en marcha de forma simultánea e independiente: la activación de la PKC y el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  que a su vez activaría la CaMKII. Por tanto, a continuación, quisimos comprobar si la inhibición simultánea de los dos mecanismos abolía completamente el efecto inhibitorio producido por el WIN55,212-2 a través de la estimulación del receptor CB1. Para ello se realizaron un último grupo de experimentos en los que se quiso bloquear tanto la parte de la vía correspondiente al IP<sub>3</sub> como la correspondiente al DAG (Figura IV.47A) sustituyendo el EGTA por BAPTA 20 mM y registrando la  $I_{Kv4.3}$  en células CHO-CB1 en presencia del inhibidor de la PKC, estaurosporina. En estas condiciones y como se puede observar en la figura IV.47B, el efecto del WIN55,212-2 se vio completamente abolido. A la concentración de 100 nM, el WIN55,212-2 redujo la  $Q_{Kv4.3}$  en un  $13.5 \pm 1.5\%$ , resultado que no era significativamente diferente del que producía el WIN55,212-2 sobre la  $I_{Kv4.3}$  en células sin receptor ( $n=4$ ,  $P > 0.05$  vs.  $18.8 \pm 2.0$ , figura IV.47C).



**Figura IV.47.** Esquema de la posible ruta intracelular de los efectos del WIN55,212-2 sobre la  $I_{Kv4.3}$  mediados a través del receptor CB1. (A) Diagrama en el que se muestra la vía intracelular PLC/IP<sub>3</sub>/DAG, la inmovilización de la  $[Ca^{2+}]_i$  y la inhibición de la PKC por estaurosporina. (B) Trazos de  $I_{Kv4.3}$  registrada en células CHO-CB1, sustituyendo el EGTA de la solución interna por BAPTA (situación control, negro), en presencia de estaurosporina y BAPTA (morado) y en presencia de ambos y de WIN55,212-2 (azul), tras aplicar pulsos de 250 ms desde -80 mV hasta +50 mV. (C) Gráfico de barras que muestra la reducción de la  $Q_{Kv4.3}$  producida por el WIN55,212-2 a través de la estimulación del receptor CB1 a la concentración de 100 nM en ausencia de inhibidores, en presencia del quelante de  $Ca^{2+}$  intracelular, BAPTA, en presencia del inhibidor de la PKC, estaurosporina, en presencia de BAPTA y estaurosporina simultáneamente y la producida de forma directa sobre el canal. Cada barra representa la media±EEM de 4 experimentos. \*P < 0.05 vs. CB1.

En base a estos resultados podemos concluir que el efecto inhibitorio del WIN55,212-2 sobre la  $I_{Kv4.3}$  a través de la estimulación del receptor CB1 depende de la activación de la PLC que desencadena la vía de señalización IP<sub>3</sub>/DAG y que implica la activación de la PKC y el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , que a su vez activa la CaMKII, interaccionando ambas quinasas con distintos sitios de la proteína del canal Kv4.3 modulando la corriente generada a través del mismo.



## **V. DISCUSIÓN**



En la presente Tesis Doctoral hemos demostrado que los endocannabinoides AEA y 2-AG, así como el análogo no hidrolizable de la AEA, la MetAEA bloquean de forma independiente de receptor los canales cardiacos Kv4.3+KChIP2a expresados en líneas celulares de mamífero. Sin embargo, los endocannabinoides PEA y LPI son menos potentes para bloquear estos canales. Además, los datos obtenidos demuestran que los endocannabinoides y sus análogos inhiben la corriente nativa  $I_{to1}$  de forma independiente de receptor en miocitos auriculares humanos, confirmando así los datos obtenidos sobre los canales clonados expresados en líneas celulares. También hemos demostrado en muestras de orejuela auricular procedentes de pacientes, que la FA produce un aumento de la expresión de los receptores de endocannabinoides CB1, CB2 y GPR55. Además, los endocannabinoides también pueden modular los canales Kv4.3 y la corriente nativa  $I_{to1}$  a través de la estimulación de los receptores CB1 y GPR55. Por último, pudimos demostrar que los efectos producidos a través de la estimulación del receptor CB1 sobre el canal Kv4.3, se deben a la activación de la vía PLC/IP<sub>3</sub>/DAG que en último término estimula la CaMKII y la PKC, pudiendo modular ambas quinasas la actividad del canal.

### **1. Efectos de los endocannabinoides sobre los canales Kv4.3+KChIP2a y la $I_{to1}$**

La corriente de K<sup>+</sup> cardiaca que presenta una rápida activación e inactivación denominada  $I_{to1}$  juega un papel primordial en la repolarización del PA cardiaco humano, tanto en la aurícula como en el ventrículo (Escande y cols., 1987; Wettwer y cols., 1994). La  $I_{to1}$  es particularmente importante en la fase inicial de la repolarización (fase 1) y condiciona la participación de otras corrientes y los procesos de transporte a través de la membrana que determinan la morfología del PA (Escande y cols., 1987). Los canales Kv4.3 junto con la subunidad auxiliar KChIP2a son los responsables de generar la  $I_{to1}$  en tejido auricular y ventricular humano (An y cols., 2000; Patel y cols., 2002; Rosati y cols., 2003).

Los resultados demuestran que la AEA y el 2-AG bloquean los canales cardiacos humanos Kv4.3+KChIP2a de una forma independiente de receptor, ya que los experimentos están realizados en células CHO que no expresaban endógenamente ningún receptor CB conocido (Gómez del Pulgar y cols., 2000; Chemin y cols., 2001; Lauckner y cols., 2008). Para confirmar estos resultados se llevaron a cabo experimentos en los cuales se determinaron los efectos de la AEA en presencia de RMB y AM630, antagonistas de los receptores CB1 y CB2, respectivamente (Pacher y cols., 2006). En estas condiciones, los efectos de la AEA fueron los mismos que los que se observaron en ausencia de los antagonistas, lo cual apoya la

hipótesis de que los endocannabinoides ejercen un efecto directo sobre los canales Kv4.3+KChIP2a. De hecho ya se habían demostrado efectos directos de los endocannabinoides sobre otros canales iónicos no cardíacos (Van der Stelt y Di Marzo, 2005; Oz, 2006; Bondarenko y cols., 2010). Así, la AEA bloquea de forma independiente de receptor los canales neuronales Kv1.2 (Poling y cols., 1996), los TASK-1 (Maingret y cols., 2001), los de Ca<sup>2+</sup> tipo T (Chemin y cols., 2001), los Kv3.1, los Kv1.1, los que generan la corriente de tipo A de rápida inactivación ( $I_A$ ) (Oliver y cols., 2004) y los de Na<sup>+</sup> voltaje-dependientes (Kim y cols., 2005).

El bloqueo producido por los endocannabinoides sobre los canales Kv4.3+KChIP2a va acompañado de una significativa aceleración de la cinética de inactivación del canal. Previamente se había descrito que la aceleración que produce la AEA en la cinética de inactivación de los canales de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> tipo T (Poling y cols., 1996; Chemin y cols., 2001; Maingret y cols., 2001; Oliver y cols., 2004; Kim y cols., 2005) se debía, bien a un bloqueo de estos canales en estado abierto (Poling y cols., 1996; Chemin y cols., 2001), o bien a un cambio conformacional en la región del filtro de selectividad (Oliver y cols., 2004). Además los resultados obtenidos demuestran que el bloqueo que producen los endocannabinoides va acompañado de una modificación en la dependencia de voltaje de la inactivación de los canales Kv4.3+KChIP2a. De nuevo, efectos similares se observaron con la AEA sobre la dependencia de voltaje en canales de Ca<sup>2+</sup> y de Na<sup>+</sup> (Chemin y cols., 2001; Kim y cols., 2005).

La potencia de la AEA ( $CI_{50} = 0.4 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ) y del 2-AG ( $CI_{50} = 0.3 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ) para inhibir la  $I_{Kv4.3}$  es similar a la que presenta la AEA para bloquear los canales neuronales TASK-1 o los de Ca<sup>2+</sup> tipo T ( $CI_{50} = 0.33 \mu\text{M}$ ) (Chemin y cols., 2001; Maingret y cols., 2001). Sin embargo, sus efectos sobre los canales Kv4.3+KChIP2a son más potentes que los demostrados en los canales de Na<sup>+</sup> ( $CI_{50} = 5.5 \mu\text{M}$ ) de las neuronas ganglionares de la raíz dorsal de rata (Kim y cols., 2005) o en los canales *Shaker* Kv1.2 ( $CI_{50} = 2.7 \mu\text{M}$ ) (Poling y cols., 1996; Oliver y cols., 2004).

Los efectos descritos sobre los canales Kv4.3+KChIP2a expresados en líneas celulares de mamífero se reproducían cuando se registraba la  $I_{to1}$  en miocitos auriculares humanos. Además de producir la misma inhibición de la corriente, también aceleraba de la misma forma la cinética de la inactivación del canal. Por tanto, los resultados demuestran que la AEA inhibe de forma independiente de receptor la corriente nativa con una potencia similar a la inhibición que observábamos sobre la  $I_{Kv4.3}$ .

Anteriormente ya se había demostrado que los ácidos grasos modulaban la actividad de canales  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  (Honoré y cols., 1994; Villaroel y Schwarz 1996; Xiao y cols., 1997 y 2001; Holmqvist y cols., 2001; Guizy y cols., 2008) y que el AA inhibía la  $I_{\text{to1}}$  en miocitos cardiacos de rata (Damron y cols., 1993). Nuestros resultados demuestran que los canales  $\text{Kv4.3}+\text{KChIP2a}$  son especialmente sensibles al AA ( $\text{CI}_{50}=0.3\pm 0.02 \mu\text{M}$ ), más que otros canales como por ejemplo los  $\text{Kv1.5}$  (Honoré y cols., 1994). Hemos descrito además efectos similares para el AO que, al igual que el AA, aceleran las cinéticas de la inactivación y desplazan la dependencia de voltaje hacia potenciales más negativos. Estos resultados, nuevamente coinciden con otros descritos anteriormente en canales de  $\text{K}^+$   $\text{Kv1.1}$ ,  $\text{Kv1.5}$ ,  $\text{Kv4.1}$ ,  $\text{Kv4.2}$ , de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y de  $\text{Na}^+$  (Honoré y cols., 1994; Villaroel y Schwarz 1996; Xiao y cols., 1997 y 2001; Holmqvist y cols., 2001; Oliver y cols., 2004; Guizy y cols., 2008; Barana y cols., 2010). Químicamente la AEA es una etanolamida derivada del AA, que puede ser liberada mediante la hidrólisis de la AEA. Esto plantearía la duda de si la AEA ejerce los efectos por sí misma o si son debidos a la acción de sus metabolitos. Sin embargo, es importante destacar que la MetAEA, el análogo no hidrolizable de la AEA, también bloqueaba los canales  $\text{Kv4.3}+\text{KChIP2a}$  con la misma potencia que la AEA y ese bloqueo presentaba las mismas características electrofisiológicas, lo que sugería que los efectos observados son producidos por la AEA *per se*. Además, el análisis de los efectos que estos ácidos grasos ejercían sobre la  $I_{\text{Kv4.3}}$ , nos sirvió también para poder relacionar la estructura de los endocannabinoides estudiados con la potencia con la que bloqueaban los canales  $\text{Kv4.3}+\text{KChIP2a}$ . De esta manera pudimos observar que al aumentar el número de átomos de C de la cadena hidrocarbonada de las etanolamidas y ácidos grasos estudiados (al menos en las cadenas de entre 16 y 20 átomos de C) y al aumentar el grado de complejidad de los compuestos, aumentaba la potencia de bloqueo. El hecho de que la potencia de bloqueo dependa de algunos parámetros de la estructura del compuesto, sugiere que los efectos son debidos a la interacción específica con un sitio de unión localizado en la proteína del canal y capaz de reconocer este tipo de moléculas.

En varios estudios se ha sugerido que los endocannabinoides y los ácidos grasos pueden modificar la actividad de algunos canales mediante la alteración de ciertas propiedades de la membrana, como la fluidez, la rigidez de la bicapa lipídica o su curvatura (Andersen y cols., 2007; Bruno y cols., 2007; Ben-Zeev y cols., 2010). Por el contrario, otros estudios han demostrado que mediadores lipídicos como el AA u otros ácidos grasos, no modifican las propiedades de la membrana, al menos a las concentraciones a las cuales esos compuestos inhiben las corrientes iónicas (Pound y cols., 2001). Para comprobar si posibles

modificaciones producidas por la AEA, el 2-AG, la PEA y el LPI en la fluidez de la membrana celular podrían ser responsables del bloqueo de los canales Kv4.3+KChIP2a producido por los endocannabinoides, se realizó una caracterización estructural y dinámica de la membrana celular en presencia y en ausencia de los diferentes compuestos. Este análisis se realizó mediante el estudio de la anisotropía de fluorescencia de la sonda fluorescente lipofílica PA-DPH, que ofrece información semicuantitativa que permite comparar la fluidez de las membranas celulares bajo diferentes condiciones experimentales (Mateo y cols., 1993; Guizy y cols., 2008). Los resultados obtenidos no descartan la hipótesis de que, a las concentraciones utilizadas, los endocannabinoides modifiquen el orden y la microviscosidad de la membrana. Sin embargo, demuestran que, en cualquier caso, los efectos producidos por todos los endocannabinoides estudiados sobre la membrana de las células CHO eran los mismos, lo cual contrasta con la diferente potencia de bloqueo de los canales Kv4.3+KChIP2a (la AEA y el 2-AG son mucho más potentes que el LPI y la PEA). Además tampoco se vio una relación directa entre la potencia de bloqueo sobre los canales Kv4.3+KChIP2a y la liposolubilidad de etanolamidas y ácidos grasos utilizando sus índices de partición y distribución, respectivamente. Por tanto, estos resultados sugieren que estos compuestos inhiben la corriente interaccionando directamente con el canal Kv4.3+KChIP2a y no produciendo cambios inespecíficos en las propiedades de la membrana.

Se había descrito que cambios en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular podrían ser los responsables de determinados efectos producidos por los endocannabinoides (Lauckner y cols., 2005; Zhuang y cols., 2005) por lo que también se estudió el posible papel de la modulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en los efectos de los endocannabinoides sobre a la  $I_{\text{Kv4.3}}$ . Incluyendo BAPTA en la solución interna se inmoviliza de manera muy eficaz el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Stern, 1992) y así, en este grupo de experimentos, pudimos comprobar que los efectos de la AEA eran iguales que cuando se usaba EGTA, tanto en el porcentaje de bloqueo sobre el canal medido como en la disminución de la  $Q_{\text{Kv4.3}}$ , como en la aceleración del curso temporal de la inactivación, aportando un dato más que apoya la hipótesis del efecto directo que estos compuestos producen sobre el canal Kv4.3+KChIP2a.

## **2. Determinación del posible sitio de unión de los endocannabinoides al canal Kv4.3+KChIP2a**

Se ha descrito que diferentes subunidades auxiliares pueden modificar los efectos de los endocannabinoides sobre diferentes corrientes iónicas. Se ha visto que la aceleración de la

inactivación de la  $I_A$  producida por el AA dependía de la presencia de KChIP (Holmqvist y cols., 2001) y que los efectos producidos sobre la  $I_{Ks}$  por diferentes ácidos grasos dependían de la presencia de minK (KCNE1) (Doolan y cols., 2002). Los canales Kv4.3 junto con la subunidades auxiliares KChIP2a, DPP6 y MiRP2 (KCNE3) son las responsables de generar la  $I_{to1}$  (Nerbonne y Kass, 2005; Radicke y cols., 2005 y 2006; Delpón y cols., 2008). Al analizar los efectos de la AEA sobre la  $I_{Kv4.3}$  registrada en células cotransfectadas con las subunidades auxiliares DPP6 o MiRP2 pudimos comprobar que su presencia no modificaba el bloqueo producido por el endocannabinoide sobre el canal Kv4.3+KChIP2a, por tanto, los efectos observados no dependían de la presencia de subunidades auxiliares. Es más, los efectos directos observados de la AEA sobre los canales nativos que generan la corriente cardiaca auricular humana  $I_{to1}$ , en presencia de los antagonistas de receptores CB1 y CB2, son los mismos que los que producía sobre los canales Kv4.3+KChIP2a transfectados en células CHO.

En estudios previos se ha demostrado que la AEA bloquea los canales Kv1.2, Kv1.5 y Kv3.4 por la cara extracelular de la membrana (Honoré y cols., 1994; Poling y cols., 1996; Oliver y cols., 2004; Guizy y cols., 2008; Barana y cols., 2010), mientras que el bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo T aparece sólo cuando se aplica en la cara intracelular (Chemin y cols., 2001). En los experimentos en los que se dializaron las células con AEA o con MetAEA no apareció prácticamente bloqueo. Estos resultados sugieren que el posible sitio de unión de los endocannabinoides está situado en la parte externa del canal Kv4.3+KChIP2a.

El hecho de que la AEA sólo produzca sus efectos sobre la  $I_{Kv4.3}$  cuando es aplicada extracelularmente, unido al hecho de que la subunidad auxiliar KChIP2a es intracelular y de que las subunidades auxiliares no son responsables de los efectos observados, descartan la hipótesis de que el sitio de unión esté localizado en la subunidad KChIP2a y sugieren que la AEA produce sus efectos sobre la parte extracelular de la subunidad  $\alpha$  Kv4.3.

La interacción directa de etanolamidas y ácidos grasos con las proteínas de canales ya se había demostrado anteriormente (Honoré y cols., 1994; Poling y cols., 1996; Xiao y cols., 1997, 2001; Van den Bossche y Vanheel 2000; Chemin y cols., 2001; Maingret y cols., 2001; Oliver y cols., 2004; Van der Stelt y Di Marzo, 2005; Kim y cols., 2005; Oz, 2006; Guizy y cols., 2008) e incluso se había descrito que una sola mutación en el D1-S6 de la subunidad  $\alpha$  del canal de  $Na^+$  cardiaco humano determina el bloqueo producido por los ácidos grasos (Xiao y cols., 2001).

Asumiendo la existencia de un sitio de unión para endocannabinoides en la cara extracelular del canal Kv4.3, es difícil entender por qué la aparición del bloqueo es tan lenta y

por qué el bloqueo es tan persistente incluso después de largos periodos de lavado con solución carente de compuesto. Sin embargo, este comportamiento es similar al observado con la AEA en los canales de Na<sup>+</sup>, Kv1.2 y TASK-1 (Maingret y cols., 2001; Oliver y cols., 2001; Kim y cols., 2005). Los endocannabinoides y sus análogos se sitúan en la bicapa lipídica y se aproximan hasta sus sitios de acción (incluso a los propios receptores CB1, que están orientados hacia el exterior de la membrana) por difusión lateral (Makriyannis y cols., 2005; Tian y cols., 2005). Los endocannabinoides difundirían lentamente por la membrana hasta llegar a la porción extracelular del canal Kv4.3, lo cual podría ser la causa de la lenta aparición y desaparición de los efectos. La información que existe sobre las propiedades conformacionales de la AEA en la membrana es controvertida. Sin embargo, muchos estudios localizan el grupo etanolamida cerca de la interfase, permitiendo la interacción entre este grupo y el residuo L192 del receptor CB1 situado en la porción extracelular (Song y Bonner, 1996).

### **3. Efectos de los endocannabinoides y análogos mediados a través de la estimulación de receptores CB sobre la $I_{Kv4.3}$ y la $I_{tot}$**

Existen diversos estudios que analizan la relación del SCE con el aparato cardiovascular, sin embargo, se conoce muy poco a cerca de los efectos que la modulación de este sistema puede ejercer sobre la actividad eléctrica cardíaca. Tras haber comprobado que en tejido auricular humano podemos encontrar receptores y mediadores del SCE, se analizaron los posibles efectos electrofisiológicos de la activación de este sistema sobre la corriente  $I_{Kv4.3}$ , primero, a través de la estimulación del receptor CB1 por el WIN55,212-2 y después, a través de la estimulación del receptor GPR55 mediante el LPI y la PEA.

Las células CHO que expresaban de forma estable el receptor CB1 o el receptor GPR55 en las que se transfectaba transitoriamente el canal Kv4.3, no poseían la subunidad auxiliar KCHIP2a, pero se ha demostrado que estas células expresan endógenamente una proteína similar (*KCHIP2-like*) (Patel y cols., 2002). Las corrientes generadas en este sistema de expresión se compararon con las corrientes generadas en células CHO transfectadas de forma estable con el canal Kv4.3+KCHIP2a usadas para analizar los efectos directos de los endocannabinoides sobre el canal. Se pudo comprobar que tanto las capacitancias celulares, como las amplitudes máximas de corriente eran iguales (Tabla III.2 en Material y métodos). Además las constantes cinéticas de activación e inactivación del canal no eran significativamente distintas en ningún caso.

Corriente	Número de células (n)	$\tau$ activación (ms)	$\tau_i$ inactivación (ms)	$\tau_r$ inactivación (ms)
$I_{Kv4.3}$	42	0.9±0.1	92.4±4.1	33.9±2.1
$I_{Kv4.3-CB1}$	25	0.9±0.2	152.46±9.4	31.9±2.9
$I_{Kv4.3-GPR55}$	51	0.8±0.1	139.1±4.2	23.3±1.8

**Tabla V.1. Valores medios de las constantes cinéticas de la activación e inactivación de la  $I_{Kv4.3}$  registrada en los diferentes tipos de células utilizados.** Los datos representan la media±EEM del número de experimentos (n) que se mencionan.

### 3.1. Modulación de la $I_{Kv4.3}$ y de la $I_{tot1}$ a través de la estimulación del receptor CB1

En los receptores CB1 el WIN55,212-2 es un cannabinoide más potente y más eficaz que la AEA (Luk y cols., 2004; Ryberg y cols., 2007). Esto hecho unido a que la AEA ejerce efectos directos muy marcados sobre el canal Kv4.3, nos llevó a elegir el compuesto sintético como herramienta para analizar los efectos mediados a través del receptor CB1 sobre el canal y las posibles rutas intracelulares responsables de los mismos.

Al comparar los efectos del WIN55,212-2 sobre la  $I_{Kv4.3}$  en células CHO que no expresaban endógenamente ningún receptor CB con los efectos que producía el WIN55,212-2 sobre la corriente registrada en células CHO-CB1, observamos que el WIN55,212-2 bloquea los canales cardiacos humanos Kv4.3 de una forma independiente de receptor pero también bloquea estos canales, y con mayor potencia, a través de la estimulación del receptor CB1. Se han descrito resultados similares para el WIN55,212-2 sobre canales neuronales de  $Na^+$  o de  $Ca^{2+}$  tipo N, donde se vio que los efectos eran tanto directos, como mediados a través de la estimulación del receptor CB1 (Shen y Thayer, 1998; Guo e Ikeda, 2004; Németh y cols., 2008). En ambos casos, los efectos mediados a través de receptor aparecían a concentraciones significativamente menores que los efectos directos.

La inhibición producida por el WIN55,212-2 sobre la  $I_{Kv4.3}$  registrada en células CHO-CB1 iba acompañada de una significativa aceleración de la cinética de inactivación y de un desplazamiento de la dependencia de voltaje de la inactivación de los canales Kv4.3 hacia potenciales más negativos. En estudios previos también se demostró que la activación del receptor CB1 por el WIN55,212-2 inhibía las corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo N y P/Q (Cailfield y Brown, 1992; Mackie y Hille, 1992; Mackie y Lai, 1995; Pan y cols., 1996; Twitchel y cols., 1997) y otras corrientes de  $K^+$  neuronales como la tipo D ( $I_D$ ) o la tipo M ( $I_M$ ) (Deadwyler 1993; Deadwyler y cols., 1995; Pan y cols., 1996; Mu 1999). Sin embargo, Deadwyler y colaboradores describieron un aumento de la corriente  $I_A$  registrada en neuronas de hipocampo de rata y un desplazamiento hacia potenciales más positivos en la dependencia de

voltaje de la inactivación por efecto del WIN55,212-2 sobre esa corriente (Deadwyler y cols., 1995). Un año más tarde, en el estudio de Pan y colaboradores, se describió un ligero aumento de la  $I_A$  producido por el WIN55,212-2 pero que no iba acompañado de modificaciones en la dependencia de voltaje de la inactivación (Pan y cols., 1996). En este artículo se propuso que las discrepancias en los resultados se podían deber a que los registros de la corriente se realizaron en diferentes tipos neuronales. En los estudios de Deadwyler, la  $I_A$  se registraba en neuronas de hipocampo (Deadwyler y cols., 1995) mientras que en el estudio de Pan, los experimentos se realizaron en neuronas del ganglio cervical superior (Pan y cols., 1996).

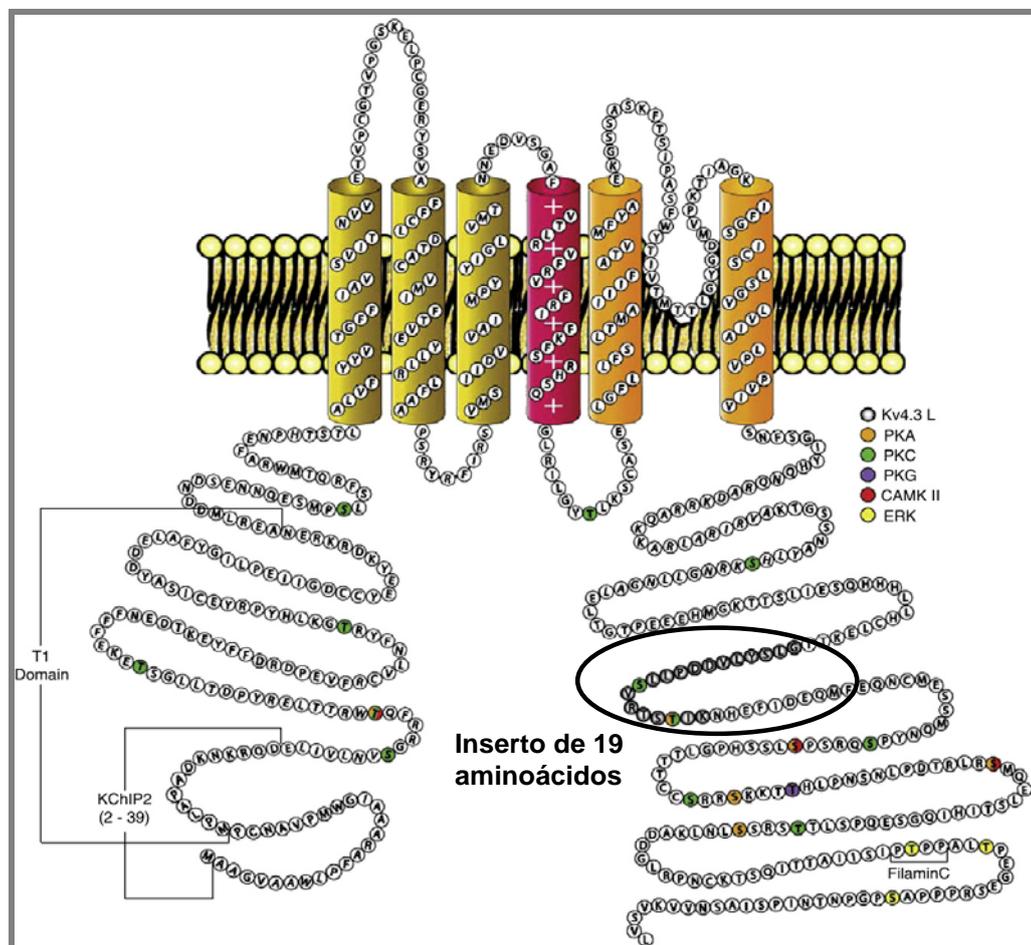
A pesar de que la corriente neuronal  $I_A$  se activa y se inactiva muy rápidamente y a los mismos potenciales a los que se activa la  $I_{to1}$ , las diferencias entre aquellos estudios y nuestros resultados se pueden deber a que en cerebro la  $I_A$  está generada principalmente por canales Kv4.2 (Maletic-Savatic y cols; 1995; Alonso y Widmer 1997; Serôdio y cols., 1994; Martina y cols., 1998) mientras que en el corazón humano, las subunidades  $\alpha$  Kv4.3 son las responsables de la  $I_{to1}$  (Dixon y cols., 1996; Kong y cols., 1998; Dilks y cols., 1999). Otra razón de los diferentes resultados obtenidos podría ser la activación de diferentes vías de señalización. El aumento de la corriente neuronal  $I_A$  por el WIN55,212-2 a través de CB1 se debe a la activación de la vía de señalización AC/AMPC/PKA (Deadwyler y cols., 1995; Hampson y cols., 1995). En nuestros resultados, el bloqueo de los canales Kv4.3 producido por el WIN55,212-2 en presencia de 9-CPA en células CHO-CB1, era similar a la que producía en ausencia de este inhibidor de la AC, pudiendo descartar así, que los efectos fueran debidos a la activación de esta vía. Posteriormente demostramos que la inhibición de la corriente cardíaca  $I_{Kv4.3}$  por el WIN55,212-2 a través del receptor CB1 se debe a la activación de la PLC que en último término activa la PKC y la CaMKII que interaccionarían con distintos sitios de la proteína del canal Kv4.3 modulando la corriente generada a través del mismo. Además, y lo que es más importante, los resultados obtenidos al analizar los efectos de la estimulación selectiva del receptor CB1 sobre la  $I_{to1}$  registrada en miocitos auriculares humanos, permitieron demostrar que el WIN55,212-2 inhibía la corriente nativa y que los efectos sobre ésta eran similares a los observados sobre los canales Kv4.3 expresados en células CHO-CB1.

### 3.2. Cascada intracelular responsable de la inhibición de la $I_{Kv4.3}$ por el WIN55,212,2

Los endocannabinoides producen la mayoría de sus efectos a través de la activación del receptor CB1 mediante su unión a proteínas Gi/o, cuya principal vía de señalización es la activación secuencial de la AC y la PKA (Howlett y cols., 1986; Glass y Felder, 1997; Pertwee, 1997; Howlett y cols., 2002). Otra de las vías más comunes descritas en la estimulación del receptor CB1 es la que produce la activación de proteínas Gq/11 y de la PLC (Sugiura y cols., 1997; Mombouli y cols., 1999; Lauckner y cols., 2005; De Petrocellis y cols., 2007).

Como se ha mencionado, nuestros experimentos demostraban que la inhibición producida por el WIN55,212 sobre la  $I_{Kv4.3}$  registrada en células CHO-CB1 se debía a la activación de la PLC ya que en presencia de un inhibidor de dicha lipasa, el U73122, se abolían los efectos del cannabinoide sobre la corriente, quedando una pequeña fracción de bloqueo que correspondía al efecto directo sobre el canal Kv4.3 ejercido por el WIN55,212-2. La estimulación del receptor CB1, tanto en sistemas de expresión como en diferentes tejidos, produce un aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular a través de la activación de la proteína Gq/11 y de la PLC. (Lauckner y cols., 2005; McIntosh y cols., 2007). La activación de la PLC resulta en la hidrólisis del PIP2, dando lugar a los segundos mensajeros  $IP_3$  y DAG (Sugiura y cols., 1997; Mombouli y cols., 1999; De Petrocellis y cols., 2007). La producción de  $IP_3$  provoca la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los depósitos intracelulares (Berridge, 2009) y por su parte, el DAG activa la PKC (Nishizuka, 1992). Como se ha descrito en los resultados, aproximadamente la mitad del efecto producido por el WIN55,212-2 a través de la estimulación del receptor CB1, podía ser suprimido en presencia de BAPTA, un potente quelante de  $Ca^{2+}$  intracelular. Además, en nuestros experimentos, se ha comprobado que el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  producido por la activación de la PLC activaba la CaMKII, la cual era la responsable de parte de la inhibición de la  $I_{Kv4.3}$  producida por el WIN55,212-2 a través de la activación del receptor CB1. Se han relacionado multitud de quinasas que fosforilan las proteínas que forman los canales, modulando, de esta manera, las corrientes generadas a través de estos. En particular, la CaMKII parece ser crítica en la regulación de la  $I_{to1}$  cardíaca (Tessier y cols., 1999; Couchonnal y Anderson, 2008). La fosforilación del canal Kv4.3 por la CaMKII se podría producir en alguno de los tres residuos que se han descrito como sitios de fosforilación para dicha quinasas: la treonina 53 en el extremo N-terminal y las serinas 516 y 550 en el C-terminal (Sergeant y cols., 2005) (Figura V.1).

Parte del efecto del WIN55,212-2 sobre la  $I_{Kv4.3}$  registrada en células CHO-CB1, era consecuencia de la activación de la ruta DAG/PKC, ya que como pudimos observar, en presencia de inhibidores de esta quinasa (estaurosporina y queleritrina) ese efecto se abolía. Los posibles sitios consenso de fosforilación por PKC del canal Kv4.3 son las serinas 47, 164, 444, 499, 530 y 548 y/o las treoninas 53, 69, 100, 313, 504 y 588 (Van der Heyden y cols., 2006). El canal Kv4.3 tiene dos isoformas, una corta y otra larga. La forma larga tiene un inserto de 19 aminoácidos entre el residuo 489 y el 509 en el que se encuentran la S499 y la T504, dos de los doce sitios consenso de fosforilación por PKC (Figura V.1) (Kong y cols; 1998; Po y cols., 2001). Ambos sitios quedarían excluidos de ser los posibles sitios de fosforilación ya que el ADN que codifica para el canal Kv4.3 que nosotros transfectamos en las células CHO-CB1 es la forma corta.



**Figura V.1. Estructura y secuencia de aminoácidos de los canales humanos Kv4.3.** El extremo C-terminal corresponde a la versión larga del canal Kv4.3 (Kv4.3-L). Se muestran diversos sitios de fosforilación en la secuencia del canal y los sitios específicos para las serina/treonina quinasa, incluyendo la PKA (naranja), PKC (verde), PKG (morado); CaMKII (rojo) y ERK (amarillo). [Adaptada de Niwa y Nerbonne, 2010]

La inhibición simultánea de los dos mecanismos (inmovilización del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular con BAPTA e inhibición de la PKC con estaurosporina) abolía completamente el bloqueo del canal Kv4.3 producido por el WIN55,212-2 a través de la estimulación del receptor CB1. En estas condiciones se observaba un pequeño porcentaje de bloqueo del canal Kv4.3, que era igual al obtenido utilizando el inhibidor de la PLC, y que a su vez, era igual al porcentaje de bloqueo que el WIN55,212-2 ejercía de forma directa. Por tanto, estos datos sugieren que el WIN55,212-2, a través de la estimulación del receptor CB1, puede activar la PLC y que el consiguiente aumento de  $\text{IP}_3$  y DAG resulta en la inhibición de la  $I_{\text{Kv4.3}}$  a través de dos mecanismos puestos en marcha de forma simultánea e independiente: la activación de la PKC y de la CaMKII. Está ampliamente descrito que ambas quinasas pueden regular la  $I_{\text{to1}}$  y los canales Kv4.3 (Pucéat y cols., 1994; Nakamura y cols., 1997; Tessier y cols., 1999; Wang y cols., 2001a; Li y cols., 2006b; Van der Heyden y cols., 2006; Couchonnal y Anderson 2008; Niwa y Nerbonne, 2010). Por ejemplo la estimulación del receptor muscarínico M2 por el carbacol en miocitos de rata bloqueaba los canales Kv4.3 a través de su fosforilación por PKC, efecto que podía ser consecuencia de la activación previa de la PLC (Nakamura y cols., 1997). Existen datos previos en la literatura que demuestran la modulación de la  $I_{\text{to1}}$  mediante la activación simultánea de la PKC y de la CaMKII. De hecho, Wang y colaboradores describieron que la reducción que producía la fenilefrina a través de la estimulación de receptores adrenérgicos sobre la  $I_{\text{to1}}$  era consecuencia de la acción conjunta de la PKC y de la CaMKII (Wang y cols., 2001a).

### **3.3. Efectos del LPI y de la PEA mediados a través del receptor GPR55 sobre la $I_{\text{Kv4.3}}$ y la $I_{\text{to1}}$**

Se ha sugerido que en el aparato cardiovascular debe existir al menos otro receptor para cannabinoides diferente de CB1 y de CB2. El receptor que surgió como principal candidato fue el GPR55 (Baker y cols., 2006; Lauckner y cols., 2008; Waldeck-Weiermair y cols., 2008). Su ligando endógeno natural es el LPI aunque se ha descrito que también puede ser activado por otros compuestos como la AEA o la PEA (Sawzdargo y cols., 1999; Baker y cols., 2006; Oka y cols., 2007; Pertwee, 2007; Ryberg y cols., 2007). Como hemos visto anteriormente, el LPI y la PEA no son compuestos muy potentes para bloquear de forma directa los canales Kv4.3+KChIP2a, por lo que eran una herramienta óptima para poder estudiar los posibles efectos debidos a la estimulación del receptor GPR55.

La estimulación del receptor GPR55 mediante LPI o PEA inhibe la  $I_{Kv4.3}$ . Más aun, los efectos producidos por estos compuestos a través del receptor GPR55 son significativamente más marcados que los producidos de forma directa. Se han descrito resultados similares en células HEK-293 que expresaban el receptor GPR55 y el canal Kv7.2/Kv7.3 que genera la  $I_M$  neuronal. La estimulación del receptor por diferentes agonistas producía una mayor inhibición de la corriente que la que éstos producían en células que no expresaban el receptor GPR55 (Lauckner y cols., 2008). Sin embargo, aunque el LPI es un compuesto más potente para bloquear el canal Kv4.3 a través de la estimulación del receptor que de forma directa sobre el canal, también hay que destacar que la inhibición máxima de la corriente sólo alcanzaba el 40%.

El bloqueo que producen el LPI y la PEA sobre los canales Kv4.3 medido como la disminución de la  $Q_{Kv4.3}$  es muy similar. Además, ninguno de los dos compuestos modificó las constantes cinéticas de la inactivación de forma significativa, aunque en el caso de la PEA se apreciaba una tendencia hacia una aceleración de las constantes de tiempo, tanto del componente rápido como del lento, pero que no alcanzaba significación estadística. Se observó, en cambio, diferencias significativas en cuanto a la modificación que producen ambos compuestos sobre la dependencia de voltaje de la inactivación. Mientras que el LPI no modificaba los valores de  $V_h$  de la curva de inactivación, la PEA desplazaba la curva de inactivación hacia potenciales más negativos de forma significativa.

Los resultados obtenidos en sistemas heterólogos de expresión no se pudieron reproducir en las células nativas, motivo por el cual, los efectos sobre la  $I_{Kv4.3}$  mediados a través del receptor GPR55 no fueron analizados en mayor profundidad. La relación entre el grado de ocupación del receptor y la respuesta del agonista puede depender de la densidad del receptor en la membrana. Cuanto mayor sea el nivel de expresión, menor nivel de ocupación se necesitaría para producir una respuesta determinada, asumiendo que los niveles de todos los intermediarios no estuviesen limitados. Al analizar la expresión del receptor GPR55 en muestras de pacientes en RS y con FA pudimos comprobar que está más expresado en muestras procedentes de pacientes con FA. Sería necesario, por tanto, realizar experimentos en miocitos de pacientes con FA para comprobar si los efectos son diferentes de los obtenidos en miocitos procedentes de pacientes en RS y poder relacionarlo así, con un aumento de la expresión del receptor.

#### **4. Implicaciones clínicas de los resultados**

Las acciones cardiovasculares de los endocannabinoides son complejas y muy variadas. Se han descrito efectos sobre la vasculatura, el miocardio y el sistema nervioso autónomo (Pacher y cols., 2005b y 2006, Li y cols., 2009b). Los efectos mediados a través de la interacción de los endocannabinoides con sus receptores sobre el aparato cardiovascular (descenso de la presión arterial, contractilidad y frecuencia cardíacas) han sido descritos extensamente (Pacher y cols., 2005a y b, 2006). Por otra parte, se han descrito efectos directos de estos compuestos sobre la excitabilidad neuronal (Venance y cols., 1995), la modulación del dolor (Wiley y cols., 2006) y la función cardiovascular (Pacher y cols., 2005b, 2006). En este sentido, la AEA puede modular canales iónicos, activar receptores vanilloides y actuar sobre otras dianas (Pacher y cols., 2005b; Oz, 2006). Sin embargo, se conoce muy poco sobre sus efectos cardíacos, particularmente sobre la actividad eléctrica.

##### **4.1. El SCE en diferentes situaciones patológicas**

Se ha descrito que en diversas situaciones patológicas se produce un aumento de la síntesis de endocannabinoides y/o de la expresión de sus receptores (Varga y cols., 1998; Wang y cols., 2001b, Pertwee 2005b; Naccarato y cols., 2010; Miller y Devi, 2011). Los endocannabinoides y sus análogos pueden ser sintetizados en el corazón (Pacher y cols, 2005, 2006) y por ello, en diferentes artículos se ha propuesto que en determinadas patologías del aparato cardiovascular, podría ocurrir lo mismo. En miocardio y aorta de rata se vio un aumento de expresión del receptor CB1 en animales hipertensos en los cuales la AEA provocaba una disminución de la presión arterial, la contractilidad y las resistencias vasculares (Lake y cols., 1997; Bátkai y cols., 2004b). Asimismo, se ha descrito que los receptores CB2 estaban más expresados en plaquetas ateroscleróticas de rata y humano que en sus respectivos controles (Steffens y cols., 2005), en diferentes cánceres en humanos existe un aumento en la expresión de receptores CB (Sarfaraz y cols., 2008) y en tejido adiposo de ratas Zucker obesas hay un aumento en la expresión de los receptores CB1 (Bensaid y cols., 2003). Incluso se ha descrito recientemente que el receptor GPR55 está más expresado en tejido adiposo de pacientes obesos y con diabetes tipo 2 que en sujetos no obesos (Moreno-Navarrete y cols., 2012).

Por otra parte, se ha descrito que un aumento en los niveles de 2-AG produce una disminución de la placa de ateroma en arterias coronarias de ratones a través de la activación

del receptor CB2 (Steffens y cols., 2005) y que además, ese aumento, tiene efectos protectores frente a la isquemia miocárdica y la hipoxia en ratas (Joyeux y cols., 2002; Shmist y cols., 2006). En humanos, se ha descrito un aumento de los niveles de AEA y 2-AG en pacientes con infarto agudo de miocardio o en condiciones de isquemia/reperfusión (Wang y cols., 2011). Estos cambios en los niveles de endocannabinoides tendrían efectos cardioprotectores debido a su acción sobre los receptores CB (Wang y cols., 2011). También se ha visto que los niveles en suero de AEA y 2-AG están aumentados en pacientes que han sufrido shock endotóxico (Wang y cols., 2001b).

Otro ejemplo importante es la participación del SCE en la génesis de la obesidad y en la del síndrome metabólico (SM) (Ravinet y cols., 2003; Di Marzo y Petrosino, 2007; Mouslech y Valla, 2009). En España, 1 de cada 2 adultos tiene sobrepeso, el 16% son obesos (Devaux y Sassi, 2012) y un 31% de la población presenta SM (Fernández-Bergés y cols., 2012). La relación entre la obesidad y el riesgo de desarrollar diversas enfermedades cardiovasculares ha sido bien estudiada en múltiples estudios epidemiológicos (Stern, 1995; Rexrode y cols., 1996; Arone, 2001; Chaput y cols., 2005; Anand y cols., 2008; Mattioli, 2011). De hecho, se ha descrito que un aumento en los niveles plasmáticos de endocannabinoides (que están aumentados en pacientes obesos respecto a sus controles) (Pertwee, 2005b; Di Marzo y Petrosino, 2007, Matias y cols., 2006; Côté y cols., 2007; Aronne e Isoldi, 2007), se correlacionaba con un mayor riesgo de eventos cardiovasculares (Côté y cols., 2007; Hiley, 2009; Quercioli y cols., 2011), por lo que una de las nuevas estrategias que se propuso en el tratamiento de la obesidad fue la modulación del SCE. Además, la obesidad y el SM son un factor de riesgo asociado a patologías que aumentan la incidencia de FA (p.ej. HTA, cardiopatía isquémica, diabetes, insuficiencia cardíaca) así como a la propia FA (Fuster y cols., 2006; Wang y cols., 2004; Dublin y cols., 2006; Nicolaou y cols., 2007; Wanahita y cols., 2008; Watanabe y cols., 2008b; Zacharias y cols., 2005). En 2008 se llevó a cabo un meta-análisis de 16 estudios que incluían 123.249 pacientes y demostró que el sobrepeso y la obesidad aumentaban el riesgo de FA en un 39% y en un 87%, respectivamente (Wanahita y cols., 2008). Ello ha llevado a proponer que una reducción del peso corporal podría asociarse a una menor incidencia de FA (Wang y cols., 2004; Wanahita y cols., 2008).

#### **4.2. Modulación del SCE en la FA**

Los endocannabinoides y sus análogos pueden ser sintetizados en el corazón (Pacher y cols., 2005a y b, 2006). Éstos no se almacenan sino que son producidos “a demanda”, estando

su síntesis estimulada en situaciones de daño tisular (Pacher y cols, 2006). Parece razonable asumir que, de forma análoga, en el miocardio, la síntesis de estos compuestos aumentase en situaciones de taquiarritmias auriculares como la FA, en la que se produce inflamación, estrés oxidativo, fibrosis intersticial y apoptosis (Kourliouros y cols., 2009). Además la FA se caracteriza por la presencia en el electrocardiograma de una actividad auricular rápida (>400 latidos/min) de amplitud variable y una respuesta ventricular irregular y se ha demostrado que la síntesis de endocannabinoides, en tejido nervioso, aumenta al estimularlo a altas frecuencias y al aumentar la  $[Ca^{2+}]_i$ , (Pacher y cols., 2006), condiciones que también están asociadas a la FA (Kourliouros y cols., 2009) y que podrían, por tanto, relacionarse con un aumento en la síntesis de endocannabinoides.

La FA es la arritmia con mayor prevalencia (hasta un 9% en los mayores de 80 años) y la que más hospitalizaciones y gastos sanitarios origina (Fuster y cols., 2006). Además de la sintomatología propia de la arritmia, la FA aumenta la incidencia de insuficiencia cardiaca y de tromboembolismos e ictus (5.3% vs 0.8% en pacientes tratados con antiagregantes y anticoagulantes) y duplica la mortalidad (Fuster y cols., 2006, Hart y Halperin, 2001). La FA, *per se*, altera/remodela las propiedades electrofisiológicas del tejido auricular, produciendo un acortamiento no uniforme de la DPA y del periodo refractario auricular que es secundario a cambios en la expresión de los canales que participan en la repolarización auricular (Fuster y cols., 2006, Tamargo y cols., 2004a; Nattel y cols., 2007). Este remodelado eléctrico promueve el mantenimiento y recurrencia de la arritmia y es responsable de la pérdida de efectividad de los fármacos antiarrítmicos clásicos cuando la arritmia persiste más de 72 horas.

En esta Tesis Doctoral se ha descrito por primera vez un aumento de la expresión de los receptores CB1, CB2 y GPR55 en tejido cardiaco auricular de pacientes con FAc con respecto a aquellos que permanecían en RS. Anteriormente se había descrito que un aumento de la expresión de los receptores CB1 en el corazón se relacionaba con un aumento en la lipogénesis que contribuiría a la formación ectópica de grasa en este órgano (Osei-Hyiaman y cols., 2005), que es *per se* un factor de riesgo independiente de eventos cardiovasculares (Montani y cols., 2004; Kankaanpää y cols., 2006). De igual forma, se ha descrito, que la FA produce cambios en la expresión de diferentes receptores presentes en el miocardio, como el receptor de angiotensina II tipo I (Boldt y cols., 2003), los receptores muscarínicos (Yeh y cols., 2007) o de forma más reciente, los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (de la Fuente y cols., 2012), por lo que es posible que el aumento de la expresión de los receptores CB1, CB2 y GPR55 podría formar parte del complejo remodelado que induce la FA. Por tanto, los datos

sugieren una implicación directa del SCE en la FA, por lo que la modulación de este sistema podría representar una nueva estrategia en el abordaje de la FA, particularmente, en pacientes obesos o con sobrepeso.

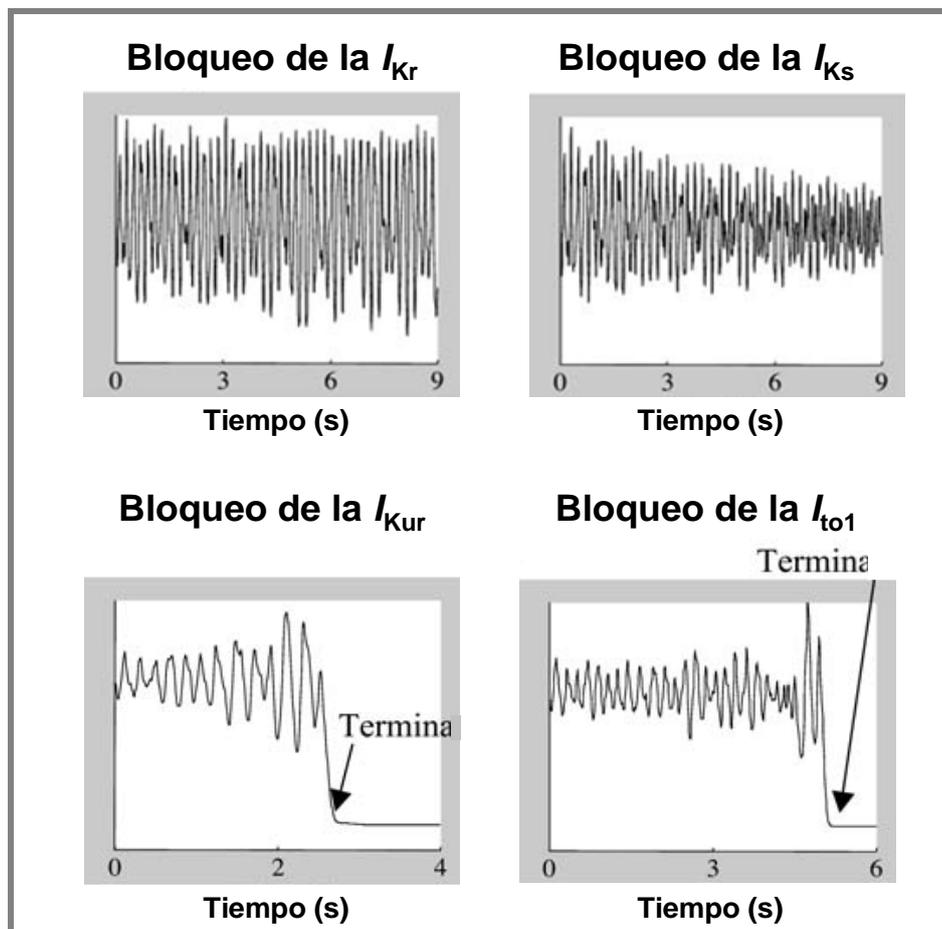
#### 4.3. Implicaciones de la inhibición de la $I_{to1}$ en pacientes con FA

En el presente estudio, se demuestra por primera vez, que los endocannabinoides a concentraciones dentro del rango micromolar bajo ( $\approx 0.5 \mu\text{M}$ ), bloquean de forma directa los canales cardiacos humanos  $Kv4.3$  así como la corriente nativa  $I_{to1}$ . Además, la estimulación de los receptores CB1 y GPR55 también inhibe, y de forma más potente la  $I_{Kv4.3}$  y la  $I_{to1}$ . Los estudios de desplazamiento de radioligandos indican que los valores de  $K_i$  de la AEA y del 2-AG están comprendidos entre 31-543 nM y 58-519 nM, respectivamente para los receptores CB1 y que los del LPI y de la PEA oscilan entre 4nM y 1.2  $\mu\text{M}$  para los receptores GPR55 (Ryberg y cols., 2007; Kapur y cols., 2009). Sin embargo, es muy difícil establecer un rango de concentraciones fisiológicas para los endocannabinoides, ya que son sustancias muy lipofílicas que se sintetizan y acumulan en las membranas celulares.

La  $I_{to1}$  juega un papel determinante en el mantenimiento de la amplitud y de la duración de la fase de meseta del PA auricular cardiaco humano. La potente inhibición de la  $I_{Kv4.3}$  producida por los endocannabinoides debería ser considerada para tratar de entender los posibles efectos del SCE sobre la electrofisiología cardiaca.

Hasta hace poco tiempo, se creía que prolongar la duración de la parte final del PA bloqueando las corrientes  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$  era la mejor estrategia terapéutica en el tratamiento de la FA. De esta forma, el periodo refractario se prolongaría y, con ello, cesaría la reentrada del impulso en el miocardio porque el frente de onda que estaba avanzando sobre la cola de refractariedad se encontraría ahora con tejido inexcitable (Allessie y cols., 1973). Tanto los datos clínicos como los experimentales, han demostrado que esta estrategia basada en la prolongación de la longitud de onda ( $LO = \text{velocidad de conducción} \times \text{periodo refractario}$ ) es totalmente ineficiente en la FA (Cosío y Delpón, 2002). Los estudios de mapeo óptico con colorantes potenciométricos, han llevado a la demostración de que los frentes que invaden el miocardio son curvos, de tal forma que giran en torno a un punto estacionario (pivote) de forma similar a un vórtice o rotor. Los modelos matemáticos sobre la dinámica de estas fuentes de reentrada sostenida de alta frecuencia o rotores propuestos por el Dr. Jalife y Nattel han demostrado que es el bloqueo de las corrientes que determinan la fase de meseta del PA auricular, la  $I_{to1}$  y la  $I_{Kur}$ , lo que hace que el rotor que genera la arritmia se extinga (Figura

V.2) con mínimos efectos sobre la repolarización ventricular (Blaauw y cols., 2004; Burashnikov y cols., 2004; Wettwer y cols., 2004).



**Figura V.2.** Efecto sobre los rotores del bloqueo de corrientes de  $K^+$ . Actividad de los rotores registrada en un pseudo-ECG cuando se bloquean individualmente las principales corrientes de salida de  $K^+$ :  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{Kur}$  e  $I_{to1}$ . [Adaptada de Pandit y cols., 2005]

La potente inhibición de la  $I_{to1}$  producida por la AEA y otros endocannabinoides descrita en esta Tesis Doctoral podría aumentar la duración de la fase de meseta del PA auricular humano, efectos que, como se ha comentado, han sido propuestos como críticos para el cese de las fuentes de reentrada sostenida de alta frecuencia (rotores), que pueden ser responsables de la FA (Pandit y cols., 2005).



## **VI. CONCLUSIONES**



En la presente Tesis Doctoral hemos analizado los efectos de los endocannabinoides y sus análogos sobre los canales Kv4.3 expresados en células CHO y en células CHO que expresaban de forma estable los receptores CB1 y GPR55, y sobre la corriente nativa  $I_{to1}$  registrada en miocitos auriculares humanos. Además hemos analizado la expresión de los receptores CB en tejido auricular de pacientes con FAc y en RS, así como la ruta intracelular por la que el WIN55,212-2 ejerce sus efectos a través de la estimulación del receptor CB1. De los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1) Los endocannabinoides AEA y 2-AG, así como el análogo no hidrolizable de la AEA, la MetAEA inhiben, de una forma independiente de receptor, la corriente cardíaca  $I_{to1}$  registrada en miocitos auriculares humanos, así como la corriente generada por el canal Kv4.3. Sin embargo, los endocannabinoides PEA y LPI son menos potentes para inhibir la  $I_{to1}$  y la  $I_{Kv4.3}$  que los primeros.

2) El bloqueo que producen los endocannabinoides sobre el canal Kv4.3+KChIP2a es consecuencia de su interacción directa con la subunidad alfa-Kv4.3 que forma el poro del canal.

3) El posible sitio de unión de los endocannabinoides está situado en la parte externa de la subunidad alfa-Kv4.3, quedando descartado que los efectos sean debidos a uniones a diferentes proteínas auxiliares o a perturbaciones en la membrana celular.

4) Los receptores CB1, CB2 y GPR55 se expresan en tejido cardíaco auricular. La FAc aumenta la expresión de los tres receptores, siendo este aumento más marcado en el caso de los receptores GPR55.

5) La estimulación de los receptores CB1 inhibe la  $I_{Kv4.3}$  y la corriente nativa  $I_{to1}$  registrada en miocitos auriculares humanos, siendo este efecto más marcado que el que ejercen los endocannabinoides estudiados de forma directa sobre el canal.

6) La estimulación de los receptores GPR55 inhibe la  $I_{Kv4.3}$  en sistemas heterólogos pero no modifica la  $I_{to1}$  registrada en miocitos auriculares humanos.

7) La inhibición de la  $I_{Kv4.3}$  producida por la estimulación del receptor CB1 es consecuencia de la activación de la PLC, que en último término activa la PKC y la CaMKII. Ambas quinasas interaccionarían con distintos sitios de la proteína del canal Kv4.3 modulando la corriente generada a través del mismo.

Por todo ello proponemos que los endocannabinoides podrían actuar como moduladores de los canales Kv4.3, responsables de la génesis de la corriente cardíaca humana  $I_{to1}$  y, por tanto, modular la morfología del PA auricular. Este efecto podría ser de particular importancia en aquellas situaciones en las que la síntesis de endocannabinoides se vea aumentada o en las que se produzca un aumento de la expresión de los receptores CB como ocurre en el caso de la FA.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



- Abadji V, Lin S, Taha G, Griffin G, Stevenson LA, Pertwee RG, Makriyannis A. (R)-methanandamide: a chiral novel anandamide possessing higher potency and metabolic stability. *J Med Chem* 1994; **37**:1889-93.
- 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.
- Abriel H. Cardiac sodium channel  $Na_v1.5$  and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**:2-11.
- Accili EA, Kiehn J, Yang Q, Wang Z, Brown AM, Wible BA. Separable  $Kv\beta$  subunit domains alter expression and gating of potassium channels. *J Biol Chem* 1997; **272**:25824-25831.
- Aimond F, Kwak SP, Rhodes KJ, Nerbonne JM. Accessory  $Kv\beta 1$  subunits differentially modulate the functional expression of voltage-gated  $K^+$  channels in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 2005; **96**:451-8.
- Aldhoon B, Melenovský V, Peichl P, Kautzner J. New insights into mechanisms of atrial fibrillation. *Physiol Res* 2010; **59**:1-12
- Aldrich RW, Corey DP, Stevens CF. A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. *Nature* 1983; **306**:436-41.
- Aldrich RW. Fifty years of inactivation. *Nature* 2001; **411**:643-4.
- Aliot E, Capucci A, Crijns HJ, Goette A, Tamargo J. Twenty-five years in the making: flecainide is safe and effective for the management of atrial fibrillation. *Europace* 2011; **13**:161-73
- Allessie MA, Lammers WJEP, Bonke FIM, Hollen J. Experimental evaluation of Moe's multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. En: *Cardiac electrophysiology and arrhythmias*. Zipes DP, Jalife J (Eds.) 1985; 265-276.
- Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kléber AG, Lab MJ, Legato MJ, Rosen MR, Schwartz PJ, Spooner PM, Van Wagoner DR, Waldo AL. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation* 2001; **103**:769-77
- Allessie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodelling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002; **54**:230-246.
- Alonso G, Widmer H. Clustering of  $Kv4.2$  potassium channels in postsynaptic membrane of rat supraoptic neurons: an ultrastructural study. *Neuroscience* 1997; **77**:617-21.
- Amarillo Y, De Santiago-Castillo JA, Dougherty K, Maffie J, Kwon E, Covarrubias M, Rudy B. Ternary  $Kv4.2$  channels recapitulate voltage-dependent inactivation kinetics of A-type  $K^+$  channels in cerebellar granule neurons. *J Physiol* 2008; **586**:2093-106.
- Amin AS, Asghari-Roodsari A, Tan HL. Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Arch* 2010; **460**:223-37.
- Amorós I, Jiménez-Jáimez J, Tercedor L, Barana A, Gómez R, de la Fuente MG, Dolz-Gaitón P, Alvarez M, Martínez-Espín E, Lorente JA, Melgares R, Tamargo J, Delpón E, Caballero R. Functional effects of a missense mutation in HERG associated with type 2 long QT syndrome. *Heart Rhythm* 2011; **8**:463-70.
- Amos GJ, Wettwer E, Metzger F, Li Q, Himmel HM, Ravens U. Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol* 1996; **491**:31-50.
- An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 2000; **403**:553-6.
- Anand RG, Peters RW, Donahue TP. Obesity and dysrhythmias. *J Cardiometab Syndr* 2008; **3**:149-54.
- Andersen OS, Bruno MJ, Sun H, Koeppe RE 2<sup>nd</sup>. Single-molecule methods for monitoring changes in bilayer elastic properties. *Methods Mol Biol* 2007; **400**:543-70.
- Antz C, Fakler B. Fast Inactivation of Voltage-Gated  $K^+$  Channels: From Cartoon to Structure. *News Physiol Sci* 1998; **13**:177-182.
- Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH, Lukas A, Krishnan SC, Di Diego JM, Gintant GA, Liu DW. Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ Res* 1991; **69**:1427-49.
- Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, Casis O, Sanguinetti MC, Aizawa Y, Guerchicoff A, Pfeiffer R, Oliva A, Wollnik B, Gelber P, Bonaros EP Jr, Burashnikov E, Wu Y, Sargent JD, Schickel S, Oberheiden R, Bhatia A, Hsu LF, Haïssaguerre M, Schimpf R, Borggrefe M, Wolpert C. Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-

- segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* 2007; **115**:442-9.
- Anumonwo JM, Lopatin AN. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**:45-54.
- Apkon M, Nerbonne JM. Alpha 1-adrenergic agonists selectively suppress voltage-dependent K<sup>+</sup> current in rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**:8756-60.
- Apkon M, Nerbonne JM. Characterization of two distinct depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1991; **97**:973-1011.
- Armstrong CM, Bezanilla F. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 1973; **242**:459-61.
- Armstrong CM. Ionic pores, gates, and gating currents. *Q Rev Biophys* 1974; **7**:179-210.
- Armstrong CM. Sodium channel and gating currents. *Physiol Rev* 1981; **61**:644-682.
- Aronne LJ. Treating obesity: a new target for prevention of coronary heart disease. *Prog Cardiovasc Nurs* 2001; **16**:98-106, 115.
- Aronne LJ, Isoldi KK. Cannabinoid-1 receptor blockade in cardiometabolic risk reduction: efficacy. *Am J Cardiol* 2007; **100**:18P-26P.
- Ashton JC, Smith PF. Cannabinoids and cardiovascular disease: the outlook for clinical treatments. *Curr Vasc Pharmacol* 2007; **5**:175-85.
- Atrial Fibrillation Investigators. Risk factors for stroke and efficacy of antithrombotic therapy in atrial fibrillation. Analysis of pooled data from five randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 1994; **154**:1449-1457
- Ausma J, Wijffels M, Thoné F, Wouters L, Allessie M, Borgers M. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation* 1997; **96**:3157-63.
- Aviles RJ, Martin DO, Apperson-Hansen C, Houghtaling PL, Rautaharju P, Kronmal RA, Tracy RP, Van Wagener DR, Psaty BM, Lauer MS, Chung MK. Inflammation as a risk factor for atrial fibrillation. *Circulation* 2003; **108**:3006-10.
- Bachur NR, Masek K, Melmon KL, Udenfriend S. Fatty acid amides of ethanolamine in mammalian tissues. *J Biol Chem* 1965; **240**: 1019-1024.
- Bähring R, Milligan CJ, Vardanyan V, Engeland B, Young BA, Dannenberg J, Waldschutz R, Edwards JP, Wray D, Pongs O. Coupling of voltage-dependent potassium channel inactivation and oxidoreductase active site of Kvβ subunits. *J Biol Chem* 2001; **276**:22923-9.
- Baker D, Pryce G, Giovannoni G, Thompson AJ. The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol* 2003; **2**:291-8.
- Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 2006; **27**:1-4.
- Balser JR, Nuss HB, Romashko DN, Marban E, Tomaselli GF. Functional consequences of lidocaine binding to slow-inactivated sodium channels. *J Gen Physiol* 1996; **107**:643-58.
- Balser JR. The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 2001; **33**:599-613.
- Barana A, Amorós I, Caballero R, Gómez R, Osuna L, Lillo MP, Blázquez C, Guzmán M, Delpón E, Tamargo J. Endocannabinoids and cannabinoid analogues block cardiac hKv1.5 channels in a cannabinoid receptor-independent manner. *Cardiovasc Res* 2010; **85**:56-67.
- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. KvLQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I<sub>Ks</sub> cardiac potassium current. *Nature* 1996; **384**:78-80.
- Barry DM, Xu H, Schuessler RB, Nerbonne JM. Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4 α subunit. *Circ Res* 1998; **83**:560-567.
- Baruscotti M, Barbuti A, Bucchi A. The cardiac pacemaker current. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**:55-64.
- Bátkai S, Járαι Z, Wagner JA, Goparaju SK, Varga K, Liu J, Wang L, Mirshahi F, Khanolkar AD, Makriyannis A, Urbaschek R, Garcia N Jr, Sanyal AJ, Kunos G. Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med* 2001; **7**:827-32.
- Bátkai S, Pacher P, Járαι Z, Wagner JA, Kunos G. Cannabinoid antagonist SR-141716 inhibits endotoxic hypotension by a cardiac mechanism not involving CB1 or CB2 receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004a; **287**:H595-600.

- Bátkai S, Pacher P, Osei-Hyiaman D, Radaeva S, Liu J, Harvey-White J, Offertáler L, Mackie K, Rudd MA, Bukoski RD, Kunos G. Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. *Circulation* 2004b; **110**:1996-2002.
- Bátkai S, Pacher P. Endocannabinoids and cardiac contractile function: pathophysiological implications. *Pharmacol Res* 2009; **60**:99-106.
- Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Barg J, Mechoulam R, Vogel Z. The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Lett* 1995; **375**:143-7.
- Bean BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 1989; **51**:367-84.
- Beechem JM. Global analysis of biochemical and biophysical data. *Methods Enzymol* 1992; **210**:37-54.
- Beeler GW, Reuter H. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibers. *J Physiol* 1977; **268**:177-210.
- Begg M, Mo FM, Offertáler L, Bátkaí S, Pacher P, Razdan RK, Lovinger DM, Kunos G. G protein-coupled endothelial receptor for atypical cannabinoid ligands modulates a Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> current. *J Biol Chem* 2003; **278**:46188-94.
- Begg M, Pacher P, Bátkaí S, Osei-Hyiaman D, Offertáler L, Mo FM, Liu J, Kunos G. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther* 2005; **106**:133-45.
- Bellocchio L, Cervino C, Pasquali R, Pagotto U. The endocannabinoid system and energy metabolism. *J Neuroendocrinol* 2008; **20**:850-7.
- Bellocq C, van Ginneken AC, Bezzina CR, Alders M, Escande D, Mannens MM, Baro I, Wilde AA. Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation* 2004; **109**:2394-2397.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 1997; **277**:1094-7.
- Beltramo M, Piomelli D. Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Neuroreport* 2000; **11**:1231-5.
- Ben Amar M. Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *J Ethnopharmacol* 2006; **105**:1-25.
- Ben Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, Bisogno T, Di Marzo V, Mechoulam R. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol* 1998; **353**:23-31.
- Ben-Zeev G, Telias M, Nussinovitch I. Lysophospholipids modulate voltage-gated calcium channel currents in pituitary cells; effects of lipid stress. *Cell Calcium* 2010; **47**:514-24.
- Bendahhou S, Marionneau C, Hurogne K, Larroque MM, Derand R, Szuts V, Escande D, Demolombe S, Barhanin J. In vitro molecular interactions and distribution of KCNE family with KCNQ1 in the human heart. *Cardiovasc Res* 2005; **67**:529-38.
- Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1998; **98**:946-52.
- Benndorf K, Markwardt F, Nilius B. Two types of transient outward currents in cardiac ventricular cells of mice. *Pflügers Arch* 1987; **409**:641-643.
- Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A, Maffrand JP, Le Fur G, Oury-Donat F, Soubrié P. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 2003; **63**:908-14.
- Berenfeld O, Zaitsev AV, Mironov SF, Pertsov AM, Jalife J. Frequency-dependent breakdown of wave propagation into fibrillatory conduction across the pectinate muscle network in the isolated sheep right atrium. *Circ Res* 2002; **90**:1173-1180.
- Berger M, Schweitzer P. Timing of thromboembolic events after electrical cardioversion of atrial fibrillation or flutter: a retrospective analysis. *Am J Cardiol* 1998; **82**: 1545-1547.
- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1793**:933-40.
- Bers DM, Pérez-Reyes E. Ca<sup>2+</sup> channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca<sup>2+</sup> influx and intracellular Ca<sup>2+</sup> release. *Cardiovasc Res* 1999; **42**:339-360.
- Bertaso F, Sharpe CC, Hendry BM, James AF. Expression of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human atrium. *Basic Res Cardiol* 2002; **97**:424-433.

- Berul CI, Morad M. Regulation of potassium channels by nonsedating antihistamines. *Circulation* 1995; **91**:2220-5.
- Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E. Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993; **73**:379-85.
- Bezánilla F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 2000; **80**:555-92.
- Bezánilla F. Voltage sensor movements. *J Gen Physiol* 2002; **120**:465-73.
- Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, De Waard M. The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha 1$  subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the  $\beta$ -subunit. *Neuron* 2000; **25**:177-90.
- Bidaud I, Lory P. Hallmarks of the channelopathies associated with L-type calcium channels: A focus on the Timothy mutations in Ca<sub>v</sub>1.2 channels. *Biochimie* 2011; **93**:2080-6.
- Bisogno T, MacCarrone M, De Petrocellis L, Jarranian A, Finazzi-Agrò A, Hillard C, Di Marzo V. The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem* 2001; **268**:1982-9.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 2003; **163**:463-8.
- Bjerregaard P, Gussak I. Short QT syndrome: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005; **2**:84-87.
- Blaauw Y, Gögelein H, Tieleman RG, van Hunnik A, Schotten U, Allessie MA. "Early" class III drugs for the treatment of atrial fibrillation: efficacy and atrial selectivity of AVE0118 in remodeled atria of the goat. *Circulation* 2004; **110**:1717-24.
- Bodi I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA, Schwartz A. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest* 2005; **115**:3306-17.
- Boldt A, Wetzel U, Weigl J, Garbade J, Lauschke J, Hindricks G, Kottkamp H, Gummert JF, Dhein S. Expression of angiotensin II receptors in human left and right atrial tissue in atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; **42**:1785-92.
- Bondarenko A, Waldeck-Weiermair M, Naghdi S, Poteser M, Malli R, Graier WF. GPR55-dependent and -independent ion signalling in response to lysophosphatidylinositol in endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2010; **161**:308-20.
- Bondarenko AI, Malli R, Graier WF. The GPR55 agonist lysophosphatidylinositol acts as an intracellular messenger and bidirectionally modulates Ca<sup>2+</sup>-activated large-conductance K<sup>+</sup> channels in endothelial cells. *Pflugers Arch* 2011; **461**:177-89.
- Bonhaus DW, Chang LK, Kwan J, Martin GR. Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; **287**:884-8.
- Bonz A, Laser M, Küllmer S, Kniesch S, Babin-Ebell J, Popp V, Ertl G, Wagner JA. Cannabinoids acting on CB1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; **41**:657-64.
- Bosch RF, Gaspo R, Busch AE, Lang HJ, Li GR, Nattel S. Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 1998; **38**:441-50.
- Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Köhlikamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999; **44**:121-31.
- Bouaboula M, Rinaldi M, Carayon P, Carillon C, Delpech B, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur J Biochem* 1993; **214**:173-80.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrié B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 1995; **312**:637-41.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrié B, Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Le Fur G, Casellas P. Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem* 1996; **237**:704-11.
- Bouaboula M, Bianchini L, McKenzie FR, Pouyssegur J, Casellas P. Cannabinoid receptor CB1 activates the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE-1 isoform via Gi-mediated mitogen activated protein kinase

- signaling transduction pathways. *FEBS Lett* 1999; **449**:61-5.
- Bouchard JF, Lépiciier P, Lamontagne D. Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sci* 2003; **72**:1859-70.
- Boutjdir M, Le Heuzey JY, Lavergne T, Chauvaud S, Guize L, Carpentier A, Peronneau P. Inhomogeneity of cellular refractoriness in human atrium: factor of arrhythmia? *Pacing Clin Electrophysiol* 1986; **9**:1095-1100.
- Bowditch H. Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskel fagern des Herzens zeigen. *Arb Physiol Anstalt* 1871; **6**:139-176.
- Boyden PA, Tilley LP, Pham TD, Liu SK, Fenoglio JJ Jr, Wit AL. Effects of left atrial enlargement on atrial transmembrane potentials and structure in dogs with mitral valve fibrosis. *Am J Cardiol* 1982; **49**:1896-1908.
- Boyett MR. A study of the effect of the rate of stimulation on the transient outward current in the sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1981; **319**:1-22.
- Boyle WA, Nerbonne JM. Two functionally distinct 4-aminopyridine-sensitive outward  $K^+$  currents in rat atrial myocytes. *J Gen Physiol* 1992; **100**:1041-1067.
- Brehm P, Eckert R. Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in Paramecium. *Science* 1978; **202**:1203-6.
- Breitwieser GE, Szabo G. Mechanism of muscarinic receptor-induced  $K^+$  channel activation as revealed by hydrolysis-resistant GTP analogues. *J Gen Physiol* 1988; **91**:469-493.
- Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol* 2001; **60**:155-63.
- Brendel J, Peukert S. Blockers of the Kv1.5 channels for treatment of atrial arrhythmias. *Exp Opin Ther Pat* 2002; **12**:1589-1598.
- Brown AM, Lee KS, Powell T. Sodium current in single rat heart muscle cells. *J Physiol* 1981; **318**:479-500.
- Brown SM, Wager-Miller J, Mackie K. Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1576**:255-64.
- Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 2007; **152**:567-75.
- Brugada R, Hong K, Dumaine R, Cordeiro J, Gaita F, Borggrefe M, Menendez TM, Brugada J, Pollevick GD, Wolpert C, Burashnikov E, Matsuo K, Wu YS, Guerchicoff A, Bianchi F, Giustetto C, Schimpf R, Brugada P, Antzelevitch C. Sudden death associated with short QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation* 2004; **109**:30-35.
- Bruins P, te Velthuis H, Yazdanbakhsh AP, Jansen PG, van Hardevelt FW, de Beaumont EM, Wildevuur CR, Eijssman L, Trouwborst A, Hack CE. Activation of the complement system during and after cardiopulmonary bypass surgery: postsurgery activation involves C-reactive protein and is associated with postoperative arrhythmia. *Circulation* 1997; **96**:3542-8.
- Brundel BJ, van Gelder IC, Henning RH, Tuinenburg AE, Deelman LE, Tieleman RG, Grandjean JG, van Gilst WH, Crijns HJ. Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999; **42**:443-54.
- Brundel BJ, Van Gelder IC, Henning RH, Tieleman R, Tuinenburg AE, Wietses M, Grandjean J, Van Gilst WH, Crijns H. Ion channel remodeling is related to intraoperative atrial effective refractory periods in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Circulation* 2001; **103**: 684-690
- Bruno MJ, Koeppe RE 2nd, Andersen OS. Docosahexaenoic acid alters bilayer elastic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**:9638-43.
- Buraei Z, Yang J. The  $\beta$  subunit of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. *Physiol Rev* 2010; **90**:1461-506.
- Burashnikov A, Mannava S, Antzelevitch C. Transmembrane action potential heterogeneity in the canine isolated arterially perfused right atrium: effect of  $I_{Kr}$  and  $I_{Kur}/I_{to}$  block. *Am J Physiol* 2004; **286**:H2393-H2400.
- Burashnikov E, Pfeiffer R, Barajas-Martinez H, Delpón E, Hu D, Desai M, Borggrefe M, Haïssaguerre M, Kanter R, Pollevick GD, Guerchicoff A, Laiño R, Marieb M, Nademanee K, Nam GB, Robles R, Schimpf R, Stapleton DD, Viskin S, Winters S, Wolpert C, Zimmermann S, Veltmann C, Antzelevitch C. Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm* 2010; **7**:1872-82.

- Busch AE, Busch GL, Ford E, Suessbrich H, Lang HJ, Greger R, Kunzelmann K, Attali B, Stuhmer W. The role of Isk protein in the specific pharmacological properties of the  $I_{Ks}$  channel complex. *Br J Pharmacol* 1997; **122**:187-189.
- Caballero R, Moreno I, González T, Valenzuela C, Tamargo J, Delpón E. Putative binding sites for benzocaine on a human cardiac cloned channel (Kv1.5). *Cardiovasc Res* 2002; **56**:104-117.
- Caballero R, Moreno I, González T, Arias C, Valenzuela C, Delpón E, Tamargo J. Spironolactone and its main metabolite, canrenoic acid, block human ether-a-go-go-related gene channels. *Circulation* 2003; **107**:889-895.
- Caballero R, Gómez R, Moreno I, Núñez L, González T, Arias C, Guízy M, Valenzuela C, Tamargo J, Delpón E. Interaction of angiotensin II with the angiotensin type 2 receptor inhibits the cardiac transient outward potassium current. *Cardiovasc Res* 2004a; **62**:86-95.
- Caballero R, Gómez R, Núñez L, Moreno I, Tamargo J, Delpón E. Diltiazem inhibits hKv1.5 and Kv4.3 currents at therapeutic concentrations. *Cardiovasc Res* 2004b; **64**:457-66.
- Caballero R, de la Fuente MG, Gómez R, Barana A, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Osuna L, Almendral J, Atienza F, Fernández-Avilés F, Pita A, Rodríguez-Roda J, Pinto A, Tamargo J, Delpón E. In humans, chronic atrial fibrillation decreases the transient outward current and ultrarapid component of the delayed rectifier current differentially on each atria and increases the slow component of the delayed rectifier current in both. *J Am Coll Cardiol* 2010a; **55**:2346-54.
- Caballero R, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Amorós I, Barana A, González de la Fuente M, Osuna L, Duarte J, López-Izquierdo A, Moraleda I, Gálvez E, Sánchez-Chapula JA, Tamargo J, Delpón E. Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311, decreasing the polyamine-induced rectification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010b; **107**:15631-6.
- Calandra B, Portier M, Kernéis A, Delpech M, Carillon C, Le Fur G, Ferrara P, Shire D. Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur J Pharmacol* 1999; **374**:445-55.
- Calignano A, La Rana G, Beltramo M, Makriyannis A, Piomelli D. Potentiation of anandamide hypotension by the transport inhibitor, AM404. *Eur J Pharmacol* 1997; **337**:R1-2.
- Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 1998; **394**:277-81.
- Camm AJ, European Heart Rhythm Association; European Association for Cardio-Thoracic Surgery, Kirchhof P, Lip GY, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, Van Gelder IC, Al-Attar N, Hindricks G, Prendergast B, Heidbuchel H, Alfieri O, Angelini A, Atar D, Colonna P, De Caterina R, De Sutter J, Goette A, Gorennek B, Heldal M, Hohloser SH, Kolh P, Le Heuzey JY, Ponikowski P, Rutten FH. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2010; **31**: 2369-429.
- Camm AJ, Lip GY, De Caterina R, Savelieva I, Atar D, Hohnloser SH, Hindricks G, Kirchhof P; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG), Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S; Document Reviewers, Vardas P, Al-Attar N, Alfieri O, Angelini A, Blömostrom-Lundqvist C, Colonna P, De Sutter J, Ernst S, Goette A, Gorennek B, Hatala R, Heidbüchel H, Heldal M, Kristensen SD, Kolh P, Le Heuzey JY, Mavrikakis H, Mont L, Filardi PP, Ponikowski P, Prendergast B, Rutten FH, Schotten U, Van Gelder IC, Verheugt FW. 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Eur Heart J* 2012; **33**:2719-47.
- Campbell DL, Rasmusson RL, Qu Y, Strauss HC. The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. I. Basic characterization and kinetic analysis. *J Gen Physiol* 1993a; **101**:571-601.
- Campbell DL, Qu Y, Rasmusson RL, Strauss HC. The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. II. Closed state reverse use-dependent block by 4-aminopyridine. *J Gen Physiol* 1993b; **101**:603-626.
- Cannon SC, Brown RH Jr, Corey DP. A sodium channel defect in hyperkalemic periodic paralysis: potassium-induced failure of inactivation. *Neuron* 1991; **6**:619-26.
- Carmeliet E, Vereecke J. Electrogenesis of the action potential. En: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System*. Berne R, Speralakis N,

- Geiger S. *American Physiological Society* 1979; 269-334.
- Carmeliet E. Slow inactivation of the sodium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *Pflugers Arch* 1987; **408**:18-26.
- Carmeliet E. Mechanisms and control of repolarization. *Eur Heart J* 1993; **14**:3-13.
- Carmeliet E. Effects of cetirizine on the delayed K<sup>+</sup> currents in cardiac cells: comparison with terfenadine. *Br J Pharmacol* 1998; **124**:663-8.
- Carrier EJ, Kearns CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ. Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 2004; **65**:999-1007.
- Castellino RC, Morales MJ, Strauss HC, Rasmusson RL. Time- and voltage-dependent modulation of a Kv1.4 channel by a  $\beta$ -subunit (Kv $\beta$ 3) cloned from ferret ventricle. *Am J Physiol* 1995; **269**:H385-91.
- Castle NA. Bupivacaine inhibits the transient outward K<sup>+</sup> current but not the inward rectifier in rat ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; **255**:1038-46.
- Castle NA. Selective inhibition of potassium currents in rat ventricle by clofilium and its tertiary homolog. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; **257**:342-50.
- Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000; **26**:13-25.
- Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 2005a; **57**:397-409.
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 2005b; **57**:411-25.
- Caulfield MP, Brown DA. Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca<sup>2+</sup> current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br J Pharmacol* 1992; **106**:231-2.
- Cens T, Mangoni ME, Richard S, Nargeot J, Charnet P. Coexpression of the  $\beta$ 2 subunit does not induce voltage-dependent facilitation of the class C L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Pflugers Arch* 1996; **431**:771-4.
- Centonze D, Battistini L, Maccarrone M. The endocannabinoid system in peripheral lymphocytes as a mirror of neuroinflammatory diseases. *Curr Pharm Des* 2008; **14**:2370-42.
- Cha TJ, Ehrlich JR, Chartier D, Qi XY, Xiao L, Nattel S. Kir3-based inward rectifier potassium current: potential role in atrial tachycardia remodeling effects on atrial repolarization and arrhythmias. *Circulation* 2006; **113**:1730-1737.
- Chaput JP, Bérubé-Parent S, Tremblay A. Obesity and cardiovascular physiology: impact of some pharmacological agents. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; **3**:185-93.
- Chemin J, Monteil A, Perez-Reyes E, Nargeot J, Lory P. Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J* 2001; **20**:7033-40.
- Chemin J, Nargeot J, Lory P. Chemical determinants involved in anandamide-induced inhibition of T-type calcium channels. *J Biol Chem* 2007; **282**:2314-23.
- Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-Lopez R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998; **392**:293-6.
- Chen F, Esmailian F, Sun W, Wetzel GT, Sarma JS, Singh BN, Klitzner TS. Azimilide inhibits multiple cardiac potassium currents in human atrial myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2002; **7**:255-64.
- Chen H, Kim LA, Rajan S, Xu S, Goldstein SA. Charybdotoxin binding in the I<sub>Ks</sub> pore demonstrates two minK subunits in each channel complex. *Neuron* 2003a; **40**:15-23.
- Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY, Jin HW, Sun H, Su XY, Zhuang QN, Yang YQ, Li YB, Liu Y, Xu HJ, Li XF, Ma N, Mou CP, Chen Z, Barhanin J, Huang W. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 2003b; **299**:251-254.
- Chen L, Marquardt ML, Tester DJ, Sampson KJ, Ackerman MJ, Kass RS. Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**:20990-20995.
- Cheng WW, D'Avanzo N, Doyle DA, Nichols CG. Dual-Mode Phospholipid Regulation of Human Inward Rectifying Potassium Channels *Biophys J* 2011; **100**:620-628

- Choe S. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* 2002; **3**:115-21.
- Choi KL, Aldrich RW, Yellen G. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**:5092-5.
- Choi KL, Mossman C, Aubé J, Yellen G. The internal quaternary ammonium receptor site of Shaker potassium channels. *Neuron* 1993; **10**:533-41.
- Chouabe C, Neyroud N, Guicheney P, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. Properties of KvLQT1 K<sup>+</sup> channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J* 1997; **16**:5472-5479.
- Christ T, Wettwer E, Voigt N, Hála O, Radicke S, Matschke K, Várro A, Dobrev D, Ravens U. Pathology-specific effects of the I<sub>Kur</sub>/I<sub>to</sub>/I<sub>K,ACh</sub> blocker AVE0118 on ion channels in human chronic atrial fibrillation. *Br J Pharmacol* 2008; **154**:1619-1630.
- Christie MJ, North RA, Osborne PB, Douglass J, Adelman JP. Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron* 1990; **4**:405-11.
- Chu ZL, Jones RM, He H, Carroll C, Gutierrez V, Lucman A, Moloney M, Gao H, Mondala H, Bagnol D, Unett D, Liang Y, Demarest K, Semple G, Behan DP, Leonard J. A role for  $\beta$ -cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucose-dependent insulin release. *Endocrinology* 2007; **148**:2601-9.
- Chugh SS, Blackshear JL, Shen WK, Hammill SC, Gersh BJ. Epidemiology and natural history of atrial fibrillation: clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 2001; **37**:371-8.
- Clark RB, Giles WR, Imaizumi Y. Properties of the transient outward current in rabbit atrial cells. *J Physiol* 1988; **405**:147-168.
- Clarkson CW, Matsubara T, Hondeghem LM. Slow inactivation of V<sub>max</sub> in guinea-pig ventricular myocardium. *Am J Physiol* 1984; **247**:H645-H654.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B. Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann N Y Acad Sci* 1999; **868**:233-85.
- Colinas O, Gallego M, Setién R, López-López JR, Pérez-García MT, Casis O. Differential modulation of Kv4.2 and Kv4.3 channels by calmodulin-dependent protein kinase II in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; **291**:H1978-87.
- Comtois P, Kneller J, Nattel S. Of circles and spirals: bridging the gap between the leading circle and spiral wave concepts of cardiac reentry. *Europace* 2005; **7** Suppl 2:10-20
- Conti LR, Radeke CM, Shyng SL, Vandenberg CA. Transmembrane topology of the sulfonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem* 2001; **276**:41270-41278.
- Coraboeuf E, Otsuka M. L'action des solutions hyposodiques sur les potentiels cellulaires de tissu cardiaque de mammifères. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1956; **234**:441-444.
- Coraboeuf E, Carmeliet E. Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflugers Arch* 1982; **392**:352-9.
- Corda D, Iurisci C, Berrie CP. Biological activities and metabolism of the lysophosphoinositides and glycerophosphoinositols. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1582**:52-69.
- Cordeiro JM, Marieb M, Pfeiffer R, Calloe K, Burashnikov E, Antzelevitch C. Accelerated inactivation of the L-type calcium current due to a mutation in CACNB2b underlies Brugada syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2009; **46**:695-703.
- Cormier JW, Rivolta I, Tateyama M, Yang AS, Kass RS. Secondary structure of the human cardiac Na<sup>+</sup> channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J Biol Chem* 2002; **277**:9233-41.
- Cosío FG, Delpón E. New antiarrhythmic drugs for atrial flutter and atrial fibrillation: a conceptual breakthrough at last? *Circulation* 2002; **105**:276-8.
- Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortman S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 2003; **112**:423-31.
- Cota D. The role of the endocannabinoid system in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *J Neuroendocrinol* 2008; **20**:35-8.
- Côté M, Matias I, Lemieux I, Petrosino S, Alméras N, Després JP, Di Marzo V. Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J Obes (Lond)* 2007; **31**:692-9.

- Couchonnal LF, Anderson ME. The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology (Bethesda)* 2008; **23**:151-9.
- Courtemanche M, Ramirez RJ, Nattel S. Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation induced electrical remodeling: insights from a mathematical model. *Cardiovasc Res* 1999; **42**:477-489.
- Covarrubias M, Wei AA, Salkoff L. Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K<sup>+</sup> current systems. *Neuron* 1991; **7**:763-73.
- Cox JL, Canavan TE, Schuessler RB, Cain ME, Lindsay BD, Stone C, Smith PK, Corr PB, Boineau JP. The surgical treatment of atrial fibrillation. II. Intraoperative electrophysiologic mapping and description of the electrophysiologic basis of atrial flutter and atrial fibrillation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; **101**:406-426.
- Cranefield P, Aronson R. *Cardiac Arrhythmias: The role of trigger activity and other mechanisms*. Cranefield & Aronson (Eds.). *Futura* 1975.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 1996; **384**:83-7.
- Cui J, Melman Y, Palma E, Fishman GI, McDonald TV. Cyclic AMP regulates the HERG K<sup>+</sup> channel by dual pathways. *Curr Biol* 2000; **10**:671-674.
- 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.
- Damron DS, Van Wagoner DR, Moravec CS, Bond M. Arachidonic acid and endothelin potentiate Ca<sup>2+</sup> transients in rat cardiac myocytes via inhibition of distinct K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* 1993; **268**:27335-44.
- Dhamoon AS, Jalife J. The inward rectifier current I<sub>K1</sub> controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2005; **2**:316-24.
- Dainese E, Oddi S, Bari M, Maccarrone M. Modulation of the endocannabinoid system by lipid rafts. *Curr Med Chem* 2007; **14**:2702-15.
- Dalle Carbonare M, Del Giudice E, Stecca A, Colavito D, Fabris M, D'Arrigo A, Bernardini D, Dam M, Leon A. A saturated N-acylethanolamine other than N-palmitoyl ethanolamine with anti-inflammatory properties: a neglected story... *J Neuroendocrinol* 2008; **20**:26-34.
- Darbar D, Herron KJ, Ballew JD, Jahangir A, Gersh BJ, Shen WK, Hammill SC, Packer DL, Olson TM. Familial atrial fibrillation is a genetically heterogeneous disorder. *J Am Coll Cardiol* 2003; **41**:2185-92.
- Darbar D, Kannankeril PJ, Donahue BS, Kucera G, Stubblefield T, Haines JL, George AL Jr, Roden DM. Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation. *Circulation* 2008; **117**:1927-35.
- Dascal N, Schreiber W, Lim NF, Wang W, Chavkin C, Dimagno L, Labarca C, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C, Trollinger D, Lester HA, Davidson N. Atrial G protein-activated K<sup>+</sup> channel: Expression cloning and molecular properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**:10235-10239.
- De Bruin ML, Pettersson M, Meyboom RH, Hoes AW, Leufkens HG. Anti-HERG activity and the risk of drug-induced arrhythmias and sudden death. *Eur Heart J* 2005; **26**:590-597.
- De Petrocellis L, Bisogno T, Ligresti A, Bifulco M, Melck D, Di Marzo V. Effect on cancer cell proliferation of palmitoylethanolamide, a fatty acid amide interacting with both the cannabinoid and vanilloid signalling systems. *Fundam Clin Pharmacol* 2002; **16**:297-302.
- De Petrocellis L, Marini P, Matias I, Moriello AS, Starowicz K, Cristino L, Nigam S, Di Marzo V. Mechanisms for the coupling of cannabinoid receptors to intracellular calcium mobilization in rat insulinoma  $\beta$ -cells. *Exp Cell Res* 2007; **313**:2993-3004.
- De Petrocellis L, Di Marzo V. Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010; **5**:103-21.
- De Vos CB, Pisters R, Nieuwlaat R, Prins MH, Tieleman RG, Coelen RJ, van den Heijkant AC, Allesie MA, Crijns HJ. Progression from paroxysmal to persistent atrial fibrillation clinical correlates and prognosis. *J Am Coll Cardiol* 2010; **55**:725-31.
- De Waard M, Pragnell M, Campbell KP. Ca<sup>2+</sup> channel regulation by a conserved  $\beta$ -subunit domain. *Neuron* 1994; **13**:495-503.
- Deal KK, England SK, Tamkun MM. Molecular physiology of cardiac potassium channels. *Physiol Rev* 1996; **76**:49-67.

- Deadwyler SA, Hampson RE, Bennett BA, Edwards TA, Mu J, Pacheco MA, Ward SJ, Childers SR. Cannabinoids modulate potassium current in cultured hippocampal neurons. *Receptors Channels* 1993; **1**:121-34.
- Deadwyler SA, Hampson RE, Mu J, Whyte A, Childers S. Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; **273**:734-43.
- Decher N, Uyguner O, Scherer CR, Karaman B, Yüksel-Apak M, Busch AE, Steinmeyer K, Wollnik B. hKChIP2 is a functional modifier of hKv4.3 potassium channels: cloning and expression of a short hKChIP2 splice variant. *Cardiovasc Res* 2001; **52**:255-64.
- Decher N, Barth AS, Gonzalez T, Steinmeyer K, Sanguinetti MC. Novel KChIP2 isoforms increase functional diversity of transient outward potassium currents. *J Physiol* 2004; **557**:761-72.
- Defer N, Wan J, Souktani R, Escoubet B, Perier M, Caramelle P, Manin S, Deveaux V, Bourin MC, Zimmer A, Lotersztajn S, Pecker F, Pavoine C. The cannabinoid receptor type 2 promotes cardiac myocyte and fibroblast survival and protects against ischemia/reperfusion-induced cardiomyopathy. *FASEB J* 2009; **23**:2120-30.
- Delpón E, Tamargo J, Sánchez-Chapula J. Effects of imipramine on the transient outward current in rabbit atrial single cells. *Br J Pharmacol* 1992; **106**:464-9.
- Delpón E, Valenzuela C, Pérez O, Casis O, Tamargo J. Propafenone preferentially blocks the rapidly activating component of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in guinea pig ventricular myocytes. Voltage-independent and time-dependent block of the slowly activating component. *Circ Res* 1995; **76**:223-235.
- Delpón E, Cordeiro JM, Núñez L, Thomsen PE, Guerchicoff A, Pollevick GD, Wu Y, Kanters JK, Larsen CT, Hofman-Bang J, Burashnikov E, Christiansen M, Antzelevitch C. Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008; **1**:209-18.
- Delpón E, Tamargo J. Electrofisiología cardíaca. En: *Fisiología Humana*. Tresguerres JAF. McGraw-Hill 2010.
- Demuth DG, Molleman A. Cannabinoid signalling. *Life Sci* 2006; **78**:549-63.
- Dennis A, Wang L, Wan X, Ficker E. hERG channel trafficking: Novel targets in drug-induced long QT syndrome. *Biochem Soc Trans* 2007; **35**:1060-1063.
- Derkinderen P, Ledent C, Parmentier M, Girault JA. Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB1 receptors in hippocampus. *J Neurochem* 2001; **77**:957-60.
- Deschênes I, Tomaselli GF. Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Lett* 2002; **528**:183-8.
- Deschênes I, Armoundas AA, Jones SP, Tomaselli GF. Post-transcriptional gene silencing of KChIP2 and Navβ1 in neonatal rat cardiac myocytes reveals a functional association between Na<sup>+</sup> and I<sub>to</sub> currents. *J Mol Cell Cardiol* 2008; **45**:336-346.
- Deutsch DG, Chin SA. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol* 1993; **46**:791-6.
- Deutsch DG, Glaser ST, Howell JM, Kunz JS, Puffenbarger RA, Hillard CJ, Abumrad N. The cellular uptake of anandamide is coupled to its breakdown by fatty-acid amide hydrolase. *J Biol Chem* 2001; **276**:6967-73.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; **258**:1946-9.
- Devaux M, Sassi F. Social inequalities in obesity and overweight in 11 OECD countries. *Eur J Public Health*. 2012 [Epub ahead of print]
- Dhamoon AS, Jalife J. The inward rectifier current I<sub>K1</sub> controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2005; **2**:316-24.
- Di Diego JM, Sun ZQ, Antzelevitch C. I<sub>to</sub> and action potential notch are smaller in left vs. right canine ventricular epicardium. *Am J Physiol* 1996; **271**:H548-61.
- Di Diego JM, Cordeiro JM, Goodrow RJ, Fish JM, Zygmunt AC, Pérez GJ, Scornik FS, Antzelevitch C. Ionic and cellular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males. *Circulation* 2002; **106**:2004-11.
- Di Francesco D. Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers. *Pharmacol Res* 2006; **53**:399-406.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and

- inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 1994; **372**:686-91.
- Di Marzo V, Bisogno T, Sugiura T, Melck D, De Petrocellis L. The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide. *Biochem J* 1998; **331**:15-9.
- Di Marzo V, Deutsch DG. Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis* 1998; **5**:386-404.
- Di Marzo V. Biosynthesis and inactivation of endocannabinoids: relevance to their proposed role as neuromodulators. *Life Sci* 1999; **65**:645-55.
- Di Marzo V, Breivogel CS, Tao Q, Bridgen DT, Razdan RK, Zimmer AM, Zimmer A, Martin BR. Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB1 cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB1, non-CB2 receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem* 2000; **75**:2434-44.
- Di Marzo V, Melck D, Orlando P, Bisogno T, Zagoory O, Bifulco M, Vogel Z, De Petrocellis L. Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. *Biochem J* 2001; **358**:249-55.
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 2004; **3**:771-84.
- Di Marzo V, Petrocellis LD. Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu Rev Med* 2006; **57**:553-74.
- Di Marzo V, Petrosino S. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol* 2007; **18**:129-40.
- Di Marzo V, Maccarrone M. FAAH and anandamide: is 2-AG really the odd one out? *Trends Pharmacol Sci* 2008; **29**:229-33.
- Di Marzo V, De Petrocellis L. Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: A further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. *Curr Med Chem* 2010; **17**:1430-49.
- Di Marzo V, Piscitelli F, Mechoulam R. Cannabinoids and endocannabinoids in metabolic disorders with focus on diabetes. *Handb Exp Pharmacol* 2011; **203**:75-104.
- Dilks D, Ling HP, Cockett M, Sokol P, Numann R. Cloning and expression of the human Kv4.3 potassium channel. *J Neurophysiol* 1999; **81**:1974-1977.
- Diochot S, Drici MD, Moinier D, Fink M, Lazdunski M. Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of  $I_{to1}$  in cardiac electrogenesis. *Br J Pharmacol* 1999; **126**:251-63.
- Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS, McKinnon D. Role of the Kv4.3  $K^+$  channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* 1996; **79**:659-68.
- Doolan GK, Panchal RG, Fonnes EL, Clarke AL, Williams DA, Petrou S. Fatty acid augmentation of the cardiac slowly activating delayed rectifier current  $I_{Ks}$  is conferred by hminK. *FASEB J* 2002; **16**:1662-4.
- Dobrev D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hála O, Doerfel C, Christ T, Schüler S, Ravens U. Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying  $K^+$  current  $I_{K,ACh}$  in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced  $I_{K,ACh}$  and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation* 2001; **104**:2551-2557.
- Dobrev D, Friedrich A, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T, Knaut M, Ravens U. The G protein-gated potassium current  $I_{K,ACh}$  is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2005; **112**:3697-3706.
- Dobrev D. Electrical Remodeling in Atrial Fibrillation. *Herz* 2006; **31**:108-12.
- Dorian P, Pinter A, Mangat I, Korley V, Cvitkovic SS, Beatch GN. The effect of vernakalant (RSD1235), an investigational antiarrhythmic agent, on atrial electrophysiology in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; **50**:35-40.
- Doyle DA, Morais Cabral J, 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.
- Drolet B, Simard C, Mizoue L, Roden DM. Human cardiac potassium channel DNA polymorphism modulates access to drug binding site and causes drug resistance. *J Clin Invest* 2005; **115**:2209-2213.
- Duan Y, Zheng J, Nicholson RA. Inhibition of [3H]batrachotoxinin A-20 $\alpha$ -benzoate binding to

- sodium channels and sodium channel function by endocannabinoids. *Neurochem Int* 2008; **52**:438-46.
- Dublin S, French B, Glazer NL, Wiggins KL, Lumley T, Psaty BM, Smith NL, Heckbert SR. Risk of new-onset atrial fibrillation in relation to body mass index. *Arch Intern Med* 2006; **166**:2322-8.
- Dudel J, Peper K, Rüdell R, Trautwein W. The potassium component of membrane current in Purkinje fibers. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 1967; **296**:308-27.
- Dukes ID, Morad M. Tedisamil inactivates transient outward  $K^+$  current in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1989; **257**:H1746-9.
- Eaholtz G, Scheuer T, Catterall WA. Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* 1994; **12**:1041-8.
- Eckardt L. Gender differences in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2007; **18**:422-4.
- El-Haou S, Balse E, Neyroud N, Dilanian G, Gavillet B, Abriel H, Coulombe A, Jeromin A, Hatem SN. Kv4 potassium channels form a tripartite complex with the anchoring protein SAP97 and CaMKII in cardiac myocytes. *Circ Res* 2009; **104**:758-69.
- Elvan A, Wylie K, Zipes DP. Pacing-induced chronic atrial fibrillation impairs sinus node function in dogs. Electrophysiological remodeling. *Circulation* 1996; **94**:2953-60.
- Engeli S, Böhnke J, Feldpausch M, Gorzelnik K, Janke J, Bátkai S, Pacher P, Harvey-White J, Luft FC, Sharma AM, Jordan J. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 2005; **54**:2838-43.
- England SK, Uebele VN, Shear H, Kodali J, Bennett PB, Tamkun MM. Characterization of a voltage-gated  $K^+$  channel  $\beta$  subunit expressed in human heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**:6309-6313.
- Erdbrügger W, Keffel J, Knocks M, Otto T, Philipp T, Michel MC. Protein kinase C isoenzymes in rat and human cardiovascular tissues. *Br J Pharmacol* 1997; **120**:177-86.
- Escande D, Coulombe A, Faivre JF, Deroubaix E, Coraboeuf E. Two types of transient outward currents in adult human atrial cells. *Am J Physiol* 1987; **252**:H142-H148.
- Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**:3376-80.
- Falasca M, Corda D. Elevated levels and mitogenic activity of lysophosphatidylinositol in k-ras-transformed epithelial cells. *Eur J Biochem* 1994; **221**:383-9.
- Falasca M, Silletta MG, Carvelli A, Di Francesco AL, Fusco A, Ramakrishna V, Corda D. Signalling pathways involved in the mitogenic action of lysophosphatidylinositol. *Oncogene* 1995; **10**:2113-24.
- Fedida D, Wible B, Wang Z, Fermini B, Faust F, Nattel S, Brown AM. Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned  $K^+$  channel current. *Circ Res* 1993; **73**:210-216.
- Fedida D, Orth PM, Chen JY, Lin S, Plouvier B, Jung G, Ezrin AM, Beatch GN. The mechanism of atrial antiarrhythmic action of RSD1235. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005; **16**:1227-38.
- Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA. Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**:7656-60.
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 1995; **48**:443-50.
- Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett* 1996; **393**:231-5.
- Felder CC, Glass M. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; **38**:179-200.
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Glass M, Mackie KP, Fahey KJ, Cullinan GJ, Hunden DC, Johnson DW, Chaney MO, Koppel GA, Brownstein M. LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; **284**:291-7.
- Feng J, Wang Z, Li GR, Nattel S. Effects of class III antiarrhythmic drugs on transient outward and ultra-

- rapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1997a; **281**:384-92.
- Feng J, Wible B, Li GR, Wang Z, Nattel S. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res* 1997b; **80**:572-579.
- Feng J, Xu D, Wang Z, Nattel S. Ultrarapid delayed rectifier current inactivation in human atrial myocytes: Properties and consequences. *Am J Physiol* 1998a; **275**:H1717-H1725.
- Feng J, Yue L, Wang Z, Nattel S. Ionic mechanisms of regional action potential heterogeneity in the canine right atrium. *Circ Res* 1998b; **83**:541-551.
- Fenwick EM, Marty A, Neher E. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 1982; **331**:599-635.
- Fermini B, Wang Z, Duan D, Nattel S. Differences in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. *Am J Physiol* 1992; **263**:H1747-54.
- Fernández-Bergés D, Cabrera de León A, Sanz H, Elosua R, Guembe MJ, Alzamora M, Vega-Alonso T, Félix-Redondo FJ, Ortiz-Marrón H, Rigo F, Lama C, Gavrilá D, Segura-Fragoso A, Lozano L, Marrugat J. Metabolic syndrome in Spain: prevalence and coronary risk associated with harmonized definition and WHO proposal. DARIOS study. *Rev Esp Cardiol* 2012; **65**:241-8.
- Ficker E, Taglialatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Science* 1994; **266**:1068-72.
- Finley MR, Li Y, Hua F, Lillich J, Mitchell KE, Ganta S, Gilmour RF Jr, Freeman LC. Expression and coassociation of ERG1, KCNQ1, and KCNE1 potassium channel proteins in horse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; **283**:H126-38.
- Fisar Z. Cannabinoids and atherosclerosis. *Prague Med Rep* 2009; **110**:5-12.
- Fisyunov A, Tsintsadze V, Min R, Burnashev N, Lozovaya N. Cannabinoids modulate the P-type high-voltage-activated calcium currents in purkinje neurons. *J Neurophysiol* 2006; **96**:1267-77.
- Folander K, Smith JS, Antanavage J, Bennett C, Stein RB, Swanson R. Cloning and expression of the delayed-rectifier IsK channel from neonatal rat heart and diethylstilbestrol-primed rat uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**:2975-9.
- Ford WR, Honan SA, White R, Hiley CR. Evidence of a novel site mediating anandamide-induced negative inotropic and coronary vasodilator responses in rat isolated hearts. *Br J Pharmacol* 2002; **135**:1191-8.
- Fozzard HA, Hiraoka M. The positive dynamic current and its inactivation properties in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1973; **234**:569-86.
- Fozzard HA, January CT, Makielski JC. New studies of the excitatory sodium currents in heart muscle. *Circ Res* 1985; **56**:475-85.
- Fozzard HA, Hanck DA, Makielski JC, Scanley BE, Sheets MF. Sodium channels in cardiac Purkinje cells. *Experientia* 1987; **43**:1162-8.
- Franklin A, Parmentier-Batteur S, Walter L, Greenberg DA, Stella N. Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. *J Neurosci* 2003; **23**:7767-75.
- Franqueza L, Longobardo M, Vicente J, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ, Valenzuela C. Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels. *Circ Res* 1997; **81**:1053-64.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 2003; **83**:1017-66.
- Fride E, Mechoulam R. Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. *Eur J Pharmacol* 1993; **231**:313-4.
- Frost L, Hune LJ, Vestergaard P. Overweight and obesity as risk factors for atrial fibrillation or flutter: the Danish Diet, Cancer, and Health Study. *Am J Med* 2005; **118**:489-495.
- Frustaci A, Caldarulo M, Buffon A, Bellocchi F, Fenici R, Melina D. Cardiac biopsy in patients with "primary" atrial fibrillation. Histologic evidence of occult myocardial diseases. *Chest* 1991; **100**:303-6.
- Frustaci A, Chimenti C, Bellocchi F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation* 1997; **96**:1180-4.
- Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodríguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D. Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- $\alpha$ . *Nature* 2003; **425**:90-3.

- Furukawa T, Myerburg RJ, Furukawa N, Bassett AL, Kimura S. Differences in transient outward currents of feline endocardial and epicardial myocytes. *Circ Res* 1990; **67**:1287-1291.
- Fuster V y cols. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation. *Circulation* 2006; **114**: e257-354.
- Gaborit N, Steenman M, Lamirault G, Le Meur N, Le Bouter S, Lande G, Léger J, Charpentier F, Christ T, Dobrev D, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation* 2005; **112**: 471-481.
- Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol* 2007; **582**:675-693.
- Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 1995; **232**:54-61.
- Galve-Roperh I, Rueda D, Gómez del Pulgar T, Velasco G, Guzmán M. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB1 cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 2002; **62**:1385-92.
- Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Bennett T. Complex regional haemodynamic effects of anandamide in conscious rats. *Br J Pharmacol* 2002; **135**:1889-96.
- Gaspo R, Bosch RF, Talajic M, Nattel S. Functional mechanisms underlying tachycardia-induced sustained atrial fibrillation in a chronic dog model. *Circulation* 1997; **96**:4027-35.
- George AL Jr. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest* 2005; **115**:1990-9.
- Gérard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J* 1991; **279**:129-34.
- Gettes LS, Reuter H. Slow recovery from inactivation of inward currents in mammalian myocardial fibres. *J Physiol* 1974; **240**:703-724.
- Giang DK, Cravatt BF. Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**:2238-42.
- Giles WR, Imaizumi Y. Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J Physiol* 1988; **405**:123-145.
- Gintant GA, Datyner NB, Cohen IS. Slow inactivation of a tetrodotoxin-sensitive current in canine cardiac Purkinje fibers. *Biophys J* 1984; **45**:509-512.
- Giudicessi JR, Ye D, Tester DJ, Crotti L, Mugione A, Nesterenko VV, Albertson RM, Antzelevitch C, Schwartz PJ, Ackerman MJ. Transient outward current ( $I_{to}$ ) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome. *Heart Rhythm* 2011; **8**:1024-32.
- Glaser ST, Abumrad NA, Fatade F, Kaczocha M, Studholme KM, Deutsch DG. Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**:4269-74.
- Glass M, Dragunow M, Faull RL. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 1997; **77**:299-318.
- Glass M, Felder CC. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci* 1997; **17**:5327-33.
- Gluais P, Bastide M, Caron J, Adamantidis M. Risperidone prolongs cardiac action potential through reduction of  $K^+$  currents in rabbit myocytes. *Eur J Pharmacol* 2002; **444**:123-32.
- Godlewski G, Offertáler L, Wagner JA, Kunos G. Receptors for acylethanolamides- GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2009; **89**:105-11.
- Godreau D, Vranckx R, Maguy A, Rücker-Martin C, Goyenvallé C, Abdelshafy S, Tessier S, Couétil JP, Hatem SN. Expression, regulation and role of the MAGUK protein SAP-97 in human atrial myocardium. *Cardiovasc Res* 2002; **56**:433-42.
- Goette A, Lendeckel U. Nonchannel drug targets in atrial fibrillation. *Pharmacol Ther* 2004; **102**:17-36.
- Gögelein H, Brüggemann A, Gerlach U, Brendel J, Busch AE. Inhibition of  $I_{Ks}$  channels by HMR 1556. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; **362**:480-8.

- Gögelein H, Brendel J, Steinmeyer K, Strübing C, Picard N, Rampe D, Kopp K, Busch AE, Bleich M. Effects of the atrial antiarrhythmic drug AVE0118 on cardiac ion channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; **370**:183-92.
- Goldin AL. Evolution of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *J Exp Biol* 2002; **205**:575-84.
- Goldman DE. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J Gen Physiol* 1943; **27**:37-60.
- Gómez R, Núñez L, Caballero R, Vaquero M, Tamargo J, Delpón E. Spironolactone and its main metabolite canrenoic acid block hKv1.5, Kv4.3 and Kv7.1 + minK channels. *Br J Pharmacol* 2005; **146**:146-61.
- Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Amorós I, Barana A, de Prada T, Macaya C, Maroto L, Rodríguez E, Caballero R, López-Farré A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide inhibits Kv4.3 and human cardiac transient outward potassium current ( $I_{to1}$ ). *Cardiovasc Res* 2008; **80**:375-84.
- Gómez R, Caballero R, Barana A, Amorós I, Calvo E, López JA, Klein H, Vaquero M, Osuna L, Atienza F, Almendral J, Pinto A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide increases cardiac  $I_{K1}$  by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circ Res* 2009; **105**:383-92.
- Gómez-Lagunas F, Armstrong CM. Inactivation in ShakerB K<sup>+</sup> channels: a test for the number of inactivating particles on each channel. *Biophys J* 1995; **68**:89-95.
- Gómez del Pulgar T, Velasco G, Guzmán M. The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem J* 2000; **347**:369-73.
- Gómez del Pulgar T, Velasco G, Sánchez C, Haro A, Guzmán M. De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem J* 2002; **363**:183-8.
- Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell D, Hipkin RW. Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol* 2000; **57**:1045-50.
- González T, Longobardo M, Caballero R, Delpón E, Tamargo J, Valenzuela C. Effects of bupivacaine and a novel local anesthetic, IQB-9302, on human cardiac K<sup>+</sup> channels. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **296**:573-83.
- González T, Navarro-Polanco R, Arias C, Caballero R, Moreno I, Delpón E, Tamargo J, Tamkun MM, Valenzuela C. Assembly with the Kvβ1.3 subunit modulates drug block of hKv1.5 channels. *Mol Pharmacol* 2002; **62**:1456-1463.
- González de la Fuente M, Barana A, Gómez R, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Sacristán S, Atienza F, Pita A, Pinto A, Fernández-Avilés F, Caballero R, Tamargo J, Delpón E. Chronic atrial fibrillation up-regulates β1-Adrenoceptors affecting repolarizing currents and action potential duration. *Cardiovasc Res* 2012 [Epub ahead of print]
- Goparaju SK, Ueda N, Taniguchi K, Yamamoto S. Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1999; **57**:417-23.
- Goutopoulos A, Fan P, Khanolkar AD, Xie XQ, Lin S, Makriyannis A. Stereochemical selectivity of methanandamides for the CB1 and CB2 cannabinoid receptors and their metabolic stability. *Bioorg Med Chem* 2001; **9**:1673-84.
- Grainger J, Boachie-Ansah G. Anandamide-induced relaxation of sheep coronary arteries: the role of the vascular endothelium, arachidonic acid metabolites and potassium channels. *Br J Pharmacol* 2001; **134**:1003-12.
- Grammer JB, Bosch RF, Kuhlkamp V, Seipel L. Molecular remodeling of Kv4.3 potassium channels in human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000; **11**:626-633.
- Grant AO, Carboni MP, Neplioueva V, Starmer CF, Memmi M, Napolitano C, Priori S. Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *J Clin Invest* 2002; **110**:1201-9.
- Griffin G, Atkinson PJ, Showalter VM, Martin BR, Abood ME. Evaluation of cannabinoid receptor agonists and antagonists using the guanosine-5'-O-(3-[35S]thio)-triphosphate binding assay in rat cerebellar membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; **285**:553-60.
- Griffin G, Tao Q, Abood ME. Cloning and pharmacological characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **292**:886-94.
- Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD, Chandy G. Pharmacological characterization of five cloned voltage gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1,

- 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 1994; **45**:1227-1234.
- Gross GJ, Castle NA. Propafenone inhibition of human atrial myocyte repolarizing currents. *J Mol Cell Cardiol* 1998; **30**:783-93.
- Guindon J, Hohmann AG. A physiological role for endocannabinoid-derived products of cyclooxygenase-2-mediated oxidative metabolism. *Br J Pharmacol* 2008; **153**:1341-3.
- Guizy M, David M, Arias C, Zhang L, Cofán M, Ruiz-Gutiérrez V, Ros E, Lillo MP, Martens JR, Valenzuela C. Modulation of the atrial specific Kv1.5 channel by the n-3 polyunsaturated fatty acid,  $\alpha$ -linolenic acid. *J Mol Cell Cardiol* 2008; **44**:323-35.
- Gulbis JM, Mann S, MacKinnon R. Structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel  $\beta$ -subunit. *Cell* 1999; **97**:943-52.
- Gulbis JM, Zhou M, Mann S, MacKinnon R. Structure of the cytoplasmic  $\beta$ -subunit-T1 assembly of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. *Science* 2000; **289**:123-7.
- Guo W, Kamiya K, Toyama J. Evidences of antagonism between amiodarone and triiodothyronine on the K<sup>+</sup> channel activities of cultured rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997; **29**:617-27.
- Guo W, Xu H, London B, Nerbonne JM. Molecular basis of transient outward K<sup>+</sup> current diversity in mouse ventricular myocytes. *J Physiol* 1999; **521**:587-99.
- Guo J, Ikeda SR. Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons. *Mol Pharmacol* 2004; **65**:665-74.
- Gussak I, Brugada P, Brugada J, Wright RS, Kopecky SL, Chaitman BR, Bjerregaard P. Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology* 2000; **94**:99-102.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005; **57**:473-508.
- Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 1988; **395**:233-53.
- Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le Mouroux A, Le Métayer P, Clémenty J. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med* 1998; **339**:659-666.
- Hájos N, Kathuria S, Dinh T, Piomelli D, Freund TF. Endocannabinoid transport tightly controls 2-arachidonoyl glycerol actions in the hippocampus: effects of low temperature and the transport inhibitor AM404. *Eur J Neurosci* 2004; **19**:2991-6.
- Hampson RE, Evans GJ, Mu J, Zhuang SY, King VC, Childers SR, Deadwyler SA. Role of cyclic AMP dependent protein kinase in cannabinoid receptor modulation of potassium "A-current" in cultured rat hippocampal neurons. *Life Sci* 1995; **56**:2081-8.
- Hancox JC, Levi AJ, Witchel HJ. Time course and voltage dependence of expressed HERG current compared with native "rapid" delayed rectifier K<sup>+</sup> current during the cardiac ventricular action potential. *Pflügers Arch* 1998; **436**:843-853.
- Hansen HS. Palmitoylethanolamide and other anandamide congeners. Proposed role in the diseased brain. *Exp Neurol* 2010; **224**:48-55.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981; **391**:85-100.
- Hart RG, Halperin JL. Atrial fibrillation and stroke: concepts and controversies. *Stroke* 2001; **32**:803-8.
- Hattori T, Makiyama T, Akao M, Ehara E, Ohno S, Iguchi M, Nishio Y, Sasaki K, Itoh H, Yokode M, Kita T, Horie M, Kimura T. A novel gain-of-function KCNJ2 mutation associated with short-QT syndrome impairs inward rectification of Kir2.1 *Cardiovasc Res* 2012; **93**:666-673
- Haverkamp W, Breithardt G, Camm AJ, Janse MJ, Rosen MR, Antzelevitch C, Escande D, Franz M, Malik M, Moss A, Shah R. The potential for QT prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* 2000; **47**:219-233.
- He M, Bodi I, Mikala G, Schwartz A. Motif III S5 of L-type calcium channels is involved in the dihydropyridine binding site. A combined radioligand binding and electrophysiological study. *J Biol Chem* 1997; **272**:2629-33.
- Hedin KE, Lim NF, Clapham DE. Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel

- subunit that permits GIRK1 expression of  $I_{K,Ach}$  currents in oocytes. *Neuron* 1996; **16**:423-429.
- Heeringa J, van der Kuip DA, Hofman A, Kors JA, van Herpen G, Stricker BH, Stijnen T, Lip GY, Wittteman JC. Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. *Eur Heart J* 2006; **27**:949-953.
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson R, MacKinnon R. Mutations in the  $K^+$  channel signature sequence. *Biophys J* 1994; **66**:1061-1067.
- Heinemann SH, Terlau H, Stühmer W, Imoto K, Numa S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 1992; **356**:441-3.
- Henry WL, Morganroth J, Pearlman AS, Clark CE, Redwood DR, Itscoitz SB, Epstein SE. Relation between echocardiographically determined left atrial size and atrial fibrillation. *Circulation* 1976; **53**:273-279.
- Henry DJ, Chavkin C. Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* 1995; **186**:91-4.
- Henstridge CM, Balenga NA, Ford LA, Ross RA, Waldhoer M, Irving AJ. The GPR55 ligand L- $\alpha$ -lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent  $Ca^{2+}$  signalling and NFAT activation. *FASEB J* 2009; **23**:183-93.
- Henstridge CM, Balenga NA, Schröder R, Kargl JK, Platzer W, Martini L, Arthur S, Penman J, Whistler JL, Kostenis E, Waldhoer M, Irving AJ. GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *Br J Pharmacol* 2010; **160**:604-14.
- Herbert JM, Augereau JM, Gleye J, Maffrand JP. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **172**:993-9.
- Hering S, Aczél S, Grabner M, Döring F, Berjukow S, Mitterdorfer J, Sinnegger MJ, Striessnig J, Degtjar VE, Wang Z, Glossmann H. Transfer of high sensitivity for benzothiazepines from L-type to class A (BI) calcium channels. *J Biol Chem* 1996; **271**:24471-5.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 1991; **11**:563-83.
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 2010; **90**:291-366.
- Hiley CR. Endocannabinoids and the heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; **53**:267-76.
- Hillard CJ, Pounds JJ, Boyer DR, Bloom AS. Studies of the role of membrane lipid order in the effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on adenylate cyclase activation in heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; **252**:1075-82.
- Hillard CJ, Edgmond WS, Jarrahan A, Campbell WB. Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem* 1997; **69**:631-8.
- Hillard CJ, Manna S, Greenberg MJ, DiCamelli R, Ross RA, Stevenson LA, Murphy V, Pertwee RG, Campbell WB. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J Pharmacol Exp Ther* 1999; **289**:1427-33.
- Hillard CJ. Endocannabinoids and vascular function. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **294**:27-32.
- Hillard CJ, Jarrahan A. The movement of N-arachidonylethanolamine (anandamide) across cellular membranes. *Chem Phys Lipids* 2000; **108**:123-34.
- Hille B. (Ed.). *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3<sup>a</sup> Edición. Ed. Sinauer Associates. Sunderland, MA (USA). 2001.
- Hiraoka M, Kawano S. Calcium-sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 1989; **410**:187-212.
- Hirschberg B, Rovner A, Lieberman M, Patlak J. Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle  $Na^+$  channels. *J Gen Physiol* 1995; **106**:1053-1068.
- Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 1993; **362**:31-8.
- Ho WS, Hiley CR. Endothelium-independent relaxation to cannabinoids in rat-isolated mesenteric artery and role of  $Ca^{2+}$  influx. *Br J Pharmacol* 2003; **139**:585-97.
- Hobbs WJ, Fynn S, Todd DM, Wolfson P, Galloway M, Garratt CJ. Reversal of atrial electrical remodeling after cardioversion of persistent atrial fibrillation in humans. *Circulation* 2000; **101**:1145-51.

- Hocini M, Ho SY, Kawara T, Linnenbank AC, Potse M, Shah D, Jaïs P, Janse MJ, Haïssaguerre M, De Bakker JM. Electrical conduction in canine pulmonary veins: electrophysiological and anatomic correlation. *Circulation* 2002; **105**:2442-8.
- Hocini M, Nault I, Wright M, Veenhuyzen G, Narayan SM, Jaïs P, Lim KT, Knecht S, Matsuo S, Forclaz A, Miyazaki S, Jadidi A, O'Neill MD, Sacher F, Clémenty J, Haïssaguerre M. Disparate evolution of right and left atrial rate during ablation of long lasting persistent atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2010; **55**:1007-1016.
- Hockerman GH, Johnson BD, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels. *J Biol Chem* 1995; **270**:22119-22.
- Hockerman GH, Johnson BD, Abbott MR, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels in transmembrane segment IIIIS6 and the pore region of the  $\alpha 1$  subunit. *J Biol Chem* 1997; **272**:18759-65.
- Hodgkin AL, Katz B. The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol* 1949; **108**:37-77.
- Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952a; **117**:500-44.
- Hodgkin AL, Huxley AF. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 1952b; **116**:473-96.
- Hodgson-Zingman DM, Karst ML, Zingman LV, Heublein DM, Darbar D, Herron KJ, Ballew JD, de Andrade M, Burnett JC Jr, Olson TM. Atrial natriuretic peptide frameshift mutation in familial atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2008; **359**: 158-165.
- Hoffman B, Cranefield P. *Electrophysiology of the heart*. Hoffman B, Cranefield P. McGraw-Hill 1960.
- Hoffman AF, Lupica CR. Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurosci* 2000; **20**:2470-9.
- Hoffman AF, Macgill AM, Smith D, Oz M, Lupica CR. Species and strain differences in the expression of a novel glutamate-modulating cannabinoid receptor in the rodent hippocampus. *Eur J Neurosci* 2005; **22**:2387-91.
- Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. Molecular basis for  $\text{Ca}^{2+}$  channel diversity. *Annu Rev Neurosci* 1994; **17**:399-418.
- Högestätt ED, Zygmunt PM. Cardiovascular pharmacology of anandamide. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; **66**:343-51.
- Holmqvist MH, Cao J, Knoppers MH, Jurman ME, Distefano PS, Rhodes KJ, Xie Y, An WF. Kinetic modulation of  $\text{Kv}4$ -mediated A-current by arachidonic acid is dependent on potassium channel interacting proteins. *J Neurosci* 2001; **21**:4154-61.
- Hondeghem LM, Katzung BG. Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim Biophys Acta* 1977; **472**:373-398.
- Hondeghem LM. Validity of  $V_{\text{max}}$  as a measure of the sodium current in cardiac and nervous tissues. *Biophys J* 1978; **23**:147-152.
- Hong K, Bjerregaard P, Gussak I, Brugada R. Short QT syndrome and atrial fibrillation caused by mutation in *KCNH2*. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005; **4**:394-396.
- Honoré E, Barhanin J, Attali B, Lesage F, Lazdunski M. External blockade of the major cardiac delayed-rectifier  $\text{K}^+$  channel ( $\text{Kv}1.5$ ) by polyunsaturated fatty acids. *Proc Natl Acad Sci* 1994; **91**:1937-41.
- Horn R, Patlak J, Stevens CF. Sodium channels need not open before they inactivate. *Nature* 1981; **291**:426-427.
- 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  $\text{K}^+$  channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* 1991; **7**:547-56.
- Houston DB, Howlett AC. Solubilization of the cannabinoid receptor from rat brain and its functional interaction with guanine nucleotide-binding proteins. *Mol Pharmacol* 1993; **43**:17-22.
- Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL. Involvement of  $\text{G}_i$  in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol* 1986; **29**:307-13.
- Howlett AC. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; **68-69**:619-31.

- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002; **54**:161-202.
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 2004; **47**:345-58.
- Howlett AC, Blume LC, Dalton GD. CB1 cannabinoid receptors and their associated proteins. *Curr Med Chem* 2010; **17**:1382-93.
- Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan NY, Jan LY. Evidence that direct binding of Gbg to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel is important for channel activation. *Neuron* 1995; **15**:1133-1143.
- Huang B, Qin D, El-Sherif N. Early down-regulation of K<sup>+</sup> channel genes and currents in the postinfarction heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000; **11**:1252-1261.
- Irisawa G, Hagiwara N. Pacemaker mechanism of mammalian sinoatrial node cells. En: *Electrophysiology of Sinoatrial and Atrioventricular Nodes*. Mazgalev T, Dreifus L, Michelson E, Alan R. *Liss Alan R Inc* 1988:33-52.
- Isacoff EY, Jan YN, Jan LY. Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Nature* 1991; **353**:86-90.
- Isenberg G, Klockner U. Calcium currents of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude. *Pflügers Arch* 1982; **395**:30-41.
- Isom LL, Catterall WA. Na<sup>+</sup> channel subunits and Ig domains. *Nature* 1996; **383**:307-8.
- Iversen L. Cannabis and the brain. *Brain* 2003; **126**:1252-70.
- Iwamura H, Suzuki H, Ueda Y, Kaya T, Inaba T. In vitro and in vivo pharmacological characterization of JTE-907, a novel selective ligand for cannabinoid CB2 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **296**:420-5.
- Jaggari SI, Hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS. The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain* 1998; **76**:189-99.
- Jalife J, Berenfeld O, Mansour M. Mother rotors and fibrillatory conduction: a mechanism of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002; **54**:204-216.
- Jalife J. Déjà vu in the theories of atrial fibrillation dynamics. *Cardiovasc Res* 2011; **89**:766-75.
- Jan LY, Barbel S, Timpe L, Laffer C, Salkoff L, O'Farrell P, Jan YN. Mutating a gene for a potassium channel by hybrid dysgenesis: an approach to the cloning of the Shaker locus in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1983; **48**:233-45.
- Jangsangthong W, Kuzmenkina E, Khan IF, Matthes J, Hullin R, Herzig S. Inactivation of L-type calcium channels is determined by the length of the N terminus of mutant  $\beta$ 1-subunits. *Pflügers Arch* 2010; **459**:399-411.
- Jahnel U, Klemm P, Nawrath H. Different mechanisms of the inhibition of the transient outward current in rat ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994; **349**:87-94.
- Járai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdan RK, Zimmer A, Kunos G. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**:14136-41.
- Járai Z, Wagner JA, Goparaju SK, Wang L, Razdan RK, Sugiura T, Zimmer AM, Bonner TI, Zimmer A, Kunos G. Cardiovascular effects of 2-arachidonoyl glycerol in anesthetized mice. *Hypertension* 2000; **35**:679-84.
- Jarrahian A, Hillard CJ. Arachidonylethanolamide (anandamide) binds with low affinity to dihydropyridine binding sites in brain membranes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997; **57**:551-4.
- Jarrahian A, Manna S, Edgemond WS, Campbell WB, Hillard CJ. Structure-activity relationships among N-arachidonylethanolamine (Anandamide) head group analogues for the anandamide transporter. *J Neurochem* 2000; **74**:2597-606.
- Jerng HH, Qian Y, Pfaffinger PJ. Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophys J* 2004; **87**:2380-96.
- Jespersen T, Grunnet M, Olesen SP. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology* 2005; **20**:408-416.
- Ji S, John SA, Lu Y, Weiss JN. Mechanosensitivity of the cardiac muscarinic potassium channel. A novel

- property conferred by Kir3.4 subunit. *J Biol Chem* 1998; **273**:1324-1328.
- Jiang M, Cabo C, Yao J, Boyden PA, Tseng G. Delayed rectifier K<sup>+</sup> currents have reduced amplitudes and altered kinetics in myocytes from infarcted canine ventricle. *Cardiovasc Res* 2000; **48**:34-43.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 2002a; **417**:515-22.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 2002b; **417**:523-6.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> channel. *Nature* 2003b; **423**:42-8.
- Jiang M, Zhang M, Tang DG, Clemp HF, Liu J, Holwitt D, Kasirajan V, Pond AL, Wettwer E, Tseng GN. KCNE2 protein is expressed in ventricles of different species, and changes in its expression contribute to electrical remodeling in diseased hearts. *Circulation* 2004; **109**:1783-8.
- Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; **298**:1911-2.
- Jones RT. Cardiovascular system effects of marijuana. *J Clin Pharmacol* 2002; **42**:58S-63S.
- Jones E, Roti Roti EC, Wang J, Delfosse SA, Robertson GA. Cardiac I<sub>Kr</sub> channels minimally comprise hERG 1a and 1b subunits. *J Biol Chem* 2004; **279**:44690-44694.
- Jonsson KO, Vandevoorde S, Lambert DM, Tiger G, Fowler CJ. Effects of homologues and analogues of palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide. *Br J Pharmacol* 2001; **133**:1263-75.
- Josephson IR, Sánchez-Chapula J, Brown AM. Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ Res* 1984; **54**:157-162.
- Joyeux M, Arnaud C, Godin-Ribuot D, Demenge P, Lamontagne D, Ribouot C. Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res* 2002; **55**:619-25.
- Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a metansulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> current by dofetilide. *Circ Res* 1993; **72**:75-83.
- Kääb S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 1998; **98**:1383-93.
- Kaczocha M, Glaser ST, Deutsch DG. Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**:6375-80.
- Kalifa J, Tanaka K, Zaitsev AV, Warren M, Vaidyanathan R, Auerbach D, Pandit S, Vikstrom KL, Ploutz-Snyder R, Talkachou A, Atienza F, Guiraudon G, Jalife J, Berenfeld O. Mechanisms of wave fractionation at boundaries of high-frequency excitation in the posterior left atrium of the isolated sheep heart during atrial fibrillation. *Circulation* 2006; **113**:626-633.
- Kang MG, Campbell KP. Gamma subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* 2003; **278**:21315-8.
- Kankaanpää M, Lehto HR, Pärkkä JP, Komu M, Viljanen A, Ferrannini E, Knuuti J, Nuutila P, Parkkola R, Iozzo P. Myocardial triglyceride content and epicardial fat mass in human obesity: relationship to left ventricular function and serum free fatty acid levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**:4689-95.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 2009; **89**:309-80.
- Kaprielian R, Wickenden AD, Kassiri A, Parker TG, Liu PP, Backx PH. Relationship between K<sup>+</sup> channel down-regulation and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. *J Physiol* 1999; **517**:229-245.
- Kapur A, Zhao P, Sharir H, Bai Y, Caron MG, Barak LS, Abood ME. Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *J Biol Chem* 2009; **284**:29817-27.
- Kass RS, Sanguinetti MC. Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. *J Gen Physiol* 1984; **84**:705-26.

- Kass RS, Moss AJ. Long QT syndrome: novel insights into the mechanisms of cardiac arrhythmias. *J Clin Invest* 2003; **112**:810-815.
- Kato T, Yamashita T, Sagara K, Iinuma H, Fu LT. Progressive nature of paroxysmal atrial fibrillation. Observations from a 14-year follow-up study. *Circ J* 2004; **68**:568-72.
- Katona I, Freund TF. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med* 2008; **14**:923-30.
- Katz B. Les constantes electriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* 1949; **2**:285-299.
- Kennedy ME, Nemej J, Clapham DE. Localization and interaction of epitope-tagged GIRK1 and CIR inward rectifier K<sup>+</sup> channel subunits. *Neuropharmacol* 1996; **35**:831-839
- Kenyon JL, Gibbons WR. 4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 1979; **73**:139-57.
- Kim YH, Lim DS, Lee JH, Shim WJ, Ro YM, Park GH, Becker KG, Cho-Chung YS, Kim MK. Gene expression profiling of oxidative stress on atrial fibrillation in humans. *Exp Mol Med* 2003; **35**: 336-349
- Kim J, Ghosh S, Nunziato DA, Pitt GS. Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 2004a; **41**:745-54.
- Kim LA, Furst J, Butler MH, Xu S, Grigorieff N, Goldstein SA. I<sub>to</sub> channels are octomeric complexes with four subunits of each Kv4.2 and K<sup>+</sup> channel-interacting protein 2. *J Biol Chem* 2004b; **279**:5549-54.
- Kim HI, Kim TH, Shin YK, Lee CS, Park M, Song JH. Anandamide suppression of Na<sup>+</sup> currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 2005a; **1062**:39-47.
- Kim YM, Guzik TJ, Zhang YH, Zhang MH, Kattach H, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM, Casadei B. A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circ Res* 2005b; **97**: 629-636.
- Kin Y, Misumi Y, Ikehara Y. Biosynthesis and characterization of the brain-specific membrane protein DPPX, a dipeptidyl peptidase IV-related protein. *J Biochem* 2001; **129**:289-95.
- King A. Prevention: Neuropsychiatric adverse effects signal the end of the line for rimonabant. *Nat Rev Cardiol* 2010; **7**:602.
- Kinosita K Jr, Kawato S, Ikegami A. Dynamic structure of biological and model membranes: analysis by optical anisotropy decay measurement. *Adv Biophys* 1984; **17**:147-203.
- Kirchhof P, Auricchio A, Bax J, Crijns H, Camm J, Diener HC, Goette A, Hindricks G, Hohnloser S, Kappenberger L, Kuck KH, Lip GY, Olsson B, Meinertz T, Priori S, Ravens U, Steinbeck G, Svernhage E, Tijssen J, Vincent A, Breithardt G. Outcome parameters for trials in atrial fibrillation: executive summary. Recommendations from a consensus conference organized by the German Atrial Fibrillation Competence Network (AFNET) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Eur Heart J* 2007; **28**:2803-2817.
- Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, Friedman H. The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol* 2003; **74**:486-96.
- Klößner U, Mikala G, Schwartz A, Varadi G. Molecular studies of the asymmetric pore structure of the human cardiac voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel. Conserved residue, Glu-1086, regulates proton-dependent ion permeation. *J Biol Chem* 1996; **271**:22293-6.
- Knobloch K, Brendel J, Peukert S, Rosenstein B, Busch AE, Wirth KJ. Electrophysiological and antiarrhythmic effects of the novel I(Kur) channel blockers, S9947 and S20951, on left vs. right pig atrium in vivo in comparison with the I(Kr) blockers dofetilide, azimilide, d,l-sotalol and ibutilide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2002; **366**:482-7.
- Kobayashi Y, Arai S, Waku K, Sugiura T. Activation by 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, of p42/44 mitogen-activated protein kinase in HL-60 cells. *J Biochem* 2001; **129**:665-9.
- Koch SE, Bodi I, Schwartz A, Varadi G. Architecture of Ca<sup>2+</sup> channel pore-lining segments revealed by covalent modification of substituted cysteines. *J Biol Chem* 2000; **275**:34493-500.
- Kogan NM, Mechoulam R. Cannabinoids in health and disease. *Dialogues Clin Neurosci* 2007; **9**:413-30.
- Koidl B, Flaschberger P, Schaffer P, Pelzmann B, Bernhart E, Mächler H, Rigler B. Effects of the class III antiarrhythmic drug ambasilide on outward currents in human atrial myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1996; **353**:226-32.
- Kong W, Po S, Yamagishi T, Ashen MD, Stetten G, Tomaselli GF. Isolation and characterization of the human gene encoding I<sub>to</sub>: further diversity by alternative mRNA splicing. *Am J Physiol* 1998; **275**:H1963-H1970.

- Konrad RJ, Major CD, Wolf BA. Diacylglycerol hydrolysis to arachidonic acid is necessary for insulin secretion from isolated pancreatic islets: sequential actions of diacylglycerol and monoacylglycerol lipases. *Biochemistry* 1994; **33**:13284-94.
- Kourliouros A, Savelieva I, Kiotsekoglou A, Jahangiri M, Camm J. Current concepts in the pathogenesis of atrial fibrillation. *Am Heart J* 2009; **157**:243-52.
- Krapivinsky G, Gordon EA, Wickman K, Velimirovic B, Krapivinsky L, Clapham DE. The G-protein-gated atrial  $K_1$  channel  $I_{K_{ACh}}$  is a heteromultimer of two inwardly rectifying  $K^+$  channel protein. *Nature* 1995; **374**:135-141.
- Kreusch A, Pfaffinger PJ, Stevens CF, Choe S. Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature* 1998; **392**:945-8.
- Krogh-Madsen T, Abbott GW, Christini DJ. Effects of Electrical and Structural Remodeling on Atrial Fibrillation Maintenance: A Simulation Study. *Plos Comput Biol* 2012; **8**: e1002390.
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 1993a; **362**:127-33.
- Kubo Y, Reuveny E, Slesinger PA, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature* 1993b; **364**:802-6.
- Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005; **57**:509-26.
- Kumagai K, Akimitsu S, Kawahira K, Kawanami F, Yamanouchi Y, Hiroki T, Arakawa K. Electrophysiological properties in chronic lone atrial fibrillation. *Circulation* 1991; **84**:1662-8.
- Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJ, Lin JL, Hoshijima M, Nguyen-Tran VT, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross J, Giles WR, Chien KR. A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of  $I_{to}$  and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 2001; **107**:801-813.
- Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T, Doyle DA. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 2003; **300**:1922-6.
- Kuo A, Domene C, Johnson LN, Doyle DA, Vénien-Bryan C. Two different conformational states of the KirBac3.1 potassium channel revealed by electron crystallography. *Structure* 2005; **13**:1463-72.
- Kupersmidt S, Yang T, Anderson ME, Wessels A, Niswender KD, Magnuson MA, Roden DM. Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ Res* 1999; **84**:146-152.
- Kurachi Y, Nakajima T, Sugimoto T. Short-term desensitization of muscarinic  $K^+$  channel current in isolated atrial myocytes and possible role of GTP-binding proteins. *Pflügers Arch* 1987; **410**:227-233.
- Kurata HT, Fedida D. A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; **92**:185-208.
- Kurokawa J, Abriel H, Kass RS. Molecular basis of the delayed rectifier current  $I_{Ks}$  in heart. *J Mol Cell Cardiol* 2001; **33**:873-882.
- Kuryshv YA, Gudz TI, Brown AM, Wible BA. KChAP as a chaperone for specific  $K^+$  channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; **278**:C931-41.
- Kwak YG, Hu N, Wei J, George AL Jr, Grobaski TD, Tamkun MM, Murray KT. Protein kinase A phosphorylation alters Kv $\beta$ 1.3 subunit-mediated inactivation of the Kv1.5 potassium channel. *J Biol Chem* 1999; **274**:13928-13932.
- Lagneux C, Lamontagne D. Involvement of cannabinoids in the cardioprotection induced by lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 2001; **132**:793-6.
- Lake KD, Compton DR, Varga K, Martin BR, Kunos G. Cannabinoid-induced hypotension and bradycardia in rats mediated by CB1-like cannabinoid receptors. *Pharmacol Exp Ther* 1997; **281**:1030-7.
- Lalik PH, Krafte DS, Volberg WA, Ciccarelli RB. Characterization of endogenous sodium channel gene expressed in Chinese hamster ovary cells. *Am J Physiol* 1993; **264**:C803-9.
- Lambert DM, Di Marzo V. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr Med Chem* 1999; **6**:757-73.
- Lambert DM, Vandevorde S, Diependaele G, Govaerts SJ, Robert AR. Anticonvulsant activity of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid, in mice. *Epilepsia* 2001; **42**:321-7.
- Lan R, Gatley J, Lu Q, Fan P, Fernando SR, Volkow ND, Pertwee R, Makriyannis A. Design and synthesis of the CB1 selective cannabinoid antagonist AM281:

- a potential human SPECT ligand. *AAPS PharmSci* 1999; **1**:E4.
- Lauckner JE, Hille B, Mackie K. The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**:19144-9.
- Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**:2699-704.
- Lauffer LM, Iakoubov R, Brubaker PL. GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes* 2009; **58**:1058-66.
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitot F, Aubert JF, Beslot F, Böhme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 1999; **283**:401-4.
- Lee KS, Marban E, Tsien RW. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol* 1985; **364**:395-411.
- Lee KS. Potentiation of the calcium-channel currents of internally perfused mammalian heart cells by repetitive depolarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**:3941-5.
- Lee TE, Philipson LH, Nelson DJ. N-type inactivation in the mammalian Shaker K<sup>+</sup> channel Kv1.4. *J Membr Biol* 1996; **151**:225-35.
- Lee MP, Hu RJ, Johnson LA, Feinberg AP. Human KvLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 1997; **15**:181-185.
- Lee GY, Shin YK, Lee CS, Song JH. Effects of arachidonic acid on sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 2002; **950**:95-102.
- Leonoudakis D, Mailliard W, Wingerd K, Clegg D, Vandenberg C. Inward rectifier potassium channel Kir2.2 is associated with synapse-associated protein SAP97. *J Cell Sci* 2001; **114**:987-98.
- Lépicier P, Bouchard JF, Lagneux C, Lamontagne D. Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia. *Br J Pharmacol* 2003; **139**:805-15.
- Lépicier P, Bibeau-Poirier A, Lagneux C, Servant MJ, Lamontagne D. Signaling pathways involved in the cardioprotective effects of cannabinoids. *J Pharmacol Sci* 2006; **102**:155-66.
- Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure. *EMBO J* 1996; **15**:1004-11.
- Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; **279**:F793-801.
- Levy S, Maarek M, Coumel P, Guize L, Lekieffre J, Medvedowsky JL, Sebaoun A. Characterization of different subsets of atrial fibrillation in general practice in France: the ALFA study. The College of French Cardiologists. *Circulation* 1999; **99**:3028-3035.
- Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human ventricular myocytes. *Circ Res* 1996a; **78**:689-696.
- Li GR, Feng J, Wang Z, Fermini B, Nattel S. Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human atrial myocytes. *Circ Res* 1996b; **78**:903-915.
- Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M. Transmural heterogeneity of action potentials and I<sub>to1</sub> in myocytes isolated from the human right ventricle. *Am J Physiol* 1998; **275**:H369-H377.
- Li HL, Qu YJ, Lu YC, Bondarenko VE, Wang S, Skerrett IM, Morales MJ. DPP10 is an inactivation modulatory protein of Kv4.3 and Kv1.4. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006a; **291**:C966-76.
- Li J, Marionneau C, Zhang R, Shah V, Hell JW, Nerbonne JM, Anderson ME. Calmodulin kinase II inhibition shortens action potential duration by upregulation of K<sup>+</sup> currents. *Circ Res* 2006b; **99**:1092-9.
- Li Q, Ma HJ, Zhang H, Qi Z, Guan Y, Zhang Y. Electrophysiological effects of anandamide on rat myocardium. *Br J Pharmacol* 2009; **158**:2022-9.
- Li GR, Dong MQ. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Adv Pharmacol* 2010; **59**:93-134.
- Li Q, Ma HJ, Song SL, Shi M, Ma HJ, Li DP, Zhang Y. Effects of anandamide on potassium channels in rat ventricular myocytes: a suppression of I<sub>to</sub> and augmentation of K<sub>ATP</sub> channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; **302**:C924-30.

- Liao C, Zheng J, David LS, Nicholson RA. Inhibition of voltage-sensitive sodium channels by the cannabinoid 1 receptor antagonist AM251 in mammalian brain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; **94**:73-8.
- Lillo MP, Cañadas O, Dale RE, Acuña AU. Location and properties of the taxol binding center in microtubules: a picosecond laser study with fluorescent taxoids. *Biochemistry* 2002; **41**:12436-49.
- Liman ER, Hess P, Weaver F, Koren G. Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K<sup>+</sup> channel. *Nature* 1991; **353**:752-6.
- Lin S, Khanolkar AD, Fan P, Goutopoulos A, Qin C, Papahadjis D, Makriyannis A. Novel analogues of arachidonylethanolamide (anandamide): affinities for the CB1 and CB2 cannabinoid receptors and metabolic stability. *J Med Chem* 1998; **41**:5353-61.
- Lip GY, Tse HF, Lane DA. Atrial fibrillation. *Lancet* 2012; **379**: 648-61
- Litovsky SH, Antzelevitch C. Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ Res* 1988; **62**:116-126
- Liu J, Gao B, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makriyannis A, Kunos G. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J* 2000; **346**:835-40.
- Liu GX, Derst C, Schlichthörl G, Heinen S, Seeböhm G, Brüggemann A, Kummer W, Veh RW, Daut J, Preisig-Müller R. Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K<sup>+</sup> channels from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol* 2001; **532**:115-26.
- Liu WJ, Wang HT, Chen WW, Deng JX, Jiang Y, Liu J. Co-expression of KCNE2 and KChIP2c modulates the electrophysiological properties of Kv4.2 current in COS-7 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2008; **29**:653-60.
- Lo Verme J, Gaetani S, Fu J, Oveisi F, Burton K, Piomelli D. Regulation of food intake by oleoylethanolamide. *Cell Mol Life Sci* 2005; **62**:708-16.
- Logothetis DE, Jin T, Lupyan D, Rosenhouse-Dantsker A. Phosphoinositide mediated gating of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Pflugers Arch* 2007; **455**:83-95.
- Lograno MD, Romano MR. Cannabinoid agonists induce contractile responses through Gi/o-dependent activation of phospholipase C in the bovine ciliary muscle. *Eur J Pharmacol* 2004; **494**:55-62.
- London B, Trudeau MC, Newton KP, Beyer AK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Satler CA, Robertson GA. Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res* 1997; **81**:870-8.
- London B, Wang DW, Hill JA, Bennet PB. The transient outward current in mice lacking the potassium channel gene Kv1.4. *J Physiol* 1998; **509**:171-182.
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science* 2005a; **309**:897-903.
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 2005b; **309**:903-8.
- Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 1994; **372**:366-9.
- Lopatin AN, Nichols CG. Inward rectifiers in the heart: an update on I<sub>K1</sub>. *J Mol Cell Cardiol* 2001; **33**:625-38.
- Lopes CM, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis DE. Alterations in conserved Kir channel-PIP<sub>2</sub> interactions underlie channelopathies. *Neuron* 2002; **34**:933-944.
- Lopes CM, Remon JJ, Matavel A, Sui JL, Keselman I, Medei E, Shen Y, Rosenhouse-Dantsker A, Rohacs T, Logothetis DE. Protein kinase A modulates PLC-dependent regulation and PIP<sub>2</sub>-sensitivity of K<sup>+</sup> channels. *Channels* 2007; **1**:124-134.
- López-Barneo J, Hoshi T, Heinemann SH, Aldrich RW. Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors Channels* 1993; **1**:61-71.
- Lu Y, Yue L, Wang Z, Nattel S. Effects of the diuretic agent indapamide on Na<sup>+</sup>, transient outward, and delayed rectifier currents in canine atrial myocytes. *Circ Res* 1998; **83**:158-66.
- Lu T, Hoshi T, Weintraub NL, Spector AA, Lee HC. Activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by epoxyeicosatrienoic acids in rat cardiac ventricular myocytes. *J Physiol* 2001; **537**:811-27.
- Luk T, Jin W, Zvonok A, Lu D, Lin XZ, Chavkin C, Makriyannis A, Mackie K. Identification of a potent and highly efficacious, yet slowly desensitizing CB1

- cannabinoid receptor agonist. *Br J Pharmacol* 2004; **142**:495-500.
- Lundby A, Olesen SP. KCNE3 is an inhibitory subunit of the Kv4.3 potassium channel. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **346**:958-967.
- Lundquist AL, Manderfield LJ, Vanoye CG, Rogers CS, Donahue BS, Chang PA, Drinkwater DC, Murray KT, George AL Jr. Expression of multiple KCNE genes in human heart may enable variable modulation of  $I_{Ks}$ . *J Mol Cell Cardiol* 2005; **38**:277-287.
- Maccarrone M, van der Stelt M, Rossi A, Veldink GA, Vliegthart JF, Agrò AF. Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain. *J Biol Chem* 1998; **273**:32332-9.
- Maccarrone M, Bari M, Lorenzon T, Bisogno T, Di Marzo V, Finazzi-Agrò A. Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J Biol Chem* 2000; **275**:13484-92.
- Maccarrone M, Cartoni A, Parolaro D, Margonelli A, Massi P, Bari M, Battista N, Finazzi-Agrò A. Cannabimimetic activity, binding, and degradation of stearoyl ethanolamide within the mouse central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 2002; **21**:126-40.
- Maccarrone M. Endocannabinoids and reproductive endocrinology. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; **10**:305-10.
- Maccarrone M, Dainese E, Oddi S. Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling. *Trends Biochem Sci* 2010; **35**:601-8.
- Maccarrone M, Gasperi V, Catani MV, Diep TA, Dainese E, Hansen HS, Avigliano L. The endocannabinoid system and its relevance for nutrition. *Annu Rev Nutr* 2010; **30**:423-40.
- Mackie K, Hille B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**:3825-9.
- Mackie K, Devane WA, Hille B. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* 1993; **44**:498-503.
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 1995; **15**:6552-61.
- Mackie K. Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. *Int J Obes* 2006; **30**:S19-23
- Mackie K, Stella N. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J* 2006; **8**:E298-306.
- Mackie K. Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J Neuroendocrinol* 2008a; **20**:10-4.
- Mackie K. Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Mol Cell Endocrinol* 2008b; **286**:S60-5.
- MacKinnon R, Yellen G. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated  $K^+$  channels. *Science* 1990; **250**:276-279.
- MacKinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 1991; **350**:232-5.
- MacKinnon R, Aldrich RW, Lee AW. Functional stoichiometry of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 1993; **262**:757-9.
- Maffie J, Rudy B. Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type  $K^+$  currents in neurons. *J Physiol* 2008; **586**:5609-23.
- Maingret F, Patel AJ, Lazdunski M, Honoré E. The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background  $K^+$  channel TASK-1. *EMBO J* 2001; **20**:47-54.
- MacKinnon R. Potassium channels. *FEBS Lett* 2003; **555**:62-5.
- Maisel WH, Stevenson LW. Atrial fibrillation in heart failure: epidemiology, pathophysiology and rationale for therapy. *Am J Cardiol* 2003; **91**:2D-8D
- Maisel WH. Autonomic modulation preceding the onset of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2003; **42**:1269-1073.
- Makielski JC, Limberis JT, Chang SY, Fan Z, Kyle JW. Coexpression of  $\beta 1$  with cardiac sodium channel  $\alpha$  subunits in oocytes decreases lidocaine block. *Mol Pharmacol* 1996; **49**:30-9.
- Makita N, Bennett PB, George AL Jr. Molecular determinants of  $\beta 1$  subunit-induced gating modulation in voltage-dependent  $Na^+$  channels. *J Neurosci*. 1996; **16**:7117-27.
- Makriyannis A, Tian X, Guo J. How lipophilic cannabinergic ligands reach their receptor sites. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005; **77**:210-8.
- Maletic-Savatic M, Lenn NJ, Trimmer JS. Differential spatiotemporal expression of  $K^+$  channel polypeptides in rat hippocampal neurons developing in situ and in vitro. *J Neurosci* 1995; **15**:3840-51.

- Mallat A, Lotersztajn S. Cannabinoid receptors as therapeutic targets in the management of liver diseases. *Drug News Perspect* 2008; **21**:363-8.
- Mandapati R, Skanes A, Chen J, Berenfeld O, Jalife J. Stable microreentrant sources as a mechanism of atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation* 2000; **101**: 194-199.
- Maneuf YP, Brotchie JM. Paradoxical action of the cannabinoid WIN 55,212-2 in stimulated and basal cyclic AMP accumulation in rat globus pallidus slices. *Br J Pharmacol* 1997; **120**:1397-8.
- Mansour M, Mandapati R, Berenfeld O, Chen J, Samie FH, Jalife J. Left-to-right gradient of atrial frequencies during acute atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation* 2001; **103**:2631-2636.
- Mantegazza M, Yu FH, Catterall WA, Scheuer T. Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**:15348-53.
- Mark MD, Herlitz S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Eur J Biochem* 2000; **267**:5830-6.
- Martens JR, Kwak YG, Tamkun MM. Modulation of Kv channel  $\alpha/\beta$  subunit interactions. *Trends Cardiovasc Med* 1999; **9**:253-8.
- Martina M, Schultz JH, Ehmke H, Monyer H, Jonas P. Functional and molecular differences between voltage-gated K<sup>+</sup> channels of fast-spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus. *J Neurosci* 1998; **18**:8111-25.
- Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR, and Kass RS. Requirement of a macromolecular signaling complex for  $\beta$  adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* 2002; **295**:496-499.
- Mateo CR, Lillo MP, González-Rodríguez J, Acuña AU. Molecular order and fluidity of the plasma membrane of human platelets from time-resolved fluorescence depolarization. *Eur Biophys J* 1991; **20**:41-52.
- Mateo CR, Lillo MP, Brochon JC, Martínez-Ripoll M, Sanz-Aparicio J, Acuña AU. Rotational dynamics of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene and derivatives from fluorescence depolarization. *J Phys Chem* 1993; **97**:3486-91.
- Mathie A, Woollorton JRA, Watkins CS. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmac* 1998; **30**:13-24.
- Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and  $\beta$ -pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**:3171-80.
- Mattioli AV. Lifestyle and atrial fibrillation. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2011; **9**:895-902.
- Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel and blocking by internal Mg<sup>2+</sup>. *Nature* 1987; **325**:156-9.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; **346**:561-4.
- Matsuda T, Masumiya H, Tanaka N, Yamashita T, Tsuruzoe N, Tanaka Y, Tanaka H, Shigenoba K. Inhibition by a novel anti-arrhythmic agent, NIP-142, of cloned human cardiac K<sup>+</sup> channel Kv1.5 current. *Life Sci* 2001; **68**:2017-24.
- Massi P, Vaccani A, Parolaro D. Cannabinoids, immune system and cytokin network. *Curr Pharm Des* 2006; **12**:3135-46.
- McAllister SD, Griffin G, Satin LS, Abood ME. Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a xenopus oocyte expression system. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; **291**:618-26.
- McCormack T, McCormack K, Nadal MS, Vieira E, Ozaita A, Rudy B. The effects of *Shaker*  $\beta$ -subunits on the human lymphocyte K<sup>+</sup> channel Kv1.3. *J Biol Chem* 1999; **274**:20123-20126.
- McCrossan ZA, Abbott GW. The MinK-related peptides. *Neuropharmacology* 2004; **47**:787-821.
- McDonald TW, Yu Z, Ming Z, Palm E, Meyers MB, Wang KW, Goldstein SAN, Fishman GI. A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current  $I_{Kr}$ . *Nature* 1997; **388**:289-292.
- McFarland MJ, Porter AC, Rakhshan FR, Rawat DS, Gibbs RA, Barker EL. A role for caveolae/lipid rafts in the uptake and recycling of the endogenous cannabinoid anandamide. *J Biol Chem* 2004; **279**:41991-7.

- McLarnon JG, Xu R. Actions of the benzopyran compound terikalant on macroscopic currents in rat ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; **275**:389-96.
- McLerie M, Lopatin AN. Dominant-negative suppression of  $I_{K1}$  in the mouse heart leads to altered cardiac excitability. *J Mol Cell Cardiol* 2003; **35**:367-78.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995; **50**:83-90.
- Medi C, Sparks PB, Morton JB, Kistler PM, Halloran K, Rosso R, Vohra JK, Kumar S, Kalman JM. Pulmonary vein antral isolation for paroxysmal atrial fibrillation: results from long-term follow-up. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2011; **22**:137-41.
- Meisler MH, Kearney JA. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *J Clin Invest* 2005; **115**:2010-7.
- Mendizábal VE, Adler-Graschinsky E. Cannabinoids as therapeutic agents in cardiovascular disease: a tale of passions and illusions. *Br J Pharmacol* 2007; **151**:427-40.
- Meszaros J, Ryder KO, Hart G. Transient outward current in catecholamine-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Am J Physiol* 1996; **271**:H2360- H2368.
- Michael G, Xiao L, Qi XY, Dobrev D, Nattel S. Remodelling of cardiac repolarization: how homeostatic responses can lead to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* 2009; **81**:491-9
- Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, Reiser PJ, McCarthy PM, Van Wagoner DR, Bauer JA. Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation* 2001; **104**:174-180.
- Mikala G, Bahinski A, Yatani A, Tang S, Schwartz A. Differential contribution by conserved glutamate residues to an ion-selectivity site in the L-type  $Ca^{2+}$  channel pore. *FEBS Lett* 1993; **335**:265-9.
- Mikala G, Klöckner U, Varadi M, Eisfeld J, Schwartz A, Varadi G. cAMP-dependent phosphorylation sites and macroscopic activity of recombinant cardiac L-type calcium channels. *Mol Cell Biochem* 1998; **185**:95-109.
- Miller LK, Devi LA. The highs and lows of cannabinoid receptor expression in disease: mechanisms and their therapeutic implications. *Pharmacol Rev* 2011; **63**:461-70.
- Mitcheson JS, Sanguinetti MC. Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell Physiol Biochem* 1999; **9**:201-216.
- Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti M. A structural basis for drug induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**:12329-12333.
- Mitra R, Morad M. Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83**:5340-4.
- Miyasaka Y, Barnes ME, Gersh BJ, Cha SS, Bailey KR, Abhayaratna WP, Seward JB, Tsang TS. Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence. *Circulation* 2006; **114**:119-125.
- Mombouli JV, Schaeffer G, Holzmann S, Kostner GM, Graier WF. Anandamide-induced mobilization of cytosolic  $Ca^{2+}$  in endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1999; **126**:1593-600.
- Moe GK, Abildskov JA. Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge. *Am Heart J* 1959; **58**:59-70.
- Moe GK, Rheinboldt WC, Abildskov JA. A computer model of atrial fibrillation. *Am Heart J* 1964; **67**:200-220.
- Montani JP, Carroll JF, Dwyer TM, Antic V, Yang Z, Dulloo AG. Ectopic fat storage in heart, blood vessels and kidneys in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; **28**:S58-65.
- Montecucco F, Lenglet S, Braunersreuther V, Burger F, Pelli G, Bertolotto M, Mach F, Steffens S. CB2 cannabinoid receptor activation is cardioprotective in a mouse model of ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2009; **46**:612-20.
- Monteleone P, Castaldo E, Maj M. Neuroendocrine dysregulation of food intake in eating disorders. *Regul Pept* 2008; **149**:39-50.
- Moore SA, Nomikos GG, Dickason-Chesterfield AK, Schober DA, Schaus JM, Ying BP, Xu YC, Phebus L, Simmons RM, Li D, Iyengar S, Felder CC. Identification of a high-affinity binding site involved

- in the transport of endocannabinoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**:17852-7.
- Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R. Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. *Nature* 2001; **414**:37-42.
- Morales MJ, Castellino RC, Crews AL, Rasmusson RL, Strauss HC. A novel  $\beta$  subunit increases rate of inactivation of specific voltage-gated potassium channel  $\alpha$  subunits. *J Biol Chem* 1995; **270**:6272-6277.
- Moreau C, Jacquet H, Prost AL, D'hahan N, Vivaudou M. The molecular basis of the specificity of action of K<sub>ATP</sub> channel openers. *EMBO J* 2000; **19**:6644-6651.
- Moreau C, Prost AL, Derand R, Vivaudou M. SUR, ABC proteins targeted by K<sub>ATP</sub> channel openers. *J Mol Cell Cardiol* 2005; **38**:951-963.
- Moreira FA, Crippa JA. The psychiatric side-effects of rimonabant. *Rev Bras Psiquiatr* 2009; **31**:145-53.
- Moreno I, Caballero R, González T, Arias C, Valenzuela C, Iriepa I, Gálvez E, Tamargo J, Delpón E. Effects of irbesartan on cloned potassium channels involved in human cardiac repolarization. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; **304**:862-73.
- Moreno-Galindo EG, Barrio-Echavarría GF, Vásquez JC, Decher N, Sachse FB, Tristani-Firouzi M, Sánchez-Chapula JA, Navarro-Polanco RA. Molecular basis for a high-potency open-channel block of Kv1.5 channel by the endocannabinoid anandamide. *Mol Pharmacol* 2010; **77**:751-8.
- Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Whyte L, Díaz-Arteaga A, Vázquez-Martínez R, Rotellar F, Guzmán R, Gómez-Ambrosi J, Pulido MR, Russell WR, Imbernón M, Ross RA, Malagón MM, Dieguez C, Fernández-Real JM, Frühbeck G, Nogueiras R. The L- $\alpha$ -Lysophosphatidylinositol/GPR55 System and Its Potential Role in Human Obesity. *Diabetes* 2012; **61**:281-91.
- Morgan K, Stevens EB, Shah B, Cox PJ, Dixon AK, Lee K, Pinnock RD, Hughes J, Richardson PJ, Mizuguchi K, Jackson AP.  $\beta$ 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**:2308-13.
- Mori Y, Mikala G, Varadi G, Kobayashi T, Koch S, Wakamori M, Schwartz A. Molecular pharmacology of voltage-dependent calcium channels. *Jpn J Pharmacol* 1996; **72**:83-109.
- Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM. Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* 1995; **91**:1588-1595.
- Motoike HK, Liu H, Glaaser IW, Yang AS, Tateyama M, Kass RS. The Na<sup>+</sup> channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol* 2004; **123**:155-65.
- Mouslech Z, Valla V. Endocannabinoid system: An overview of its potential in current medical practice. *Neuro Endocrinol Lett* 2009; **30**:153-79.
- Mu J, Zhuang SY, Kirby MT, Hampson RE, Deadwyler SA. Cannabinoid receptors differentially modulate potassium A and D currents in hippocampal neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; **291**:893-902.
- Mu J, Zhuang SY, Hampson RE, Deadwyler SA. Protein kinase-dependent phosphorylation and cannabinoid receptor modulation of potassium A current ( $I_A$ ) in cultured rat hippocampal neurons. *Pflugers Arch* 2000; **439**:541-6.
- Mubagwa K, Flameng W, Carmeliet E. Resting and action potentials of nonischemic and chronically ischemic human ventricular muscle. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1994; **5**:659-71.
- Mukhopadhyay P, Bátkai S, Rajesh M, Czifra N, Harvey-White J, Haskó G, Zsengeller Z, Gerard NP, Liaudet L, Kunos G, Pacher P. Pharmacological inhibition of CB1 cannabinoid receptor protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Am Coll Cardiol* 2007; **50**:528-36.
- Müller-Ehmsen J, Näbauer M, Schwinger RH. Na<sup>+</sup> channel modulating effect of the inotropic compound S(-)BDF 9196 in human myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; **359**:60-4.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; **365**:61-5.
- Muñoz V, Grzeda KR, Desplantez T, Pandit SV, Mironov S, Taffet SM, Rohr S, Kléber AG, Jalife J. Adenoviral expression of  $I_{Ks}$  contributes to wavebreak and fibrillatory conduction in neonatal rat ventricular cardiomyocyte monolayers. *Circ Res* 2007; **101**:475-83.
- Murai T, Kakizuka A, Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Molecular cloning and sequence analysis of human genomic DNA encoding a novel membrane protein which exhibits a slowly activating potassium channel activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **161**:176-81.

- Näbauer M, Beuckelmann DJ, Erdmann E. Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993; **73**:386-94.
- Näbauer M, Beuckelmann DJ, Überfuhr P, Steinbeck G. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* 1996; **93**:168-177.
- Nabauer M, Gerth A, Limbourg T, Schneider S, Oeff M, Kirchhof P, Goette A, Lewalter T, Ravens U, Meinertz T, Breithardt G, Steinbeck G. The Registry of the German Competence NETwork on Atrial Fibrillation: patient characteristics and initial management. *Europace* 2009; **11**:423-434.
- Naccarato M, Pizzuti D, Petrosino S, Simonetto M, Ferigo L, Grandi FC, Pizzolato G, Di Marzo V. Possible Anandamide and Palmitoylethanolamide involvement in human stroke. *Lipids Health Dis* 2010; **9**:47.
- Nadal MS, Ozaita A, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Ma Y, Mo W, Goldberg EM, Misumi Y, Ikehara Y, Neubert TA, Rudy B. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K<sup>+</sup> channels. *Neuron* 2003; **37**:449-61.
- Nakahira K, Shi G, Rhodes KJ, Trimmer JS. Selective interaction of voltage-gated K<sup>+</sup> channel  $\beta$ -subunits with  $\alpha$ -subunits. *J Biol Chem* 1996; **271**:7084-9.
- Nakamura TY, Coetzee WA, Vega-Saenz De Miera E, Artman M, Rudy B. Modulation of Kv4 channels, key components of rat ventricular transient outward K<sup>+</sup> current, by PKC. *Am J Physiol* 1997; **273**:H1775-86.
- Narayan SM, Krummen DE, Rappel WJ. Clinical mapping approach to diagnose electrical rotors and focal impulse sources for human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2012; **5**:447-54.
- Nattel S, Singh BN. Evolution, mechanisms, and classification of antiarrhythmic drugs: focus on class III actions. *Am J Cardiol* 1999; **84**:11R-19R.
- Nattel S, Yue L, Wang Z. Cardiac ultrarapid delayed rectifiers. A novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell Physiol Biochem* 1999; **9**:217-226.
- Nattel S, Li D, Yue L. Basic mechanisms of atrial fibrillation. Very new insights into very old ideas. *Annu Rev Physiol* 2000; **62**:51-77.
- Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002; **415**:219-226.
- Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev* 2007; **87**:425-56.
- Nattel S, Frelin Y, Gaborit N, Louault C, Demolombe S. Ion-channel mRNA-expression profiling: Insights into cardiac remodeling and arrhythmic substrates. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**:96-105.
- Németh B, Ledent C, Freund TF, Hájos N. CB1 receptor-dependent and -independent inhibition of excitatory postsynaptic currents in the hippocampus by WIN 55,212-2. *Neuropharmacology* 2008; **54**:51-7.
- Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000; **525**:285-298.
- Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005; **85**:1205-53.
- Nernst W. Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper: Theorie der Diffusion. *Z phys Chem* 1888; **2**:613-637.
- Nichols CG, Makhina EN, Pearson WL, Sha Q, Lopatin AN. Inward rectification and implications for cardiac excitability. *Circ Res* 1996; **78**:1-7.
- Nicholson RA, Liao C, Zheng J, David LS, Coyne L, Errington AC, Singh G, Lees G. Sodium channel inhibition by anandamide and synthetic cannabimimetics in brain. *Brain Res* 2003; **978**:194-204.
- Nicolaou VN, Papadakis JE, Karatzis EN, Dermitzaki SI, Tsakiris AK, Skoufas PD. Impact of the metabolic syndrome on atrial size in patients with new-onset atrial fibrillation. *Angiology* 2007; **58**:21-5.
- Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 1985; **316**:443-6.
- Ning Y, O'Neill K, Lan H, Pang L, Shan LX, Hawes BE, Hedrick JA. Endogenous and synthetic agonists of GPR119 differ in signalling pathways and their effects on insulin secretion in MIN6c4 insulinoma cells. *Br J Pharmacol* 2008; **155**:1056-65.
- Nishida M, MacKinnon R. Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell* 2002; **111**:957-65.

- Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992; **258**:607-14.
- Nithipatikom K, Moore JM, Isbell MA, Falck JR, Gross GJ. Epoxyeicosatrienoic acids in cardioprotection: ischemic versus reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; **291**:H537-42.
- Niwa N, Nerbonne JM. Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current ( $I_{to}$ ) expression and regulation. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**:12-25.
- Noble D. The surprising heart: a review of recent progress in cardiac electrophysiology. *J Physiol* 1984; **353**:1-50.
- Noda M, Suzuki H, Numa S, Stühmer W. A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett*. 1989; **259**:213-6.
- Núñez L, Vaquero M, Gómez R, Caballero R, Mateos-Cáceres P, Macaya C, Iriepa I, Gálvez E, López-Farré A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide blocks hKv1.5 channels by S-nitrosylation and by a cyclic GMP-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 2006; **72**:80-9.
- Núñez L, Barana A, Amorós I, de la Fuente MG, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Rodríguez-García I, Mosquera I, Monserrat L, Delpón E, Caballero R, Castro-Beiras A, Tamargo J. p.D1690N Nav1.5 rescues p.G1748D mutation gating defects in a compound heterozygous Brugada syndrome patient. *Heart Rhythm* 2012 [Epub ahead of print]
- O'Connell AD, Morton MJ, Hunter M. Two-pore domain  $K^+$  channels-molecular sensors. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1566**:152-61.
- O'Reilly JP, Wang SY, Kallen RG, Wang GK. Comparison of slow inactivation in human heart and rat skeletal muscle  $Na^+$  channel chimaeras. *J Physiol* 1999; **515**:61-73.
- Oddi S, Fezza F, Pasquariello N, De Simone C, Rapino C, Dainese E, Finazzi-Agrò A, Maccarrone M. Evidence for the intracellular accumulation of anandamide in adiposomes. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**:840-50.
- Oddi S, Fezza F, Pasquariello N, D'Agostino A, Catanzaro G, De Simone C, Rapino C, Finazzi-Agrò A, Maccarrone M. Molecular identification of albumin and Hsp70 as cytosolic anandamide-binding proteins. *Chem Biol* 2009; **16**:624-32.
- Offertáler L, Mo FM, Bátakai S, Liu J, Begg M, Razdan RK, Martin BR, Bukoski RD, Kunos G. Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 2003; **63**:699-705.
- Ogielska EM, Zagotta WN, Hoshi T, Heinemann SH, Haab J, Aldrich RW. Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of  $K^+$  channels. *Biophys J* 1995; **69**:2449-57.
- Ohno S, Zankov DP, Ding WG, Itoh H, Makiyama T, Doi T, Shizuta S, Hattori T, Miyamoto A, Naiki N, Hancox JC, Matsuura H, Horie M. KCNE5 (KCNE1L) Variants Are Novel Modulators of Brugada Syndrome and Idiopathic Ventricular Fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011; **4**:352-61.
- Ohya S, Morohashi Y, Muraki K, Tomita T, Watanabe M, Iwatsubo T, Imaizumi Y. Molecular cloning and expression of the novel splice variants of  $K^+$  channel-interacting protein 2. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **282**:96-102.
- Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **362**:928-34.
- Oka S, Kimura S, Toshida T, Ota R, Yamashita A, Sugiura T. Lysophosphatidylinositol induces rapid phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase and activating transcription factor 2 in HEK293 cells expressing GPR55 and IM-9 lymphoblastoid cells. *J Biochem* 2010; **147**:671-8.
- Oliver D, Lien CC, Soom M, Baukowitz T, Jonas P, Fakler B. Functional conversion between A-type and delayed rectifier  $K^+$  channels by membrane lipids. *Science* 2004; **304**:265-70.
- Olson TM, Alekseev AE, Liu XK, Park S, Zingman LV, Bienengraeber M, Sattiraju S, Ballew JD, Jahangir A, Terzic A. Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation. *Hum Mol Genet* 2006; **15**:2185-2191.
- Orgado JM, Fernández-Ruiz J, Romero J. The endocannabinoid system in neuropathological states. *Int Rev Psychiatry* 2009; **21**:172-80.
- Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátakai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, Kunos G. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005; **115**:1298-305.

- Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C, Backx PH. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current ( $I_{to}$ ) in normal and diseased myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001; **33**:851-872.
- Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab* 2006; **3**:167-75.
- Oxford GS, Yeh JZ. Interactions of monovalent cations with sodium channels in squid axon. I. Modification of physiological inactivation gating. *J Gen Physiol* 1985; **85**:583-602.
- Oz M, Tchuginova YB, Dunn SM. Endogenous cannabinoid anandamide directly inhibits voltage-dependent  $Ca^{2+}$  fluxes in rabbit T-tubule membranes. *Eur J Pharmacol* 2000; **404**:13-20.
- Oz M, Tchuginova Y, Dinc M. Differential effects of endogenous and synthetic cannabinoids on voltage-dependent calcium fluxes in rabbit T-tubule membranes: comparison with fatty acids. *Eur J Pharmacol* 2004; **502**:47-58.
- Oz M. Receptor-independent effects of endocannabinoids on ion channels. *Curr Pharm Des* 2006; **12**:227-39.
- Pacher P, Batkai S, Kunos G. Haemodynamic profile and responsiveness to anandamide of TRPV1 receptor knock-out mice. *J Physiol* 2004; **558**:647-57.
- Pacher P, Batkai S, Kunos G. Blood pressure regulation by endocannabinoids and their receptors. *Neuropharmacology* 2005a; **48**:1130-8.
- Pacher P, Batkai S, Kunos G. Cardiovascular pharmacology of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 2005b; **168**:599-625.
- Pacher P, Batkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2006; **58**:389-462.
- Pacher P, Mukhopadhyay P, Mohanraj R, Godlewski G, Batkai S, Kunos G. Modulation of the endocannabinoid system in cardiovascular disease: therapeutic potential and limitations. *Hypertension* 2008; **52**:601-7.
- Pacher P, Steffens S. The emerging role of the endocannabinoid system in cardiovascular disease. *Semin Immunopathol* 2009; **31**:63-77.
- Pan X, Ikeda SR, Lewis DL. Rat brain cannabinoid receptor modulates N-type  $Ca^{2+}$  channels in a neuronal expression system. *Mol Pharmacol* 1996; **49**:707-14.
- Pandey R, Mousawy K, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmacol Res* 2009; **60**:85-92.
- Pandit SV, Berenfeld O, Anumonwo JM, Zaritski RM, Kneller J, Nattel S, Jalife J. Ionic determinants of functional reentry in a 2-D model of human atrial cells during simulated chronic atrial fibrillation. *Biophys J* 2005; **88**:3806-21.
- Panyi G, Sheng Z, Deutsch C. C-type inactivation of a voltage-gated  $K^{+}$  channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys J* 1995; **69**:896-903.
- 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.
- Patel AJ, Honore E. Properties and modulation of mammalian 2P domain  $K^{+}$  channels. *Trends Neurosci* 2001; **24**:339-46.
- Patel SP, Campbell DL, Strauss HC. Elucidating KChIP effects on Kv4.3 inactivation and recovery kinetics with a minimal KChIP2 isoform. *J Physiol* 2002; **545**:5-11.
- Patel SP, Campbell DL. Transient outward potassium current,  $I_{to}$ , phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol* 2005; **569**:7-39.
- Patel KD, Davison JS, Pittman QJ, Sharkey KA. Cannabinoid CB2 receptors in health and disease. *Curr Med Chem* 2010; **17**:1393-410.
- Patlak JB, Ortiz M. Slow currents through single sodium channels of the adult rat heart. *J Gen Physiol* 1985; **86**:89-104.
- Pegan S, Arrabit C, Zhou W, Kwiatkowski W, Collins A, Slesinger PA, Choe S. Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat Neurosci* 2005; **8**:279-87.
- Pelleg A, Belardinelli L. Cardiac electrophysiology and pharmacology of adenosine: basic and clinical aspects. *Cardiovasc Res* 1993; **27**:54-61.
- Pereon Y, Demolombe S, Baro I, Drouin E, Charpentier F, Escande D. Differential expression of KvLQT1 isoforms across the human ventricular wall. *Am J Physiol* 2000; **278**:H1908-H1915.

- Pérez-García MT, López-López JR, González C. Kv $\beta$ 1.2 subunit coexpression in HEK293 cells confers O<sub>2</sub> sensitivity to Kv4.2 but not to *Shaker* channels. *J Gen Physiol* 1999; **113**:897-907.
- Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol Rev* 2003; **83**:117-61.
- Persson F, Carlsson L, Duker G, Jacobson I. Blocking characteristics of hKv1.5 and hKv4.3/hKChIP2.2 after administration of the novel antiarrhythmic compound AZD7009. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; **46**:7-17.
- Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 1997; **74**:129-80.
- Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 1999; **6**:635-64.
- Pertwee RG. Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 2001; **48**:859-67.
- Pertwee RG. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 2005a; **168**:1-51.
- Pertwee RG. The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *AAPS J* 2005b; **7**:E625-54.
- Pertwee RG. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br J Pharmacol* 2007; **152**:984-6.
- Pertwee RG. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *Br J Pharmacol* 2009; **156**:397-411.
- Pertwee RG. Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Curr Med Chem* 2010; **17**:1360-81.
- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacol Rev* 2010; **62**:588-631.
- Peters NS, Schilling RJ, Kanagaratnam P, Markides V. Atrial fibrillation: strategies to control, combat, and cure. *Lancet* 2002; **359**:593-603.
- Peterson BZ, Lee JS, Mulle JG, Wang Y, de Leon M, Yue DT. Critical determinants of Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Biophys J* 2000; **78**:1906-20.
- Pietr M, Kozela E, Levy R, Rimmerman N, Lin YH, Stella N, Vogel Z, Juknat A. Differential changes in GPR55 during microglial cell activation. *FEBS Lett* 2009; **583**:2071-6.
- Pietrobon D, Hess P. Novel mechanism of voltage-dependent gating in L-type calcium channels. *Nature* 1990; **346**:651-5.
- Pioletti M, Findeisen F, Hura GL, Minor DL Jr. Three-dimensional structure of the KChIP1-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer. *Nat Struct Mol Biol* 2006; **13**:987-95.
- Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie XQ, Makriyannis A. Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**:5802-7.
- Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 2003; **4**:873-84.
- Pisanti S, Bifulco M. Endocannabinoid system modulation in cancer biology and therapy. *Pharmacol Res* 2009; **60**:107-16.
- Pistis M, Melis M. From surface to nuclear receptors: the endocannabinoid family extends its assets. *Curr Med Chem* 2010; **17**:1450-67.
- Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canún S, Bendahhou S, Tsunoda A, Donaldson MR, Iannaccone ST, Brunt E, Barohn R, Clark J, Deymeer F, George AL Jr, Fish FA, Hahn A, Nitu A, Ozdemir C, Serdaroglu P, Subramony SH, Wolfe G, Fu YH, Ptáček LJ. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* 2001; **105**:511-519.
- Po SS, Wu RC, Juang GJ, Kong W, Tomaselli GF. Mechanism of  $\alpha$ -adrenergic regulation of expressed hKv4.3 currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; **281**:H2518-27.
- Poling JS, Rogawski MA, Salem N Jr, Vicini S. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits Shaker-related voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Neuropharmacology* 1996; **35**:983-91.
- Pond AL, Scheve BK, Benedict AT, Petrecca K, Van Wagoner DR, Shrier A, Nerbonne JM. Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart. Relation to functional I<sub>Kr</sub> channels. *J Biol Chem* 2000; **275**:5997-6006.

- Pound EM, Kang JX, Leaf A. Partitioning of polyunsaturated fatty acids, which prevent cardiac arrhythmias, into phospholipid cell membranes. *J Lipid Res* 2001; **42**:346-51.
- Potreau D, Gómez JP, Fares N. Depressed transient outward current in single hypertrophied cardiomyocytes isolated from the right ventricle of ferret heart. *Cardiovasc Res* 1995; **30**:440-448.
- Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP. Calcium channel  $\beta$ -subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the  $\alpha 1$ -subunit. *Nature* 1994; **368**:67-70.
- Priori SG, Pandit SV, Rivolta I, Berenfeld O, Ronchetti E, Dhamoon A, Napolitano C, Anumonwo J, di Barletta MR, Gudappakkam S, Bosi G, Stramba-Badiale M, Jalife J. A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ Res* 2005; **96**:800-807.
- Prystowsky EN, Camm J, Lip GY, Allessie M, Bergmann JF, Breithardt G, Brugada J, Crijns H, Ellinor PT, Mark D, Naccarelli G, Packer D, Tamargo J. The impact of new and emerging clinical data on treatment strategies for atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2010; **21**:946-58.
- Pu J, Wada T, Valdivia C, Chutkow WA, Burant CF, Makielski JC. Evidence of  $K_{ATP}$  channels in native cardiac cells without SUR. *Biophys J* 2001; **80**:863-868.
- Pucéat M, Hilal-Dandan R, Strulovici B, Brunton LL, Brown JH. Differential regulation of protein kinase C isoforms in isolated neonatal and adult rat cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1994; **269**:16938-44
- Pusch M. Increase of the single-channel conductance of KvLQT1 potassium channels induced by the association with minK. *Pflügers Arch* 1998; **437**:172-174.
- Qin D, Zhang ZH, Caref EB, Boutjdir M, Jain P, el-Sherif N. Cellular and ionic basis of arrhythmias in postinfarction remodeled ventricular myocardium. *Circ Res* 1996; **79**:461-73.
- Quercioli A, Pataky Z, Vincenti G, Makoundou V, Di Marzo V, Montecucco F, Carballo S, Thomas A, Staub C, Steffens S, Seimille Y, Golay A, Ratib O, Harsch E, Mach F, Schindler TH. Elevated endocannabinoid plasma levels are associated with coronary circulatory dysfunction in obesity. *Eur Heart J* 2011; **32**:1369-78.
- Radicke S, Cotella D, Graf EM, Ravens U, Wettwer E. Expression and function of dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6 as a putative  $\beta$ -subunit of human cardiac transient outward current encoded by Kv4.3. *J Physiol* 2005; **565**:751-6.
- Radicke S, Cotella D, Graf EM, Banse U, Jost N, Varró A, Tseng GN, Ravens U, Wettwer E. Functional modulation of the transient outward current  $I_{to}$  by KCNE  $\beta$ -subunits and regional distribution in human non-failing and failing hearts. *Cardiovasc Res* 2006; **71**:695-703.
- Radicke S, Cotella D, Bortoluzzi A, Ravens U, Sblattero D, Wettwer E. DPP10 - A new putative regulatory  $\beta$  subunit of  $I_{to}$  in failing and non-failing human heart. *Circulation* 2007; **116**:II.187 (abstract).
- Radicke S, Vaquero M, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Tamargo J, Ravens U, Wettwer E, Delpón E. Effects of MiRP1 and DPP6  $\beta$ -subunits on the blockade induced by flecainide of Kv4.3/KChIP2 channels. *Br J Pharmacol* 2008; **154**:774-86.
- Rajamani S, Anderson CL, Anson BD, January CT. Pharmacological rescue of human  $K^+$  channel long-QT2 mutations: human ether-a-go-go-related gene rescue without block. *Circulation* 2002; **105**:2830-2835.
- Rajesh M, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Haskó G, Liaudet L, Huffman JW, Csiszar A, Ungvari Z, Mackie K, Chatterjee S, Pacher P. CB2-receptor stimulation attenuates TNF- $\alpha$ -induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; **293**:H2210-8.
- Rajesh M, Mukhopadhyay P, Haskó G, Huffman JW, Mackie K, Pacher P. CB2 cannabinoid receptor agonists attenuate TNF- $\alpha$ -induced human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Br J Pharmacol* 2008a; **153**:347-57.
- Rajesh M, Mukhopadhyay P, Haskó G, Pacher P. Cannabinoid CB1 receptor inhibition decreases vascular smooth muscle migration and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008b; **377**:1248-52.
- Rakhshan F, Day TA, Blakely RD, Barker EL. Carrier-mediated uptake of the endogenous cannabinoid anandamide in RBL-2H3 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **292**:960-7.
- Randall MD, Harris D, Kendall DA, Ralevic V. Cardiovascular effects of cannabinoids. *Pharmacol Ther* 2002; **95**:191-202.
- Randall MD, Kendall DA, O'Sullivan S. The complexities of the cardiovascular actions of cannabinoids. *Br J Pharmacol* 2004; **142**:20-6.

- Rasmusson RL, Morales MJ, Castellino RC, Zhang Y, Campbell DL, Strauss HC. C-type inactivation controls recovery in a fast inactivating cardiac K<sup>+</sup> channel (Kv1.4) expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 1995; **489**:709-21.
- Rasmusson RL, Morales MJ, Wang S, Liu S, Campbell DL, Brahmajothi MV, Strauss HC. Inactivation of voltage-gated cardiac K<sup>+</sup> channels. *Circ Res* 1998; **82**:739-50.
- Ravinet Trillou C, Arnone M, Delgorge C, Gonalons N, Keane P, Maffrand JP, Soubrie P. Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; **284**:R345-53.
- Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, Siegl PK, Strang I, Sullivan AT, Wallis R, Camm AJ, Hammond TG. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res* 2003; **58**:32-45.
- Rensma PL, Allessie MA, Lammers WJ, Bonke FI, Schalij MJ. Length of excitation wave and susceptibility to reentrant atrial arrhythmias in normal conscious dogs. *Circ Res* 1988; **62**:395-410.
- Rettig J, Heinemann SH, Wunder F, Lorra C, Parcej DN, Dolly JO, Pongs O. Inactivation properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by presence of  $\beta$ -subunit. *Nature* 1994; **369**:289-94.
- Reuter H. Divalent cations as change carriers in excitable membranes. *Prog Biophys Mol Biol* 1973; **26**:1-43.
- Rhee MH, Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z. Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem* 1998; **71**:1525-34.
- Rexrode KM, Manson JE, Hennekens CH. Obesity and cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol* 1996; **11**:490-5.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Néliat G, Caput D, Ferrara P, Soubrié P, Brelière JC, Le Fur G. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 1994; **350**:240-4.
- Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Shire D, Bouaboula M, Oustric D, Barth F, Casellas P, Ferrara P, Le Fur G. Characterization of two cloned human CB1 cannabinoid receptor isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; **278**:871-878.
- Robbe D, Alonso G, Duchamp F, Bockaert J, Manzoni OJ. Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J Neurosci* 2001; **21**:109-16.
- Roberds SL, Knoth KM, Po S, Blair TA, Bennett PB, Hartshorne RP, Snyders DJ, Tamkun MM. Molecular biology of the voltage-gated potassium channels of the cardiovascular system. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1993; **4**:68-80.
- Roberts R. Genomics and cardiac arrhythmias. *J Am Coll Cardiol* 2006; **47**:9-21.
- Roche R, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Gonthier MP, Laborde C, Baron JF, Haffaf Y, Cesari M, Festy F. Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol* 2006; **126**:177-87.
- Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Gómez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodríguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* 2001; **414**:209-12.
- Romero J, Orgado JM. Cannabinoids and neurodegenerative diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2009; **8**:440-50.
- Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE, McKinnon D. Regulation of KChIP2 potassium channel  $\beta$  subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol* 2001; **533**:119-125.
- Ross RA, Brockie HC, Stevenson LA, Murphy VL, Templeton F, Makriyannis A, Pertwee RG. Agonist-inverse agonist characterization at CB1 and CB2 cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630. *Br J Pharmacol* 1999; **126**:665-72.
- Ross RA. The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol Sci* 2009; **30**:156-63.
- Ross S, Peselow E. The neurobiology of addictive disorders. *Clin Neuropharmacol* 2009; **32**:269-76.
- Roux B, MacKinnon R. The cavity and pore helices in the KcsA K<sup>+</sup> channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* 1999; **285**:100-102.
- Rudy B. Slow inactivation of the sodium conductance in squid giant axons. Pronase resistance. *J Physiol* 1978; **283**:1-21.

- Rueda D, Galve-Roperh I, Haro A, Guzmán M. The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Pharmacol* 2000; **58**:814-20.
- Rüegg UT, Burgess GM. Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci* 1989; **10**:218-20.
- Ruilope LM, Després JP, Scheen A, Pi-Sunyer X, Mancía G, Zanchetti A, Van Gaal L. Effect of rimonabant on blood pressure in overweight/obese patients with/without co-morbidities: analysis of pooled RIO study results. *J Hypertens* 2008; **26**:357-67.
- Ruppersberg JP, Schröter KH, Sakmann B, Stocker M, Sewing S, Pongs O. Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* 1990; **345**:535-7.
- Ryberg E, Vu HK, Larsson N, Groblewski T, Hjorth S, Elebring T, Sjögren S, Greasley PJ. Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB1 receptor. *FEBS Lett* 2005; **579**:259-64.
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 2007; **152**:1092-101.
- Sade H, Muraki K, Ohya S, Hatano N, Imaizumi Y. Activation of large-conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by cannabinoids. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; **290**:C77-86.
- Sagan S, Venance L, Torrens Y, Cordier J, Glowinski J, Giaume C. Anandamide and WIN 55212-2 inhibit cyclic AMP formation through G-protein-coupled receptors distinct from CB1 cannabinoid receptors in cultured astrocytes. *Eur J Neurosci* 1999; **11**:691-9.
- Saikawa T, Carmeliet E. Slow recovery of the maximal rate of rise ( $V_{max}$ ) of the action potential in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch* 1982; **394**:90-93.
- Sakmann B, Noma A, Trautwein W. Acetylcholine activation of single muscarinic K<sup>+</sup> channel in isolated pacemaker cells of mammalian heart. *Nature* 1983; **303**:250-253.
- Samie FH, Berenfeld O, Anumonwo J, Mironov SF, Udassi S, Beaumont J, Taffet S, Pertsov AM, Jalife J. Rectification of the background potassium current: a determinant of rotor dynamics in ventricular fibrillation. *Circ Res* 2001; **89**:1216-1223.
- Sánchez C, Galve-Roperh I, Rueda D, Guzmán M. Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol Pharmacol* 1998; **54**:834-43.
- Sánchez C, Rueda D, Ségui B, Galve-Roperh I, Levade T, Guzmán M. The CB1 cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein fan. *Mol Pharmacol* 2001; **59**:955-9.
- Sanchez-Chapula JA. Mechanism of transient outward K<sup>+</sup> channel block by disopyramide. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; **90**:515-23.
- Sanders P, Berenfeld O, Hocini M, Jaïs P, Vaidyanathan R, Hsu LF, Garrigue S, Takahashi Y, Rotter M, Sacher F, Scavée C, Ploutz-Snyder R, Jalife J, Haïssaguerre M. Spectral analysis identifies sites of high-frequency activity maintaining atrial fibrillation in humans. *Circulation* 2005; **112**:789-797.
- Sanguinetti M, Jurkiewicz N. Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 1990; **96**:195-215.
- Sanguinetti M, Jurkiewicz N. Delayed rectifier outward K<sup>+</sup> current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am J Physiol* 1991; **260**:H393-H399.
- Sanguinetti M, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I<sub>Kr</sub> potassium channel. *Cell* 1995; **81**:299-307.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Spector PS, Keating MT. Spectrum of HERG K<sup>+</sup> channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996a; **93**:2208-2212.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT. Coassembly of KvLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I<sub>Ks</sub> potassium channel. *Nature* 1996b; **384**:80-83.
- Sanguinetti M, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 2006; **440**:463-469.
- Sanguinetti MC. HERG1 channelopathies. *Pflügers Arch* 2010; **460**:265-76.
- Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Afaq F, Mukhtar H. Cannabinoids for cancer treatment: progress and promise. *Cancer Res* 2008; **68**:339-42.

- Savinainen JR, Järvinen T, Laine K, Laitinen JT. Despite substantial degradation, 2 arachidonoylglycerol is a potent full efficacy agonist mediating CB1 receptor-dependent G-protein activation in rat cerebellar membranes. *Br J Pharmacol* 2001; **134**:664-72.
- Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; **64**:193-8.
- Scherf D. Premature beats and extra-systoles. *Mod Concepts Cardiovasc Dis* 1958; **27**:489-492.
- Schimpf R, Wolpert C, Gaita F, Giustetto C, Borggreffe M. Short QT syndrome. *Cardiovasc Res* 2005; **67**:357-366.
- Schmid PC, Reddy PV, Natarajan V, Schmid HH. Metabolism of N-acylethanolamine phospholipids by a mammalian phosphodiesterase of the phospholipase D type. *J Biol Chem* 1983; **258**:9302-6.
- Schmid HH, Schmid PC, Natarajan V. N-acylated glycerophospholipids and their derivatives. *Prog Lipid Res* 1990; **29**:1-43.
- Schmid PC, Schwartz KD, Smith CN, Krebsbach RJ, Berdyshev EV, Schmid HH. A sensitive endocannabinoid assay. The simultaneous analysis of N-acylethanolamines and 2-monoacylglycerols. *Chem Phys Lipids* 2000; **104**:185-91.
- Schmitt N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B, Pongs O. A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J* 2000; **19**:332-340.
- Scholz EP, Welke F, Joss N, Seyler C, Zhang W, Scherer D, Völkers M, Bloehs R, Thomas D, Katus HA, Karle CA, Zitron E. Central role of PKC $\alpha$  in isoenzyme-selective regulation of cardiac transient outward current  $I_{to}$  and Kv4.3 channels. *J Mol Cell Cardiol* 2011; **51**:722-9.
- Schoppa NE, McCormack K, Tanouye MA, Sigworth FJ. The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels. *Science* 1992; **255**:1712-5.
- Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet* 1999; **23**:20-1.
- Schotten U, de Haan S, Neuberger HR, Eijssbouts S, Blaauw Y, Tieleman R, Allessie M. Loss of atrial contractility is primary cause of atrial dilatation during first days of atrial fibrillation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; **287**:H2324-H2331.
- Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev* 2011; **91**:265-325.
- Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* 2002; **90**:939-50.
- Schreiber D, Harlfinger S, Nolden BM, Gerth CW, Jaehde U, Schömig E, Klosterkötter J, Giuffrida A, Astarita G, Piomelli D, Markus Leweke F. Determination of anandamide and other fatty acyl ethanolamides in human serum by electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2007; **361**:162-8.
- Schuhmann K, Voelker C, Höfer GF, Pflügelmeier H, Klugbauer N, Hofmann F, Romanin C, Groschner K. Essential role of the  $\beta$  subunit in modulation of C-class L-type Ca<sup>2+</sup> channels by intracellular pH. *FEBS Lett* 1997; **408**:75-80.
- Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, Haverkamp W, Chen Q, Sun Y, Rubie C, Hordt M, Towbin JA, Borggreffe M, Assmann G, Qu X, Somberg JC, Breithardt G, Oberti C, Funke H. KCNE1 mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat Genet* 1997; **17**:267-268.
- Schuster A, Lacinová L, Klugbauer N, Ito H, Birnbaumer L, Hofmann F. The IVS6 segment of the L-type calcium channel is critical for the action of dihydropyridines and phenylalkylamines. *EMBO J* 1996; **15**:2365-70.
- Schwartz GJ, Fu J, Astarita G, Li X, Gaetani S, Campolongo P, Cuomo V, Piomelli D. The lipid messenger OEA links dietary fat intake to satiety. *Cell Metab* 2008; **8**:281-8.
- Schwartz PJ, Priori SG, Dumaine R, Napolitano C, Antzelevitch C, Stramba-Badiale M, Richard TA, Berti MR, Bloise R. A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2000; **343**:262-7.
- Schweitzer P. Cannabinoids decrease the K<sup>+</sup> M-current in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* 2000; **20**:51-8.
- Sculptoreanu A, Rotman E, Takahashi M, Scheuer T, Catterall WA. Voltage-dependent potentiation of the

- activity of cardiac L-type calcium channel  $\alpha 1$  subunits due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**:10135-9.
- Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Prog Biophys Mol Biol* 2003; **81**:133-76.
- Sergeant GP, Ohya S, Reihill JA, Perrino BA, Amberg GC, Imaizumi Y, Horowitz B, Sanders KM, Koh SD. Regulation of  $Kv4.3$  currents by  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; **288**:C304-13.
- Serôdio P, Kentros C, Rudy B. Identification of molecular components of A-type channels activating at subthreshold potentials. *J Neurophysiol* 1994; **72**:1516-29.
- Serôdio P, Demiera EVS, Rudy B. Cloning of a novel component of A-type  $K^+$  channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J Neurophysiol* 1996; **75**:2174-2179.
- Shen NV, Pfaffinger PJ. Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated  $K^+$  channel subunit proteins. *Neuron* 1995; **14**:625-33.
- Shen W, Kurachi Y. Mechanisms of adenosine mediated actions on cellular and clinical cardiac electrophysiology. *Mayo Clin Proc* 1995; **70**:274-291.
- Shen M, Thayer SA. The cannabinoid agonist WIN55,212-2 inhibits calcium channels by receptor-mediated and direct pathways in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* 1998; **783**:77-84.
- Shen MJ, Choi EK, Tan AY, Lin SF, Fishbein MC, Chen LS, Chen PS. Neural mechanisms of atrial arrhythmias. *Nat Rev Cardiol* 2012; **9**:30-39
- Shibata EF, Drury T, Refsum H, Aldrete V, Giles W. Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. *Am J Physiol* 1989; **257**:H1773-81.
- Shibata R, Misonou H, Campomanes CR, Anderson AE, Schrader LA, Doliveira LC, Carroll KI, Sweatt JD, Rhodes KJ, Trimmer JS. A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of  $Kv4.2$  potassium channels. *J Biol Chem* 2003; **278**:36445-54.
- Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000; **52**:557-594.
- Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem* 1995; **270**:3726-31.
- Shmist YA, Goncharov I, Eichler M, Shneyvays V, Isaac A, Vogel Z, Shainberg A. Delta-9-tetrahydrocannabinol protects cardiac cells from hypoxia via CB2 receptor activation and nitric oxide production. *Mol Cell Biochem* 2006; **283**:75-83.
- Showalter VM, Compton DR, Martin BR, Abood ME. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; **278**:989-99.
- Siegelbaum SA, Tsien RW, Kass RS. Role of intracellular calcium in the transient outward current of calf Purkinje fibers. *Nature* 1977; **269**:611-613.
- Siegmund SV, Uchinami H, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. Anandamide induces necrosis in primary hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; **41**:1085-95.
- Sigworth FJ. Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys* 1994; **27**:1-40.
- Siqueira SW, Lapa AJ, Ribeiro do Valle J. The triple effect induced by delta 9-tetrahydrocannabinol on the rat blood pressure. *Eur J Pharmacol* 1979; **58**:351-7.
- Simard C, Drolet B, Yang P, Kim RB, Roden DM. Polymorphism screening in the cardiac  $K^+$  channel gene *KCNA5*. *Clin Pharmacol Ther* 2005; **77**:138-144.
- Skanes A. Vagally mediated stabilization: the latest spin on rotors in atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2009; **6**:1473-1474.
- Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R, Petrelli L, Romanello S, Facci L, Leon A. The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**:3984-9.
- Slawsky MT, Castle NA.  $K^+$  channel blocking actions of flecainide compared with those of propafenone and quinidine in adult rat ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; **269**:66-74.
- Slipetz DM, O'Neill GP, Favreau L, Dufresne C, Gallant M, Gareau Y, Guay D, Labelle M, Metters KM. Activation of the human peripheral cannabinoid

- receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 1995; **48**:352-61.
- Smart D, Jonsson KO, Vandevoorde S, Lambert DM, Fowler CJ. 'Entourage' effects of N-acyl ethanolamines at human vanilloid receptors. Comparison of effects upon anandamide-induced vanilloid receptor activation and upon anandamide metabolism. *Br J Pharmacol* 2002; **136**:452-8.
- Smid SD. Gastrointestinal endocannabinoid system: multifaceted roles in the healthy and inflamed intestine. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; **35**:1383-7.
- Smith PL, Baukowitz T, Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 1996; **379**:833-836.
- Snider NT, Walker VJ, Hollenberg PF. Oxidation of the endogenous cannabinoid arachidonoyl ethanolamide by the cytochrome P450 monooxygenases: physiological and pharmacological implications. *Pharmacol Rev* 2010; **62**:136-54.
- Snyders DJ, Tamkun MM, Bennett PB. A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart: Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J Gen Physiol* 1993; **101**:513-543.
- Snyders DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 1999; **42**:377-90.
- Soh H, Goldstein SA. I SA channel complexes include four subunits each of DPP6 and Kv4.2. *J Biol Chem* 2008; **283**:15072-7.
- Sokolova O, Kolmakova-Partensky L, Grigorieff N. Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel at 2.5 nm resolution. *Structure* 2001; **9**:215-20.
- Solinas M, Goldberg SR, Piomelli D. The endocannabinoid system in brain reward processes. *Br J Pharmacol* 2008; **154**:369-83.
- Song ZH, Bonner TI. A lysine residue of the cannabinoid receptor is critical for receptor recognition by several agonists but not WIN55212-2. *Mol Pharmacol* 1996; **49**:891-6.
- Spector PS, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti M. Class III anti-arrhythmic drugs blocks HERG, a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Open-channel block by methanesulfonanilides. *Circ Res* 1996a; **78**:499-503.
- Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC. Fast inactivation causes rectification of the I<sub>Kr</sub> channel. *J Gen Physiol* 1996b; **107**:611-619.
- Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000; **102**:1178-85.
- Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT. Cav1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 2004; **119**:19-31.
- Stanfield PR, Nakajima S, Nakajima Y. Constitutively active and G-protein coupled inward rectifier K<sup>+</sup> channels: Kir2.0 and Kir3.0. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2002; **145**:47-179.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 1997; **388**:773-8.
- Steffens S, Veillard NR, Arnaud C, Pelli G, Burger F, Staub C, Karsak M, Zimmer A, Frossard JL, Mach F. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature* 2005; **434**:782-6.
- Sterin-Borda L, Del Zar CF, Borda E. Differential CB1 and CB2 cannabinoid receptor-inotropic response of rat isolated atria: endogenous signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol* 2005; **69**:1705-13.
- Stern MD. Buffering of calcium in the vicinity of a channel pore. *Cell Calcium* 1992; **13**:183-92.
- Stern M. Epidemiology of obesity and its link to heart disease. *Metabolism* 1995; **44**:1-3.
- Stewart S, Hart CL, Hole DJ, McMurray JJ. A population-based study of the longterm risks associated with atrial fibrillation: 20-year follow-up of the Renfrew/ Paisley study. *Am J Med* 2002; **113**:359-364.
- Stoddard MF, Dawkins PR, Prince CR, Ammash NM. Left atrial appendage thrombus is not uncommon in patients with acute atrial fibrillation and a recent embolic event: a transesophageal echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol* 1995; **25**:452-9.

- Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 1989; **339**:597-603.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **215**:89-97.
- Sugiura T, Kodaka T, Kondo S, Nakane S, Kondo H, Waku K, Ishima Y, Watanabe K, Yamamoto I. Is the cannabinoid CB1 receptor a 2-arachidonoylglycerol receptor? Structural requirements for triggering a  $Ca^{2+}$  transient in NG108-15 cells. *J Biochem* 1997; **122**:890-5.
- Sugiura T, Kodaka T, Nakane S, Kishimoto S, Kondo S, Waku K. Detection of an endogenous cannabimimetic molecule, 2-arachidonoylglycerol, and cannabinoid CB1 receptor mRNA in human vascular cells: is 2-arachidonoylglycerol a possible vasomodulator? *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **243**:838-43.
- Sugiura T, Kondo S, Kishimoto S, Miyashita T, Nakane S, Kodaka T, Suhara Y, Takayama H, Waku K. Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *J Biol Chem* 2000; **275**:605-12.
- Sugiura T, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 2000; **108**:89-106.
- Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; **66**:173-92.
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* 2006; **45**:405-46.
- Sun Y, Quan XQ, Fromme S, Cox RH, Zhang P, Zhang L, Guo D, Guo J, Patel C, Kowey PR, Yan GX. A novel mutation in the KCNH2 gene associated with short QT syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2011; **50**:433-441.
- Takeuchi S, Akita T, Takagishi Y, Watanabe E, Sasano C, Honjo H, Kodama I. Disorganization of gap junction distribution in dilated atria of patients with chronic atrial fibrillation. *Circ J* 2006; **70**:575-82.
- Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* 1988; **242**:1042-5.
- Tanasescu R, Constantinescu CS. Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology* 2010; **215**:588-97.
- Tamargo J. Drug-induced torsade de pointes: from molecular biology to bedside. *Jpn J Pharmacol* 2000; **83**:1-19.
- Tamargo J, Caballero R, Delpón E. Pharmacological approaches in the treatment of atrial fibrillation. *Curr Med Chem* 2004a; **11**:13-28.
- Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004b; **62**:9-33.
- Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Delpón E.  $I_{Kur}$ /Kv1.5 channel blockers for the treatment of atrial fibrillation. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; **18**:399-416.
- Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ $Ca^{2+}$  dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **135**:397-402.
- Tan HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, van Tintelen PJ, van den Berg MP, Wilde AA, Balsler JR. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 2001; **409**:1043-7.
- Tao X, Avalos JL, Chen J, MacKinnon R. Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier  $K^{+}$  channel Kir2.2 at 3.1 Å resolution. *Science* 2009; **326**:1668-74.
- Terlau H, Heinemann SH, Stühmer W, Pusch M, Conti F, Imoto K, Numa S. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett* 1991; **293**:93-6.
- Tessier S, Karczewski P, Krause EG, Pansard Y, Acar C, Lang-Lazdunski M, Mercadier JJ, Hatem SN. Regulation of the transient outward  $K^{+}$  current by  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinases II in human atrial myocytes. *Circ Res* 1999; **85**:810-9.
- Tian X, Guo J, Yao F, Yang DP, Makriyannis A. The conformation, location, and dynamic properties of the endocannabinoid ligand anandamide in a membrane bilayer. *J Biol Chem* 2005; **280**:29788-95.

- Tian D, Frishman WH. Vernakalant: a new drug to treat patients with acute onset atrial fibrillation. *Cardiol Rev* 2011; **19**:41-4.
- Timpe LC, Fantl WJ. Modulation of a voltage-activated potassium channel by peptide growth factor receptors. *J Neurosci* 1994; **14**:1195-201.
- Tobimatsu T, Fujisawa H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem* 1989; **264**:17907-12.
- Tomaselli GF, Marbán E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999; **42**:270-283.
- Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY. How far will you go to sense voltage? *Neuron* 2005; **48**:719-25.
- Topol EJ, Bousser MG, Fox KA, Creager MA, Despres JP, Easton JD, Hamm CW, Montalescot G, Steg PG, Pearson TA, Cohen E, Gaudin C, Job B, Murphy JH, Bhatt DL; CRESCENDO Investigators. Rimonabant for prevention of cardiovascular events (CRESCENDO): a randomised, multicentre, placebo-controlled trial. *Lancet* 2010; **376**:517-23.
- Trautwein W, Uchizono K. Electron microscopic and electrophysiologic study of the pacemaker in the sinoatrial node of the rabbit heart. *Zellforsch Mikrosk Anat* 1963; **61**:96-109.
- Tristani-Firouzi M, Jensen JL, Donaldson MR, Sansone V, Meola G, Hahn A, Bendahhou S, Kwiecinski H, Fidzianska A, Plaster N, Fu YH, Ptacek LJ, Tawil R. Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J Clin Invest* 2002; **110**:381-388.
- Tristani-Firouzi M, Sanguinetti MC. Structural determinants and biophysical properties of HERG and KCNQ1 channel gating. *J Mol Cell Cardiol* 2003; **35**:27-35.
- Tseng GN, Hoffman BF. Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes. *Circ Res* 1989; **64**:633-647.
- Tseng GN.  $I_{Kr}$ : The hERG channel. *J Mol Cell Cardiol* 2001; **33**:835-849.
- Tseng-Crank JC, Tseng GN, Schwartz A, Tanouye MA. Molecular cloning and functional expression of a potassium channel cDNA isolated from a rat cardiac library. *FEBS Lett* 1990; **268**:63-8.
- Tucker SJ, Pessia M, Adelman JP. Muscarine-gated  $K^+$  channel: Subunit stoichiometry and structural domains essential for G protein stimulation. *Am J Physiol* 1996; **271**:H379-H385.
- Twitchell W, Brown S, Mackie K. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 1997; **78**:43-50.
- Uebele VN, England SK, Chaudhary A, Tamkun MM, Snyders DJ. Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kv $\beta$ 2.1 subunits. *J Biol Chem* 1996; **271**:2406-2412.
- Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S, Tokunaga T. Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J Biol Chem* 1995; **270**:23823-7.
- Ueda N, Yamanaka K, Yamamoto S. Purification and characterization of an acid amidase selective for N-palmitoylethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance. *J Biol Chem* 2001; **276**:35552-7.
- Ulbricht W. Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. *Physiol Rev* 2005; **85**:1271-301.
- Underdown NJ, Hiley CR, Ford WR. Anandamide reduces infarct size in rat isolated hearts subjected to ischaemia-reperfusion by a novel cannabinoid mechanism. *Br J Pharmacol* 2005; **146**:809-16.
- Unsold B, Kerst G, Brousos H, Hubner M, Schreiber R, Nitschke R, Greger R, Bleich M. KCNE1 reverses the response of the human  $K^+$  channel KCNQ1 to cytosolic pH changes and alters its pharmacology and sensitivity to temperature. *Pflügers Arch* 2000; **441**:368-378.
- Vaquero M, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Tamargo J, Delpón E. Effects of atorvastatin and simvastatin on atrial plateau currents. *J Mol Cell Cardiol* 2007; **42**:931-45.
- Valenzuela C, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ. Stereoselective block of a human cardiac potassium channel (Kv1.5) by bupivacaine enantiomers. *Biophys J* 1995; **69**:418-27.
- Van den Bossche I, Vanheel B. Influence of cannabinoids on the delayed rectifier in freshly dissociated smooth muscle cells of the rat aorta. *Br J Pharmacol* 2000; **131**:85-93.
- Van der Heyden MA, Wijnhoven TJ, Opthof T. Molecular aspects of adrenergic modulation of the transient outward current. *Cardiovasc Res* 2006; **71**:430-42.

- Van der Stelt M, Di Marzo V. Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity. *Prostaglandin Other Lipid Mediat* 2005; **77**:111-22.
- Van der Velden HMW, van der Zee L, Wijffels M, van Leuven C, Dorland R, Vos MA, Jongasma HJ, Allessie M. Atrial fibrillation in the goat induces changes in monophasic action potential and mRNA expression of ion channels involved in repolarization. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000; **11**:1262-1269.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 2005; **310**:329-32.
- Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM. Outward K<sup>+</sup> current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 1997; **80**:772-81.
- Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca<sup>2+</sup> currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* 1999; **85**:428-436.
- Van Wagoner DR, Nerbonne JM. Molecular basis of electrical remodeling in atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 2000; **32**:1101-17.
- Vandenberg CA. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**:2560-4.
- Varga K, Lake K, Martin BR, Kunos G. Novel antagonist implicates the CB1 cannabinoid receptor in the hypotensive action of anandamide. *Eur J Pharmacol* 1995; **278**:279-83.
- Varga K, Lake KD, Huangfu D, Guyenet PG, Kunos G. Mechanism of the hypotensive action of anandamide in anesthetized rats. *Hypertension* 1996; **28**:682-6.
- Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *FASEB J* 1998; **12**:1035-44.
- Varro A, Nanasi PP, Lathrop DA. Potassium currents in isolated human atrial and ventricular cardiocytes. *Acta Physiol Scand* 1993; **149**:133-142.
- Venance L, Piomelli D, Glowinski J, Giaume C. Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signalling in striatal astrocytes. *Nature* 1995; **376**:590-4.
- Vidrio H, Sánchez-Salvatori MA, Medina M. Cardiovascular effects of (-)-11-OH-delta 8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; **28**:332-6.
- Vilin YY, Makita N, George AL Jr, Ruben PC. Structural determinants of slow inactivation in human cardiac and skeletal muscle sodium channels. *Biophys J* 1999; **77**:1384-93.
- Villarroel A, Schwarz TL. Inhibition of the Kv4 (Shal) family of transient K<sup>+</sup> currents by arachidonic acid. *J Neurosci* 1996; **16**:2522-32.
- Virag L, Iost N, Opincariu M, Szolnoky J, Szecsi J, Bogats G, Szenohradszky P, Varro A, Papp JG. The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2001; **49**:790-797.
- Voigt N, Trausch A, Knaut M, Matschke K, Varró A, Van Wagoner DR, Nattel S, Ravens U, Dobrev D. Left-to-right atrial inward rectifier potassium current gradients in patients with paroxysmal versus chronic atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010; **3**:472-80.
- Wada K, Yokotani N, Hunter C, Doi K, Wenthold RJ, Shimasaki S. Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**:197-201.
- Wagner JA, Varga K, Ellis EF, Rzigalinski BA, Martin BR, Kunos G. Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature* 1997; **390**:518-21.
- Wagner JA, Varga K, Járαι Z, Kunos G. Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors. *Hypertension* 1999; **33**:429-34.
- Wagner JA, Hu K, Bauersachs J, Karcher J, Wiesler M, Goparaju SK, Kunos G, Ertl G. Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001; **38**:2048-54.
- Wagner JA, Abesser M, Harvey-White J, Ertl G. 2-Arachidonylglycerol acting on CB1 cannabinoid receptors mediates delayed cardioprotection induced by nitric oxide in rat isolated hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; **47**:650-5.
- Wakili R, Voigt N, Käab S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest* 2011; **121**:2955-68.

- Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL Jr, Phillips HA, Saar K, Reis A, Johnson EW, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup> channel  $\beta$ 1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet* 1998; **19**:366-70.
- Walton M, Fozzard HA. The relation of  $V_{\max}$  to  $I_{Na}$ ,  $G_{Na}$ , and  $h$  infinity in a model of the cardiac Purkinje fiber. *Biophys J* 1979; **25**:407-420.
- Wanahita N, Messerli FH, Bangalore S, Gami AS, Somers VK, Steinberg JS. Atrial fibrillation and obesity: results of a meta-analysis. *Am Heart J* 2008; **155**:310-5.
- Wang Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes: Evidence for a novel delayed rectifier K<sup>+</sup> current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* 1993; **73**:1061-1076.
- Wang Z, Fermini B, Nattel S. Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 1994; **28**:1540-1546.
- Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995a; **80**:805-11.
- Wang Z, Fermini B, Nattel S. Effects of flecainide, quinidine, and 4-aminopyridine on transient outward and ultrarapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1995b; **272**:184-96.
- Wang Z, Kiehn J, Yang Q, Brown AM, Wible BA. Comparison of binding and block produced by alternatively spliced Kv $\beta$ 1 subunits. *J Biol Chem* 1996; **271**:28311-7.
- Wang H, Shi H, Zhang L, Pourrier M, Yang B, Nattel S, Wang Z. Nicotine is a potent blocker of the cardiac A-type K<sup>+</sup> channels. Effects on cloned Kv4.3 channels and native transient outward current. *Circulation* 2000a; **102**:1165-71.
- Wang HS, Brown BS, McKinnon D, Cohen IS. Molecular basis for differential sensitivity of KCNQ and  $I_{Ks}$  channels to the cognitive enhancer XE991. *Mol Pharmacol* 2000b; **57**:1218-1223.
- Wang J, Myers CD, Robertson GA. Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K<sup>+</sup> channel. *J Gen Physiol* 2000c; **115**:749-758.
- Wang H, Yang B, Zhang Y, Han H, Wang J, Shi H, Wang Z. Different subtypes of  $\alpha$ 1-adrenoceptor modulate different K<sup>+</sup> currents via different signalling pathways in canine ventricular myocytes. *J Biol Chem* 2001a; **276**:40811-6.
- Wang Y, Liu Y, Ito Y, Hashiguchi T, Kitajima I, Yamakuchi M, Shimizu H, Matsuo S, Imaizumi H, Maruyama I. Simultaneous measurement of anandamide and 2-arachidonoylglycerol by polymyxin B-selective adsorption and subsequent high-performance liquid chromatography analysis: increase in endogenous cannabinoids in the sera of patients with endotoxic shock. *Anal Biochem* 2001b; **294**:73-82.
- Wang TJ, Parise H, Levy D, D'Agostino RB Sr, Wolf PA, Vasani RS, Benjamin EJ. Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation. *JAMA* 2004; **292**:2471-7.
- Wang H, Yan Y, Liu Q, Huang Y, Shen Y, Chen L, Chen Y, Yang Q, Hao Q, Wang K, Chai J. Structural basis for modulation of Kv4 K<sup>+</sup> channels by auxiliary KChIP subunits. *Nat Neurosci* 2007; **10**:32-9.
- Wang J, Ueda N. Role of the endocannabinoid system in metabolic control. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; **17**:1-10.
- Wang PF, Jiang LS, Bu J, Huang XJ, Song W, Du YP, He B. Cannabinoid-2 Receptor Activation Protects against Infarct and Ischemia/Reperfusion Heart Injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012; **59**:301-7.
- Waldeck-Weiermair M, Zoratti C, Osibow K, Balenga N, Goessnitzer E, Waldhoer M, Malli R, Graier WF. Integrin clustering enables anandamide-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in endothelial cells via GPR55 by protection against CB1-receptor-triggered repression. *J Cell Sci* 2008; **121**:1704-17.
- Wartmann M, Campbell D, Subramanian A, Burstein SH, Davis RJ. The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett* 1995; **359**:133-6.
- Weerapura M, Nattel S, Chartier D, Caballero R, Hebert TE. A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link? *J Physiol* 2002; **540**:15-27.
- Wei J, Wang DW, Alings M, Fish F, Wathen M, Roden DM, George AL Jr. Congenital long-QT syndrome caused by a novel mutation in a conserved acidic domain of the cardiac Na<sup>+</sup> channel. *Circulation* 1999; **99**:3165-71.

- Weidmann S. The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium-carrying system. *J Physiol* 1955; **127**:213-224.
- Weis F, Beiras-Fernandez A, Sodian R, Kaczmarek I, Reichart B, Beiras A, Schelling G, Kreth S. Substantially altered expression pattern of cannabinoid receptor 2 and activated endocannabinoid system in patients with severe heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**:1187-93.
- Westlake TM, Howlett AC, Bonner TI, Matsuda LA, Herkenham M. Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 1994; **63**:637-52.
- Wettwer E, Amos G, Gath J, Zerkowski HR, Reidemeister JG, Ravens U. Transient outward current in human and rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 1993; **27**:1662-1669.
- Wettwer E, Amos GJ, Posival H, Ravens U. Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res* 1994; **75**:473-482.
- Wettwer E, Hála O, Christ T, Heubach JF, Dobrev D, Knaut M, Varró A, Ravens U. Role of  $I_{Kur}$  in controlling action potential shape and contractility in the human atrium: influence of chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2004; **110**:2299-306.
- Wheal AJ, Bennett T, Randall MD, Gardiner SM. Cardiovascular effects of cannabinoids in conscious spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 2007; **152**:717-24.
- White R, Ho WS, Bottrill FE, Ford WR, Hiley CR. Mechanisms of anandamide-induced vasorelaxation in rat isolated coronary arteries. *Br J Pharmacol* 2001; **134**:921-9.
- Wible BA, Yang Q, Kuryshev YA, Accili EA, Brown AM. Cloning and expression of a novel  $K^+$  channel regulatory protein, KChAP. *J Biol Chem* 1998; **273**:11745-51.
- Wible BA, Wang L, Kuryshev YA, Basu A, Haldar S, Brown AM. Increased  $K^+$  efflux and apoptosis induced by the potassium channel modulatory protein KChAP/PIAS3 $\beta$  in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2002; **277**:17852-62.
- Wickenden AD, Jegla TJ, Kaprielian R, Backx PH. Regional contributions of Kv1.4, Kv4.2, and Kv4.3 to transient outward  $K^+$  current in rat ventricle. *Am J Physiol* 1999; **276**:H1599-H1607.
- Wickman K, Nemeš J, Gendler SJ, Clapham DE. Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron* 1998; **20**:103-114.
- Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allesie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995; **92**:1954-1968.
- Wilde AA, Brugada R. Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel. *Circ Res* 2011; **108**:884-97.
- Wiley JL, Razdan RK, Martin BR. Evaluation of the role of the arachidonic acid cascade in anandamide's in vivo effects in mice. *Life Sci* 2006; **80**:24-35.
- Williams CP, Hu N, Shen W, Mashburn AB, Murray KT. Modulation of the human Kv1.5 channel by protein kinase C activation: role of the Kv $\beta$ 1.2 subunit. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; **302**:545-50.
- Winfrey AT. Stably rotating patterns of reaction and diffusion. En: *Theoretical Chemistry* Eyring H, Hendenon D (Eds.) (New York: Academic) 1978; **4**:1-51.
- Winterberg H. Studien über herzflimmern. I. Über die wirkung des N. Bagus und accelerans auf das Flimmern des Herzens. *Pflügers Arch Physiol* 1907; **117**:223-256.
- Wissmann R, Baukowitz T, Kalbacher H, Kalbitzer HR, Ruppertsberg JP, Pongs O, Antz C, Fakler B. NMR structure and functional characteristics of the hydrophilic N terminus of the potassium channel  $\beta$ -subunit Kv $\beta$ 1.1. *J Biol Chem* 1999; **274**:35521-5.
- Wolf PA, Benjamin EJ, Belanger AJ, Kannel WB, Levy D, D'Agostino RB. Secular trends in the prevalence of atrial fibrillation: The Framingham Study. *Am Heart J* 1996; **131**:790-795.
- Workman AJ, Kane KA, Rankin AC. The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2001; **52**: 226-235.
- Xia M, Jin Q, Bendahhou S, He Y, Larroque MM, Chen Y, Zhou Q, Yang Y, Liu Y, Liu B, Zhu Q, Zhou Y, Lin J, Liang B, Li L, Dong X, Pan Z, Wang R, Wan H, Qiu W, Xu W, Eurlings P, Barhanin J, Chen Y. A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **332**:1012-9.
- Xiao YF, Gomez AM, Morgan JP, Lederer WJ, Leaf A. Suppression of voltage-gated L-type  $Ca^{2+}$  currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal

- rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**:4182-7.
- Xiao YJ, Schwartz B, Washington M, Kennedy A, Webster K, Belinson J, Xu Y. Electrospray ionization mass spectrometry analysis of lysophospholipids in human ascitic fluids: comparison of the lysophospholipid contents in malignant vs nonmalignant ascitic fluids. *Anal Biochem* 2001; **290**:302-13.
- Xie LH, John SA, Ribalet B, Weiss JN. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) regulation of strong inward rectifier Kir2.1 channels: multilevel positive cooperativity. *J Physiol* 2008; **586**:1833-1848.
- Xie C, Bondarenko VE, Morales MJ, Strauss HC. Closed-state inactivation in Kv4.3 isoforms is differentially modulated by protein kinase C. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; **297**:C1236-48.
- Xu J, Yu W, Jan YN, Jan LY, Li M. Assembly of voltage-gated potassium channels. Conserved hydrophilic motifs determine subfamily-specific interactions between the  $\alpha$ -subunits. *J Biol Chem* 1995; **270**:24761-8.
- Xu H, Guo W, Nerbonne JM. Four kinetically distinct depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1999; **113**:661-78.
- Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y. G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev* 1998; **50**:723-60.
- Yang NB, Horn R. Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channel. *Neuron* 1995; **15**:213-218.
- Yang T, Kupersmidt S, Roden DM. Anti-minK antisense decreases the amplitude of the rapidly activating cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. *Circ Res* 1995; **77**:1246-1253.
- Yang N, George AL Jr, Horn R. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* 1996; **16**:113-22.
- Yang BF, Li GR, Xu CQ, Nattel S. Effects of RP58866 on transmembrane K<sup>+</sup> currents in mammalian ventricular myocytes. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1999; **20**:961-9.
- Yang EK, Alvira MR, Levitan ES, Takimoto K. Kv $\beta$  subunits increase expression of Kv4.3 channels by interacting with their C termini. *J Biol Chem* 2001; **276**:4839-44.
- Yang D, Song LS, Zhu WZ, Chakir K, Wang W, Wu C, Wang Y, Xiao RP, Chen SR, Cheng H. Calmodulin regulation of excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Circ Res* 2003; **92**:659-67.
- Yang Y, Xia M, Jin Q, Bendahhou S, Shi J, Chen Y, Liang B, Lin J, Liu Y, Liu B, Zhou Q, Zhang D, Wang R, Ma N, Su X, Niu K, Pei Y, Xu W, Chen Z, Wan H, Cui J, Barhanin J, Chen Y. Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am J Hum Genet* 2004; **75**:899-905.
- Yeh YH, Qi X, Shiroshita-Takeshita A, Liu J, Maguy A, Chartier D, Hebert T, Wang Z, Nattel S. Atrial tachycardia induces remodelling of muscarinic receptors and their coupled potassium currents in canine left atrial and pulmonary vein cardiomyocytes. *Br J Pharmacol* 2007; **152**:1021-32.
- Yellen G, Jurman ME, Abramson T, MacKinnon R. Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K<sup>+</sup> channel. *Science* 1991; **251**:939-42.
- Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 2002; **419**:35-42.
- Yeola SW, Rich TC, Uebele VN, Tamkun MM, Snyders DJ. Molecular analysis of a binding site for quinidine in a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Role of S6 in antiarrhythmic drug binding. *Circ Res* 1996; **78**:1105-14.
- Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998; **274**:C25-37.
- Yool AJ, Schwarz TL. Alteration of ionic selectivity of a K<sup>+</sup> channel by mutation of the H5 region. *Nature* 1991; **349**:700-4.
- Yu SP, Kerchner GA. Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *J Neurosci Res* 1998; **52**:612-7.
- Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 2003; **4**:207.
- Yuan W, Ginsburg KS, Bers DM. Comparison of sarcolemmal calcium channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Physiol* 1996; **493**:733-46.
- Yue L, Feng JL, Wang Z, Nattel S. Effects of ambasilide, quinidine, flecainide and verapamil on ultra-rapid delayed rectifier potassium currents in canine atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 2000; **46**:151-61.

- Zacharias A, Schwann TA, Riordan CJ, Durham SJ, Shah AS, Habib RH. Obesity and risk of new-onset atrial fibrillation after cardiac surgery. *Circulation* 2005; **112**:3247-55.
- 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.
- Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL, Schwarz TL. The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K<sup>+</sup> current ( $I_{K1}$ ) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol* 2001; **533**:697-710.
- Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW. Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* 1994; **372**:97-100.
- Zhang M, Jiang M, Tseng GN. MinK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as  $\beta$  subunit of cardiac transient outward channel? *Circ Res* 2001; **88**:1012-1019.
- Zhang Y, Han H, Wang J, Wang H, Yang B, Wang Z. Impairment of human ether-a-go-go-related gene (HERG) K<sup>+</sup> channel function by hypoglycemia and hyperglycemia. Similar phenotypes but different mechanisms. *J Biol Chem* 2003; **278**:10417-10426.
- Zhang DF, Liang B, Lin J, Liu B, Zhou QS, Yang YQ. KCNE3 R53H substitution in familial atrial fibrillation. *Chin Med J (Engl)* 2005; **118**:1735-8.
- Zhang L, Xu CQ, Hong Y, Zhang JL, Liu Y, Zhao M, Cao YX, Lu YJ, Yang BF, Shan HL. Propranolol regulates cardiac transient outward potassium channel in rat myocardium via cAMP/PKA after short-term but not after long-term ischemia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2010; **382**:63-71.
- Zhou Z, Gong Q, Epstein ML, January CT. HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. Intracellular transport and functional defects. *J Biol Chem* 1998; **273**:21061-21066.
- Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S, MacKinnon R. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 2001; **411**:657-61.
- Zhou Y, MacKinnon R. The occupancy of ions in the K<sup>+</sup> selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J Mol Biol* 2003; **333**:965-975.
- Zhuang SY, Bridges D, Grigorenko E, McCloud S, Boon A, Hampson RE, Deadwyler SA. Cannabinoids produce neuroprotection by reducing intracellular calcium release from ryanodine-sensitive stores. *Neuropharmacology* 2005; **48**:1086-96.
- Zicha S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varro A, Nattel S. Transmural expression of transient outward potassium current subunits in normal and failing canine and human hearts. *J Physiol* 2004; **561**:735-748.
- Zimmer T, Surber R. SCN5A channelopathies: an update on mutations and mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 2008; **98**:120-36.
- Zoratti C, Kipmen-Korgun D, Osibow K, Malli R, Graier WF. Anandamide initiates Ca<sup>2+</sup> signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2003; **140**:1351-62.
- Zühlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 1999; **399**:159-62.

