

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**Papel de la Policistina-1 en la regulación de BIN1 y la formación de la ultraestructura de los túbulos transversos en los cardiomiocitos**

**Magda Carolina Díaz Vesga**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Directores de tesis**

**Dra. Zully Pedrozo C.**

**Dr. Andrew Quest**

**Magda Carolina Díaz V**

**Dra. Zully Pedrozo C.**

**Dr. Andrew Quest**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédica presentada por el candidato

**MAGDA CAROLINA DÍAZ VESGA**

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biomédicas en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 01 de junio del 2022.**

**Prof. Zully Pedrozo C. Ph.D**

**Prof. Andrew Quest. Ph.D.**

**Director de Tesis**

**Dpto.**

**Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**PROF. DR. ....**

**PROF. DR. ....**

**PROF. DR. ....**

**PROF. DRA. ....**

**Presidente Comisión de Examen**

***“La comprensión es una forma de éxtasis”***

**Carl Sagan**

***A mi familia, mis padres, mi hermana, mi hermano y Jaime Andrés  
por acompañarme en cada proceso, en cada elección desde el amor,  
por dejarme ser y estar.***

## Agradecimientos

Quiero agradecer inicialmente a mis padres, por entregarme lo mejor de cada uno, por su amor incondicional, su confianza y su apoyo, siempre desde el respeto. A mi hermana le agradezco por enseñarme a comprender que tenemos tiempos y procesos diferentes, lo cual no nos hace ni mejores ni peores personas, que nunca es tarde para volver a empezar, a mi hermano por su alegría, por su espíritu de intentar hacer las cosas lo mejor posible y por la promesa de volvernos a encontrar y transitar en algún espacio.

Agradezco enormemente a Jaime Andrés, el amor, la comprensión y la capacidad de hacerme ver que existen muchas maneras de apreciar y comprender el mundo que habitamos, por escuchar atentamente mis alegrías, mis frustraciones y mis ilusiones. Porque su amor me honra día a día.

A la Dra. Zully Pedrozo C, por ser la mejor tutora, por su dedicación, por su interés en que aprendiera a desempeñarme bien en el laboratorio, pero sobre todo a que logrará comprender el por qué hacer lo que se debe hacer. Agradezco su sentido del humor, su preocupación por mi bienestar dentro y fuera del laboratorio. La Dra. Zully me abrió las puertas de su laboratorio aun sabiendo que no tenía ninguna experiencia en técnicas celulares y moleculares, pero tenía la mejor intención de aprender y hacer un buen trabajo. Además, agradezco al Dr. Andrew Quest, por ser otro buen tutor, por integrarme a su laboratorio de comunicaciones celulares, así mi tema fuera un poco lejano de los intereses de su grupo de investigación, por vincularme en procesos formativos como la escritura de artículos científicos y los “*lab meeting*”, por su rigurosidad con el manejo de los resultados, así como también por el tiempo que dispuso para mis consultas durante este proceso académico.

Además de todo el apoyo que he recibido de mis tutores y mi familia, también en este camino han estado personas que me han apoyado, animado desde el comienzo y durante todo el recorrido, para lograr terminar mi doctorado. Quiero agradecer a mis amigos/as: Helberg Asencio, por creer en mí y apoyarme al tomar la decisión de realizar el doctorado; Camilo Morales, por darme ese impulso que necesitaba y por mostrarme las posibilidades que había en la Universidad de Chile y por presentarme a la Dra. Pedrozo, por haberme brindado su hogar cuando recién llegué a Chile; a Natalia Jiménez, Paula Hurtado, Sandra Moreno, Elizabeth Londoño, Freddy Moreno, Silverio Garzón, José G. Ortega, Sebastián Medina, Angélica Pinzón, Ana Luz Cuarán, Lina Sandoval, Ana María Moncada, Juliana Orjuela,



Sandra L. Bermúdez, Awdy Dueñas, Oscar Viveros, porque de una u otra manera estuvieron pendientes de mi proceso en Chile y me dieron su apoyo en todo momento.

En el 2018, cuando llegué a Chile, pensaba que era muy difícil hacer amigos/as, pero sucedió todo lo contrario y en este camino transitado, he encontrado amistades maravillosas que hicieron este proceso mucho más enriquecedor y agradable, ellos/as son: Raúl Flores, que además de ser mi compañero de laboratorio, es mi amigo, con quién he compartido momentos agradables y difíciles; al Dr. Pablo Aránguiz, por haberme enseñado lo más básico del trabajo del laboratorio y su paciencia; a la Dra. Ivonne, por su gran capacidad de enseñar y compartir el conocimiento sin ningún reparo; a Catalina Kretschmar, por acogerme desde el primer día de clase, por querer estudiar conmigo así mi ritmo fuera más lento, por su bonita amistad; a Francisca Troncoso, por escucharme, por tener la voluntad de ayudar siempre y por intentar tener una solución siempre; a Felipe Lagos, por intentar explicarme cómo funciona un canal, pero sobre todo por su amistad; a Virginia Brown y Javier Bahamondes, por las buenas conversaciones y acogerme en su hogar con buena comida y por su interés en Colombia; al grupo de *mountain bike Club ruta 26*, porque no les importaba que no tuviera mucho tiempo para entrenar y que fuera la más lenta en las rutas. A Iris Rodríguez, su apoyo fue muy valioso para poder retornar en la medida de lo posible a las actividades del laboratorio en pandemia. Agradezco también al apoyo técnico, por contribuir al desarrollo de la tesis: Magdalena González del laboratorio de la Dra. Pedrozo. También quiero agradecer a Cecilia Carter, secretaria del Doctorado en Ciencias Biomédicas, por ser un apoyo y guía fundamental en el doctorado, por contestar amable y eficientemente las inquietudes que tenía como estudiante de doctorado.

Finalmente, y no menos importante agradezco el apoyo financiero a la Pontificia Universidad Javeriana de Cali (Colombia) y a la ANID (Chile), a través de la beca Doctorado Nacional #21191341.

El desarrollo y culminación de una tesis de doctorado, es producto de múltiples esfuerzos relacionados en el ámbito académico, pero también es producto de una red de apoyo familiar y de amistad, por todas sus contribuciones, **muchísimas gracias.**

## Índice

<b>1. Resumen</b> .....	<b>8</b>
2. <i>Abstract</i> .....	10
<b>3. Introducción</b> .....	<b>12</b>
3.1 <i>Insuficiencia cardíaca</i> .....	12
3.2 <i>Acoplamiento excitación/contracción cardíaca</i> .....	12
3.3 <i>Policistina-1 (PC1)</i> .....	13
3.3.1 <i>PC1 y corazón</i> .....	14
3.4 <i>Túbulos transversos cardíacos</i> .....	14
3.4.1 <i>Tubulogénesis</i> .....	15
3.5 <i>BIN1: Estructura y función</i> .....	15
3.5.1 <i>BIN1, c-Myc y PC1</i> .....	17
<b>4. Hipótesis y Objetivos</b> .....	<b>18</b>
<i>Objetivo general</i> .....	18
<i>Objetivos específicos</i> .....	18
<b>5. Materiales y Métodos</b> .....	<b>19</b>
5.1 <i>Animales</i> .....	19
5.2 <i>Obtención de tejido ventricular desde ratones C57BL/6</i> .....	19
5.3 <i>Ecocardiografías y parámetros morfométricos</i> .....	19
5.4 <i>Histología</i> .....	20
5.5 <i>Cultivo de cardiomiocitos ventriculares de rata neonata</i> .....	20
5.6 <i>Transfecciones y transducciones de los cardiomiocitos ventriculares de rata neonatas (NRVMs) en cultivo</i> .....	20
5.7 <i>Reactivos</i> .....	21
5.8 <i>Inmunoblot</i> .....	21
5.8.1 <i>Extracción y cuantificación de proteínas</i> .....	21
5.8.2 <i>Electroforesis y detección de la señal quimioluminiscente</i> .....	22
5.8.3 <i>Análisis densitométrico y cuantificación de la señal quimioluminiscente</i> .....	22
5.9 <i>Fraccionamiento celular</i> .....	22
5.10 <i>Extracción de ARN y qRT-PCR</i> .....	23
5.10.1 <i>Extracción del ARN celular total</i> .....	23
5.10.2 <i>Cuantificación del ARN celular total</i> .....	23
5.10.3 <i>Síntesis de cDNA - Reacción de Transcripción Reversa</i> .....	23
5.10.4 <i>qRT-PCR</i> .....	23
5.10.5 <i>Cálculo de las abundancias relativas de las isoformas de BIN1</i> .....	23

5.11 Evaluación de la ultraestructura de los Túbulo-T por microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	24
5.12 Análisis estadístico.....	24
<b>6. Resultados.....</b>	<b>26</b>
<i>Objetivo específico 1.</i> ....	26
1.1 El silenciamiento selectivo para Pkd1 en los cardiomiocitos (PC1 KO) induce el desarrollo de cardiomiopatía dilatada y a una menor sobrevida.....	26
<i>Objetivo específico 2.</i> ....	31
2.1 El contenido proteico total de BIN1 disminuye en el tejido cardíaco de ratones adultos PC1 KO a las 9-11 semanas de edad y en los de 7-9 meses de vida.....	31
2.2 El contenido proteico de BIN1 disminuye en la fracción enriquecida de membrana de túbulo-T del tejido cardíaco de los ratones PC1 KO.....	34
2.3 El silenciamiento de la PC1 en los cardiomiocitos de ratas neonatas (NRVMs) no modifica los niveles proteicos de BIN1.....	36
2.4 La sobre expresión del C-terminal completo de la PC1 (FLM) en los cardiomiocitos de ratas neonatas (NRVMs) no modifica los niveles proteicos de BIN1.....	38
2.5 La PC1 regula expresión de las isoformas cardíacas de BIN1.....	40
<i>Objetivo específico 3.</i> ....	45
3.1 La expresión deficiente de la PC1 en los cardiomiocitos del tejido cardíaco en ratones y en NRVMs aumenta los niveles del factor transcripcional c-Myc.....	45
3.2 La sobre-expresión de la PC1 (Ad-FLM) en los cardiomiocitos ventriculares de rata neonata modifica los niveles del factor transcripcional c-Myc.....	46
3.3 El silenciamiento de la PC1 o la sobre-expresión de su dominio C-terminal en los cardiomiocitos regulan el contenido proteico del factor transcripcional c-Myc.....	47
3.4 El silenciamiento de c-Myc en los NRVMs modifica los niveles de las isoformas cardíacas de BIN1.....	49
3.5 El silenciamiento o la sobre-expresión de c-Myc en los NRVMs modifica el contenido proteico de BIN1.....	53
<i>Objetivo específico 4.</i> ....	54
4.1 Los cardiomiocitos de los ratones PC1 KO presentan un remodelamiento de la ultraestructura de los túbulo-T.....	54
<b>7. Discusión.....</b>	<b>63</b>
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>70</b>
<b><i>Graphical Abstract. Policistina-1 regula la expresión de BIN1 en cardiomiocitos y mantiene la ultraestructura de los túbulo-T.</i>.....</b>	<b>71</b>
<b>9. Referencias.....</b>	<b>72</b>
<b>10. Asistencia a congresos y publicaciones generadas.....</b>	<b>76</b>
10.1 Publicaciones.....	76

## 1. Resumen

La Insuficiencia cardíaca (IC) es la incapacidad del corazón de generar un adecuado gasto cardíaco de acuerdo a la demanda requerida por el organismo. Uno de los cambios estructurales que presenta el corazón durante la IC son las alteraciones en los túbulos transversos (túbulos-T). Los túbulos-T son invaginaciones de la membrana que desempeñan un papel fundamental en el acoplamiento excitación-contracción de los cardiomiocitos. La expresión de la proteína *Bridging integrator 1* (BIN1) específicamente, las isoformas cardíacas BIN1+13 y BIN1+13+17 en cardiomiocitos promueve la formación y la ultraestructura de los túbulos-T además de la mantención de los canales de calcio sensibles a potencial tipo-L (LTCC) en los mismos. También, ha sido descrito que el factor transcripcional c-Myc es un regulador negativo de la expresión de BIN1 y además se encuentra sobre expresado en la insuficiencia cardíaca. La Policistina-1 (PC1) es un mecanosensor, se expresa de forma ubicua y la expresión deficiente en los cardiomiocitos de ratones *knockout* (KO) reduce la función cardíaca. Sin embargo, actualmente se desconoce si la PC1 regula la formación de túbulos-T inducida por BIN1 a través de un mecanismo regulado por c-Myc. Para evaluar si la PC1 regula la expresión de BIN1 y la formación de los túbulos-T en los cardiomiocitos, utilizamos ratones adultos C57BL/6 silenciados selectivamente en cardiomiocitos para PC1 (PC1 KO) de 9 a 11 semanas y de 7 a 9 meses de edad, así como cardiomiocitos ventriculares neonatas aislados de ratas Sprague-Dawley silenciados para PC-1 (NRVMs siPC1). Silenciamos PC1 y c-Myc usando siRNA específicos. Además, sobre expresamos por medio de adenovirus, el C-terminal de PC1 (Ad-FLM). La función cardíaca en los ratones PC1 KO fue determinada por ecocardiografía, evaluamos la sobrevida en estos animales, así como también los parámetros morfométricos (peso del corazón, pulmón y longitud de la tibia). El contenido de proteína y el ARNm de BIN1, PC1 y c-Myc, se evaluó usando western blot y qRT-PCR, respectivamente. La ultraestructura de los túbulos-T en el tejido cardíaco ventricular fue evaluada mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Encontramos que la expresión deficiente de PC1 en tejido cardíaco ventricular de ratones PC1 KO de 9 a 11 semanas de vida genera disfunción cardíaca (reducción en la fracción de eyección y de acortamiento), y en los PC1 KO de 7 a 9 meses de edad esta disfunción progresa hacia una cardiomiopatía dilatada, lo cual disminuye su sobrevida. Estos hallazgos se asociaron con niveles reducidos de contenido proteico y del ARNm de BIN1 total, tanto a las 9-11 semanas como a los 7-9 meses de edad. Aunque en los NRVMs siPC1 no hubo diferencias

en los niveles proteicos ni en el ARNm de BIN1 comparado con sus controles. De manera interesante, encontramos que en los ratones PC1 KO de 9 a 11 semanas y los NRVMs siPC1, la isoforma cardíaca BIN1+13 disminuye y la BIN1+13+17 aumenta significativamente. Mientras en los PC1 KO de 7 a 9 meses el ARNm de todas isoformas cardíacas de BIN1 se encuentran disminuidas. Además, cuando se sobre expresó el C-terminal de PC1 (Ad-FLM) en los NRVMs observamos aumento del ARNm de BIN1+13 y una disminución significativa de BIN1+13+17. Por otra parte, encontramos niveles aumentados del contenido proteico y del ARNm de c-Myc en el tejido cardíaco de ratones PC1 KO en ambas edades y en NRVMs siPC1. Mientras que en los NRVMs Ad-FLM el contenido de proteína y de ARNm de c-Myc estaba disminuido. Asimismo, en NRVMs si-c-Myc, encontramos un aumento del contenido proteico y del ARNm del BIN1 total, un aumento significativo para la isoforma BIN1+13 y una disminución de BIN1+13+17. En cambio en los NRVMs en los que se sobre expresó c-Myc (Ad c-myc), encontramos disminución en el contenido de proteína de BIN1 total, del ARNm de BIN1t y del ARNm de la isoforma BIN1+13. Finalmente, encontramos cambios en la ultraestructura de los túbulos-T (aumento del área del lumen y disminución de la electrondensidad) en el tejido cardíaco ventricular de los ratones PC1 KO en ambas edades, pero sólo los de 7 a 9 meses de edad, presentan disminución del número de túbulos-T por área. Estos datos en conjunto sugieren que la PC1 puede ser un regulador de la expresión diferencial de las isoformas cardíacas de BIN1 en los cardiomiocitos, a través de un mecanismo de regulación negativa de c-Myc y que su ausencia genera cambios estructurales en los túbulos-T.

## 2. Abstract

Heart failure (HF) is the inability of the heart to generate adequate cardiac output according to the demand required by the body. One of the structural changes that the heart presents during HF are alterations in the transverse tubules (T-tubules). T-tubules are membrane invaginations that play a fundamental role in the excitation-contraction coupling of cardiomyocytes. The expression of the protein Bridging integrator 1 (BIN1) specifically, the cardiac isoforms BIN1+13 and BIN1+13+17 in cardiomyocytes promotes the formation and ultrastructure of T-tubules. In addition to the maintenance of potential-sensitive calcium channels. type-L (LTCC) in them. Also, it has been described that the transcriptional factor c-Myc is a negative regulator of BIN1 expression and is also overexpressed in heart failure. Polycystin-1 (PC1) is a mechanosensor, it is ubiquitously expressed, and its deficient expression in cardiomyocytes of knockout (KO) mice reduces cardiac function. However, it is currently unknown whether PC1 regulates BIN1-induced T-tubule formation through a c-Myc-regulated mechanism. To assess whether PC1 regulates BIN1 expression and T-tubule formation in cardiomyocytes, we used adult C57BL/6 mice selectively silenced in cardiomyocytes for PC1 (PC1 KO) at 9 to 11 weeks and 7 to 9 months of age. As well as neonatal rat ventricular cardiomyocytes isolated from Sprague-Dawley rats silenced for PC-1 (NRVMs siPC1). We silenced PC1 and c-Myc using specific siRNAs. In addition, we overexpress by means of adenoviruses, the C-terminus of PC1 (Ad-FLM). Cardiac function in PC1 KO mice was determined by echocardiography, we evaluated survival in these animals, as well as morphometric parameters (heart weight, lung weight, and tibial length). The protein and mRNA content of BIN1, PC1 and c-Myc, was evaluated using western blot and qRT-PCR, respectively. The ultrastructure of T-tubules in ventricular cardiac tissue was evaluated by transmission electron microscopy (TEM). We found that deficient expression of PC1 in ventricular cardiac tissue of 9 to 11-week-old PC1 KO mice generates cardiac dysfunction (reduced ejection fraction and shortening), and in 7 to 9-month-old PC1 KO mice this dysfunction progresses to dilated cardiomyopathy, which decreases their survival. These findings were associated with reduced levels of protein content and total BIN1 mRNA at both 9-11 weeks and 7-9 months of age. Although in siPC1 NRVMs there were no differences in protein levels or BIN1 mRNA compared to their controls. Interestingly, we found that in 9 to 11-week-old PC1 KO mice and siPC1 NRVMs, the cardiac isoform BIN1+13 is significantly decreased and BIN1+13+17 is significantly increased. While in PC1 KO from 7 to 9 months the mRNA of all cardiac isoforms of BIN1 are decreased. In addition, when the C-terminal of PC1 (Ad-FLM) was overexpressed in the NRVMs, we observed an

increase in the mRNA of BIN1+13 and a significant decrease in BIN1+13+17. On the other hand, we found increased levels of c-Myc mRNA and protein content in heart tissue of PC1 KO mice at both ages and in NRVMs siPC1. While in the Ad-FLM NRVMs the protein and mRNA content of c-Myc was decreased. Likewise, in NRVMs si-c-Myc, we found an increase in the protein and mRNA content of total BIN1, a significant increase for the BIN1+13 isoform, and a decrease in BIN1+13+17. In contrast, in the NRVMs in which c-Myc (Ad c-myc) was overexpressed, we found a decrease in the protein content of total BIN1, of BIN1t mRNA, and of the BIN1+13 isoform mRNA. Finally, we found changes in the ultrastructure of the T-tubules (increased lumen area and decreased electron density) in the ventricular heart tissue of PC1 KO mice at both ages, but only those aged 7 to 9 months showed decreased number of T-tubules per area. Together, these data suggest that PC1 may be a regulator of the differential expression of cardiac isoforms of BIN1 in cardiomyocytes, through a negative regulation mechanism of c-Myc, and that its absence generates structural changes in T-tubules.

### 3. Introducción

#### 3.1 Insuficiencia cardíaca

La insuficiencia cardíaca (IC) es un síndrome clínico complejo identificado por la presencia de síntomas característicos, como disnea y fatiga, además de evidencia de disfunción cardíaca debido a una anomalía estructural y/o funcional del corazón, que resulta en presiones intracardíacas elevadas y/o gasto cardíaco inadecuado en reposo y/o durante el ejercicio. Desde una perspectiva hemodinámica, la IC es la incapacidad del corazón de bombear la sangre al cuerpo acorde con sus necesidades, o puede hacerlo solo a expensas de altas presiones de llenado ventricular (1). Se ha estimado que la prevalencia de la IC en EE.UU y Canadá es de 1,5 a 1,9% de la población total y en Europa es de 1,2%. Su prevalencia e incidencia aumenta de manera progresiva con la edad (2).

Con el fin de evaluar la progresión de la IC, las directrices del Colegio Americano de Cardiología y de la Asociación Americana del Corazón (*American Heart Association and American College of Cardiology guidelines*), ha propuesto 4 estadios de la IC (3, 4):

- Estadio A: presentar riesgo alto de IC, sin cambios estructurales del corazón y sin síntomas de IC.
- Estadio B: cambios estructurales en el corazón, pero sin signos ni síntomas de IC. Esta etapa incluye pacientes en clase funcional I de la NYHA (*New York Heart Association*) sin síntomas o signos previos o actuales de IC.
- Estadio C: cambios estructurales en el corazón con síntomas previos o actuales de IC. Esta etapa incluye pacientes en cualquier clase funcional de la NYHA (incluida la clase I con síntomas previos).
- Estadio D: IC refractaria que requiere intervenciones especializadas. En este estadio se incluyen pacientes en clase funcional IV de la NYHA con IC refractaria.

A pesar de que varias pueden ser las causas del desarrollo de la IC, uno de los mayores cambios fisiopatológicos son las alteraciones en el acoplamiento excitación/contracción.

#### 3.2 Acoplamiento excitación/contracción cardíaca

La contracción del miocardio es dependiente del mecanismo conocido como acoplamiento excitación-contracción (acoplamiento E-C), el cual se inicia mediante la generación de los potenciales de acción cardíacos, que producen la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo-L dependientes de potencial (LTCC), presentes principalmente en los túbulos transversos (túbulos-T), los cuales corresponden a invaginaciones del sarcolema. La entrada



de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los LTCC desencadena la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico (RS) por medio de los receptores de ryanodina (RyRs), mecanismo conocido como “liberación de calcio inducida por calcio”, lo que conlleva a un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático (5). En los cardiomiocitos, la relación estrecha entre los túbulos-T y las cisternas del RS es conocida como diadas cardíacas (5, 6). La organización y cantidad de las diadas tiene implicancias funcionales tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (7), así, una cantidad adecuada de diadas garantiza la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que desencadena la contracción cardíaca (8). Por otro lado, en condiciones patológicas como el shock hiperosmótico, el infarto agudo del miocardio y la insuficiencia cardíaca, se ha encontrado dilatación de los túbulos-T, una disminución del número de diadas, pérdida de la eficacia del acoplamiento E-C y una contractilidad cardíaca alterada (7-10).

Durante cada ciclo cardíaco el corazón es sometido a cambios de longitud; el llenado ventricular (diástole) induce el estiramiento de los cardiomiocitos mientras que durante la eyección de la sangre (sístole), éstos se acortan (11, 12). Estos cambios de longitud son detectados por proteínas conocidas como mecanosensores (13), los cuales censan el estiramiento de la matriz extracelular y/o del sarcolema, y transducen vías de señalización vitales para la función y la sobrevivencia de los cardiomiocitos, sin embargo, se sabe poco sobre los mecanosensores presentes en el corazón, cuales son las vías que activan y como contribuyen a la regulación fisiológica de este órgano (14, 15).

### **3.3 Policistina-1 (PC1)**

La Policistina-1 (PC1) es una proteína mecanosensora que pertenece a la familia de los TRP (*Potencial Receptor Transition*), específicamente a los TRPP. La PC1 se expresa en diferentes tejidos, como el nervioso, renal, óseo y cardíaco (16, 17). Se localiza tanto en cilios primarios (células renales y fibroblastos) (18, 19), como en el sarcolema de los cardiomiocitos (20, 21). Esta proteína está formada por 4303 aminoácidos, con un gran dominio extracelular N-terminal, once dominios transmembrana y un C-terminal citoplasmático pequeño de 200 aminoácidos (16). El dominio extracelular de la PC1 contiene un sitio proteolítico del receptor acoplado a proteína G (GPS), que cuando se escinde produce un fragmento N-terminal (400 kDa) y un fragmento C-terminal (150 kDa). Mientras el C-terminal de PC1 modula diferentes vías de señalización, como la de la PKC, PI3K/AKT, mTOR, calcineurina-NFAT y afecta la actividad de factores de transcripción como STAT y el coactivador p100, entre otros, el N-terminal funciona como sensor mecánico, detectando estímulos de deformación de la membrana celular (16).

### **3.3.1 PC1 y corazón**

Estudios previos con ratones silenciados para la expresión de la PC1 únicamente en los cardiomiocitos (PC1 KO), mostraron que los animales presentan disfunción sistólica y diastólica medida por ecocardiografía a las 8 semanas de vida y al menos hasta las 12 semanas de vida no presentaron alteraciones en su desarrollo ni signos de insuficiencia cardíaca (IC) (20, 21). Sin embargo, se desconoce el progreso de la disfunción cardíaca con la edad en estos ratones. Por otra parte, se encontró en los ratones PC1 KO una disminución de los niveles proteicos de los LTCC en la superficie celular (20, 22). Más aún, se demostró que la PC1 es vital para el desarrollo de la hipertrofia cardíaca inducida por constricción aórtica transversa (TAC), lo cual simula un aumento de la postcarga cardíaca (20). Tanto la disfunción como la inhibición del desarrollo de la hipertrofia cardíaca observada en estos ratones podrían estar asociadas, al menos en parte, a la disminución de los LTCC en ausencia de la PC1 (20). Corroborando lo anterior, los cardiomiocitos ventriculares de rata neonata (NRVM) *knockdown* para la PC1 (siPC1), sometidos a estrés mecánico por medio de un estímulo con solución hipoosmótica (HS), revelaron que la PC1 esta involucrada con la regulación y estabilidad de los LTCC cardíacos (22). Debido a que la pérdida de los túbulos-T puede llevar a la degradación de los LTCC y que esto antecede a las manifestaciones clínicas de la IC (23), se puede hipotetizar que la PC1 podría ser necesaria para la mantención de la estructura de los túbulos-T.

Un estudio reciente demuestra que la PC1 regula varios canales de potasio involucrados en la repolarización de los cardiomiocitos (21), sin cambios aparentes en la densidad de los túbulos-T, sugiriendo que la PC1 no tendría un papel en la constitución y/o mantención de los mismos, sin embargo, en dicho estudio no se realizó un análisis profundo acerca del papel de este mecanosensor en la formación y mantención de la estructura de los túbulos-T, el cual puede variar sin cambios evidentes en la densidad de los mismos. Los cambios en la estructura de los túbulos-T conllevan cambios profundos en la función contráctil cardíaca (24).

Si bien, el conjunto de estos datos indica que la PC1 es un mecanosensor de los cardiomiocitos que regula tanto la contractilidad cardíaca como los niveles proteicos de los LTCC, se desconocen los mecanismos por los cuales ejerce esta regulación.

### **3.4 Túbulos transversos cardíacos**

Los túbulos-T son invaginaciones ramificadas del sarcolema, los cuales penetran el espacio intracelular. En los cardiomiocitos ventriculares, los túbulos-T constituyen el 0,8–3,6% del volumen celular total y el 21–64% del sarcolema total y varían en diámetro (20–450 nm) y

densidad, dependiendo de las especies (25). Los túbulos-T se encuentran presentes en los cardiomiocitos maduros, mientras los embrionarios, fetales y atriales carecen de ellos (26).

Estas estructuras tienen funciones importantes para el acoplamiento E-C, el mantenimiento del potencial de membrana en reposo, la iniciación y regulación del potencial de acción y la transducción de señales (25). La membrana del túbulo-T contiene microdominios que compartimentalizan los canales iónicos, como los LTCC, los cuales se posicionan cercanos a los RyRs (6, 24), ayudando latido a latido a regular el flujo eficiente de  $Ca^{2+}$  y por lo tanto, funcionan como un centro de señalización que controla la función contráctil cardíaca (25). Estudios en diferentes especies han mostrado que la remodelación de los túbulos-T en los cardiomiocitos ventriculares se encuentra presente e incluso antecede al desarrollo de la IC, lo cual se refleja en la reducción general de la densidad de los túbulos-T y un desarreglo en su organización (9, 27-30). Sin embargo y a pesar de la importancia de los túbulos-T tanto fisiológicamente como durante el desarrollo de diferentes patologías cardíacas, se conoce poco acerca de su generación (tubulogénesis), regulación y mantención en los cardiomiocitos.

#### **3.4.1 Tubulogénesis**

Se ha reportado que el desarrollo de los túbulos-T en mamíferos pequeños comienza durante el período postnatal, extendiéndose hasta la tercera semana (29, 30) y en mamíferos de mayor tamaño como las ovejas y los humanos, se ha encontrado que el desarrollo de estas estructuras inicia al final de la gestación y su maduración ocurre posterior al nacimiento (31). No obstante, se sabe muy poco acerca de los procesos involucrados en la biogénesis de los túbulos-T. Varias proteínas adaptadoras (*scaffolding*) se han asociado con la biogénesis de los túbulos-T, como: Junctofilina 2, caveolina 3 y *Bridging integrator 1* (BIN1) (28, 32).

BIN1 ha sido reportada como uno de los principales reguladores de la formación y mantención del túbulo-T y sus proteínas asociadas, como los LTCC (24), ya que está involucrada tanto en el tráfico y la agrupación de estos canales, así como la organización de microdominios de la membrana celular (32). Mientras la supresión del gen que codifica para BIN1 produce cardiopatía perinatal (33), su supresión en animales adultos conduce al desarreglo de los túbulos-T (34, 35). Hasta el momento sin embargo se desconocen los mecanismos que permiten que BIN1 regule la tubulogénesis, tanto en condiciones fisiológicas como en situaciones fisiopatológicas cardíacas.

#### **3.5 BIN1: Estructura y función**

BIN1, también conocida como anfifisina 2, pertenece a la superfamilia de proteínas que contiene el dominio *Bin1-Amphiphysin-Rvs* (BAR) (36). BIN1 se identificó por primera vez a

través de su interacción con la oncoproteína MYC y se identificó como un supresor de tumores (37). La superfamilia de proteínas del dominio BAR están involucradas en múltiples procesos celulares en diferentes tejidos y órganos, como el tráfico y la remodelación de membranas, la regulación del citoesqueleto, la reparación del ADN, la progresión del ciclo celular y la apoptosis (25, 38).

BIN1 está codificado por un gen con 20 exones que se empalman selectivamente para producir las diversas isoformas expresadas en diferentes tejidos. Todas las isoformas de BIN1 contienen un dominio BAR conservado de unión a lípidos en el N- terminal (exones 1-9), una región *coiled-coil* de *splicing* alternativo (exón 13-16), un dominio de enlace MYC codificado por un *splicing* del exón 17, un exón 18 constitutivo, y exones 19-20 en el C-terminal conservado (dominio de homología SH3), que permite la interacción con el citoesqueleto y otras proteínas intracelulares (25). En el tejido cardíaco se expresan cuatro isoformas diferentes: BIN1+12 y BIN1+17 que son ubicuas y dos variantes de *splicing* alternativo cardíacas: BIN1+13 y BIN1+13+17 (24, 25). La formación del túbulo-T requiere inserción en la membrana de dímeros de BIN1 a través de su dominio N-terminal para iniciar la invaginación inicial del túbulo-T (25, 39, 40). En el corazón del ratón, BIN1+13 es la isoforma más abundante, pero si bien BIN1+13+17 es menos abundante, juega un papel fundamental en la formación, cantidad y funcionalidad de los túbulos-T (27).

En ratones *knockout* (KO) para BIN1 cardíaco, que desarrollan cardiomiopatía dilatada, la restauración de la expresión de BIN1+13+17 rescata la función del túbulo-T y del corazón (33) y tanto en modelos animales como humanos, los niveles de BIN1 disminuyen durante la IC (35, 41), sin embargo, la contribución de la reducción de BIN1 en el desarrollo y la progresión de esta enfermedad sigue siendo desconocida. Por otra parte, BIN1 dirige el ensamblaje y mantenimiento de las díadas cardíacas. La subunidad  $Ca_v1.2$  del LTCC está localizada y agrupada en los túbulos-T por interacción específica con BIN1 y su disminución causa una reducción sustancial de esta subunidad en la superficie celular (34). Se ha demostrado además que las isoformas cardíacas de BIN1, son responsables de la formación y mantenimiento de la ultraestructura de los túbulos-T (micro plegamientos), los cuales son microdominios de membrana que ayudan a la homeostasis de las concentraciones iónicas, principalmente de  $Ca^{2+}$  en las díadas cardíacas (24, 25), siendo vitales por tanto para la función contráctil del corazón. Hasta el momento se desconoce cómo se regula la expresión de BIN1, sin embargo, datos preliminares de nuestro laboratorio sugieren que la PC1 podría estar implicada en dicha regulación. Comprender la regulación de BIN1 puede revelar aspectos novedosos e importantes de los mecanismos subyacentes a la fisiopatología cardíaca.

### 3.5.1 BIN1, c-Myc y PC1

Se ha reportado en células cancerosas que la sobreexpresión de c-Myc reprime la expresión de BIN1, sugiriendo que este factor transcripcional es un regulador negativo de BIN1 (42-44). Durante la IC los niveles de c-Myc se encuentran elevados (45), y, de hecho, la sobreexpresión de c-Myc induce la aparición de esta enfermedad, con disfunción mitocondrial en pocas semanas (46). Aunque no se conocen los mecanismos a través de los cuales c-Myc es expresado positivamente durante el desarrollo de la IC, esto podría tener relación con la disminución de BIN1 observada en esta patología, lo que a su vez explicaría la alteración de los túbulos-T. Por otra parte, se conoce que c-Myc está altamente aumentado en los riñones de pacientes con la enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ADPKD) y en varios modelos de ratones en los que el gen *Pkd1* a nivel renal ha sido mutado o eliminado (47, 48), lo que sugiere que la PC1 es un regulador negativo de la expresión de c-Myc en las células renales. Sin embargo, se desconoce el efecto de PC1 sobre los niveles de c-Myc en los cardiomiocitos.

**En resumen**, considerando que: a) la ausencia de la PC1 en los ratones de 8 semanas de vida disminuye la contractilidad cardíaca y el contenido proteico de los LTCC en los cardiomiocitos, b) la pérdida de los túbulos-T se relaciona con la disminución de los LTCC y empeoramiento de la IC, c) la expresión de BIN1 en los cardiomiocitos regula positivamente la formación de los túbulos-T y/o la mantención de la ultraestructura de éstos, siendo crucial para la contractilidad cardíaca, d) datos preliminares de nuestro laboratorio sugieren que la PC1 regularía positivamente la expresión de BIN1 en el tejido cardíaco, e) c-Myc es un regulador negativo de BIN1 en células cancerosas y se encuentra aumentado en la disfunción cardíaca y f), la PC1 es un regulador negativo de la expresión de c-Myc en células renales, proponemos que la PC1 regula la expresión basal de BIN1 y la formación y/o mantención de la ultraestructura de los túbulos-T en los cardiomiocitos a través de un control negativo de la expresión de c-Myc. El conocimiento de estos mecanismos ayudaría a comprender la regulación fisiológica de los túbulos-T en los cardiomiocitos, así como también el papel de la PC1 en las alteraciones de la contractilidad cardíaca.

## **4. Hipótesis y Objetivos**

La Policistina-1 promueve la expresión de BIN1 mediante un mecanismo de regulación negativa de c-Myc manteniendo la ultraestructura de los túbulos-T de los cardiomiocitos.

### **Objetivo general**

Determinar el papel de la Policistina-1 en la mantención de la ultraestructura de los túbulos-T en los cardiomiocitos a través de la regulación de la expresión de c-Myc y BIN1.

### **Objetivos específicos**

- 1. Evaluar la función cardíaca en los ratones PC1 KO a diferentes edades.**
- 2. Estudiar el papel de la PC1 en la expresión de las isoformas cardíacas de BIN1, tanto en tejido de corazones de ratones PC1 KO a diferentes edades, como en cultivo de miocitos ventriculares de rata neonata.**
- 3. Evaluar el efecto de la PC1 en la expresión de c-Myc y su relación con la expresión de BIN1 en cardiomiocitos.**
- 4. Determinar los cambios en la estructura de los túbulos-T asociados a la expresión de la PC1 en los cardiomiocitos.**

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1 Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6 de 7 días de nacidos, de 9-11 semanas de vida y de 7 a 9 meses de edad, con un silenciamiento selectivo y específico en los cardiomiocitos para el gen de la Policistina-1 (*Pkd1*), (*KnockOut* para la PC1, PC1 KO). De acuerdo con lo descrito en la literatura (20), estos animales se obtuvieron por medio de la cruce de ratones modificados genéticamente portadores de un gen para la recombinasa Cre, cuya expresión es controlada por un promotor de la cadena pesada de la  $\alpha$ -miosina ( $\alpha$ -MHC Cre) y de ratones que poseen los alelos del gen *Pkd1* floxeados por sitios loxP (*Pkd1*<sup>fllox/fllox</sup>). Como controles se usaron ratones C57BL/6 *Pkd1*<sup>fllox/fllox</sup> (PC1<sup>fl/fl</sup>).

Se utilizaron además ratas Sprague-Dawley neonatas de 1-3 días de vida de ambos sexos, para el aislamiento y cultivo de miocitos ventriculares de rata neonata (NRVMs).

La mantención y manipulación de estos animales se realizó de acuerdo con las normas éticas establecidas para animales de experimentación (*Guide for the care and use of laboratory animals, National Institutes of Health, EE. UU., 2011*). Proyecto aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (CBA#0997/FMUCH y CBA#1099)

### 5.2 Obtención de tejido ventricular desde ratones C57BL/6

Los ratones fueron expuestos a isoflurano calidad USP al 0,1% (1 mg/L, dosis correspondiente a la de eutanasia). Una vez evidenciados signos de sedo-analgésia profunda, se procedió a realizar dislocación cervical y comprobación de ausencia de reflejos. Posteriormente se realizó una toracotomía para extraer el corazón completo. Posteriormente los ventrículos fueron separados de las aurículas y lavados en PBS1X frío. El tejido ventricular fue congelado en nitrógeno líquido, triturado en un mortero y almacenado a -80 °C hasta su posterior uso.

### 5.3 Ecocardiografías y parámetros morfométricos

Se realizaron ecocardiografías en los ratones anestesiados (isoflurano, 0,5-1%) a través del ecógrafo Vivid i (General Electric) con el transductor iRL-RS. Se analizaron las dimensiones de fracción de acortamiento y fracción de eyección, de acuerdo con lo descrito en la literatura(20). Los parámetros morfométricos se obtuvieron después de eutanaziar los ratones como fue descrito en el apartado anterior. Los parámetros morfométricos que se

obtuvieron fueron: peso del corazón/longitud de la tibia y peso húmedo de los pulmones/longitud de la tibia.

#### **5.4 Histología**

Los corazones de los ratones se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas y posteriormente se transfirieron a PBS 1X, seguido de inclusión en parafina. Se realizó tinción con hematoxilina/eosina para análisis morfológicos.

#### **5.5 Cultivo de cardiomiocitos ventriculares de rata neonata**

El aislamiento y cultivo de los NRVMs fue realizado de acuerdo con lo descrito previamente en la literatura (20). Brevemente, los animales fueron decapitados, se extrajo rápidamente el corazón y se procedió a la separación de aurículas y ventrículos. El tejido ventricular fue cortado previo a la digestión enzimática con pancreatina a una concentración de 0,1 g/100 mL en PBS 1X. Las células obtenidas de la digestión fueron plaqueadas e incubadas durante 50 min en un ambiente de 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire a 37°C en presencia de medio de plaqueo (DMEM/M199 4:1, suero fetal bovino 10%, suero equino 5%, Penicilina:Estreptomicina 100 unidades/mL:100 µg/mL, L-glutamina 200 mM, 5'-bromo-2'-desoxiuridina 100 µM) para separar los fibroblastos (los cuales se adhieren al plástico de la placa) de los cardiomiocitos (sobrenadante). Los cardiomiocitos obtenidos fueron contados en una cámara de Neubauer y posteriormente se sembraron en placas previamente recubiertas con una monocapa de gelatina. El número por sembrar fue determinado de acuerdo con las condiciones experimentales y las placas se mantuvieron por 24 horas en medio de plaqueo. Posteriormente, se realizó el lavado de las células con PBS 1X y estas se mantuvieron en medio de mantención (DMEM/M199 4:1, suero fetal bovino 10%, Penicilina:Estreptomicina 100 unidades/mL:100 µg/mL y 5'-bromo-2'-desoxiuridina 100 µM) hasta realizar los experimentos correspondientes.

#### **5.6 Transfecciones y transducciones de los cardiomiocitos ventriculares de rata neonatas (NRVMs) en cultivo**

Para disminuir la expresión de la PC1 o del factor transcripcional *c-Myc*, los NRVMs fueron transfectados con un siRNA con secuencia específica para los mismos, designados como siPC1 o si *c-Myc*, respectivamente. Brevemente, los NRVMs se transfectaron con 127 nM del siRNA correspondiente, en presencia de oligofectamina en medio Opti-MEM. Como control, se utilizó un siRNA de secuencia no relacionada. Los experimentos se terminaron a las 48 h post transfección. La eficiencia del silenciamiento se muestra en las Figuras 10 y 23.



Para sobreexpresar el C-terminal completo de la PC1 humana anclada a la membrana, fue utilizado el vector adenoviral Ad-FLM. Como control de la transducción se utilizó un adenovirus vacío citomegalovirus (CMV Ad-Null). En breve, los NRVMs se transdujeron con un MOI (multiplicidad de infección) de 20 en medio de mantención. Los experimentos se terminaron a 24 h post transducción. Adicionalmente, para sobreexpresar el factor transcripcional c-Myc, fue utilizado el vector adenoviral Ad c-Myc y como control de la transducción el adenovirus vacío citomegalovirus (CMV Ad-Null), a un MOI de 2 durante 48 h. La eficiencia de la sobreexpresión se muestra en las Figuras 12 y 25.

## 5.7 Reactivos

Pancreatina, 5'-bromo-2'-desoxiuridina, siPC1 y sic-Myc fueron provistos por Sigma-Aldrich. PBS 1X, DMEM, M199, Suero fetal bovino, Suero equino, Penicilina/Estreptomicina 100X y H<sub>2</sub>O libre de RNAsas y DNAsas se obtuvieron de HyClone, GE Healthcare Life Sciences. L-glutamina 200 mM y Opti-MEM fueron provistos por Gibco, ThermoFisher Scientific. Oligofectamina y SYBR Green se adquirieron de Invitrogen, ThermoFisher Scientific. Ad-FLM y Ad-Null se adquirieron de Vector Biolabs. T-PER y BSA 2 mg/mL fueron provistos por ThermoFisher Scientific. cOmplete - Inhibitor Cocktail Tablets y PhosSTOP- Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets se obtuvieron de Roche, Sigma-Aldrich. Protein Assay Dye Reagent y iScript cDNA synthesis Kit se adquirieron de Bio-Rad, en tanto el TRIsure y el cloroformo se adquirieron de Bioline y Merck, respectivamente.

## 5.8 Inmunoblot

### 5.8.1 Extracción y cuantificación de proteínas

Para la obtención de un lisado total de proteínas, tanto de muestras provenientes de los NRVMs como de tejido cardíaco ventricular, se utilizó el buffer de lisis comercial T-PER (*Tissue Protein Extraction Reagent*) suplementado con el cóctel inhibidor de proteasas (*cOmplete - Protease Inhibitor Cocktail Tablets*) y fosfatasa (*PhosSTOP - Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets*). Los lisados celulares obtenidos fueron centrifugados a 8.000 x g durante 8 minutos a 4°C para la obtención de un sobrenadante al cual se le determinó la concentración de proteínas por medio del método de Bradford. Se utilizó el kit Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad) según las indicaciones del fabricante. Se realizó una curva de calibración (Absorbancia vs. Concentración en µg/µL) usando como estándar proteico Albúmina de Suero Bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA, ), y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en el lector de placa Sunrise (Tecan).

### **5.8.2 Electroforesis y detección de la señal quimioluminiscente**

Los lisados proteicos obtenidos, fueron separados por medio de una electroforesis en gel de poli-acrilamida/bis-acrilamida con dodecilsulfato sódico en condiciones denaturantes, por medio de un campo eléctrico (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad). Los geles fueron realizados al 10% y 15%. Posterior a la separación electroforética las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Immobilon-P<sup>sq</sup>, Milipore), por medio del equipo Transblot (Bio-Rad). La membrana fue bloqueada durante 1 h a temperatura ambiente con una solución de BSA al 5% en TBS-Tween 0,2 % (TBST) y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario de interés (Tabla 1) a 4 °C toda la noche o 1 h a temperatura ambiente. Luego se incubó con un anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano. La señal quimioluminiscente fue detectada por el imager Chemidoc XRS System (Bio-Rad) o el imager C-DiGit Blot Scanner (LI-COR).

### **5.8.3 Análisis densitométrico y cuantificación de la señal quimioluminiscente**

Para el análisis densitométrico de las bandas correspondientes se utilizó el software ImageLab versión 6.0.1 (Bio-Rad). El contenido proteico se expresó como la razón de la señal densitométrica de la proteína de interés sobre la señal densitométrica del GAPDH (utilizado como control de carga).

### **5.9 Fraccionamiento celular**

Los corazones fueron obtenidos como se mencionó anteriormente. El tejido se homogeneizó mediante un homogeneizador de vidrio/vidrio en una proporción de 1:5 (p/v) de buffer de sacarosa (sacarosa 0,3 M y HEPES 10 mM, pH 7,4) suplementado con inhibidores de proteasas (Roche). El homogeneizado se centrifugó a 5000 x g a 4 °C durante 15 minutos para eliminar los residuos. El sobrenadante se mantuvo en hielo y el pellet se resuspendió y se centrifugó de nuevo durante 15 min a la misma velocidad y ambos sobrenadantes se agruparon y centrifugaron a 15.000 x g a 4 °C durante 20 minutos. Se recogió el nuevo sobrenadante y se añadió KCl (0,6 M). Esta suspensión se centrifugó a 120.000 x g a 4 °C durante 80 min. El pellet, microsomas enriquecidos en componentes de la membrana superficial, se resuspendió en buffer de sacarosa y se mantuvo a -80 °C. La fracción de sobrenadante se utilizó como fracción citosólica en los análisis de experimentos posteriores. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford anteriormente mencionado.

## **5.10 Extracción de ARN y qRT-PCR**

### **5.10.1 Extracción del ARN celular total**

Para la obtención del ARN total, tanto de muestras provenientes de cardiomiocitos en cultivo como de tejido cardíaco ventricular, se realizó una extracción por medio del método del tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo. Brevemente, las muestras se trataron con el reactivo TRIsure y cloroformo (5:1). Se centrifugaron las muestras a 12.000 x g por 12 minutos a 4 °C y se obtuvo la capa superior acuosa. La precipitación del ARN total se realizó utilizando isopropanol a -80 °C durante toda la noche. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12.000 x g por 12 minutos a 4 °C para la obtención del RNA, el cual fue lavado tres veces con etanol al 75%.

### **5.10.2 Cuantificación del ARN celular total**

La cuantificación del ARN se realizó con el Micro espectrofotómetro Nano-400 v 1.0 (ALLSHENG), siguiendo las instrucciones del proveedor.

### **5.10.3 Síntesis de cDNA - Reacción de Transcripción Reversa**

Se utilizó 150 ng de ARN de cada muestra para la reacción de Transcriptasa Reversa, usando el kit iScript cDNA synthesis (Bio-Rad) según las indicaciones del fabricante. El DNA complementario (*complementary DNA*, cDNA) se diluyó 10 veces con H<sub>2</sub>O libre de ARNasas y DNAsas.

### **5.10.4 qRT-PCR**

Para la cuantificación del transcrito de *Pkd1*, *BIN1 total*, *las isoformas de BIN1*, *c-Myc* y *18S ARNr* (utilizado como housekeeping), a una concentración final de 45 ng, se usó el reactivo SYBR Green (Invitrogen) y los partidores específicos (Tabla 2). Las abundancias relativas de los transcritos fueron calculadas por medio del método del  $\Delta\Delta C_t$ .

### **5.10.5 Cálculo de las abundancias relativas de las isoformas de BIN1**

De acuerdo con lo descrito en la literatura previamente (24), se generaron partidores específicos para detectar las isoformas de *BIN1* que unen los exones de interés (12 y 13, 17 y 18, 12 y 17, 12 y 18).

### **5.11 Evaluación de la ultraestructura de los Túbulos-T por microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Para el estudio de los túbulos-T por TEM, se perfundieron retrógradamente los corazones completos de los ratones PC1 KO y PC1<sup>fl/fl</sup> con solución fijadora (PFA al 2% y glutaraldehído al 2,5% en buffer de cacodilato de sodio 0,1 M y CaCl<sub>2</sub> 50 mM, pH 7,4) a 3 mL por minuto a temperatura ambiente durante 15 min antes de ser almacenado a 4 °C en la solución fijadora (24). Las imágenes se adquirieron con un aumento de 26.500 X utilizando un microscopio electrónico de transmisión Philips Tecnai 12 (Biotwin) equipado con el software de captura iTEM Olympus Soft Imaging solutions (Windows NT 6.1) (Unidad de microscopía avanzada, Pontificia Universidad Católica de Chile). Se midió un promedio de 32 a 78 túbulos-T por condición y se calculó el área, la electrondensidad del lumen del túbulo T y el número de túbulos T por área de sección de tejido ventricular (um<sup>2</sup>) por medio del software ImageJ 2.0.0-rc-43/1.50e.

### **5.12 Análisis estadístico**

Para la comparación de las medias de dos grupos experimentales se utilizó un t-Test no pareado, en tanto que, para la comparación de las medias de más de dos grupos experimentales, fue utilizado un ANOVA de una vía, seguido de un post test de Tukey. Para comprobar si los datos se comportaban de manera paramétrica o no, se realizaron las pruebas de normalidad (Shapiro Wilk para n menores de 30 y Kolmogorov-Smirnov para n mayores de 30). Las diferencias entre grupos se consideraron significativas a un valor  $p < 0,05$ . Los datos se analizaron y graficaron con el software GraphPad Prism versión 9.2.0. Los histogramas de frecuencias de los túbulos-T, fueron realizados con el software estadístico R (v4.1.2: R Core Team 2021)

**Tabla 1. Anticuerpos y condiciones experimentales utilizadas.**

ANTICUERPO	DILUCIÓN	AGENTE BLOQUEANTE	PROVEEDOR
Anti-BIN1 [EPR13463-25] ab185950	1:1.000	BSA 5%/TBST 0,2%	Abcam
Anti-c-Myc (D84C12)	1:1000	BSA 5%/TBST 0,2%	Cell Signaling
Anti-NCX1 (sc30304-R)	1:1000	BSA 5%/TBST 0,2%	Santa Cruz
Anti-GAPDH (G9545)	1:40.000	BSA 5%/TBST 0,2%	Sigma-Aldrich

**Tabla 2. Partidores utilizados**

Partidores	Secuencia (5' a 3')	
BIN1 Total	<i>Forward:</i> AGTGC GTCCAGAATTTCAAT <i>Reverse:</i> GCTTCGTGCATGGCTTTAAC	Rata
BIN1 Total	<i>Forward:</i> CGAGCAGTTTGAGCAGTGTG <i>Reverse:</i> AGCTTCTTGAGGCTTCGTG	Ratón
BIN1+12+13	<i>Forward:</i> CCATCTCAGCTCCGGAAGG <i>Reverse:</i> CCATCTCAGCTCCGGAAGG	Rata/Ratón
BIN1+17+18	<i>Forward:</i> GGAGACAGCAGCCAGTGAAG <i>Reverse:</i> GGAGACAGCAGCCAGTGAAG <i>Reverse:</i> CCCATTACAGTTGCGGA (Rata)	Rata/Ratón
BIN1+12+18	<i>Forward:</i> GGGCTACCAT CCCAAGTCC <i>Reverse:</i> CCCATTACAGTTGCGGAG <i>Reverse:</i> RCCCCATTACAGTTGCGGAG (Rata)	Rata/Ratón
BIN1+12+17	<i>Forward:</i> AAAGGGAACAAGAGCCCGTC <i>Forward:</i> AAAGGGAACAAGAGCCCGTC (Rata) <i>Reverse:</i> AAAGGGAACAAGAGCCCGTC	Rata/Ratón
c-Myc	<i>Forward:</i> AGCCCCTAGTGCTGCATGA <i>Reverse:</i> TCCACAGACACCACATCAATTC	Rata/Ratón
18S ARNr	<i>Forward:</i> AACGGCTACCACATCCAAG <i>Reverse:</i> CCTCCAATGGATCCTCGTTA	Rata
18S ARNr	<i>Forward:</i> CGGACAGGATTGACAGATTG <i>Reverse:</i> CAAATCGCTCCACCAACTAA	Ratón

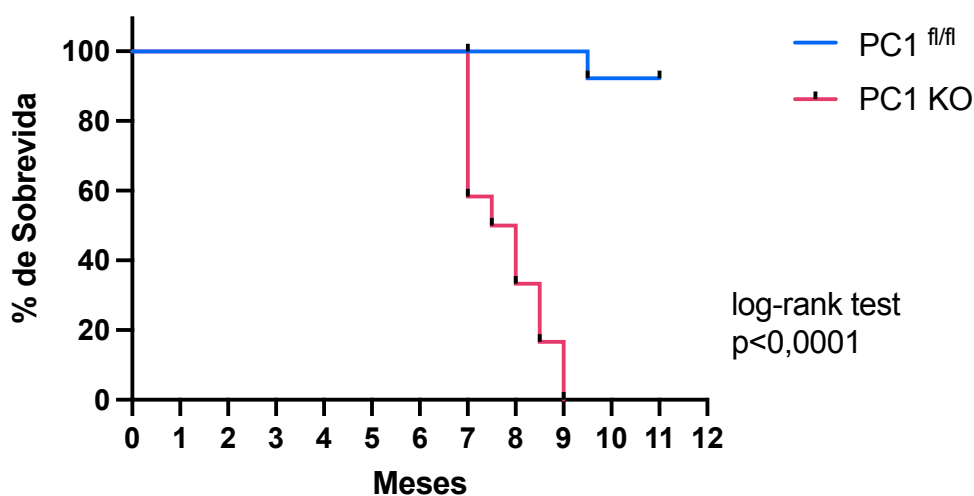
## 6. Resultados

**Objetivo específico 1. Evaluar la función cardíaca en los ratones PC1 KO a diferentes edades.**

### 1.1 El silenciamiento selectivo para Pkd1 en los cardiomiocitos (PC1 KO) induce el desarrollo de cardiomiopatía dilatada y a una menor sobrevida

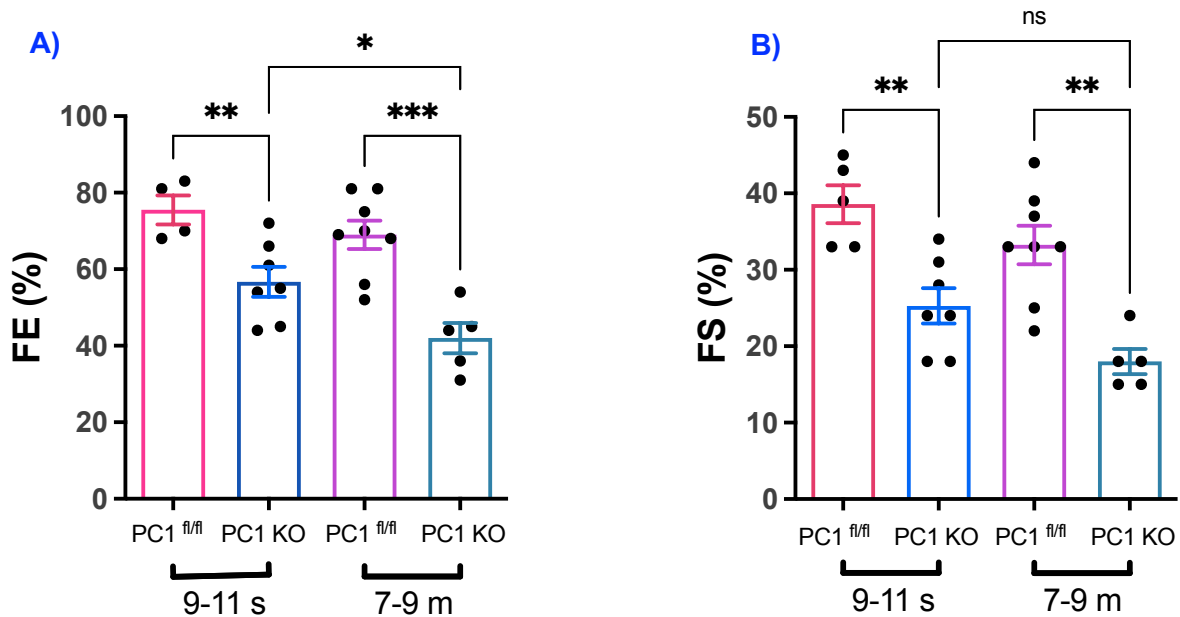
Estudios previos en ratones silenciados para la expresión de PC1 en los cardiomiocitos (PC1-KO), han reportado disfunción cardíaca sin hipertrofia cardíaca a las 8 semanas de vida y sin signos de IC (20, 21). Sin embargo, se desconoce las consecuencias de la disfunción cardíaca de los ratones PC1 KO a lo largo del tiempo. Para estudiar estas consecuencias, se realizó una curva de sobrevida para los ratones C57BL/6 PC1 KO y sus controles, los ratones PC1<sup>fl/fl</sup> y se evaluó por ecocardiografía la función cardíaca de estos ratones .

Nuestros resultados indican que aproximadamente el 41,2% de los ratones PC1 KO murieron repentinamente a los 7 meses de edad y el 100% a los 9 meses. Es importante destacar que los ratones PC1 KO de 7-9 meses de edad presentaron signos de IC como movilidad restringida, respiración superficial y fatiga (**Figura 1A**).



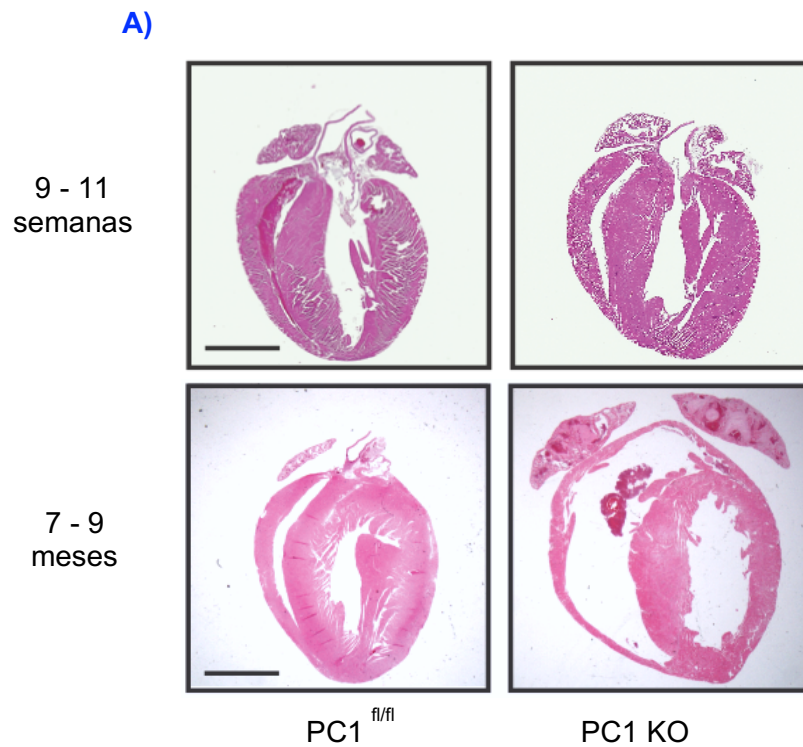
**Figura 1. A)** Curva de sobrevida de Kaplan Meier para ratones PC1<sup>fl/fl</sup> y PC1 KO. (n=12-14). Se usó la prueba *log-rank* para comparar las tasas de sobrevida entre los grupos PC1<sup>fl/fl</sup> y PC1 KO.

De acuerdo a lo observado en la curva de supervivencia, decidimos evaluar la función cardíaca en dos edades diferentes de los ratones PC1 KO: **a las 9-11 semanas de edad y a los 7-9 meses de vida**. En relación a la función cardíaca se encontró una disminución de la fracción de eyección tanto en los ratones PC1 KO de 9-11 semanas de vida (Control FE:  $72,4 \pm 4,3\%$  vs  $56,7 \pm 3,9\%$  para PC1-KO) como en ratones PC1 KO de 7-9 meses (FE:  $69 \pm 3,7\%$  para el control versus  $42 \pm 4,0\%$  para PC1 KO) (**Figura 2A**). Además, se observó una disminución en la fracción de acortamiento en los ratones PC1 KO de 9-11 semanas (FS:  $38,6 \pm 2,5\%$  para control versus  $25,3 \pm 2,3\%$  para PC1 KO) en los ratones PC1 KO de 7-9 meses esta disminución en la fracción de acortamiento fue mayor (FS:  $33,3 \pm 2,5\%$  para el control frente a  $18 \pm 1,6\%$  para PC1 KO) (**Figura 2B**).



**Figura 2.** Función cardíaca medida por ecocardiografía. **A)** Fracción de eyección (FE) en ratones PC1 KO de 9-11 semanas y de 7-9 meses con sus respectivos controles. **B)** Fracción de acortamiento (FS) en ratones PC1 KO de 9-11 semanas y de 7-9 meses con sus respectivos y de 7-9 meses con sus respectivos controles. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía. (n= 4-8). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. \*p <0,05, \*\* p<0,006 y \*\*\*p<0,002.

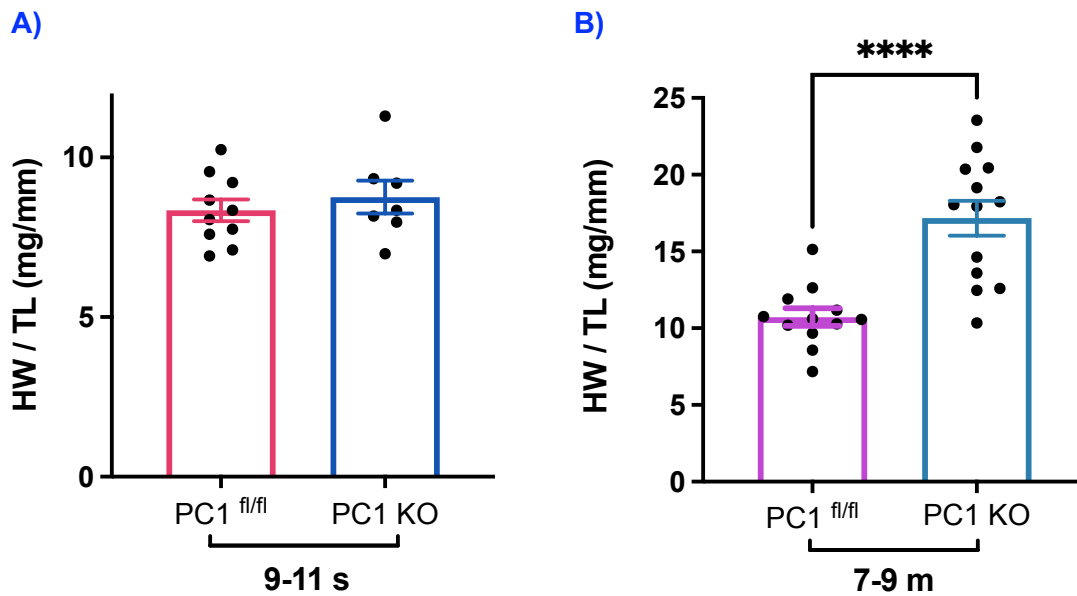
Además, se observó dilatación de las cámaras cardíacas en cortes histológicos de las cuatro cámaras del corazón con tinción de hematoxilina/eosina en ratones PC1 KO de 7 a 9 meses de edad al compararse con sus respectivos controles, pero los ratones PC1 KO de 9 a 11 semanas no presentan estas alteraciones en sus cámaras cardíacas (**Figura 3A**).



**Figura 3.** Fotografías de cortes histológicos representativos del corazón con las cuatro cámaras cardíacas. **A)** En la parte superior las imágenes representativas de los ratones PC1 KO de 9-11 semanas y en la parte inferior las de 7-9 meses con sus respectivos controles.



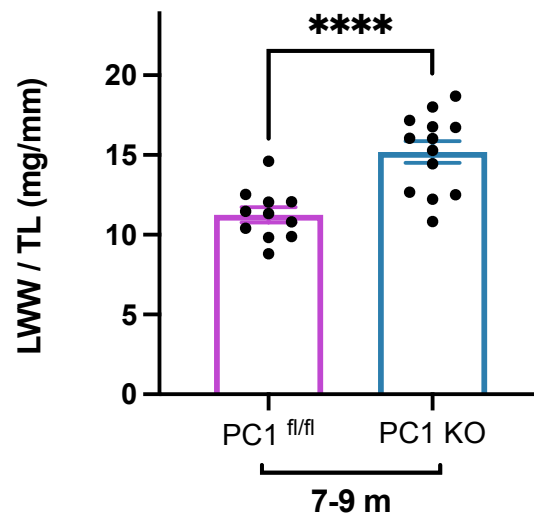
Al evaluar la relación peso del corazón con longitud de la tibia (HW/TL), se encontró que esta relación no presentó cambios en en los ratones PC1 KO de 9-11 semanas de vida (**Figura 4A**). A diferencia de lo que ocurre en los ratones PC1 KO de 7-9 meses, donde esta relación aumentó de  $10,7 \pm 0,6$  a  $17,2 \pm 1,1$  mg/mm (60%), pero no se observaron cambios (**Figura 4B**).



**Figura 4.** Relación peso del corazón respecto a la longitud de la tibia (HW/TL). **A)** En los ratones PC1 KO vs. controles (PC1<sup>fl/fl</sup>) de 9-11 semanas de vida (n=7-10) y, **B)** En los ratones PC1 KO vs. controles (PC1<sup>fl/fl</sup>) de 7-9 meses de edad (n=12-13). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. \*p<0,05 vs. PC1<sup>fl/fl</sup>.

Finalmente, se evaluó la relación peso húmedo del pulmón con la longitud de la tibia (LWW/TL) en los ratones PC1 KO de 7-9 meses y se encontró un aumento en esta relación de  $11,3 \pm 0,5$  a  $15,2 \pm 0,7$  mg/mm (35) en los ratones PC1 KO (Figura 5A). En conjunto, estos hallazgos corroboran que los ratones PC1 KO de 9 a 11 semanas de vida presentan disfunción cardíaca, lo cual empeora en aquellos de 7 a 9 meses de vida, acompañado por signos de IC que conllevan a un aumento de la mortalidad, posiblemente porque desarrollan una cardiomiopatía dilatada.

A)

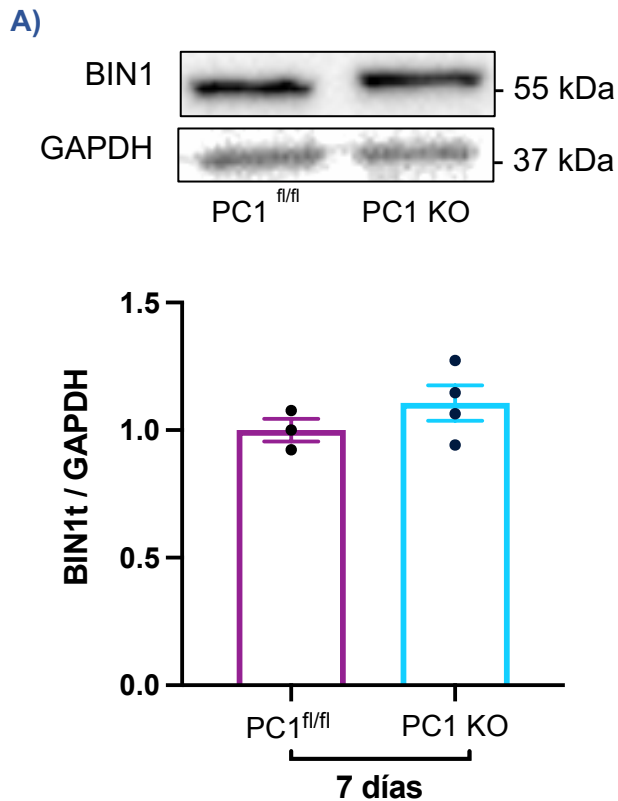


**Figura 5. A)** Relación peso del pulmón húmedo respecto a la longitud de la tibia (LWW/TL) de los ratones PC1 KO vs. controles (PC1<sup>fl/fl</sup>), a los 7-9 meses de edad (n=12-13). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. \*\*\*\*p<0,0001 vs. PC1<sup>fl/fl</sup>.

**Objetivo específico 2.** Estudiar el papel de la PC1 en la expresión de las isoformas cardíacas de BIN1, tanto en tejido de corazones de ratones PC1 KO a diferentes edades de vida, como en cultivo de miocitos ventriculares de rata neonata.

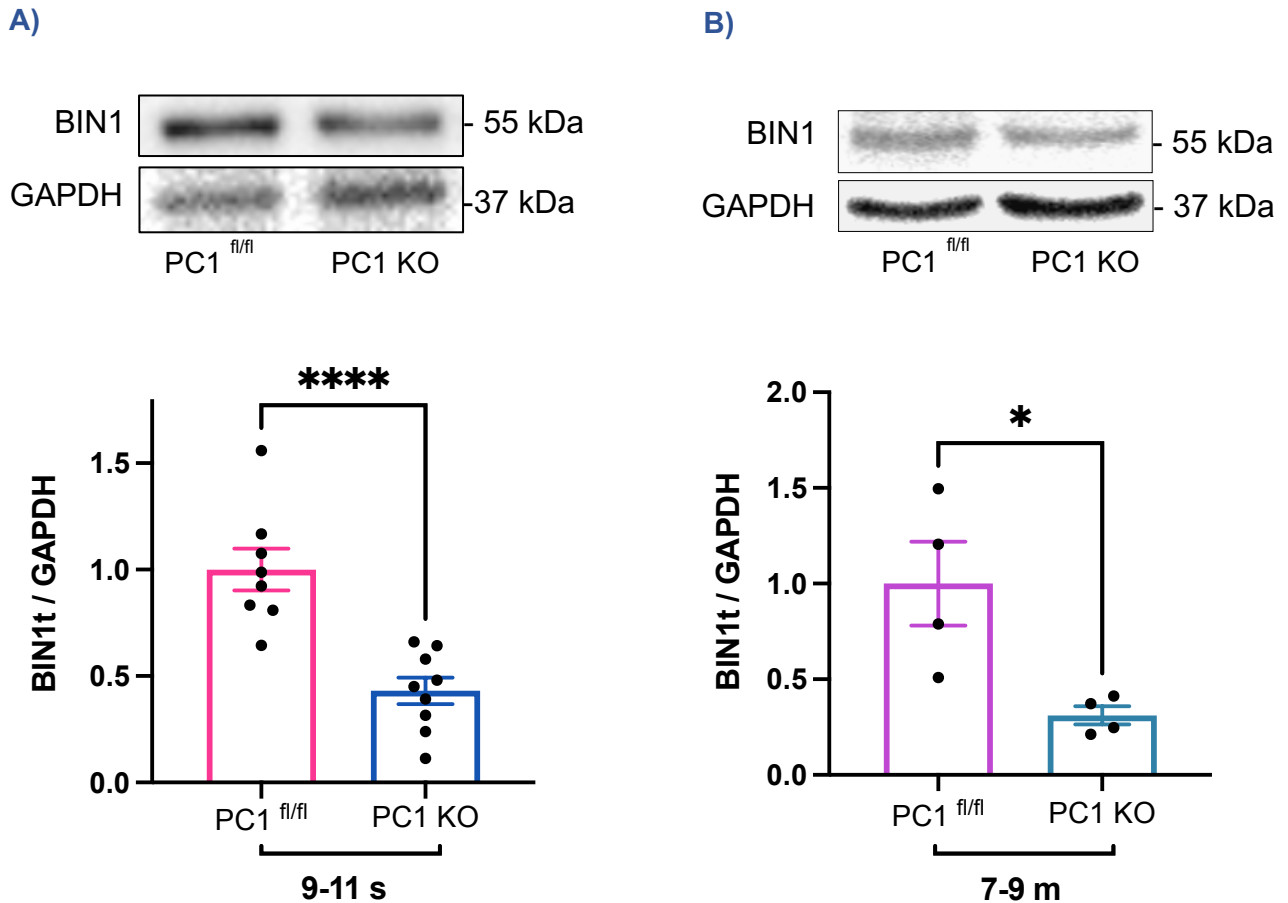
### 2.1 El contenido proteico total de BIN1 disminuye en el tejido cardíaco de ratones adultos PC1 KO a las 9-11 semanas de edad y en los de 7-9 meses de vida

Para determinar la relación entre la PC1 y el contenido proteico de BIN1 en el tejido cardíaco, se analizaron muestras provenientes de ratones PC1 KO y controles de 7 días de nacidos, 9-11 semanas de vida y en los mayores de 7 meses de edad (con signos de IC). Se evaluó el contenido proteico de BIN1, por medio de la técnica de western blot. Los resultados obtenidos no muestran diferencias en los niveles proteicos de BIN1 a los 7 días de nacidos de los ratones PC1 KO comparados con sus respectivos controles (**Figura 6A**).



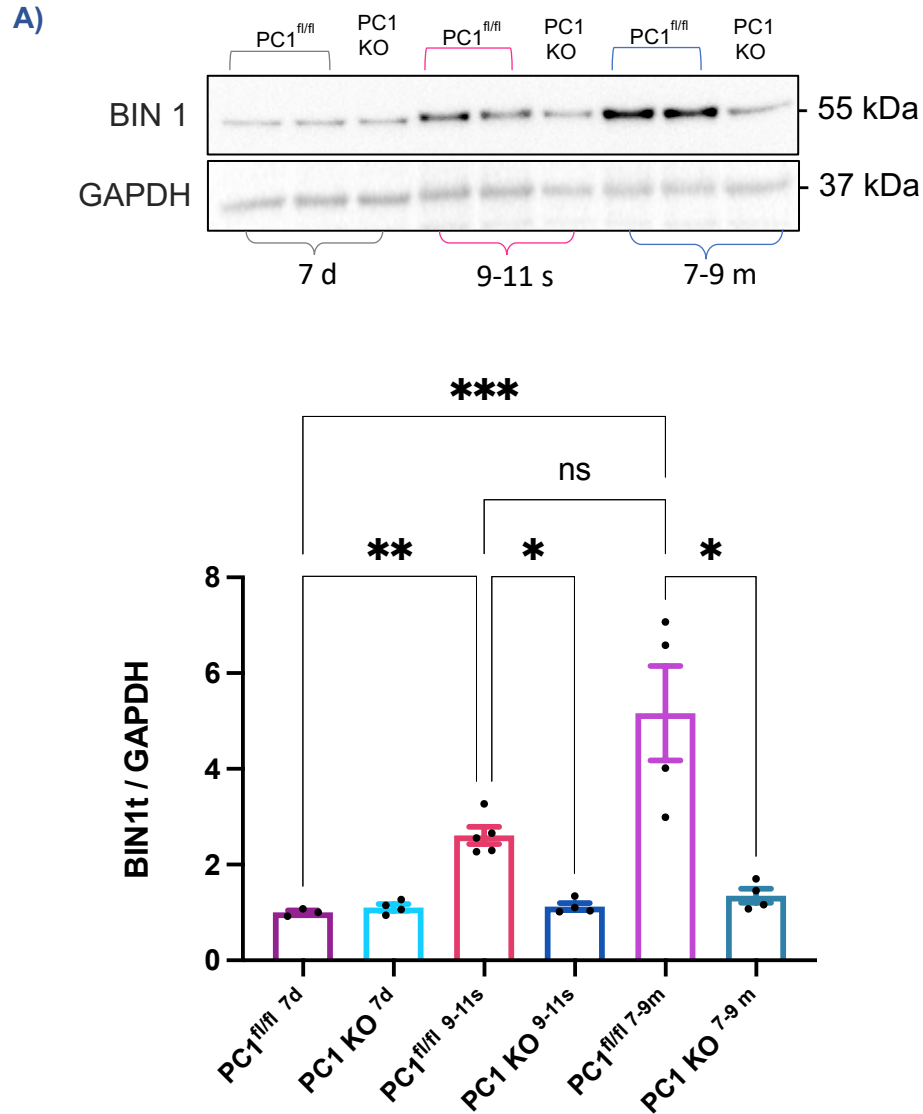
**Figura 6. A)** Niveles proteicos de BIN1 en el tejido ventricular de los ratones PC1 KO vs. ratones controles (PC1<sup>fl/fl</sup>) a los 7 días de nacidos (n= 3-4). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.

Al evaluar el contenido de BIN1 en el tejido cardíaco de los ratones PC1 KO a las 9-11 semanas de vida (**Figura 7A**) y a los 7-9 meses de edad (**Figura 7**), se encontró una disminución significativa de BIN1 total al ser comparados con sus controles ( $p=0,0001$  y  $p=0,01$  respectivamente).



**Figura 7.** Niveles proteicos de BIN1total en tejido ventricular (en la parte superior de cada cuantificación se muestran los westerns blot representativos). **A)** Contenido proteico de BIN1t en los ratones PC1 KO vs. controles (PC1<sup>fl/fl</sup>), a las 9-11 semanas de vida (n= 8-9), \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. PC1<sup>fl/fl</sup> y, **B)** Contenido proteico de BIN1t en los ratones PC1 KO vs. controles (PC1<sup>fl/fl</sup>) a los 7-9 meses de edad (n=4), \*  $p < 0,01$  vs. PC1<sup>fl/fl</sup>. Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.

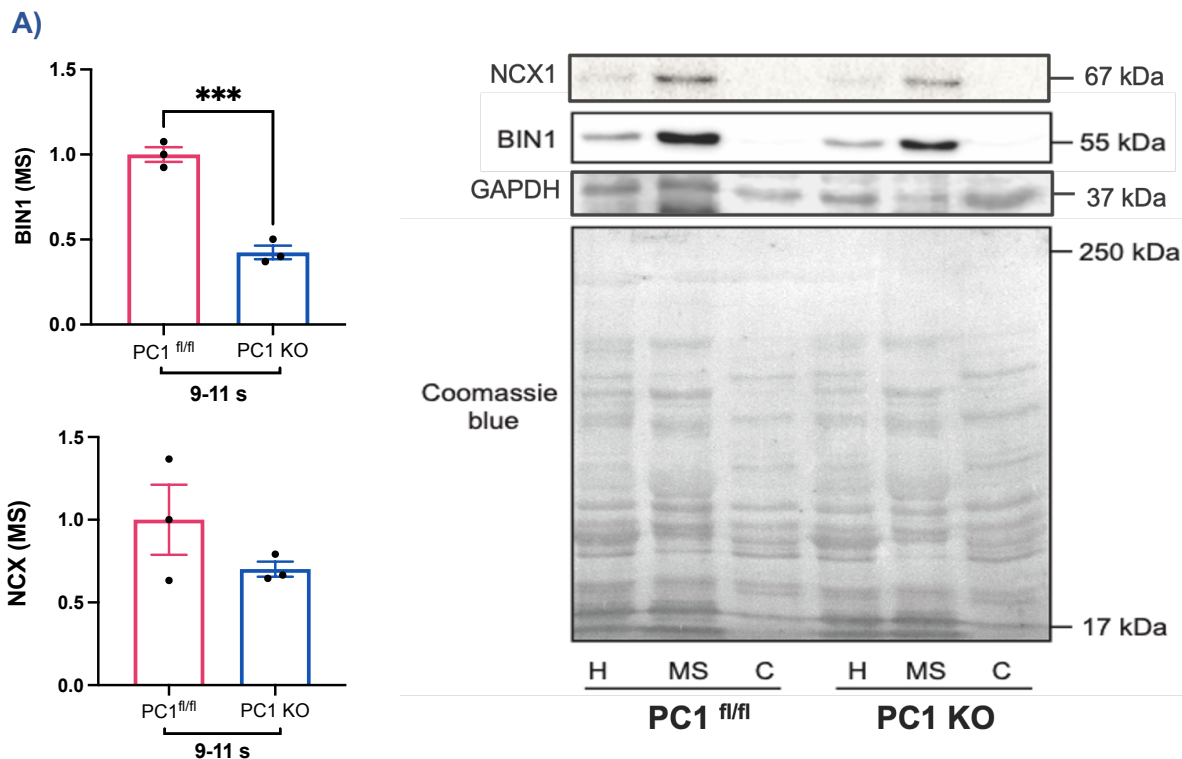
Por otro lado, al evaluar el contenido proteico de BIN1t a las diferentes edades en un mismo blot (7 días, 9-11 semanas y 7-9 meses de vida), se observó un aumento significativo de los niveles de BIN1 en los ratones controles (PC1<sup>fl/fl</sup>) desde los 7 días de vida hasta las 9 a 11 semanas y aunque a los 7 a 9 meses de edad se observa que continúa aumentando los niveles de BIN1 total, ya no es significativo. En cambio, en los ratones PC1 KO no se observa este aumento de BIN1 total en la medida que se hacen adultos (Figura 8A).



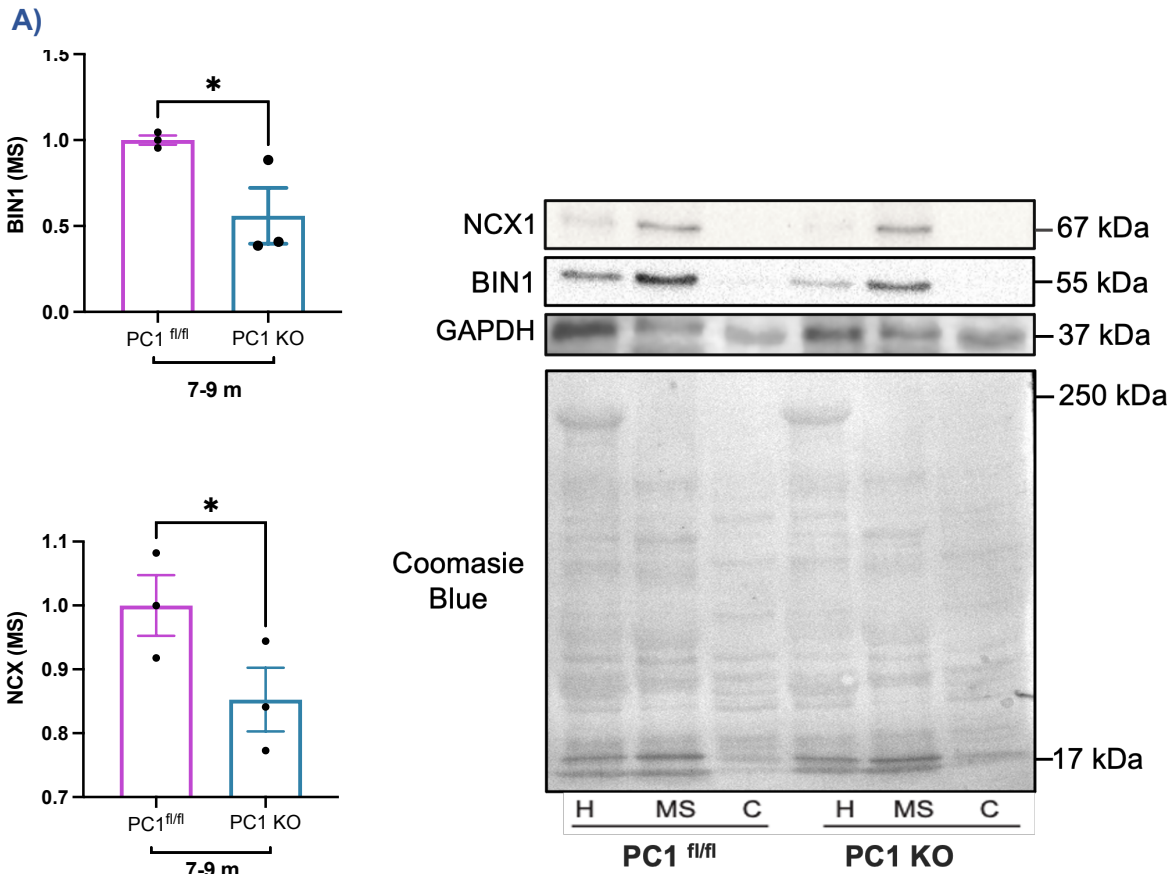
**Figura 8. A)** Niveles proteicos de BIN1 en tejido ventricular de los ratones PC1 KO vs. controles (PC1<sup>fl/fl</sup>) a diferentes edades (n=3-5). Para el análisis estadístico se utilizó una ANOVA de una vía. Los resultados se expresan como promedio ± SEM. \* p<0,02; \*\*p<0,006 y \*\*\* p<0,0007 vs. PC1<sup>fl/fl</sup>.

## 2.2 El contenido proteico de BIN1 disminuye en la fracción enriquecida de membrana de túbulos-T del tejido cardíaco de los ratones PC1 KO

Para estudiar si la disminución del contenido proteico de BIN1 observado en el tejido cardíaco de los ratones PC1 KO se reflejaba en su localización en la membrana celular, se obtuvieron fracciones enriquecidas en membrana de túbulos-T. Se utilizaron 3 fracciones obtenidas por centrifugación diferencial en gradiente; un homogenizado (H), un sobrenadante (C, que corresponde a la fracción citosólica) y una fracción enriquecida de membrana (microsomas/MS). Para corroborar la pureza de las fracciones, se evaluó el contenido del intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX) y GAPDH. A través de western blot se determinó una disminución del nivel proteico de BIN1 en las muestras provenientes de los microsomas de ratones PC1 KO tanto de 9-11 semanas de vida, ( $p=0,0003$ ), (Figura 9A), como en los de 7-9 meses de edad, ( $p=0,02$ ), (Figura 10A). Estos datos en su conjunto corroboran la disminución de los niveles proteicos de BIN1 en el tejido cardíaco de los ratones PC1 KO y sugieren que esto se refleja en su localización en los túbulos-T.



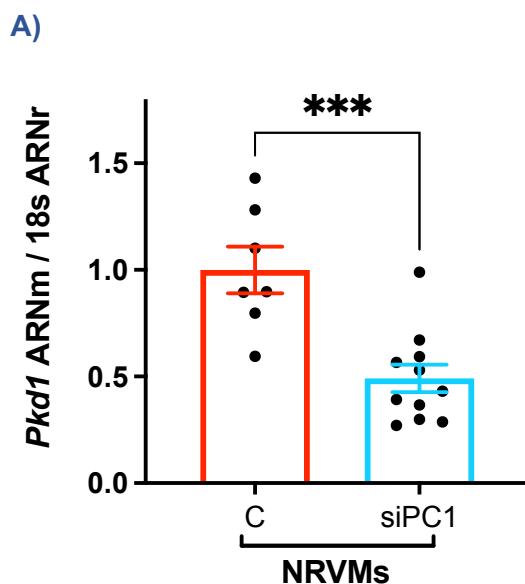
**Figura 9. A)** Niveles proteicos de BIN1 en la fracción enriquecida de membranas (MS) de tejido ventricular de los ratones PC1 KO vs. controles (PC1<sup>fl/fl</sup>) a las 9-11 semanas de vida. En la parte izquierda del panel se muestran las cuantificaciones de BIN1 y NCX (intercambiador sodio/calcio), ( $n=3$ ), \*\*\*  $p < 0,0003$  vs. PC1<sup>fl/fl</sup>. En la parte derecha se muestran los blot representativos de NCX, BIN1, GAPDH y la tinción de la membrana con azul de coomasie. Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.



**Figura 10. A)** Niveles proteicos de BIN1 en la fracción enriquecida de membranas (MS) de tejido ventricular de los ratones PC1 KO vs. controles (PC1<sup>fl/fl</sup>) a los 7-9 meses de edad. En la parte izquierda del panel se muestran las cuantificaciones de BIN1 y NCX (intercambiador sodio/calcio), (n=3), \*\*\* p<0,0003 vs. PC1<sup>fl/fl</sup> y \* p<0,049 vs. PC1<sup>fl/fl</sup> respectivamente. En la parte derecha se muestran los blot representativos de NCX, BIN1, GAPDH y la tinción de la membrana con azul de coomasie. Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio ± SEM.

### 2.3 El silenciamiento de la PC1 en los cardiomiocitos de ratas neonatas (NRVMs) no modifica los niveles proteicos de BIN1

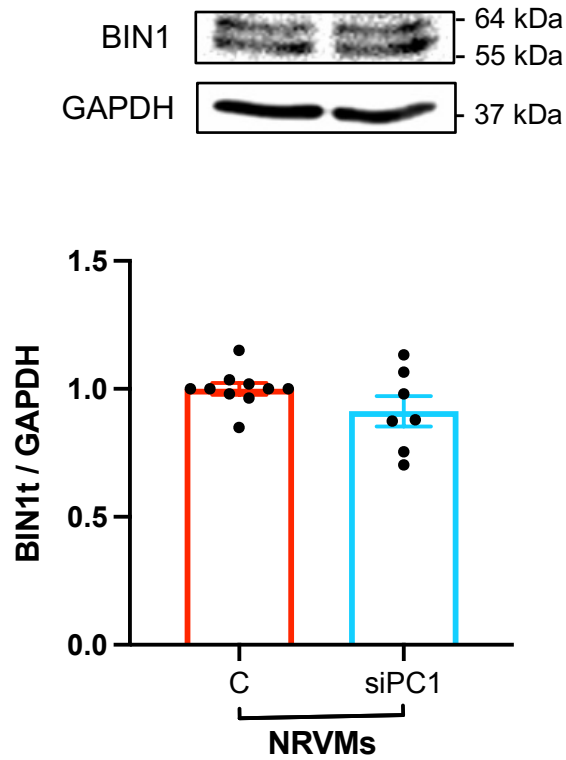
Los NRVMs fueron aislados y cultivados de acuerdo con lo descrito previamente (20) y disminución de la expresión de PC1 se logró a través de la transfección con un siRNA específico (siPC1). Los NRVMs knockdown para la PC1 (siPC1), muestran un 50% de disminución en los niveles de ARNm del gen *Pkd1* (Figura 11A). Por otra parte, los datos obtenidos no muestran diferencias significativas entre el contenido de BIN1 en los NRVMs siPC1 comparado con los controles, 48 h post-transfección (Figura 12A). No se evaluaron los niveles de BIN1 posterior a estos tiempos.



**Figura 11. A)** Niveles del ARNm para el gen de la PC1 (*Pkd1*) en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transfectados con un siRNA (siPC1) durante 48 h (n= 7-11). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0,0003$  vs. Control (C).



A)

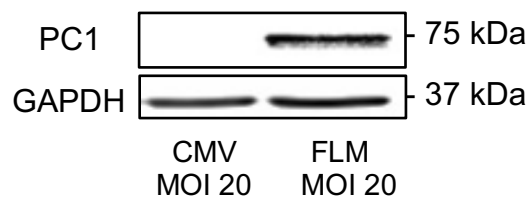


**Figura 12. A)** Niveles proteicos de BIN1 total en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transfectados con un siRNA específico para PC1 (siPC1) durante 48 h (n= 7-10), (en la parte superior de la cuantificación se muestra un western blot representativo). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. Se cuantificaron las dos bandas que aparecen en el blot para el BIN1 total.

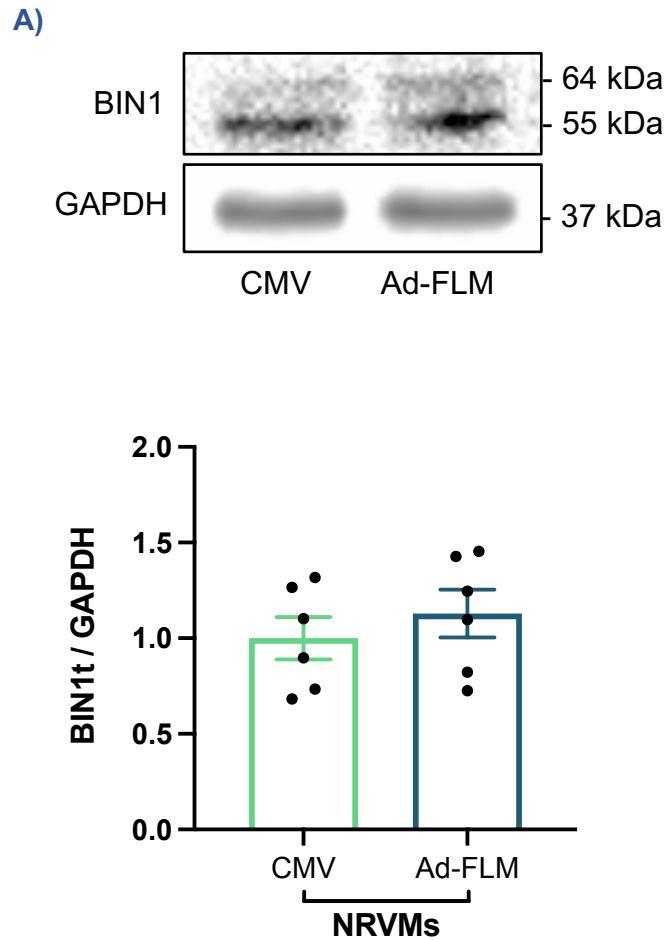
## 2.4 La sobre expresión del C-terminal completo de la PC1 (FLM) en los cardiomiocitos de ratas neonatas (NRVMs) no modifica los niveles proteicos de BIN1

Para continuar estudiando la relación entre la PC1 y la expresión de BIN1 se realizaron experimentos sobre-expresando el C-terminal completo de la PC1 humana con un sitio de anclaje a membrana. Para ello se utilizó un vector adenoviral Ad-FLM a un MOI de 20, durante 24 h (**Figura 13A**) y posteriormente, se evaluó el contenido proteico de BIN1 total, mediante western blot en los NRVMs transducidos con un MOI de 20. No se encontró diferencias significativas entre los NRVMs transducidos con el FLM comparado con sus controles (**Figura 14A**).

A)



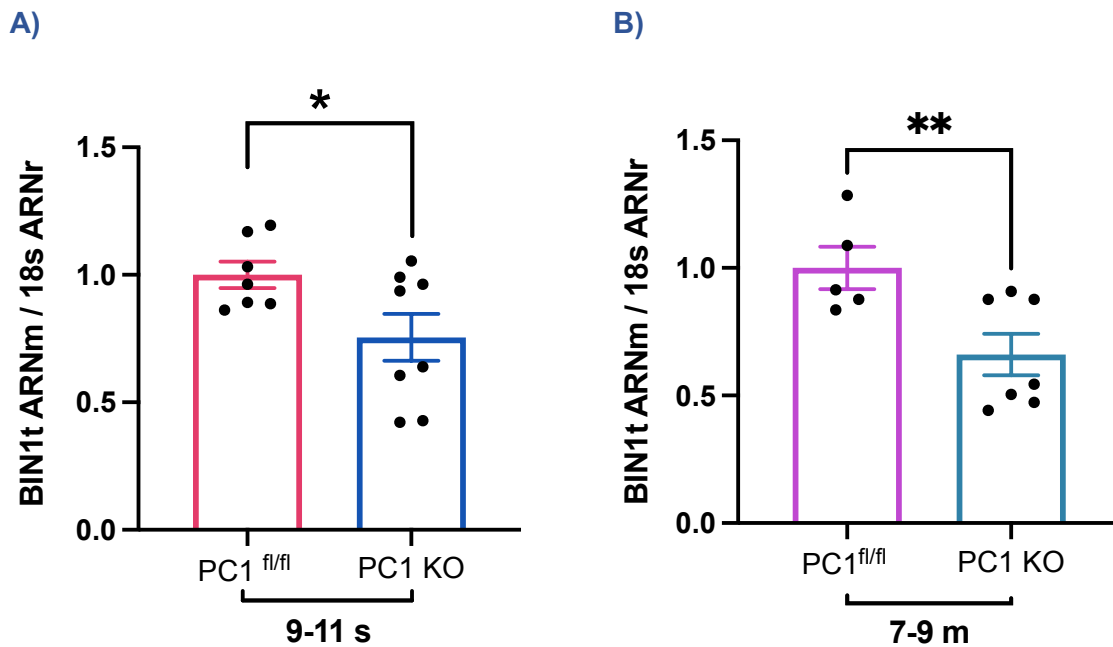
**Figura 13. A)** Sobreexpresión en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata de la cola C-terminal de la PC1 (Ad-FLM) a un MOI=20. Se utilizó un adenovirus vacío (CMV) como control de la transducción. Niveles de GAPDH como control de carga.



**Figura 14. A)** Niveles proteicos de BIN1 en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transducidos con Adenovirus para el C-terminal completo de la PC1 humana anclada a la membrana (Ad-FLM) con un MOI=20 y como control de la transducción el adenovirus vacío citomegalovirus (CMV) durante 24 h (n= 6), (en la parte superior de la cuantificación se muestra un western blot representativo). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. Se cuantificaron las dos bandas que aparecen en el blot para el BIN1 total.

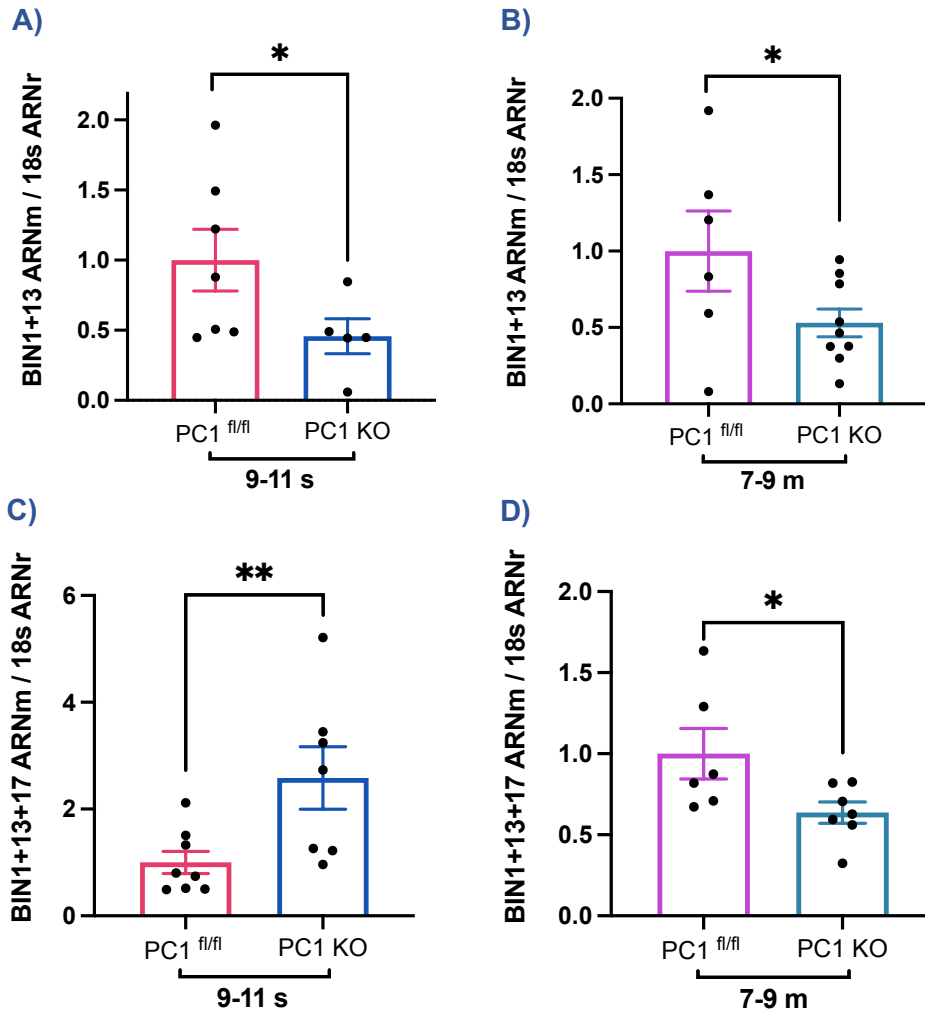
## 2.5 La PC1 regula expresión de las isoformas cardíacas de BIN1

En el tejido cardíaco se expresan cuatro isoformas diferentes de BIN1: BIN1+12 y BIN1+17 que son ubicuas y dos variantes de *splicing* alternativo cardíacas (cardio específicas): BIN1+13 y BIN1+13+17. Para determinar los cambios en la expresión de BIN1 total y sus isoformas cardíacas (BIN1+13 y BIN1+13+17), se evaluaron los niveles de ARNm mediante qRT-PCR. En el tejido ventricular de ratones PC1 KO tanto a las 9-11 semanas de vida (**Figura 15A**) como a los 7-9 meses, se observa una disminución en el ARNm de BIN1 total ( $p=0,02$ ), (**Figura 15B**).



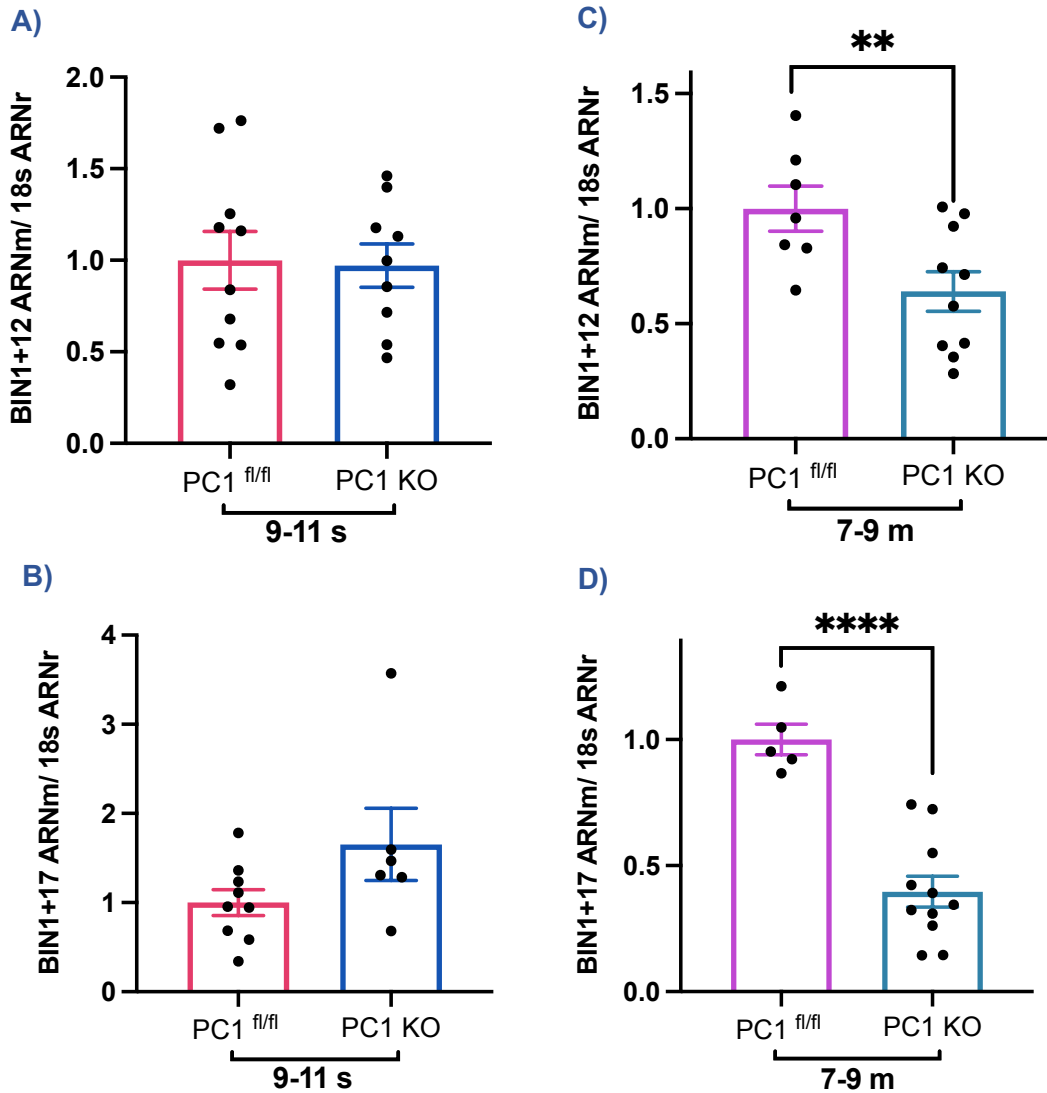
**Figura 15.** Niveles de ARNm de BIN1 total en el tejido cardíaco ventricular de ratones. **A)** En ratones PC1 KO de 9-11 (n=7-8), \* $p<0,02$  vs. PC1<sup>fl/fl</sup> y, **B)** En los ratones PC1 KO de 7-9 meses (n=5-7), \*\* $p<0,008$  vs. PC1<sup>fl/fl</sup>. Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM

Con respecto a las isoformas, mientras los niveles de BIN1+13 disminuyen de manera significativa tanto en los ratones PC1 KO a las 9-11 semanas de vida como en aquellos de 7-9 meses de edad ( $p=0,04$  y  $p=0,03$  respectivamente), (**Figura 16A y 16B**), los niveles de BIN1+13+17 presentan un aumento a las 9-11 semanas de vida ( $p=0,009$ ). Este aumento sin embargo, ya no es observado a los 7-9 meses de edad, cuando los animales presentan signos de IC ( $p=0,02$ ), (**Figura 16B y 16C**).



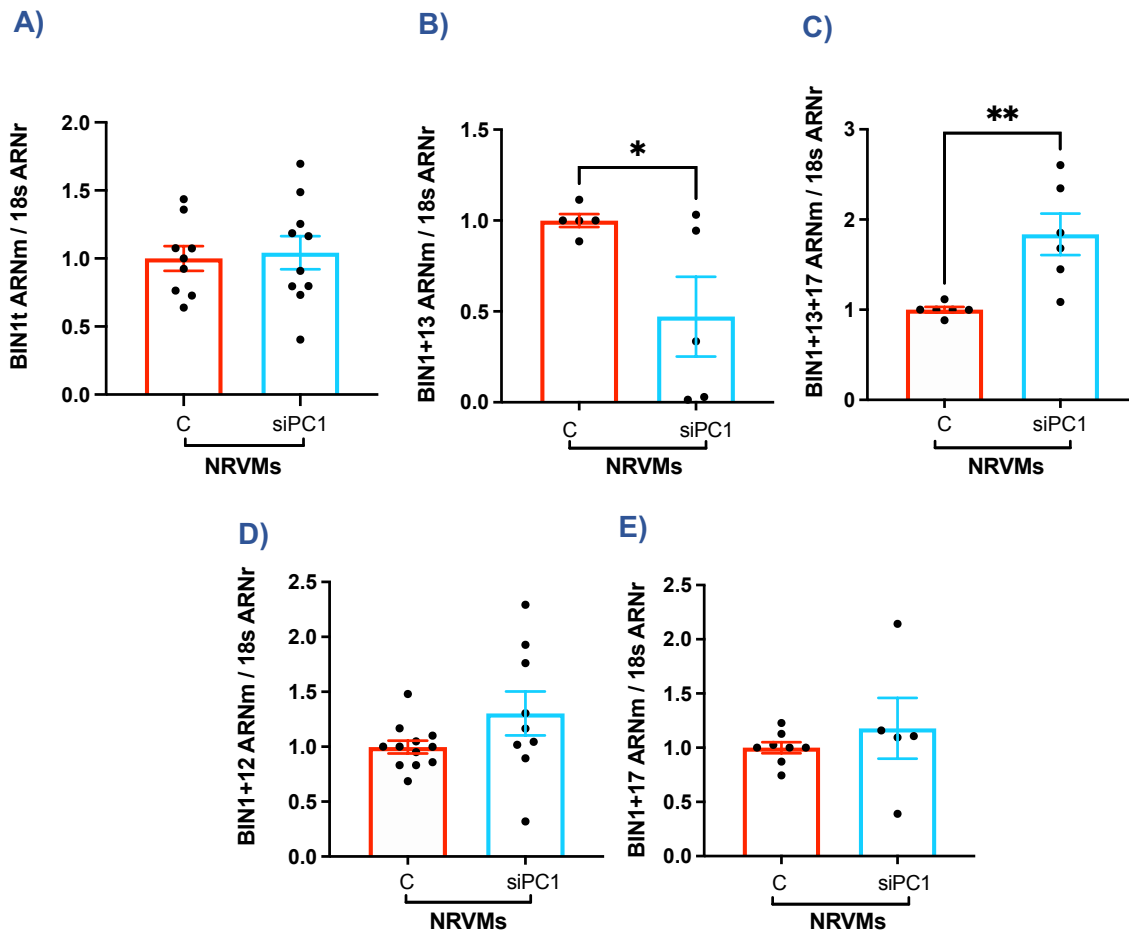
**Figura 16.** Niveles de ARNm de las isoformas cardio específicas en el tejido cardíaco ventricular. **A)** En la parte superior del panel se muestra los niveles del ARNm de BIN1+13 en ratones PC1 KO de 9-11 semanas ( $n= 5-7$ ),  $*p<0,04$  vs. PC1<sup>fl/fl</sup> y **B)** en ratones PC1 KO de 7-9 meses de vida ( $n=6-9$ ),  $*p<0,03$  vs. PC1<sup>fl/fl</sup>. **C)** En la parte inferior se muestra los niveles de ARNm de BIN1+13+17 en ratones PC1 KO de 9-11 semanas ( $n= 7-8$ ),  $**p<0,009$  vs. PC1<sup>fl/fl</sup> y **D)** en ratones PC1 KO de 7-9 meses de vida ( $n= 6-7$ ),  $*p<0,02$  vs. PC1<sup>fl/fl</sup>. Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas para las isoformas ubicuas entre las muestras de los ratones PC1 KO y los controles a las 9-11 semanas de edad (**Figura 17A y 17B**), sin embargo, los niveles de ARNm de las mismas se ven disminuidas con respecto a sus controles en las muestras de los ratones PC1 KO cuando los signos de IC son claros (7-9 meses de edad), ( $p=0,007$  para BIN1+12 y  $p=0,001$  para BIN1+17, respectivamente), (**Figura 17C y 17D**).



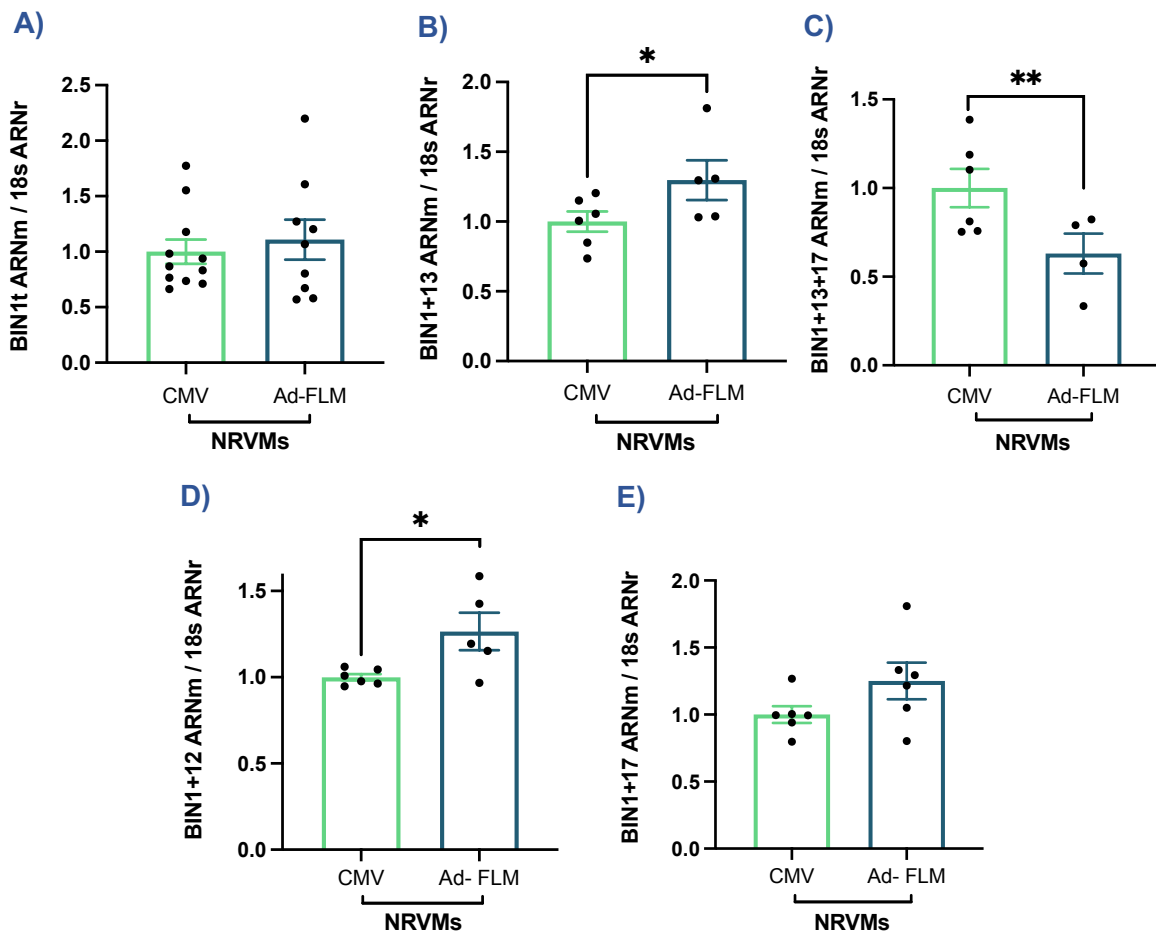
**Figura 17.** Niveles de ARNm de las isoformas ubicuas en el tejido cardíaco ventricular. En el lado izquierdo del panel se muestran los niveles en los ratones PC1 KO de 9-11 semanas: **A)** el ARNm de BIN1+12 ( $n= 9-10$ ) y **B)** el ARNm de BIN1+17 ( $n= 6-9$ ). En el lado derecho del panel se muestran los niveles en los ratones PC1 KO de 7-9 meses de edad: **C)** el ARNm de BIN1+12 ( $n= 7-10$ ),  $**p<0,007$  vs. PC1<sup>fl/fl</sup> y **D)** el ARNm de BIN1+17 ( $n= 5-11$ ),  $**** p<0,0001$  vs. PC1<sup>fl/fl</sup>. Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.

Para corroborar estos resultados se realizaron experimentos en NRVMs. Si bien y de acuerdo con lo observado en los niveles proteicos de BIN1, los NRVMs siPC1 no muestran diferencias significativas en el ARNm de BIN1 total comparado con sus controles 48 h post-transfección (**Figura 18A**), los niveles de ARNm de la isoforma BIN1+13 disminuyen de manera significativa ( $p=0,02$ ) (**Figura 18B**), y el contenido de ARNm de la isoforma BIN1+13+17 aumenta significativamente en los NRVMs siPC1, comparados con sus controles ( $p= 0,002$ ) (**Figura 18C**). Por otro lado, el ARNm de las isoformas ubicuas: BIN1+12 y BIN1+17 no muestran diferencias significativas (**Figura 18D y 18E**).



**Figura 18.** Niveles de ARNm de BIN1 total, de las isoformas cardio específicas y las ubicuas en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transfectados con siRNA (siPC1) durante 48 h. En la parte superior del panel se muestran: **A)** los niveles de ARNm de BIN1t ( $n= 9-10$ ); **B)** los de ARNm de la isoforma cardio específica BIN1+13 ( $n=5$ ),  $*p<0,02$  vs. Control (C); y **C)** de la isoforma cardio específica BIN+13+17 ( $n= 6$ ),  $** p<0,002$  vs. Control (C). En la parte inferior se muestran los niveles de ARNm de las isoformas ubicuas: **D)** BIN+12 ( $n=9-12$ ) y **E)** BIN1+17 ( $n= 5-8$ ). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.

Finalmente, y a pesar de que el contenido del ARNm del BIN1 total en los NRVMs con Ad-FLM (sobre expresión del C-terminal completo de la PC1 humana anclada a la membrana) con un MOI=20 no muestra diferencias significativas del BIN1 total con respecto a sus controles (**Figura 19A**), el ARNm de la isoforma BIN1+13 aumenta significativamente ( $p=0,04$ ), (**Figura 19B**), mientras el de la isoforma BIN1+13+17 disminuye ( $p= 0,04$ ), (**Figura 19C**). En relación con la isoforma ubicua BIN1+12, se observó un aumento significativo de su ARNm en los NRVMs Ad-FLM comparado con los controles ( $p= 0,02$ ) (**Figura 19D**), mientras que el BIN 1+17 no presentó diferencias significativas (**Figura 19E**).



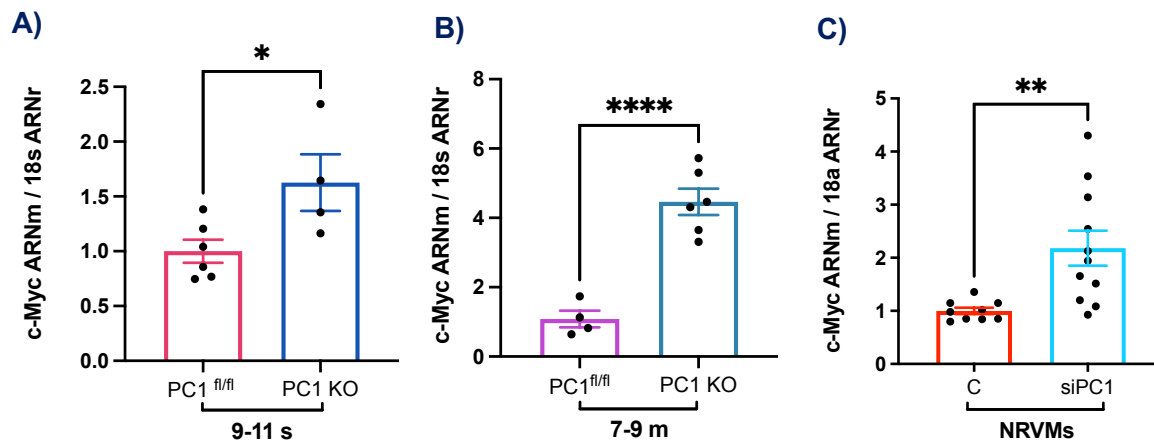
**Figura 19.** Niveles de ARNm de BIN1 total, de las isoformas cardio específicas y las ubicuas en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transducidos con el C-terminal de la PC1 (Ad-FLM) con un MOI=20 durante 24 h. En la parte superior del panel se muestran: **A)** los niveles de ARNm de BIN1t (n= 9-11); **B)** los de ARNm de la isoforma cardio específica BIN+13 (n= 5-6), \*  $p<0,04$  vs. CMV y **C)** el de ARNm de la isoforma cardio específica BIN+13+17 (n= 4-6), \*\* $p<0,02$  vs. CMV. En la parte inferior se muestran los niveles de: **D)** el ARNm de las isoformas ubicuas BIN+12 (n=5-6), \*  $p<0,02$  vs. CMV y **E)** de BIN1+17 (n=6). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.



**Objetivo específico 3. Evaluar el efecto de la PC1 en la expresión de c-Myc y su relación con la expresión de BIN1 en cardiomiocitos.**

### **3.1 La expresión deficiente de la PC1 en los cardiomiocitos del tejido cardíaco en ratones y en NRVMs aumenta los niveles del factor transcripcional c-Myc**

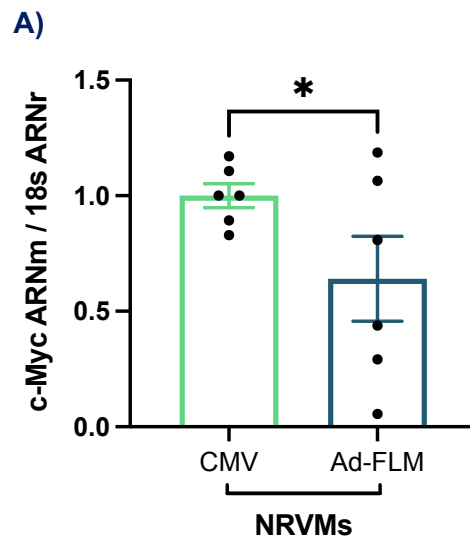
Para evaluar la relación entre la expresión del factor transcripcional c-Myc y la PC1, medimos los niveles del ARNm de c-Myc en el tejido cardíaco ventricular de los ratones PC1 KO de 9-11 semanas de vida y 7-9 meses de edad y en los NRVMs siPC1. Nuestros resultados indican un aumento significativo del contenido de ARNm de c-Myc en el tejido ventricular de los ratones PC1 KO, tanto a las 9-11 semanas (**Figura 20A**), como a los 7-9 meses de vida (**Figura 20B**), ( $p=0,01$  y  $p=0,0001$  respectivamente). Corroborando estos datos, en los NRVMs siPC1 también se observa un aumento significativo del ARNm de c-Myc cuando son comparados con sus controles ( $p= 0,002$ ), (**Figura 20C**).



**Figura 20.** Niveles de ARNm de c-Myc en: **A)** tejido cardíaco ventricular de ratones PC1 KO de 9 a 11 semanas (n=4-6), \* $p<0,01$  vs. PC1<sup>fl/fl</sup> y **B)** a los 7 a 9 meses de vida (n=4-6), \*\*\*\* $p<0,0001$  vs. PC1<sup>fl/fl</sup>. **C)** Niveles de ARNm de c-Myc en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transfectados con siRNA (siPC1) durante 48 h (n= 9-11) \*\*  $p<0,002$  vs. Control (C). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.

### 3.2 La sobre-expresión de la PC1 (Ad-FLM) en los cardiomiocitos ventriculares de rata neonata modifica los niveles del factor transcripcional c-Myc

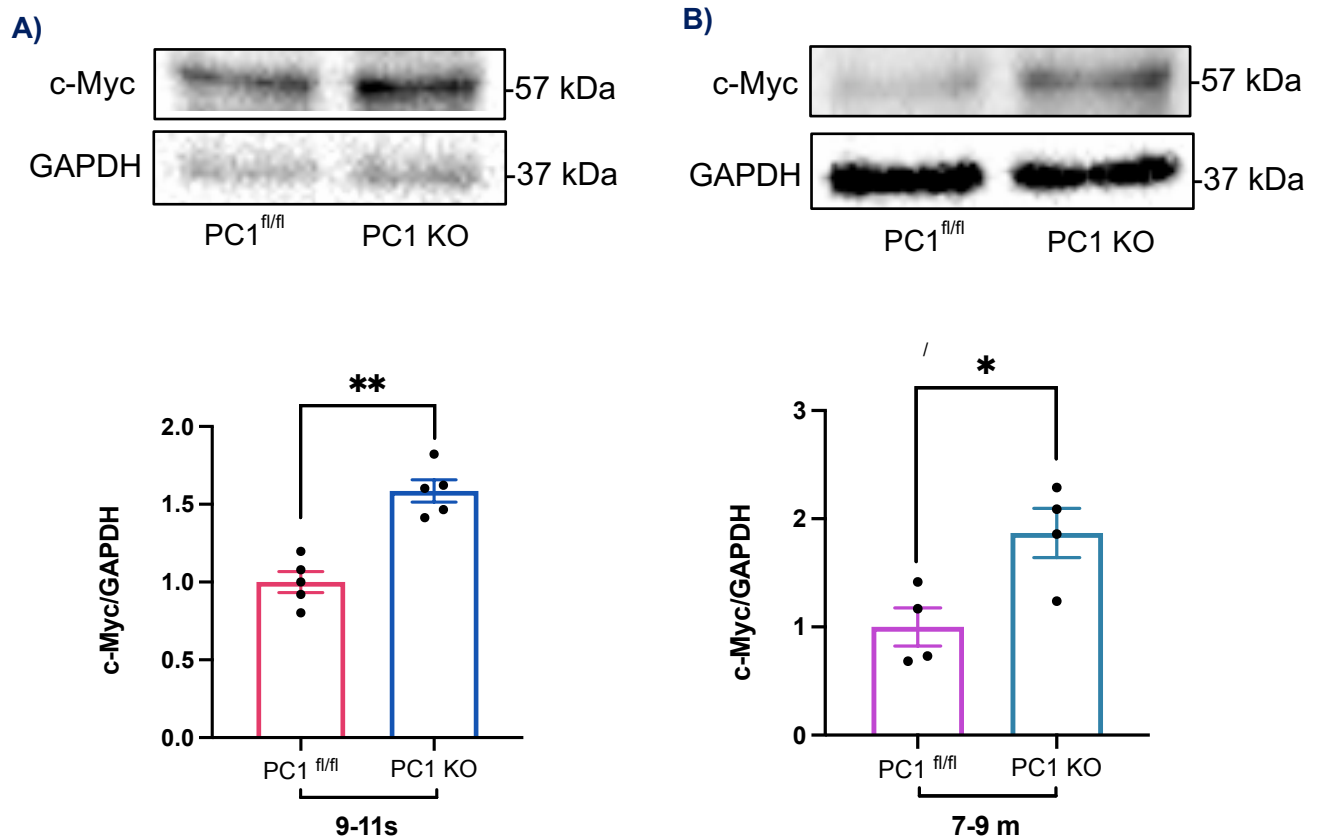
Al evaluar los niveles de ARNm de c-Myc en los NRVMs donde se sobre-expresó el C-terminal de la PC1 (NRVMs Ad-FLM) a un MOI igual a 20, se encontró una disminución significativa respecto a los controles ( $p=0,04$ ) (Figura 21A).



**Figura 21. A)** Niveles de ARNm de c-Myc en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transducidos con el C-terminal de la PC1 (Ad-FLM) con un MOI=20 durante 24 h (n= 6). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. \*  $p<0,04$  vs. CMV.

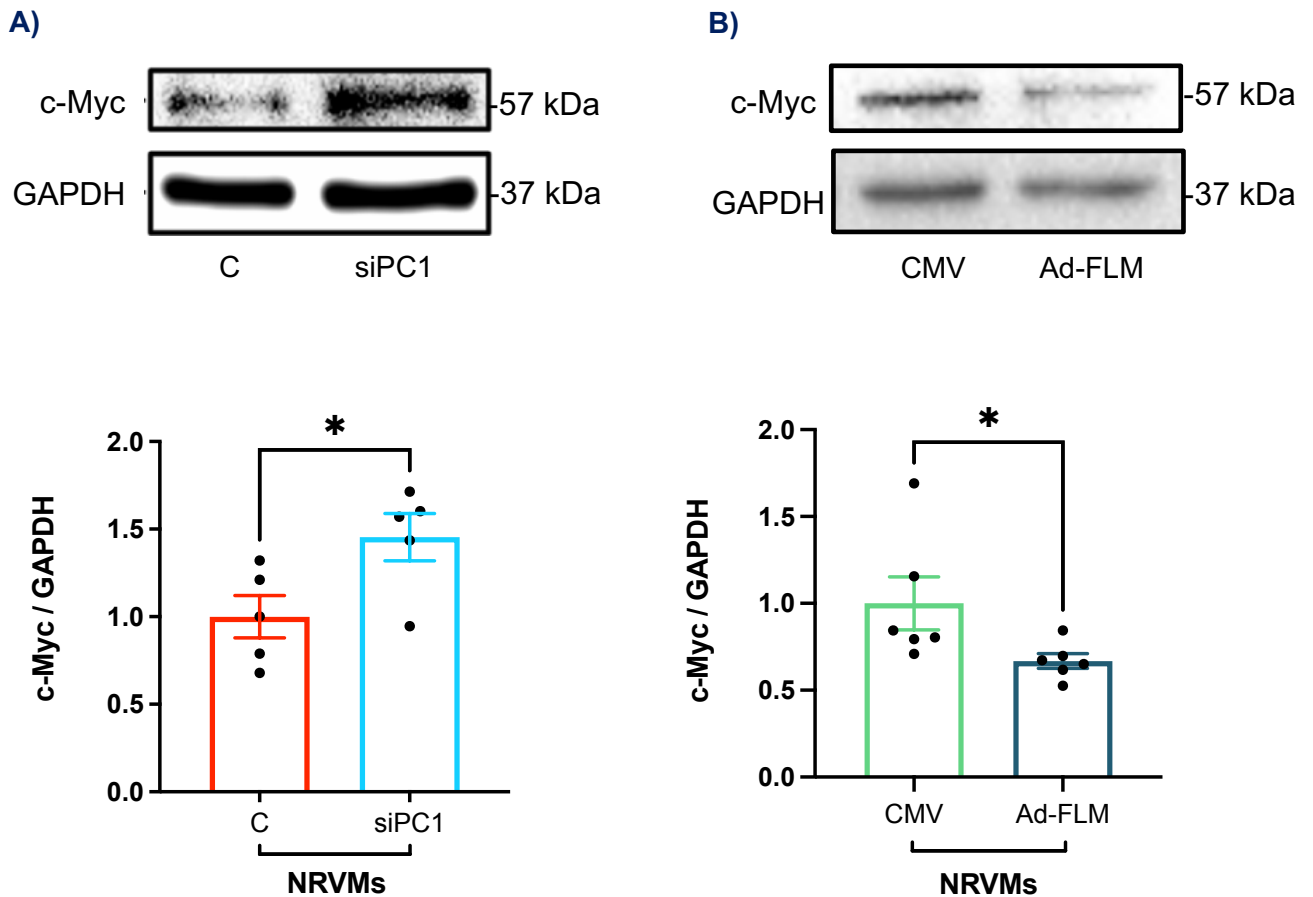
### 3.3 El silenciamiento de la PC1 o la sobre-expresión de su dominio C-terminal en los cardiomiocitos regulan el contenido proteico del factor transcripcional c-Myc

Para determinar si los cambios del ARNm de c-Myc dependientes de la presencia de la PC1 se relacionan con su contenido proteico, se utilizaron muestras provenientes de ratones PC1 KO de 9-11 semanas de vida, 7-9 meses de vida y NRVMs siPC1, con sus respectivos controles. Nuestros resultados indicaron un aumento significativo del contenido proteico de c-Myc tanto en el tejido cardíaco de los ratones PC1 KO de 9-11 semanas de vida ( $p=0,0002$ ), (Figura 22A), como en los de 7-9 meses de edad ( $p=0,001$ ), (Figura 22B).



**Figura 22.** Niveles proteicos de c-Myc en tejido ventricular en: **A)** los ratones PC1 KO vs. controles (PC1<sup>fl/fl</sup>) de 9-11 semanas de vida (n= 5), \*\*  $p < 0,0002$  vs. PC1<sup>fl/fl</sup> y, **B)** en los de 7-9 meses de edad (n=4), \* $p < 0,01$  vs. PC1<sup>fl/fl</sup>, (en la parte superior de cada cuantificación se muestran los westerns blot representativos). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.

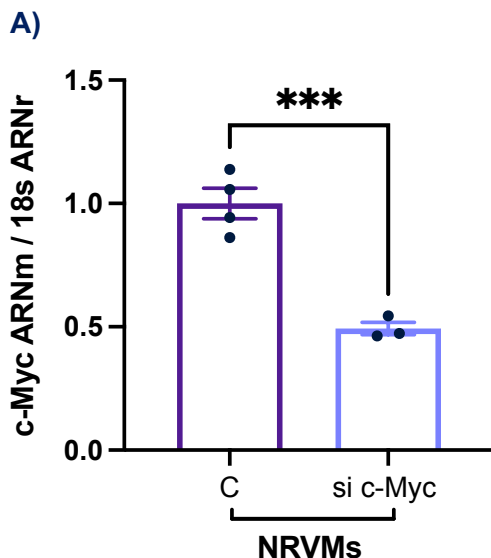
Corroborando estos datos, mientras los NRVMs siPC1 también presentaron un aumento proteico de c-Myc ( $p=0,01$ ), (**Figura 23A**), los NRVMs Ad-FLM indicaron una disminución significativa del contenido proteico de c-Myc ( $p=0,01$ ), (**Figura 23B**).



**Figura 23. A)** Niveles proteicos de c-Myc en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata (NRVMs) transfectados con un siRNA (siPC1) durante 48 h ( $n=5$ ),  $*p<0,01$  vs. Control (C) y, **B)** en NRVMs transducidos con el C-terminal de la PC1 (Ad-FLM) con un MOI=20 durante 24 h ( $n= 6$ ),  $* p<0,01$  vs. CMV. Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.

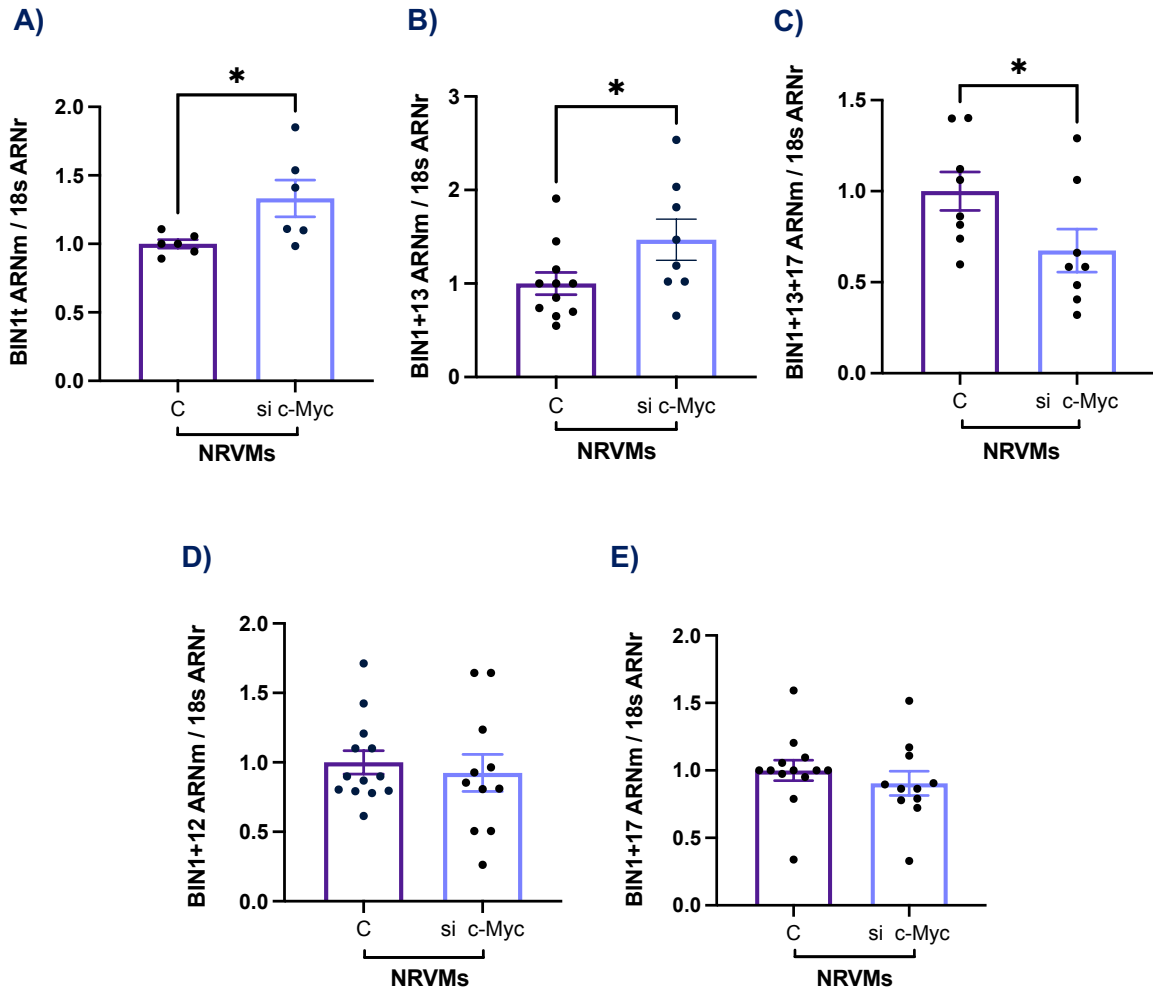
### 3.4 El silenciamiento de c-Myc en los NRVMs modifica los niveles de las isoformas cardíacas de BIN1

Para determinar la relación entre la expresión del factor transcripcional c-Myc y BIN1, se utilizaron NRVMs *knockdown* para c-Myc (si c-Myc), transfectados por medio de un siRNA c-Myc durante 48 horas. Se evaluaron los niveles del ARNm de c-Myc en los NRVMs si-c-Myc, mediante qRT-PCR, observándose una disminución de su expresión, de aproximadamente el 50% ( $p=0,006$ ), (**Figura 24A**).



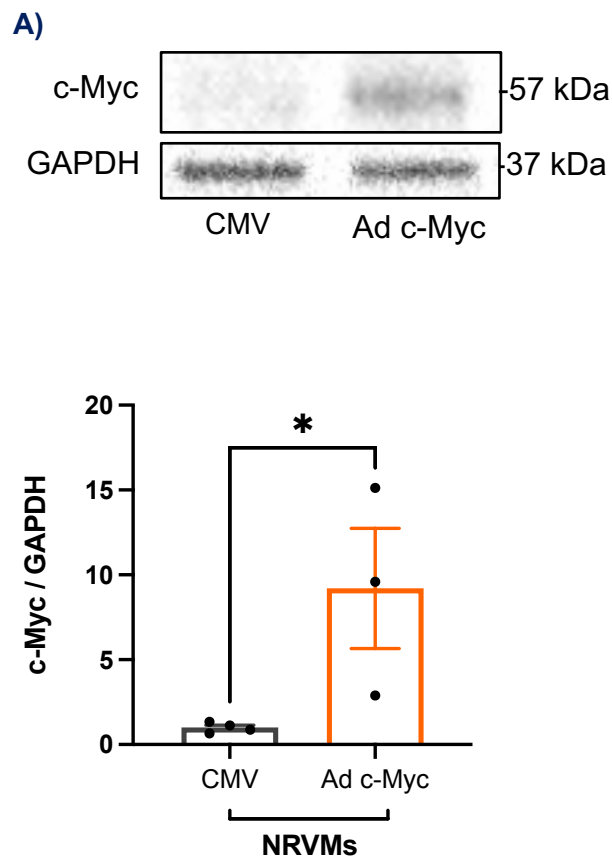
**Figura 24. A)** Niveles del contenido de ARNm de c-Myc en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata (NRVMs) transfectados con un siRNA (si c-Myc) durante 48 h ( $n=3-4$ ). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. \*\*\* $p<0,0006$  vs. Control (C).

Los NRVMs si-c-Myc presentaron un aumento significativo de los niveles de ARNm de BIN1 total ( $p=0,0003$ ), (**Figura 25A**). Más aún, los niveles del ARNm de la isoforma cardíaca BIN1+13 aumenta significativamente ( $p=0,03$ ), (**Figura 25B**); mientras los de la isoforma cardíaca específica de BIN1+13+17 disminuye significativamente, comparados a sus controles ( $p=0,02$ ), (**Figura 25C**). Los niveles del ARNm de las isoformas ubicuas BIN1+12 y BIN1+17 en los NRVMs si c-Myc no presentan diferencias significativas respecto a los controles (**Figura 25D y 25E**).

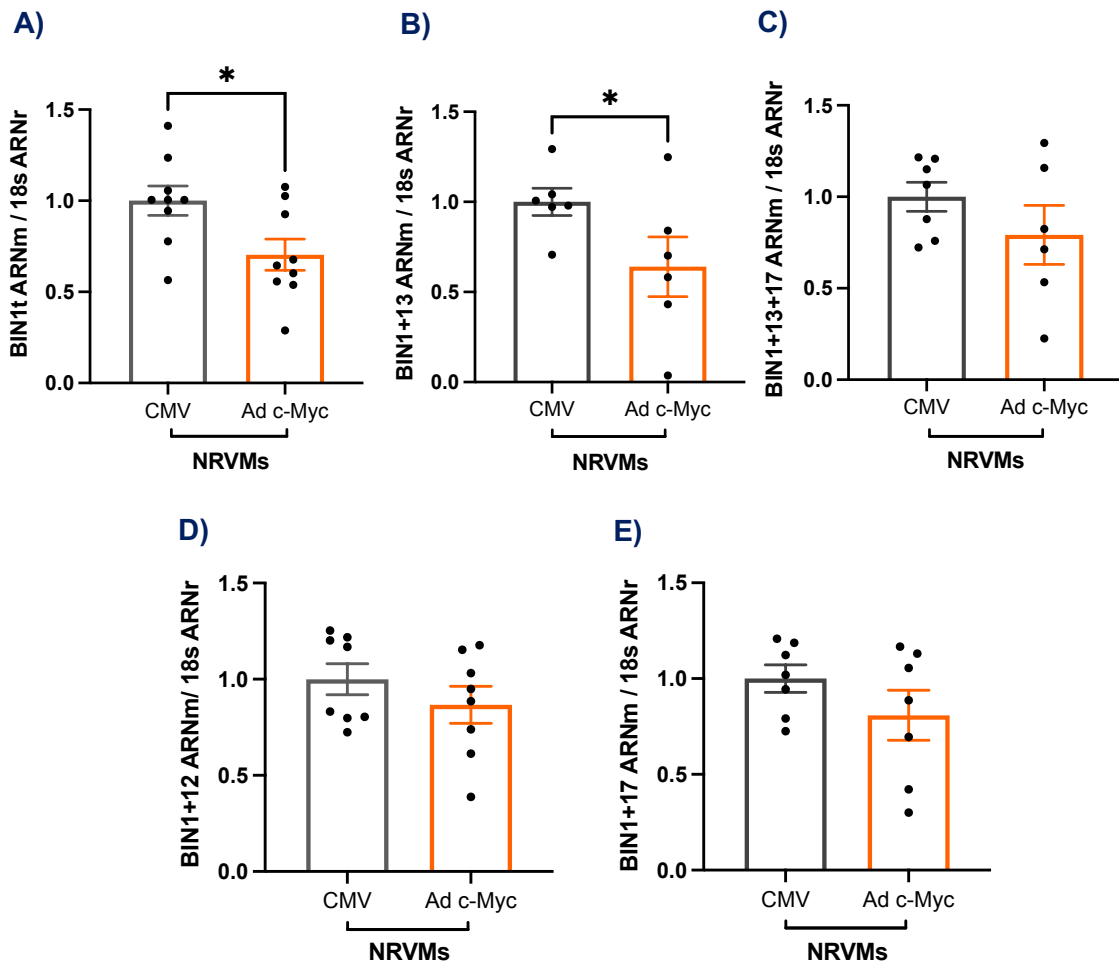


**Figura 25.** Niveles de ARNm de BIN1 total, de las isoformas cardio específicas y las ubicuas en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata (NRVMs) transfectados con un siRNA (si c-Myc) durante 48 h. En la parte superior del panel se muestran los niveles en el ARNm de: **A)** BIN1t (n=6), \*p <0,01 vs. Control (C); **B)** de la isoforma cardio específica BIN+13 (n=8-11), \* p<0,03 vs. Control (C) y, **C)** de la isoforma cardio específica BIN+13+17 (n= 8), \* p<0,02 vs. Control (C). En la parte inferior se muestran el ARNm de las isoformas ubicuas: **D)** BIN1+12 (n=11-13) y, **E)** BIN1+17 (n=11-13). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio ± SEM.

Para corroborar los datos obtenidos anteriormente que sugieren que c-Myc regula los niveles de ARNm total de BIN1, así como sus isoformas, se sobre-expresó c-Myc utilizando un vector adenoviral (Ad c-Myc) a un MOI de 2 durante 48 h. La transducción de c-Myc llevó a la sobreexpresión significativa de la proteína ( $p=0,001$ ), (**Figura 26A**), relacionado con una disminución de los niveles de ARNm de BIN1 total ( $p=0,01$ ), (**Figura 27A**). Por otro lado, se evidenció una disminución del ARNm de la isoforma cardio específica BIN1+13 ( $p=0,03$ ), (**Figura 27B**), sin cambios de la isoforma cardio específica BIN1+13+17, (**Figura 27C**), ni de las isoformas ubicuas BIN1+12 y BIN1+17 (**Figura 27D y 27E**).



**Figura 26. A)** Niveles proteicos de c-Myc en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata (NRVMs) transducidos con el vector adenoviral Ad c-Myc (MOI=2) durante 48 h ( $n=3-4$ ), (en la parte superior de la cuantificación se muestra un western blot representativo), \*  $p<0,01$  vs. CMV. Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM.

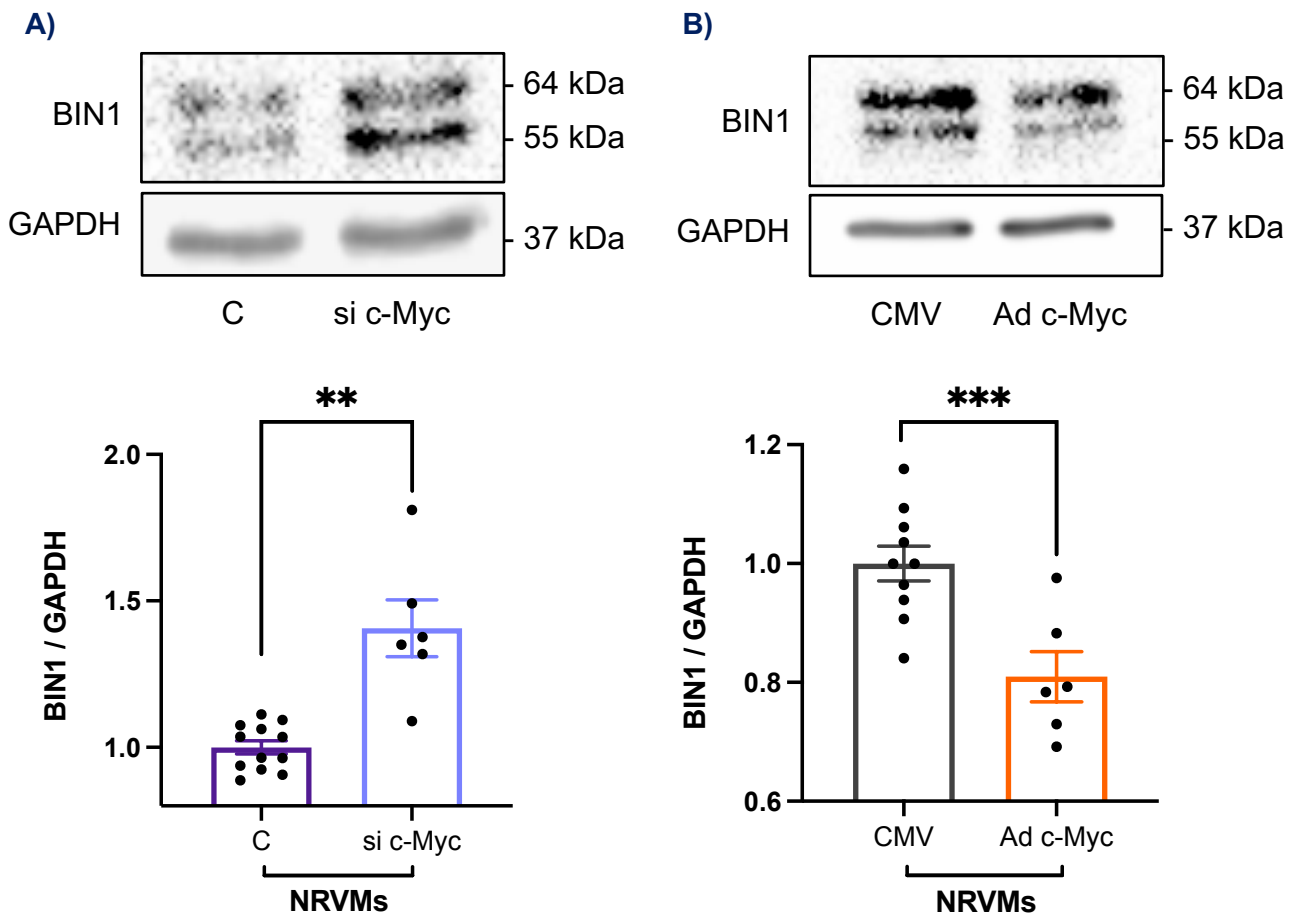


**Figura 27.** Niveles de ARNm de BIN1 total, de las isoformas cardio específicas y las ubicuas en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata (NRVMs) transducidos con el vector adenoviral Ad c-Myc (MOI=2) durante 48 h. En el panel superior se muestran los niveles de ARNm de: **A)** BIN1 total (n=9), \*p<0,01 vs. CMV; **B)** de la isoforma cardio específica BIN+13 (n=6), \*p<0,03 vs. CMV y, **C)** los de la isoforma cardio específica BIN+13+17 (n=6-7). En la parte inferior se muestran los niveles de ARNm de las isoformas ubicuas: **D)** BIN+12 (n=8) y **E)** BIN1+17 (n=7). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio ± SEM.



### 3.5 El silenciamiento o la sobre-expresión de c-Myc en los NRVMs modifica el contenido proteico de BIN1

Para determinar si los cambios observados en el ARNm de BIN1 dependiente de c-Myc se traduce en cambios a nivel proteico, se midió el contenido de BIN1 total por western blot. Los NRVMs si-c-Myc mostraron un aumento del contenido proteico de BIN1 respecto a sus controles ( $p=0,002$ ), (**Figura 28A**), mientras que por el contrario, en los NRVMs Ad c-Myc, el contenido proteico de BIN1 disminuyó de manera significativa al compararse con sus controles ( $p=0,001$ ), (**Figura 28B**).



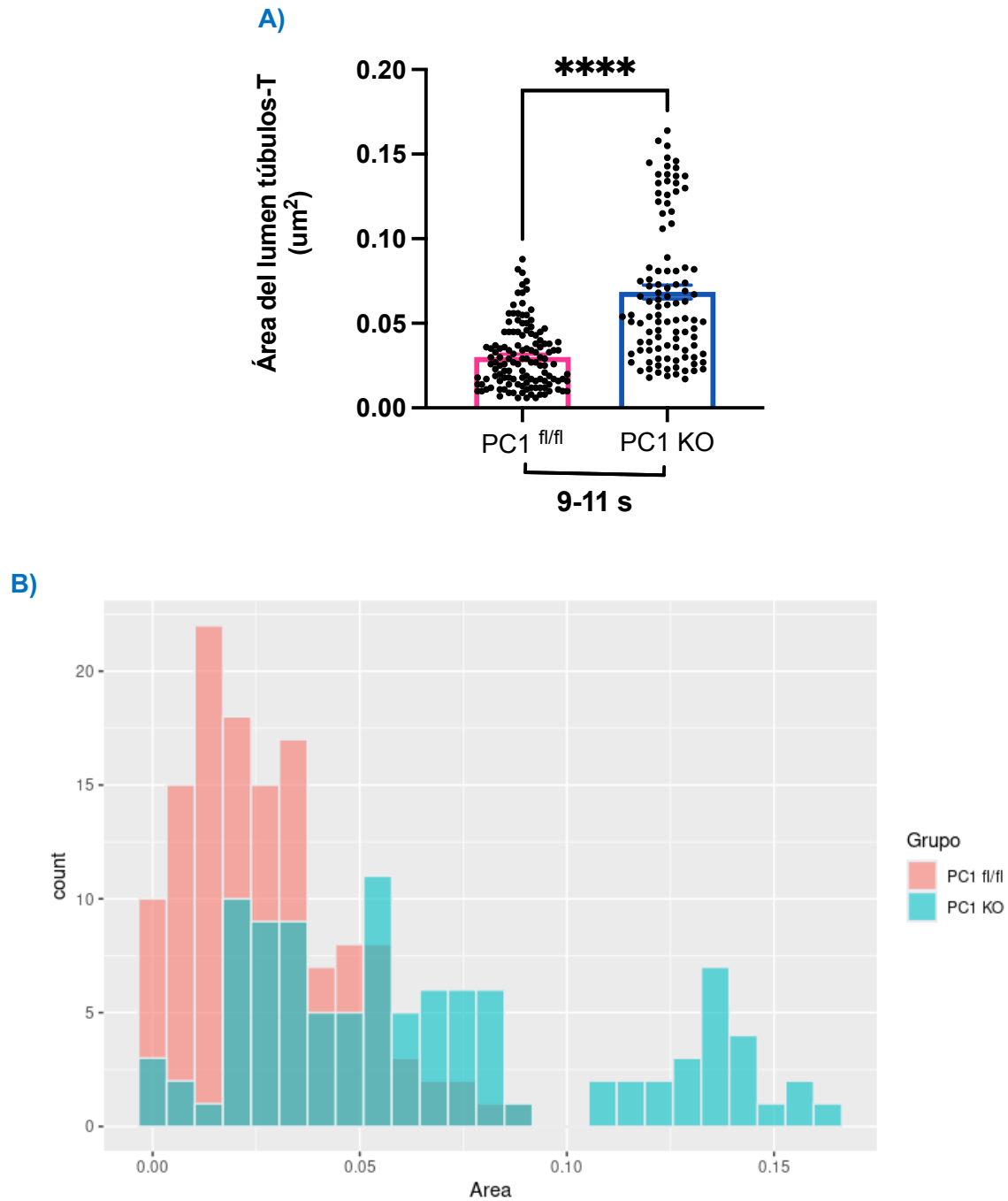
**Figura 28. A)** En la parte izquierda de panel se muestran los niveles proteicos de BIN1 en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata transfectados (NRVMs) con un siRNA específico para c-Myc (si c-Myc) durante 48 h ( $n=6-12$ ),  $**p<0,002$  vs. Control (C). **B)** En la parte derecha, los niveles proteicos de BIN1 en NRVMs transducidos con el vector adenoviral Ad c-Myc durante 48 h ( $n=6-10$ ),  $***p<0,001$  vs. CMV, (en la parte superior de cada una de las cuantificaciones se muestran los westerns blot representativos). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. Se cuantificaron las dos bandas que aparecen en el blot para el BIN1 total.

#### Objetivo específico 4. Determinar los cambios en la estructura de los túbulos-T asociados a la expresión de la PC1 en los cardiomiocitos.

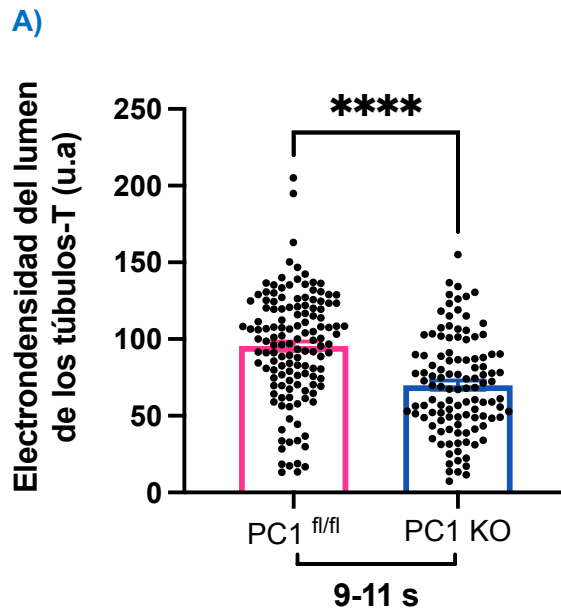
##### 4.1 Los cardiomiocitos de los ratones PC1 KO presentan un remodelamiento de la ultraestructura de los túbulos-T

Considerando que la disminución de BIN1 se ha asociado al desarrollo de IC tanto en pacientes como en ratones (33, 35, 41) y que esto se asociaría a cambios en la ultraestructura de los túbulos-T que explicarían, aunque sea en parte la disfunción cardíaca (24), se evaluaron los túbulos-T mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), en cortes de tejido cardíaco obtenidos del ventrículo izquierdo de corazones de ratones PC1 KO a las 9-11 semanas y a los 7-9 meses de vida, en conjunto con sus respectivos controles. Los parámetros que se evaluaron para describir la ultraestructura de los túbulos-T fueron: el área del lumen y la electrondensidad intraluminal, la cual es un indicativo de la formación de los microplegamientos, necesarios para la correcta formación de las diadas. Los datos obtenidos indican que los ratones PC1 KO a las 9-11 semanas, presentan un aumento en el área del lumen ( $p=0,0001$ ), (**Figura 29A**); además al evaluar la distribución de los túbulos-T por área mediante un histograma de frecuencias, existe una población de túbulos-T en el tejido cardíaco de ratones PC1 KO que tienen un área similar al área de los túbulos-T del grupo control, aunque también se observa como otra población de túbulos-T a las 9-11 semanas, tiene un área es mayor al compararse con el grupo control (**Figura 29B**). En relación con la electrondensidad intraluminal, se encontró una disminución comparada con el grupo control ( $p=0,0001$ ), (**Figura 30A**), al determinar la distribución que presentan los valores de electrondensidad se encontró que, aunque exista una población de túbulos-T en los ratones PC1 KO con electrondensidades que no son tan bajas, claramente se observa otra gran población de túbulos-T que tiene un electrondensidad muy disminuida en comparación al grupo control (**Figura 30B**). Se muestran imágenes representativas de la microscopía electrónica de los túbulos-T de los ratones PC1 KO y de los ratones PC1<sup>fl/fl</sup> (controles), (**Figura 31A**). De igual manera estos cambios en la ultraestructura de los túbulos-T fueron observados en los ratones PC1 KO a los 7-9 meses de vida: un aumento del área del lumen ( $p=0,0001$ ), (**Figura 32A**), con una distribución del área que evidencia que existe una población de túbulos-T de los que tienen un área menor, pero que existe otra población con un aumento del área, en cambio el área de los túbulos-T en el grupo control (PC1<sup>fl/fl</sup>) se concentra en rangos de área menores, sin una población definida de túbulos-T con áreas aumentadas (**Figura 32B**). Adicionalmente, al evaluar la electrondensidad en el grupo de ratones de 7 a 9 meses de edad,

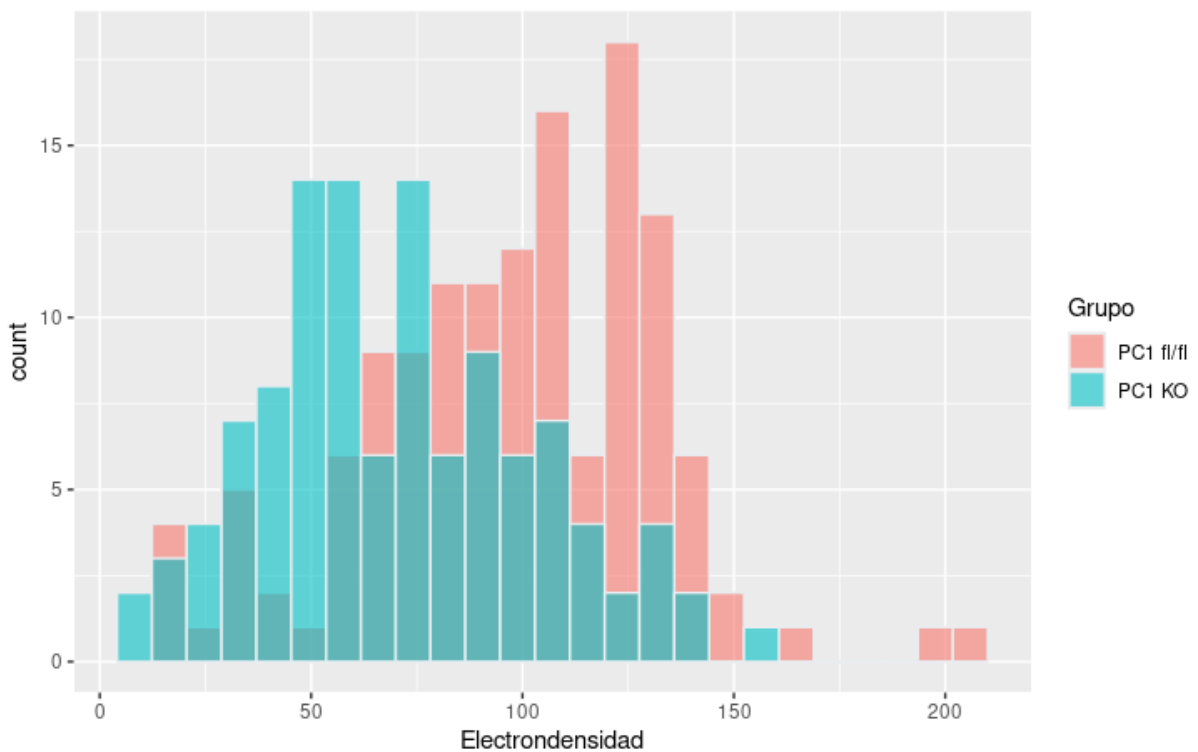
se observó también una menor electrondensidad intraluminal en los túbulos-T de los ratones PC1 KO comparado con sus controles (PC1<sup>fl/fl</sup>) ( $p=0,0001$ ), (**Figura 33A**). En relación con la distribución, se observa que la mayor población de los túbulos-T de los ratones PC1 KO se encuentran en los rangos de menor electrondensidad, y sólo una población de túbulos-T de los ratones PC1<sup>fl/fl</sup>, tienen un rango mayor de electrondensidad (**Figura 33B**). Se muestran imágenes representativas de la microscopía electrónica de los túbulos-T de los ratones PC1 KO y de los ratones PC1<sup>fl/fl</sup> (controles) de 7 a 9 meses de edad (**Figura 34A**). Finalmente, se evaluó el número de túbulos por área y a las 9-11 semanas de vida no presentan diferencias significativas con sus respectivos controles (**Figura 35A**), mientras que en los ratones PC1 KO a los 7-9 meses de edad, se encontró disminuido significativamente respecto a sus controles ( $p=0,0009$ ), (**Figura 35B**). El conjunto de estos resultados sugiere que los cambios en la ultraestructura de los túbulos-T en los ratones PC1 KO se encuentran presentes a edad temprana de estos animales, aun cuando los signos de IC no han aparecido, pero estarían relacionados con la disfunción cardíaca medida por ecocardiografía (Figura 1B). La pérdida del número de túbulos-T parecería ocurrir posteriormente, relacionado con la aparición de los signos de IC.



**Figura 29.** Área del lumen de los túbulos transversos (túbulos-T) en secciones de tejido cardíaco de los ratones PC1 KO a las 9-11 semanas de edad por microscopía electrónica de transmisión (TEM). **A)** Cuantificación del área del lumen en los túbulos-T de los ratones PC1 KO y sus controles, (n=3), \*\*\*\*p<0,0001 vs. PC1<sup>fl/fl</sup>. Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio ± SEM. **B)** Histograma de frecuencias de área tanto de los túbulos-T del grupo PC1 KO y del grupo PC1<sup>fl/fl</sup>. Se utilizó el software estadístico R (v4.1.2: R Core Team 2021)

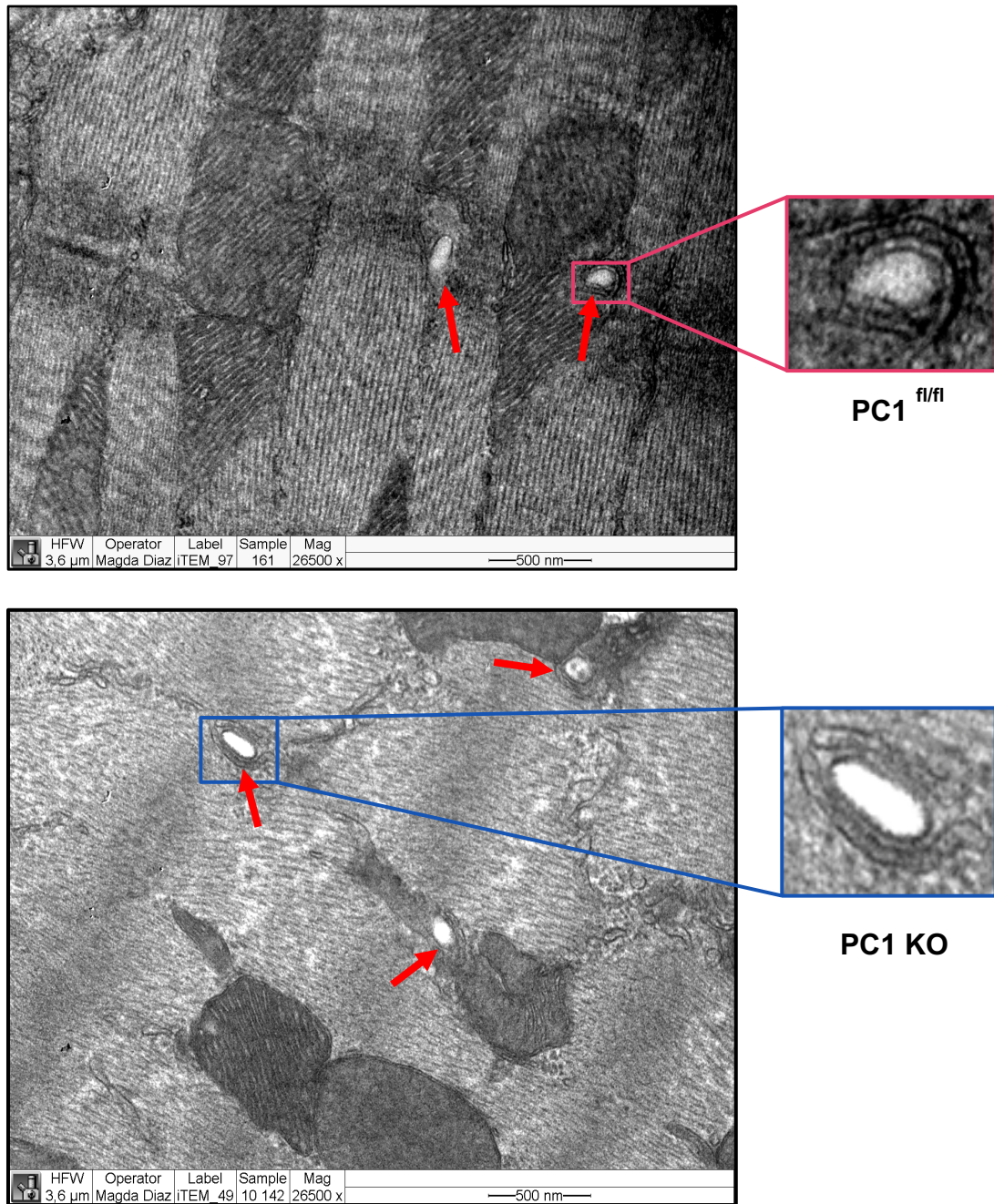


B)

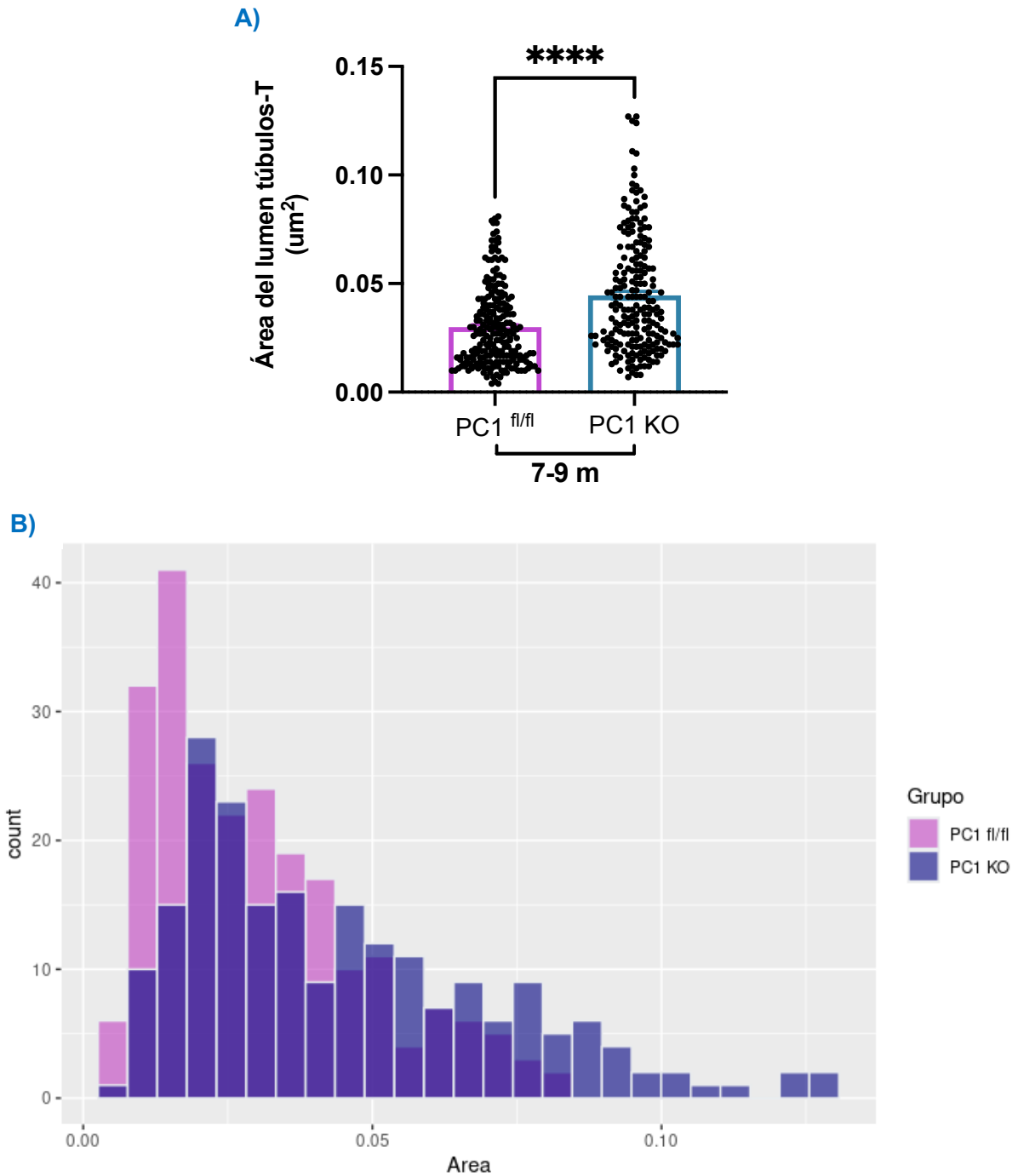


**Figura 30.** Electrondensidad intraluminal de los túbulos transversos (túbulos-T) en secciones de tejido cardíaco de los ratones PC1 KO a las 9-11 semanas de edad por microscopía electrónica de transmisión (TEM). **A)** Cuantificación de la electrondensidad intraluminal de los túbulos-T de los ratones PC1 KO y sus controles, (n=3), \*\*\*\*p<0,0001 vs. PC1<sup>fl/fl</sup>. Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio ± SEM. **B)** Histograma de frecuencias de electrondensidad de los túbulos-T del grupo PC1 KO y del grupo PC1<sup>fl/fl</sup>. Se utilizó el software estadístico R (v4.1.2: R Core Team 2021)

A)

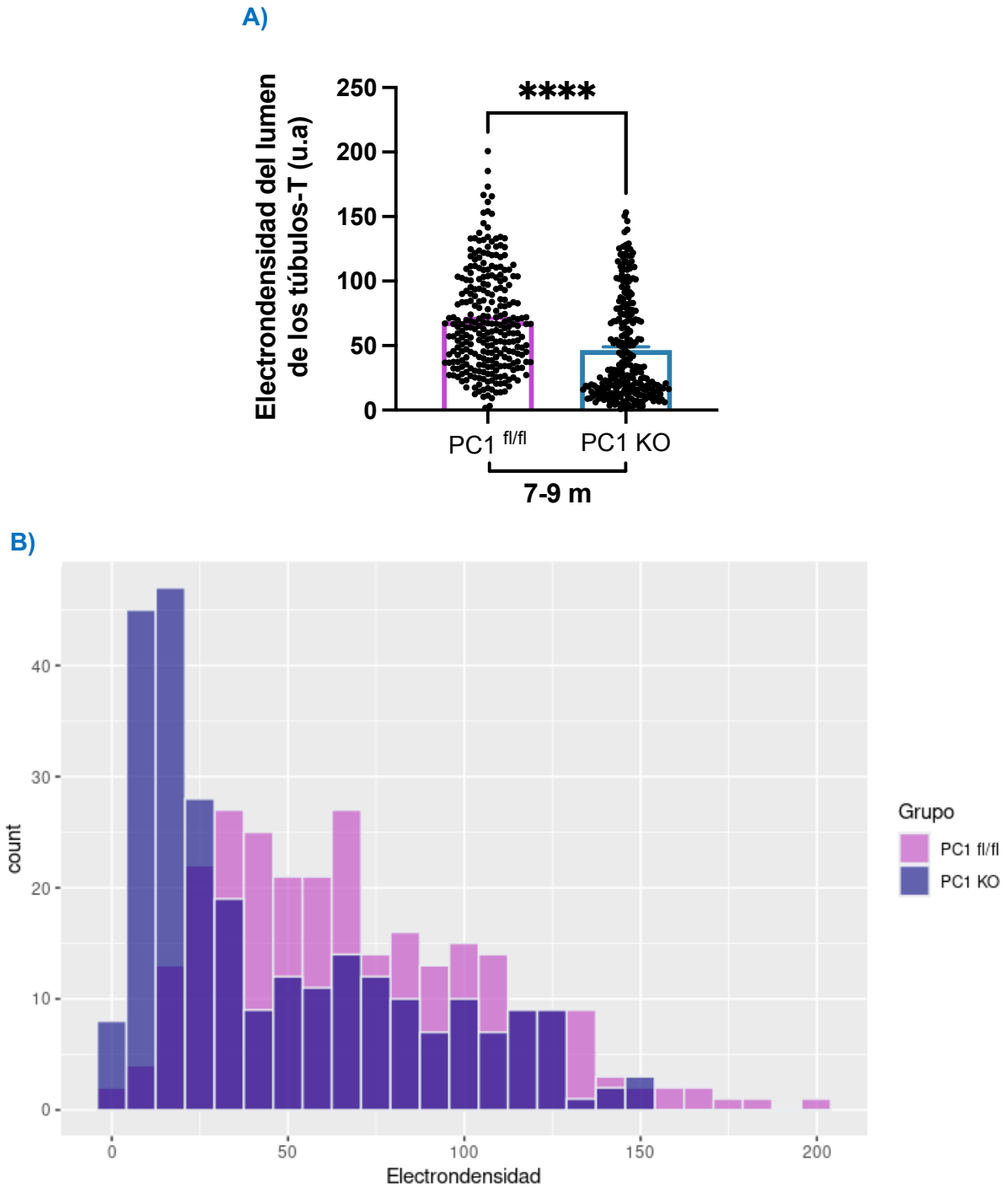


**Figura 31. A)** Imágenes representativas de los tejidos cardíacos evaluados por TEM, a las 9-11 semanas de edad. Las flechas rojas indican los túbulos-T por imagen y en el recuadro se visualiza de forma magnificada un túbulo-t por cada condición (PC1<sup>fl/fl</sup> y PC1 KO). En la parte superior del panel se muestra los túbulos-T en los PC1<sup>fl/fl</sup> y en la parte inferior se muestra los túbulos-T en los PC1 KO.



**Figura 32.** Área del lumen de los túbulos transversos (túbulos-T) en secciones de tejido cardíaco de los ratones PC1 KO a los 7-9 meses de edad por microscopía electrónica de transmisión (TEM). **A)** Cuantificación del área del lumen en los túbulos-T de los ratones PC1 KO y sus controles, (n=3), \*\*\*\*p<0,0001 vs. PC1<sup>fl/fl</sup>. Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio ± SEM. **B)** Histograma de frecuencias de área tanto de los túbulos-T del grupo PC1 KO y del grupo PC1<sup>fl/fl</sup>. Se utilizó el software estadístico R (v4.1.2: R Core Team 2021)

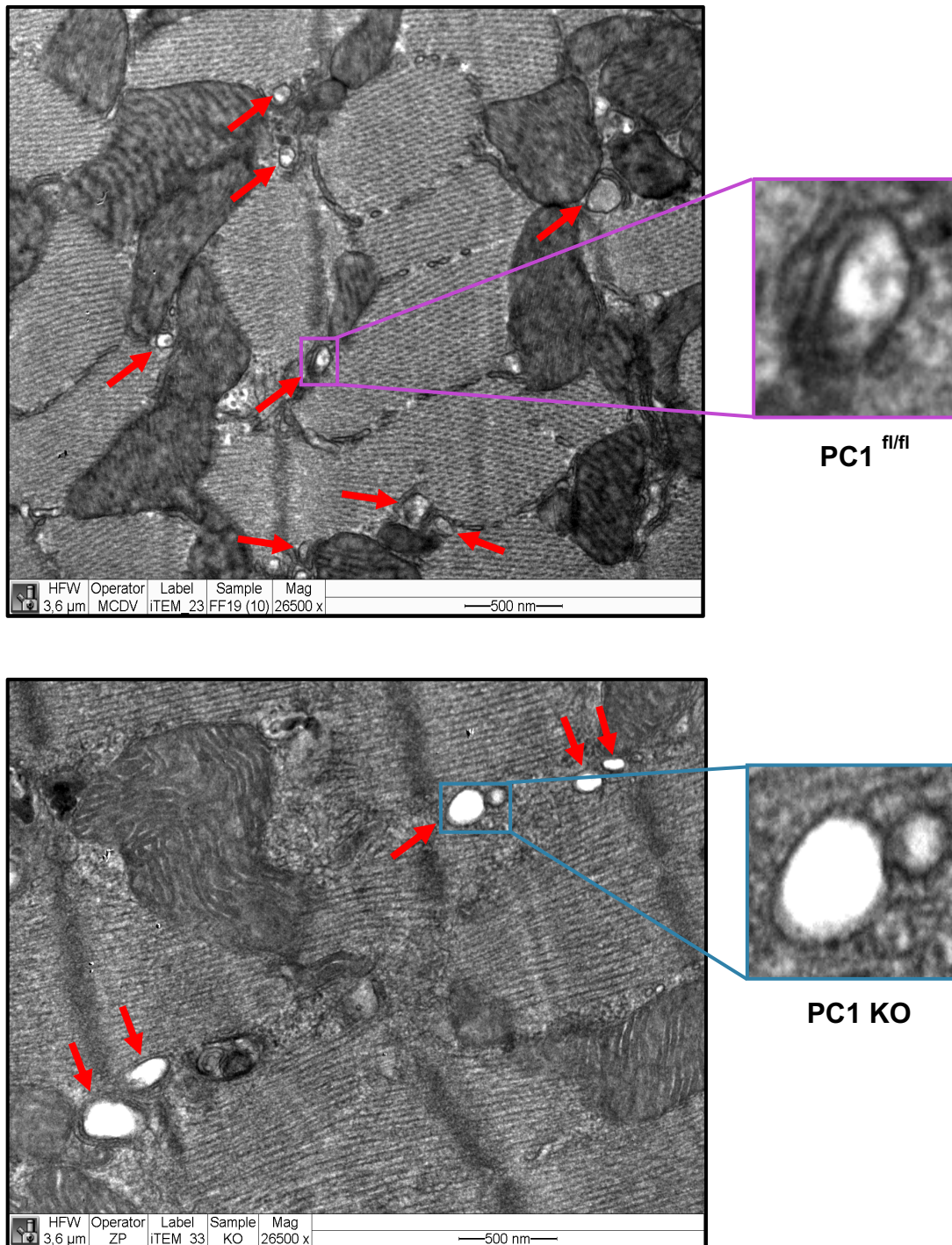




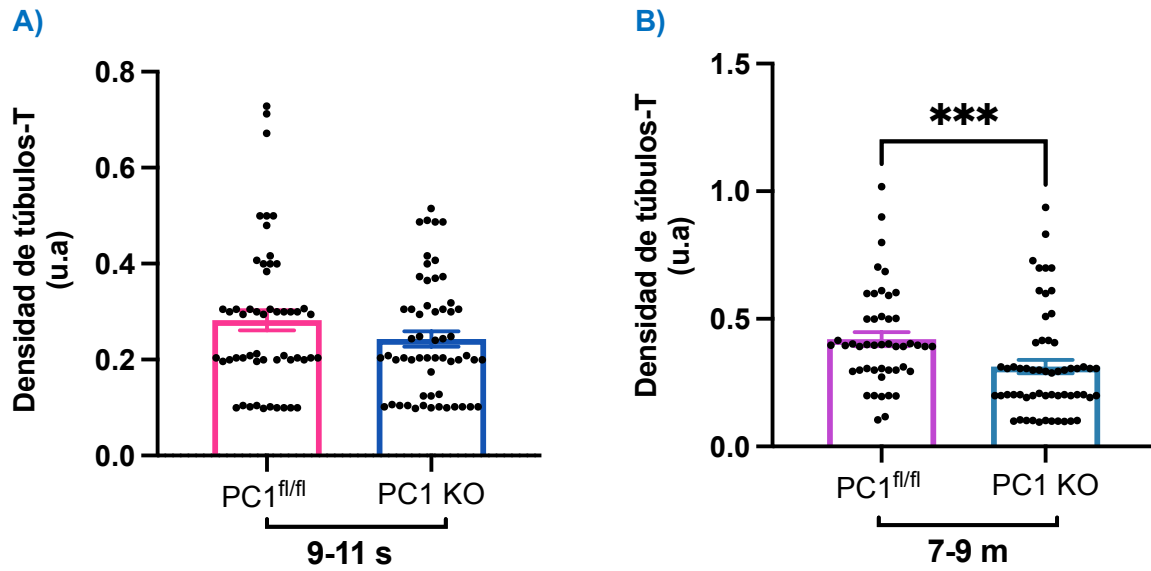
**Figura 33.** Electrondensidad intraluminal de los túbulos transversos (túbulos-T) en secciones de tejido cardíaco de los ratones PC1 KO a los 7 a 9 meses de edad por microscopía electrónica de transmisión (TEM). **A)** Cuantificación de la electrondensidad intraluminal de los túbulos-T de los ratones PC1 KO y sus controles, (n=3), \*\*\*\*p<0,0001 vs. PC1<sup>fl/fl</sup>. Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. **B)** Histograma de frecuencias de electrondensidad de los túbulos-T del grupo PC1 KO y del grupo PC1<sup>fl/fl</sup>. Se utilizó el software estadístico R (v4.1.2: R Core Team 2021)



A)



**Figura 34. A)** Imágenes representativas de los tejidos cardíacos evaluados por TEM a los 7 a 9 meses de edad. Las flechas rojas indican los túbulos-T por imagen y en el recuadro se visualiza de forma magnificada un túbulo-t por cada condición (PC1<sup>fl/fl</sup> y PC1 KO). En la parte superior del panel se muestra los túbulos-T en los PC1<sup>fl/fl</sup> y en la parte inferior se muestra los túbulos-T en los PC1 KO.



**Figura 35.** Cuantificación de número de túbulos-T por área ( $\mu\text{m}^2$ ) en secciones de tejido cardíaco de los ratones PC1 KO: **A)** a los 9-11 semanas de edad meses de edad (n=3) y, **B)** en los ratones PC1 KO a los 7-9 meses de edad (n=3). Para el análisis estadístico se utilizó un t-Test no pareado. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0,0009$  vs. PC1<sup>fl/fl</sup>

## 7. Discusión

La PC1 es una proteína mecanosensora esencial para el funcionamiento cardíaco. Se ha reportado anteriormente que los ratones silenciados para el gen de la PC1 en los cardiomiocitos presentan disfunción cardíaca a las 8 semanas de vida (20, 21). Nuestros resultados reafirman que en los ratones PC1 KO cardio específicos se genera una disfunción cardíaca a las 9 a 11 semanas de vida, aunque sin evidencia de signos de IC. Sin embargo, encontramos que cuando los ratones PC1 KO tienen entre 7 a 9 meses de edad, presentan un empeoramiento de la función cardíaca y presentan signos de IC como fatiga, respiración rápida y superficial. Además, al evaluar la supervivencia de estos ratones PC1 KO, se encontró que el 100% de estos ratones mueren a los 9 meses de vida. Dentro de la clasificación de estadios de la IC (3, 4) podría sugerirse que los ratones PC1 KO de 9 a 11 semanas de edad, se encuentran en un estadio B, mientras que los PC1 KO de 7 a 9 meses de vida se encontrarían en un estadio C-D. En una cohorte de pacientes fue evaluada la coexistencia de ADPKD y cardiomiopatías primarias y se encontró que el 5,8% presentaban cardiomiopatía dilatada idiopática, el 2,5% tenían cardiomiopatía hipertrófica obstructiva y el 0,3 % ventrículo izquierdo no compacto, este estudio sugiere que las mutaciones de *PKD1* y *PKD2* pueden predisponer a cardiomiopatías primarias y que las interacciones genéticas pueden explicar la coexistencia observada de enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ADPKD) y cardiomiopatías (49). Además en la literatura fue reportado un caso de una menor de 8 meses de vida quien fue diagnosticada con ADPKD y súbitamente presentó signos de IC y falleció, de acuerdo a los análisis post mortem se encontró una cardiomiopatía dilatada idiopática (50). De acuerdo a nuestros hallazgos en los ratones PC1 KO, se puede sugerir que cualquier alteración en la expresión de *Pkd1* genera un daño a nivel cardíaco, que si bien inicialmente se presenta con disfunción cardíaca progresa a una cardiomiopatía dilatada. Posiblemente la progresión hacia la cardiomiopatía dilatada explique porque los ratones PC1 KO a partir de los 7 meses presentan un aumento en la mortalidad, ya que ha sido descrito que en la cardiomiopatía dilatada existe una alta incidencia de muerte súbita cardíaca, especialmente en personas jóvenes en edad laboral y adicionalmente los pacientes con cardiomiopatía dilatada suelen ser más jóvenes en comparación con aquellos que tienen cardiopatías isquémicas (51, 52). Es importante destacar que la muerte súbita cardíaca, puede ser la manifestación inicial de la cardiomiopatía dilatada en sujetos que previamente han sido asintomáticos (53) . Por lo tanto, este aumento de mortalidad observado en los ratones PC1 KO de 7 a 9 meses de edad, sea el desenlace de la cardiomiopatía dilatada. Por otra parte, es

importante decir que nuestro modelo de ratones PC1 KO es homocigoto, por lo tanto, todos los cambios observados en los ratones PC1 KO durante el desarrollo de esta tesis reflejan lo que ocurre en la ausencia total de la PC1 en el corazón. En relación con cambios fisiopatológicos a nivel cardíaco en ratones heterocigotos para la PC1 en el corazón (*Pkd1<sup>+/-</sup>*), ha sido descrito que en estos ratones heterocigotos existe activación de la mitofagia, la cual está relacionada con alteraciones de la integridad de la red mitocondrial, el desequilibrio de la dinámica mitocondrial, por lo tanto, con desregulación metabólica cardíaca (54). Además, en otro estudio que evaluó como en ratones *Pkd1<sup>+/-</sup>* se modificaba la expresión de la ADPKD, los autores encontraron que en los ratones heterocigotos se desarrollan quistes renales pero no se presentan efectos adversos en la supervivencia evaluada a un año (55). Si bien estos estudios, no evaluaron la función cardíaca, a partir de estos datos se puede hipotetizar que los ratones *Pkd1<sup>+/-</sup>*, podrían presentar disfunción cardíaca quizás a edades posteriores de la 12ª semana de vida y que tal vez, cuando sean sometidos a algún tipo de estrés cardíaco como el ejercicio o la sobrecarga por volumen o presión, desarrollen algún grado de Insuficiencia cardíaca, aunque posiblemente no los llevaría a un aumento de la mortalidad prematura.

En la literatura ha sido reportado que en los cardiomiocitos de los ratones PC1 KO de también ocurre una disminución en el contenido proteico de los LTCC, los cuales son esenciales en el acoplamiento E-C (22). Los LTCC se encuentran en mayor densidad en los túbulos transversos y cuando existe alteraciones en esta red de túbulos-T, como en la IC, estos canales pueden ser degradados, contribuyendo al empeoramiento de la función cardíaca. Se ha descrito que una de las proteínas claves en la generación de los túbulos-T y del mantenimiento de su ultraestructura es la proteína BIN1. En el tejido cardíaco se expresan cuatro isoformas diferentes, dos ubicuas: BIN1+12 y BIN1+17 y dos variantes de *splicing* alternativo cardíaco específicas: BIN1+13 y BIN1+13+17 (24, 25). Por esta razón en este estudio, se evaluó si la PC1 es capaz de regular el contenido proteico de BIN1, los niveles de ARNm de BIN1 y sus isoformas. Los resultados de este trabajo indican que, ni en los ratones PC1 KO a los 7 días de nacidos comparados con sus controles (PC1<sup>fl/fl</sup>), ni en los NRVMS siPC1 vs. Controles, no hay diferencias en los niveles proteicos de BIN1. Esto podría explicarse debido a que el desarrollo de la red de túbulos-T en mamíferos pequeños ocurre en el período postnatal y tiene una duración aproximada de 3 semanas (25,26),(56). En cambio, los niveles proteicos de BIN1, al igual que el ARNm de BIN1 total, presentan una reducción significativa en el tejido cardíaco de los ratones PC1 KO de 9-11 semanas de vida y de 7 a 9 meses de edad. Además, encontramos disminución en la expresión de BIN1 en los

microsomos (fracción enriquecida de membrana) en los ratones PC1 KO en ambas edades, lo cual podría sugerir que la ausencia de la PC1 regula la expresión de BIN1 en el tejido cardíaco y su localización en la membrana en animales adultos. Otro hallazgo importante es que en los ratones PC1<sup>fl/fl</sup> (controles) a medida que aumenta su edad, los niveles de BIN1 también aumentaban, posiblemente porque en la medida que estos animales son más adultos requieren una red de túbulos transversos mucho más madura y estable. Mientras que los ratones PC1 KO a pesar de que se hicieron más adultos, estos niveles permanecían igual. Ha sido reportado que a medida que las células maduran, aumenta la expresión de BIN1, al igual que la longitud de los túbulos (40). Estos datos sugieren que la ausencia de la PC1 en los ratones adultos estaría impidiendo que BIN1 aumente de manera progresiva con la edad. Es importante mencionar que cuando se evaluó el contenido proteico de BIN1 total en los NRVMs, el anti-BIN1 utilizado (ab185950), reconoce dos bandas que se encuentran entre los pesos moleculares de 55 kDa y 64 kDa, por lo tanto, se tuvieron en cuenta las dos bandas al analizar el contenido de BIN1 total en los NRVMs. En cambio, al evaluar BIN1 total en el tejido cardíaco, el anti-BIN1 usado reconoce una sola banda que corresponde a los 55 kDa. Respecto a esto, encontramos en la literatura que cuando se observan las dos bandas es debido a que se están reconociendo las isoformas cardio específicas de BIN1 (BIN1+13 y BIN1+13+17) (57), en nuestro caso como expresamos el contenido total cuantificamos las dos bandas como fue mencionado anteriormente. Por otra parte, otros autores han encontrado una sola banda en los blots al evaluar el contenido proteico de BIN1 total (35, 58, 59).

Adicionalmente en los ratones PC1 KO de 9-11 semanas de edad, observamos que el ARNm de la isoforma cardio específica BIN1+13 presenta una disminución respecto a los controles correspondientes, así como un aumento significativo en la isoforma BIN1+13+17, posiblemente el aumento de esta última isoforma cardio específica de BIN1 intentaría compensar la disminución de BIN1+13. Sin embargo, en los ratones PC1 KO de 7-9 meses de edad, disminuye el ARNm del BIN1 total, el ARNm de todas las isoformas tanto las cardio específicas (BIN1+13 y BIN1+13+17) como las ubicuas (BIN1+12 y BIN1+12+17). Estos hallazgos, podrían en parte dar cuenta del empeoramiento de la IC en los ratones PC1 KO de 7-9 meses de edad. Hong y cols. (2014), reportaron que la isoforma BIN1+13 es la más abundante en el tejido cardíaco de ratón y que la isoforma BIN1+13+17 es crucial en el mantenimiento de los microplegamientos de los túbulos-T (ultraestructura de los túbulos-T) (22). Además, Hong y cols. (2012) observaron que la expresión de BIN1 tanto a nivel de ARNm y de proteína, se encuentran disminuidas en los cardiomiocitos de humanos con IC (41). Por otro lado, recientemente, Li y cols. (2020) mostraron que la administración de BIN1

exógenamente, por medio de un virus adenoasociado (AAV9-cBIN1), en ratones sometidos a TAC, limita la progresión de la IC y mejora la supervivencia en dichos ratones(58). De acuerdo con esto, se podría postular que la PC1 pudiese modular la expresión de las isoformas cardíacas específicas de BIN1 en el tejido cardíaco del ratón adulto, lo que podría repercutir en la formación de la ultraestructura de los túbulos-T y el desarrollo de la IC.

Más aún, los cambios observados en el ARNm de las isoformas cardíacas específicas en el tejido ventricular cardíaco de los ratones PC1 KO de 9-11 semanas de vida, son corroborados en el modelo de los cardiomiocitos de NRVMs *knockdown* para la PC1 (NRVMs siPC1). Así, el ARNm de BIN1+13 en NRVMs siPC1 disminuye, mientras el de BIN1+13+17 aumenta significativamente y, por otro lado, los NRVMs con sobreexpresión del C-terminal de la PC1 (NRVMs Ad-FLM20) presentan niveles de ARNm opuesto a los detallados para los NRVMs siPC1, con un aumento del contenido del ARNm de BIN1+13 y la disminución significativa del ARNm de la isoforma BIN1+13+17. El conjunto de estos resultados, sugieren que la PC1 podría ser un regulador del *splicing* alternativo de las isoformas cardíacas específicas de BIN1 en los cardiomiocitos. Recientemente Lu y cols. (2020) (60) mostraron que la aplicación de BIN1c (isoforma BIN1+13+17) exógenamente por medio de un adenovirus, limita la hipertrofia cardíaca en ratones sometidos a TAC, tiene un efecto protector en la IC desarrollada por TAC y aumenta la localización de los LTCC en los túbulos-T, sugiriendo que la regulación de tan sólo esta isoforma genera cambios en la función cardíaca.

Diferentes estudios han demostrado que uno de los reguladores negativos de la expresión de BIN1 es el factor transcripcional c-Myc (42-44). También se ha reportado que en el tejido renal de pacientes con ADPKD y en varios modelos de ratones en los que el gen *Pkd1* a nivel renal ha sido mutado o eliminado (47, 48), los niveles de c-Myc están aumentados. Nuestros resultados demuestran que tanto en el tejido ventricular de los ratones PC1 KO tanto a las 9-11 semanas, como a los 7-9 meses de edad y además en los NRVMs siPC1, los niveles del ARNm de c-Myc están aumentados significativamente, lo cual reafirma que en tejidos con disminución del gen *Pkd1*, existen niveles elevados de c-Myc. Por otro lado, los resultados obtenidos en los NRVMs con sobreexpresión del C-terminal de la PC1 (NRVMs Ad-FLM20), muestran que tanto el ARNm como el contenido proteico de c-Myc se encuentra disminuido significativamente. Estos datos sugieren que la PC1 podría estar regulando los niveles de c-Myc también en los cardiomiocitos. Al respecto, Lee y cols (2020) (61) demostraron que en ratones *wild-type*, la PC1 interactúa con el factor transcripcional Tafazzin (TAZ), mientras que en su ausencia TAZ interactúa fuertemente con Axina1, lo que genera una interacción débil

entre Axina1 y  $\beta$ -Catenina, permitiendo la translocación de  $\beta$ -Catenina al núcleo, donde induce la expresión de c-Myc. Además, Cai y cols. (2018) (62) mostraron que en un modelo de ratón con deficiencia de *Pkd1*, hay una hiperactivación de la vía YAP/TAZ por inhibición de la vía Hippo, permitiendo que el complejo YAP/TAZ pueda translocarse al núcleo y promover la transcripción de c-Myc. Estos datos, aunque en tejido renal, y en conjunto con nuestros hallazgos, sugieren que la PC1 puede regular negativamente los niveles de c-Myc en los cardiomiocitos.

Como se mencionó anteriormente se ha reportado que c-Myc es un regulador negativo de BIN1, así como también se han encontrado niveles elevados de c-Myc durante la IC (45). Nuestros resultados indican que, en los cardiomiocitos *knockdown* para c-Myc (NRVMs si-c-Myc) existe un aumento significativo en los niveles totales del ARNm de BIN1. Asimismo, en los NRVMs si c-Myc se observa un

aumento significativo de la isoforma cardio específica BIN1+13 y una disminución significativa de la isoforma cardio específica BIN1+13+17. Al evaluar que sucedía con BIN1 en los NRVMs que sobreexpresaron c-Myc (NRVMs Ad c-Myc), se encontró una disminución significativa tanto del contenido proteico de BIN1 como del ARNm del BIN1 total y de la isoforma cardio específica BIN1+13, pero sin cambios en la BIN1+13+17. Estos datos sugieren que c-Myc podría actuar como un regulador del *splicing* de BIN1 en los NRVMs. En la literatura c-Myc ha sido relacionado como un factor clave en el *splicing* alternativo de diferentes proteínas, sobre todo en el área de cáncer. Recientemente, en cáncer de próstata se ha reportado que c-Myc regula el *splicing* de la proteína Sam68 (63). También, ha sido descrito cómo c-Myc puede regular varias proteínas involucradas en el *splicing*, por ejemplo, en el carcinoma hepatocelular, c-Myc regula a *SNRPB*, que es un componente del espliceosoma (64) y también puede regular a MTR4, una helicasa de ARN, afectando la expresión de genes como *GLUT1* y *PKM2* (65). Estos reportes sustentan nuestra hipótesis de que c-Myc podría ser un regulador de la expresión diferencial de las isoformas cardíacas de BIN1 en los cardiomiocitos, y siendo que la PC1 regularía negativamente la expresión de c-Myc, esta podría ser la vía que explique la diferencia en la expresión de las isoformas de BIN1 en los cardiomiocitos observada cuando la PC1 se expresa de manera deficiente.

Es ampliamente descrito que, los túbulos transversos (túbulos-T) son estructuras fundamentales para el acoplamiento excitación-contracción de los cardiomiocitos(6, 25, 27). Así como también, se ha reportado cómo los túbulos-T presentan cambios o un

remodelamiento durante diferentes enfermedades cardíacas, tal como en la IC (28). Varias proteínas han sido implicadas en el desarrollo y mantenimiento de los túbulos-T (31). De estas, BIN1 ha recibido especial atención. BIN1 ha sido identificada como un regulador clave del ensamblaje y mantenimiento de la estructura de los túbulos-T, tanto en corazones en desarrollo como en patologías cardíacas (24, 25, 41). De acuerdo con los anteriores hallazgos de este estudio, donde se observó cómo en los ratones PC1 KO a diferentes edades se encuentra una significativa disminución de BIN1, se evaluó por medio de TEM, la ultraestructura de los túbulos-T en el tejido cardíaco ventricular de dichos ratones. Encontramos que tanto los ratones PC1 KO de 9-11 semanas de edad, que presentan disfunción cardíaca por ecocardiografía, como en los PC1 KO de 7-9 meses de vida (con signos de IC), se observa un aumento del área del lumen de los túbulos-T, lo cual ha sido asociado a dilatación de los túbulos-T, tal como fue descrito en un modelo animal porcino post infarto del miocardio (66) y en los animales heterocigotos para BIN1 (24). Además, en los ratones PC1 KO se observó una disminución significativa de la electrondensidad del lumen del túbulo-T en ambas edades. Esta disminución de la electrondensidad, ha sido asociada a pérdida de los microplegamientos que son fundamentales en la función de los túbulos-T, tal como fue expuesto en el estudio de Hong y cols. (2014), donde la ausencia de los microplegamientos en los ratones heterocigotos *KnockOut* para BIN1, resulta en un aumento de arritmias cardíacas y disminución de la función cardíaca(24). Es importante destacar que, aunque la pérdida de la PC1 en el corazón induce cambios en la ultraestructura de los túbulos-T, existen poblaciones de túbulos-T que conservan el área y la electrondensidad dentro de los valores que presentan los PC1<sup>fl/fl</sup>. Esto podría ser explicado si se considera que estas estructuras tienen una amplia plasticidad (31, 67) y, fpor otra parte, que aumentos del área y pérdida de micropleglamientos de los túbulos-T en una población de ellos, puede generar importantes alteraciones en la función cardíaca. En otras palabras, para observar cambios en la función no se requiere que todos los túbulos-T, se encuentren alterados. Finalmente, nosotros no encontramos diferencia en la densidad de los túbulos-T (número de túbulos-T/área) en los ratones PC1 KO de 9-11 semanas de edad en comparación a sus controles (PC1<sup>fl/fl</sup>), lo cual ya había sido descrito por Altamirano y cols. (2019) al evaluar cardiomiocitos ventriculares adultos de ratones PC1 KO mediante microscopía confocal. Sin embargo, en los ratones PC1 KO de 7 a 9 meses de edad, si existe una disminución significativa en la densidad de los túbulos-T vs los PC1<sup>fl/fl</sup>, lo cual posiblemente contribuye al empeoramiento del desempeño de los túbulos-T en el acoplamiento E-C. Estos hallazgos en su conjunto sugieren



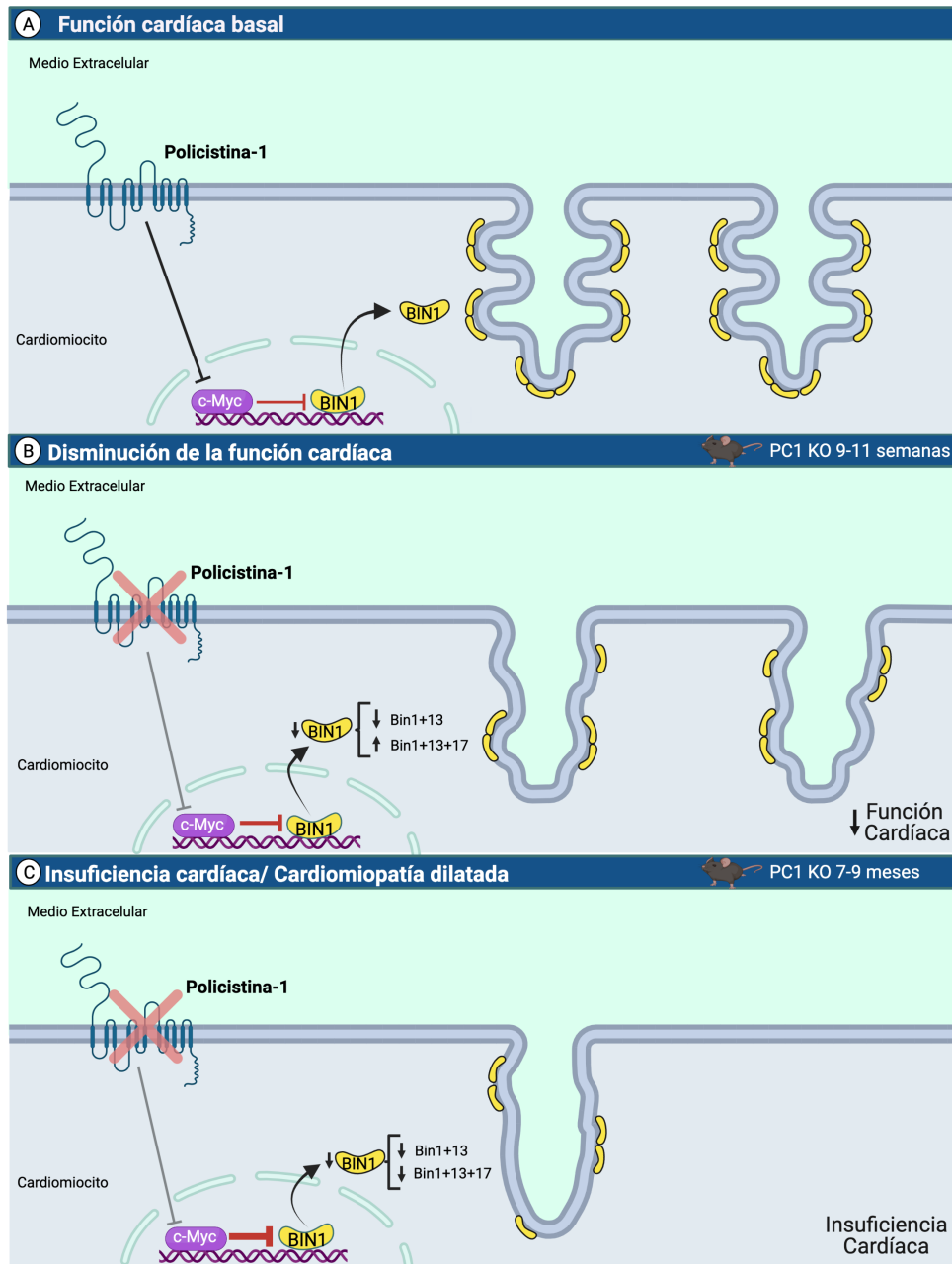
que la ausencia de PC1 en los cardiomiocitos conlleva a un remodelamiento de la ultraestructura de los túbulos-T en la disfunción cardíaca y de manera más severa en la IC.

## 8. Conclusiones

De acuerdo a los hallazgos encontrados en este trabajo se puede concluir:

1. Los animales PC1 KO de 9 a 11 semanas de vida presentan disfunción cardíaca y los de 7 a 9 meses de edad desarrollan una cardiomiopatía dilatada que ocasiona signos de IC y la muerte.
2. La PC1 regula la expresión de las isoformas cardio específicas de BIN1 en los animales PC1 KO de 9 a 11 semanas de vida y de todas las isoformas cardíacas: específicas y ubicuas en los animales PC1 KO de 7 a 9 meses de edad.
3. La PC1 es un regulador negativo de la expresión de c-Myc en el tejido cardíaco, lo que permite la expresión de BIN1 en condiciones basales.
4. La expresión deficiente de la PC1 en el tejido cardíaco ventricular genera alteraciones en la ultraestructura de los túbulos-T y estos cambios se presentan antes de que aparezcan los signos de IC.

**Graphical Abstract. Policistina-1 regula la expresión de BIN1 en cardiomiocitos y mantiene la ultraestructura de los túbulos-T.**



**Figura 31.** A. La PC1 regula negativamente a c-Myc, lo que produce que c-Myc disminuya su regulación negativa sobre BIN1, permitiendo la expresión de BIN1 y su localización en la membrana, contribuyendo a la mantención de la ultraestructura de los túbulos-T. B. La disminución de PC1 en ratones de 9-11 semanas de edad genera pérdida de la inhibición sobre c-Myc, por lo tanto, c-Myc inhibe la expresión BIN1, alterando la ultraestructura de los túbulos-T. C. La disminución de la PC1 en ratones de 7-9 meses de edad, además de la pérdida de la inhibición de c-Myc sobre BIN1 y la alteración de la ultraestructura de los túbulos-T, conlleva a la pérdida de éstos.

## 9. Referencias

1. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Bohm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2021;42(36):3599-726.
2. Roger VL. Epidemiology of Heart Failure. *Circulation Research*. 2021;128(10):1421-34.
3. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Jr., Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(16):e147-239.
4. Writing C, Maddox TM, Januzzi JL, Jr., Allen LA, Breathett K, Butler J, et al. 2021 Update to the 2017 ACC Expert Consensus Decision Pathway for Optimization of Heart Failure Treatment: Answers to 10 Pivotal Issues About Heart Failure With Reduced Ejection Fraction: A Report of the American College of Cardiology Solution Set Oversight Committee. *J Am Coll Cardiol*. 2021;77(6):772-810.
5. Eisner DA, Caldwell JL, Kistamas K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ Res*. 2017;121(2):181-95.
6. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198-205.
7. Guo A, Zhang C, Wei S, Chen B, Song LS. Emerging mechanisms of T-tubule remodelling in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2013;98(2):204-15.
8. Heinzel FR, Bito V, Biesmans L, Wu M, Detre E, von Wegner F, et al. Remodeling of T-tubules and reduced synchrony of Ca<sup>2+</sup> release in myocytes from chronically ischemic myocardium. *Circ Res*. 2008;102(3):338-46.
9. Louch WE, Mork HK, Sexton J, Stromme TA, Laake P, Sjaastad I, et al. T-tubule disorganization and reduced synchrony of Ca<sup>2+</sup> release in murine cardiomyocytes following myocardial infarction. *J Physiol*. 2006;574(Pt 2):519-33.
10. Song LS, Sobie EA, McCulle S, Lederer WJ, Balke CW, Cheng H. Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(11):4305-10.
11. Friedrich O, Wagner S, Battle AR, Schurmann S, Martinac B. Mechano-regulation of the beating heart at the cellular level--mechanosensitive channels in normal and diseased heart. *Prog Biophys Mol Biol*. 2012;110(2-3):226-38.
12. Schonleitner P, Schotten U, Antoons G. Mechanosensitivity of microdomain calcium signalling in the heart. *Prog Biophys Mol Biol*. 2017;130(Pt B):288-301.
13. Lyon RC, Zanella F, Omens JH, Sheikh F. Mechanotransduction in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*. 2015;116(8):1462-76.
14. Kresh JY, Chopra A. Intercellular and extracellular mechanotransduction in cardiac myocytes. *Pflugers Arch*. 2011;462(1):75-87.
15. Lammerding J, Kamm RD, Lee RT. Mechanotransduction in cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1015:53-70.
16. Dalagiorgou G, Basdra EK, Papavassiliou AG. Polycystin-1: function as a mechanosensor. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(10):1610-3.
17. Boulter C, Mulroy S, Webb S, Fleming S, Brindle K, Sandford R. Cardiovascular, skeletal, and renal defects in mice with a targeted disruption of the Pkd1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(21):12174-9.
18. Zhou J. Polycystins and Primary Cilia: Primers for Cell Cycle Progression. *Annual Review of Physiology*. 2009;71(1):83-113.
19. Villalobos E, Criollo A, Schiattarella GG, Altamirano F, French KM, May HI, et al. Fibroblast Primary Cilia Are Required for Cardiac Fibrosis. *Circulation*. 2019;139(20):2342-57.

20. Pedrozo Z, Criollo A, Battiprolu PK, Morales CR, Contreras-Ferrat A, Fernandez C, et al. Polycystin-1 Is a Cardiomyocyte Mechanosensor That Governs L-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Protein Stability. *Circulation*. 2015;131(24):2131-42.
21. Altamirano F, Schiattarella GG, French KM, Kim SY, Engelberger F, Kyrychenko S, et al. Polycystin-1 Assembles With Kv Channels to Govern Cardiomyocyte Repolarization and Contractility. *Circulation*. 2019;140(11):921-36.
22. Cordova-Casanova A, Olmedo I, Riquelme JA, Barrientos G, Sanchez G, Gillette TG, et al. Mechanical stretch increases L-type calcium channel stability in cardiomyocytes through a polycystin-1/AKT-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2018;1865(2):289-96.
23. Wei S, Guo A, Chen B, Kutschke W, Xie YP, Zimmerman K, et al. T-tubule remodeling during transition from hypertrophy to heart failure. *Circ Res*. 2010;107(4):520-31.
24. Hong T, Yang H, Zhang SS, Cho HC, Kalashnikova M, Sun B, et al. Cardiac BIN1 folds T-tubule membrane, controlling ion flux and limiting arrhythmia. *Nat Med*. 2014;20(6):624-32.
25. Hong T, Shaw RM. Cardiac T-Tubule Microanatomy and Function. *Physiol Rev*. 2017;97(1):227-52.
26. Walden AP, Dibb KM, Trafford AW. Differences in intracellular calcium homeostasis between atrial and ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46(4):463-73.
27. Manfra O, Frisk M, Louch WE. Regulation of Cardiomyocyte T-Tubular Structure: Opportunities for Therapy. *Curr Heart Fail Rep*. 2017;14(3):167-78.
28. Jones PP, MacQuaide N, Louch WE. Dyadic Plasticity in Cardiomyocytes. *Frontiers in Physiology*. 2018;9(1773).
29. Seki S, Nagashima M, Yamada Y, Tsutsuura M, Kobayashi T, Namiki A, et al. Fetal and postnatal development of Ca<sup>2+</sup> transients and Ca<sup>2+</sup> sparks in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2003;58(3):535-48.
30. Haddock PS, Coetzee WA, Cho E, Porter L, Katoh H, Bers DM, et al. Subcellular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> gradients during excitation-contraction coupling in newborn rabbit ventricular myocytes. *Circ Res*. 1999;85(5):415-27.
31. Setterberg IE, Le C, Frisk M, Li J, Louch WE. The Physiology and Pathophysiology of T-Tubules in the Heart. *Front Physiol*. 2021;12:718404.
32. Fu Y, Hong T. BIN1 regulates dynamic t-tubule membrane. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(7 Pt B):1839-47.
33. Laury-Kleintop LD, Mulgrew JR, Heletz I, Nedelcoviciu RA, Chang MY, Harris DM, et al. Cardiac-specific disruption of Bin1 in mice enables a model of stress- and age-associated dilated cardiomyopathy. *J Cell Biochem*. 2015;116(11):2541-51.
34. Hong TT, Smyth JW, Gao D, Chu KY, Vogan JM, Fong TS, et al. BIN1 localizes the L-type calcium channel to cardiac T-tubules. *PLoS Biol*. 2010;8(2):e1000312.
35. Caldwell JL, Smith CE, Taylor RF, Kitmitto A, Eisner DA, Dibb KM, et al. Dependence of cardiac transverse tubules on the BAR domain protein amphiphysin II (BIN-1). *Circ Res*. 2014;115(12):986-96.
36. Frost A, Unger VM, De Camilli P. The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell*. 2009;137(2):191-6.
37. DePinho RA, Schreiber-Agus N, Alt FW. myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res*. 1991;57:1-46.
38. Prokic I, Cowling BS, Laporte J. Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92(5):453-63.
39. Frost A, Perera R, Roux A, Spasov K, Destaing O, Egelman EH, et al. Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains. *Cell*. 2008;132(5):807-17.
40. De La Mata A, Tajada S, O'Dwyer S, Matsumoto C, Dixon RE, Hariharan N, et al. BIN1 Induces the Formation of T-Tubules and Adult-Like Ca<sup>2+</sup> Release Units in Developing Cardiomyocytes. *Stem Cells*. 2019;37(1):54-64.

41. Hong TT, Smyth JW, Chu KY, Vogan JM, Fong TS, Jensen BC, et al. BIN1 is reduced and Cav1.2 trafficking is impaired in human failing cardiomyocytes. *Heart Rhythm*. 2012;9(5):812-20.
42. Lundgaard GL, Daniels NE, Pyndiah S, Cassimere EK, Ahmed KM, Rodrigue A, et al. Identification of a novel effector domain of BIN1 for cancer suppression. *J Cell Biochem*. 2011;112(10):2992-3001.
43. Wang J, Jia Y, Zhao S, Zhang X, Wang X, Han X, et al. BIN1 reverses PD-L1-mediated immune escape by inactivating the c-MYC and EGFR/MAPK signaling pathways in non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2017;36(45):6235-43.
44. Andresen C, Helander S, Lemak A, Fares C, Csizmok V, Carlsson J, et al. Transient structure and dynamics in the disordered c-Myc transactivation domain affect Bin1 binding. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(13):6353-66.
45. Hou N, Ye B, Li X, Margulies KB, Xu H, Wang X, et al. Transcription Factor 7-like 2 Mediates Canonical Wnt/beta-Catenin Signaling and c-Myc Upregulation in Heart Failure. *Circ Heart Fail*. 2016;9(6).
46. Lee HG, Chen Q, Wolfram JA, Richardson SL, Liner A, Siedlak SL, et al. Cell cycle re-entry and mitochondrial defects in myc-mediated hypertrophic cardiomyopathy and heart failure. *PLoS One*. 2009;4(9):e7172.
47. Trudel M. c-Myc Signalling in the Genetic Mechanism of Polycystic Kidney Disease. In: Li X, editor. *Polycystic Kidney Disease*. Brisbane (AU)2015.
48. Parrot C, Kurbegovic A, Yao G, Couillard M, Cote O, Trudel M. c-Myc is a regulator of the PKD1 gene and PC1-induced pathogenesis. *Hum Mol Genet*. 2019;28(5):751-63.
49. Chebib FT, Hogan MC, El-Zoghby ZM, Irazabal MV, Senum SR, Heyer CM, et al. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Patients May Be Predisposed to Various Cardiomyopathies. *Kidney Int Rep*. 2017;2(5):913-23.
50. Miura A, Kondo H, Yamamoto T, Okumura Y, Nishio H. Sudden Unexpected Death of Infantile Dilated Cardiomyopathy with JPH2 and PKD1 Gene Variants. *Int Heart J*. 2020;61(5):1079-83.
51. Halliday BP, Cleland JGF, Goldberger JJ, Prasad SK. Personalizing Risk Stratification for Sudden Death in Dilated Cardiomyopathy: The Past, Present, and Future. *Circulation*. 2017;136(2):215-31.
52. Japp AG, Gulati A, Cook SA, Cowie MR, Prasad SK. The Diagnosis and Evaluation of Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(25):2996-3010.
53. Akhtar M, Elliott PM. Risk Stratification for Sudden Cardiac Death in Non-Ischaemic Dilated Cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rep*. 2019;21(12):155.
54. Ramirez-Sagredo A, Quiroga C, Garrido-Moreno V, Lopez-Crisosto C, Leiva-Navarrete S, Norambuena-Soto I, et al. Polycystin-1 regulates cardiomyocyte mitophagy. *FASEB J*. 2021;35(8):e21796.
55. Wu G, Tian X, Nishimura S, Markowitz GS, D'Agati V, Park JH, et al. Trans-heterozygous Pkd1 and Pkd2 mutations modify expression of polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet*. 2002;11(16):1845-54.
56. Lipsett DB, Frisk M, Aronsen JM, Norden ES, Buonarati OR, Cataliotti A, et al. Cardiomyocyte substructure reverts to an immature phenotype during heart failure. *J Physiol*. 2019;597(7):1833-53.
57. Liu Y, Zhou K, Li J, Agvanian S, Caldaruse AM, Shaw S, et al. In Mice Subjected to Chronic Stress, Exogenous cBIN1 Preserves Calcium-Handling Machinery and Cardiac Function. *JACC Basic Transl Sci*. 2020;5(6):561-78.
58. Li J, Agvanian S, Zhou K, Shaw RM, Hong T. Exogenous Cardiac Bridging Integrator 1 Benefits Mouse Hearts With Pre-existing Pressure Overload-Induced Heart Failure. *Front Physiol*. 2020;11:708.

59. Fu Y, Shaw SA, Naami R, Vuong CL, Basheer WA, Guo X, et al. Isoproterenol Promotes Rapid Ryanodine Receptor Movement to Bridging Integrator 1 (BIN1)-Organized Dyads. *Circulation*. 2016;133(4):388-97.
60. Liu Y, Zhou K, Li J, Agvanian S, Caldaruse A-M, Shaw S, et al. In Mice Subjected to Chronic Stress, Exogenous cBIN1 Preserves Calcium-Handling Machinery and Cardiac Function. *JACC: Basic to Translational Science*. 2020;5(6):561-78.
61. Lee EJ, Seo E, Kim JW, Nam SA, Lee JY, Jun J, et al. TAZ/Wnt-beta-catenin/c-MYC axis regulates cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(46):29001-12.
62. Cai J, Song X, Wang W, Watnick T, Pei Y, Qian F, et al. A RhoA-YAP-c-Myc signaling axis promotes the development of polycystic kidney disease. *Genes Dev*. 2018;32(11-12):781-93.
63. Caggiano C, Pieraccioli M, Panzeri V, Sette C, Bielli P. c-MYC empowers transcription and productive splicing of the oncogenic splicing factor Sam68 in cancer. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(12):6160-71.
64. Peng N, Li J, He J, Shi X, Huang H, Mo Y, et al. c-Myc-mediated SNRPB upregulation functions as an oncogene in hepatocellular carcinoma. *Cell Biol Int*. 2020;44(5):1103-11.
65. Yu L, Kim J, Jiang L, Feng B, Ying Y, Ji KY, et al. MTR4 drives liver tumorigenesis by promoting cancer metabolic switch through alternative splicing. *Nat Commun*. 2020;11(1):708.
66. Pinali C, Malik N, Davenport JB, Allan LJ, Murfitt L, Iqbal MM, et al. Post-myocardial infarction t-tubules form enlarged branched structures with dysregulation of junctophilin-2 and bridging integrator 1 (BIN-1). *Journal of the American Heart Association*. 2017;6(5):e004834.
67. Watson SA, Perbellini F, Terracciano CM. Cardiac t-tubules: where structural plasticity meets functional adaptation. *Cardiovasc Res*. 2016;112(1):423-5.

## 10. Asistencia a congresos y publicaciones generadas

Participé en modalidad póster en el:

- AHA Basic Cardiovascular Sciences 2021. Realizado de manera virtual durante el 23 y 25 de agosto, 2021. "**Polycystin-1 regulates cardiac BIN1 expression through c-myc and T-tubule remodeling**". Este trabajo recibió el reconocimiento: "2021 Paul Dudley White International Scholar", el cual reconoce a los autores que contribuyeron al mejor resumen aceptado clasificado de cada país.
- I Congreso de estudiantes de posgrado del campus Dra. Eloísa Díaz, Universidad de Chile. Realizado de manera virtual durante el 10 y 11 de diciembre, 2020. Obtuve el 1er puesto en la categoría de póster. **Rol de la Policistina-1 en la regulación de BIN1 y el desarrollo de la insuficiencia cardíaca.**
- XXXIV Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas (SCHCF) llevada a cabo el 8 al 11 de septiembre de 2019 en el Hotel Santa Cruz de la ciudad de Santa Cruz, Valle de Colchagua, Región de O'Higgins, Chile.

Participé en modalidad ponencia oral en el:

- XXXVI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas. Realizada de manera virtual durante el 29 de noviembre al 3 de diciembre, 2021. Participé en el simposio de Fisiólogos Jóvenes, con la presentación oral titulada: "Policistina 1 regula la expresión de BIN1 y el remodelamiento de los túbulos transversos en los cardiomiocitos"
- Annual Meeting ISHR-Latinoamerica 2021. Realizada de manera virtual durante el 22 y 26 de noviembre, 2021. Participé con la ponencia oral titulada: "BIN1 como marcador de disfunción cardíaca en un modelo murino preclínico"

### 10.1 Publicaciones

"Policistina-1 protege a los cardiomiocitos de la necrosis inducida por estrés mecánico". Cristian Espinoza, **Magda C. Díaz**, Magdalena González, Ivonne Olmedo, Zully Pedrozo. Rev Chil Cardiol, **2019**.

"Inhibition of the proteasome preserves Mitofusin-2 and mitochondrial integrity, protecting cardiomyocytes during ischemia-reperfusion injury". Olmedo I, Pino G, Riquelme JA, Aranguiz P, **Díaz MC**, López-Crisosto C, Lavandero S, Donoso P, Pedrozo Z\*, Sánchez G\*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. **2019**.



“Does Peer Reviewing for COVID-19-Related Papers Still Work?” Octavio Orellana-Serradell, **Magda C. Díaz**, María Fernanda González, Myriam Gutiérrez, Daniela Herrera, Daniela Jara, Diego Maureira, Jenny L. Ruiz-Fuentes, Sofía Sanhueza and Lisette Leyton; el cual fue publicado en la revista *Frontiers in Research Metrics*, **2020**.

“Extracellular Vesicles as Mediators of Cancer Disease and as Nanosystems in Theranostic Applications”. Burgos-Ravanel, R.; Campos, A.; **Díaz-Vesga, M.C.**; González, M.F.; León, D.; Lobos-González, L.; Leyton, L.; Kogan, M.J.; Quest, A.F.G.. *Cancers* **2021**.

“Polycystin-1 regulates cardiomyocyte mitophagy”. Ramírez-Sagredo A, Quiroga C, Garrido-Moreno V, López-Crisosto C, Leiva-Navarrete S, Norambuena-Soto I, Ortiz-Quintero J, **Díaz-Vesga MC**, Perez W, Hendrickson T, Parra V, Pedrozo Z, Altamirano F, Chiong M, Lavandero S. *FASEB J.* **2021**.

"Exploring Functional Differences between the Right and Left Ventricles to Better Understand Right Ventricular Dysfunction". Judith Bernal-Ramirez, **Magda C. Díaz-Vesga\***, Matias Talamilla, Andrea Méndez, Clara Quiroga, Javier A. Garza-Cervantes, Anay Lázaro-Alfaro, Carlos Jerjes-Sanchez, Mauricio Henríquez, Gerardo García-Rivas, Zully Pedrozo. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. **2021**. \*comparto primera autoría junto con Bernal-Ramirez.

“Potential Therapies to Protect the Aging Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury”. **Díaz-Vesga MC**, Zúñiga-Cuevas Ú, Ramírez-Reyes A, Herrera-Zelada N, Palomo I, Bravo-Sagua R, Riquelme JA. *Front Cardiovasc Med.* **2021**

“Mecanosensores en el cambio de fenotipo de la musculatura lisa vascular”. Catalina Nachtigall, Natalia Olivares, Paula Fierro, Bruno Manríquez, Antonia Rojas, Magdalena González, **Magda C. Díaz-Vesga**, Zully Pedrozo. *Rev Chil Cardiol*, **2021**.

Santiago, a 17 de mayo de 2018

Certificado n°: **18154-MED-UCH**

## CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo número **CBA 0997 FMUCH** del Proyecto de Investigación titulado: “**The role of Polycystin-1 in the development of heart failure. T-tubule system regulation and c-MyC dependent BIN-1 expression**”, de la Investigadora Responsable **Dra. Zully Rocío E. Pedrozo Cibils**, del Laboratorio de Mecanotransducción en la Fisiopatología Cardíaca, Programa Disciplinario de Fisiología y Biofísica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

La Dra. Pedrozo se ha comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de **200** ratones *Mus musculus*, (cepa C57/BL6), provenientes de la Unidad de mantención animal del Centro Fondap ACCDiS (UMA ACCDis), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, desde mayo de 2018 hasta marzo de 2022, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **Fondecyt Regular Nro. 1180613**.

*El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.*



Dr. Cristián Ugaz Ruiz  
Director Ejecutivo  
CICUA - VID  
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla  
Presidente  
CICUA - VID  
Universidad de Chile



## CERTIFICACIÓN

Este Comité certifica que las modificaciones solicitadas por la **Dra. Zully Pedrozo** al Protocolo **CBA # 0997 FMUCH** han sido aprobadas, las cuales consisten en:

- Solicitar el uso de 6 animales adicionales. Dichos animales corresponden a ratones macho, cepa C57BL/6: 3 controles (flox-flox) y 3 knockout para la PC1, todos de 9-12 semanas de vida.
- Cambio del lugar de mantención de los ratones transgénicos, desde la Unidad de mantención de animales del Centro Fondap ACCDiS situado en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, hasta la Unidad de Mantención Animal del Programa de Fisiología y Biofísica (CBA-BIO 030 FMUCH)
- Incorporación de la Srta. Magda Carolina Díaz de profesión kinesióloga, tesista del Doctorado en Ciencias. Su función en el protocolo será el transporte, genotipificación y asistencia durante los experimentos para la obtención de muestras biológicas.

Estas modificaciones no alteran ni contravienen las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales previamente aprobados (Protocolo CBA # 0997 FMUCH).

**Dr. Leandro J. Carreño**  
Presidente

*Comité de Bioética sobre Investigación en Animales*



Santiago, 24 de Agosto de 2020