

Universidad Nacional de La Plata (UNLP)
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Cs. Biológicas

“PARTICIPACIÓN DE LA ENDOTELINA EN LOS EFECTOS DE ANGIOTENSINA II SOBRE EL MIOCARDIO”



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

TESIS DOCTORAL

Raúl Ariel Dulce

Director

Dr. Néstor Gustavo Pérez

Profesor Adjunto de la Cátedra de Fisiología con Física Biológica
Facultad de Ciencias Médicas, UNLP
Investigador Adjunto (CONICET)

Asesora académica

Dra. Ángela Ofelia Grassi de Gende

Ex Prof. Titular de la Cátedra de Fisiología (carrera de Farmacia)
Facultad de ciencias Exactas, UNLP



Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

2007

***A mis padres y a mis hermanos,
a mis abuelos y a Maiti, por ser
para mí las personas más
importantes***

Agradecimientos

A Gustavo por el compromiso asumido en la dirección de mi tesis, por su compañerismo, por sus valiosos consejos, por guiarme y transmitirme sus conocimientos, por su apoyo constante, por su interés en mi aprendizaje, por su confianza, por su opinión sincera y principalmente por su ejemplo.

A Cristina por brindarme su afecto, por ayudarme y aconsejarme, por enseñarme todo lo necesario, por ser un referente moral para mi evolución personal, por su apoyo, por su paciencia y, por su preocupación y esfuerzo permanente en mi progreso.

Al Dr. Cingolani por darme la oportunidad de ingresar al Centro de Investigaciones Cardiovasculares y trabajar en sus proyectos.

A la Dra. Mattiazzi por permitirme continuar el desarrollo de mis trabajos de tesis en este centro y por su buena predisposición cada vez que tuve que acudir a ella.

A Irene, Carolina, Alejandro, Martín, Celeste y Vero por prestarse incondicionalmente en todo momento a ayudarme en cualquier situación o problema y, principalmente por el afecto y “por la onda”.

A la Dra. Chiappe (CHCH) por su enseñanza y por participar activamente en mis trabajos.

A los que colaboraron con mi tesis, Verónica, Irene, Carolina, Cecilia y Chichita.

A todos los integrantes del Centro por estar siempre y con la mejor predisposición, Albita, Leticia, Venosa, Escudero, Claudia, Charly, Matilde, Cecilia Mundiña, Martín Piaggio, Andrés, Julieta, Juliana, Susana, Margarita, Gende, Luciana, Alejandra, Rosana, Magdalena, Miriam, Emanuel, Alicia Rodríguez, Edith y Chachi.

A mi familia por soportarme, por apoyarme incondicionalmente, por confiar en mí y por el amor incondicional.

A Maiti por el amor que me da día a día, porque su sabiduría, su fuerza y su apoyo me dan impulso, y su luz me muestra el camino.

ÍNDICE

INTRODUCCION	1
Aspectos generales sobre la hipertrofia cardíaca	2
Bases celulares y moleculares de la hipertrofia miocárdica	5
Angiotensina II y endotelina	5
Intercambiador sodio/hidrógeno	13
Intercambiador sodio/calcio	14
Estiramiento del miocardio e hipertrofia cardíaca	18
Acoplamiento éxito-contráctil	19
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y METODOS	29
Aspectos generales	30
Estudio de contractilidad en músculo cardíaco aislado	30
Determinación de sodio intracelular por fluorescencia en músculo papilar de gato	31
Determinación de pH intracelular por fluorescencia en músculo papilar de gato	32
Protocolos experimentales	33
Estudios de los efectos pro-hipertróficos de Ang II y ET-1 en cardiomiocitos de ratas recién nacidas	33
Aislamiento de cardiomiocitos	33
Determinación de la concentración intracelular de sodio y calcio por fluorescencia en cardiomiocitos	34
Inducción del modo inverso del intercambiador sodio/calcio	35
Determinación de la velocidad de relajación del transitorio de calcio inducido por pulsos de cafeína	36
Determinación del pH intracelular por fluorescencia en cardiomiocitos	36
Determinación de la actividad del intercambiador sodio/hidrógeno	36

Indice

Estudio de los efectos pro-hipertroficados de angiotensina II y Endotelina-1 sobre cardiomiocitos	37
Incorporación de [³ H]-fenilalanina	37
Medición de la superficie celular	38
Determinación de proteínas por inmunoanálisis "western blot"	38
Aislamiento del ARNm total y RT-PCR en tiempo real	39
Protocolo experimental general	39
Análisis estadístico	40
RESULTADOS	41
Efecto de Angiotensina II y endotelina-1 sobre la contractilidad miocárdica en músculos aislados de ventrículo de gato. Participación de los intercambiadores sodio/hidrógeno y sodio/calcio	42
Hipertrofia inducida por angiotensina II y endotelina-1 en cardiomiocitos	55
Actividad del intercambiador sodio/hidrógeno en cardiomiocitos	60
Concentración de calcio intracelular y actividad del intercambiador sodio/calcio en cardiomiocitos	64
DISCUSION Y CONCLUSIONES	72
Discusión	73
"Cross talk" angiotensina II-endotelina	73
Efecto inotrópico positivo de una dosis baja de angiotensina II. Mecanismo propuesto	74
Hipertrofia cardíaca inducida por una dosis baja de angiotensina II	75
Conclusión final	80
REFERENCIAS	81

INTRODUCCIÓN

Aspectos generales sobre la hipertrofia miocárdica

El corazón es un órgano vital cuya función es promover la circulación de la sangre a través del sistema circulatorio. Para cumplir con esta función el tejido cardíaco cuenta con células musculares estriadas altamente diferenciadas denominadas miocitos cardíacos, las cuales son capaces de desarrollar fuerza contráctil en forma organizada. Los miocitos cardíacos representan ~30% del número total de células cardíacas, pero dado su gran tamaño constituyen ~76% del volumen del órgano. Además de miocitos, el tejido cardíaco cuenta con otros tipos celulares, entre los que se encuentran células endoteliales endocárdicas y vasculares, musculares lisas, fibroblastos, macrófagos, células especializadas en la conducción de estímulos y células con función endocrina, las que junto con el tejido intersticial representan el 24% restante del volumen del órgano (1).

Resulta muy interesante, que a pesar de que los miocitos son células altamente diferenciadas que pierden su capacidad de proliferar muy tempranamente luego del nacimiento (2, 3), son capaces de responder a estímulos externos que promuevan su crecimiento. Diversos estímulos entre los que se cuentan cambios en las cargas hemodinámicas y factores humorales promueven el aumento del tamaño celular a expensas de la formación o agregado de sarcómeros a la maquinaria contráctil, sin incrementar el número de células. De esta manera el miocito puede crecer tanto en largo como en ancho, lo cual se denomina hipertrofia cardíaca (HC).

La eutrofia cardíaca postnatal normal como consecuencia de una redistribución hemodinámica (luego de la eliminación de la circulación umbilical, cierre del foramen oval y cierre del conducto arterioso) y la HC fisiológica resultante del condicionamiento por ejercicio físico, son consideradas formas de crecimiento cardíaco adaptativo. Sin embargo, cuando aparece un aumento anormal de la carga hemodinámica, se induce el crecimiento de la célula cardíaca y por ende el aumento de tamaño de toda la masa ventricular en respuesta a la mayor demanda contráctil, proceso que se considera una variante patológica de HC.

Aunque inicialmente la HC fue considerada una respuesta adaptativa beneficiosa del corazón frente a un elevado estrés biomecánico, actualmente se acepta que en las situaciones donde existe una actividad física de alta exigencia, la capacidad del miocardio para crecer en respuesta a las demandas hemodinámicas sería una característica favorable, mientras que en aquellos casos donde la hipertrofia está asociada a hipertensión, estenosis, remodelamiento post-infarto, mutaciones genéticas que afecten proteínas sarcoméricas o del citoesqueleto, etc., sería una mala adaptación que conduciría a una disfunción cardíaca progresiva, insuficiencia cardíaca y muerte súbita (4, 5).

En el presente trabajo se tratan aspectos relacionados a la HC patológica de la cual se describirán seguidamente algunas características generales. Existen dos patrones básicos de HC que dependen del estímulo que la dispara: concéntrica y excéntrica. La HC concéntrica se caracteriza por la incorporación de sarcómeros en paralelo (al menos predominantemente) con un consecuente crecimiento en ancho del miocito, generalmente asociada a estímulos tales como sobrecarga crónica de presión (hipertensión arterial) o válvulas cardíacas estenóticas. La HC excéntrica se caracteriza por el agregado de sarcómeros en serie lo cual induce un aumento en la longitud del miocito y se encuentra frecuentemente asociada a la sobrecarga de volumen como ocurre cuando hay válvulas regurgitantes.

De modo general, se podría decir que la respuesta hipertrófica o remodelamiento hipertrófico, es el resultado de la estimulación de múltiples vías de señalamiento que alteran la transcripción génica (6, 7) promoviendo modificaciones a nivel celular y molecular que se manifiestan mediante una serie de cambios morfológicos y funcionales. En los últimos años, el estudio del proceso de desarrollo de HC patológica ha sido motivo de numerosos trabajos de investigación, a pesar de lo cual aún no se lo comprende plenamente. Se sabe que la respuesta hipertrófica involucra la alteración de genes que codifican para proteínas involucradas en la homeostasis del calcio (Ca^{+2}) y del sodio (Na^{+}) así como el aumento de los niveles de óxido nítrico (NO) y péptidos

natriuréticos (8-11). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que una de las características más notorias de la HC es la reexpresión de genes fetales los cuales se constituyen de este modo en marcadores consistentes de HC (12).

Una amplia variedad de factores, algunos de los cuales son producidos por el corazón mismo, han sido implicados en la patogénesis de la HC (13). Péptidos vasoactivos como angiotensina II (Ang II) o endotelina (ET) han sido involucrados en la respuesta hipertrófica a la sobrecarga hemodinámica mediante mecanismos autocrinos/paracrinos (14-17). Resulta interesante que un reconocido blanco de acción de estos péptidos es el intercambiador $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ (NHE) (18, 19), mecanismo celular alcalinizante que ha sido repetidamente vinculado al desarrollo de HC independientemente de su etiología (18-23). En tal sentido, De la Sierra y colaboradores encontraron que el NHE estaba hiperactivo en eritrocitos de pacientes con hipertrofia ventricular izquierda (24) y que la hiperactividad se correlacionaba muy bien con el nivel de hipertrofia y no así con los valores de presión arterial. Por otra parte se ha demostrado que los corazones hipertróficos de ratas espontáneamente hipertensas tienen aumentada la actividad del NHE (25, 26) y, en concordancia con los resultados de De la Sierra, en estos animales es posible corregir la HC por inhibición del NHE sin reducir significativamente los valores de presión arterial (21, 27, 28).

Un conocido segundo mensajero en la transducción de una extensa cantidad de señales intracelulares involucradas en el crecimiento celular es el Ca^{+2} . Zhu y colaboradores (29) demostraron que la inducción de hipertrofia por ET-1 en cardiomiocitos requiere la activación de rutas dependientes de Ca^{+2} -calmodulina quinasa II (CaMKII) y calcineurina (fosfatasa, ver figura 3) posteriores al aumento de Ca^{+2} . A pesar de que el aumento de la concentración de Ca^{+2} intracelular ($[\text{Ca}^{+2}]_i$) ha sido propuesto como mediador de los efectos hipertróficos de ET (29), los trabajos no describen con claridad las posibles causas del aumento de Ca^{+2} .

De todo lo anterior se desprende que a pesar de que las causas del desarrollo de HC han sido motivo de un gran número de trabajos de investigación, todavía

queda mucho camino por recorrer en cuanto a la identificación de las vías de señalización. El esclarecimiento de las señales intracelulares que provocan la HC podría resultar de fundamental importancia para el desarrollo futuro de estrategias preventivas y/o terapéuticas para su control.

Bases celulares y moleculares de la hipertrofia miocárdica

Angiotensina II y Endotelina

La Ang II es un octapéptido que, además de poseer un potente efecto vasoconstrictor, produce numerosos efectos sobre otros tejidos. En el miocardio produce aumento del inotropismo y de la frecuencia de contracción, estimulación de la síntesis proteica e hipertrofia miocítica, y estimulación de la proliferación de fibroblastos y producción de colágeno (30). Si bien originalmente el sistema renina-angiotensina (SRA) fue descrito como un sistema hormonal general (31), actualmente se conoce la existencia de SRA locales capaces de ejercer función moduladora en diversos tejidos incluido el miocardio (32). Al respecto cabe señalar que varios de los componentes del SRA fueron encontrados en gran cantidad de tejidos y la síntesis local de Ang II se ha demostrado en órganos aislados (33).

La forma clásica general descrita en la década de 1960, propone que en respuesta a la disminución de la presión arterial o a la disminución del Na^+ extracelular (Na^+_e) a nivel sistémico, las células yuxtaglomerulares renales liberan renina al plasma (34). Esta proteasa ejerce su acción sobre el angiotensinógeno, un glucopolipéptido circulante de 14 aminoácidos (aa) perteneciente a la familia de las α -2-globulinas y sintetizado principalmente por el hígado (figura 1) generando un producto de 10 aa, conocido como angiotensina I (Ang I). Luego la enzima convertidora de angiotensina (ECA), presente principalmente en pulmón, cliva la Ang I produciendo el octapéptido Ang II. Ésta tiene una vida media muy corta (aproximadamente una hora) ya que es degradada por distintas peptidasas presentes en los tejidos dando como producto la angiotensina III de mucho menor actividad (35). En el músculo cardíaco se ha comprobado la expresión de RNA mensajeros (RNAm) para el

angiotensinógeno, la enzima convertidora de angiotensina y receptores de Ang II (36-38) sustentando la posibilidad de una síntesis local del péptido. En consonancia con esto, las concentraciones de Ang I y Ang II medidas en el intersticio miocárdico se hallan en el rango nanomolar, valores que superan en aproximadamente 100 veces la concentración plasmática de ambos péptidos (39-41).

Asimismo, trabajos recientes han demostrado la participación del SRA tisular en el aumento del inotropismo y la hipertrofia, entre otros efectos observados al estirar el miocardio (41-48).

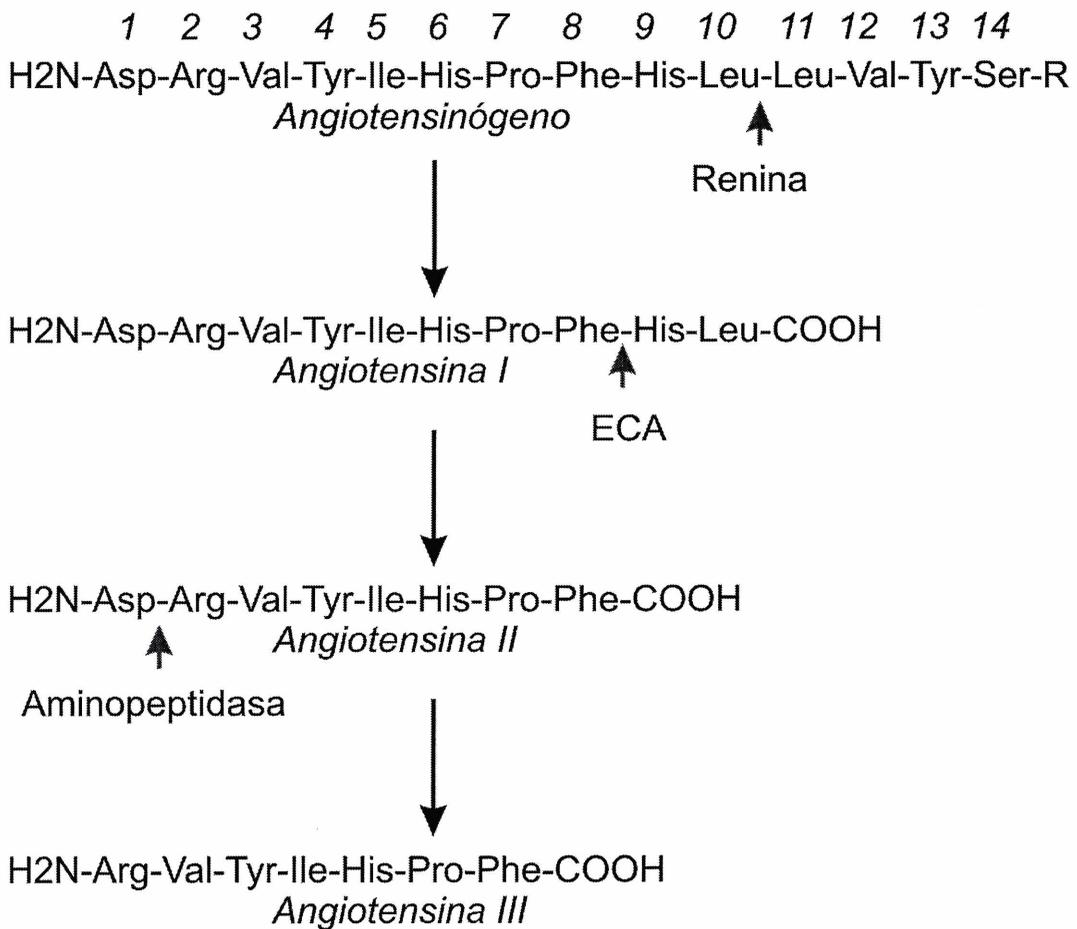


Figura 1: Representación del SRA. Etapas de generación y degradación de Ang II.

Por estudios de unión de ligando (“binding”) se han encontrado dos tipos de receptores (Rc) de Ang II en diferentes tejidos (49): el tipo 1 (AT₁) sensible al bloqueo con losartan (Los) (50) y el tipo 2 (AT₂) que es inhibido por PD123319 (51). Ambos tipos se expresan en el corazón humano y de otras especies como gato, rata, conejo y mono (52, 53). La distribución de los subtipos de Rc cambia según el tejido y la especie que se considere, variando las proporciones relativas de ambos (53-58).

Los Rc AT₁ y AT₂ tienen acciones opuestas en lo que respecta al crecimiento celular (59-61). Ha sido demostrado que la estimulación de los AT₂ media efectos antiproliferativos, proapoptóticos, de diferenciación celular, disminución de la matriz extracelular en el corazón (62, 63), aumenta la producción de óxido nítrico (NO) y disminuye la frecuencia cardiaca (64, 65). Los Rc AT₁, en cambio, favorecen el efecto inotrópico positivo (EIP), vasoconstricción, expresión génica y síntesis proteica que conducen a HC, fibrosis y remodelamiento cardiaco (50, 66-69), constituyendo el inicio de la vía de señalización que se estudia con mayor detalle en este trabajo.

En tal sentido, el Rc AT₁ está compuesto por 359 aa, contiene 7 dominios transmembrana y tiene un 30 % de homología con el Rc AT₂. Ambos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas regulatorias G (RAPG, la cual recibe este nombre por la capacidad de fijar nucleótidos de guanina) especialmente la tipo q (Gq) (70-72). Esta proteína G es un complejo proteico compuesto por 3 subunidades, alfa (α), beta (β) y gama (γ) que intervienen en múltiples caminos de señalamiento intracelulares. La subunidad α tiene el sitio de unión para los nucleótidos de guanina y la actividad GTPasa, y es la determinante del tipo de efecto asociado al Rc (da la denominación al tipo de proteína G). Durante el estado inactivo, una molécula de GDP se encuentra unida al sitio de unión a nucleótidos (73). La unión de Ang II con el Rc AT₁ determina que se active el mecanismo, de esta manera la subunidad α_q sufre un cambio conformacional que causa el reemplazo de GDP por GTP y disociación del trímero (ver mecanismo de acción general en figura 2). Esta subunidad α_q activa la isoforma β de fosfolipasa C (PLC β).

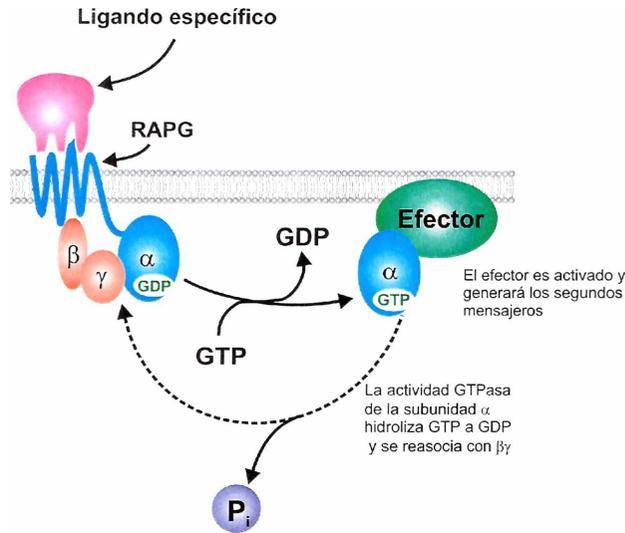


Figura 2: Mecanismo general de acción de receptores asociados a proteína G. La unión del ligando al receptor activa la proteína G, la cual se disocia en el dímero βγ y la subunidad α, a la vez que esta última desplaza el GDP de su sitio para unir GTP. La subunidad α activa, se traslada hasta interactuar con el efector blanco, el cual amplifica la señal sintetizando segundos mensajeros.

La PLC es una enzima que hidroliza fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) para dar inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ puede inducir la liberación de Ca⁺² al citosol desde depósitos intracelulares (74-76). El DAG, que permanece unido a la membrana, es un activador de proteína quinasa C (PKC) de la cual existen varias isoformas, algunas dependientes de Ca⁺² (α, β1, β2) y otras independientes de ese catión (δ, ε y λζ) (72, 77-79).

De esta manera, tanto PKC como IP₃ median muchos de los efectos de Ang II actuando como segundos mensajeros a diferentes niveles intracelulares. PKC puede activar, entre otras vías, quinasas tales como JAK-STATJanus (kinase-signal transducers and activators of transcription) y MAPKs (Mitogen-activated protein Kinases) (ver figura 3, 80-82).

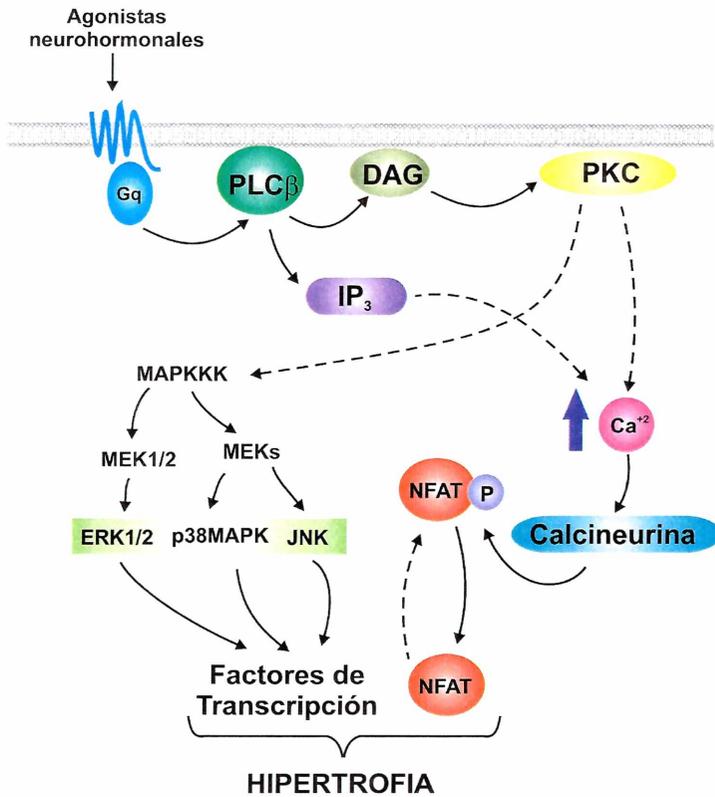


Figura 3: Representación esquemática la vía de señalización que activa la quinasas PKC, la cual promueve aumento de Ca^{+2} y activación de moléculas implicadas en vías de señalización intracelular que modifican la síntesis proteica y la transcripción de genes, procesos que están estrechamente relacionados con el efecto inotrópico y el desarrollo de hipertrofia.

Se ha demostrado recientemente que Ang II puede también activar fosfolipasa A2 (83) y la producción de NO a través de Rcs AT₂ (84).

Los mecanismos disparados por estimulación de los Rc AT₂ son menos conocidos, pero existen evidencias de que a través de la activación de tirosinas fosfatasa, ejercería sus efectos antihipertróficos por oponerse a los efectos de las quinasas antes mencionadas (61, 62, 85).

Numerosas investigaciones apoyan la noción de que varios de los efectos originalmente atribuidos a la acción de la Ang II involucrarían en realidad la participación de ET endógena. En tal sentido se ha demostrado que la administración de Ang II estimula la expresión del ARNm de preproendotelina y la liberación ET en diversas células incluidos los miocitos cardíacos (86, 87). Por otra parte, los efectos de Ang II mediados por ET serían evidentes cuando

la concentración de Ang II es pequeña (del orden nanomolar o inferiores) (88) mientras que cuando su concentración es del orden micromolar se observan los efectos directos de la Ang II (89). Se ha comprobado que el bloqueo de los receptores de ET evita numerosos efectos atribuidos a Ang II tales como el desarrollo de hipertensión provocado por su administración crónica (90), el efecto hipertrófico sobre miocitos cardíacos (44) y la activación del NHE (45, 91) y del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^- \text{Na}^+$ independiente (92).

La ET es un potente péptido vasoconstrictor aislado inicialmente de cultivos de células endoteliales de aorta porcina (93) y se conocen al menos 3 isoformas derivadas de genes diferentes, que dan como resultado final péptidos de 21 aa denominados ET-1, ET-2 y ET-3 (94). Las endotelinas derivan de preproendotelinas (de aproximadamente 212 aa) las cuales son clivadas por una proteasa del tipo de la furina (95, 96) dando las respectivas ET-grandes (o "big-ETs") de 38 aa. Luego son tomadas por una metaloproteasa llamada enzima convertidora de endotelina (ECE) para dar los polipéptidos de 21 aa. Respecto de la ECE, se conocen 3 isoenzimas: ECE-1, ECE-2 y ECE-3. ECE-1 es una proteína de membrana derivada de un solo gen que da 4 isoformas posibles (ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c y ECE-1d) (97, 98). Las 3 isoenzimas se expresan en distintas proporciones según el tejido. Tanto ECE-1 como ECE-2 son más específicas para big-ET1 que ECE-3. ECE-2 es activada preferentemente a bajos pHs y es la única que no se encuentra en la membrana celular (99). ECE-3 fue descrita en microsomas de iris bovino siendo muy específica para big-ET3 (100) (figura 4).

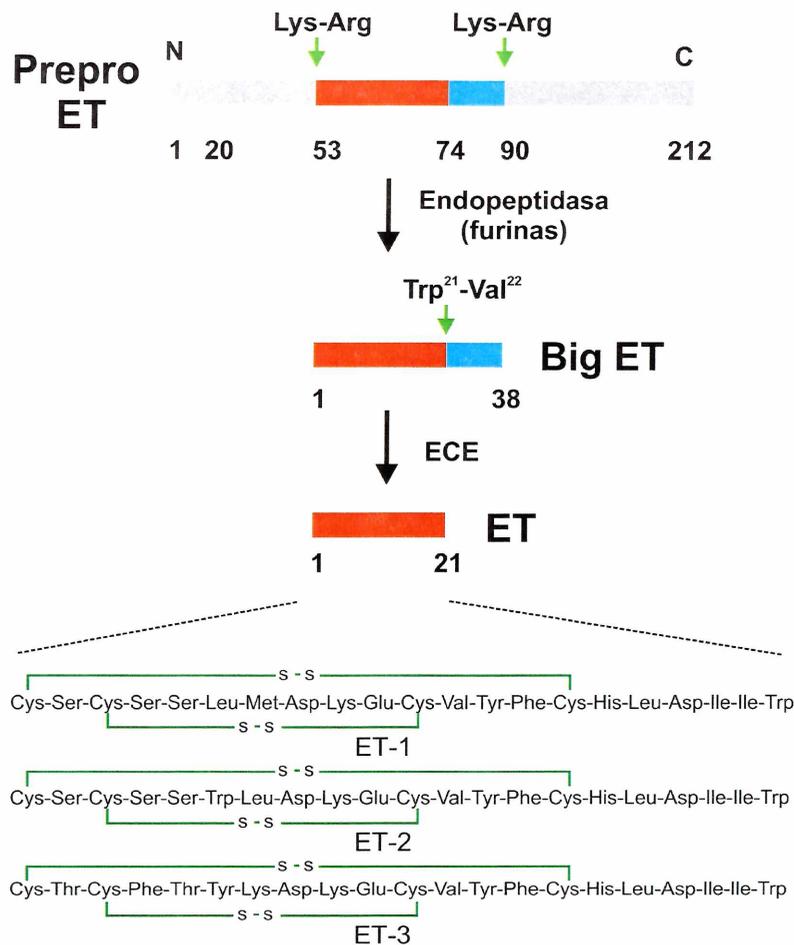


Figura 4: Esquema del procesamiento de la prepro-ET e isoformas de ET.

Los receptores de ET pertenecen también a la familia de receptores acoplados a proteína G. Sus 7 dominios transmembrana están separados por 3 loops intracelulares y 3 extracelulares, sus extremos N-terminal son extracelulares y los C-terminal intracelulares. Inicialmente se identificaron 2 tipos de receptores específicos para ET, ET_A y ET_B, con un 50 % de homología entre ellos y estructura conservada en los mamíferos. Ambos se expresan en una amplia cantidad de tejidos, aunque en proporciones variables según el tipo, y se los ha identificado en el corazón de una gran variedad de especies (101, 102). La afinidad de las diferentes ETs por cada Rc es distinta. ET-1 tiene mayor afinidad que ET-3 por el Rc ET_A, sin embargo, las dos isoformas se unen igualmente al Rc ET_B. ET-2 se une con una afinidad similar a la de ET-1 a ambos Rcs (103). Recientemente se ha descubierto, clonado y caracterizado

un tercer tipo de Rc de ET, llamado ET_C (104) específico para ET-3 y presente en células de varias especies pero no se halla en humanos.

Al igual que los Rcs de Ang II, los de ET se encuentran acoplados a proteína G. Se ha propuesto la existencia de 2 subtipos de Rcs ET_A, ET_{A1} y ET_{A2} con diferente sensibilidad a las diferentes isoformas de ET (105, 106). En forma general, la activación de los ET_A está estrechamente asociada con vasoconstricción y EIP. El mecanismo involucrado es mediante la disociación de la proteína Gq (y/o G₁₁) y ésta, a su vez activa la PLCβ que produce traslocación a la membrana, activación de las PKC y sus consecuentes efectos. También, a través de los Rcs ET_A se activan varias vías de señalización mediadas por quinasas, tal como se mencionó para la acción de Ang II por Rcs AT₁ (ver figura 3).

Por otro lado, hay evidencia de que existen también 2 subtipos de Rcs ET_B, ET_{B1} y ET_{B2}, los cuales se asocian a efectos vasodilatadores (mediados por producción de NO y prostaglandina I₂ en endotelio) y vasoconstrictores (directamente sobre músculo liso) respectivamente (107-113). Es probable que en el efecto contráctil mediado por ET_B esté involucrado el acoplamiento al subtipo de proteína G_{α13} (114).

Las distintas isoformas de ET son producidas en gran variedad de tejidos y tipos celulares. ET-1 se genera en células endoteliales (94, 115), pero también la produce el miocardio, el riñón, el sistema nervioso central y el músculo liso vascular (112). ET-2 es sintetizada en riñón, placenta, intestino, corazón y células endoteliales (117, 118). Finalmente, la ET-3 es producida en grandes cantidades en cerebro y se la encuentra también en miocardio y tracto gastrointestinal (119).

En preparaciones multicelulares de miocardio, las tres ETs tienen efectos inotrópicos positivos de potencias similares (105). A diferencia de ello, en cultivos de células cardíacas aisladas, ET-1 presenta mayor eficacia y potencia en cuanto a su efecto sobre la contractilidad (120).

Intercambiador Na^+/H^+ (NHE)

Como se mencionó antes, un efector común a ambos péptidos, Ang II y ET-1, es el NHE, proteína integral de membrana cuya principal función es contribuir a la regulación del pH_i mediante el intercambio de H^+ intracelulares por Na^+ extracelular, siendo el principal encargado de remover los H^+ producidos durante el metabolismo celular.

Se conocen 9 isoformas del intercambiador con estructuras básicamente similares, nominados correlativamente NHE-1 a NHE-9. De éstas, la isoforma más abundante en tejido cardíaco es la NHE-1, la cual tiene un peso molecular de 91 KDa, 12 dominios transmembrana y presenta 2 sitios de glicosilación en los lazos extracelulares. Ambos extremos, N-terminal y C-terminal son citoplasmáticos. En el extremo C-terminal del NHE-1 hay un sitio de unión a ATP, un sitio receptor para proteínas homólogas a calcineurina (CHP-R), dos sitios de unión para calmodulina (CAM-A y CAM-B) y varios residuos fosforilables (P) que están involucrados en la regulación de la actividad del intercambiador en respuesta a diferentes estímulos (figura 5).

Estudios recientes han revelado que el NHE-1 se encuentra preferentemente en los túbulos T y discos intercalares, y que es escasa su presencia en el sarcolema lateral (121).

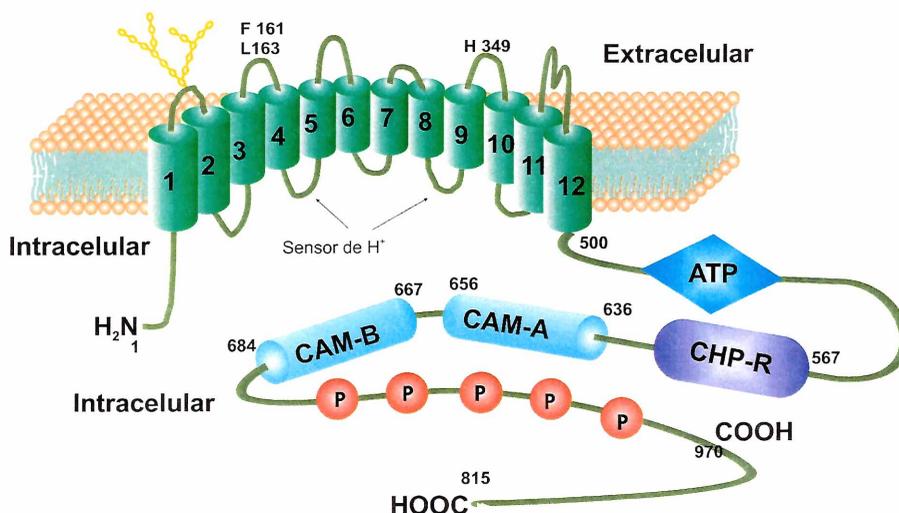


Figura 5: Representación esquemática del NHE.

El transportador se activa frente a cargas ácidas y se detiene al alcanzar valores de pH_i cercanos a 7.2, valor al cual normalmente el flujo neto de protones es casi nulo. Es importante destacar que en la mayoría de las células de mamíferos, incluidos los cardiomiocitos, el pH_i se mantiene entre 7,1 y 7,2, valores que no pueden ser explicados por equilibrio termodinámico para el H^+ a través de la membrana celular. Sin embargo, esta situación se puede mantener gracias a la presencia de mecanismos activos de extrusión de H^+ , entre los que se destaca el NHE-1. Una consecuencia directa de la actividad específica del NHE-1 como regulador del pH_i miocárdico es un ingreso masivo de Na^+ al citosol, un aspecto sumamente significativo para la homeostasis celular. En tal sentido, se ha descrito que aproximadamente entre el 40 y 50 % del Na^+ que ingresa al cardiomiocito en condiciones normales es mediado por el NHE (122, 123), lo cual hace que muchos procesos celulares tales como el metabolismo basal, la homeostasis del Ca^{+2} , la expresión génica, la contractilidad, etc. sean particularmente afectados por modificaciones en la actividad de este intercambiador.

Además de Ang II y ET, otros factores comúnmente asociados a la modulación de la actividad cardiaca como agonistas α_1 y β adrenérgicos modifican la actividad del NHE-1 (124, 125). En líneas generales, los agonistas activarían el intercambio iónico por modificación de la sensibilidad al pH_i del sensor intracelular de H^+ , haciendo que la curva de activación se desplace hacia valores más alcalinos (126).

Intercambiador Na^+/Ca^{+2} (NCX)

Al igual que el NHE, el NCX es una proteína integral de membrana, pero éste promueve el transporte de 3 iones Na^+ por cada Ca^{+2} en direcciones opuestas generando el flujo de una carga neta positiva en cada ciclo y siendo entonces un transportador electrogénico. El NCX está en la membrana plasmática de gran parte de las células de los mamíferos, contribuyendo a mantener la homeostasis del Ca^{+2} . Se han encontrado 3 isoformas (127) derivadas de 3 genes diferentes: NCX1 o tipo cardíaco (128), NCX2 o tipo muscular

esquelético (129) y NCX3 o tipo cerebral (130). El NCX1 es el más ampliamente distribuido, aunque abunda más en tejido cardíaco y cerebral (131).

La expresión del NCX1 ocurre en etapas muy tempranas de la cardiogénesis (132), siendo máxima cerca del nacimiento en mamíferos normales (133) cayendo luego en la vida postnatal, proceso opuesto al que ocurre con otra proteína vinculada al manejo del Ca^{2+} , la SERCA (sarcoplasmic-endoplasmic-reticulum calcium ATPase) cuya expresión aumenta durante la vida postnatal (134-137). Así, en los recién nacidos, la participación del NCX en el acoplamiento éxito-contráctil cardíaco sería más relevante que en los corazones adultos (ver más adelante en “Acoplamiento éxito-contráctil”).

El NCX1 tiene 970 aa y un peso molecular (PM) de 110 KDa (128). Posee 9 segmentos transmembrana, con la porción N-terminal por fuera de la célula, mientras que el extremo C-terminal se encuentra hacia el citoplasma (figura 6) (138-140). Posee además un gran lazo interno hidrofílico (entre los aa 250 y 796) entre los segmentos transmembrana 5 y 6, el cual es importante para la regulación alostérica intracelular por Ca^{+2} o Na^{+} (141, 142).

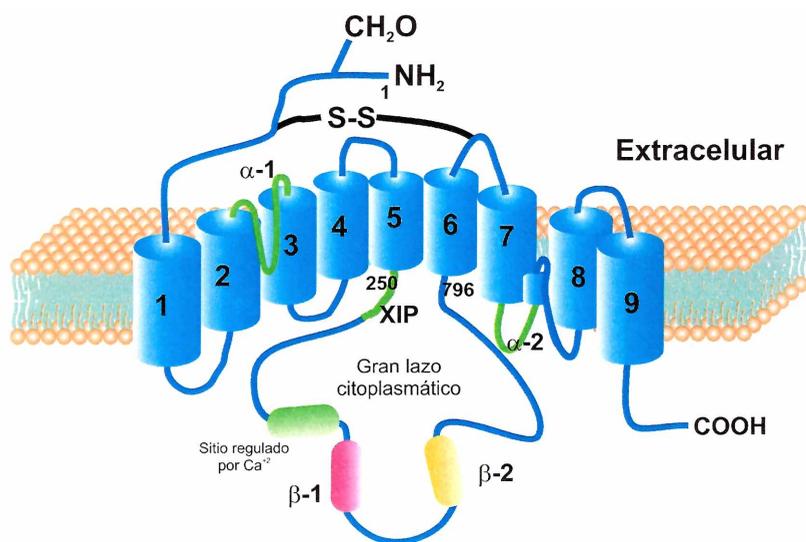


Figura 6: Representación esquemática del NCX.

La función primaria del NCX es el manejo de Ca^{+2} . Bajo condiciones fisiológicas y suponiendo que los gradientes de Na^+ y Ca^{+2} permanecen constantes en el espacio subsarcolemal, podemos estimar que el potencial de inversión del NCX (E_{NCX}) (valor del potencial de membrana que anula el flujo iónico por gradiente de concentraciones a través del intercambiador), es aproximadamente -40 mV que surge de la siguiente ecuación:

$$E_{\text{NCX}} = 3E_{\text{Na}} - 2E_{\text{Ca}}$$

$$E_{\text{Na}} = (RT/F) \ln\{[\text{Na}^+]_e / [\text{Na}^+]_i\} \quad (\text{ecuación 1})$$

$$E_{\text{Ca}} = (RT/2F) \ln\{[\text{Ca}^{+2}]_e / [\text{Ca}^{+2}]_i\}$$

donde los símbolos entre corchetes indican concentración del ión, pudiendo ser intracelular (i) o extracelular (e), E_{Na} y E_{Ca} son los potenciales de equilibrio para el Na^+ y Ca^{+2} respectivamente, R la constante de los gases, T la temperatura absoluta y F la constante de Faraday, considerándose como valores fisiológicos de $[\text{Na}^+]_i$ y $[\text{Na}^+]_e$ 10 y 140 mmol/L respectivamente.

Dado que se trata de un transportador electrogénico, la fuerza impulsora (FI) que actúa sobre el NCX está determinada por la diferencia entre el potencial de membrana (V_m) y el E_{NCX} ($FI = V_m - E_{\text{NCX}}$). Cuando el V_m es igual al E_{NCX} no se registra corriente, pues la FI es cero. A V_m más negativos que el E_{NCX} se ve favorecida la salida de Ca^{+2} y entrada de Na^+ (modo directo o "forward", corriente catiónica hacia adentro o "inward") contribuyendo a la relajación de la célula muscular. Cuando el V_m toma valores más positivos que el E_{NCX} se registran flujos de estos iones en sentidos opuestos, es decir modo inverso o "reverse", corriente catiónica hacia afuera o "outward". El hecho de que durante un potencial de acción miocárdico (PA) el V_m supere el valor teórico de E_{NCX} haría pensar que el modo inverso del NCX (NCX_{inv}) participaría activamente en el ingreso de Ca^{+2} durante el acoplamiento éxito-contráctil. Sin embargo, existe gran controversia respecto de la contribución del NCX_{inv} a la contractilidad basal (143-147) debido a que durante el PA el nivel de Ca^{+2} aumenta, y esto

modifica el E_{NCX} haciéndolo más positivo. De esta manera existe un compromiso entre el aumento del E_{NCX} y del V_m , probablemente impidiendo que dicho PA alcance o supere el E_{NCX} real (ver ecuación de E_{NCX}). Sin embargo ha sido demostrado que bajo ciertas condiciones farmacológicas y/o patológicas, el modo inverso puede cobrar mayor relevancia para la función contráctil (134, 148-151). En la insuficiencia cardíaca por ejemplo se encuentra aumentada la expresión del NCX, supuestamente como un mecanismo compensador para mantener la contractilidad ante la deficiente función del RS, lo que hace pensar que el NCX contribuiría a la entrada de Ca^{+2} al citosol y, de esta manera mantendría la función contráctil (149, 150).

Como ya se dijo, la actividad del NCX es afectada por los iones que transporta. Tanto el Ca^{+2} como el Na^+ modulan la actividad del NCX1 (152, 153). Más aún, ambos modos del intercambiador solo son activos cuando se encuentra Ca^{+2} unido al sitio intracelular de alta afinidad localizado en la parte central del gran lazo citoplasmático (154, 155). Aunque existe controversia, el valor de la constante de afinidad de este sitio ($K_{1/2}$) se encontraría entre 0.022 y 0.4 μM . En presencia de Ca^{+2}_e y de Ca^{+2} en el sitio regulatorio intracelular, altas concentraciones de Na^+ en la superficie citoplasmática activan rápidamente el transporte, seguido por una caída lenta hacia el estado estacionario (152). Esto se conoce como inactivación dependiente de Na^+ (156) y se ha sugerido que ocurre cuando el sitio de transporte está muy cargado con Na^+ (152, 156). La inactivación dependiente de Na^+ está modulada por una gran variedad de factores: es aumentada cuando aumentan los niveles de H^+ intracelulares (bajo pH_i) (152, 157, 158) y es atenuada por concentraciones $\mu\text{molares}$ de Ca^{+2} , milimolares de ATP, o PIP2 (151, 159, 160). Esta inactivación está ausente cuando la superficie intracelular es digerida parcialmente por una enzima proteolítica (141), sugiriendo que el lazo intracelular está involucrado en esta inactivación. Además, el tratamiento del NCX1 con distintos agentes reductores (ditiotreitól y FeSO_3) produce un aumento de su actividad (161) interpretándose como una atenuación de la inactivación dependiente de Na^+ (162).

El aumento de Na^+ intracelular favorece la entrada de Ca^{+2} por el modo inverso y/o deprime su salida por el modo directo, produciéndose una acumulación intracelular de Ca^{+2} que, de mantenerse en forma crónica, podría tener efectos nocivos (163).

Muchos cationes divalentes y trivalentes funcionan como bloqueantes del NCX, como La^{+3} (164) Ni^{+2} (165, 166) y Cd^{+2} (167, 168). Por otra parte el KB-R7943 es un potente y selectivo inhibidor del NCX_{inv} (143, 169, 170).

Estiramiento del miocardio e hipertrofia cardiaca

Se ha demostrado que cuando se estira el músculo cardíaco se produce un aumento de la fuerza de contracción que ocurre en dos fases: una inmediata de desarrollo rápido, seguida de una segunda fase de desarrollo gradual en la que la fuerza aumenta aproximadamente 20-25% más. El primer aumento de fuerza es debido a una mayor respuesta de los miofilamentos al Ca^{+2} , ocurre sin cambios en el incremento transitorio de Ca^{+2}_i (TCa^{+2}_i) que da origen a la contracción (171) y se considera que sería la expresión del mecanismo de Frank-Starling o regulación heterométrica de la contractilidad miocárdica. En cambio, el aumento de fuerza de la segunda fase se acompaña de un aumento del TCa^{+2}_i (45, 171) y sería la causa del efecto Anrep descrito en 1912 (172). Trabajos recientes de nuestro laboratorio han abordado en detalle el estudio de la segunda fase de aumento de fuerza post-estiramiento y han permitido sugerir que el mecanismo que lleva al aumento del TCa^{+2}_i es de naturaleza autocrina-paracrina e involucra la liberación secuencial de Ang II y ET endógenas (173). La Ang II, a través de Rcs AT_1 , provoca la liberación de ET que a su vez activa al intercambiador NHE-1, esto lleva al aumento de la $[\text{Na}^+]_i$, lo cual facilita el funcionamiento del NCX_{inv} promoviendo el ingreso de Ca^{+2} a la célula y el consecuente aumento del TCa^{+2}_i (46, 91).

En el corazón intacto, una sobrecarga hemodinámica sería equivalente a estirar el miocardio. Por lo tanto es razonable pensar que estos mecanismos se pudieran poner en marcha con el consecuente aumento del Ca^{+2}_i íntimamente asociado al desarrollo de HC. La evidencia experimental demuestra que el

estiramiento del miocardio induce hipertrofia cardiomiocítica (14, 15, 174) pero poco se conoce acerca de los mecanismos involucrados. En ambos procesos el estímulo mecánico requiere la integridad de la estructura de ciertas proteínas de membrana y del citoesqueleto (175).

Es importante destacar que la contribución del NHE-1 al aumento secundario de fuerza post-estiramiento es a través del aumento del Na^+_i que se produce, y no por cambios en el pH intracelular (pH_i). En tal sentido, ha sido previamente demostrado que la activación del NHE-1 por Ang II y otros factores de crecimiento se acompaña, en condiciones en las que el buffer fisiológico $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$ está presente, de la activación simultánea del intercambiador aniónico $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE), mecanismo acidificante independiente de Na^+ , lo cual se traduce en la ausencia de cambios significativos de pH_i (92, 176, 177).

En consonancia con el mecanismo autocrino-paracrino propuesto para explicar el aumento del TCa^{+2}_i y del desarrollo de fuerza de la segunda fase, Fujita y Endoh (178) trabajando en miocitos aislados de corazón de conejo, demostraron que la activación del NHE-1 y la subsiguiente inducción del NCX_{inv} participan en el efecto inotrópico positivo de la Ang II. Además, en un trabajo posterior los mismos autores demostraron la participación del NCX_{inv} en la generación del EIP de ET (179). En la misma línea, una comunicación reciente, en miocitos cardíacos de gato, muestra que la Ang II provoca aumento de la corriente producida por el NCX actuando en modo inverso y que este efecto está mediado por ET endógena (180).

Pareciera posible especular que el estiramiento sostenido en el tiempo sería capaz de inducir HC por acción autocrina-paracrina de Ang II/ET sobre el NHE-1 y consecuente modulación del NCX (14).

Acoplamiento éxito-contráctil (AEC)

Se denomina AEC al conjunto de procesos que comienzan con la despolarización de la membrana plasmática y terminan en la contracción muscular (181). Los procesos que se ponen en juego se pueden separar en tres etapas:

1. PA y entrada de Ca^{+2}
2. Liberación de Ca^{+2} inducida por Ca^{+2}
3. Contracción muscular

Frecuentemente se agrega a esta secuencia de procesos, una cuarta etapa que corresponde a la “relajación muscular”, la cual tiene importancia relevante entre los ciclos contráctiles. De esta manera es común que el ciclo completo se denomine “Acoplamiento Excitación-Contracción-Relajación”.

1- PA y entrada de Ca^{+2} :

Cuando el músculo cardiaco es estimulado, se abren canales rápidos de Na^+ , aumentando la permeabilidad al ión, el cual ingresa a la célula despolarizando el sarcolema de los miocitos (182). Esta despolarización se propaga por toda la superficie celular en forma de PA. El PA de miocitos ventriculares cardiacos presenta una meseta (fase 2) de varios milisegundos de duración donde existe un equilibrio transitorio de corrientes polarizantes y despolarizantes. La principal corriente despolarizante en la meseta es la corriente de Ca^{+2} (ICa^{+2}) debida a los canales de Ca^{+2} tipo L (del inglés “long lasting” o larga duración). Se sabe que las células cardiacas tienen al menos dos tipos de canales de Ca^{+2} operados por voltaje (183, 184): los tipo T (rápidos) que se cree que son los responsables de la propiedad de marcapaso de las células cardiacas (185) y los tipo L, responsables de la mayor cantidad de Ca^{+2} que entra a las células a nivel del sarcolema durante la meseta del PA, evento que vincula los fenómenos eléctricos con los mecánicos ya que es necesario para inducir la liberación de Ca^{+2} desde el retículo sarcoplásmico (RS) (figura 7). Los tipo L son inactivados por varios compuestos orgánicos e inorgánicos (dihidropiridinas, fenilalquilaminas, Cd^{+2} , La^{+3} y Mn^{+3}) (183, 186).

Otra vía por la cual podría ingresar Ca^{+2} a la célula durante el AEC es el NCX_{inv} , pero como ya se ha mencionado antes, se discute si este mecanismo es de relevancia en condiciones normales, adquiriendo notable preponderancia cuando mayor es la $[\text{Na}^+]_i$ (168, 187-191).

2- Liberación de Ca^{+2} inducida por Ca^{+2} :

En el músculo cardíaco el principal reservorio de Ca^{+2} es el RS. En el RS se conocen 2 tipos de canales diferentes que liberan Ca^{+2} , llamados receptores de rianodina (RyR) (192, 193) (tienen alta afinidad por el alcaloide rianodina) y receptores de IP_3 (IP3R) (73, 194-195).

El RyR es el más importante en el AEC cardíaco normal, siendo la participación de IP3R en estas condiciones todavía discutida. Los RyR están localizados en la vecindad de lo canales tipo L favorecido por la disposición en díadas del RS y los túbulos T. Luego de la despolarización y entrada de Ca^{+2} se produce un aumento local de la concentración de Ca^{+2} y activación de un RyR o de un pequeño grupo de ellos, lo cual produce elevaciones muy pequeñas y muy localizadas de la $[\text{Ca}^{+2}]$ en el citoplasma, conocidas en inglés como “sparks” (o chispas de Ca) (196). La sumación espacial y temporal de varios de estos sparks produce el TCa^{+2}_i (figura 7).

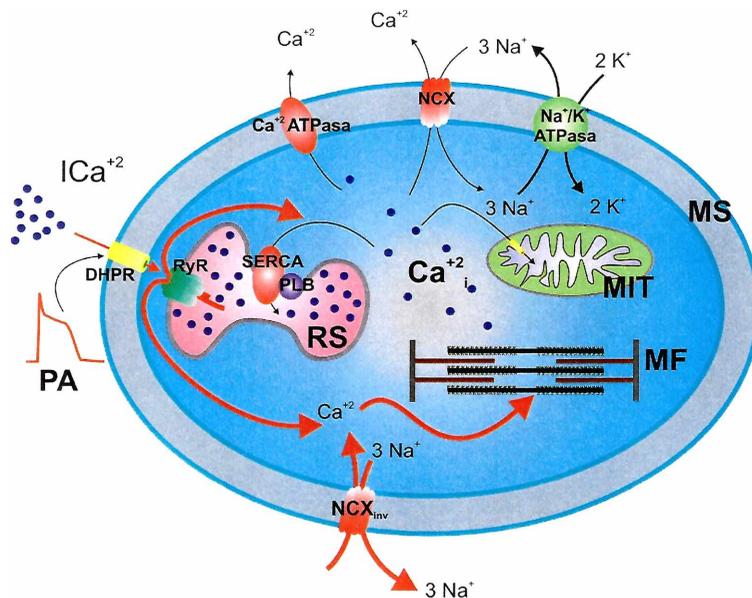


Figura 7: Esquema de las posibles fuentes de aumento del Ca^{+2}_i y fenómeno de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} . Con flechas rojas se indican las principales vías de entrada de Ca^{+2} al citosol, a través de los canales tipo L (DHP), desde el retículo sarcoplásmico (RS) a través de los canales de rianodina (RyR), o a través del NCX_{inv} . Los canales de Ca^{+2} tipo L se encuentran próximos a los de RyR. En respuesta al cambio del potencial de la membrana sarcoplásmica (MS) por la llegada del potencial de acción (PA), se activa una corriente de Ca^{+2} tipo L (ICa^{+2}) y generan un pulso de Ca^{+2} que activa a los receptores de rianodina (RyR) en el retículo sarcoplásmico (RS).

3. Contracción muscular:

Luego de la liberación de Ca^{+2} de RS, el Ca^{+2} citosólico aumenta desde aproximadamente un valor de 10^{-7} M a 10^{-6} M, o sea 10 veces su valor en reposo. Este incremento de la $[\text{Ca}^{+2}]_i$ inicia distintos procesos, uno de los cuales culmina en la contracción miocárdica.

La unidad contráctil del músculo se denomina sarcómero y está limitada por 2 líneas Z (figura 8) (197, 198). Cada sarcómero es un conjunto interdigitado de filamentos finos y gruesos. Cada filamento grueso tiene una longitud aproximada de $1.55 \mu\text{m}$ y está compuesto por una proteína llamada miosina.

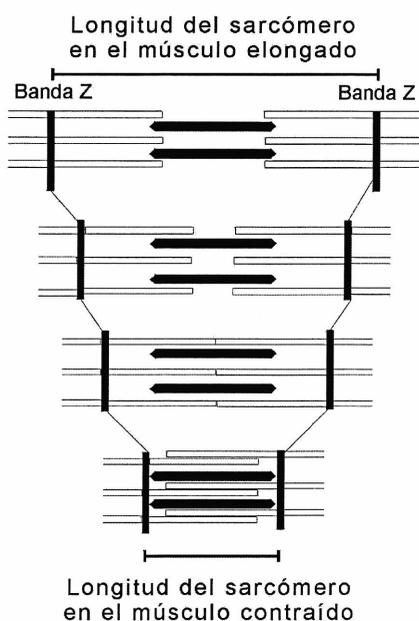


Figura 8: *Esquema de un sarcómero.* Sección longitudinal de un sarcómero en distintos grados de acortamiento. Se observa claramente como aunque el sarcómero se acorte, acercándose las líneas Z, la longitud de las proteínas contráctiles no se modifica. Miosina en negro, actina en blanco. (Modificado de Cingolani HE, Houssay AB y colaboradores. Fisiología Humana de Houssay. Sección I. Fisiología General (ed) El Ateneo 2000, pp 59-94, Buenos Aires).

La miosina es una molécula de alto peso molecular que tiene forma de bastón y posee una cola que está orientada hacia el centro del sarcómero y una cabeza globular flexible que se orienta hacia los discos Z. La cabeza es la base molecular del puente cruzado debido a la actividad ATPasa que posee (figuras 9 A). Los filamentos finos tienen una longitud aproximada de $1 \mu\text{m}$ y se

extienden de la línea Z hasta el centro del sarcómero. Están compuestos en su mayoría por una proteína denominada actina y por otras proteínas regulatorias, la troponina y la tropomiosina (197, 199). Los monómeros de actina G (globular) se ordenan formando el filamento fino (actina F). Estos filamentos se disponen en pares de hélices α . La actina puede interactuar con la miosina y activar la actividad ATPasa de su cabeza. La tropomiosina es una molécula delgada y larga que se extiende en todo el filamento fino. Cada molécula de tropomiosina se extiende sobre 7 de actina G (figura 9 B). La troponina esta formada por tres componentes, la T (TnT), la I (TnI) y la C (TnC). El conjunto de estas tres se denomina complejo troponínico. La TnT es la que une el complejo con la Tropomiosina, la TnI junto con la tropomiosina inhibe la unión de la actina con la miosina, y la TnC une Ca^{+2} (196, 197, 199). Existen otras proteínas asociadas al sarcómero que contribuyen al mantenimiento de la estructura. En la figura 9 se esquematiza la estructura de los filamentos.

Según la teoría del deslizamiento de los filamentos, el acortamiento del músculo estriado se produce debido al deslizamiento de los filamentos finos sobre los gruesos hacia el centro del sarcómero provocando que cada uno de los sarcómeros se acorte sin que se modifique la longitud de los filamentos. La base molecular de la contracción muscular es debida a la interacción cíclica de la actina con las cabezas de miosina (puentes cruzados) asociada a la hidrólisis de ATP (196, 197). El deslizamiento de los filamentos y su consecuencia, la contracción muscular, están regulados por la troponina y la tropomiosina.

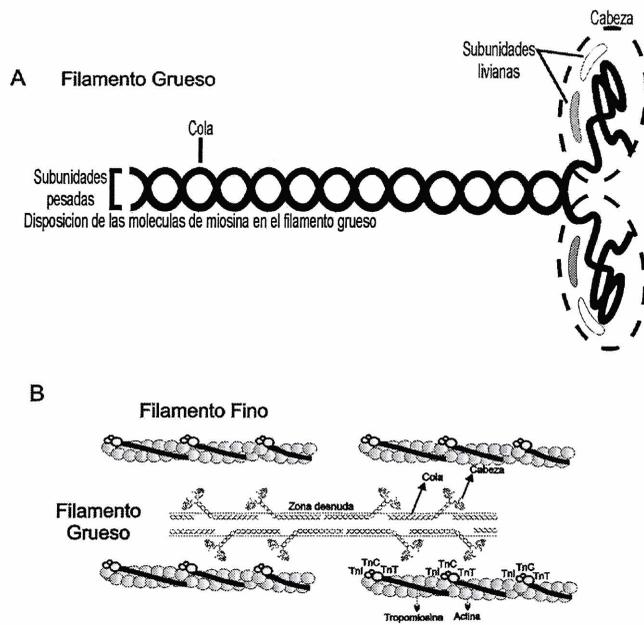


Figura 9: Miofilamentos. Panel A: Representación esquemática de una molécula de miosina. Las colas están formadas por dos cadenas pesadas enroscadas entre sí hasta un extremo en donde se separan y enroscan sobre sí mismas, formando la cabeza. Las colas dan rigidez al filamento, las cabezas salen del mismo constituyendo los puentes cruzados. Panel B: Esquema del filamento fino donde se muestra la disposición de la actina (círculos grises), tropomiosina (Tm), troponina I (Tn I), troponina C (Tn C) y la troponina T (Tn T). (Modificado de Cingolani HE, Houssay AB y colaboradores. Fisiología Humana de Houssay. Sección I. Fisiología General (ed) El Ateneo 2000, pp 59-94, Buenos Aires).

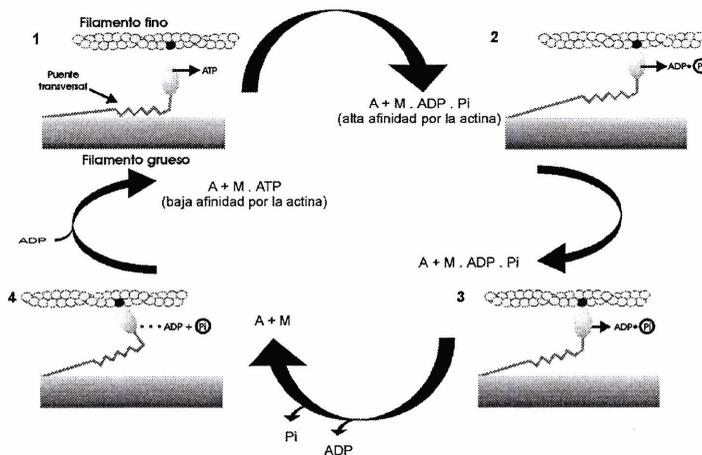


Figura 10: Procesos bioquímicos durante un ciclo de contracción. El puente transversal se une al filamento fino girando sobre sí mismo y generando tensión tracciona del filamento fino, que se desliza sobre el grueso; luego la cabeza de miosina se libera para volver a fijarse en otro punto del filamento de actina, y así sucesivamente. Los puentes transversales de las mitades opuestas del sarcómero giran en direcciones opuestas y de esta forma acercan cada mitad del

sarcómero al centro. La energía para la contracción proviene de la hidrólisis de ATP en ADP y Pi. El ATP se une a la cabeza de miosina inhibiendo la unión de esta con la actina (1). La baja actividad ATPasa de la miosina hace que el ATP sea desdoblado lentamente en ADP y Pi formando un complejo intermedio, miosina-ADP-Pi (2). Este complejo es capaz de unirse a la actina formando el complejo activo, actina-miosina-ADP-Pi (3). Esta nueva interacción formada promueve la actividad ATPasa de la miosina haciendo que se libere el fosfato de alta energía del ATP, determinando un cambio en la posición del puente transversal y el deslizamiento del filamento fino sobre el grueso (4). De esta manera la energía química es transformada en mecánica. El nuevo estado (4) se conoce como complejo de rigor y permanece así hasta que una nueva molécula de ATP se una a la cabeza de miosina. (Modificado de Cingolani HE, Houssay AB y colaboradores. Fisiología Humana de Houssay. Sección I. Fisiología General (ed) El Ateneo 2000, pp 59-94, Buenos Aires).

Cuando aumenta la $[Ca^{+2}]$ citosólico ($[Ca^{+2}]_c$) se revierte la inhibición preexistente entre actina y miosina, y se desencadena la contracción muscular. El Ca^{+2} se une a la TnC y produce un cambio conformacional en el complejo tropomiosina-troponina que hace que se libere el bloqueo del sitio activo de la actina y de esta forma pueda interactuar con la miosina. Este hecho promueve la actividad ATPasa de la miosina, la hidrólisis del ATP y la fuerte unión con la actina que precede al desarrollo de tensión.

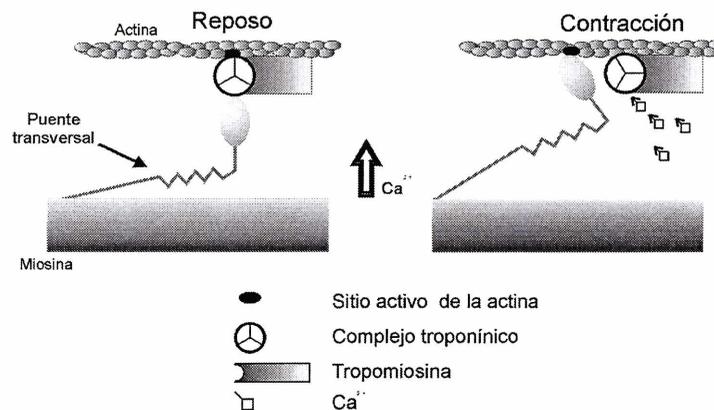


Figura 11: Regulación de la contracción por Ca^{+2} . En reposo la Tm y el complejo troponínico bloquean el sitio activo de la actina. Al incrementarse la $[Ca^{+2}]_i$, luego de la despolarización, este ión se une a la TnC y produce el corrimiento del complejo Tm y Tn, liberando el sitio activo de la actina. (Modificado de Cingolani HE, Houssay AB y colaboradores. Fisiología Humana de Houssay. Sección I. Fisiología General (ed) El Ateneo 2000, pp 59-94, Buenos Aires).

4. Relajación muscular:

Para que el músculo se relaje es necesario que baje la $[Ca^{+2}]_c$. Cuatro sistemas están involucrados en la disminución del Ca^{+2} citoplasmático, la proporción en

que cada uno de ellos contribuye varía según la especie y las condiciones fisiopatológicas. El principal responsable de la relajación muscular es el RS ya que posee en la membrana una proteína Ca-ATPasa, la SERCA2a, la cual transporta Ca^{+2} desde el citosol hacia el RS (retoma de Ca^{+2}) a una velocidad suficiente como para producir la relajación. La capacidad de transporte de la SERCA está regulada por medio de la fosforilación de la proteína fosfolamban, que se encuentra unida a ella. Cuando la fosfolamban está desfosforilada se fija a la SERCA2a y deprime el transporte de Ca^{+2} , mientras que fosforilada se libera aumentando la retoma de Ca^{+2} (200, 201).

Otros de los mecanismos involucrados en la relajación muscular, pero con menor importancia, son el NCX (actuando en el modo directo), la Ca^{+2} ATPasa de la membrana celular y el transportador de Ca^{+2} mitocondrial (202). En especies en las que el RS es menos importante, como el sapo, estos últimos mecanismos tienen más peso (203) (figura 12).

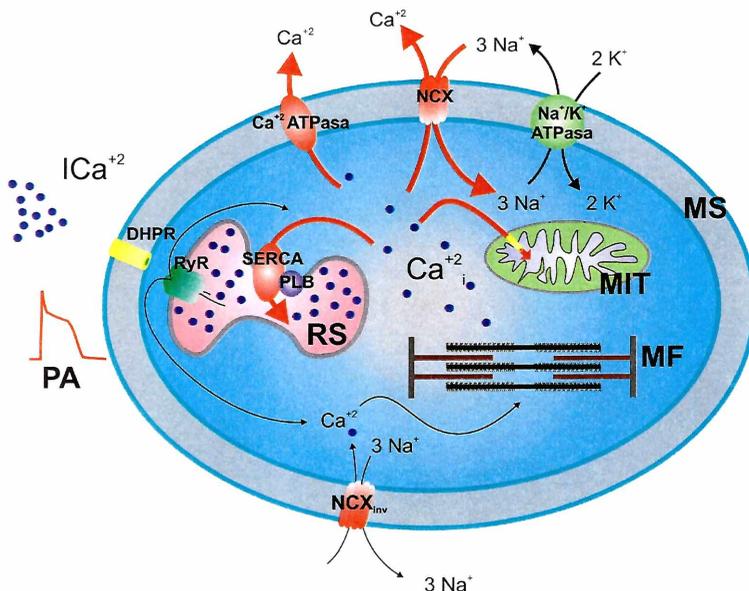


Figura12: Representación esquemática de las vías de eliminación del Ca^{2+} citosólico. Luego de la contracción el complejo troponina-tropomiosina libera Ca^{+2} porque la su concentración citosólica disminuye. Con flechas rojas se muestran las principales vías de eliminación de Ca^{+2} . Éstas son a través de la SERCA2a (SERCA), cuya inhibición preexistente se revierte cuando fosfolamban (PLB) se fosforila. Otros mecanismos que participan en la relajación son el modo directo del NCX, la Ca^{2+} ATPasa del sarcolema y el transportador de Ca^{2+} de las mitocondrias (MIT).

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de Tesis Doctoral fue dilucidar el mecanismo mediante el cual la Ang II produce EIP e hipertrofia miocárdica. Los antecedentes expuestos en INTRODUCCIÓN permiten pensar en un mecanismo autocrino-paracrino similar al disparado por el estiramiento del miocardio y responsable de la segunda fase de aumento de fuerza, el cual incluye: Liberación de ET endógena→activación del NHE-1→ aumento de Na^+_i →activación del NCX_{inv} →aumento del TCa^{+2}_i

La hipótesis principal es que esta secuencia de eventos es responsable del desarrollo del EIP y a la vez es la señal de inicio para el desarrollo de HC en respuesta a Ang II exógena.

En este marco se intentará probar que:

- tanto el EIP como el efecto pro-hipertrófico de bajas dosis de Ang II (suficiente como para producir un aumento de fuerza similar al de la segunda fase de fuerza) es mediado por la formación/liberación de ET,
- el mecanismo subyacente por el cual ocurren estos fenómenos involucra la activación del NHE-1 y el consecuente aumento de la $[Na^+]_i$,
- el aumento de Na^+_i magnifica la función en sentido inverso del NCX, el cual contribuye a una mayor entrada de Ca^{+2} al miocito durante la contracción,
- este aporte extra de Ca^{+2} al citosol influye tanto en el mayor desarrollo de fuerza como en la activación de las vías de señalización que llevan a la HC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aspectos Generales

Los experimentos fueron llevados a cabo respetando las normativas generales para uso de animales de laboratorio estipuladas en la "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No. 85-23, 1996" en músculos papilares de gato y en miocitos aislados de corazones de ratas Wistar recién nacidas (2 a 3 días de edad).

Estudios de contractilidad en músculo cardíaco aislado

Los experimentos se realizaron utilizando músculos papilares (mp) aislados del ventrículo derecho de gato de acuerdo a una técnica descrita anteriormente (90, 173). Los mp se montaron en una cámara de sobreperfusión continua ubicada sobre la platina de un microscopio invertido, adaptado para la medición simultánea de iones intracelulares por fluorescencia y fuerza contráctil, entre un transductor de fuerza y un soporte fijo. Se registró la fuerza desarrollada y la velocidad de contracción y relajación durante contracciones isométricas obtenidas por estimulación eléctrica a través de pulsos cuadrados de una intensidad ~ 20 % por encima del umbral, a una frecuencia constante de 0.2 Hz. Los mp se estabilizaron durante 15 minutos a carga 0 (sin estirar), determinándose su longitud y superficie de sección transversal bajo estas condiciones. Se realizaron estiramientos sucesivos cada 5 minutos mediante un tornillo micrométrico, para determinar la longitud a la cual los mp desarrollaban la fuerza máxima (L_{max}). Alcanzada L_{max} los mp se acortaron hasta obtener un desarrollo de fuerza equivalente al 95% del desarrollado a L_{max} (longitud que corresponde a ~98% de L_{max}) y en esta longitud se estudiaron los efectos de las distintas maniobras farmacológicas. Como solución salina normal de sobreperfusión se usó Ringer-bicarbonato de composición (en mmol/L): 128.3 de NaCl, 4.5 de KCl, 1.35 de CaCl₂, 20.23 de NaHCO₃, 1.05 de MgSO₄, y 11 de glucosa, equilibrado con una mezcla gaseosa de 5% de CO₂ en O₂ (pH~7.40). Para eliminar la influencia de las catecolaminas liberadas por las terminales nerviosas en los efectos inotrópicos,

se agregaron atenolol y prazosin (bloqueantes β y α respectivamente) ambos en concentración 1 $\mu\text{mol/L}$. Los experimentos se realizaron a 30° C.

Determinación de la $[\text{Na}^+]_i$ por fluorescencia en mp de gato.

La $[\text{Na}^+]_i$ se determinó mediante el indicador fluorescente SBFI (sodium-binding benzofuran isophthalate), usando una versión modificada de una técnica descrita por Harootunian y col. (204). Brevemente, los mp se incubaron con SBFI-AM 10 $\mu\text{mol/L}$ durante 2 horas, al cabo de las cuales se procedió al lavado del líquido extracelular con solución buffer libre de indicador durante ~1 hora. Cuando se usan formas AM de un indicador, una vez que el mismo se encuentra dentro de la célula, es necesario esperar un tiempo para que el éster sea hidrolizado por las esterasas intracelulares, las cuales lo liberan de la porción AM y lo transforman en su forma ácida libre, que es la sensible al ión y es impermeable a la membrana, lo cual minimiza su pérdida hacia el líquido extracelular. Las longitudes de onda de la luz incidente (excitación) fueron 340 y 380 nm, y la emisión fue recogida luego de atravesar un filtro específico de 535 \pm 5 nm. Dado que los cambios en $[\text{Na}^+]_i$ no alteran la emisión luego de excitar con 380 nm, pero promueven una modificación en la emisión luego de excitar con 340 nm, dividiendo las emisiones 340 nm/ 380 nm el cociente aumenta cuando aumenta $[\text{Na}^+]_i$. El cociente entre la fluorescencia de las señales emitidas fue realizado off-line luego de sustraerles los correspondientes valores de autofluorescencia (fluorescencia basal en ausencia del indicador) en cada longitud de onda. Los cocientes de fluorescencia del SBFI fueron transformados en valores de $[\text{Na}^+]_i$ mediante calibraciones "in vivo" (205). La calibración "in vivo" de la fluorescencia del SBFI fue hecha de acuerdo a Harootunian y colaboradores, con una solución conteniendo gramicidina 2.0 μM , monensina 5.0 μM y ouabaína 50 μM . Las diferentes concentraciones de Na^+ fueron preparadas a partir de mezclas apropiadas de una solución de alta concentración de Na^+ (150 mmol/L) con una de alto contenido de K^+ (150 mmol/L). Las curvas de calibración de Na^+ de diferentes preparaciones fueron lineales en el rango de concentraciones fisiológicas (4 a 16 mM).

Determinación del pH_i por fluorescencia en mp de gato.

El pH_i se determinó mediante el intercambiador fluorescente 2',7'-bis (2-carboxietil)-5,6-carboxifluoresceína (BCECF). Los H⁺ son capaces de unirse a la forma desesterificada del indicador fluorescente, modificando su emisión según la longitud de onda con la cual se lo excita. Los mp se cargaron con la forma éster acetoximetilada de este indicador (conocida como forma "BCECF-AM") la cual, por ser muy lipofílica atraviesa muy fácilmente la membrana celular. Se incubaron durante 30 minutos en la solución salina control conteniendo 10 μM de BCECF-AM a 30°C. Posteriormente se lavó el espacio extracelular con solución libre de indicador con el mismo fin que se indicó antes de permitir la desesterificación intracelular del indicador. Para lograr la excitación del BCECF, los mp se iluminaron (luz excitante) con un rayo proveniente de una lámpara de Xenon (Oriel arc lamp model 68806) previo paso por un filtro de banda única selectivo (495 ó 440 nm) y luego de incidir en un espejo dicroico (515 nm) el cual refleja el haz y lo conduce hacia el músculo para iluminar un área de aproximadamente 1.5 mm de diámetro. La luz fluorescente emitida por el indicador pasó por el objetivo y se transmitió por un espejo dicroico (DILP 580 nm) para atravesar un filtro de emisión de 535±5 nm y finalmente llegar a un fotomultiplicador (3527 Hamamatsu) colocado en una cápsula sellada y opaca a la luz ambiente. La señal proveniente del fotomultiplicador se filtró a 100 Hz y se dirigió a una PC compatible a través de un convertidor analógico/digital (2801-A Data Translation). Las señales se almacenaron luego en la computadora, para poder calcularse el cociente de fluorescencias, previa substracción de la autofluorescencia basal (sin indicador) para cada señal. Simultáneamente se almacenó en la computadora la fuerza generada por el músculo.

Calibración de la señal fluorescente de BCECF: Al final de cada experimento la señal fluorescente se calibró con soluciones de pHs conocidos, que contienen (en mmol/L): HEPES 12, KCl 140, MgCl₂ 1, EGTA 2 y 2,3-butanediona monoxima (BDM) 15, a las que se les agregó 12 μmol/L de nigericina. El BDM es una droga que previene la hipercontractura de la célula ya que desacopla la excitación de la contracción impidiendo la interacción entre la actina y la miosina. La nigericina es

un contratransportador H^+/K^+ que permite anular el gradiente de pH transarcolemal, lo cual garantiza que el pH de la solución de calibración es el mismo que “sensa” el indicador de pH que está en el citosol. El pH de las soluciones se ajustó con KOH en cuatro diferentes valores entre 7.5 y 6.5. Se registraron los cocientes de fluorescencia que generan cada uno de esos pHs conocidos, se ajustaron linealmente y se interpolaron los valores experimentales en ese ajuste (206).

Protocolos experimentales: el efecto de Ang II o ET-1 sobre mp fue ensayado en ausencia o en presencia de: HOE642 (1 $\mu\text{mol/L}$) inhibidor del NHE-1, losartan (1 $\mu\text{mol/L}$) bloqueante de receptores AT_1 , TAK044 (1 $\mu\text{mol/L}$) bloqueante inespecífico de receptores de ET, phosphoramidon (100 $\mu\text{mol/L}$) inhibidor de la ECE y KB-R7943 (5 $\mu\text{mol/L}$) inhibidor del modo inverso del NCX. En todos los casos los bloqueantes o inhibidores fueron agregados ~20 minutos antes de Ang II o ET-1, período durante el cual el desarrollo de fuerza no sufrió cambios mayores a un 3%. Además se constató cuidadosamente que la fuerza desarrollada haya alcanzado un estado estable antes del agregado de algún péptido.

Estudios de los efectos pro-hipertróficos de Ang II y ET en cardiomiocitos de ratas recién nacidas (CMRRN)

Aislamiento de CMRRN.

Para cada experimento se digirieron enzimáticamente 15 a 20 ventrículos de ratas Wistar de 2 a 3 días de vida, previamente cortados en trozos de aproximadamente 1 mm^3 . La digestión se realizó en 6 a 8 ciclos de 10 minutos y a 37 °C con agitación continua en un medio amortiguador a base de fosfatos con la siguiente composición (mmol/L): 136.7 de NaCl, 2.68 de KCl, 1.47 de KH_2PO_4 , 8.33 de NaH_2PO_4 y 55 de glucosa (PBS/glucosa) conteniendo 740 unidades de colagenasa II, 370 unidades de tripsina I y 2880 unidades de DNasa (todas de Worthington). Los sobrenadantes se agregaron sobre una mezcla de 5 mL de suero fetal bovino (FBS) y 5 mL de suero de caballo (HS)

(ambos de GIBCO). La suspensión de células fue filtrada a través de una malla de 100 μm de poro y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos. Se retiró el líquido sobrenadante y el sedimento celular fue resuspendido en una solución amortiguadora ADS de composición (mmol/L): 116 de NaCl, 20 de HEPES, 1 de NaH_2PO_4 , 5.36 KCl, 0.81 de MgSO_4 y 5.5 de glucosa (llevado a pH 7.4 con solución de NaHO), y filtrado nuevamente con una malla de 100 μm de poro. La suspensión celular obtenida se centrifugó a 3500 rpm a través de un gradiente de Percoll (constituido por las siguientes fases: 45% de percoll en ADS la superior y 65% la inferior) para separar los cardiomiocitos de los otros tipos celulares. Luego, los cardiomiocitos recolectados de la interfase entre las soluciones de percoll, fueron lavados con medio de cultivo Nutriente F10 (SIGMA) y separados por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se contaron y se plaquearon en platos de cultivo previamente cubiertos por una capa de colágeno tipo I (UPSTATE Biotechnology) a una densidad de aproximadamente 10^5 células por cm^2 (excepto para los experimentos destinados a determinar el área superficial) e incubaron en medio de cultivo F10 conteniendo 10 % de FBS, 10 % de HS, 100 unidades/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de streptomycin. A las 24 horas, se les reemplazó el medio de cultivo por DMEM (GIBCO) conteniendo 1% de FBS, 0.2% de seroalbúmina bovina (BSA), 20 nmol/L de selenito de sodio, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apo-transferrina y 20 mg/mL ácido ascórbico y se incubó durante otras 24 horas. Al cabo de este tiempo, el medio fue reemplazado por DMEM con suplementos y libre de FBS, y en esas condiciones los cardiomiocitos se incubaron nuevamente 24 horas. En todos los casos se mantuvo los cultivos en presencia de 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ de β -arabinofuranósido (SIGMA), inhibidor de la síntesis de ADN, para prevenir la proliferación celular.

Determinación de la $[\text{Na}^+]_i$ y $[\text{Ca}^{+2}]_i$ por fluorescencia en CMRRN

Se usaron cardiomiocitos crecidos hasta confluencia sobre vidrios cubreobjeto cubiertos de colágeno tipo I. Se estimularon eléctricamente a una frecuencia

similar a la que presentaban espontáneamente en cultivo (0.5 Hz) con intensidad 20% mayor a la umbral. El estímulo eléctrico fue iniciado 5 minutos antes de comenzar a registrar la fluorescencia. La rotación de los filtros de excitación y el registro de la fluorescencia se llevaron a cabo con un Sistema de Fluorescencia IonOptix acoplado a un microscopio invertido Nikon TE-2000 U. La $[Na^+]_i$ se determinó mediante SBF1 de manera similar a la descrita para mp.

Para la determinación del $[Ca^{2+}]_i$, las células se cargaron con el indicador Fura-2 AM durante 15 minutos. El proceso de carga fue seguido por 3 lavados con solución sin indicador e incubación por otros 30 minutos para permitir su desesterificación. Las longitudes de onda de excitación fueron 340 y 380 nm y se monitoreó la fluorescencia emitida luego de pasar a través de un filtro de 510 nm. El cociente 340/380 de fluorescencia emitida fue realizado off-line luego de sustraerles los correspondientes valores de autofluorescencias a cada longitud de onda. La $[Ca^{2+}]_i$ se calculó a partir de la siguiente ecuación $[Ca^{2+}]_i = K'_d (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$ con $K'_d = K_d (S_{f2} / S_{b2})$ (207). En nuestras condiciones, K'_d , R_{min} y R_{max} fueron 558.4 nmol/L, 0.211 y 1.099 respectivamente. La fluorescencia de Fura-2 se calibró con soluciones de diferentes niveles de Ca^{2+} libre, las que se obtuvieron mezclando una solución A (sin Ca^{2+}) con otra solución B (con Ca^{2+}), en proporciones adecuadas. Las composiciones de dichas soluciones fueron las siguientes (en mmol/L): **solución A**, 120 de NaCl, 4 de KCl, 1.2 de $MgCl_2$, 10 de HEPES, (pH 7.4 con NaOH) 4 de NaCN, 20 de BDM, 2 de ácido iodoacético y 0.01 de ionomicina, 10 de EGTA. La composición de la **solución B** fue similar a la anterior pero con 10 mmol/L de $CaCl_2$ resultando una $[Ca^{2+}]$ libre de 30 μ mol/L.

Inducción del modo inverso del intercambiador Na^+/Ca^{2+} en CMRRN

Los cardiomiocitos cargados con Fura-2 fueron sometidos a una abrupta remoción del Na^+ extracelular para forzar el funcionamiento del NCX en modo inverso. La solución de sobreperfusión control contenía (en mmol/L): 140 de NaCl, 6 de KCl, 1 de $MgCl_2$, 1.8 de $CaCl_2$, 6 de HEPES, 6 de glucosa (llevado a pH 7.4 con NaOH). La remoción del Na^+_e se realizó cambiando la solución

control por una solución de similar composición pero libre de Na^+ , el cual fue sustituido por una concentración equimolar de LiCl (llevado a pH 7.4 con LiOH). El estímulo de marcapaso fue detenido en el momento de la remoción del Na^+ extracelular.

Determinación de la velocidad de relajación del TCa^{+2}_i inducido por un pulsos de cafeína en CMRRN

Se realizaron de acuerdo a un protocolo similar al descrito por Bassani y col. (208). A los CMRRN cargados con Fura-2 y estimulados eléctricamente durante 15 minutos, se les detuvo el marcapaso durante 15 segundos al cabo de los cuales se cambió rápidamente la solución control (similar a la descrita anteriormente) por una similar conteniendo cafeína 10 mmol/L, monitoreando simultáneamente el Ca^{+2}_i . Se analizaron las velocidades de relajación de los pulsos de Ca^{+2}_i obtenidos en condiciones control y tratados durante 24 horas con ET-1.

Determinación del pH_i por fluorescencia en CMRRN.

El método utilizado para CMRRN fue similar al descrito para mp, pero con leves modificaciones. Se incubaron los miocitos durante 30 minutos con BCECF-AM y luego se lavó durante otros 30 minutos para favorecer la desesterificación intracelular del indicador.

Determinación de la actividad del NHE en CMRRN.

La actividad del NHE se puede medir determinando el flujo de H^+ (J_{H^+}) hacia afuera de la célula luego de una carga ácida en un medio libre de bicarbonato (buffer HEPES). Para lograr la acidosis se recurrió a la técnica conocida como “prepulso de amonio”, para lo cual se expusieron CMRRN a NH_4Cl 20 mmol/L durante 4 minutos, condición en la cual el NH_3 presente en la solución difunde rápidamente al interior celular y se combina con H^+ para formar NH_4^+ ,

produciendo un marcado aumento de pH dentro de las células. Luego de los 4 minutos de incubación se lavó el amonio extracelular con solución de perfusión normal para promover la disociación del NH_4^+ intracelular y generar NH_3 que sale rápidamente de las células a favor del gradiente de concentración, dejando H^+ libres en el citosol, que son responsables de la sobrecarga ácida (209, 210). En ausencia del anión HCO_3^- , la velocidad de recuperación del pH_i , estimada como la derivada del ajuste exponencial de pH_i vs. tiempo (dpH_i/dt), es índice de la actividad del NHE. Sin embargo, para evitar distorsiones debidas a pequeños cambios de capacidad amortiguadora intrínseca (β_i) entre las distintas células, la actividad del NHE se expresó como flujo de H^+ , el cual fue calculado con la ecuación: $J_{\text{H}^+} = \beta_i \times \text{dpH}_i/\text{dt}$, donde β_i se estimó en cada experimento a partir del $\Delta\text{base} / \Delta\text{pH}_i$ causado por el lavado del NH_4Cl .

Estudio de los efectos pro-hipertróficos de Ang II y ET-1 sobre CMRRN.

Incorporación de [^3H]-fenilalanina.

Se midió la incorporación de [^3H]-fenilalanina ([^3H]-Phe) como índice de síntesis proteica. Las células se cultivaron en policubetas de 22 mm de diámetro cada una. Después de la incubación por 24 horas en medio libre de suero, fueron incubadas por duplicado durante otras 24 horas con o sin las drogas de estudio en DMEM con L-[2,3,4,5,6- ^3H] fenilalanina (10 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) y conteniendo DL-fenilalanina 400 μM sin marcar. Al final de la incubación, los miocitos fueron lavados con PBS frío (pH 7.4) y tratados con ácido tricloro acético al 10 % (TCA) toda la noche a 4°C, para precipitar proteínas y DNA. Cada cubeta fue raspada y el precipitado lavado una vez con TCA al 10 % y dos veces con etanol al 95 %. Entre los lavados con TCA, la suspensión fue sonicada brevemente para mejorar el procedimiento de lavado. Finalmente el precipitado fue disuelto en solución de NaOH 0.15 M. Alícuotas de estas soluciones fueron llevadas a un contador de centelleo líquido y los resultados expresados como nmoles de [^3H]-Phe incorporada por disco. El DNA/disco fue determinado

fluorométricamente en las muestras neutralizadas con el colorante fluorescente bisbenzimidida (Hoechst 33258).

Medición del área celular.

Las células fueron plaqueadas a una densidad de 1.5×10^4 /cm² en discos de cultivo de 35 mm. Al término del tratamiento (24 horas) se lavaron dos veces con PBS/glucosa y se fijaron en un buffer con 10 % de paraformaldehído. El área de los cardiomiocitos fue determinada en 50 células por experimento seleccionadas aleatoriamente. Las imágenes fueron capturadas usando una cámara de video (Digital Eyepiece Camera DEC-18 WPI) adaptada a un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE2000-S), luego fueron digitalizadas y procesadas con un programa de morfometría (Image-Pro Plus for Windows 95/98 v4.5 - Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA).

Determinación de proteínas por inmunanálisis "western blot".

El medio de cultivo fue removido y los miocitos se lavaron dos veces con PBS enfriado entre 0 y 4 °C y lisados con RIPA buffer conteniendo (en mmol/L): 50 de Tris, 150 de NaCl, 1 de EDTA, 1 de EGTA, 1% de Triton X100, 0.5% de desoxicolato de sodio, pH 7.5 con inhibidores de proteasas. Las muestras se colocaron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron a 14000 rpm a 4 °C por 12 minutos. Los sobrenadantes se almacenaron a -80° C hasta ser utilizados. Las membranas de los CMRRN se desnaturalizaron y se sembraron (45 µg de proteína/calle determinadas por el método de Bradford) en un gel (7% de acrilamida), para ser sometidas a una electroforesis PAGE. El análisis de inmunotransferencia se realizó con anticuerpo policlonal de conejo contra el NHE-1. La proteína NCX fue medida con un anticuerpo monoclonal (MAB-1590, Chemicon). La inmunodetección del anticuerpo primario se llevó a cabo con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa y potenciada por un sistema de reacción de quimioluminiscencia (Amersham Biosciences). El análisis densitométrico de las proteínas NHE-1 y NCX fue expresado respecto de la densitometría para actina.

Aislamiento del ARN total y RT-PCR en tiempo real.

Se realizó PCR cuantitativa para medir expresión del ARN mensajero (ARNm) del péptido natriurético atrial (ANP) usando el método de SYBR Green PCR en tiempo real. El ARN total se aisló usando un kit RNeasy Mini y un set de DNAsa libre de RNasa (Qiagen) y un kit de transcriptasa reversa usando Omniscript RT (Qiagen) según se ha descrito antes (211). Los primers se seleccionaron usando el software Primer3 basándose en las secuencias publicadas: primer al derecho de GAPDH de 5'-GGGTGTGAACCACG AGAAAT-3', primer al inverso 5'-CCACAGTCTTCTGAGTGGCA-3'; primer al derecho de ANP de 5'-AGGGCTTCTTCCTCTTCCTG-3', primer al inverso 5'-TCCAGGTGGTCTAGCA GGTT-3'.

Protocolo experimental general.

Los miocitos cultivados en ausencia de FBS durante 24 horas fueron sometidos a condiciones control o tratados con Ang II 1 nmol/L o ET-1 5 nmol/L solas, o en presencia de uno de los siguientes fármacos: HOE 642 1 μ mol/L, KB-R7943 5 μ mol/L, TAK 044 1 μ mol/L o BQ123 300 nmol/L (bloqueante selectivo de receptores ET_A). En los experimentos con los antagonistas de receptores o drogas inhibitorias, éstos fueron agregados al medio de cultivo 15 minutos antes de la adición de Ang II o ET-1. Paralelamente se realizaron cultivos controles con TAK 044, HOE 642, KB-R7943, BQ123 o dimetilsulfóxido (DMSO) 0.05%. La duración de los tratamientos farmacológicos fue de 24 horas. Todos los compuestos se disolvieron en agua bidestilada con la excepción del KB-R7943 que fue disuelto en una solución al 50% de DMSO (la concentración final de DMSO en el medio de cultivo fue 0.05%).

Análisis estadístico.

Todos los resultados se presentan como el valor promedio \pm error estándar. Las diferencias estadísticas entre grupos se evaluaron por test de "t" de Student o análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) seguido del test de Student-Neuman-Keuls como post-hoc, según los casos. Se consideró diferencia estadísticamente significativa un valor de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Efecto de Ang II y ET-1 sobre la contractilidad miocárdica en mp aislados de ventrículo de gato. Participación de los intercambiadores NHE y NCX.

Se seleccionó un a concentración de Ang II que produjera un EIP de aproximadamente 20 %, similar al aumento de contractilidad que ocurre durante la segunda fase de aumento de fuerza posterior al estiramiento del músculo cardíaco (91). El incremento promedio de la fuerza al cabo de 30 minutos de Ang II fue de $23 \pm 2\%$ respecto de la situación control (figura 13).

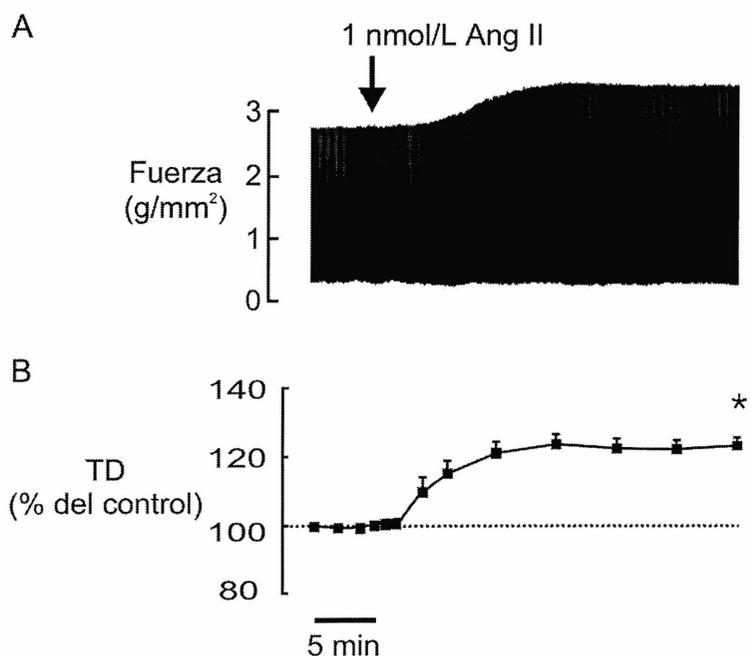


Figura 13: EIP de Ang II sobre mp de gato. (A) Registro típico compactado de la fuerza ejercida por un mp desde 5 minutos previos hasta 30 minutos posteriores al agregado de una concentración 1 nmol/L de Ang II. (B) Promedio general de resultados expresados en % del control pre-Ang II (n=4). * indica $P < 0.05$ vs. control pre-Ang II.

Como era de esperar, este efecto fue completamente abolido por el bloqueo de los receptores AT₁ con losartan, como se muestra en la figura 14.



Figura 14: Efecto del bloqueo de los receptores AT₁ frente a Ang II en mp de gato. (A) Registro típico de fuerza desde 5 minutos antes hasta 30 minutos posteriores al agregado de Ang II en presencia de losartan. (B) Resultados promedio del aumento de TD (expresado en % del control pre-Ang II) a los 30 minutos del agregado de Ang II en ausencia o presencia de losartan (n=4 en cada grupo). * indica P<0.05 vs. control pre-Ang II.

Con la idea de probar si la dosis usada de Ang II produjo su EIP a través de la liberación/formación de ET endógena, estudiamos su efecto en presencia del bloqueante inespecífico de de Rcs de ET TAK044 o del inhibidor de la ECE, phophoramidon. Tanto el bloqueo de los receptores de ET como la inhibición de la ECE, previnieron el aumento de fuerza que produce la Ang II, tal como se observa en la figura 15.

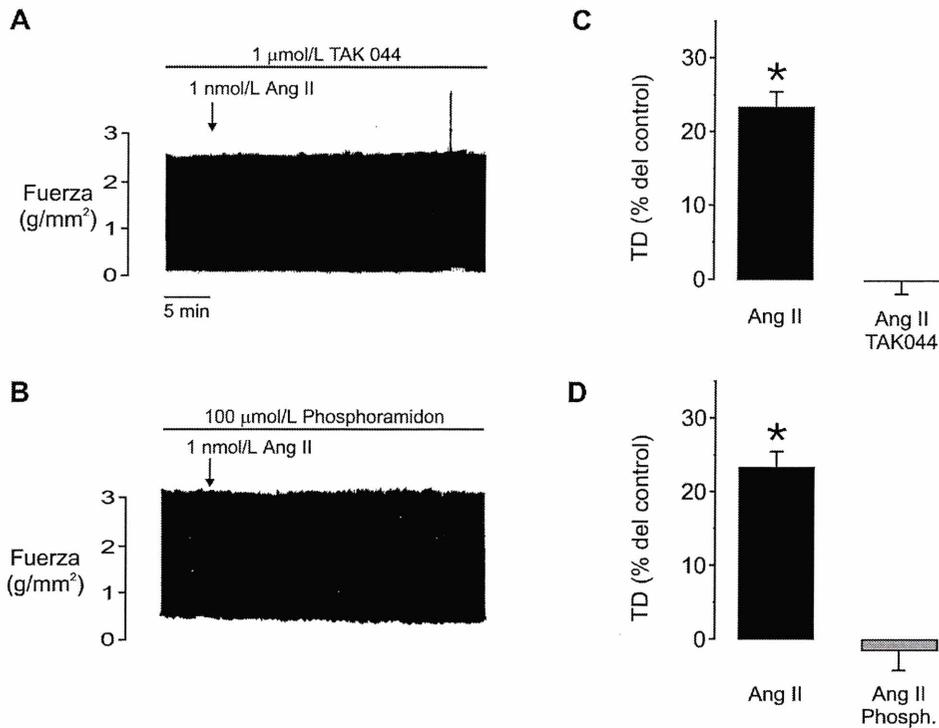


Figura 15: Efecto del bloqueo de los receptores de ET y e inhibición de la ECE frente al agregado de Ang II en mp de gato. Registro típico de fuerza de un mp cuando se agrega Ang II en presencia de TAK 044 (A) o fosphoramidon (B). Resultados promedio del aumento de TD (expresado en % respecto del control pre-Ang II) a los 30 minutos de Ang II en ausencia o en presencia de TAK 044 (C) o fosphoramidon (D) (n=4 en cada grupo). * indica $P < 0.05$ vs. control pre-Ang II.

Estos resultados sugieren que efectivamente ET endógena es un mediador del EIP de Ang II exógena (a la concentración estudiada), pero además muestran que se requiere de la conversión de big-ET en ET mediante la ECE para que el EIP se manifieste, lo cual indica que Ang II estimula la formación *de novo* de ET.

Siguiendo la hipótesis planteada en objetivos, la activación del NHE-1 sería un paso obligado en la respuesta inotrópica a esta concentración de Ang II. Para verificarlo se inhibió al intercambiador con HOE642 previo al agregado de Ang II, resultados que se muestran en la figura 16. Como se puede observar, la inhibición del NHE-1 también logró evitar el EIP de Ang II.

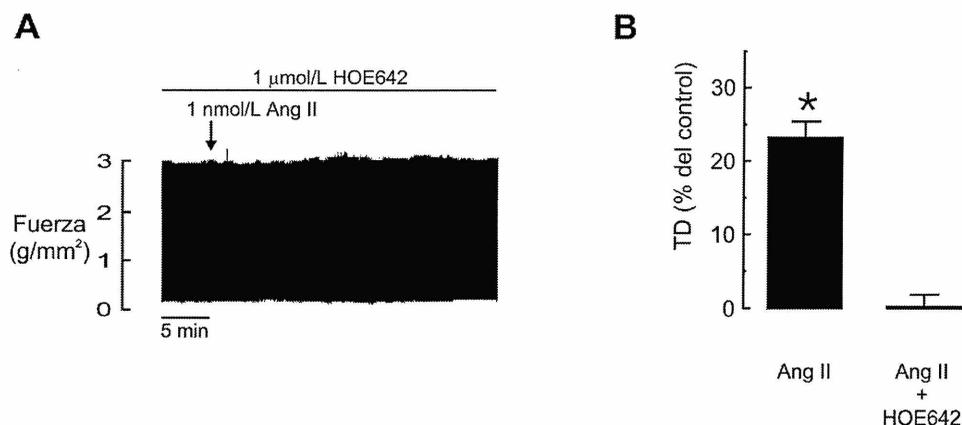


Figura 16: Efecto de la inhibición del NHE-1 frente a Ang II en mp de gato. (A) Registro típico de fuerza desde 5 minutos antes hasta 30 minutos posteriores al agregado de Ang II en presencia de HOE 642. (B) Resultados promedio del aumento de TD (expresado en % respecto del control pre-Ang II) a los 30 minutos de Ang II en ausencia o presencia de HOE 642 (n=4 en cada grupo). * indica $P < 0.05$ vs. control pre-Ang II.

Los resultados obtenidos hasta acá permiten concluir que Ang II, a la concentración estudiada, activa receptores AT_1 , esto promueve la formación/liberación de ET, la que actuando a través de un mecanismo autocrino o paracrino activa el NHE-1 y determina el cambio contráctil.

El próximo paso fue estudiar el EIP de una dosis de ET exógena equipotente a Ang II 1 nmol/L para poder comparar ambos efectos. Una dosis de ET-1 exógena de 5 nmol/L resultó inotrópicamente equipotente a 1 nmol/L de Ang II, produciendo un EIP promedio de $21 \pm 2\%$ como se observa en la figura 17.

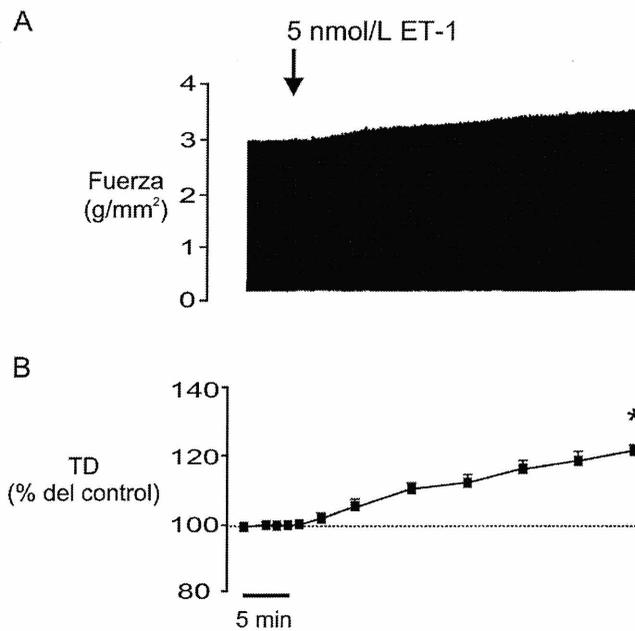


Figura 17: EIP de ET-1 sobre mp de gato. (A) Registro típico compactado de la fuerza ejercida por un mp desde 5 minutos antes hasta 30 minutos posteriores al agregado de una concentración 5 nmol/L de ET-1. (B) Promedio general de resultados expresados en % del control pre-ET-1 (n=4). * indica $P < 0.05$ vs. control pre-ET-1.

Con el fin de comprobar que todo el EIP de ET-1, en la dosis usada, era mediado sólo por Rcs específicos de ET, ensayamos el efecto del péptido en presencia del inhibidor inespecífico de Rcs de ET TAK044, encontrando una completa prevención del aumento de fuerza, según se muestra en la figura 18.

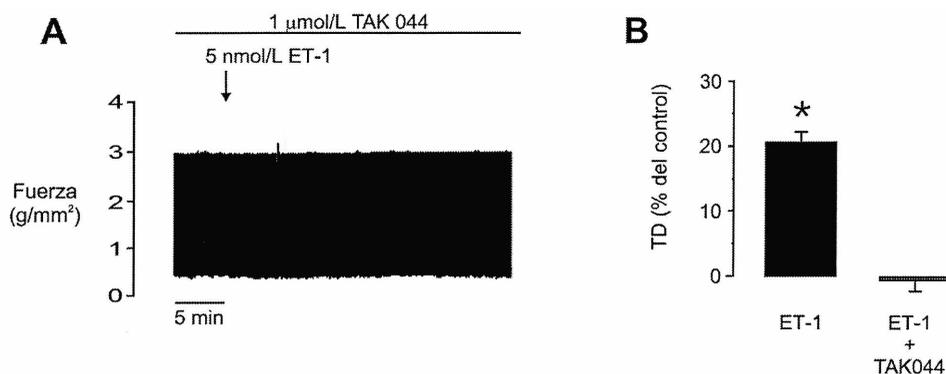


Figura 18: Efecto del bloqueo de los receptores de ET frente a ET-1 en mp de gato. (A) Registro típico de fuerza desde 5 minutos antes hasta 30 minutos posteriores al agregado de ET en presencia de TAK 044. (B) Resultados promedio del aumento de TD (expresados en % del control pre-ET-1) a los 30 minutos del agregado de ET-1 en ausencia o en presencia de TAK 044 (n=4 en cada grupo). * indica $P < 0.05$ vs. control pre-ET-1.

En concordancia con nuestra hipótesis, el EIP de ET-1 también fue cancelado por inhibición del NHE-1 con HOE642 (figura 19), lo cual demuestra que al igual que lo observado con Ang II la estimulación de la actividad del NHE-1 es un paso obligado en el aumento de la contractilidad inducido por ET-1.



Figura 19: Efecto de la inhibición del NHE-1 frente a ET-1 en mp de gato. (A) Registro de típico de fuerza desde 5 minutos antes hasta 30 minutos posteriores al agregado de ET-1 en presencia de HOE 642. (B) Resultados promedio del aumento de TD (expresado en % respecto del control pre ET-1) a los 30 minutos de ET-1 en ausencia o presencia de HOE 642 (n=4 en cada grupo). * indica $P < 0.05$ vs. control pre-ET-1

Para descartar la posibilidad de que de manera análoga a lo descrito para la relación Ang II exógena/ET endógena el efecto de ET-1 exógena esté mediado por la liberación y posterior acción autocrina/paracrina de Ang II, realizamos experimentos en los cuales se pre-incubó con el bloqueante de Rcs AT₁ losartan antes de agregar ET-1. Como muestra la figura 20, el EIP del péptido no fue cancelado por el bloqueo de receptores AT₁, condición en la cual el aumento de contractilidad fue de 18±4%. Esto sugiere que si bien Ang II exógena actúa a través de ET, la ruta inversa no es posible.

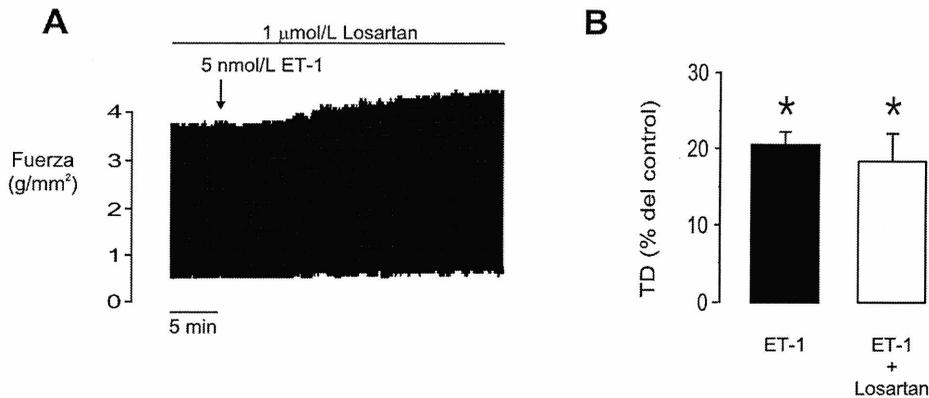


Figura 20: Efecto del bloqueo de los receptores AT_1 frente a ET-1 en mp de gato. (A) Registro típico de fuerza desde 5 minutos antes hasta 30 minutos posteriores al agregado de ET-1 en presencia de losartan. (B) Resultado promedio del aumento de TD (expresado como % del control pre-ET-1) a los 30 minutos del agregado de ET-1 en ausencia o en presencia de losartan (n=4 en cada grupo). * indica $P < 0.05$ vs. control pre-ET-1.

Los resultados indican claramente que la activación del NHE-1 participa del EIP de ET, tanto cuando es liberada en respuesta a Ang II como cuando es agregada exógenamente, de modo que la siguiente pregunta a resolver fue mediante qué mecanismo un aumento de la actividad del NHE-1 podría inducir un aumento de la fuerza contráctil.

Anteriormente se mencionó que el NHE transporta H^+ hacia el exterior de la célula y Na^+ hacia adentro. Si se piensa en una mayor actividad del NHE-1 sería razonable esperar una alcalinización intracelular y un aumento de la $[Na^+]_i$ como consecuencias inmediatas. Ambas condiciones son *per se* capaces de generar aumento de la fuerza contráctil: la alcalinización porque promueve sensibilización de los miofilamentos al Ca^{+2} , redundando en una mayor fuerza contráctil para cada dada $[Ca^{+2}]_i$, y el incremento de Na^+_i porque modifica el funcionamiento del NCX haciéndolo más lento en su modo directo o bien forzando su modo inverso lo cual conduce a una elevación del Ca^{+2} citosólico con el consecuente aumento de fuerza contráctil. Con la idea de explorar cuál de estas vías estaba involucrada, en primer término fuimos a estudiar el efecto de Ang II y ET-1 exógenas sobre el pH_i , resultados que se muestran en la figura 21. Como se puede observar, no se detectaron cambios significativos en

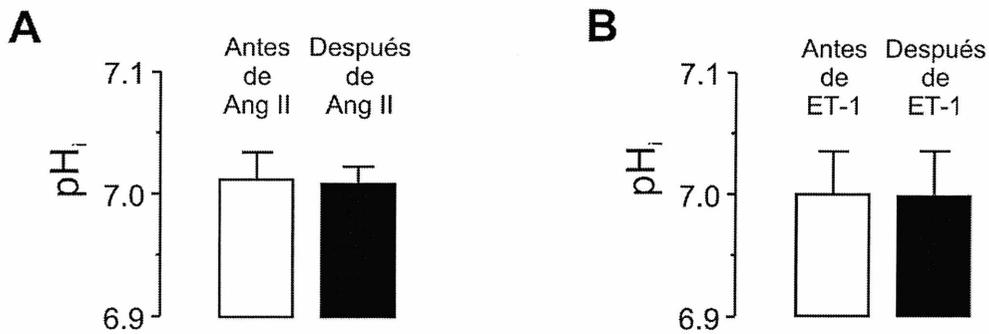


Figura 21: Efecto de Ang II o ET-1 sobre el pH_i en mp en un medio de perfusión con bicarbonato. (A) Resultados promedio de pH_i antes y después de 30 minutos de Ang II. (B) Resultados promedio de pH_i antes y después de 30 minutos de ET-1 (n=4 en ambos grupos).

el pH_i luego del agregado de los péptidos, resultados que son coherentes con experimentos previos de nuestro laboratorio en los cuales se ha demostrado que en presencia del anión bicarbonato tanto Ang II como ET activan no sólo al NHE-1 (mecanismo alcalinizante), sino también al intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^- \text{Na}^+$ -independiente (mecanismo acidificante), compensando los potenciales cambios de pH_i (92, 179, 212). Por otra parte, y volviendo al objetivo con que se plantearon estos experimentos, el hecho de no haberse encontrado cambios significativos del pH_i luego de la adición de Ang II o ET-1 eliminan a la alcalinización como una posible causa del EIP.

Descartado el pH_i como posible causa del EIP de ambos péptidos el paso siguiente fue estudiar el efecto de Ang II y ET sobre los niveles de Na^+_i con el fin de comprobar si la activación del NHE-1 efectivamente involucraba un aumento de la $[\text{Na}^+]_i$.

Conforme con la hipótesis planteada, la activación del NHE-1 se evidenció por un aumento en la $[\text{Na}^+]_i$, el cual al cabo de 30 minutos de tratamiento con Ang II fue de 2.2 ± 0.2 mmol/L por encima del control como puede verse en la figura 22. En experimentos paralelos se encontró que esta subida de la $[\text{Na}^+]_i$ estuvo acompañada por un aumento en el pico sistólico de Ca^{+2}_i desde 0.674 ± 0.11 a 0.768 ± 0.13 $\mu\text{mol/L}$ (n=4, $P < 0.05$) sin cambios significativos en la $[\text{Ca}^{+2}]_i$ diastólico (0.310 ± 0.03 vs. 0.317 ± 0.03 $\mu\text{mol/L}$). Como era de esperar, ET-1 exógena también incrementó el $[\text{Na}^+]_i$ (2.4 ± 0.4 mmol/L a los 30 minutos de

tratamiento) como se muestra en la figura 22. En concordancia con los experimentos anteriores en los que se estudió sólo contractilidad, tanto el efecto de Ang II como el de ET-1 sobre la $[Na^+]_i$ fueron eliminados por el bloqueo de receptores de ET con TAK044 (figura 22).

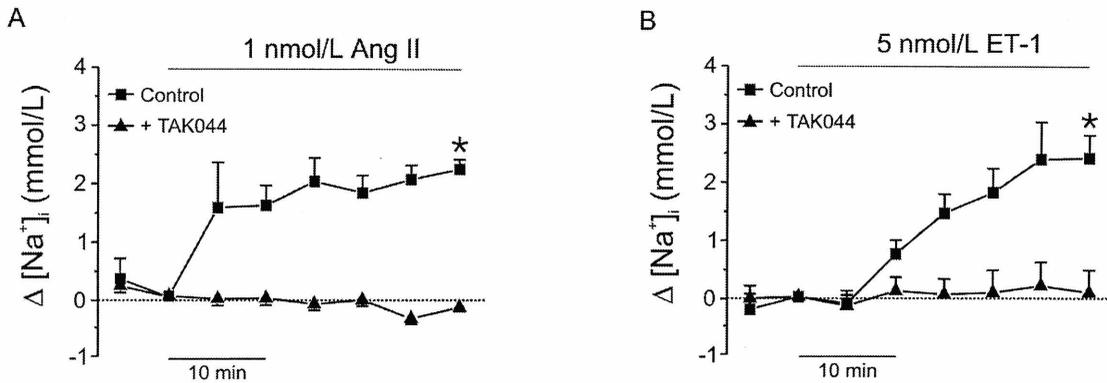


Figura 22: Efecto de Ang II o ET-1 sobre el nivel de Na^+_i . (A) Resultados promedio de la $[Na^+]_i$ desde 5 minutos antes hasta 30 minutos posteriores al agregado de Ang II en ausencia o presencia de TAK044. (B) Resultados promedio de la $[Na^+]_i$ desde 5 minutos antes hasta 30 minutos posteriores al agregado de Ang II en ausencia o presencia de TAK044 (n=4 en cada grupo). * indica $P < 0.05$ vs. control pre-Ang II o pre-ET-1.

Para demostrar que este aumento de Na^+_i era debido a la activación del NHE-1, se midió la concentración intracelular del catión con los mismos estímulos pero inhibiendo el NHE-1. La figura 23 muestra que el HOE642 previno el aumento de Na^+_i , tanto frente al tratamiento con Ang II como con ET-1.

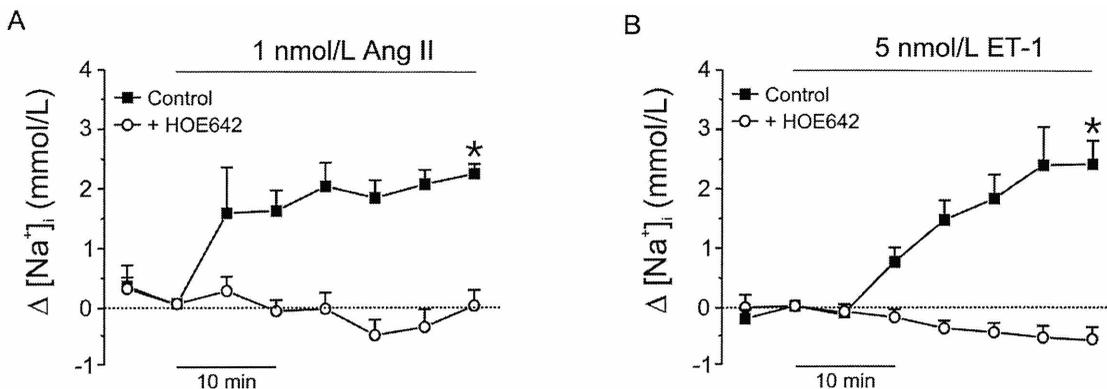


Figura 23: Efecto de Ang II o ET-1 sobre el nivel de Na^+_i . (A) Resultados promedio de la $[Na^+]_i$ desde 5 minutos antes hasta 30 minutos posteriores al agregado de Ang II en ausencia o presencia de HOE 642. (B) Resultados promedio de la $[Na^+]_i$ desde 5 minutos antes hasta 30 minutos posteriores al agregado de Ang II en ausencia o presencia de HOE 642 (n=4 en cada grupo). * indica $P < 0.05$ vs. control pre-Ang II o pre-ET-1.

Los resultados vinculan claramente la activación del NHE-1, por ET, con un aumento en la $[Na^+]_i$ y este aumento con el EIP. Una explicación posible para esta relación entre los niveles intracelulares de Na^+ y el EIP se basa en que la subida de la $[Na^+]_i$ podría producir una negativización del potencial de inversión del NCX (E_{NCX}) haciendo que este funcione en modo inverso durante un lapso más prolongado del potencial de acción y promoviendo así una mayor entrada de Ca^{+2} a la célula.

Basándonos en esta idea, realizamos una nueva serie de experimentos en los cuales investigamos la participación del NCX_{inv} en los efectos de Ang II o su mediador, ET. En tal sentido preincubamos mp con un inhibidor específico del modo inverso del NCX, el KB-R7943, y en estas condiciones ensayamos el efecto de Ang II tanto sobre el desarrollo de fuerza contráctil como sobre la $[Na^+]_i$. En concordancia con lo propuesto en el párrafo anterior, se encontró que el KB-R7943 previno completamente el aumento de fuerza inducido por Ang II, sin afectar el aumento de Na^+_i (figura 24). Resulta interesante apreciar que el agregado de KB-R7943, más allá de no afectar el incremento de Na^+_i por Ang II, en realidad produjo un aumento ligeramente mayor del ión (aunque no fue estadísticamente significativo), lo cual es coherente con la idea de que bloquear al NCX_{inv} equivale a eliminar una vía de salida de Na^+ de la célula.

Resultados

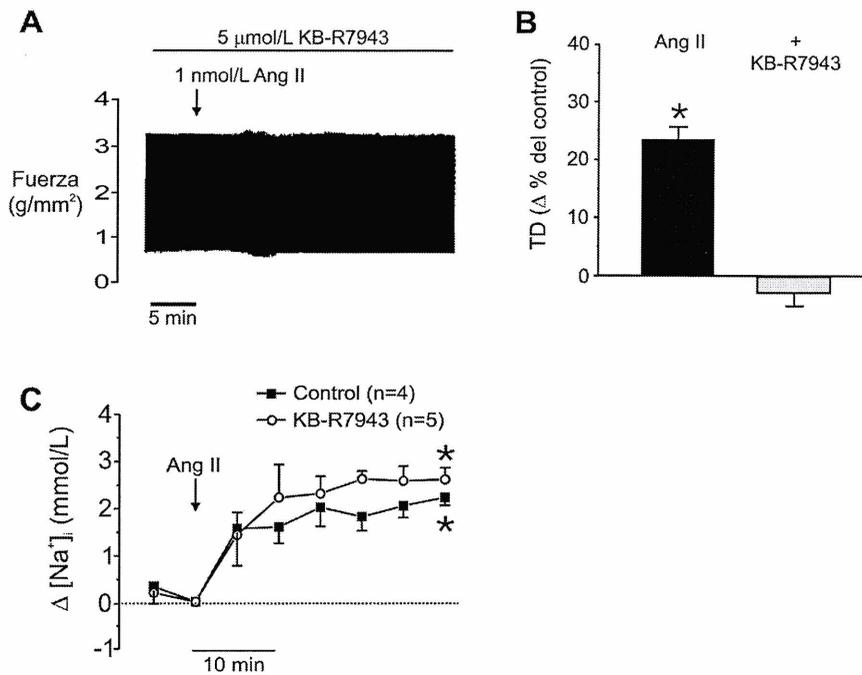


Figura 24: Efecto de la inhibición del NCX_{inv} frente a Ang II en mp de gato. (A) Registro típico de fuerza desde 5 minutos antes hasta 30 minutos posteriores al agregado de Ang II en presencia de KB-R7943. (B) Resultado promedio del aumento de TD (expresado como % del control pre-Ang II) a los 30 minutos del agregado de Ang II en ausencia o en presencia de KB-R7943. (C) Resultados promedio de la $[\text{Na}^+]_i$ desde 5 minutos antes hasta 30 minutos posteriores al agregado de Ang II en ausencia o presencia de KB-R7943 (n=4 en cada grupo). * indica $P < 0.05$ vs. control pre-Ang II.

Con el objetivo de ver si el NCX_{inv} también estaba implicado en el efecto que producía el mediador endógeno de la Ang II, la ET, se intentó revertir el EIP producido por ET-1 con KB-R7943. En efecto, el agregado de KB-R7943 a músculos en los que el aumento de fuerza por ET-1 estaba completamente establecido, revirtió el efecto sobre la contractilidad (figura 25) y, de modo similar a lo encontrado con Ang II, no detuvo la subida del Na^+_i (figura 25), confirmando que el NHE-1 permanecía hiperactivo.

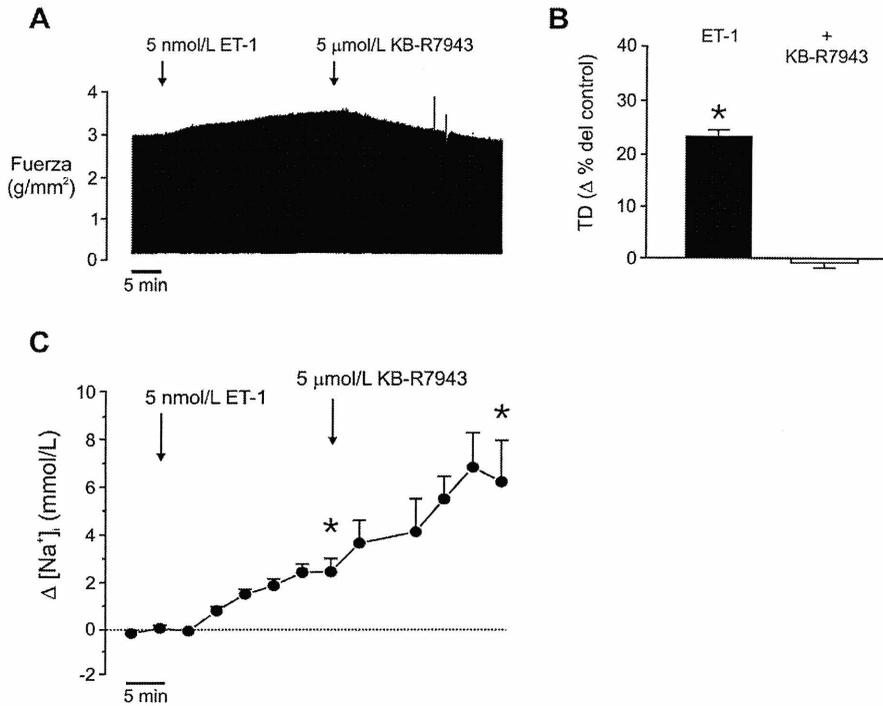


Figura 25: Efecto de la inhibición del NCX_{inv} sobre la respuesta a ET-1 en mp de gato. (A) Registro típico de fuerza en el cual se agregó KB-R7943 sobre el EIP de ET-1 completamente desarrollado. (B) Resultado promedio del aumento de TD (expresado como % del control pre-ET-1) a los 30 minutos del agregado de ET-1 y luego de 30 minutos del agregado de KB-R7943. (C) Resultados promedio de la $[Na^+]_i$ desde 5 minutos previos hasta 60 minutos posteriores al agregado de ET-1. A los 30 minutos de ET-1 se agregó KB-R793 (n=4). * indica $P < 0.05$ vs. control pre-ET-1.

Para descartar que el KB-R7943 haya estado actuando por efectos inespecíficos, se muestra que esta droga, a la concentración utilizada, no tuvo efectos sobre la contractilidad basal del músculo cardíaco (figura 26 A y B) ni sobre una condición de contractilidad mayor, similar en magnitud al aumento que promueven Ang II o ET-1. Este aumento de contractilidad de ~20% es provocado por agregado de Ca^{+2} a la solución de sobreperfusión (desde una concentración de 1.35 a 1.90 mmol/L) (figura 26 C y D).

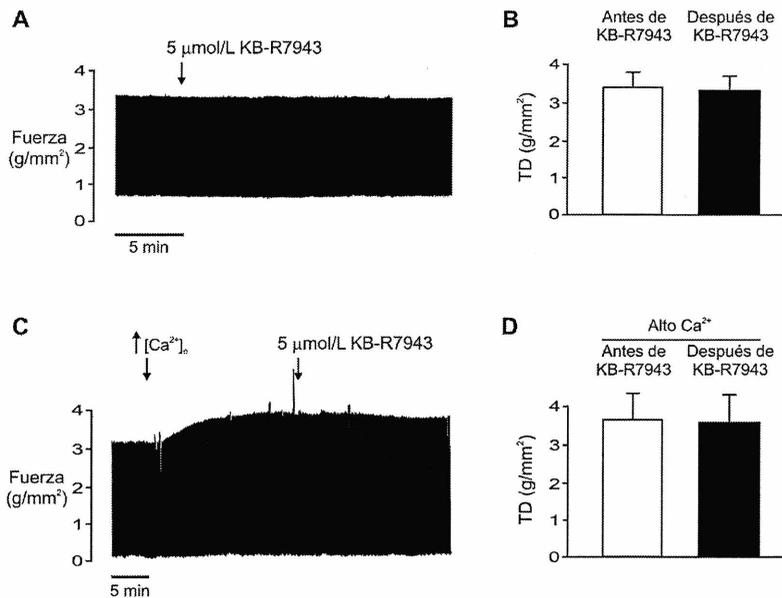


Figura 26: Efecto de la inhibición del NCX_{inv} sobre la contractilidad basal y luego de incrementar la fuerza con Ca^{2+} extracelular en mp de gato. (A) Registro típico de fuerza desde 5 minutos antes hasta 30 minutos posteriores al agregado de KB-R7943. (B) Resultados promedio de la fuerza contráctil en condición basal (expresado en g/mm^2) antes y después de 30 minutos de la incubación con KB-R7943 (n=6). (C) Registro típico de fuerza en el cual se agregó KB-R7943 sobre el EIP debido al agregado de Ca^{+2}_e . (B) Resultados promedio de la contractilidad (expresado en g/mm^2) a los 30 minutos del agregado de Ca^{+2}_e y luego de 30 minutos del agregado de KB-R7943 (n=4). * indica $P < 0.05$ vs. control pre- Ca^{+2}_e .

Resumiendo brevemente, de los resultados mostrados hasta aquí se interpreta que dosis bajas de Ang II exógena producen un EIP sobre mp de gato mediado por activación de Rcs AT_1 e involucra un aumento de la $[Na^+]_i$ dependiente de la activación del NHE-1, ya que dicho aumento fue sensible al HOE 642 al igual que el EIP. Cuando se inhibió el NCX_{inv} con KB-R7943 se logró prevenir el EIP de Ang II, pero no la subida de Na^+_i . Esto sugiere que el NCX participa en el EIP del octapéptido debido a una mayor actividad de su modo inverso introduciendo más Ca^{+2} a las células, probablemente favorecido por el mayor contenido de Na^+_i . Como sustento de este mecanismo está el hecho de que hubo un aumento del TCa^{+2}_i en los mp tratados con Ang II.

Por lo tanto el aumento de Na^+_i sería el responsable de inducir el NCX_{inv} y su consecuente aumento de Ca^{+2} promoviendo así el EIP de Ang II.

Además, estos resultados demuestran que, por un lado el EIP obtenido por agregado de ET-1 exógena comparte el mismo mecanismo descrito para Ang

II, y por otro que la formación/liberación ET endógena media el EIP de Ang II ya que este último fue prevenido bloqueando los Rcs de ET o inhibiendo la ECE. Se puede afirmar que este “cross talk” entre los péptidos no ocurre en la forma inversa ya que el bloqueo de los Rcs AT₁ con losartan no evitó el aumento de fuerza que indujo ET-1.

Dado que la hipótesis de este trabajo propone que el aumento de $[Ca^{+2}]_i$ a través del NCX_{inv} no solamente sería responsable del aumento de contractilidad inducido por Ang II o por ET, sino que también su acción crónica podría ser disparador de procesos hipertróficos, se investigó la posibilidad de que este mismo mecanismo estuviera participando del conocido efecto pro-hipertrófico que inducen ambos péptidos. Para esto decidimos utilizar cultivos de CMRRN debido a que es un modelo ampliamente utilizado para este fin. A pesar de que por ser miocitos cardíacos de animales neonatales debieran conservar su capacidad proliferativa, lo cual sería un efecto no deseado para probar nuestra hipótesis, los mismos fueron cultivados en presencia de un inhibidor de la síntesis de ADN, condición que previene la replicación genómica y por lo tanto la mitosis. Respecto a la utilización de rata, experimentos previos de nuestro laboratorio en esta especie han demostrado que el estiramiento del miocardio dispara un mecanismo similar al que describimos para el aumento de fuerza por Ang II y ET (46), lo cual creemos otorga validez a la elección de este modelo experimental, que como ya dijimos, es ampliamente usado para los estudios de HC.

Hipertrofia inducida por Ang II y ET-1 en CMRRN

Los CMRRN en cultivo muestran actividad contráctil espontánea, lo cual no fue modificado para el protocolo experimental.

El efecto hipertrófico de Ang II y ET-1 fue evaluado mediante el incremento del área superficial de las células (SC), incorporación de ³H-fenilalanina, contenido de proteína total y expresión del ARNm de ANP.

En los CMRRN estimulados con Ang II, la SC fue 124±3% respecto del control como puede verse en la figura 27 (n=230 con Ang II y n=248 en situación

control, producto de 4 aislamientos de células en cada uno, de los cuales se midieron alrededor de 60 células por tratamiento; $P < 0.05$). Este efecto fue suprimido por TAK044 5 $\mu\text{mol/L}$ ($n=184$, producto de 3 aislamientos).

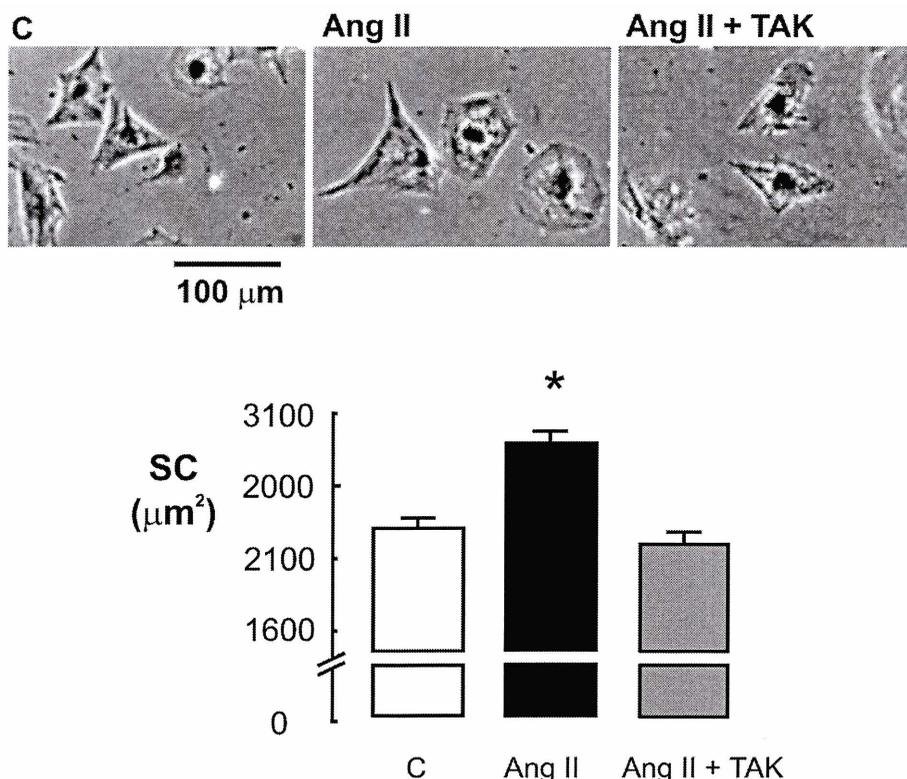


Figura 27: *Tamaño de CMRRN en cultivo como indicador de crecimiento celular.* En el panel superior se muestran fotografías representativas de CMRRN en cultivo en condiciones control y tratados con Ang II en ausencia o en presencia de TAK044. En el panel inferior se muestran los resultados promedio de SC (expresados en μm^2) en las condiciones señaladas. * indica $P < 0.05$ vs. otros grupos.

La Ang II también aumentó la incorporación de ^3H -fenilalanina en un $140.2 \pm 8\%$ respecto del control ($n=8$ para cada situación; $P < 0.05$), efecto que fue disminuido por el bloqueo de los receptores de ET ($116 \pm 6\%$ respecto del control, $n=6$, $P < 0.05$) como se puede observar en la figura 28 (barras lisas). En la misma figura se muestra, en barras rayadas, que el contenido de proteína total aumentó en los CMRRN tratados con Ang II ($123 \pm 6\%$ respecto del control, $n=8$; $P < 0.05$). El pretratamiento con TAK044 mostró una tendencia a reducir dicho aumento pero el cambio no fue estadísticamente significativo ($113 \pm 10\%$, $n=5$ vs control).

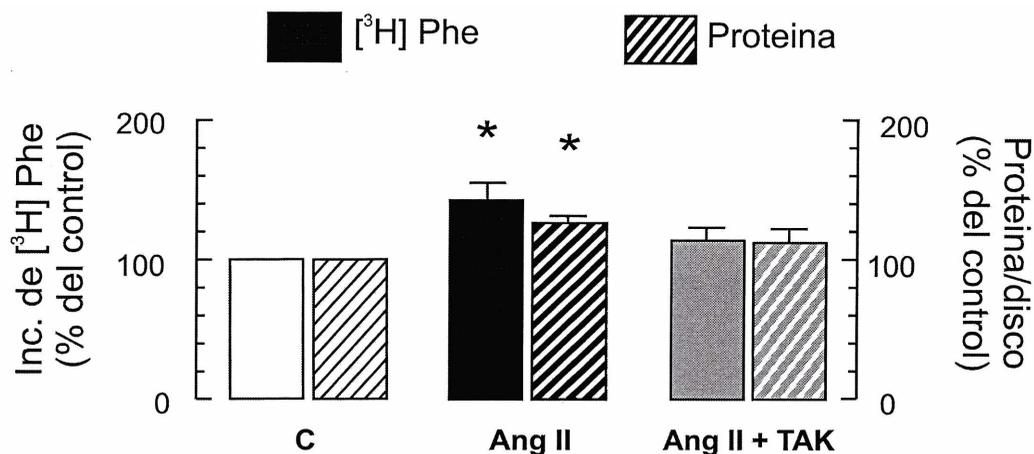


Figura 28: Parámetros utilizados como índices de síntesis proteica. Resultados promedio de incorporación de ³H-Phe (barras lisas) y contenido de proteína total (barras rayadas) en CMRRN en condiciones control y tratados con Ang II en ausencia o presencia de TAK044. * indica P < 0.05 vs. condición control.

Un marcador de hipertrofia frecuentemente utilizado es el nivel de expresión de ANP. El contenido de ARNm para dicho péptido (utilizado como indicador de la expresión de ANP) no mostró cambios significativos en los CMRRN tratados con Ang II ni en aquellos tratados con Ang II+TAK 044 (datos no mostrados), resultados que están en contra de lo esperado. A pesar de ello, consideramos que los resultados permiten decir hasta aquí que 1 nmmol/L de Ang II induce efecto pro-hipertrófico en CMRRN y para que dicho efecto se produzca es necesaria la mediación de Rcs de ET. Esto sugiere que, al igual que el EIP de esta dosis de Ang II, su efecto pro-hipertrófico sería mediado por ET liberada en forma endógena. En función de esa idea se estudió el efecto pro-hipertrófico de ET-1, usando una concentración igual a la utilizada en los experimentos de contractilidad.

Se encontró que en los CMRRN tratados con ET-1 aumentaron todos los marcadores de hipertrofia como se muestra en las siguientes figuras. En la figura 29 se muestra que la SC aumentó un 131±3% respecto del control (n=325 en cada situación; P<0.05) y este efecto fue suprimido por TAK044.

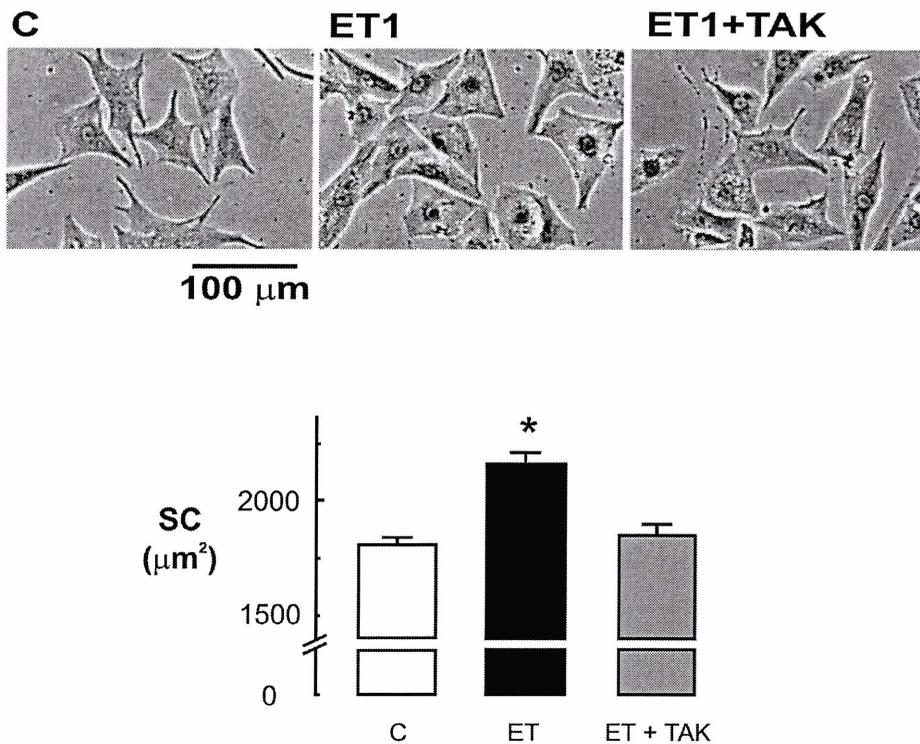


Figura 29: *Tamaño de CMRRN en cultivo como indicador de crecimiento celular.* En el panel superior se muestran fotografías representativas de CMRRN en cultivo en condiciones control y tratados con ET-1 en ausencia o en presencia de TAK044. En el panel inferior se muestran los resultados promedio de SC (expresados en μm^2) en las condiciones señaladas. * indica $P < 0.05$ vs. otros grupos.

En experimentos paralelos se determinó el efecto la inhibición específica de Rcs ET_A con el antagonista BQ123 sobre el aumento de tamaño inducido por ET-1, maniobra que no previno el crecimiento de los CMRRN (figura 30).

Además experimentos preliminares mostraron que el BQ123 no previene el aumento de incorporación de ^3H -Phe que indujo ET-1 (datos no mostrados). En tal sentido, si se revisa la literatura disponible se detecta que los datos acerca de la capacidad del BQ123 para antagonizar el efecto pro-hipertrofico de ET-1 son controvertidos. Mientras algunos autores afirman que este bloqueante ejerce inhibición completa (87, 208), otros encontraron que tanto los receptores ET_A como ET_B están implicados en la hipertrofia por ET-1 (15). Por otro lado, otro trabajo asigna actividad agonista parcial al BQ123 (213).

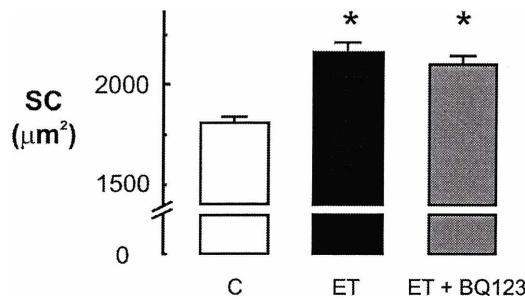


Figura 30: *Tamaño de CMRRN en cultivo como indicador de crecimiento celular.* Resultados promedio de SC (expresados en μm^2) en condiciones control y tratados con ET-1 en ausencia o en presencia de BQ123. * indica $P < 0.05$ vs. condición control.

La incorporación de ^3H -fenilalanina en presencia de ET-1 fue alrededor del doble respecto de los controles (9.49 ± 1.30 vs. 4.45 ± 0.71 nmol/disco, respectivamente, $n=12$ en cada caso; $P < 0.05$) (figura 31). Este efecto de ET-1 se previno con TAK044 (5.09 ± 1.49 nmol/disco, $n=5$; $P < 0.05$). Las barras lisas de la figura 30 muestran datos expresados en % del control y las rayadas los contenidos de proteína total. ET-1 aumentó la proteína en los CMRRN y nuevamente dicho efecto se previno con TAK044. En cada condición experimental, el aumento en la incorporación de ^3H -fenilalanina fue acompañado por un incremento del contenido de proteína total, mostrando una correlación directa entre ambos parámetros.

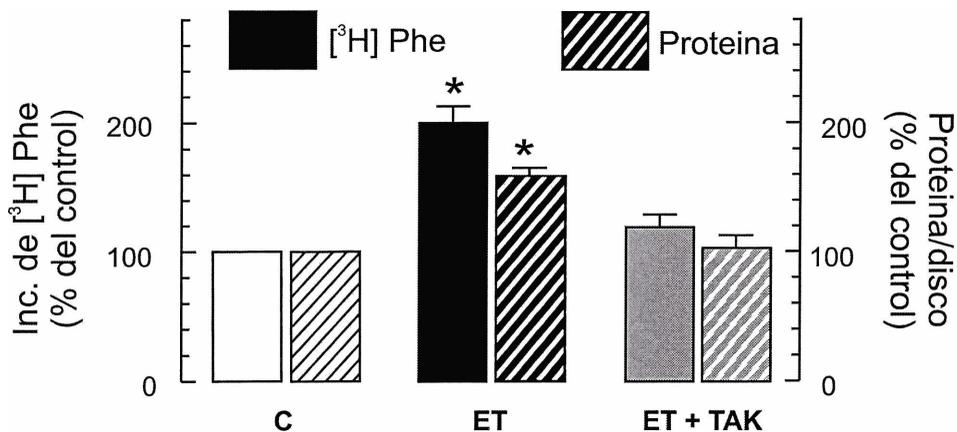


Figura 31: *Parámetros utilizados como índices de síntesis proteica.* Resultados promedio de incorporación de ^3H -Phe (barras lisas) y contenido de proteína total (barras rayadas) en CMRRN en condiciones control y tratados con ET-1 en ausencia o presencia de TAK044. * indica $P < 0.05$ vs. otros grupos.

Cuando se midió la expresión de ANP, se encontró que la ET-1 incrementó el contenido de ARNm para el péptido natriurético en CMRRN hasta un $190 \pm 25\%$ respecto del control ($n=8$, $P < 0.05$) el cual fue prevenido por co-tratamiento con TAK044 (figura 32). El contenido de DNA no fue alterado por ninguno de los tratamientos (ver tabla 2).

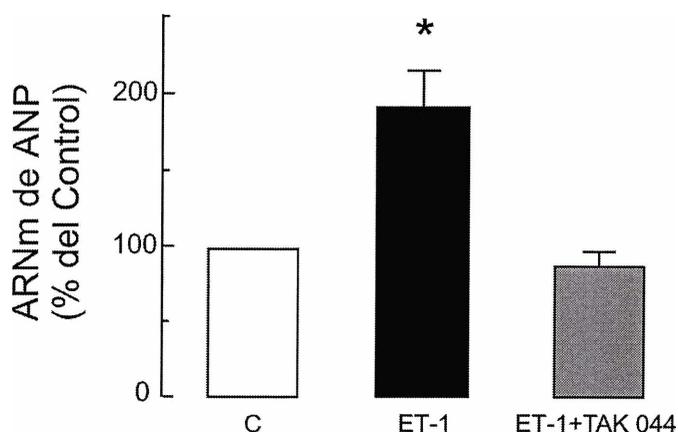


Figura 32: *Expresión del ARNm de ANP como índice de hipertrofia.* Resultados promedio de niveles de ARNm de ANP en CMRRN en condiciones control y tratados con ET-1 en ausencia o presencia de TAK044. * indica $P < 0.05$ vs. otros grupos.

Actividad del NHE-1 en CMRRN

Continuando con el mismo razonamiento aplicado a los resultados de contractilidad, donde se confirmó que ET-1 estimula la actividad del NHE-1, estudiamos la función del intercambiador mediante un ensayo para medir su actividad con el fin de verificar si en el modelo de CMRRN también es activado por dicho péptido agregado en forma exógena. Para esto evaluamos la recuperación del pH_i desde una carga ácida intracelular (método descrito antes en la sección correspondiente) en condiciones donde el único mecanismo regulador del pH_i es el NHE-1 (es decir, en un medio amortiguador HEPES sin HCO_3^-). Durante la fase de recuperación del pH_i , se observó una mayor velocidad de retorno al valor estable en las células tratadas con ET-1 que en las controles como lo muestra la figura 32. En términos del J_{H^+} , la actividad del NHE-1 fue significativamente mayor para los CMRRN tratados con ET-1 respecto de los controles (figura 33).

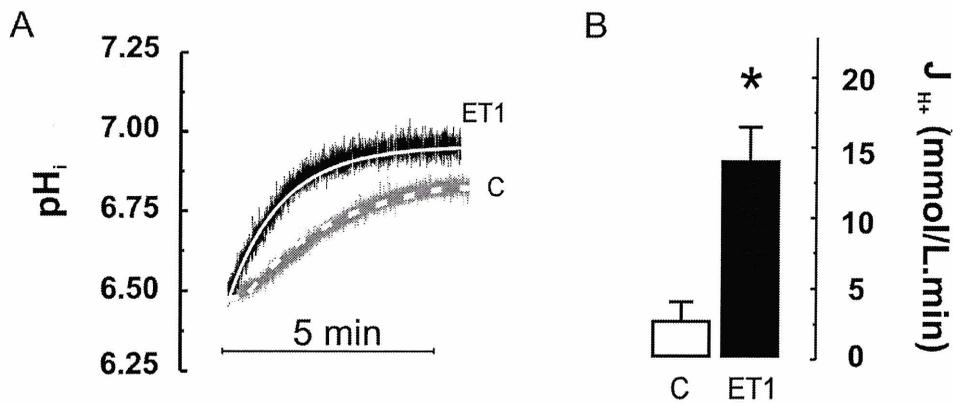


Figura 33: Actividad del NHE-1. (A) Trazos representativos de las fases de recuperación del pH_i desde una carga ácida intracelular usando la técnica del pulso NH_4Cl en CMRRN en condiciones control y tratadas con ET-1. Los ajustes exponenciales de los registros de pH_i vs. tiempo se muestran superpuestos en blanco. (B) Resultados promedio de flujo neto de protones (J_{H^+}) en ambas condiciones. * indica $P < 0.05$ vs. condición control.

La evidencia de que la actividad del NHE-1 fue mayor frente al tratamiento con ET-1 sugiere que en los CMRRN hipertróficos, el contenido de Na^+ debiera ser mayor que en células controles. Para verificar la hipótesis se midió la $[Na^+]_i$, siendo ésta mayor en los CMRRN tratados con ET-1 que en los mantenidos como controles (8.1 ± 1.2 vs. 4.2 ± 1.3 $mmol/L$, $n=4$; $P < 0.05$) (figura 34). Tal como era de esperar, la subida del nivel de Na^+_i fue prevenida por el bloqueo de los receptores de ET con TAK044 (4.2 ± 0.5 $mmol/L$, $n=4$; $P < 0.05$).

A su vez, con el objetivo de comprobar que la causa de dicho aumento era efectivamente debida a la hiperactividad del NHE-1, se determinó la $[Na^+]_i$ en CMRRN tratados con ET-1 y HOE642, observándose que la inhibición del NHE-1 canceló el aumento de Na^+_i (4.9 ± 1.4 $mmol/L$, $n=4$; $P < 0.05$) tal como se muestra en la figura 34. Estos resultados refuerzan la idea de que la elevación de la $[Na^+]_i$ en los CMRRN hipertróficos sería consecuencia de un efecto activador de la ET-1 sobre la el NHE-1.

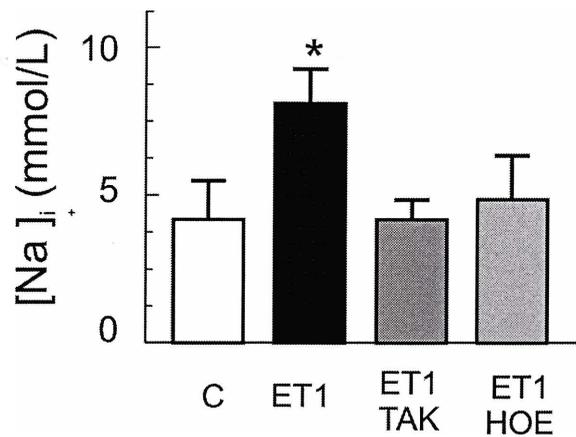


Figura 34: Niveles intracelulares de Na⁺. Se muestran resultados promedio de [Na⁺]_i en CMRRN en condiciones control y tratados con ET-1 en ausencia o presencia de TAK044 o HOE 642. * indica P < 0.05 vs. condición control.

Para descartar la posibilidad de que la mayor actividad del intercambiador se debiera a un mayor número de moléculas en funcionamiento, se determinaron los niveles de expresión de la proteína NHE-1. La figura 35 muestra que la cantidad de NHE-1 expresada fue similar entre miocitos tratados y controles, lo cual permite sugerir que el aumento en la [Na⁺]_i en CMRRN hipertróficos es resultado de una mayor velocidad de funcionamiento del NHE-1.

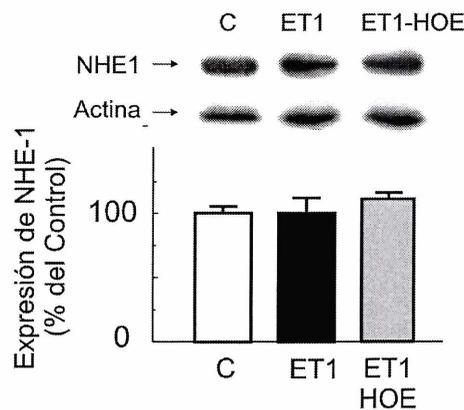


Figura 35: Expresión de la proteína NHE-1, detectada por un ensayo de inmunoanálisis "Western blot". Se muestran resultados promedio del contenido de NHE-1 en CMRRN en condiciones control y tratados con ET-1 en ausencia o en presencia de HOE 642. Los valores se expresan como % respecto del control). n=3 aislamientos distintos. * indica P < 0.05 vs. todos los grupos.

A la luz de los resultados mostrados hasta aquí, el paso siguiente era probar que efectivamente la hiperactividad del NHE-1 estaba relacionada con el efecto pro-hipertrofico de ET-1, para lo cual se exploró el efecto de la inhibición del NHE-1 sobre la hipertrofia miocítica inducida por el péptido. Tal como esperábamos, el HOE642 evitó el desarrollo de hipertrofia en CMRRN, lo cual se evidenció en la totalidad de los parámetros utilizados como indicadores de crecimiento celular. La Figura 36 muestra que la inhibición del NHE-1 previno el aumento de tamaño celular, el aumento de incorporación de ³H-Phe y el aumento del contenido de ARNm de ANP.

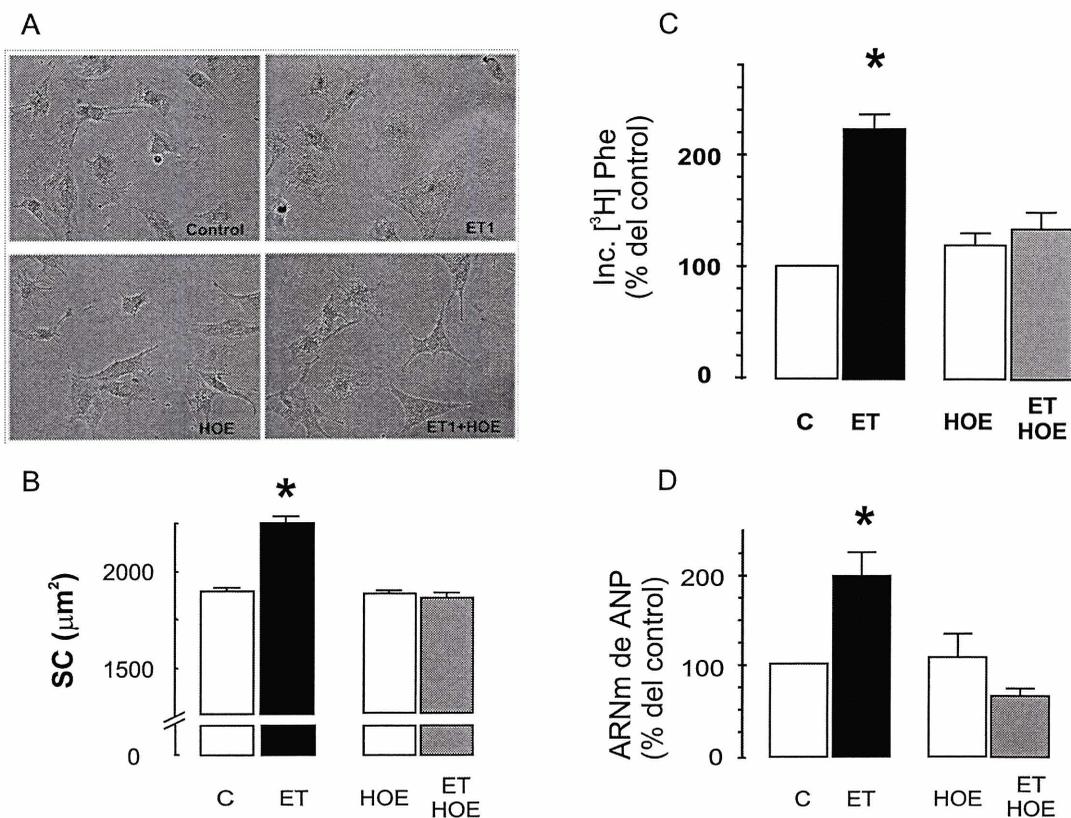


Figura 36: Prevención del efecto hipertrofico de ET-1 por inhibición del NHE-1. (A) Fotografías representativas de CMRRN en cultivo en condiciones control, con HOE 642 y tratados con ET-1 en ausencia o en presencia de HOE 642. (B-D) Resultados promedio de SC (expresados en μm²) (n=300 en control y ET, y n=200 en HOE y ET HOE), de incorporación de ³H-Phe (expresados como % del control; n=12 en control y ET, n=5 en HOE y n=4 en ET HOE) y de expresión de ANP (expresados como % del control; n=8 en control y ET, n=4 en HOE y n=5 en ET HOE). *P < 0.05 vs. control.

Estos datos en conjunto permitieron llegar a una primera conclusión acerca de la participación del NHE-1 en el efecto pro-hipertrófico de ET-1, sugiriendo que el péptido activa al intercambiador, el cual sería responsable no solo del aumento del Na^+_i en los miocitos, sino también de su crecimiento.

$[\text{Ca}^{+2}]_i$ y actividad del NCX en CMRRN hipertróficos

Según la hipótesis planteada, el efecto pro-hipertrófico de ET-1 involucraría un aumento del Ca^{+2}_i como disparador del proceso. Cuando se determinaron los valores de $[\text{Ca}^{+2}]_i$ en los CMRRN estimulados eléctricamente, se observó un incremento en el nivel “diastólico” del ión en algunas células tratadas con ET-1, pero en los resultados generales la diferencia no resultó estadísticamente significativa en comparación con el control. Tampoco el nivel del pico “sistólico” de $[\text{Ca}^{+2}]_i$ durante la contracción fue modificado significativamente por ET-1, aunque mostró una tendencia similar al diastólico (figura 37). Sin embargo el Ca^{+2} citosólico total, evaluado como el área bajo la curva del TCa^{+2} , por integración vs. el tiempo durante el ciclo contráctil, se encontró aumentado en los CMRRN tratados con ET-1 comparado con los controles. Ante este hallazgo, se realizaron las mismas determinaciones en CMRRN tratados con ET-1 en presencia de HOE 642, encontrándose que al igual que para miocitos tratados con ET-1 sola, tampoco había cambios significativos en los niveles de Ca^{+2}_i “diastólico” ni “sistólico” (figura 37 A). Sin embargo, el cálculo del área bajo la curva del TCa^{+2} en dichos miocitos (los que, recordemos, tenían una $[\text{Na}^+_i]$ similar a la control) fue similar a la control (figura 37, B), demostrando que el aumento detectado con ET-1 era sensible a la inhibición del NHE-1 y reforzando aún más la idea de que la activación del NHE-1, mediante la subida de Na^+_i , es disparadora del incremento de la $[\text{Ca}^{+2}]_i$.

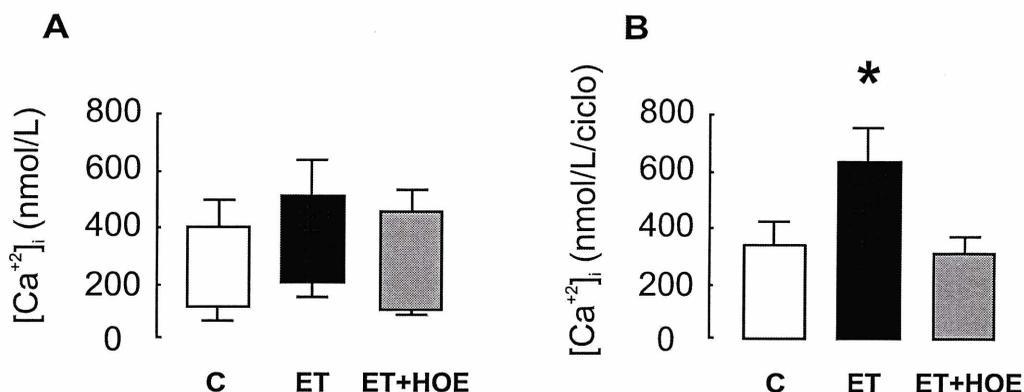


Figura 37: Determinaciones de $[Ca^{+2}]_i$ en CMRRN. (A) Resultados promedio de $[Ca^{+2}]_i$ “diastólico” (nivel inferior) y “sistólico” (nivel superior) en condiciones control y tratados con ET-1 en ausencia y presencia de HOE 642. (B) Resultados promedio del cálculo de la integral del transitorio de Ca^{+2} por ciclo contráctil en las mismas condiciones (n=11, n=9 y n=7, respectivamente). * indica $P < 0.05$ vs. otros grupos.

Frente a los resultados expuestos y siguiendo el mismo razonamiento usado para los experimentos realizados en mp, el siguiente paso fue dilucidar mediante qué mecanismo la activación del NHE-1 producía el aumento de Ca^{+2} . Se planteó anteriormente que el aumento de Na^+ podría alterar el balance de flujos a través del NCX, de tal manera de producir una menor salida de Ca^{+2} (por el modo directo) y/o favorecer una mayor entrada de Ca^{+2} (modo inverso) resultando, en ambos casos, en un aumento de la $[Ca^{+2}]_i$. A pesar de que en los experimentos en mp habíamos demostrado que la activación del NCX_{inv} era responsable del EIP de Ang II y de ET-1, aquí decidimos evaluar ambos modos de funcionamiento del NCX para tener un panorama más completo de la acción de ET-1. El modo directo fue explorado comparando los tiempos de relajación del TCa^{+2} inducido por cafeína, en miocitos tratados con ET-1 vs. controles (figura 38 A). Debido a que el modo directo del NCX es una vía fisiológica de remoción de Ca^{+2} , consideramos que en nuestras condiciones experimentales la medida de la relajación del TCa^{+2} luego de un pulso de cafeína era una buena estimación de la funcionalidad del intercambiador. La ET-1 no modificó la velocidad de relajación de los TCa^{+2} inducidos por cafeína, tal como indican los valores medios de tiempo al 67% de la relajación (Tau)

4.62±1.29 vs. 3.52±0.77 segundos en control y ET-1 respectivamente (n=5 en ambos grupos, ver trazos representativos de la figura 38 B), sugiriendo que el modo directo del NCX no fue afectado por el péptido.

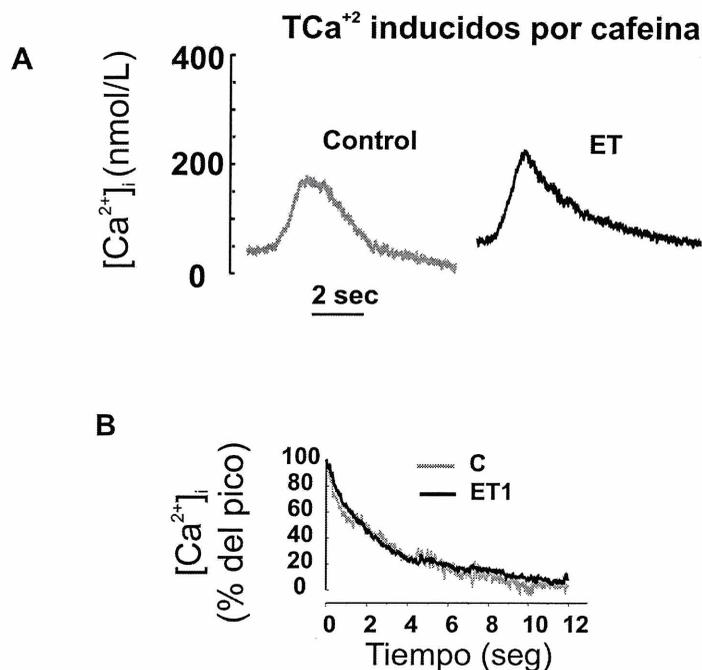


Figura 38: Evaluación del modo directo del NCX en CMRRN. (A) Registros representativos de TCa²⁺ inducidos por un pulso de cafeína en CMRRN en condición control (trazo gris) y tratados con ET-1 (trazo negro). (B) Promedio de las relajaciones de los TCa²⁺ inducidos por cafeína (expresados como % del máximo) en condición control y tratados con ET-1 (n=5).

Para probar la segunda hipótesis que sostiene que el aumento de la [Na⁺]_i en los CMRRN tratados con ET-1 favorecería al NCX_{inv}, se comparó el incremento de la [Ca²⁺]_i luego de forzar la activación del NCX_{inv} en los cultivos control y los estimulados con ET-1 mediante la remoción súbita del Na⁺_e. En la figura 39 se muestran trazos representativos de la entrada de Ca²⁺ tras exponer las células a cero Na⁺_e pudiéndose observar que la cantidad de Ca²⁺ introducido a la célula a través del NCX_{inv} fue mayor en las células tratadas con ET-1 que en las controles. La Figura 40 muestra los promedios generales en cada grupo experimental.

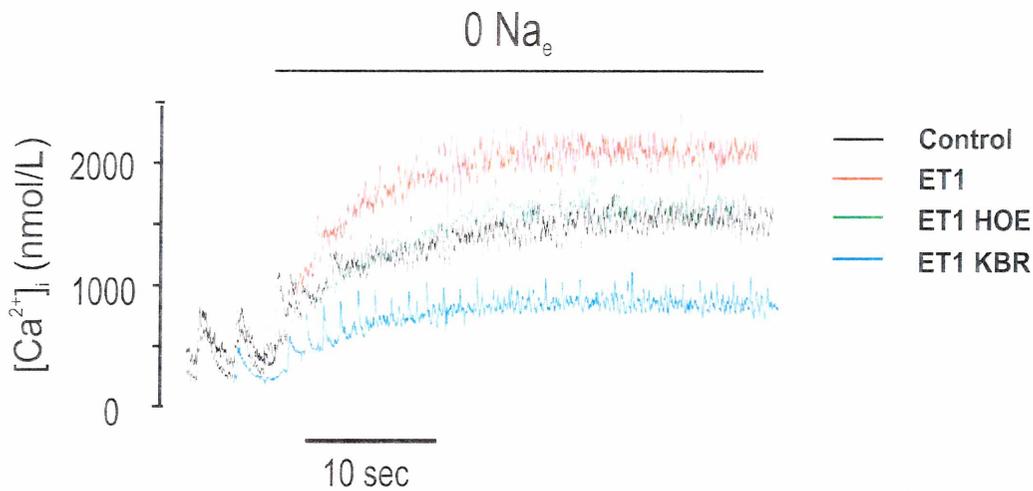


Figura 39: Inducción del NCX_{inv} . Trazos típicos mostrando el efecto de la remoción del Na^+_e sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en CMRRN controles (negro) y tratados con ET-1 en ausencia (rojo) o en presencia de HOE642 (verde) o KB-R7943 (celeste). Cuando se remueve el Na^+_e el NCX comienza a sacar Na^+ del interior celular en intercambio con Ca^{+2} que entra a la célula, maniobra experimental que permite evidenciar el grado de actividad del NCX_{inv} .

Para verificar que esta mayor entrada de Ca^{+2} , inducida por ET-1, era debía al NCX_{inv} , se realizó el mismo protocolo con miocitos tratados con ET-1 en presencia de KB-R7943. La inhibición específica del modo inverso redujo notablemente la entrada de Ca^{+2} hasta valores inferiores a los registrados en condiciones control (figuras 39 y 40). El hecho de no haber encontrado una completa abolición de la entrada de Ca^{+2} a través del NCX en presencia de KB-R7943 (figura 40 A) podría deberse a que la concentración usada de esta droga no fue suficiente. En tal sentido, aunque experimentos piloto demostraron que se requieren $10 \mu\text{mol/L}$ de KB-R7943 para inhibir completamente al NCX_{inv} , para nuestros experimentos se seleccionó la concentración $5 \mu\text{mol/L}$ con el fin de evitar posibles efectos inespecíficos sobre otras corrientes (214).

Una vez confirmado que la ET-1 producía aumento de Ca^{+2}_i por inducir una mayor actividad del NCX_{inv} , restaba comprobar que la fuerza impulsora para dicho aumento de actividad se debía a la mayor $[Na^+]_i$ que tenían esas células tratadas con la hormona, lo cual era mediado por la actividad aumentada del NHE-1. Para esto también se midió la entrada de Ca^{+2} a través del NCX_{inv} en

miocitos tratados con ET-1 y HOE642 (en los cuales el nivel de Na^+_i era similar al control). Como se representa en las figuras 39 (trazo verde) y 40 A, la inhibición del NHE-1 en presencia de ET-1, logró que la entrada de Ca^{+2} no alcance niveles superiores a los alcanzados por las células en condiciones control.

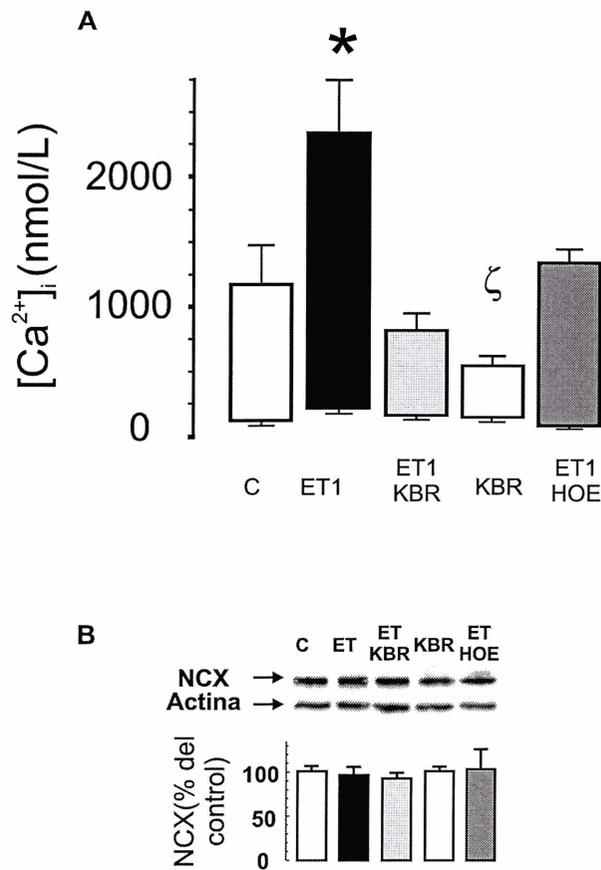


Figura 40: Actividad del NCX_{inv} en CMRRN. (A) Resultados promedio de la $[Ca^{2+}]_i$ máxima alcanzada durante la ausencia de Na^+_e y valores del nivel "diastólico", en condiciones control y tratados con ET-1 en ausencia y presencia de KB-R7943 o HOE 642. (B) Resultados promedio de la expresión de la proteína NCX, por análisis de Western blot en las mismas condiciones. * $P < 0.05$ vs el todos los grupos; $\zeta P < 0.05$ vs. condición control.

Como se muestra en la figura 40, la $[Ca^{+2}]_i$ diastólica no se modificó en forma significativa con ningún tratamiento. Como era de esperar luego de lo expuesto hasta aquí, los CMRRN tratados con ET-1 y KB-R7943 no presentaron diferencias en la $[Ca^{+2}]_i$ total respecto de la situación control (326 ± 27

nmol/L/ciclo, n=5), es decir que la inhibición del NCX_{inv} previno completamente el aumento de Ca⁺²_i promovido por ET-1.

Al igual que lo encontrado para el NHE-1, no se registraron cambios en la expresión de la proteína NCX entre los diferentes grupos experimentales (figura 40 B), por lo tanto los resultados sugieren que la mayor entrada de Ca⁺² por el NCX_{inv}, en los CMRRN tratados con ET-1, podría ser debida a una mayor fuerza impulsora sobre el intercambiador y no a una mayor cantidad de unidades transportadoras.

Con el objeto de probar que el mecanismo propuesto para el aumento del Ca⁺²_i por ET-1 a través del NCX_{inv} estaría también involucrado en el efecto hipertrófico del péptido, se evaluaron los parámetros indicadores de hipertrofia en miocitos tratados con ET-1 en presencia de KB-R7943. Se encontró que la inhibición del NCX_{inv} suprimió tanto el incremento del SC (figura 41 A) que inducía la ET-1 en los CMRRN como el aumento de la expresión de ANP (figura 41 B y D). Aunque con KB-R7943 se observó una disminución del tamaño comparado con el grupo de los controles, ese efecto fue similar al producido por el solvente utilizado como vehículo del KB-R7943, el dimetilsulfóxido (DMSO). Sin embargo ni el KB-R7943 sólo ni el DMSO modificaron la incorporación de ³H-fenilalanina o la expresión del ARNm del 107±5 y 127±21%, n=5, respectivamente. Por otro lado, el KB-R7943 redujo significativamente el aumento de incorporación de ³H-fenilalanina inducido por ET-1, como se ve en la figura 41 C.

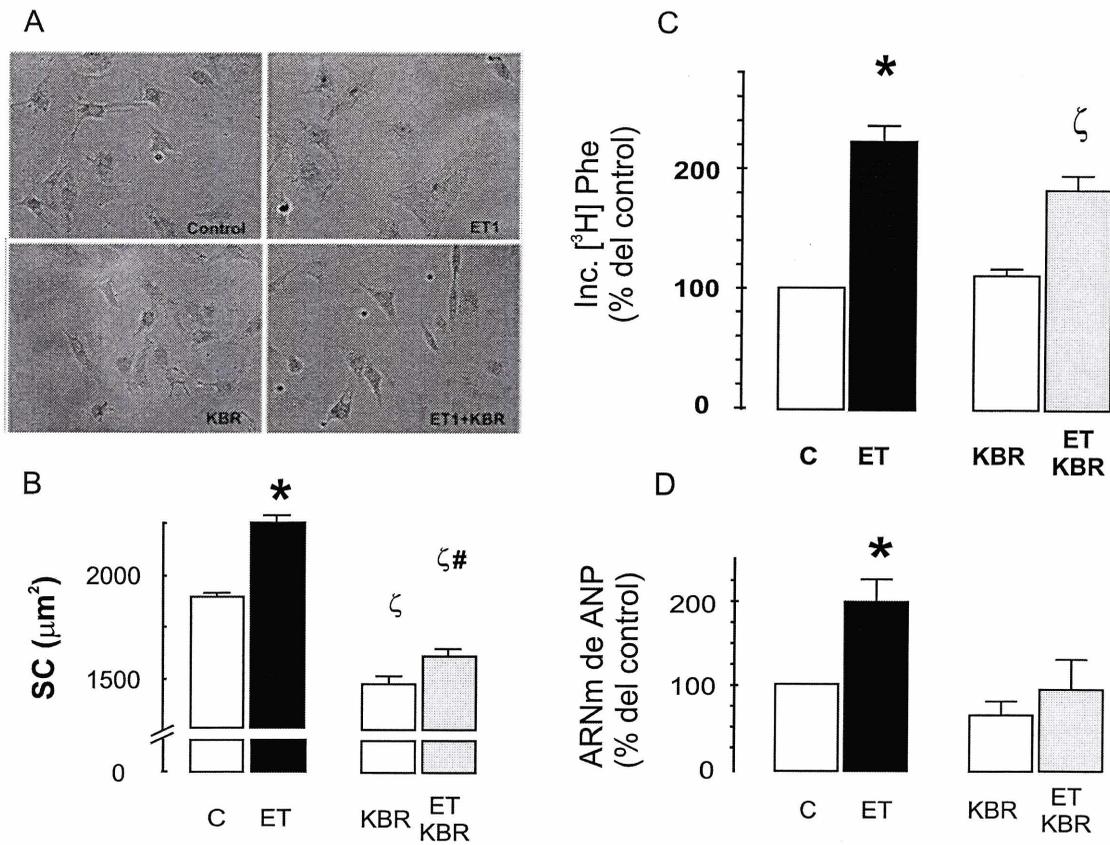


Figura 41: Prevención del efecto pro-hipertrófico de ET-1 por inhibición del NCX_{inv} . (A) Fotografías representativas de CMRRN en cultivo en condiciones control, con KB-R7943 y tratados con ET-1 en ausencia o en presencia de KB-R7943. (B-D) Resultados promedio de SC (expresados en μm^2) ($n=300$ en control y ET, y $n=200$ en KB-R y $n=280$ en ET KB-R), de incorporación de 3H -Phe (expresados como % del control; $n=12$ en control y ET, $n=6$ en KB-R y $n=7$ en ET KB-R) y de expresión de ANP (expresados como % del control; $n=8$ en control y ET, $n=4$ en KB-R y ET KB-R). * $P < 0.05$ vs. todos los grupos. ζ indica $P < 0.05$ vs. control. # indica $P < 0.05$ vs. KB-R.

Como dato extra, se encontró una buena correlación entre la síntesis de proteína nueva en los miocitos (nivel de fijación de 3H -Phe) y el contenido de proteína total (figura 42). Se comprobó que el contenido de ADN por disco fue similar en todas las condiciones experimentales, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (ver tabla 1). Esto verifica que no existieron efectos proliferativos en las condiciones indicadas.

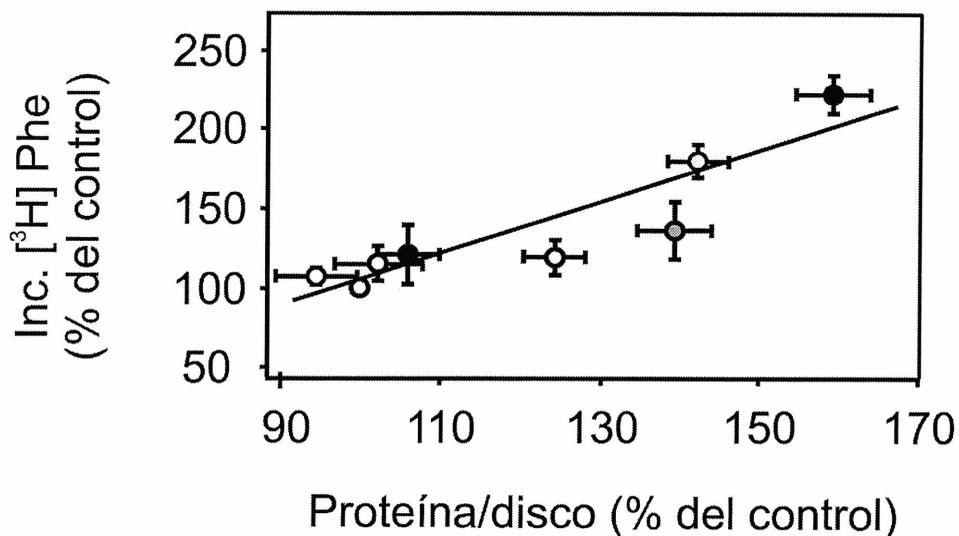


Figura 42: Correlación entre la incorporación promedio por disco de ³H-Phe en cada tratamiento en función del su respectivo valor promedio de contenido de proteína total (r=0.8914).

Contenido de ADN (µg/disco)

Control	ET-1	ET + HOE	ET + KBR	HOE	KBR	ET + TAK
1.23 ± 0.15	1.36 ± 0.13	1.35 ± 0.15	1.30 ± 0.09	1.35 ± 0.14	1.22 ± 0.12	1.19 ± 0.12
(n = 8)	(n = 8)	(n = 4)	(n = 7)	(n = 4)	(n = 7)	(n = 4)

Tabla 1: resumen del contenido promedio de ADN por disco de cultivo de CMRRN en las condiciones experimentales indicadas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN

Los resultados expuestos permiten inferir que una concentración de Ang II del orden de los niveles fisiológicos del péptido, produce un EIP sobre el músculo cardíaco que es enteramente debido a la liberación/formación de ET endógena. La ET, actuando de un modo autocrino/paracrino, promueve la activación del NHE-1, el cual incrementa la $[Na^+]_i$, activa el modo inverso del NCX y promueve así la entrada de Ca^{+2} a la célula con el consecuente aumento de fuerza contráctil. Nuestros resultados sugieren además que esta misma ruta es responsable del desarrollo de hipertrofia inducida por la Ang II/ET-1 cuando se administran crónicamente.

En las siguientes secciones intentaremos discutir los aspectos más salientes de nuestros hallazgos y, en la medida de lo posible, establecer comparaciones con resultados publicados por otros autores

“Cross talk” Ang II-ET

En las últimas dos décadas ha crecido considerablemente la evidencia de que muchos de los efectos clásicamente atribuidos a Ang II son en realidad mediados por ET endógena (86-88, 90, 215-222). Nuestros hallazgos, si bien basados exclusivamente en intervenciones farmacológicas, proveen nueva evidencia en favor de dicho “cross talk”, ya que muestran que tanto el EIP como el efecto pro-hipertrofico de bajas dosis de Ang II están mediados por liberación/formación de ET endógena. Por otra parte, nos permitimos sugerir que el único “cross talk” posible entre estos dos péptidos sería en el sentido Ang II → ET, ya que la relación inversa no parece probable, en virtud de que el efecto de ET-1 no fue prevenido por bloqueo de Rcs AT_1 (Figura 20).

Es importante remarcar que los experimentos en mp fueron realizados con bloqueo de receptores α_1 y β_1 adrenérgicos, descartando así la posibilidad de

que la liberación de catecolaminas por Ang II pudiera influir sobre los resultados (223).

Respecto de si la interrelación propuesta es de naturaleza autocrina o paracrina, el hecho de utilizar preparaciones multicelulares como los mp no permite descartar la potencial participación de otros tipos celulares diferentes a los miocitos. Sin embargo, basándonos en nuestros propios resultados en CMRRN donde el grado de contaminación con otras células no miocíticas es despreciable y en resultados previos de este mismo laboratorio en miocitos adultos aislados (180), nos permitimos sugerir que tal interrelación sería autocrina.

EIP de una dosis baja de Ang II. Mecanismo propuesto

En ausencia de cambios de pH_i , como sucede en nuestros experimentos (figura 21), el EIP de ET (propuesto mediador de Ang II) se atribuye a un aumento del TCa^{+2} mediado por el NCX_{inv} . Si bien otros autores también han mostrado que el aumento en el TCa^{+2} provocado por ET-1 es susceptible a la inhibición del NCX_{inv} por KB-R7943, se ha sugerido la posibilidad de una contribución sinérgica entre el NCX_{inv} (148) y los canales de Ca^{+2} tipo L (120, 224). Nosotros no descartamos esta posibilidad, pero proponemos que estos dos efectos serían dosis dependiente y podrían manifestarse en zonas diferentes de la curva dosis-respuesta ET vs. pCa . En otras palabras, el efecto sobre el NCX predominaría en el comienzo de la curva, es decir a bajos pCa , mientras que en zonas altas de la misma quedaría eclipsado por la predominancia de la estimulación de los canales de Ca^{+2} tipo L. Nuestra idea encuentra sustento además en un trabajo previo donde se demuestra la existencia de una pequeña contribución del NCX_{inv} en el EIP de dosis máximas de Ang II (89), condición en la cual la principal vía de aumento del TCa^{+2} es a través de los canales de Ca^{+2} tipo L. Por otro lado, y desde el punto de vista de la contractilidad miocárdica, pareciera razonable esperar que a valores de pCa máximos donde los sitios de

unión de Ca^{+2} a la troponina C se encuentran saturados, un pequeño cambio en el TCa^{+2} por acción del NCX_{inv} no afecte el desarrollo de tensión.

Hipertrofia cardíaca inducida por una dosis baja de Ang II

Como ya se dijo en Introducción la HC ocurre en respuesta a numerosos estímulos fisiológicos y fisiopatológicos, y las rutas de señalización involucradas en el proceso son muy complejas. En este trabajo demostramos que el efecto pro-hipertrófico de una dosis baja de Ang II es mediado por ET endógena a través de un mecanismo probablemente autocrino similar al que indujo un EIP de ~20-25% en mp aislados. Nuestros resultados apoyan la idea de que una entrada de Ca^{2+} a la célula por estimulación del NCX_{inv} es el disparador de la hipertrofia por Ang II/ET ya que la inhibición específica del NCX_{inv} con KB-R7943 redujo el efecto pro-hipertrófico de ET-1 (figura 41). Además describimos que el incremento de la actividad del NCX_{inv} está íntimamente ligado al aumento de la $[\text{Na}^+]_i$ mediada por la actividad del NHE-1. Por otra parte, es importante destacar que los cambios en la actividad del NCX sucedieron sin modificaciones en la expresión de la proteína (figura 40 B), lo cual podría haber afectado *per se* tanto la salida como entrada de Ca^{+2} a la célula a través del NCX. En este sentido, Takimoto y colaboradores reportaron que ratones con expresión disminuida del NCX exhibían mejora de la función sistólica y mayor respuesta hipertrófica a la sobrecarga de presión, lo que fue atribuido a la menor salida de Ca^{+2} (225). La menor expresión del NCX deprime tanto la velocidad de subida del TCa^{+2}_i como la velocidad de relajación y de esa manera aumenta marcadamente el nivel diastólico de $[\text{Ca}^{+2}]_i$ (226). En ratones que sobreexpresan el NCX se ha reportado una aceleración del tiempo al pico de la contracción y de la velocidad de relajación (227), un mayor contenido de Ca^{+2} en el RS (228) y una respuesta contráctil potenciada frente al aumento de la entrada de Na^+ a la célula muscular (227), datos estos últimos compatibles con una mayor actividad del NCX_{inv} , y por lo tanto con nuestros resultados.

La estimación matemática del E_{NCX} predice que la entrada de Ca^{+2} vía NCX puede suceder en los CMRRN bajo condiciones control y que la misma podría ser sustancialmente aumentada por estimulación con ET-1. Independientemente de ello, asumir que en nuestras condiciones experimentales la $[Na^+]_i$ y el TCa^{+2}_i fueron uniformes en todo el citosol pareciera una sobre simplificación, ya que no estamos en condiciones de asegurar que no existan gradientes intracelulares tanto para Na^+ como para Ca^{+2} , durante la contracción de la célula muscular, con cambios probablemente más pronunciados en la región subsarcolemal respecto de zonas mayoritarias del citosol donde se encuentra el indicador fluorescente. Esto obliga a considerar sus potenciales consecuencias: 1) una mayor $[Na^+]_i$ a nivel subsarcolemal que la detectada por nosotros favorecería el funcionamiento del NCX_{inv} ; 2) una mayor $[Ca^{+2}]_i$ subsarcolemal en cambio limitaría la entrada neta de Ca^{+2} a la célula vía NCX. En cualquiera de los casos, nuestra conclusión pareciera no peligrar ya que podríamos incluso argumentar que KB-R7943 fue efectivo en limitar el desarrollo de HC aún cuando existen grandes chances de que una mayor $[Ca^{+2}]_i$ subsarcolemal estuviera minimizando el efecto.

Otro aspecto a considerar es que el papel fisiológico de la entrada de Ca^{+2} por el NCX en el tejido ventricular adulto es muy controvertido (143), en tanto que en células ventriculares de recién nacidos, donde el PA es más prolongado y tanto la expresión de la proteína NCX como su corriente son mayores (133, 229), dicha entrada de Ca^{+2} podría cobrar más importancia. Esto podría desafiar la comparación entre ambos modelos experimentales. A pesar de ello, consideramos que las evidencias mostradas de que Ang II disparó rutas intracelulares similares para producir EIP en miocardio adulto y HC en neonatos validan la comparación.

En este trabajo se demuestra que la hipertrofia inducida por vía Ang II/ET-1 se previene por la inhibición del NHE-1, lo cual es consistente con una gran cantidad de datos previos que muestran la efectividad de la inhibición del NHE-1 para prevenir o inducir regresión de HC en distintos modelos experimentales

(21, 22). Aunque pareciera obvio pensar que la inhibición del NHE-1 debiera culminar en una disminución del Ca^{2+}_i , conocido factor de crecimiento, el mecanismo responsable del efecto antihipertrófico de la inhibición del NHE-1 no está plenamente aclarado, más aún, algunos autores han asociado aumentos de la $[Na^+]_i$ y no de Ca^{2+}_i con el crecimiento celular (230, 231). En tal sentido, si nos remitimos a los resultados aquí expuestos observaremos que la actividad del NHE-1 fue mayor en los CMRRN tratados con ET-1 y que la mayor $[Na^+]_i$ de estas células se normalizó inhibiendo al NHE-1 (figuras 33 y 34). Sin embargo, no debemos olvidar que la inhibición del NHE-1 normalizó también el incremento de la $[Ca^{+2}]_i$ citosólico y la mayor entrada de Ca^{+2} a través del NCX_{inv} (promovido por la remoción del Na^+_e) en aquellos miocitos neonatales que habían sido tratados con ET-1 (figura 36), a la vez que previno el desarrollo de hipertrofia (figura 39), sugiriendo una fuerte conexión entre ambos efectos. En conexión con esto, la elevación de la $[Ca^{+2}]_i$ ha sido vastamente implicada en la señalización de la HC (232, 233). En nuestras condiciones experimentales se observó un aumento de la $[Ca^{+2}]_i$ total citosólica (figura 37). También, como se mencionó antes, la subida de la $[Ca^{+2}]_i$ promovida por la eliminación del Na^+_e fue marcadamente mayor en los CMRRN expuestos a ET-1, efecto que puede ser claramente atribuido a un aumento de la función del NCX_{inv} en presencia del péptido (figura 40). Por otro lado, nuestros datos no permiten descartar la existencia de un efecto directo (Na^+ -independiente) de ET-1 sobre el NCX como ya se ha descrito (234, 235).

Se podría argumentar que la maniobra utilizada para estudiar el NCX_{inv} (remoción de Na^+ extracelular) dista mucho de las condiciones fisiológicas normales. Sin embargo, podría existir una condición similar durante el transcurso de los PA si el nivel de $[Na^+]_i$ está elevado, situación en la que la fuerza impulsora sobre el NCX favorece su modo inverso (214), ya que el V_m superaría durante más tiempo el valor de E_{NCX} (214, 236-238).

El hecho de que ET-1 promueva una prolongación del PA (239) sería otro dato a favor del mecanismo propuesto. También se ha contemplado la posibilidad de

que el aumento de la $[Na^+]_i$ produjera una disminución de la salida de Ca^{+2} vía el NCX en modo directo (240). Sin embargo, se encontró que este efecto no pudo haber contribuido a los resultados obtenidos pues no se detectó ningún cambio significativo en la velocidad de relajación de los TCa^{+2} inducidos por cafeína en los CMRRN hipertróficos (figura 38). Nuestros datos coinciden con resultados previos en un modelo de HC inducida por catecolaminas (241).

Un hallazgo inesperado fue el hecho de que los CMRRN con KB-R7943 presentaron una disminución de la SC respecto de los controles. Este efecto no estuvo asociado con reducción de la incorporación de 3H -Phe o expresión del ARNm de ANP sugiriendo que no fue debido a una disminución generalizada del crecimiento celular. Aún no se ha encontrado una explicación satisfactoria para esto, pero el hecho de que el DMSO produzca un efecto similar, permite suponer la posibilidad de una acción no específica del diluyente de la droga sobre el tamaño de las células.

Es importante señalar que el aumento de la incorporación de 3H -Phe inducido por ET-1 no fue completamente prevenido al inhibir el NCX_{inv} (figura 41). Ello puede deberse, al menos a dos posibles razones: 1) Podría atribuirse a que la dosis de KB-R7943 utilizada no inhiba completamente al NCX_{inv} , quedando una actividad remanente; 2) Podríamos pensar que el aumento del Na^+_i es el responsable del efecto hipertrófico pero activando más de un mecanismo, entre los que se incluye la activación del NCX_{inv} . Sin embargo, para que esta segunda opción se cumpla deberíamos asumir que la activación del NCX_{inv} es suficiente para justificar toda la acción de Ang II o de ET-1 sobre el inotropismo, pero no sobre el efecto hipertrófico. Tampoco se descarta que las diferencias observadas respecto a la participación del NCX en el mecanismo propuesto, se deban a diferencias entre especies o incluso a diferencias atribuibles al estado madurativo entre los modelos utilizados.

En resumen, estos datos representan la primera evidencia de que el NCX_{inv} es una ruta de entrada de Ca^{+2} ligada a la hipertrofia cardíaca producida por Ang II/ET-1 en CMRRN.

Resultados publicados por Zhu y colaboradores (29) así como datos recientes de nuestro laboratorio (242), muestran que ET-1 produce hipertrofia del cardiomiocito a través de la activación de la vía de CaMKII -y calcineurina-. En el presente trabajo no se determinaron ninguno de esos mediadores, pero se logra identificar una nueva vía de aumento de la $[\text{Ca}^{+2}]_i$ en respuesta a Ang II/ET-1, como responsable de la activación de dichas señales intracelulares pro-hipertroóficas. Por otro lado, no se descarta que otras vías de señalización también dependientes de Ca^{+2} pudieran estar contribuyendo al desarrollo de HC por estos péptidos. En tal sentido, un reporte reciente muestra que la liberación de Ca^{+2} perinuclear dependiente de IP_3 y la subsecuente activación de CaMKII median la hipertrofia inducida por ET-1 en cardiomiocitos adultos (77). Si bien es cierto que los miocitos ventriculares adultos difieren marcadamente de los CMRRN cultivados, estos últimos responden en muchos aspectos con cambios celulares similares a los observados en corazones hipertroóficos adultos in vivo. A pesar de ello, sería interesante en un futuro corroborar en qué proporción participa esta secuencia de eventos en el corazón adulto. Por otro lado, es importante remarcar que la secuencia de eventos descrita aquí para Ang II exógena es similar a la que genera la segunda fase de fuerza post-estiramiento del miocardio (46), uno de los eventos más precoces en el desarrollo de HC (14, 15).

Por último, y desde un punto de vista clínico, nuestros hallazgos avalan el potencial uso de inhibidores del NHE-1 para prevenir el desarrollo de HC, tal como se ha propuesto antes (243) pero además identifican otro potencial blanco terapéutico para el control de la patología, el NCX_{inv} .

CONCLUSIÓN FINAL

Nuestros resultados avalan la idea de que el EIP de una dosis baja de Ang II es debido enteramente a ET endógena, la cual a través de receptores específicos activa al NHE-1, aumentando el Na^+_i (sin modificaciones del pH_i) y luego el TCa^{+2}_i . Esta entrada de Ca^{+2} no sólo afectaría el desarrollo de fuerza, sino que sostenida en el tiempo sería la responsable del efecto pro-hipertrófico del péptido.

REFERENCIAS

1. Frank JS, Langer GA. The myocardial interstitium: its structure and its role in ionic exchange. *J Cell Biol* 1974;60:586-601.
2. Reiss K, Kajstura J, Capasso JM, Marino TM, Anversa P. Impairment of myocyte contractility following coronary artery narrowing is associated with activation of the myocyte IGF₁ autocrine system, enhanced expression of late growth related genes, DNA synthesis, and myocyte nuclear mitotic division in rats. *Exp Cell Res*. 1993(2):207:348-360.
3. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Anversa P. The IGF-1-IGF-1 receptor system modulates myocyte proliferation but not myocyte cellular hypertrophy in vitro. *Exp Cell Res*. 1994;215(2):273-283.
4. Dorn II GW, Force T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*. 2005;115:527-537.
5. Selvetella G, Hirsch E, Notte A, Tarone G, Lembo G. Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. *Cardiovas Res* 2004;63:373-380.
6. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad and the ugly. *Annu Rev Physiol*. 2004;65:45-79.
7. Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*. 2004;109:1580-1589.
8. Johnatty SE, Dyck JR, Michael LH, Olson EN and Abdellatif M. Identification of gene regulated during mechanical load-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:805-815.
9. Lorell BH and Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*. 2000;102:470-479.
10. Klem M, Feelisch M, Krebber T, Deussen A, Motz W and Strauer BE. Role of nitric oxide in the regulation of coronary vascular tone in heart from hypertensive rats. Maintenance of nitric oxide-forming capacity and increased basal production of nitric oxide. *Hypertension*. 1995;25:186-193.
11. Feldman AM, Weinberg EO, Ray PE and Lorell BH. Selective change in cardiac gene expression during compensatory hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ Res*. 1993;73:284-292.
12. Parker TG. Molecular biology of cardiac growth and hypertrophy. *Herz*. 1993;18(4):245-255.

13. Schaub MC, Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM. Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med.* 1997;75(11-12):901-920.
14. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell.* 1993;75:977–984.
15. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y. Endothelin is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 1996;271:3221-3228.
16. Kojima M, Shiojima I, Yamazaki T, Komuro I, Zou Y, Ying W, Mizuno T, Ueki K, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Yazaki Y. Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 induces regression of hypertensive left ventricular hypertrophy in vivo and inhibit the intracellular signalling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy in vivo. *Circulation.* 1994;89:2204-2211.
17. Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Fujisaki H, Adachi S, Akimoto H, Ohta Y, Marumo F. Endothelin ETA receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload. *Circulation.* 1994;89:2198-2203.
18. Kramer BK, Smith TW, Kelly RA. Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes. Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent Na^+/H^+ exchanger. *Circ Res.* 1991;68:269–279.
19. Matsui H, Barry WH, Livsey C, Spitzer KW. Angiotensin II stimulates sodium–hydrogen exchange in adult rabbit ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 1995;29:215–221.
20. Moor AN and Fliegel L. Protein kinase-mediated regulation of the Na^+/H^+ exchanger in the rat myocardium by mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *J Biol Chem.* 1999;274:22985–22992.
21. Cingolani HE and Camili3n de Hurtado MC. Na^+-H^+ exchanger inhibition: a new antihypertrophic tool. *Circ Res.* 2002;90:751–753.
22. Fliegel L and Karmazyn M. The cardiac Na^+/H^+ exchanger: a key downstream mediator for the cellular hypertrophic effects of paracrine, autocrine and hormonal factors. *Biochem Cell Biol.* 2004;82:626–635.
23. Cingolani HE. Na^+/H^+ exchange hyperactivity and myocardial hypertrophy: are they linked phenomena? *Cardiovas Res.* 1999;44:462-467.

24. De la Sierra A, Coca A, Pare JC, Sanchez M, Valls V, Urbano-Marquez A. Erythrocyte ion fluxes in essential hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 1993;88:1628-1633.
25. Pérez NG, Álvarez BV, Camilión de Hurtado MC, Cingolani HE. pH_i regulation in myocardium of spontaneously hypertensive rat. Compensated enhanced activity of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Circ Res*. 1995;77:1192-1200.
26. Schussheim AE, Radda GK. Altered Na⁺/H⁺ exchange activity in the spontaneously hypertensive perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27:1475-1481.
27. Cingolani HE, Rebolledo OR, Portiansky EL, Pérez NG, Camilión de Hurtado MC. Regression of hypertensive myocardial fibrosis by Na⁺/H⁺ exchange inhibition. *Hypertension*. 2003;41(2):373-377.
28. Camilión de Hurtado MC, Portiansky EL, Pérez NG, Rebolledo OR, Cingolani HE. Regression of cardiomyocyte hypertrophy in SHR following chronic inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Cardiovasc Res*. 2002;53(4):862-868.
29. Zhu W, Zou Y, Shiojima I, Kudoh S, Aikawa R, Hayashi D, Mizukami M, Toko H, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem*. 2000;275:15239-45.
30. Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac Actions of Angiotensin II: Role of an Intracardiac Renin-Angiotensin System. *Annu Rev Physiol*. 1992;54:227-241.
31. Braun-Menéndez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Muñoz JM. The Substance Causing Renal Hypertension. *J Physiol*. 1940;98:283-298.
32. Johnston CI. Renin Angiotensin System: A Dual Tissue and Hormonal System for Cardiovascular Control. *J Hypertension*. 1992;10:S13-S26.
33. Kunapuli SP, Kumar A. Molecular Cloning of Human Angiotensinogen cDNA and Evidence for the Presence of its mRNA in Rat Heart. *Circ Res*. 1987;60:786-790.
34. Cingolani HE, Housay AB. Control de la presión arterial. En *Fisiología Humana de Housay*. Sección IV Sistema Circulatorio. (ed) El Ateneo, pp 334-352, Buenos Aires, 2000.
35. Tsai BS, Peach MJ, Khosla MC, Bumpus FM. Synthesis and evaluation of (Des-Asp1) angiotensin I as a precursor for (Des-Asp1) angiotensin II (Angiotensin III). *J Med Chem*. 1975;18(12):1180-1183.

36. Jan Danser AH, Saris JJ, Schuijt MP, van Kats JP. Is there a local renin-angiotensin system in the heart? *Cardiovascular Res.* 1999;44:252-265.
37. Dostal DE, Baker KM. The cardiac renin-angiotensin system. Conceptual or a regulator of cardiac function? *Circ Res.* 1999;85:643-650.
38. Denyer R, Sanghi S, Kumar R and Dostal DE. Regulation of the renin-angiotensin system by mechanical stretch. En el capítulo "Novel aspects of mechanical signaling in cardiac tissue" de *Signal transduction and cardiac hypertrophy.* Kluwer Academic Publishers, p. 192-200. Boston, Dordrecht, Londres.
39. Hirsch AT, Pinto YM, Schunkert H, Dzau VJ. Potential role of the tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 1990;66(11):22D-30D.
40. Dostal DE, Rothblum KC, Conrad KM, Cooper GR, Baker KM. Detection of angiotensin I and II in cultured rat cardiac myocyte and fibroblasts: Evidence for local production. *Am J Physiol (Cell Physiol).* 1992;263:C851-C863.
41. Dell'Italia LJ, Meng QC, Balcells E, Wei CC, Palmer R, Hageman GR, Durand J, Hankes GH, Oparil S. Compartmentalization of Angiotensin II generation in the dog heart: evidence for independent mechanisms in intravascular and interstitial spaces. *J Clin Invest.* 100;253-258.
42. Miyata S, Haneda T, Osaka J, Kikuchi K. Renin-angiotensin system in stretch-induced hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells. *Eur J Pharmacol.* 1996;307:81-88.
43. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Mizuno T, Takano H, Hiroi Y, Veki K, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Yazaki Y. Angiotensin II partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 1995;77:258-265.
44. Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhorta A, Kajstura J, Anversa P. Stress mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decrease the Bcl-2-to-bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest.* 1998;101:1326-1342.
45. Malhotra R, Izumo S. Mechanical Stress, Local Renin-Angiotensin System and Cardiac Hypertrophy. En "Angiotensin II Receptor Blockade: Physiological and Clinical Implications". Ed by Dhalla NS y col. Kluwer Academic Publishers, 269-282, 1998.

46. Alvarez BV, Pérez NG, Ennis IL, Camilión de Hurtado MC, Cingolani HE. Mechanisms underlying the increase in force and Ca^{+2} transient that follow stretch of cardiac muscle: a possible explanation of the Anrep effect. *Circ Res.* 1999;85:716-722.
47. Kentish JC and Wrzoseck A. Changes in force and cytosolic Ca^{+2} concentration after length changes in isolated rat ventricular trabeculae. *J Physiol (Lond).* 1998;506:431-444.
48. Sadoshima J and Izumo S. Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *EMBO J.* 1993;12:1681-1692.
49. Cingolani HE, Pérez NG, Camilión de Hurtado MC. An autocrine/paracrine mechanism triggered by myocardial stretch induced changes in contractility. *News Physiol. Sci.* 2001;16:88-91.
50. Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev.* 1977;57(2):313-370.
51. Dudley DT, Panek RL, Major TC, Lu GH, Bruns RF, Klinkefus BA, Hodges JC, Weishaar RE. Subclasses of angiotensin II binding sites and their functional significance. *Mol Pharmacol.* 1990;38(3):370-377.
52. Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;163(1):284-291.
53. Chang RS, Loti VJ. Angiotensin receptor subtypes in rat, rabbit and monkey tissues: relative distribution and species dependency. *Life Sci.* 1991;49: 1485-1490.
54. Nozawa Y, Haruno A, Oda N, Yamasaki Y, Matsuura N, Yamada S, Inabe K, Kimura R, Suzuki H, Hocino T. Angiotensin II receptor subtypes in bovine and human ventricular myocardium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994;270:566-571.
55. Ishihata A, Endoh M. Species-related differences in inotropic effects of angiotensin II in mammalian ventricular muscle: receptors, subtypes and phosphoinositide hydrolysis. *Br J Pharmacol.* 1995;114(2):447-453.
56. Rogg H, Schmid A, de Gasparo M. Identification and characterization of angiotensin II receptor subtypes in rabbit ventricular myocardium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;173(1):416-422.

57. Scott AL, Chang RS, Lotti VJ, Siegl PK. Cardiac angiotensin receptors: effects of selective angiotensin II receptor antagonists, DUP 753 and PD 121981, in rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;261(3):931-935.
58. Sechi LA, Griffin CA, Grady EF, Kalinyak JE, Schambelan M. Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. *Circ Res.* 1992;71(6):1482-1489.
59. Lopez JJ, Lorell BH, Ingelfinger JR, Weinberg EO, Schunkert H, Diamant D, Tang SS. Distribution and function of cardiac angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am. J. Physiol.* 1994;267:H844-852.
60. Masaki H, Kurihara T, Yamaki A, Inomata N, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kizima K, Maruyama K, Horiuchi M, Dzau VJ, Takahashi H, Iwasaka T, Inada M, Matsubara H. Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J. Clin. Invest.* 1998;101:527-535.
61. Booz GW, Baker KM. Role of type 1 and 2 angiotensin receptors in angiotensin induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension.* 1996;28:635-640.
62. Bartunek J, Weinberg EO, Tajima M, Rohrbach S, Lorell BH. Angiotensin II type 2 receptor blockade amplifies the early signals of cardiac growth response to angiotensin II in hypertrophied hearts. *Circulation.* 1999;99:22-25.
63. Dzau VJ, Sasamura H, Hein L. Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications. *Hypertension Suppl.* 1993;11(3):S13-18.
64. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest.* 1995;95(2):651-657.
65. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res.* 1998;83(12):1182-1191.
66. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension.* 1999;33(2):613-621.
67. Catt K, Abbott A. Molecular cloning of angiotensin II receptors may presage further receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci.* 1991;12(8):279-281.
68. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 1993;45(2):205-251.

69. Schmermund A, Lerman LO, Ritman EL, Rumberger JA. Cardiac production of angiotensin II and its pharmacologic inhibition: effects on the coronary circulation. *Mayo Clin Proc.* 1999;74(5):503-513.
70. Silvestre JS, Heymes C, Oubenaissa A, Robert V, Aupetit-Faisant B, Carayon A, Swynghedauw B, Delcayre C. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation.* 1999;99(20):2694-2701.
71. Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin receptor. *Nature.* 1991;351:233-236.
72. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright HW, Unger T. International Union of Pharmacology: XXIII: the angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* 52: 415-472, 2000.
73. Rockman HA, Koch WJ, Leftkowitz RJ. Seven transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature.* 2002;415:206-212.
74. Cingolani HE, Housay AB. Endocrinología: Principios generales. En *Fisiología Humana de Housay. Sección VII Metabolismo y endocrinología.* (ed) El Ateneo 2000, pp 534-549, Buenos Aires.
75. Ferris CD, Haganir RL, Supattapone S, Snyder SH. Purified inositol-1,4,5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles. *Nature.* 1989;342(6245):87-89.
76. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature.* 1993;361(6410):315-325.
77. Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH, Bers DM. Local InsP₃-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *Clin Invest.* 2006;116(3):675-682.
78. Naruse K and King GL. Protein kinase C and myocardial biology and function. *Circ Res* 86:1104-1106.
79. Lewin B. Signal transduction. In *Genes VII.* (ed) Oxford university press, pp 801-834, 2000.
80. Mattiazzi A. Positive inotropic effect of angiotensin II. Increases in intracellular Ca²⁺ or changes in myofilament Ca²⁺ responsiveness? *Pharmacol Toxicol Methods.* 1997;37(4):205-214.

81. Dostal DE, Hunt RA, Kule CE, Bhat GJ, Karoor V, McWhinney CD, Baker KM. Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29(11):2893-2902.
82. Garrington TP and Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:211-218.
83. Lokuta AJ, Cooper C, Gaa ST, Wang HE, Rogers TB. Angiotensin II stimulates the release of phospholipid-derived second messengers through multiple receptor subtypes in heart cells. *J Biol Chem.* 1994;269(7):4832-4838.
84. Schena M, Mulatero P, Schiavone D, Mengozzi G, Tesio L, Chiandussi L, Veglio F. Vasoactive hormones induce nitric oxide synthase mRNA expression and nitric oxide production in human endothelial cells and monocytes. *Am J Hypertens.* 1999;12(4 Pt 1):388-397.
85. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptors: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:10663-10667.
86. Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Murumo F. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* 1992;19:753-757.
87. Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Murumo F, Hiroe M. Endothelin-1 is an Autocrine/Paracrine Factor in the Mechanism of Angiotensin II-Induced Hypertrophy in Cultured Rat Cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1993;92:398-403.
88. Chua BH, Chua CC, Diglio CA, Siu BB. Regulation of endothelin-1 mRNA by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1993;1178:201-206.
89. Vila Petroff MG, Aiello AE, Palomeque J, Salas MA, Mattiazzi A. Subcellular mechanisms of the positive inotropic effect of angiotensin II in cat myocardium. *J Physiol (Lond)* 2000;529:189-203.
90. Rajagopalan S, Laursen JB, Borthayre A, Kurz S, Keiser J, Haleen S, Giaid A, Harrison DG. Role of endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 1997;30:29-34.

91. Perez NG, Camili3n de Hurtado MC, Cingolani HE. Reverse mode of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ exchange following myocardial stretch. Underlying mechanism of the slow force response. *Circ. Res.* 2001;88:376-382.
92. Camilion de Hurtado MC, 3lvarez BV, P3rez NG, Ennis IL, Cingolani HE. Angiotensin II activates Na^+ -independent $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in ventricular myocardium. *Circ Res.* 1998;82:473-481.
93. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;332(6163):411-415.
94. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(8):2863-2867.
95. Laporte S, Denault JB, D'Orleans-Juste P, Leduc R. Presence of furin mRNA in cultured bovine endothelial cells and possible involvement of furin in the processing of the endothelin precursor. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22 Suppl 8:S7-10.
96. Blais V, Fugere M, Denault JB, Klarskov K, Day R, Leduc R. Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. *FEBS Lett.* 2002;524(1-3):43-48.
97. Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G, Thouard A, Barret A, Vranckx R, Tougard C, Michel JB. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *Eur J Biochem.* 1999;264(2):341-349.
98. Valdenaire O, Barret A, Schweizer A, Rohrbacher E, Mongiat F, Pinet F, Corvol P, Tougard C. Two di-leucine-based motifs account for the different subcellular localizations of the human endothelin-converting enzyme (ECE-1) isoforms. *J Cell Sci.* 1999;112 Pt 18:3115-3125.
99. Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem.* 1995;270(25):15262-15268.
100. Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa S, Shimohama S, Kimura J, Masaki T. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett.* 1998;428(3):304-308.

101. Takanashi M, Endoh M. Characterization of positive inotropic effect of endothelin on mammalian ventricular myocardium. *Am J Physiol.* 1991;261(3 Pt 2):H611-619.
102. Gu XH, Ou RC, Casley DJ, Daly MJ, Nayler WG. Effect of age on endothelin-1 binding sites in rat cardiac ventricular membranes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;19(5):764-769.
103. Ishikawa T, Li LM, Shinmi O, Kimura S, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T. Characteristics of binding of endothelin-1 and endothelin-3 to rat hearts. Developmental changes in mechanical responses and receptor subtypes. *Circ Res.* 1991;69(4):918-926.
104. Karne S, Jayawikreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an ET-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem.* 1993;268:19126-19133.
105. Endoh M, Fujita S, Yang HT, Talukder MA, Maruya J, Norota I. Endothelin: receptor subtypes, signal transduction, regulation of Ca²⁺ transients and contractility in rabbit ventricular myocardium. *Life Sci.* 1998;62:1485-1489.
106. Kasai H, Takanashi M, Takasaki C, Endoh M. Pharmacological properties of endothelin receptor subtypes mediating positive inotropic effects in rabbit heart. *Am J Physiol.* 1994;266:h2220-2228.
107. Hosoda K, Nakao K, Arai H, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Shirakami G, Saito Y, Nakanishi S, Imura H. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor c-DNA. *FEBS Lett.* 1991;287:23-26.
108. Ogawa Y, Nakao K, Arai H, Nakagawa O, Hosoda K, Suga S, Nakanishi S, Imura H. Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;178:248-255.
109. Wanner TD, Mitchell JA, De Nucci G, Vane JR. Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989;13:S85-88.
110. De Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes-Ewaller C, Wanner TD, Vane JR. Pressor effect of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;85:9797-9800.

111. Haynes WG, Strachan FE, Webb DJ. Endothelin ET_A and ET_B receptors mediate vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation*. 1995;92:357-363.
112. Davenport AP, Maguire JJ. Is endothelin-induced vasoconstriction mediated only by ETA receptors in humans? *Trends Pharmacol Sci*. 1994;15:9-11.
113. Flynn MA, Haleen SJ, Welch KM, Cheng XM, Reynolds EE. Endothelin B receptors on human endothelial and smooth-muscle cells show equivalent binding pharmacology. *J Cardiovas Pharmacol*. 1998;32:106-116.
114. Kitamura K, Shiraishi N, Singer WD, Handlogten ME, Tomita K, Miller Tyler. Endothelin-B receptors activate G α_{13} . *Am J Physiol*. 1999;276(4):C930-937.
115. Yanagisawa M, Inoue A, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene: possible regulation by endothelial phosphoinositide turnover signaling. *Cardiovasc Pharmacol*. 1989;13 Suppl 5:S13-17; discussion S18.
116. Gray GA. Generation of endothelin. En *Molecular biology and pharmacology of the endothelins*. Gray GA, Webb DJ, eds RG Landers: Austin. pp13-32, 1995.
117. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med*. 333(6):356-63, 1995.
118. Levin ER. Endothelins as cardiovascular peptides. *Am J Nephrol*. 1996;16(3):246-251.
119. Shinmi O, Kimura S, Sawamura T, Sugita Y, Yoshizawa T, Uchiyama Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T, Kanazawa I. Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;164(1):587-593.
120. Talukder MA, Norota I, Sakurai K, Endoh M. Inotropic response of rabbit ventricular myocytes to endothelin-1: difference from isolated papillary muscles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(2):H596-605.
121. Petrecca K, Atanasiu R, Grinstein S, Orłowski J, Shrier A. Subcellular localization of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 in rat myocardium. *Am J Physiol*. 1999;276(2 Pt 2):H709-717.
122. Frelin C, Vigne P, Lazdunski M. The role of the Na⁺/H⁺ exchange system in cardiac cells in relation to the control of the internal Na⁺ concentration. *J Biol Chem*. 1984;259(14):8880-8885.

123. Landunski M, Frelin C, Vigne P. the sodiun/hidrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol.* 1985;17:1029-1042.
124. Puceat M, Clement-Chomienne O, Terzic A, Vassort G. Alpha 1-adrenoceptor and purinoceptor agonists modulate Na-H antiport in single cardiac cells. *Am J Physiol.* 1993;264(2 Pt 2):H310-319.
125. Puceat M, Vassort G. Neurohumoral modulation of intracellular pH in the heart. *Cardiovasc Res.* 1995;29(2):178-183.
126. Kimura M, Gardner JP, Aviv A. Agonist-evoked alkaline shift in the cytosolic pH set point for activation of Na⁺/H⁺ antiport in human platelets. The role of cytosolic Ca²⁺ and protein kinase C. *J Biol Chem.* 1990;265(34):21068-21074.
127. Linck B, Qiu Z, He Z, Tong Q, Hilgemann DW, Philipson KD. Functional comparison of the three isoforms of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1, NCX2, NCX3). *Am J Physiol.* 1998;274:C415-423.
128. Nicoll DA, Longoni S, Philipson KD. Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *Science.* 1990;250(4980):562-565.
129. Li Z, Matsuoka S, Hryshko LV, Nicoll DA, Bersohn MM, Burke EP, Lifton RP. Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. Philipson KD. *J Biol Chem.* 1994;269(26):17434-17439.
130. Nicoll DA, Quednau BD, Qui Z, Xia YR, Lusic AJ, Philipson KD. Cloning of a third mammalian Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCX3. *J Biol Chem.* 1996;271(40):24914-24921.
131. Komuro I, Wenninger KE, Philipson KD, Izumo S. Molecular cloning and characterization of the human cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(10):4769-4773.
132. Koushik SV, Bundy J, Conway SJ. Sodium-calcium exchanger is initially expressed in a heart-restricted pattern within the early mouse embryo. *Mech Dev.* 1999;88(1):119-122.
133. Boerth SR, Zimmer DB, Artman M. Steady-state mRNA levels of the sarcolemmal Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger peak near birth in developing rabbit and rat hearts. *Circ Res.* 1994;74(2):354-359.

134. Studer R, Reinecke H, Vetter R, Holtz J, Drexler H. Expression and function of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger in postnatal development of the rat, in experimental-induced cardiac hypertrophy and in the failing human heart. *Basic Res Cardiol.* 1997;92 Suppl 1:53-58.
135. Vetter R, Studer R, Reinecke H, Kolar F, Ostadalova I, Drexler H. Reciprocal changes in the postnatal expression of the sarcolemmal Na⁺-Ca(2⁺)-exchanger and SERCA2 in rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27(8):1689-1701.
136. Koban MU, Moorman AF, Holtz J, Yacoub MH, Boheler KR. Expressional analysis of the cardiac Na-Ca exchanger in rat development and senescence. *Cardiovasc Res.* 1998;37(2):405-423.
137. Moorman AF, Vermeulen JL, Koban MU, Schwartz K, Lamers WH, Boheler KR. Patterns of expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2⁺)-ATPase and phospholamban mRNAs during rat heart development. *Circ Res.* 1995;76(4):616-625.
138. Cook O, Low W, Rahamimoff H. Membrane topology of the rat brain Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *Biochim Biophys Acta.* 1371(1):40-52, 1998.
139. Iwamoto T, Nakamura TY, Pan Y, Uehara A, Imanaga I, Shigekawa M. Unique topology of the internal repeats in the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *FEBS Lett.* 1999;446(2-3):264-268.
140. Nicoll DA, Ottolia M, Lu L, Lu Y, Philipson KD. A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *Biol Chem.* 1999;274(2):910-917.
141. Matsuoka S, Nicoll DA, Reilly RF, Hilgemann DW, Philipson KD. Initial localization of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(9):3870-3874.
142. Hilgemann DW. Giant excised cardiac sarcolemmal membrane patches: sodium and sodium-calcium exchange currents. *Pflugers Arch.* 1989;415(2):247-249.
143. Satoh H, Ginsburg KS, Qing K, Terada H, Hayashi H, Bers DM. KB-R7943 block of Ca(2⁺) influx via Na⁽⁺⁾/Ca(2⁺) exchange does not alter twitches or glycoside inotropy but prevents Ca(2⁺) overload in rat ventricular myocytes. *Circulation.* 2000;101(12):1441-1446.
144. Litwin SE, Li J, Bridge JH. Na-Ca exchange and the trigger for sarcoplasmic reticulum Ca release: studies in adult rabbit ventricular myocytes. *Biophys J.* 1998;75(1):359-371.

145. Sipido KR, Maes M, Van de Werf F. Low efficiency of Ca²⁺ entry through the Na(+)-Ca²⁺ exchanger as trigger for Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum. A comparison between L-type Ca²⁺ current and reverse-mode Na(+)-Ca²⁺ exchange. *Circ Res.* 1997;81(6):1034-1044.
146. Wasserstrom JA, Vites AM. The role of Na(+)-Ca²⁺ exchange in activation of excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 1996;493 (Pt 2):529-542.
147. Bers DM, Christensen DM, Nguyen TX. Can Ca entry via Na-Ca exchange directly activate cardiac muscle contraction? *J Mol Cell Cardiol.* 1988;20(5):405-414.
148. Yang HT, Sakurai K, Sugawara H, Watanabe T, Norota I, Endoh M. Role of Na⁺/Ca²⁺ exchange in endothelin-1-induced increases in Ca²⁺ transient and contractility in rabbit ventricular myocytes: pharmacological analysis with KB-R7943. *Br J Pharmacol.* 1999;126(8):1785-1795.
149. Hasenfuss G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res.* 1998;37(2):279-289.
150. Mattiello JA, Margulies KB, Jeevanandam V, Houser SR. Contribution of reverse-mode sodium-calcium exchange to contractions in failing human left ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 1998;37(2):424-431.
151. Tani M. Mechanisms of Ca²⁺ overload in reperfused ischemic myocardium. *Annu Rev Physiol.* 1990;52:543-559.
152. Hilgemann DW, Collins A, Matsuoka S. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Secondary modulation by cytoplasmic calcium and ATP. *J Gen Physiol.* 1992;100(6):933-961.
153. DiPolo R, Beauge L. Characterization of the reverse Na/Ca exchange in squid axons and its modulation by Cai and ATP. Cai-dependent Nai/Cao and Nai/Nao exchange modes. *J Gen Physiol.* 1987;90(4):505-525.
154. Matsuoka S, Nicoll DA, Hryshko LV, Levitsky DO, Weiss JN, Philipson KD. Regulation of the cardiac Na(+)-Ca²⁺ exchanger by Ca²⁺. Mutational analysis of the Ca(2+)-binding domain. *J Gen Physiol.* 1995;105(3):403-420.
155. Levitsky DO, Nicoll DA, Philipson KD. Identification of the high affinity Ca(2+)-binding domain of the cardiac Na(+)-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem.* 1994;269(36):22847-22852.

156. Dyck C, Maxwell K, Buchko J, Trac M, Omelchenko A, Hnatowich M, Hryshko LV. Structure-function analysis of CALX1.1, a Na⁺-Ca²⁺ exchanger from *Drosophila*. Mutagenesis of ionic regulatory sites. *J Biol Chem*. 1998;273(21):12981-12987.
157. Doering AE, Lederer WJ. The mechanism by which cytoplasmic protons inhibit the sodium-calcium exchanger in guinea-pig heart cells. *J Physiol*. 1993;466:481-499.
158. Philipson KD, Bersohn MM, Nishimoto AY. Effects of pH on Na⁺-Ca²⁺ exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles. *Circ Res*. 1982;50(2):287-293.
159. He Z, Tong Q, Quednau BD, Philipson KD, Hilgemann DW. Cloning, expression, and characterization of the squid Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCX-SQ1). *J Gen Physiol*. 1998;111(6):857-873.
160. Hilgemann DW, Ball R. Regulation of cardiac Na⁺,Ca²⁺ exchange and KATP potassium channels by PIP₂. *Science*. 1996;273(5277):956-959.
161. Reeves JP, Bailey CA, Hale CC. Redox modification of sodium-calcium exchange activity in cardiac sarcolemmal vesicles. *J Biol Chem*. 1986;261(11):4948-4955.
162. Santacruz-Tolozza L, Ottolia M, Nicoll DA, Philipson KD. Functional analysis of a disulfide bond in the cardiac Na⁽⁺⁾-Ca⁽²⁺⁾ exchanger. *J Biol Chem*. 2000;275(1):182-188.
163. Kusuoka H, Camilión de Hurtado MC, Marban E. Role of sodium/calcium exchange in the mechanism of myocardial stunning: protective effect of reperfusion with high sodium solution. *JACC*. 1993;21(1):240-248.
164. Troster TL, Philipson KD. Effects of divalent and trivalent cations on Na⁺-Ca²⁺ exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1983;731(1):63-68.
165. Kimura J, Miyamae S, Noma A. Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. *J Physiol*. 1987;384:199-222.
166. Ehara T, Matsuoka S, Noma A. Measurement of reversal potential of Na⁺-Ca²⁺ exchange current in single guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol*. 1989;410:227-249.
167. Stengl M, Carmeliet E, Mubagwa K, Flameng W. Modulation of transient outward current by extracellular protons and Cd²⁺ in rat and human ventricular myocytes. *J Physiol*. 1998;511 (Pt 3):827-836.

168. Hobai IA, Bates JA, Howarth FC, Levi AJ. Inhibition by external Cd^{2+} of Na/Ca exchange and L-type Ca channel in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 1997;272(5 Pt 2):H2164-2172.
169. Iwamoto T, Watano T, Shigekawa M. A novel isothiourea derivative selectively inhibits the reverse mode of $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange in cells expressing NCX1. *J Biol Chem.* 1996;271(37):22391-22397.
170. Watano T, Kimura J, Morita T, Nakanishi H. A novel antagonist, No. 7943, of the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange current in guinea-pig cardiac ventricular cells. *Br J Pharmacol.* 1996;119(3):555-563.
171. Allen DG y Kurihara, S. The effects of muscle :length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. *J. Physiol.* 1982;327:79-84.
172. Von Anrep G. On the part played by the suprarenals in the normal vascular reactions on the body. *J Physiol (Lond).* 1912;45:307-317.
173. Cingolani HE, Álvarez BV, Ennis IL, Camilión de Hurtado MC. Stretch-induced alkalinization of feline papillary muscle. An autocrine-paracrine system. *Circ Res.* 1998;83:775-780.
174. Yutao X, Geru W, Xiojun B, Tao G, Aigoun M. Mechanical stretch-induced hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes is mediated by beta(1)-integrin-microtubule signaling pathways. *Eur J Heart Fail.* 2006;8(1):16-22.
175. Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, Selvetella G, Lembo G, Tarone G. Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiov Res.* 2006;70:422-433.
176. Camilion de Hurtado MC y Álvarez BV, Ennis IL, Cingolani HE. Stimulation of myocardial Na^{+} -independent $\text{Cl}^{-}/\text{HCO}_3^{-}$ exchanger by angiotensin II is mediated by endogenous endothelin. *Circ Res.* 2000;86:622-627.
177. Boron WF, Boyarsky G, Ganz M. Regulation of intracellular pH in renal mesangial cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;574:321-332.
178. Fujita S, Endoh M. Influence of a $\text{Na}^{+}\text{-H}^{+}$ exchange inhibitor ethylisopropylamiloride, a $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ exchange inhibitor KB-R7943 and their combination on the increases in contractility and Ca^{2+} transient induced by angiotensin II in isolated adult rabbit ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999;360(5):575-584.
179. Yang HT, Sakurai K, Sugawara H, Watanabe T, Norota i, Endoh M. Role of $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange in endothelin-1-induced increases in Ca^{2+} transient and

- contractility in rabbit ventricular myocytes: pharmacological analysis with KB-R7943. *Br J Pharmacol.* 1999;126:1785-95.
180. Aiello EA, Villa-Abrille MC, Cingolani HE. Autocrine stimulation of cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ exchanger currents by endogenous endothelin release by angiotensin II. *Circ Res.* 2002;90:374-376.
181. Langer GA. Heart: excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol.* 1973;35:55-86.
182. Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature.* 1984;312 (5990):121-127.
183. Hess P, Lansman JB, Tsien RW. Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. *J Gen Physiol.* 1986;88(3):293-319.
184. Hess P, Lansman JB, Nilius B, Tsien RW. Calcium channel types in cardiac myocytes: modulation by dihydropyridines and beta-adrenergic stimulation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1986;8 Suppl 9:S11-21.
185. Cingolani HE, Housay AB. Origen y propagación del impulso cardíaco. Actividad eléctrica del corazón. En *Fisiología Humana de Housay. Sección IV. Sistema Circulatorio.* (ed) El Ateneo 2000, pp 243-265, Buenos Aires.
186. Lansman JB, Hess P, Tsien RW. Blockade of current through single calcium channels by Cd^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} . Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. *J Gen Physiol.* 1986;88(3):321-347.
187. Talukder MA, Endoh M. Pharmacological differentiation of synergistic contribution of L-type Ca^{2+} channels and Na^+/H^+ exchange to the positive inotropic effect of phenylephrine, endothelin-3 and angiotensin II in the rabbit ventricular myocardium. *Nauny-Schmiedeberg's Arch pharmacol.* 1997;355:87-96.
188. Nuss HB, Houser SR. Sodium-calcium exchange-mediated contractions in feline ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 1992;263(4 Pt 2):H1161-1169.
189. Philipson KD, Nishimoto AY. $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange is affected by membrane potential in cardiac sarcolemmal vesicles. *J Biol Chem.* 1980;255(14):6880-6882.

190. Hinata M, Yamamura H, Li L, Watanabe Y, Watano T, Imaizumi Y, Kimura J. Stoichiometry of Na⁺-Ca²⁺ exchange is 3:1 in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol.* 2002;545(Pt 2):453-461.
191. Hobai IA, O'Rourke B. Enhanced Ca²⁺-activated Na⁺-Ca²⁺ exchange activity in canine pacing-induced heart failure. *Circ Res.* 2002;87:690-698.
192. Sutko JL, Willerson JT, Templeton GH, Jones LR, Besch HR Jr. Ryanodine: its alterations of cat papillary muscle contractile state and responsiveness to inotropic interventions and a suggested mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther.* 1979;209(1):37-47.
193. Fleischer S, Inui M. Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 1989;18:333-364.
194. Chadwick CC, Saito A, Fleischer S. Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(6):2132-2136.
195. Walker JW, Somlyo AV, Goldman YE, Somlyo AP, Trentham DR. Kinetics of smooth and skeletal muscle activation by laser pulse photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature.* 1987;327(6119):249-252.
196. Ruegg JC. Cardiac contractility: how calcium activates the myofilaments. *Naturwissenschaften.* 1998;85(12):575-582.
197. Katz AM. Excitation-contraction coupling. In *Physiology of the heart.* (ed) AM Katz Raven Press. 1977;pp137-149. New York.
198. Sommer JR, Johnson EA. Ultrastructure of cardiac muscle. In *Handbook of Physiology, section 2 The Cardiovascular System, Volume 1 The Heart,* (ed) Berne RM, pp 113-86. American Physiological Society, Bethesda.
199. el-Saleh SC, Warber KD, Potter JD. The role of tropomyosin-troponin in the regulation of skeletal muscle contraction. *J Muscle Res Cell Motil.* 1986;7(5):387-404.
200. Tada M, Yamada M, Kadoma M, Inui M, Ohmori F. Calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum and phosphorylation of phospholamban. *Mol Cell Biochem.* 1982;46(2):73-95.
201. Tada M, Kirchberger MA, Katz AM. Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 1975;250(7):2640-2647.

202. Bers DM. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res.* 2000;87(4):275-281.
203. Nabauer M, Morad M. Modulation of contraction by intracellular Na⁺ via Na(+)-Ca²⁺ exchange in single shark (*Squalus acanthias*) ventricular myocytes. *J Physiol.* 1992;457:627-637.
204. Frampton JE, Harrison SM, Boyett MR, Orchard CH. Ca²⁺ and Na⁺ in rat myocytes showing different force-frequency relationships. *Am. J. Physiol (Cell Physiol).* 1991;261:C739-C750.
205. Harootunian AT, Kao JPY, Eckert BK, Tsien RY. Fluorescence ratio imaging of cytosolic free Na⁺ in individual fibroblasts and lymphocytes. *J Biol Chem.* 1989;264:19449-19457.
206. Borzak S, Kelly RA, Kramer BK, Matoba Y, Marsh JD, Reers M. In situ calibration of fura-2 and BCECF fluorescence in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 1990;259:H973-H981.
207. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved Fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985;260:3440–3450.
208. Bassani RA, Bassani JWM, Bers DM. Mitochondrial and sarcolemmal Ca²⁺ transport reduce [Ca²⁺]_i during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol.* 1992;453:591–608.
209. Boron WF, Weer P. Active proton transport stimulated by CO₂/HCO₃⁻, blocked by cyanide. *Nature.* 1976;259:240-241.
210. Sperelakis N. Intracellular pH regulation. In *Cell Physiology Source Book*. Ed Academic Press. 1998; pp:293-311. San Diego, California, USA.
211. Ennis IL, Garciarena CD, Pérez NG, Dulce RA, Camilión de Hurtado MC, Cingolani HE. Endothelin isoforms and the response to myocardial stretch. *Am J Physiol, Heart Circ Physiol.* 2005;288:H2925–H2930.
212. Matiazzi AR, Pérez NG, Vila Petroff MG, et al. Dissociation between positive inotropic and alkalinizing effect of angiotensin II in feline myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1997;272:H1131-H1136.
213. Cullen JP, Bell D, Kelso EJ, McDermott BJ. Use of A-192621 to provide evidence for involvement of ET_B-receptors in endothelin-1-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *Eur J Pharmacol.* 2001;417:157–168.

214. Bers DM. Excitation–contraction coupling and cardiac contractile force (2nd ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (2001), pp. 133–160 Chapter 6.
215. Dohi Y, Hahn AW, Boulanger CM, Bulher FR, Luscher TF. Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries. *Hypertension*. 1992;19:131-137.
216. Fujisaki H, Ito H, Hirata Y, Tanaka M, Hata M, Lin M, Adachi S, Akimoto H, Marumo F, Hiroe M. Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin gene expression. *J Clin Invest*. 1995;96:1059-1065.
217. Barton M, Shaw S, d’Uscio LV, Moreau P, Luscher TF. Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;238:861-865.
218. Muller DN, Mervaala EM, Schmidt F, Park JK, Dechend R, Genersch E, Breu V, Loffler BM, Ganten D, Schneider W, Haller H, Luft FC. Effect of bosentan of NF-kappaB, inflammation, and tissue factor in angiotensin II-induced-organ damage. *Hypertension*. 2000;36:282-290.
219. Fikai S, Herizi A, Mimran A, Jover B. Endothelin blockade in angiotensin II hypertension: prevention and treatment studies in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28:1100-1103.
220. Ortiz MC, Sanabria E, Manriquez MC, Romero JC, Juncos LA. Role of endothelin and isoprostanes in slow pressor responses to angiotensin II. *Hypertension*. 37:505-510, 2001.
221. Muller DN, Mullaly A, Dechend R, Park JK, Fiebeler A, Pilz B, Loffler BM, Blum-Kaelin D, Masur S, Dehmlow H, Aebi DJ, Haller H, Luft FC. Endothelin-converting enzyme inhibition ameliorates angiotensin II-induced cardiac damage. *Hypertension*. 2002;40:840-846.
222. Seccia TM, Belloni AS, Kreutz R, Paul M, Nussdorfer GG, Pessina AC, Rossi GP. Cardiac fibrosis occurs early and involves endothelin and AT-1 receptors in hypertension due to endogenous angiotensin II. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:666-673.
223. Ross G, White FN. Role of catecholamine release in cardiovascular response to angiotensin. *Am J Physiol*. 1966;211:1419-1423.

224. Watanabe T, Endoh M. Characterization of endothelin-1-induced regulation of L-type Ca^{2+} current in rabbit ventricular myocytes. *Nauny-Schmiedeberg's Arch pharmacol.* 1999;360:654-664.
225. Takimoto E, Yao A, Toko H, Takano H, Shimoyama M, Sonoda M, Wakimoto K, Takahashi T, Akazawa H, Mizukami M, Nagai T, Nagai R, Komuro I. Sodium calcium exchanger plays a key role in alteration of cardiac function in response to pressure overload. *FASEB J.* 2002;16:373–378.
226. Slodzinski MK and Blaustein MP. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in neonatal rat heart cells: antisense inhibition and protein half-life. *Am J Physiol, Cell Physiol.* 1998;275:459–467.
227. Baumer AT, Flesch M, Kilter H, Philipson KD, Bohm M. Overexpression of the $\text{Na}^+(\text{+})\text{-Ca}^{2+}$ exchanger leads to enhanced inotropic responsiveness to $\text{Na}^+(\text{+})$ -channel agonist without sarcoplasmic reticulum protein changes in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;249:786-790.
228. Terracciano CM, Souza AI, Philipson KD, MacLeod KT. $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange and sarcoplasmic reticular Ca^{2+} regulation in ventricular myocytes from transgenic mice overexpressing the $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger. *J Physiol.* 1998;512(pt3):651-667.
229. Artman M, Ichikawa H, Avkiran M, Coetzee WA. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange current density in cardiac myocytes from rabbits and guinea pigs during postnatal development. *Am J Physiol.* 1995;268:H1714–H1722.
230. Haddock PS, Coetzee WA, Cho E, Porter L, Katoh H, Bers DM, et al. Subcellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gradients during excitation–contraction coupling in newborn rabbit ventricular myocytes. *Circ Res.* 1999;85:415–427.
231. Kent RL, Hooper JK, Cooper IV G. Load responsiveness of protein synthesis in adult mammalian myocardium: role of cardiac deformation linked to sodium influx. *Circ Res* 1989;64:74–85.
232. Sei CA, Irons CE, Sprenkle AB, McDonough PM, Brown JH, Glembotski CC. The α -adrenergic stimulation of atrial natriuretic factor expression in cardiac myocytes requires calcium influx, protein kinase C, and calmodulin-regulated pathways. *J Biol Chem.* 1991;266:15910-15916.
233. LaPointe MC, Deschepper CF, Wu JP, Gardner DG. Extracellular calcium regulates expression of the gene for atrial natriuretic factor. *Hypertension.* 1990;15:20-28.

234. Ballard C and Schaffer S. Stimulation of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger by phenylephrine, angiotensin II and endothelin 1. *J Mol Cell Cardiol.*1996;28:11–17.
235. Aiello EA, Villa-Abrille MC, Dulce RA, Cingolani HE, Pérez NG. Endothelin-1 stimulates the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger reverse mode through intracellular Na^+ (Na_i^+)-dependent and Na_i^+ -independent pathways. *Hypertension.* 2005;45:288–293.
236. Armoundas AA, Hobai IA, Tomaselli GF, Winslow RL, O'Rourke B. Role of sodium–calcium exchanger in modulating the action potential of ventricular myocytes from normal and failing hearts. *Circ Res.* 2003;93:46–53.
237. Waisser-Thomas J, Piacentino III V, Gaughan JP, Margulies K, Houser SR. Calcium entry via Na^+/Ca exchange during the action potential directly contributes to contraction of failing human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.*2003;57:974–985.
238. von Lewinski D, Stumme B, Maier LS, Luers C, Bers DM, Pieske B. Stretch-dependent slow force response in isolated rabbit myocardium is Na^+ dependent. *Cardiovasc Res.* 2003;57:1052–1061.
239. Yorikane R, Koike H, Miyake S. Electrophysiological effects of endothelin-1 on canine myocardial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991;17:S159–S162.
240. Baartscheer A, Schumacher CA, Belterman CNW, Coronel R, Fiolet JWT. $[\text{Na}^+]_i$ and the driving force of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2003;57:986–995.
241. Chorvatova A, Hart G, Hussain M. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange current ($I_{\text{Na}/\text{Ca}}$) and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in catecholamine-induced cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2004;1:278–287.
242. Ennis IL, Garciarena CD, Escudero EM, Pérez NG, Dulce RA, Camilión de Hurtado MC, Cingolani HE. Normalization of the calcineurin pathway underlies the regression of hypertensive hypertrophy induced by Na^+/H^+ exchanger-1 (NHE-1) inhibition. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007;85:1-10. (EN PRENSA).
243. Karmazyn M, Sawyer M, Fliegel L. The $\text{Na}(+)/\text{H}(+)$ exchanger: a target for cardiac therapeutic intervention. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2005;5(4):323-335.