

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

Caracterización Funcional de cotransportador $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$ cardíaco

AUTOR: DE GIUSTI VERÓNICA CELESTE

DIRECTOR: AIELLO ERNESTO ALEJANDRO

2010

CENTRO DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES, FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

Agradecimientos

Antes que nada, les quiero agradecer a todos...a cada una de las personas que están al lado mío y que con su compañía me permitieron llegar hasta acá, porque los quiero, los necesito y los admiro...les digo gracias porque sí me ayudaron, me quieren y sí me quieren me hacen feliz!

Gracias de verdad, porque cada uno sabe lo importante que es en mi vida, porque sé que cuento con ustedes siempre, porque cuando más necesité una mano que me levantara la encontré en ustedes, porque sola no hubiese podido...y me mostraron el tesoro que es tenerlos conmigo.

Les voy a agradecer especialmente a cada uno de manera desordenada, familiares, amigos ó compañeros de trabajo, pero intencionalmente, porque lo que me hace feliz es estar en casa discutiendo de ciencia y estar en el laboratorio hablando de mi vida.

Papí y mamá: Pa, ¿qué decir sobre lo que representás para mí en unas pocas líneas? A cada lado que voy llevo tus consejos de vida, tus enseñanzas, nuestras reflexiones y sobre todo nuestras discusiones...y digo con un orgullo que me llena el alma que sos mi papá! Ma estás siempre al lado, pendiente, incondicionalmente, acompañándome en todo lo que elijo...por eso primero que a nadie...ya lo saben, los quiero!!

Ale: nunca me voy a olvidar del día que fui al laboratorio a decirte que no iba a aceptar trabajar con vos...y a los 10 minutos de escucharte, ya había decidido cambiar de opinión...menos mal! Sos el mejor director que pude tener, porque lograste el complicado equilibrio entre acompañarme y guiarme en los experimentos y "dejarme volar" en ideas y proyectos, el equilibrio entre discutir sobre ciencia y hacer horas de "psicoanálisis"... el equilibrio entre ser mi director y mi amigo.

Laury y Edu: ¡cómo los quiero! Y cuánto les agradezco su compañía!! Los dos, cada uno a su manera, siempre están...para reírnos, para llorar, para discutir, para compartir un mate, un partido de tenis, de fútbol...cualquier cosa, porque lo lindo es eso, sentir esas ganas de encontrarnos y estar juntos!

Especialmente a Lau y al Perí en estos "meses pre-tesis" gracias por los mates, las cenas, el hospedaje de fin de semana...jajaja...¡¡no es fácil aguantar a tinkerbell!!

More: ¡tan chiquita! Sos una lucecita, parece mentira que tan chiquita puedas dar tanta alegría! Gracias, porque aunque no lo sepas, cada vez que decís "tía vero" me llenás de felicidad y me recargás de energía para avanzar.

Jose: sos mi amiga y mi hermana, lo sabés...siempre ahí, a un paso...en los momentos lindos y en los tristes, simplemente estás...y cuando hablo con vos, soy más sincera que cuando hablo conmigo misma...

Cecí, Pau y María: venimos creciendo juntas desde la primaria, desde el primer día de clases en el Normal 2 cuando con Cecí, la señorita nos mandó abajo de la campana por hablar en clase, cuando Pau se compraba los alfajores en los recreos y cuando María me quería enseñar danzas clásicas...ya tenemos casi 30... y seguimos siendo "las chicas de la primaria"...las quiero!

Florcita: vos también sabés lo que te agradezco estar siempre, lo que te quiero..."la chica prolijita y de pelo lindo"... jajajaja, así te nombré cuando te conocí, te acordás?

Tía nena y abu: mis solcitos, siempre con una sonrisa, siempre con ternura, siempre dándome todo sin esperar nada a cambio...me acuerdo cuando decían "cuánto daría por ver a vero terminar el jardín"...y me vieron recibir el diploma de médica! Ahora acá estoy por doctorarme, y están conmigo, como siempre en mi corazón.

Los "Ales" Ale O y Alejandrita, Lu, Miri, Omar, Gise, Luis y Cecí: no sé sinceramente si les dije alguna vez todo lo que los quiero y les agradezco todo lo que me ayudaron y me ayudan, cada uno a su manera, con consejos, con charlas, con retos, con abrazos, con regalos, con miradas, de todas formas, pero siempre transformando los días de trabajo en alegría, haciendo que empiece como empieza el día, siempre lo termine con una sonrisa. Nos conocemos hace poco, compartiendo las horas del laboratorio, pero para mí no son "compañeros de trabajo", son personas verdaderamente importantes en mi vida. También Guille, Héctor, Kokís mis amigos de la facu!! Siempre pendientes porque esté bien...

A Patito, mi tía de la vida, a Mari, mi tía de sangre y mi amiga por elección, a Gaby, a mi tío Chipi, a Sabri y a Emi, mis primitos postizos, a Juanjo, a Carito, a Gise, mi diseñadora exclusiva, a Gusti, a Marce y a Pauli, a Franco. A Martín, mi compañero de

corridas, a Gus, mi contador preferido de chistes, a Clau, mi mamá adoptiva, a Cel, porque desde que nos empezamos a tratar, entre charla y charla, sentí como si nos conociáramos hace tiempo, a Juli, porque algún día vamos a hacer el desafío de los volcanes!, a Albíta, por el primer mate de todas las mañanas!!!...y de verdad y sinceramente a todos mis compañeros del laboratorio...porque como una vez le dije a Ale: "un trabajo se consigue bastante fácil, un buen trabajo ya cuesta más, pero un buen trabajo es el que uno se divierte y se sienta cómodo no se consigue fácilmente..." y así es el laboratorio y por eso le agradezco especialmente a la Dra. Alicia Mattiazzi, porque me dio la posibilidad de trabajar en el Centro de Investigaciones Cardiovasculares, porque ser parte del Centro es mucho más que un trabajo...es un divertimento...y el día que deje de serlo perderá la magia...

Le agradezco al Dr Cingolani porque desde que empecé a trabajar me permitió participar de las reuniones, enseñándome que más importante que repetir lo que dicen los demás, es creer y defender lo que uno hace.

Al Dr. Bernardo Alvarez, a la Dra. María Celeste Villa Abrille y a la Dra Gladys Chiappe de Cingolani porque ellos comenzaron la generación de los anticuerpos que me permitió a mí realizar gran parte de esta Tesis.

Finalmente, hay 3 personas que me guiaron específicamente en el camino hacia la investigación, y les quiero agradecer especialmente.

Primero a mi papá, que desde chica me enseñó a cuestionar todo, a no aceptar las cosas porque sí o porque lo decía otro, a que lo importante es estar convencido de lo que uno hace y dice, porque así se puede argumentar, y porque aunque pensaba que la investigación era para mí, no me quiso influenciar y me dejó hacer mi camino, con tropiezos, con idas y vueltas, y cuando vio que ya estaba "encaminada" me dijo "yo lo sabía..."

Luego a Olga Suescum, porque después de escuchar una charla de ella en la facu, todavía siendo alumna de medicina, me despertó la curiosidad por la ciencia y le dije "quiero ver que es esto de investigar"...y me lo enseñó.

Y finalmente a Ale, que una vez que ya sabía que era la investigación, me permitió no sólo trabajar en investigación, sino divertirme, enojarme y empeñarme con ella, sencillamente porque me enseñó a sentir la investigación como parte de mi vida.

Ahhh! Ya me olvidaba...le agradezco a la/el nuevo integrante de la familia...Renata o Lisandro, que todavía no nació y de sólo imaginarla/o ya me llena de emoción.



"(...) por eso, para vos más que un consejo, va un pedacito:
 No pierdas nunca las "ganas" ni la alegría; no te desanimés,
 pensá que las dificultades son un estímulo para llegar a la meta;
 no te condiciones, siempre sentite capaz de hacer las cosas y
 hacerlas mejor cada día... ¡ sobre todo tratá de iniciar
 cada día con el mismo optimismo que tenés hoy (...)"
 Un beso grande- Papá-
 5-6-95

"La vida es exactamente eso: tener permanentemente metas
 que creamos buenas y luchar por alcanzarlas. Con la
 absoluta seguridad de que es posible y que el solo hecho
 de intentarlo ya vale la pena".

Índice

Contenidos	Página
Introducción	1
Control del pH intracelular (pH _i) en miocitos cardíacos.....	3
El cotransportador Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ (NBC).....	4
Cotransportadores Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ electrogénicos (estequiometría 1 Na ⁺ / 2 ó 3 HCO ₃ ⁻).....	6
Cotransportador Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ electroneutro (estequiometría 1 Na ⁺ / 1HCO ₃ ⁻).....	7
Actividad del NBC.....	7
El NBC cardíaco.....	9
Fisiología.....	9
Regulación.....	10
Implicancias fisiopatológicas.....	11
La Angiotensina II (Ang II) y el corazón.....	13
Especies reactivas del oxígeno (ROS) como moléculas de señalización intracelular.....	16
MAP Kinasas.....	20
Objetivos	25
Primera parte: Participación del NBC en el control del pH _i y su regulación por la Ang II.....	27

Segunda parte: El NBC electrogénico y la Ang II.....	28
Tercera parte: Efecto de los Anticuerpos contra la isoforma electrogénica NBC1 en la fisiología de la célula cardíaca.....	28
Materiales y Métodos	29
Técnicas Generales.....	31
Aislamiento de miocitos.....	31
Producción de anticuerpos policlonales contra la isoforma electrogénica NBC1.....	33
Técnicas Específicas.....	34
Registro de pH_i en miocitos.....	34
Pulso de Amonio.....	35
Pulso de K^+	38
Registro de Potencial de acción (PA) en miocitos aislados.....	39
Análisis de proteínas por electroforesis e inmunoblots (Western Blots).....	40
Soluciones.....	42
Análisis Estadístico.....	42
Resultados	43
Primera parte: Participación del NBC en el control del pH_i y su regulación por la Ang II.....	45
Dosis mínima de HOE 642 para abolir al intercambiador Na^+/H^+ (NHE).....	46
Participación del cotransportador Na^+/HCO_3^- (NBC) en la recuperación de la acidosis.....	47
Regulación hormonal del NBC: Efecto de la Angiotensina II (AngII).....	49
Papel de las especies reactivas del oxígeno (ROS).....	52

Papel de la MAPK ERK 1/2.	56
Segunda parte: El NBC electrogénico y la Ang II.....	60
Efecto de la Ang II sobre el NBC electrogénico (NBCe) en el control del pH_i	61
Efecto de la Ang II sobre el NBCe en el potencial de acción.....	66
Tercera parte: Efecto de los Anticuerpos contra la isoforma electrogénica NBC1 en la fisiología de la célula cardíaca.....	69
Expresión del NBC1 en miocardio de gato.....	70
Efectos opuestos de los anticuerpos evaluados con Pulso de K^+	71
Efectos opuestos de los anticuerpos evaluados con Pulso de amonio.....	74
Efectos opuestos de los anticuerpos evaluados con Patch-clamp perforado.....	77
Discusión y Perspectivas Futuras	79
Bibliografía	95

Introducción

Control del pH intracelular (pH_i) en miocitos cardíacos

El cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC)

Actividad del NBC

El NBC cardíaco

La Angiotensina II (Ang II) y el corazón

Especies reactivas del oxígeno (ROS) como moléculas de señalización intracelular

MAP Kinasas

"La ciencia es una manera de mirar el mundo, una actitud. Como el arte. Es estar convencido de que debajo de lo que vemos hay un mecanismo oculto". Leonardo Moledo

Control del pH intracelular (pH_i) en miocitos cardíacos

El correcto funcionamiento contráctil y eléctrico del corazón depende de la estricta regulación en la homeostasis a nivel celular (Vaughan-Jones, Spitzer et al. 2009).

El pH intracelular (pH_i) de los miocitos ventriculares se mantiene en valores cercanos a 7.2 gracias a la existencia en la membrana plasmática de dos mecanismos acidificantes: los intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE) y Cl^-/OH^- (CHE), que introducen una molécula de Cl^- por cada una molécula de HCO_3^- ó OH^- que extruyen, y de dos mecanismos alcalinizantes: el intercambiador Na^+/H^+ (NHE) y el cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC), los cuales aumentan el pH_i sacando H^+ ó introduciendo HCO_3^- , respectivamente (Dart and Vaughan-Jones 1992; Karmazyn and Moffat 1993), al tiempo que introducen en la célula una molécula de Na^+ en cada ciclo (Vaughan-Jones, Villafuerte et al. 2006).

En ausencia de bicarbonato, el único mecanismo alcalinizante activo es el NHE, pero en un medio con bicarbonato, como la sangre, ambos mecanismos alcalinizantes son igualmente operativos a pH cercanos al basal (Lagadic-Gossmann, Buckler et al. 1992; Camilion de Hurtado, Perez et al. 1995; Le Prigent, Lagadic-Gossmann et al. 1997; Vaughan-Jones, Villafuerte et al. 2006; Vaughan-Jones, Spitzer et al. 2009) .

La *Figura 1* muestra un esquema de una célula donde han sido representado los cuatro trasportadores que controlan el pH_i .

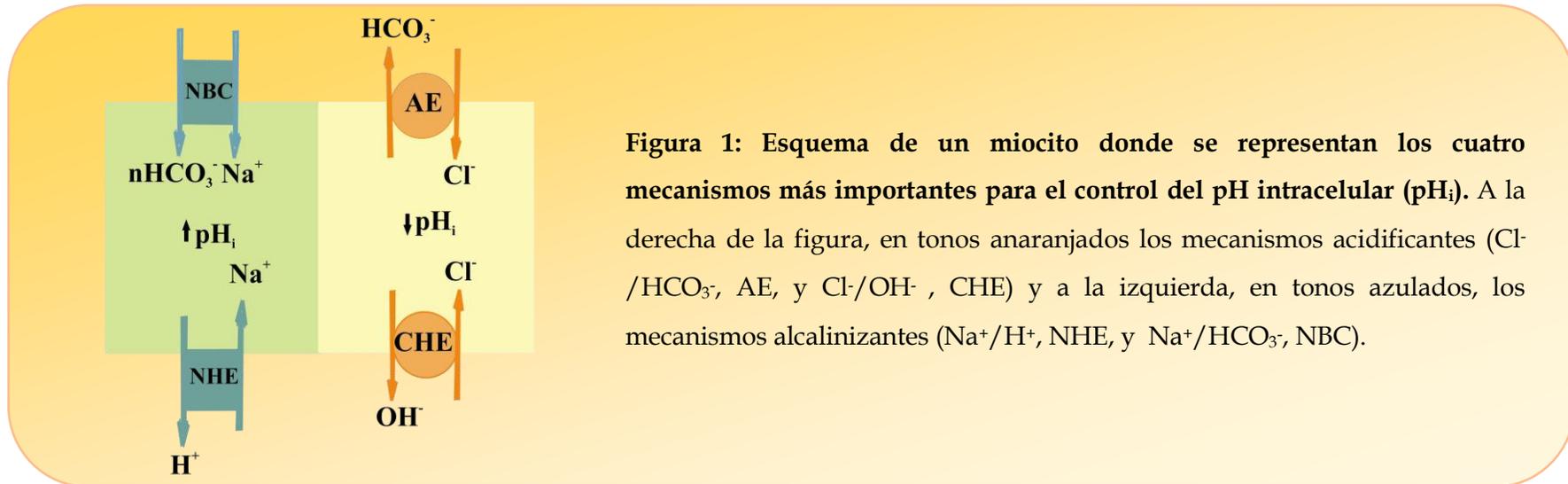


Figura 1: Esquema de un miocito donde se representan los cuatro mecanismos más importantes para el control del pH intracelular (pH_i). A la derecha de la figura, en tonos anaranjados los mecanismos acidificantes ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, AE, y Cl^-/OH^- , CHE) y a la izquierda, en tonos azulados, los mecanismos alcalinizantes (Na^+/H^+ , NHE, y $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, NBC).

El cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC)

Las proteínas de membrana que transportan HCO_3^- o CO_3^- tienen un rol sumamente importante en las células eucariotas regulando tanto el pH intra como extracelular. Esto no es sorprendente dado que el bicarbonato es el principal sistema amortiguador en los organismos eucariotas.

Los mecanismos primarios de transporte de bicarbonato en mamíferos son el NBC y el AE. El NBC tiene un alto grado de homología en su secuencia con el AE, conformando una superfamilia de *transportadores de bicarbonato*, compuesta por diez genes diferentes, denominada *SLC4*.

En la *Figura 2* se esquematiza la interrelación de los productos proteicos de dichos genes según un análisis poligenético computarizado (Romero, Fulton et al. 2004; Pushkin and Kurtz 2006).

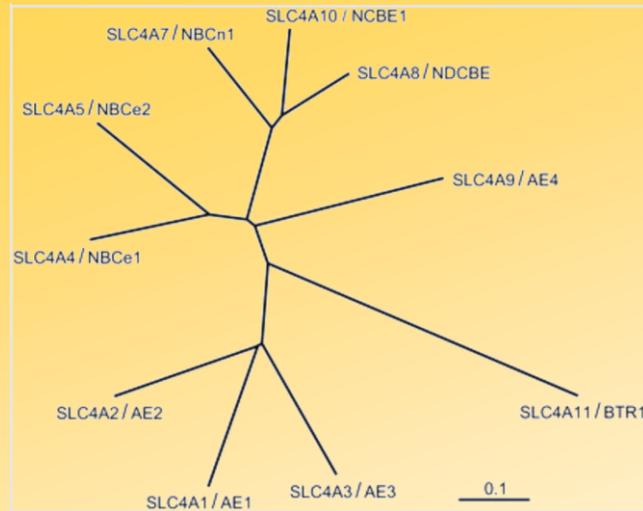


Figura 2: Árbol de la familia SLC4. El análisis poligenético computarizado fue realizado utilizando la secuencia aminoacídica de una variante humana representativa de cada uno de los genes de la familia (dispuesto en <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

Todos los miembros de la familia SLC4 comparten la capacidad para transportar HCO₃⁻, distinguiéndose entre ellos por la habilidad de mediar el transporte simultáneo de Cl⁻ o Na⁺. Así se distinguen 3 subgrupos funcionales (Romero, Fulton et al. 2004):

1. Intercambio electroneutro de Cl⁻/HCO₃⁻ (AE)
2. Intercambio electroneutro de Cl⁻ por Na⁺ y HCO₃⁻ (NDCBE)
3. Cotransporte de Na⁺ y HCO₃⁻ (NBC), de un modo electroneutro (NBCn, cotransportando 1 molécula de Na⁺ por cada 1 molécula de HCO₃⁻) ó de una forma electrogénica (NBCe, cotransportando 1 molécula de Na⁺ por cada 2 ó 3 moléculas de HCO₃⁻).

Todos los miembros de la familia SLC4 poseen un largo dominio hidrofílico amino terminal (N-terminal) y un dominio hidrofílico carboxilo terminal (C-terminal) mucho más corto, ambos intracelulares. Separando estos dominios existen de 10 a 14

segmentos hidrofóbicos transmembrana (TMs). Además, poseen dos dominios re-entrantes, uno entre el TMs 9 y 10 y otro justo después del TMs 11. Finalmente, presentan dos dominios completamente extracelulares, uno entre los TMs 5 y 6 y el otro entre los TMs 7 y 8, conocidos como dominios extracelulares 3 (EC3) y 4 (EC4), respectivamente (Figura 3).

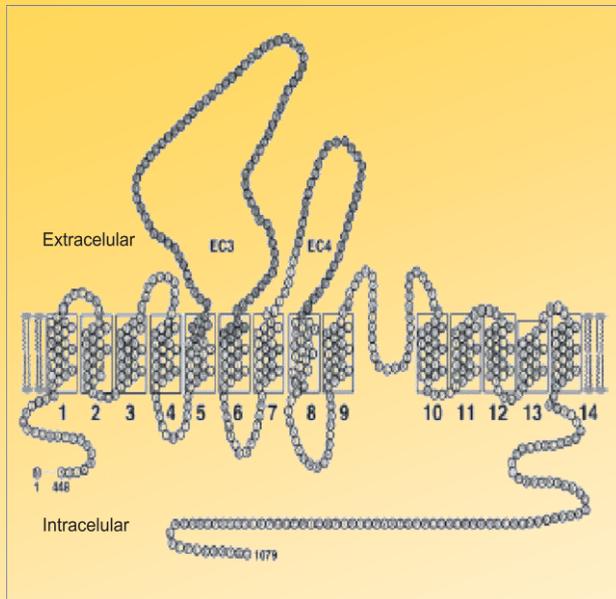


Figura 3: Modelo topológico de la isoforma electrogénica del NBC renal (Alvarez, Loisel et al. 2003).

EC3 y EC4: dominios extracelulares 3 y 4, repectivamente.

Cotransportadores $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ electrogénicos (estequiometría $1 \text{ Na}^+ / 2$ ó 3 HCO_3^-)

1. **NBCe1 (NBC1):** Está codificado por el gen **SLC4A4** (Choi, Romero et al. 1999), del cual derivan, por “splicing” alternativo del gen, tres variantes: el **NBCe1-A** (kNBC), presente en los túbulos renales proximales, el **NBCe1-B** (pNBC), de distribución amplia, entre ellas el corazón, que se diferencia del NBC1-A porque los primeros 41 aminoácidos de éste son reemplazados

por otros 85 aminoácidos diferentes en el NBC1-B y el *NBCe1-C*, estructuralmente similar al pNBC, con excepción del extremo C-terminal.

2. **NBCe2 (NBC4):** Está codificado por el gen **SLC4A5** (Pushkin, Abuladze et al. 2000; Sassani, Pushkin et al. 2002). Su estequiometría no está aún bien definida, pudiendo transportar 2 ó 3 moléculas de HCO_3^- por cada molécula de Na^+ (Burnham, Flagella et al. 1998; Virkki, Wilson et al. 2002).

Cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ electroneutro (estequiometría 1 Na^+ / 1 HCO_3^-)

1. **NBCn (NBC3):** Está codificado por el gen **SLC4A7** (Choi, Aalkjaer et al. 2000). Cotransporta 1 molécula de Na^+ por cada 1 de HCO_3^- (Soleimani and Burnham 2000). Es la isoforma del NBC que está más ampliamente distribuída por el organismo, siendo de gran importancia a nivel del sistema nervioso central.

Actividad del NBC

El NBC promueve el co-influjo de Na^+ y HCO_3^- , pudiendo hacerlo de un modo electroneutro (cotransporte de una molécula de Na^+ por cada molécula de HCO_3^- , NBCn) o electrogénico (cotrasporte de una molécula de Na^+ por cada dos o tres de HCO_3^- , NBCe) (Dart and Vaughan-Jones 1992; Camilion de Hurtado, Alvarez et al. 1996; Aiello, Petroff et al. 1998; Yamamoto, Swietach et al. 2005; Villa-Abrille, Petroff et al. 2007; Vaughan-Jones, Spitzer et al. 2009).

La fuerza impulsora del NBCe tiene tres componentes: el gradiente de Na^+ , el gradiente de HCO_3^- , común con el NBC electroneutro, y el potencial de membrana, exclusivo del mecanismo electrogénico. Conocer esto ayuda a entender, como se

verá más adelante en *Fisiología del NBC*, la relación que existe entre el potencial de membrana en reposo de la célula, la estequiometría y el sentido de transporte del HCO_3^- , y además la importancia particular que tiene este mecanismo en las células cardíacas (ver *NBC cardíaco*).

El NBC tiene tres funciones principales (Romero, Fulton et al. 2004)

1. Regulación del estado ácido- base del organismo a través de la reabsorción renal de HCO_3^- .

Una de las funciones primarias del riñón es la reabsorción de HCO_3^- hacia el torrente sanguíneo. El 80-90% del HCO_3^- es reabsorbido en el túbulo proximal a través del NBC electrogénico renal (NBCe1-A). El HCO_3^- filtrado se asocia con los H^+ de la luz tubular, formando ácido carbónico (H_2CO_3), el cual se disocia rápidamente en CO_2 y H_2O . El CO_2 difunde a través de la membrana apical y una vez dentro de la célula vuelven a formarse HCO_3^- y H^+ . Así, el NBCe1-A localizado en la membrana basolateral de los túbulos proximales es el encargado de extruir el HCO_3^- de la célula hacia el intersticio. Esta es una particularidad de las isoformas electrogénicas con estequiometría $3 \text{HCO}_3^- : 1 \text{Na}^+$, ya que el potencial de inversión del NBC (E_{NBC}) con esta estequiometría es alrededor de -20 mV , frecuentemente menos negativo que el potencial de membrana en reposo (PMR) de las células.

2. Secreción de HCO_3^- en glándulas exócrinas.

En células de los conductos pancreáticos, el NBC participa en la secreción de HCO_3^- . Este efecto es producido gracias al influjo de HCO_3^- a través de la membrana basolateral por el NBC electrogénico pancreático (NBCe1-B) y al posterior eflujo de este ión hacia la luz del conducto mediado por un AE presente en la membrana apical. El NBC1e-B posee una estequiometría

de 2 HCO_3^- : 1 Na^+ lo que determina un E_{NBC} de aproximadamente -100 mV, un potencial más negativo que el PMR de estas células. De esta manera, la fuerza impulsora favorece el influjo de HCO_3^- a la célula.

3. Regulación del pH_i .

La regulación del pH_i llevada a cabo por el NBC es esencial para el correcto funcionamiento de las células en el organismo, donde el principal sistema amortiguador es el conformado por el $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$.

El NBC cardíaco

Fisiología

En el corazón el NBC promueve el co-influjo de Na^+ y HCO_3^- contribuyendo con el 40-50 % de la extrusión total de ácido de las células cardíacas. Inicialmente el funcionamiento del NBC cardíaco fue descrito por el grupo del Dr. Vaughan-Jones de la Universidad de Oxford de Gran Bretaña como un mecanismo electroneutro (Lagadic-Gossmann, Buckler et al. 1992), y más tarde el grupo de trabajo liderado por el Dr. Cingolani demostró la existencia de un mecanismo electrogénico con una estequiometría de 2 HCO_3^- : 1 Na^+ (Camilion de Hurtado, Perez et al. 1995). Actualmente, gracias a los adelantos en biología molecular, se conoce que ambos mecanismos, electroneutro (isoforma NBC3) y electrogénico (isoformas NBC1 y NBC4) co-existen en el tejido cardíaco (Cordat and Casey 2009).

Adicionalmente, en nuestro laboratorio se registró por primera vez la corriente generada por el NBCe, la cual se denominó $I_{\text{Na,Bic}}$, demostrando que era capaz de modular la forma y duración del potencial de acción cardíaco tanto en miocitos de rata como de gato (Aiello, Petroff et al. 1998; Villa-Abrille, Petroff et al. 2007).

Por otro lado, el NBC, al igual que el NHE, además de regular el pH_i , aumenta la concentración de Na^+ intracelular ($[\text{Na}^+_i]$), contribuyendo con un 30% del incremento total del Na^+_i a pH intracelular 6.8 (Yamamoto, Swietach et al. 2005). Este incremento del Na^+_i activa al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) en su modo reverso, llevando al aumento de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}_i]$) (Rothstein, Byron et al. 2002; Bril 2003; Aiello, Villa-Abrille et al. 2005).

Regulación

La Angiotensina II (Ang II) activa al NBC en miocitos ventriculares de ratas neonatas por un mecanismo fosfoinositol-independiente tras la unión a sus receptores AT2 (Kohout and Rogers 1995) y en miocitos ventriculares de ratas adultas tras su unión a los receptores AT1 y la posterior activación de la MAP kinasa ERK 1/2 (Baetz, Haworth et al. 2002).

Además, ha sido demostrado que el NBC es regulado en forma dual por el sistema nervioso autónomo simpático, siendo el transportador activado por agonistas β -adrenérgicos, e inhibido por agonistas α_1 -adrenérgicos (Lagadic-Gossmann and Vaughan-Jones 1993).

Por último, los iones intracelulares también pueden modificar la actividad del NBC cardíaco. Dada la importancia del Ca^{2+} en los procesos intracelulares, *Le Pringent et al* estudiaron el efecto que este ión tenía sobre el NBC, demostrando que, según sus

resultados, la actividad del NBC es Ca^{2+} -independiente (Le Prigent, Lagadic-Gossmann et al. 1997). Por otro lado, en células HEK 293 transfectadas con NBCe1-B, el magnesio intracelular (Mg^{2+}_i) inhibió la corriente generada por la mencionada isoforma electrogénica (Yamaguchi and Ishikawa 2008).

Implicancias fisiopatológicas

El estudio de la implicancia del NBC en la patología cardiovascular está recién en sus inicios, y a pesar que han sido realizadas algunas investigaciones, no existen hasta el momento evidencias concretas que indiquen relaciones de causalidad entre el NBC y el desarrollo y/o evolución de las patologías cardíacas.

Se ha demostrado la participación del NBC durante el daño post isquemia/reperfusión del corazón tanto en animales (Schafer, Ladilov et al. 2000; Sandmann, Yu et al. 2001) como en pacientes con insuficiencia cardíaca terminal, los cuales mejoraron sus parámetros funcionales tras el bloqueo del NBCe (Khandoudi, Albadine et al. 2001). Los autores plantean la posibilidad de que dado que la actividad del NBC lleva a un aumento de la $[\text{Na}^+_i]$ (Vaughan-Jones, Villafuerte et al. 2006), y en consecuencia de la $[\text{Ca}^{2+}_i]$ por la activación del NCX en modo reverso (ver *Fisiología del NBC cardíaco*), una sobreexpresión y un incremento en la actividad del cotransportador generaría una sobrecarga perjudicial de la $[\text{Ca}^{2+}_i]$ que conduciría a la apoptosis celular, a la hipertrofia y a una mayor predisposición a generar eventos arrítmicos (Doggrell and Hancox 2003; Baartscheer and van Borren 2008).

Ha sido demostrado que durante la hipertrofia y la insuficiencia cardíaca la $[\text{Na}^+]_i$ está elevada, y que en consecuencia el NCX funciona en su modo reverso introduciendo Ca^{2+} a la célula (Gray, McIntyre et al. 2001; Despa, Islam et al. 2002; Verdonck, Volders et al. 2003).

La relación entre el aumento de la $[\text{Na}^+]_i$ y la de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con la hipertrofia cardíaca ha sido ampliamente estudiado en referencia a la activación del NHE, demostrándose que el uso de inhibidores del NHE son capaces de impedir e incluso revertir la injuria miocárdica secundaria a la mencionada sobrecarga de calcio (Ennis, Garcarena et al. 2007). En referencia a lo anteriormente expuesto, *Bril A* ha propuesto que el uso de inhibidores del NBC podría representar una novedosa estrategia terapéutica para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares (Bril 2003).

Adicionalmente, ha sido demostrado el aumento en la expresión y función del NBC durante el desarrollo de hipertrofia cardíaca secundaria a coartación aórtica en ratas, siendo revertida con Losartán (inhibidor del receptor AT1 de Ang II), relacionando al NBC con dicha situación patológica (Yamamoto, Shirayama et al. 2007). Además, es interesante que los autores demuestran la existencia de una heterogeneidad en la distribución del NBC en la pared ventricular de corazones normales, siendo mayor su expresión en la zona del epicardio que en el miocardio y endocardio, la cual desaparece durante la hipertrofia (Yamamoto, Shirayama et al. 2007). Dado que es conocido que durante la hipertrofia cardíaca existen anomalías electrofisiológicas y un aumento en la aparición de eventos arrítmicos, podría ocurrir que esta homogenización transmural de los corazones hipertróficos tenga alguna relevancia en dichos sucesos.

Por último, en ratas en las cuales se generó un modelo de diabetes mellitus insulino-dependiente, se demostró que la recuperación del pH_i está disminuída por un deterioro exclusivo del funcionamiento del NHE y que en contraposición la

actividad del NBC permanece inalterada, siendo así, este mecanismo el único que logra defender a la célula de la acidosis, adquiriendo de esta manera un rol relevante en este modelo patológico. (Le Prigent, Lagadic-Gossmann et al. 1997).

La Angiotensina II (Ang II) y el corazón

La Ang II es una hormona fuertemente implicada en el funcionamiento contráctil y eléctrico del corazón. Es conocido hace años la modulación que ejerce sobre varios transportadores de membrana, como el NHE y el NCX, y la estrecha relación que existe entre dicha regulación y la fisiología cardíaca (Aiello, Villa-Abrille et al. 2002; Fliegel and Karmazyn 2004; Cingolani, Perez et al. 2005; Cingolani, Villa-Abrille et al. 2006; De Giusti, Correa et al. 2008). Es por ello que en el presente estudio de *Tesis* decidimos estudiar la relación de la Ang II con el NBC, otro importante transportador de la membrana de las células cardíacas.

La Ang II es un octapéptido formado a partir de la Ang I por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), presente en el endotelio de los vasos sanguíneos, constituyendo el principal estímulo para la secreción de aldosterona por las células glomerulares de la corteza suprarrenal y formando parte del sistema endócrino *renina-angiotensina-aldosterona* (SRAA). Además, la Ang II es producida y secretada en forma local por diversos tejidos, pudiendo actuar en forma autócrina o parácrina (Husain A 1994). En el corazón *Sadoshima et al* fueron los primeros en demostrar que el estiramiento de los miocitos promueve la liberación de Ang II almacenada en vesículas intracelulares, siendo capaz de inducir el desarrollo de hipertrofia en el resto de los miocitos ventriculares (Sadoshima, Xu et al. 1993; Sadoshima and Izumo 1996). A partir de este descubrimiento, en el laboratorio del *Dr. Cingolani* se ha estudiado en forma sistemática este fenómeno en músculos papilares, mostrando que no sólo se libera Ang II almacenada, sino que se promueve la síntesis de novo de endotelina-1 (ET-1) (Cingolani, Perez et al. 2001;

Cingolani, Perez et al. 2003) y que es tras la unión a sus receptores de membrana ET-A que se desencadenan las diferentes cascadas de señalización intracelular con activación de MAP kinasas y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales en suma activan al NHE (Caldiz, Garciarena et al. 2007).

El mecanismo por el cual se llega a la hipertrofia por la activación del NHE implicaría el aumento de la $[\text{Na}^+]_i$, la activación consecuente del NCX en su modo reverso y el consecuente aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, el cual finalmente activa la vía de la calcineurina como mediadora final más importante en el desarrollo de hipertrofia cardíaca (Ennis, Garciarena et al. 2007).

El mismo grupo de trabajo demostró que el estiramiento de los músculos papilares a corto plazo desencadena la activación de las mismas vías expuestas previamente, pero en este caso siendo responsable del *Fenómeno Anrep o segunda fase de fuerza*, (Perez, de Hurtado et al. 2001; Cingolani, Perez et al. 2003; Cingolani, Perez et al. 2005), caracterizado por el aumento lento y progresivo de la contractilidad que sigue al incremento rápido inicial generado por un aumento en la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} (fenómeno conocido como mecanismo de *Frank Starling*).

Así, estos autores sostienen que el mismo estímulo mecánico desencadena vías intracelulares semejantes, participando a corto plazo de la regulación de la contractilidad cardíaca, pero generando a largo plazo una sobrecarga perjudicial de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que lleva al desarrollo de hipertrofia cardíaca (*Figura 4*) (Dulce, Hurtado et al. 2006; Cingolani, Perez et al. 2008).

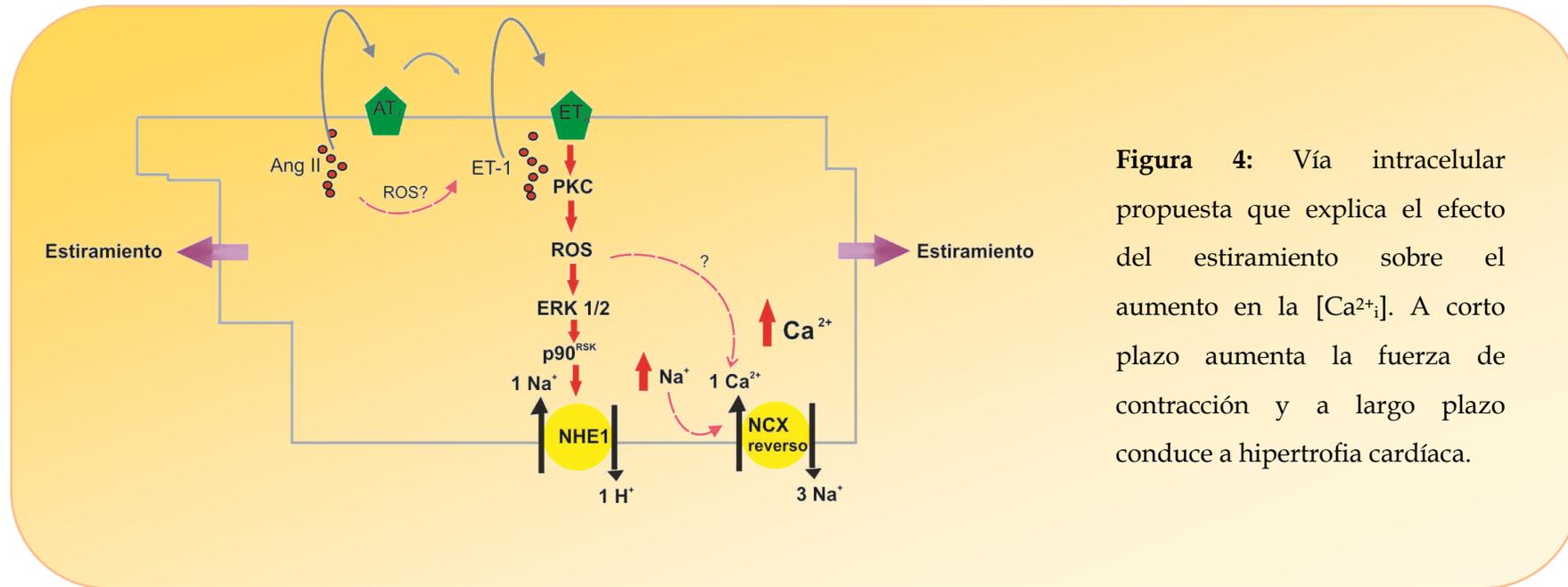


Figura 4: Vía intracelular propuesta que explica el efecto del estiramiento sobre el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}_i]$. A corto plazo aumenta la fuerza de contracción y a largo plazo conduce a hipertrofia cardíaca.

Consistentemente, también en miocitos ventriculares aislados se ha demostrado que la Ang II y/o la ET-1 tienen un efecto inotrópico positivo (EIP) secundario a la activación del NHE, el cual generaría, como ha sido explicado, el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}_i]$ (Aiello, Villa-Abrille et al. 2005; Cingolani, Villa-Abrille et al. 2006; De Giusti, Correa et al. 2008).

La regulación de los transportadores de membrana por la Ang II cumple además un papel importante en el control del pH_i , que como se mencionó anteriormente es esencial para el correcto funcionamiento celular. Ha sido demostrado que la Ang II activa tanto al NHE (Ito, Kagaya et al. 1997; Fliegel and Karmazyn 2004; Cingolani and Ennis 2007) como al NBC (Baetz, Haworth et al. 2002) en miocitos ventriculares, acelerando la recuperación del pH_i tras la inducción de una acidosis.

Finalmente, en relación a los efectos electrofisiológicos de la hormona, la Ang II induce un alargamiento de la duración del potencial de acción cardíaco (DPAC) a través, principalmente, de la inhibición de las corrientes de K^+ repolarizantes tempranas

(Ito) (Yu, Gao et al. 2000) y tardías (IKr y IKs) (Zhou, Ziegler et al. 2006; Domenighetti, Boixel et al. 2007; Rivard, Paradis et al. 2008; Wang, Shi et al. 2008) y activación de la corriente despolarizante L-Ca^{2+} (Aiello and Cingolani 2001; Ichiyanagi, Ishii et al. 2002). Estos sucesos que ocurren a nivel celular son los responsables de las alteraciones en los registros electrocardiográficos (ECG), dentro de los cuales se destacan los cambios en la morfología de la onda T (correspondiente a la repolarización ventricular) y el alargamiento del intervalo QT (representativo de la duración del PA), ambos en estrecha relación con la aparición de fenómenos arrítmicos potencialmente mortales (Domenighetti, Boixel et al. 2007; Fischer, Dechend et al. 2007; Goette and Lendeckel 2008).

Por otro lado, independientemente de la importancia que tiene la Ang II en el normal funcionamiento de las células cardíacas, es estrecha la relación entre la Ang II y el corazón enfermo. Es conocido que los niveles de Ang II están aumentados durante la hipertrofia cardíaca (Lorell 1995; De Mello and Danser 2000; Sernerri, Boddi et al. 2001; Palomeque, Delbridge et al. 2009), que el potencial de acción de los miocitos ventriculares está alargado en dicha patología (Carmeliet 2006), siendo una de sus principales complicaciones la aparición de arritmias ventriculares (Domenighetti, Boixel et al. 2007), y que los inhibidores de los receptores AT1 y los inhibidores de la ECA son los fármacos más ampliamente utilizados en el tratamiento de las patologías cardíacas.

Especies reactivas del oxígeno (ROS) como moléculas de señalización intracelular

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) conforman un grupo heterogéneo de moléculas que incluye a los radicales libres, como el superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^-) y compuestos como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que dada su alta permeabilidad a través de las membranas lipídicas y la posibilidad de generar, a través de la *Reacción de Fenton* en situaciones

patológicas, el radical hidroxilo (OH^-), se lo incluye dentro de las especies reactivas del oxígeno junto con el O_2^- y el OH^- (Dikalov, Griendling et al. 2007; Takimoto and Kass 2007).

Si bien hasta hace pocos años los ROS eran considerados únicamente moléculas “dañinas” implicadas en la hipertrofia, el remodelamiento y la disfunción celular; en la actualidad se han ganado una importante posición junto a otras moléculas encargadas de regular la fisiología celular.

Los ROS forman parte de las vías de señalización intracelular activadas por diferentes agonistas, como la Ang II y ET-1 (Zhang, Chen et al. 2001; Caldiz, Garcarena et al. 2007; Bartosz 2009). En nuestro laboratorio se ha demostrado que ambas hormonas son capaces de aumentar la producción de ROS y a través de ellos llevar a cabo sus efectos (Cingolani, Villa-Abrille et al. 2006; De Giusti, Correa et al. 2008).

Las fuentes principales de ROS en la célula son cuatro: la enzima NADPH oxidasa (NOX), la cadena respiratoria mitocondrial, la enzima Xantina Oxidasa (XO) y el desacople de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), cuando por efectos del estrés oxidativo se produce depleción de su cofactor tetrahidrobiopterina (BH_4) o de su sustrato (arginina) (Figura 5).

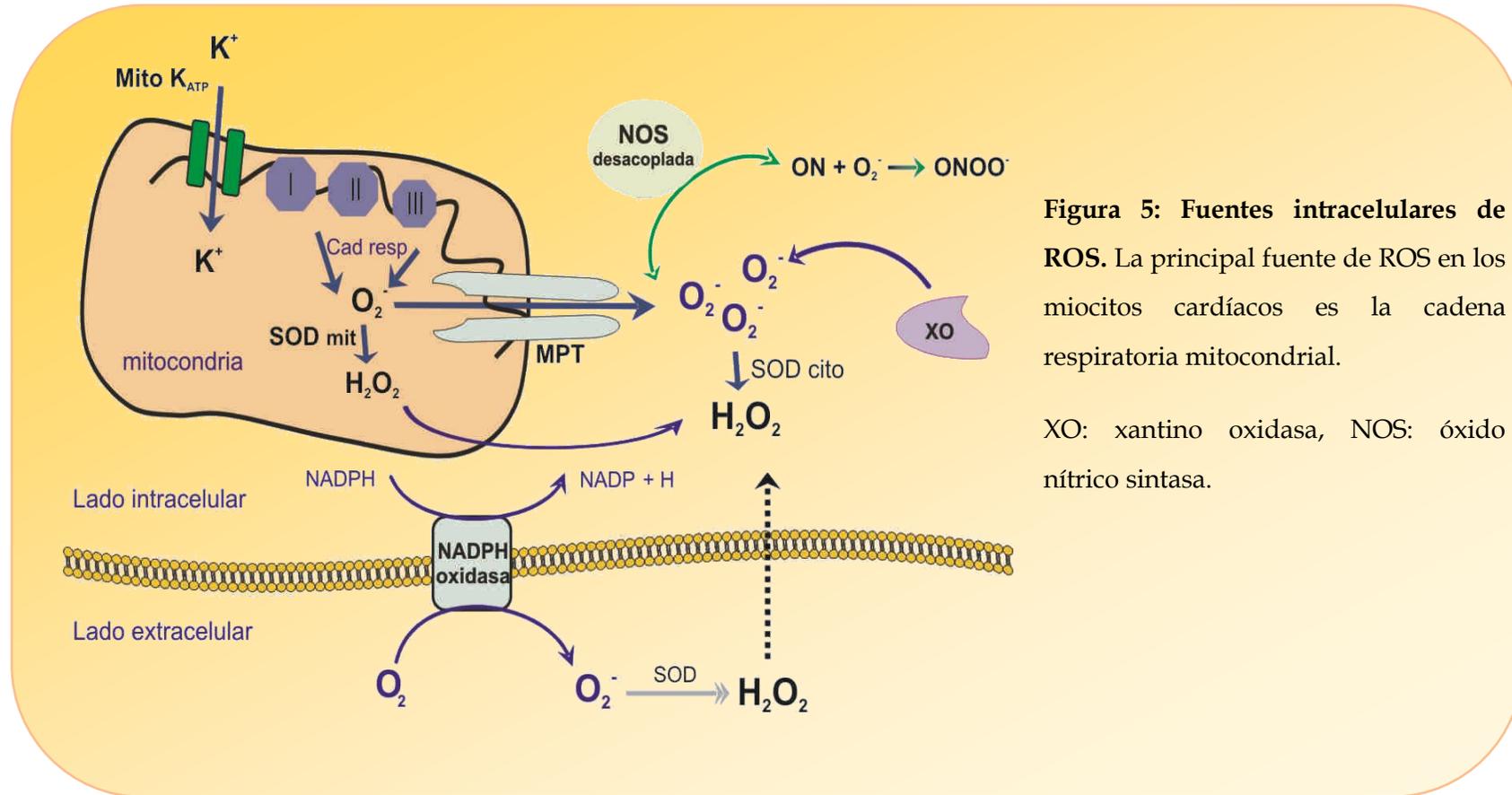


Figura 5: Fuentes intracelulares de ROS. La principal fuente de ROS en los miocitos cardíacos es la cadena respiratoria mitocondrial.

XO: xantino oxidasa, NOS: óxido nítrico sintasa.

En los miocitos cardíacos la producción de O₂⁻ en los complejos I, II y III de la cadena respiratoria mitocondrial constituye la principal fuente de ROS (Dikalov, Griending et al. 2007; Takimoto and Kass 2007). Zorov et al fueron los primeros en demostrar la existencia de una relación entre los ROS y las mitocondrias, por medio de la cual pequeñas cantidades de O₂⁻ generan la salida de un estallido de ROS mitocondrial, fenómeno que los investigadores denominaron “Liberación de ROS inducida por ROS” (Zorov, Filburn et al. 2000). Este término fue adoptado en sucesivas investigaciones (Kimura, Zhang et al. 2005; Zorov,

Juhaszova et al. 2006), y en el año 2005 Kimura et al propusieron a la NOX como la generadora del O_2^- inicial, promotor de la producción masiva de ROS mitocondriales (Kimura, Zhang et al. 2005).

La relación entre los ROS y la mitocondria estaría viabilizada por los canales mitocondriales de K^+ ATP-dependientes (mitoK_{ATP}) (Yao, Tong et al. 1999; Oldenburg, Yang et al. 2003; Oldenburg, Qin et al. 2004; Kimura, Zhang et al. 2005), los cuales tras su apertura y la entrada de K^+ a la matriz mitocondrial, desencadenarían tres posibles consecuencias: la hinchazón, la alcalinización de la matriz o la leve despolarización de la membrana interna mitocondrial, fenómenos que activarían la producción de O_2^- por el complejo I de la cadena mitocondrial (Andruxhiv, Costa et al. 2006).

Así, como se esquematiza en la Figura 6, los ROS generados en la organela saldrían hacia el citosol, mediando los efectos desencadenados por los diferentes agonistas en la superficie celular y regulando diversos procesos fisiológicos (De Giusti, Correa et al. 2008; Doughan, Harrison et al. 2008; Garcarena, Caldiz et al. 2008).

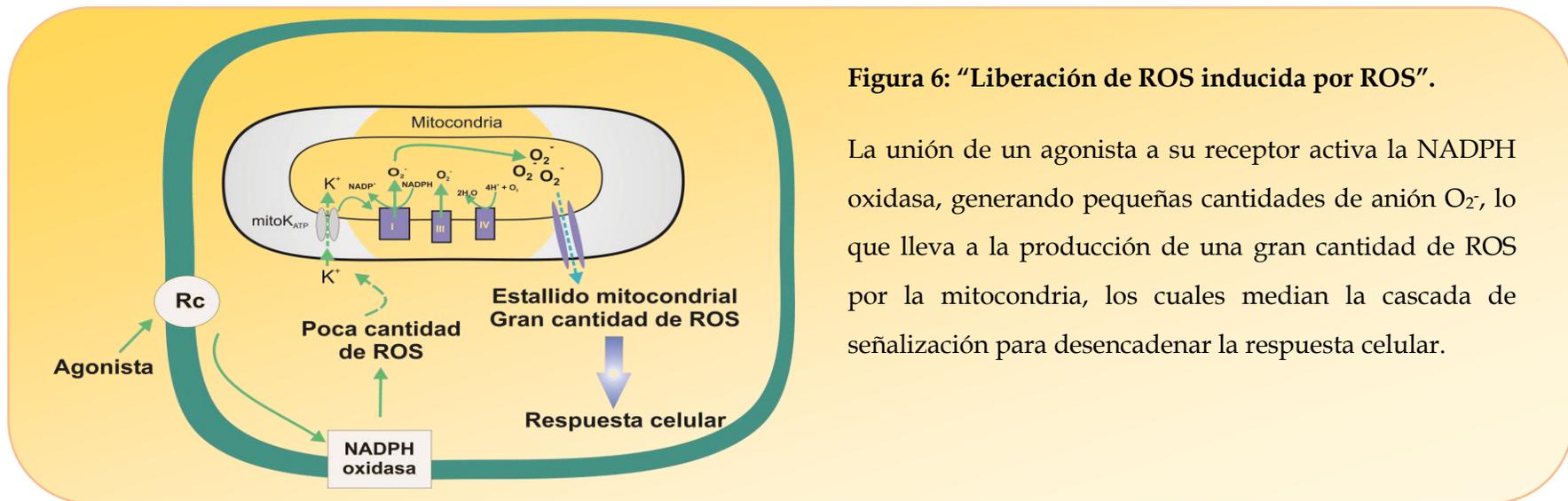


Figura 6: “Liberación de ROS inducida por ROS”.

La unión de un agonista a su receptor activa la NADPH oxidasa, generando pequeñas cantidades de anión O_2^- , lo que lleva a la producción de una gran cantidad de ROS por la mitocondria, los cuales median la cascada de señalización para desencadenar la respuesta celular.

MAP Kinasas

Las MAP kinasas (MAPK) o *proteínas kinasas activadas por mitógenos* son moléculas señalizadoras altamente conservadas durante la evolución que traducen estímulos extracelulares en respuestas intracelulares.

Las cascadas de señalización de las MAPK están organizadas en módulos dispuestos en serie compuestos en su mayoría de los casos por 3 proteínas kinasas y una proteína que oficia de andamio, encargadas todas de conectar las señales de dichos mitógenos extracelulares con moléculas del interior celular y poder así mediar la respuesta de la célula ante el estímulo en cuestión (*Figura 7*) (Kumar, Boehm et al. 2003).

Es importante el hecho de que los módulos no son estrictamente independientes, y más aún se influyen mutuamente, resultando esto en un alto grado de complejidad tanto en lo referido a su función como en su regulación.

Así, las vías lineales representan más la excepción que la regla, y cuanto mayor es la información, tanto más se acepta que las vías de las MAPK, como seguramente ocurre con otras vías de señalización intracelular, están extensamente conectadas entre sí formando verdaderas redes de comunicación (Kyriakis and Avruch 2001; Liu and Hofmann 2004).

Las MAPK desempeñan un importante papel dentro de la célula. Basta conocer sus sustratos, para conocer los fenómenos en los cuales participan, como la transcripción, la síntesis proteica, el ciclo celular, la diferenciación y la muerte celular, teniendo esto, como se puede apreciar, un profundo impacto en la fisiopatología celular (Kyriakis and Avruch 2001).

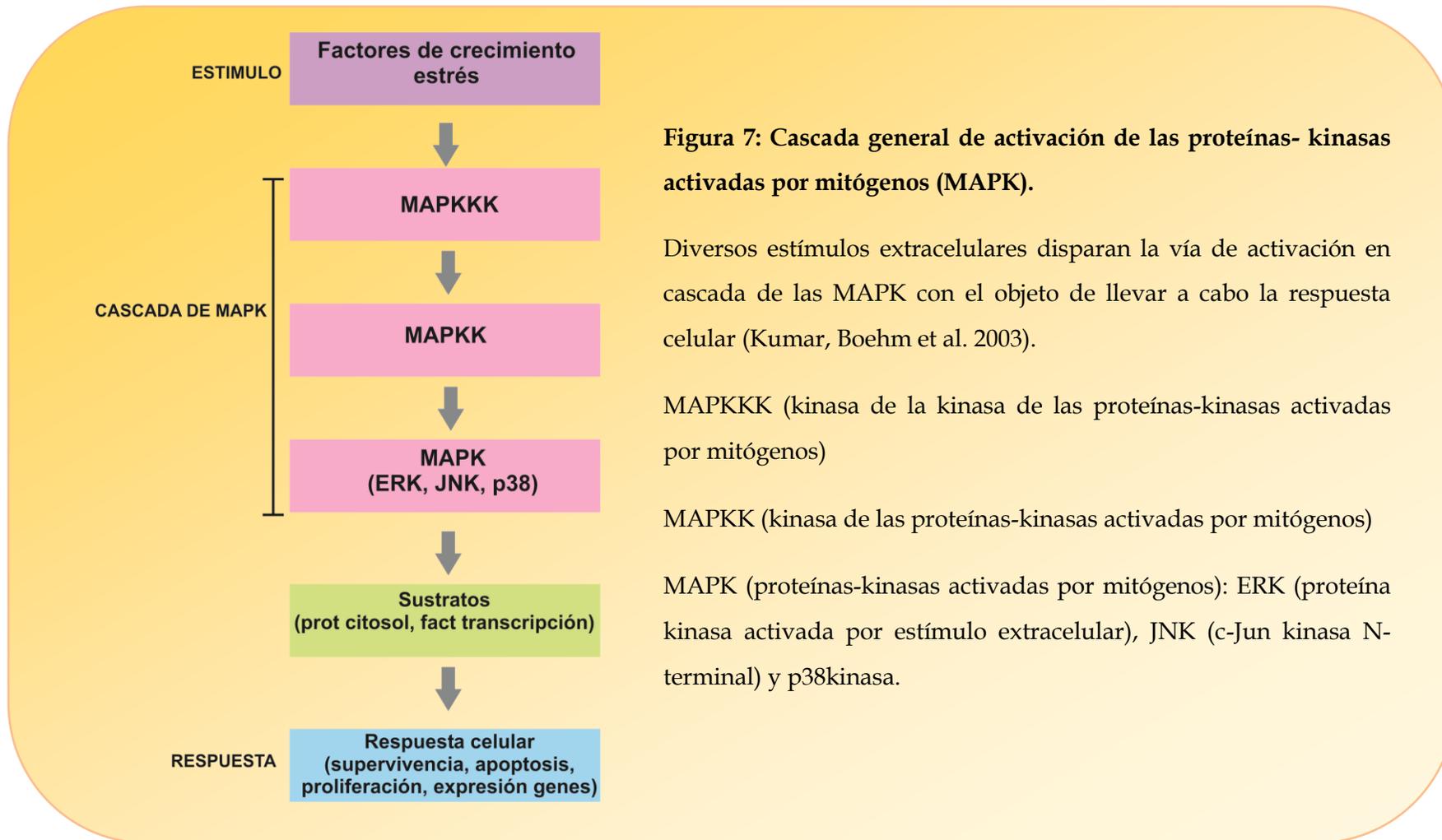


Figura 7: Cascada general de activación de las proteínas- kinasas activadas por mitógenos (MAPK).

Diversos estímulos extracelulares disparan la vía de activación en cascada de las MAPK con el objeto de llevar a cabo la respuesta celular (Kumar, Boehm et al. 2003).

MAPKKK (kinasa de la kinasa de las proteínas-kinasas activadas por mitógenos)

MAPKK (kinasa de las proteínas-kinasas activadas por mitógenos)

MAPK (proteínas-kinasas activadas por mitógenos): ERK (proteína kinasa activada por estímulo extracelular), JNK (c-Jun kinasa N-terminal) y p38kinasa.

Las tres familias principales de MAPK son: la proteína kinasa activada por estímulo extracelular (**ERK 1/2**), la c-Jun kinasa N-terminal (**JNK**) y la p38 kinasa (**p38**).

Si bien las mencionadas familias comparten la mayoría de los estímulos, cada una es preferentemente activada por sólo algunos de ellos. Esta modalidad permite a la célula responder coordinadamente ante la llegada de múltiples señales.

Los estímulos capaces de activar la vía de las MAPK comprenden una gran variedad de moléculas extracelulares; algunas acopladas al *Receptor Tirosina kinasa (TK)*, como la Insulina, los factores de crecimiento y algunas citoquinas, y otras acopladas al *Receptor de siete dominios Transmembrana acoplado a proteína G (GPCR)*, como el utilizado por la Ang II y la ET-1 (Kyriakis and Avruch 2001).

Por otra parte, las MAPK pueden ser activadas ante situaciones estresantes, como el estrés osmótico, la radiación ionizante y la isquemia (Chai, Wu et al. 2008; Nito, Kamada et al. 2008). Otro estímulo muy importante lo constituye la acidosis intracelular (Haworth, Dashnyam et al. 2006).

De todos los estímulos mencionados anteriormente, en general es aceptado que ERK 1/2 media las respuestas celulares iniciadas por factores de crecimiento, mientras que la JNK y p38 kinasa responden principalmente a las situaciones estresantes y a las citoquinas proinflamatorias (Aoki, Richmond et al. 2000).

En el corazón el conocimiento de la implicancia de las MAPK tanto en la fisiología celular como en el desarrollo y evolución de las patologías cardíacas ha crecido de manera exponencial.

Las MAPK están implicadas en la regulación de la contractilidad y del pH_i , en los cuales aparentan exhibir roles opuestos.

La ERK 1/2 media el efecto inotrópico positivo (EIP) de Ang II y ET-1 (Cingolani, Villa-Abrille et al. 2006; De Giusti, Correa et al. 2008) y la activación del NBC durante la recuperación de la acidosis (Baetz, Haworth et al. 2002), mientras que la p38 kinasa media el efecto inotrópico negativo (EIN) de las mismas hormonas (Liao, Wang et al. 2002; Palomeque, Sapia et al. 2006; Szokodi, Kerkela et al. 2008) y la inhibición del NHE durante la recuperación de la acidosis (Kusuhara, Takahashi et al. 1998).

Se ha demostrado que la ERK 1/2 es fosforilada y activada por H_2O_2 de manera dosis y tiempo-dependiente.

Así, el H_2O_2 100 μM induce una significativa fosforilación de dicha kinasa, que comienza al minuto y adquiere su pico máximo a los 3 minutos de exposición (Sabri, Byron et al. 1998; Rothstein, Byron et al. 2002; Snabaitis, Hearse et al. 2002).

De este modo, tanto los ROS como ERK 1/2 (ambos activados por la Ang II) formarían parte de una misma cascada de señalización responsable de mediar los efectos de la hormona (Caldiz, Garcarena et al. 2007).

La p38 kinasa y los ROS también exhiben una estrecha relación entre sí. Aunque existe enorme evidencia sobre la activación de la p38 kinasa por los ROS (Wenzel, Taimor et al. 2001; Izumiya, Kim et al. 2003; Kimura, Zhang et al. 2005), también ha sido demostrado que existen vías de activación de p38 kinasa sin participación de los ROS (Palomeque, Sapia et al. 2006; Spallarossa, Altieri et al. 2006), pareciendo esta discrepancia depender de la dosis (Kwon, Pimentel et al. 2003) y el tiempo de exposición a

los ROS (Liu and Hofmann 2004), como así también del tejido en el cual se estudie e incluso de la isoforma de la kinasa implicada (Sabri and Lucchesi 2006).

Por otro lado, es conocido que tanto ERK 1/2 como p38 kinasa son fosforiladas y activadas durante procesos patológicos como la injuria por isquemia y reperfusión (Moor, Gan et al. 2001; Aon, Cortassa et al. 2008; Chai, Wu et al. 2008) y el desarrollo de hipertrofia cardíaca. Aquí también parecen desempeñar funciones opuestas, siendo la ERK 1/2 pro-hipertrófica y la p38 kinasa pro-apoptótica, existiendo un fino equilibrio entre ellas, resultado del cual dependerá la futura respuesta celular (Cingolani and Ennis 2007; Park, Fischer et al. 2007; Cingolani, Perez et al. 2008; Chai, Wu et al. 2008).

Objetivos

Primera parte: Participación del NBC en el control del pH_i y su regulación por la Ang II

Segunda parte: El NBC electrogénico y la Ang II

Tercera parte: Efecto de los Anticuerpos contra la isoforma electrogénica NBC1 en la fisiología de la célula cardíaca

“Nadie está a salvo de las derrotas, pero es mejor perder algunos combates en la lucha por nuestros sueños, que ser derrotado sin saber siquiera por lo que se está luchando.”

El objetivo general del presente estudio de *Tesis* es la “**Caracterización funcional del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) cardíaco**”, investigando la implicancia de sus diferentes isoformas en la fisiología cardíaca y esclareciendo el papel que cumple la Angiotensina II (Ang II) en la modulación de su actividad.

Para ello se utilizaron miocitos ventriculares de gato adulto en los cuales se midió el pH intracelular (pH_i) por epifluorescencia y se realizaron registros de potenciales de acción (PA) con la técnica de Patch-clamp para evaluar la implicancia de las isoformas electrogénicas del NBC en su morfología y duración.

La producción de anticuerpos contra la isoforma electrogénica NBC1 se utilizó para evaluar la expresión y función del NBC1 en los miocitos ventriculares.

El presente estudio de *Tesis* se puede dividir en tres partes, cada una con objetivos específicos y en las que nos planteamos responder a los siguientes interrogantes:

Primera parte: Participación del NBC en el control del pH_i y su regulación por la Ang II

1. ¿Tiene el NBC una participación activa en el control del pH_i formando parte de los mecanismos alcalinizantes del miocito ventricular? ¿Cuál es su contribución a pH_i ácidos y a pH_i cercanos al basal?
2. ¿Es el NBC regulado por la Angiotensina II (Ang II)?, ¿Qué vías están implicadas en la señalización intracelular desencadenada por la hormona? ¿Participan las especies reactivas del oxígeno (ROS)? ¿Cuáles son las fuentes de ROS

implicados en la regulación del NBC? ¿Participan las MAP kinasas? ¿Están los ROS y las MAPK en la misma vía de señalización desencadenada por la Ang II o son dos vías independientes?

Segunda parte: El NBC electrogénico y la Ang II

1. ¿Qué efecto tiene la Ang II sobre el NBC electrogénico? ¿Qué vía intracelular es la responsable de dicho efecto?
2. ¿Qué relevancia tiene en la duración del PA el efecto de la Ang II sobre el NBC electrogénico?

Tercera parte: Efecto de los Anticuerpos contra la isoforma electrogénica NBC1 en la fisiología de la célula cardíaca

1. ¿Son los anticuerpos generados en nuestro laboratorio capaces de reconocer a la isoforma electrogénica NBC1?
2. ¿Es posible modular la actividad del NBC1 con el uso de dichos anticuerpos?, si es así, ¿qué relevancia tiene el NBC1 en el control del pH_i y en el potencial de acción (PA)?

Materiales y Métodos

Técnicas Generales

Técnicas Específicas

Soluciones

Análisis Estadístico

“La ciencia representa una búsqueda disciplinada de la verdad. Esta verdad nunca es absoluta y es plausible de ser refutada.”

Técnicas Generales

Aislamiento de Miocitos

Todos los experimentos presentados en la presente *Tesis* se realizaron en miocitos ventriculares de gato adulto obtenidos mediante la técnica de digestión enzimática, que se describe brevemente:

Los animales son anestesiados con pentobarbital sódico (35mg/Kg) por vía intraperitoneal, corroborándose la ausencia de reflejo tendinoso y corneal, como así también la falta de respuesta frente a estímulos dolorosos. Se realiza la toracotomía a través de una incisión a la altura esternal con el fin de exponer la totalidad de la cavidad torácica.

El corazón se desliga de la cubierta pericárdica y se inyecta 1 ml de heparina sódica (200U/ml) dentro de la cavidad ventricular para evitar la formación de coágulos. Posteriormente, los corazones son removidos y colgados en un *Sistema de Langherdorf* (Figura 8) para comenzar la perfusión retrógrada con una solución HEPES 1.35 mM Cl_2Ca (ver *Soluciones*) para limpiarlo y estabilizarlo. Se prosigue por 5 minutos con otra solución nominalmente libre de calcio con 0.1 mM de *Ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-n, n, n', n'-tetraacetic acid (EGTA)*, corroborando que el corazón deja de latir. Luego se hace recircular la solución por 15 minutos con 0.5 mM Cl_2Ca , 0.50 mg/ml de colagenasa tipo II (300U/ml), 0.02mg/ml de proteasa y albúmina bovina 0.5 mg/ml. En el transcurso de la digestión se puede observar la caída del ventrículo derecho, la apariencia más espesa de la solución y la menor consistencia del corazón al tacto. Durante todo el proceso de digestión la temperatura se mantuvo a 37°C.

Una vez concluida la digestión, aproximadamente a los 20 minutos del comienzo del pasaje de las enzimas, el corazón es desmontado y el tejido ventricular no digerido es disociado mecánicamente con tijeras.

Finalmente, se restituye progresivamente el calcio de la solución con el agregado de Cl_2Ca hasta lograr una concentración final de 1.35 mM, concentración que se utilizará en los posteriores experimentos. Este pasaje lento por soluciones progresivamente más concentradas en Cl_2Ca tiene como propósito evitar la muerte celular por recalcificación rápida. Al momento de utilizar los miocitos, éstos se resuspenden en una solución con bicarbonato burbujeado con CO_2 5% / O_2 95% (ver *Soluciones*) con el fin de poder evaluar la función del NBC.



Figura 8: Equipo de Langherdorf utilizado para el aislamiento de los miocitos ventriculares de corazón de gato.

Se observa el corazón dentro del vaso de doble camisa durante la etapa de digestión enzimática con colagensa.

Producción de anticuerpos policlonales contra la isoforma electrogénica NBC1

1. Proteína de fusión:

Con el objeto de producir anticuerpos policlonales contra los dominios extracelulares 3 y 4 del NBC1 (EC3 y EC4), se construyó un plásmido con la secuencia del ADN copia (ADNc) para la proteína glutatión S-transferasa (GST) unida al ADNc correspondiente al EC3 y o al EC4. Estas proteínas de fusión, producidas por el *Dr. Bernardo Alvarez* en el laboratorio del *Dr. Joseph Casey* (Alvarez, Loisselle et al. 2003), fueron utilizadas como antígenos al inyectarlas en conejos.

2. Anticuerpos:

Los anticuerpos se obtuvieron mediante la inmunización de conejos machos New Zealand de 3 meses de edad con una inyección subcutánea de 1000 µg de la proteína de fusión en adyuvante de Freund`s completo, seguida de dos inyecciones separadas por un mes, con 600 µg de proteína de fusión con adyuvante de Freund`s incompleto. Al cabo de un mes de la última inyección se realizó la extracción de sangre y se separó el suero crudo conteniendo los anticuerpos contra los dominios extracelulares 3 (a-L3) y 4 (a-L4), respectivamente. Paralelamente, otros conejos fueron inyectados con el adyuvante de Freund`s completo sin la proteína de fusión para generar suero no inmune (sham).

Debido a que estos dominios son extracelulares, pretendíamos que los anticuerpos reconocieran al cotransportador e interfirieran en su función.

Técnicas Específicas

Registro de pH_i en miocitos

El pH intracelular (pH_i) de los miocitos se midió por un sistema de epifluorescencia (Ion Optix, Milton, MA). Se utilizaron los miocitos cardíacos obtenidos en el mismo día mediante la técnica previamente descrita y mantenidos en un medio con HCO_3^- burbujeadado con CO_2 5%/ O_2 95%, los cuales fueron cargados con 10 μM del indicador de pH_i , 2'-7'-bis (2-carboxyethyl) -5, 6-carboxyfluorescein (BCECF)-AM a 30°C durante 10 minutos, al cabo de los cuales se lavó el medio extracelular con solución libre de indicador.

El modo de carga del indicador se basa en que las formas “AM” o “acetoxy-metil-ester” de los indicadores fluorescentes atraviesan fácilmente la membrana, y así una vez en el citosol las esterasas intracelulares cortan la porción AM para liberar la forma ácida del indicador, que es la que posee la propiedad de fluorescer cuando se combina con el ión correspondiente (H^+).

Transcurridos 30 minutos de lavado, los miocitos fueron colocados sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon TE 2000-U), a flujo continuo (2ml/min) y estimulados a través de dos electrodos de platino a una frecuencia de 0.5 Hz. La luz de excitación, provista por una cámara de Xenon de 75 watt, fue centrada a 440 y 490 nm y transmitida a los miocitos. La fluorescencia emitida fue colectada por un fotomultiplicador provisto de un filtro de 535 nm. El cociente (490/440) fue digitalizado a 10 kHz (ION WIZARD software) para análisis de fluorescencia.

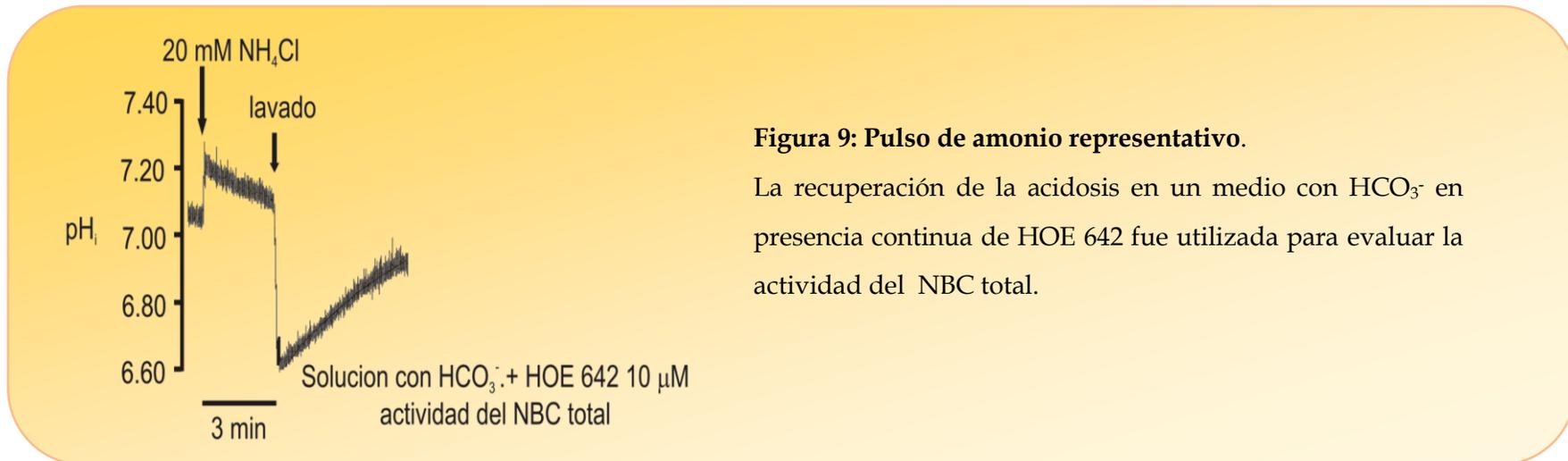
Al término de cada experimento, se realizó una calibración con Nigericina y alto K^+ (Perez, Alvarez et al. 1995). Esto permitió transformar las unidades arbitrarias de fluorescencia del cociente 490/440 en unidades de pH_i . Se realizó un gráfico del pH_i vs

el cociente 490/440, se hizo un ajuste lineal de los datos, y el valor de la ordenada al origen y la pendiente de la ecuación general de la recta fueron utilizados para reemplazar los datos de fluorescencia.

Los miocitos cargados con BCECF se utilizaron para medir el pH_i de las células realizando 2 técnicas diferentes, las cuales se describen brevemente a continuación:

Pulso de Amonio

Para evaluar la actividad total del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) en la recuperación del pH_i tras la acidosis se utilizó la técnica conocida como “Pulsos de amonio” (Figura 9).



Inicialmente los miocitos fueron expuestos a una solución extracelular de bicarbonato burbujeado con CO_2 5%/ O_2 95%, registrándose el pH_i hasta su estabilización. Seguidamente, al exponerlos a NH_4Cl 20 mM durante 3 minutos se generó una alcalosis intracelular debido a la difusión rápida, a través de la membrana, del amoníaco (NH_3) y la subsecuente asociación de esta molécula con los H^+ intracelulares.

A la vez, también difunde, pero más lentamente, amonio (NH₄⁺), el cual se disocia y aporta una cantidad extra de H⁺ al medio intracelular, produciendo una leve caída del pH_i. Cuando el NH₄Cl fue removido y los miocitos volvieron a exponerse a la solución de bicarbonato inicial, se evidenció una rápida acidificación celular debida a la generación intracelular de H⁺, secundaria a la disociación del NH₄⁺ en H⁺ y NH₃ y al aporte de H⁺ provenientes de la difusión lenta del NH₄⁺.

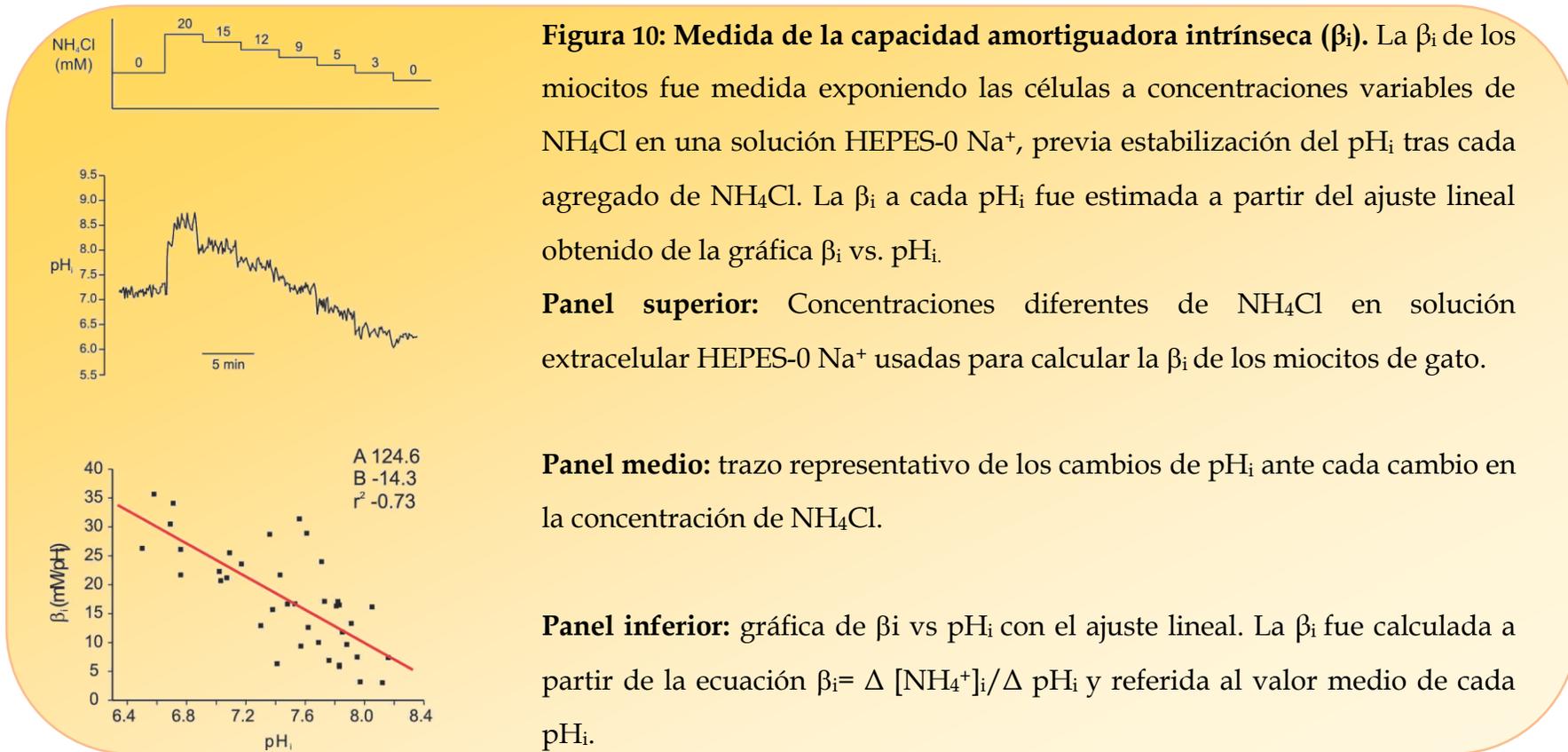
Dado que el NH₃ es permeable, salió de la célula, y los H⁺ que permanecieron en el interior fueron los responsables de la disminución del pH_i.

Esta acidosis intracelular activó a los mecanismos celulares alcalinizantes (NHE y NBC), encargados de llevar el pH_i a sus valores basales.

El análisis de los datos se realizó en el programa de computación *Origin 7.0*, ajustando la curva de recuperación con una función exponencial de primer orden. De este ajuste se obtuvo la velocidad (dpH_i/dt) de recuperación a cada pH_i y luego, con este dato y conociendo la capacidad amortiguadora total (β_{tot}), se calculó el flujo de protones (J_H) en mM/min ($J_H = \beta_{tot} dpH_i/dt$). Como se explica en la (*Figura 10*), la β_{tot} fue calculada a partir de la suma entre la capacidad amortiguadora del CO₂ intracelular (β_{CO_2}) y la capacidad amortiguadora intrínseca (β_i).

La β_{CO_2} fue calculada como, $\beta_{CO_2} = 2.3 [HCO_3^-]_i$, donde $[HCO_3^-]_i = [HCO_3^-]_o 10^{pH_i - pH_o}$ (Roos and Boron 1981; Leem, Lagadic-Gossmann et al. 1999). La β_i de los miocitos fue calculada exponiendo las células a diferentes concentraciones de NH₄Cl (20, 15, 12, 9, 5 y 3 mmol/L) en buffer HEPES- 0 Na⁺ (ver *Soluciones*) y registrando el pH_i obtenido para cada concentración de NH₄Cl durante 3 minutos, utilizando luego el promedio de los valores del último minuto en cada situación. Sabiendo que: $NH_4^+_i = NH_4^+_o \times 10^{(pH_o - pH_i)} / 1 + 10^{(pH_o - pK)}$, la β_i se calculó como $\beta_i = \Delta [NH_4^+]_i / \Delta pH_i$, y referida al punto medio de las medidas de

pH_i , pK del NH_4^+ = 9.21 y el pH_o = 7.4 (Zaniboni, Swietach et al. 2003). La β_i a diferentes valores de pH_i fue estimada sobre un ajuste lineal obtenido de la gráfica entre la β_i en función del pH_i .



En la presente *Tesis* se utilizó esta técnica para determinar el papel que juega el NBC, y sus diferentes isoformas, en la recuperación de una sobrecarga ácida intracelular. Se investigó el efecto de Angiotensina II (Ang II) sobre el cotransportador y, con el empleo de diferentes inhibidores, la vía intracelular desencadenada por la hormona para modular su función. En

todos los casos la Ang II fue agregada 10 minutos previos al inicio de los “Pulso de amonio”, y los inhibidores 10 minutos previos al agregado de Ang II.

También se utilizaron los anticuerpos diseñados contra la isoforma electrogénica NBC1 (a-L3 y a-L4) con el objeto de investigar la participación relativa de las isoformas del NBC en la recuperación del pH_i . Los miocitos fueron preincubados 10 minutos previos al inicio de los “Pulsos de amonio” con el suero sham o conteniendo cada uno de los anticuerpos.

Pulso de K^+

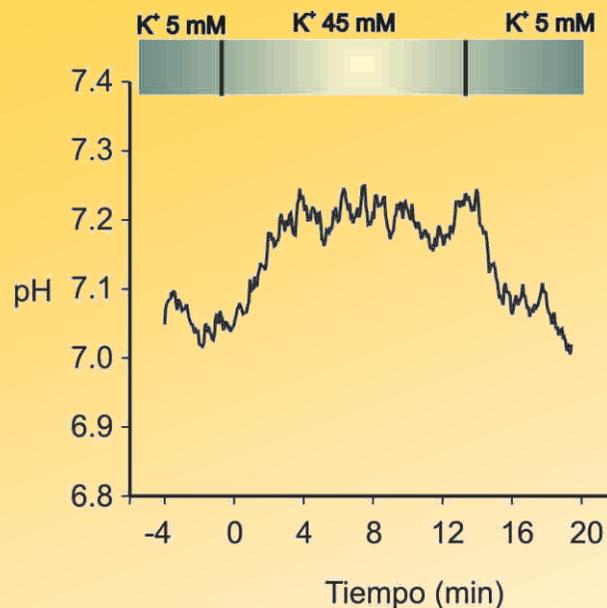


Figura 11: Pulso de K^+ representativo.

Se registra el aumento de pH_i generado por el paso de los miocitos de una solución extracelular con K^+ 5 mM a otra con K^+ 45 mM. Al cabo de 14 minutos los miocitos vuelven a exponerse a la solución inicial y el pH_i desciende. Dado que el alto K^+ genera una despolarización celular, este método fue utilizado para evaluar la actividad del NBC electrogénico (NBCe) en aislamiento.

Con el objetivo de investigar la actividad del NBC electrogénico (NBCe) en forma aislada, se realizaron “Pulsos de K^+ ” (Figura 11), también conocidos como “Despolarización con alto potasio”. Inicialmente los miocitos fueron expuestos a una

solución extracelular de bicarbonato con K^+ 5 mM y seguidamente, tras lograr la estabilización en el registro del pH_i , se cambió la solución por una con alto K^+ (45 mM), isosmolar con respecto a la solución inicial, la cual se mantuvo durante 14 minutos. El alto K^+ generó una despolarización celular de aproximadamente 60 mV, lo cual activó selectivamente al NBCe y generó un aumento del pH_i (ΔpH_i), representando una medida de la actividad del NBCe. Por último, los miocitos volvieron a exponerse a la solución inicial, constatándose el descenso del pH_i .

Con esta técnica se pretendió estudiar las dos isoformas electrogénicas del NBC (NBC1 y NBC4), utilizando los anticuerpos diseñados por nuestro laboratorio contra la isoforma NBC1, como así también investigar la regulación hormonal por Ang II de dicho mecanismo.

Los anticuerpos y la Ang II fueron agregados 10 minutos previos al inicio de los “Pulsos de K^+ ” y los inhibidores 10 minutos previos al agregado de Ang II.

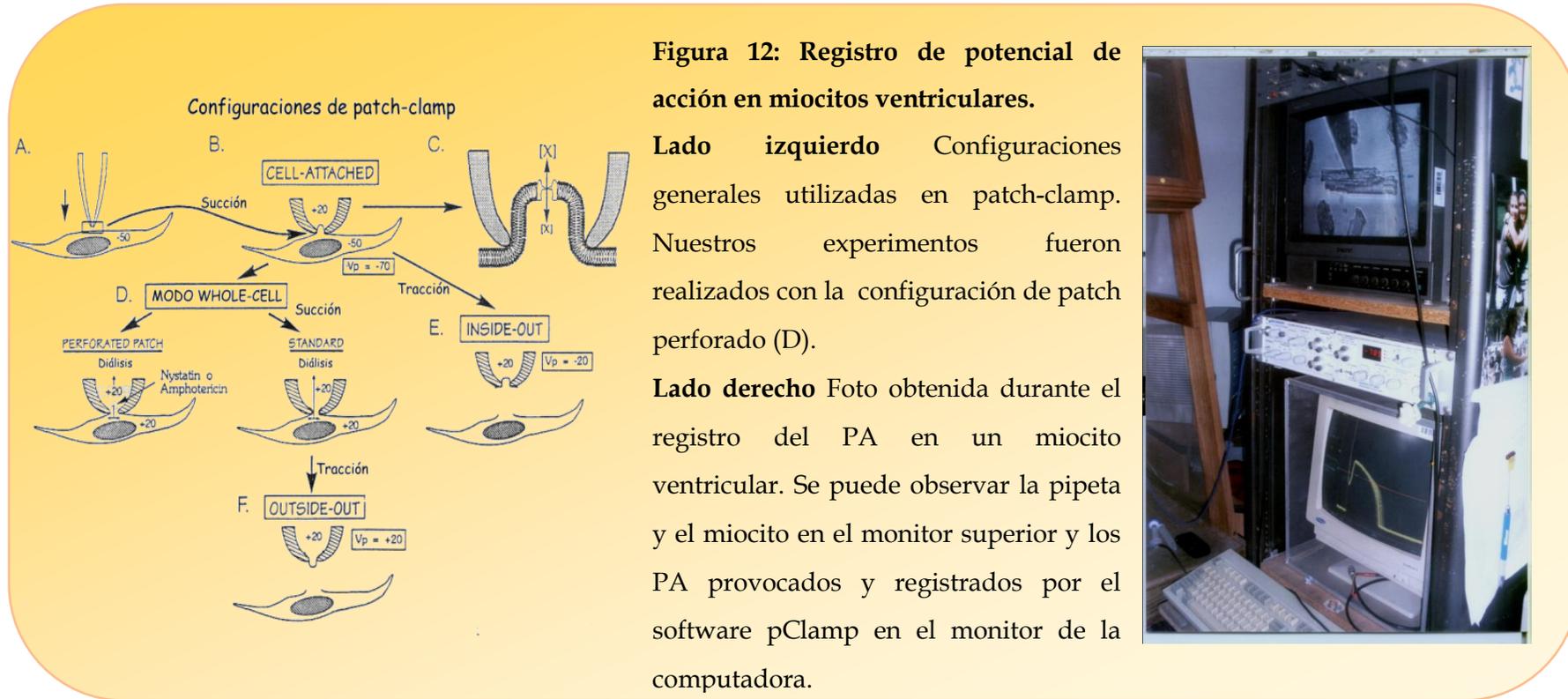
Registro de Potencial de acción (PA) en miocitos aislados

El registro del potencial de acción (PA) de los miocitos ventriculares dispuestos en una cámara de perfusión se realizó con la técnica de Patch-clamp en su configuración patch perforado (*Figura 12, lado izquierdo*), utilizando un amplificador de patch-clamp (Axopatch 200A, Axon Instruments, Foster City, Calif.).

Las pipetas se generaron con un estirador de pipetas PP-83 puller (Narishige, Tokyo, Japan) y luego se pulieron con una microforja MF-83 (Narishige) hasta lograr una resistencia final de 0.5-1 M Ω .

Las corrientes (filtradas a 1 kHz) se registraron en forma digital directamente al disco duro de una PC a través de un convertidor analógico-digital (Digidata 1200, Axon Instruments; *Figura 12, lado derecho*).

Se utilizaron los programas pClamp y Axotape (Axon Instruments). El análisis de los datos se realizó con pClamp (Clampfit).



Análisis de proteínas por electroforesis e immunoblots (Western Blots)

Esta técnica se utilizó para estudiar la fosforilación de ERK 1/2 en miocitos aislados de corazones de gato y para la detección del NBC1 en lisado de ventrículo y células embrionarias de riñón humano 293 (HEK 293), utilizando un anticuerpo contra la ERK 1/2 fosforilada o los anticuerpos contra el NBC1, respectivamente.

Las células HEK 293 se transfectaron con la variante por splicing alternativo del NBC1, el NBC1-B (Alvarez, Loiselle et al. 2003) para ser analizadas para la expresión del NBC1, junto a los lisados de ventrículo, dos días posteriores a la transfección.

Los preparados de ventrículo y los miocitos aislados fueron homogenizados con un Polytron en buffer fosfato salino (140 mM ClNa , 3 mM ClK , 6.5 mM HPO_4Na_2 , 1.5 mM $\text{H}_2\text{PO}_4\text{K}$, pH 7.4), conteniendo inhibidores de proteasas (MiniComplete Tablets, Roche).

Se tomó una alícuota a la cual se le adicionó el buffer de carga SDS/PAGE ((10% (v/v) de glicerol, 1-3% (v/v) 2-mercaptoetanol, 2% (p/v) SDS, 0.5% (p/v) de azul de bromofenol, 75 mM Tris, pH 6.8)). Las muestras se resolvieron en geles de 7,5% de poliacrilamida. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF y luego incubadas con los anticuerpos correspondientes para cada análisis: de conejo anti-NBC1 comercial (Millipore, Temecula, CA), a-L3, a-L4 o suero no inmune (para estudiar la expresión del NBC1) o con anti ERK 1/2 fosforilada (Santa Cruz Biotechnology), para la detección de la kinasa.

La detección de las proteínas inmunoreactivas fue realizada por quimioluminiscencia, utilizando un anticuerpo secundario (Amersham). Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada 5%. Anticuerpos Ig-G conjugados a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) fueron utilizados como anticuerpos secundarios y las bandas se visualizaron usando el reactivo ECL y el equipo Chemidoc (Biorad).

Soluciones

Solución HEPES para el aislamiento de los miocitos

(mM) 146.2 NaCl, 4.69 KCl, 11 glucosa, 10 HEPES, 0.35 NaH_2PO_4 , H_2O , 1.05 $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4 con OHNa. A esta solución se le agrega 1.35 mM Cl_2Ca para la etapa de lavado o 0.1 mM EGTA. Todas las soluciones durante el aislamiento son burbujeadas con O_2 100%.

Solución de HCO_3^- utilizada en los Pulsos de amonio y experimentos de Patch-clamp

(mM) 5 KCl, 118 NaCl, 1.2 MgSO_4 , 0.8 Cl_2Mg , 1.35 Cl_2Ca , 10 glucosa, 20 NaHCO_3 , pH 7.4 con OHNa luego del burbujeo continuo con CO_2 5% / O_2 95%.

Solución para la realización de los Pulsos de K^+

(mM) 118 NaCl, 5 KCl, 1 MgSO_4 , 0.35 NaH_2PO_4 , 10 glucosa, 40 cloruro de colina, 20 NaHCO_3 , pH 7.4 luego del burbujeo continuo con CO_2 5% / O_2 95%. En la solución de alto K^+ para inducir la despolarización celular se reemplazó 40 mM cloruro de colina por 40 mM KCl.

Solución para el interior de la pipeta de patch-clamp

(mM) 130 Gluconato de K^+ , 10 KCl, 5 NaCl, 0.5 MgCl_2 , 1 EGTA, 10 HEPES, 0.3 mg/ml Nistatina, pH 7.2 con KOH.

Solución de calibración utilizada para la medición del pH_i

(mM) 140 KCl, 1 MgCl_2 , 2 EGTA, 12 HEPES, 0.01 nigericina, 11 Glucosa, 20 2,3-butanedionemonoxime (BDM), el pH se ajusta con KOH a diferentes valores en el rango de 7.5 a 6.5.

HEPES-0 Na^+ para el cálculo de la capacidad amortiguadora intrínseca (β_i) de los miocitos

(mM) 25 HEPES, 4.66 KCl, 1.05 MgSO_4 , 1.35 CaCl_2 , 148 N-metil-D-glucamina, 11 glucosa, pH 7.4 con HCl 1N.

Análisis Estadístico

Los datos fueron expresados como la media \pm error estándar (ES), siendo comparados con el test de Student o con ANOVA, seguido de un test de Student- Newman- Keuls. Un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Primera parte: Participación del NBC en el control del pH_i y su regulación por la Ang II

Segunda parte: El NBC electrogénico y la Ang II

Tercera parte: Efecto de los Anticuerpos contra la isoforma electrogénica NBC1 en la fisiología de la célula cardíaca

“Es verdad que no sabemos lo que tenemos hasta que lo perdemos, pero también es verdad que no sabemos que nos hacía falta hasta que lo encontramos.”

Primera Parte: Participación del NBC en el control del pH_i y su regulación por la Ang II

El objetivo inicial de la primera parte del presente trabajo de *Tesis* fue estudiar la participación relativa del NBC en el control del pH intracelular (pH_i) como parte integrante de los mecanismos alcalinizantes de los miocitos ventriculares.

Posteriormente, el segundo objetivo fue investigar la modulación hormonal del NBC, específicamente su regulación por la Ang II y dentro de este punto profundizar en la vía intracelular que desencadena la hormona, evaluando la participación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y de las MAP kinasas (MAPK) en dicho efecto.

La hipótesis planteada fue que el NBC sería un mecanismo alcalinizante activo en los miocitos ventriculares de gato y que la Ang II estimularía su actividad por medio del aumento en la producción de ROS y la activación de la vía de las MAPK.

Para comprobarlo utilizamos miocitos ventriculares cargados con BCECF en los cuales investigamos la recuperación de la acidosis durante “Pulsos de amonio” en situación control, en presencia de Ang II y con el agregado de los inhibidores específicos de aquellas moléculas, que pensamos, estaban involucradas en la producción de ROS y activación de las MAPK.

Dosis mínima de HOE 642 para abolir al intercambiador Na^+/H^+ (NHE)

El mantenimiento del pH intracelular (pH_i) dentro de límites estrechos es indispensable para el correcto funcionamiento celular (Vaughan-Jones, Spitzer et al. 2009). Dado el elevado metabolismo de los miocitos cardíacos y también ante la presentación de diversas situaciones patológicas, la disminución del pH_i (acidosis) es una situación frecuente contra la cual debe luchar la célula y para lo cual pone en marcha a sus dos principales mecanismos alcalinizantes, el intercambiador Na^+/H^+ (NHE) y el cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) (Lagadic-Gossmann, Buckler et al. 1992; Camilion de Hurtado, Perez et al. 1995; Le Prigent, Lagadic-Gossmann et al. 1997; Vaughan-Jones, Villafuerte et al. 2006).

En un medio HEPES sin bicarbonato el único mecanismo activo es el NHE, mientras que en un medio con bicarbonato ambos transportadores están activos. Esto tiene gran importancia dado que el bicarbonato es el principal buffer fisiológico en el organismo, por lo que estudiar el comportamiento celular en su presencia representa la mejor aproximación a una situación real.

Dado que nuestro objetivo fue investigar exclusivamente al NBC, el primer paso que realizamos fue determinar la dosis mínima necesaria del inhibidor específico del NHE, HOE 642 para abolir completamente su actividad (Hoshino and Avkiran 2001; Baetz, Haworth et al. 2002; Kusumoto, Igata et al. 2002; Haworth, Dashnyam et al. 2006; Cingolani and Ennis 2007). La *Figura 13* muestra “Pulsos de amonio” realizados en un medio HEPES sin bicarbonato (HCO_3^-), para evaluar exclusivamente la actividad del NHE. Como se puede apreciar, la dosis mínima de HOE 642 necesaria para bloquear totalmente al NHE fue 10 μM .

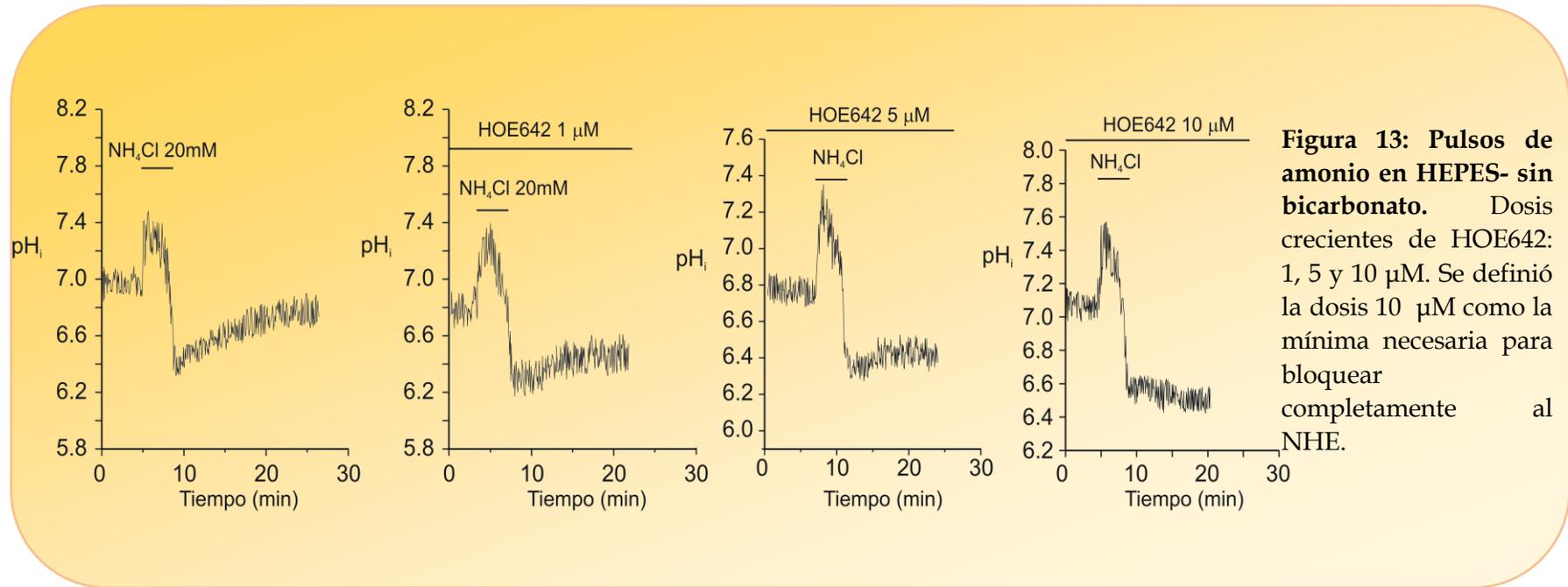


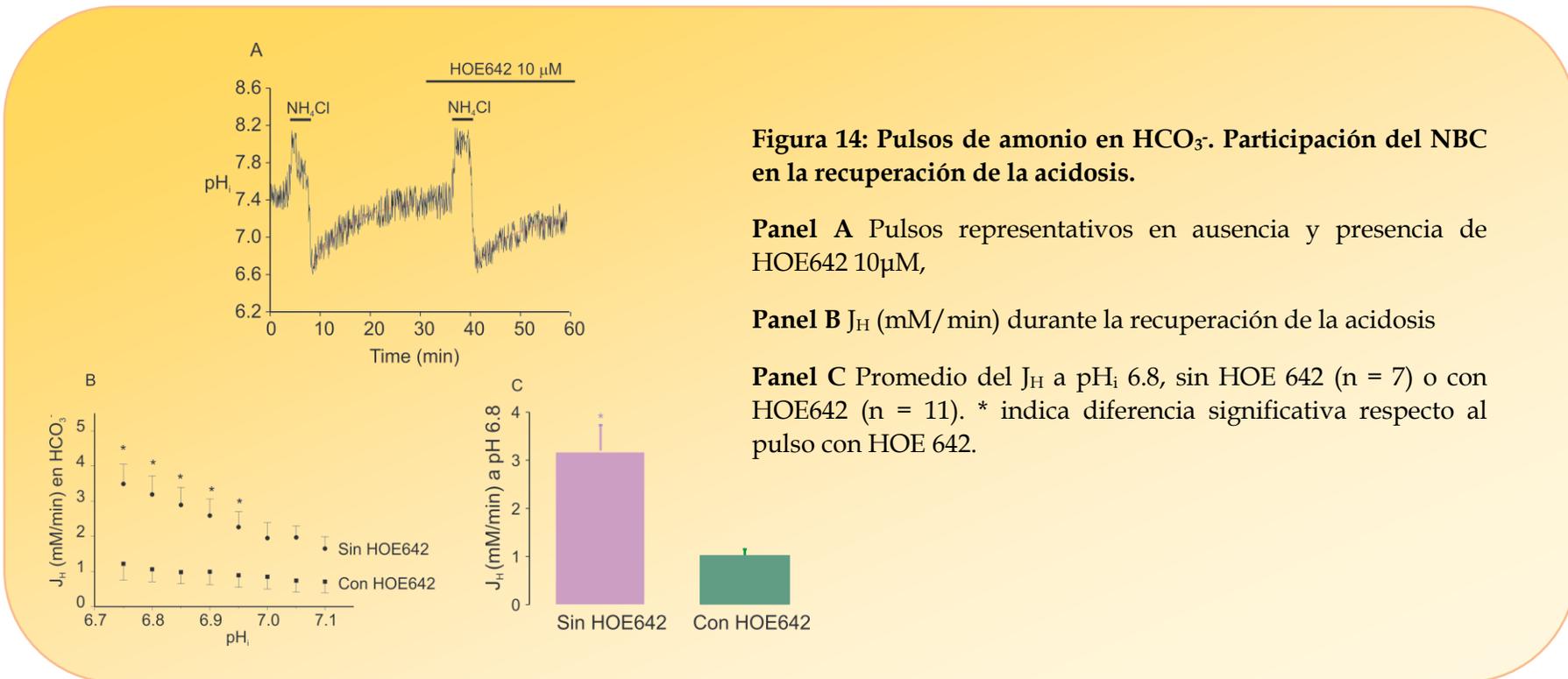
Figura 13: Pulsos de amonio en HEPES- sin bicarbonato. Dosis crecientes de HOE642: 1, 5 y 10 μM . Se definió la dosis 10 μM como la mínima necesaria para bloquear completamente al NHE.

Participación del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) en la recuperación de la acidosis

Una vez establecida la dosis de HOE 642 a utilizar (10 μM), los siguientes “Pulsos de amonio” fueron realizados en presencia continua del inhibidor en una solución de bicarbonato burbujeado con CO_2 5%/ O_2 95%.

Lo primero que investigamos fue la participación del NBC en la recuperación del pH_i tras la inducción de acidosis intracelular, para lo cual realizamos *Pulsos de amonio* en ausencia o presencia de HOE 642 (Figura 14). Durante el rango de pH_i

comprendido entre 6.7 a 7.1, el agregado de HOE 642 disminuyó significativamente el flujo de protones (J_{H}). Es interesante notar que esta disminución fue paulatinamente menor a medida que la célula recuperaba su pH_i basal. Estos resultados demuestran que la participación relativa del NBC en el control del pH_i a pH_i 6.8 es de 30% y que a pH_i cercanos al basal su participación aumenta, siendo su actividad equivalente a la del NHE (Baetz, Haworth et al. 2002; Vaughan-Jones, Villafuerte et al. 2006).



Finalmente, para confirmar que la recuperación restante era debida al NBC se agregó al medio con HOE 642 un inhibidor selectivo del NBC, S0859 (10 μM) recientemente identificado por el grupo del *Dr. Vaughn-Jones* (Ch'en, Villafuerte et al. 2008) (Figura 15). En esta situación la recuperación del pH_i fue nula.

Estos experimentos nos permiten afirmar que el NBC es el único mecanismo activo ante situaciones en las que el NHE está inhibido, como ha sido demostrado en modelos de ratas con diabetes insulino-dependiente (Le Prigent, Lagadic-Gossmann et al. 1997).

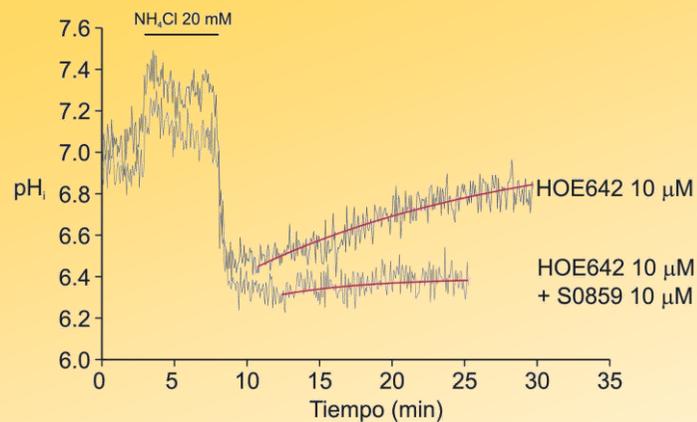


Figura 15: Pulsos de amonio en presencia constante de HOE642 sin y con S0859. En presencia de ambos inhibidores la recuperación del pH_i queda completamente abolida, demostrando que el NBC es el único mecanismo activo cuando el NHE está inhibido.

Regulación hormonal del NBC: Efecto de la Angiotensina II (AngII)

La Angiotensina II (Ang II) está fuertemente implicada en la fisiología cardíaca. Sus acciones son llevadas a cabo tras su unión a receptores de membrana, a partir de los cuales se desencadenan diferentes vías de señalización intracelular, en las que en su gran mayoría participan las MAP kinasas (MAPK) y las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Zhang, Lu et al. 2007;

Garciarena, Caldiz et al. 2008). Se ha demostrado que la Ang II activa al NHE (Fliegel and Karmazyn 2004; Cingolani, Villa-Abrille et al. 2006) y al NCX utilizando dichas vías de señalización (Aiello, Villa-Abrille et al. 2002). Con respecto a la modulación del NBC cardíaco, se ha descrito que la Ang II 100 nM activa al cotransportador en miocitos de ratas adultas por medio de la activación de las MAPK (Baetz, Haworth et al. 2002). Adicionalmente, el grupo de *Grace et al* demostró que la hormona, sólo a concentraciones iguales o mayores a 10^{-7} M es capaz de activar al cotransportador en miocitos de hurón (Grace, Metcalfe et al. 1996), pero se desconoce el efecto que tiene la hormona sobre el NBC de gato y la vía intracelular por la cual se genera su efecto.

Basándonos en lo anteriormente expuesto, realizamos los pulsos de amonio preincubando las células con Ang II 100 nM.

La Ang II produjo un aumento significativo del J_{H} en el rango de pH_i que va desde 6.7 a 7, siendo 70% mayor al control a pH_i 6.8 (1.70 ± 0.15 , $n = 8^*$ vs 1.03 ± 0.12 , $n = 11$, *Figura 16*).

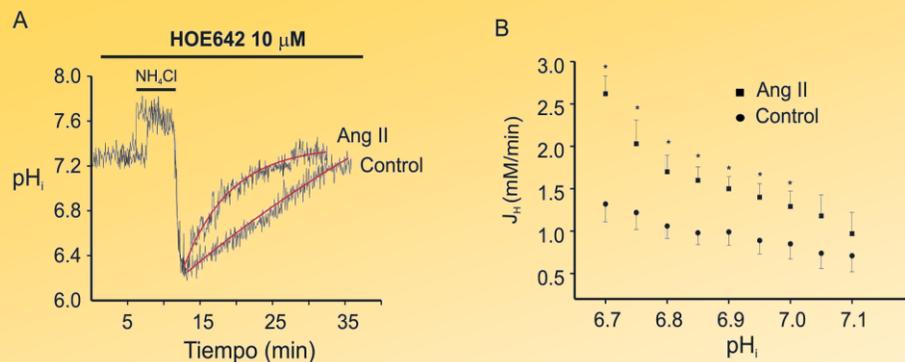


Figura 16: Efecto de Ang II 100 nM sobre el NBC. Panel A Pulsos de amonio representativos sin y con el agregado de Ang II.

Panel B J_{H} promedio durante la recuperación de la acidosis. *indica diferencia significativa respecto del control.

El efecto estimulante de la Ang II sobre el NBC fue inhibido completamente al preincubar las células con Losartán $1 \mu\text{M}$ (inhibidor de los receptores AT_1 ; 0.93 ± 0.2 , $n = 6$; *Figura 17*) o Celeritrina $2 \mu\text{M}$ (bloqueante de la proteína quinasa C, PKC; 0.9 ± 0.1 , $n = 9$; *Figura 17*).

Estos resultados concuerdan con la bibliografía existente, que demuestra que los miocitos adultos normales expresan bajos niveles de receptores AT_2 y que los efectos de la Ang II son totalmente abolidos con inhibidores de los receptores AT_1 (Sandmann, Yu et al. 2001; Palomeque, Delbridge et al. 2009). Ninguna de estas drogas tuvo efecto sobre el J_{H} control (*Figura 17, inset*).

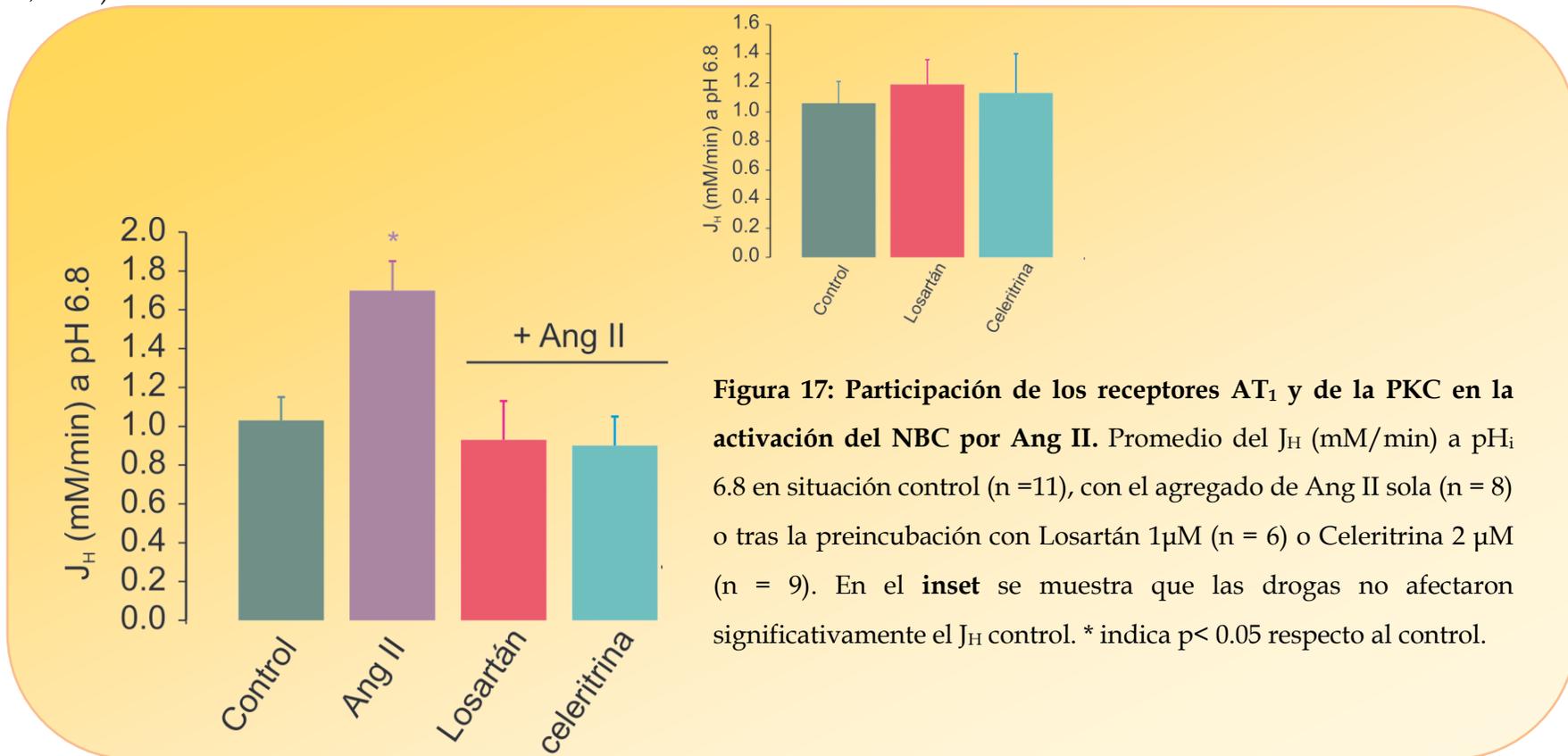


Figura 17: Participación de los receptores AT_1 y de la PKC en la activación del NBC por Ang II. Promedio del J_{H} (mM/min) a pH_i 6.8 en situación control ($n = 11$), con el agregado de Ang II sola ($n = 8$) o tras la preincubación con Losartán $1 \mu\text{M}$ ($n = 6$) o Celeritrina $2 \mu\text{M}$ ($n = 9$). En el **inset** se muestra que las drogas no afectaron significativamente el J_{H} control. * indica $p < 0.05$ respecto al control.

Papel de las especies reactivas del oxígeno (ROS)

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) tienen un importante rol dentro de las vías de señalización intracelular desencadenadas por diversos estímulos externos (Bartosz 2009). Así la Ang II y la ET-1 son capaces de aumentar la producción de ROS y a través de ellos llevar a cabo sus acciones (Zhang, Chen et al. 2001; Giordano 2005; Cingolani, Villa-Abrille et al. 2006; Caldiz, Garcarena et al. 2007; De Giusti, Correa et al. 2008).

Basándonos en estos conocimientos, evaluamos si el efecto de la Ang II sobre el NBC estaba mediado por la generación de ROS. Como se muestra en la *Figura 18*, la preincubación con Apocinina 300 μM, inhibidor de la NADPH oxidasa (NOX; J_H 0.8±0.13 mM/min, n = 6) o con el secuestrador de ROS, mercapto-propionil-glicina 2 mM (MPG; J_H 0.8±0.08 mM/min, n = 9) abolió el efecto de la Ang II.

La dirección en la cual la NOX produce el anión superóxido (O₂⁻) en los miocitos ventriculares es un tema controvertido. Dado que la isoforma existente en la membrana de los miocitos ventriculares (NOX2) es la misma que la presente en las células fagocíticas (Zhang, Lu et al. 2007), pensamos que el O₂⁻ podría generarse hacia el lado extracelular y que al ser dismutado por la superóxido dismutasa (SOD) a peróxido de hidrógeno (H₂O₂), éste difundía al interior de la célula, mediando la respuesta celular de la Ang II (Seshiah, Weber et al. 2002; Doughan, Harrison et al. 2008).

Consecuentemente, investigamos si el agregado de H₂O₂ a la solución extracelular podría mimetizar el efecto de la Ang II sobre el NBC.

La *Figura 18* muestra que el agregado de H₂O₂ 100 μM generó un efecto sobre el NBC similar al exhibido por la hormona (J_H 1.61±0.19mM/min, n = 9; p<0.05). Adicionalmente, el agregado al medio extracelular de Catalasa impermeable (1000 unidades/ml), enzima que convierte el H₂O₂ en O₂ y H₂O, previno el efecto de Ang II (*Figura 18*, J_H 1.01±0.13 mM/min, n = 8).

Hasta acá los resultados obtenidos nos demostraban que la Ang II, tras su unión a los receptores AT1, activa a la NOX y el O_2^- generado, ya sea directa o indirectamente, estimula al NBC acelerando la recuperación del pH_i .

En los últimos años ha sido acuñado el concepto de una “*Liberación de ROS inducida por ROS*” en donde las pequeñas cantidades de O_2^- generadas por la NOX inducen un estallido de ROS de origen mitocondrial, los cuales al salir de la organela transmiten la información recibida en la superficie al interior celular, siendo este mecanismo responsable de la mediación de diferentes procesos celulares (Zorov, Filburn et al. 2000; Zhang, Chen et al. 2001; Kimura, Zhang et al. 2005; Zorov, Juhaszova et al. 2006).

Dentro de la mitocondria, el O_2^- se genera principalmente en los complejos I, II y III de la cadena respiratoria, pero el mecanismo por el cual se activa dicha producción está en constante investigación. Ha sido demostrado que la apertura de los canales de K^+ mitocondriales dependientes de ATP ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) ya sea porque se alcaliniza la matriz mitocondrial, se genera una leve caída del potencial de membrana mitocondrial y/o se genera hinchazón de la organela, aumenta la producción de O_2^- por la cadena respiratoria (Andrukhiv, Costa et al. 2006; Costa, Quinlan et al. 2006). Consistentemente, el bloqueo de los $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ previene los efectos de la Ang II y de la ET-1 mediados por los ROS (Yao, Tong et al. 1999; Pain, Yang et al. 2000; Oldenburg, Yang et al. 2003; Oldenburg, Qin et al. 2004; Kimura, Zhang et al. 2005) y su apertura con Diasóxido (abridor de $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) genera protección contra los daños por isquemia-reperfusión (Honda, Korge et al. 2005; Matejikova, Kucharska et al. 2009; Matejikova, Ravingerova et al. 2009) y mimetiza efectos fisiológicos generados por estímulos hormonales (De Giusti, Correa et al. 2008).

En nuestros experimentos, y en concordancia con lo anteriormente expuesto, la preincubación de las células con 5-hidroxi-decanoato (5-HD 500 μM ; inhibidor selectivo de los $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) o con Rotenona 10 μM (inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria) previno completamente el efecto de la Ang II sobre el NBC (*Figura 18*; $J_{\text{H}} 0.97 \pm 0.21 \text{mM}/\text{min}$, $n=9$ y

$1.07 \pm 0.24 \text{ mM/min}$, $n=7$, respectivamente). Ninguna de las drogas utilizadas tuvo efecto significativo sobre el J_{H} control (*Figura 18, inset*).

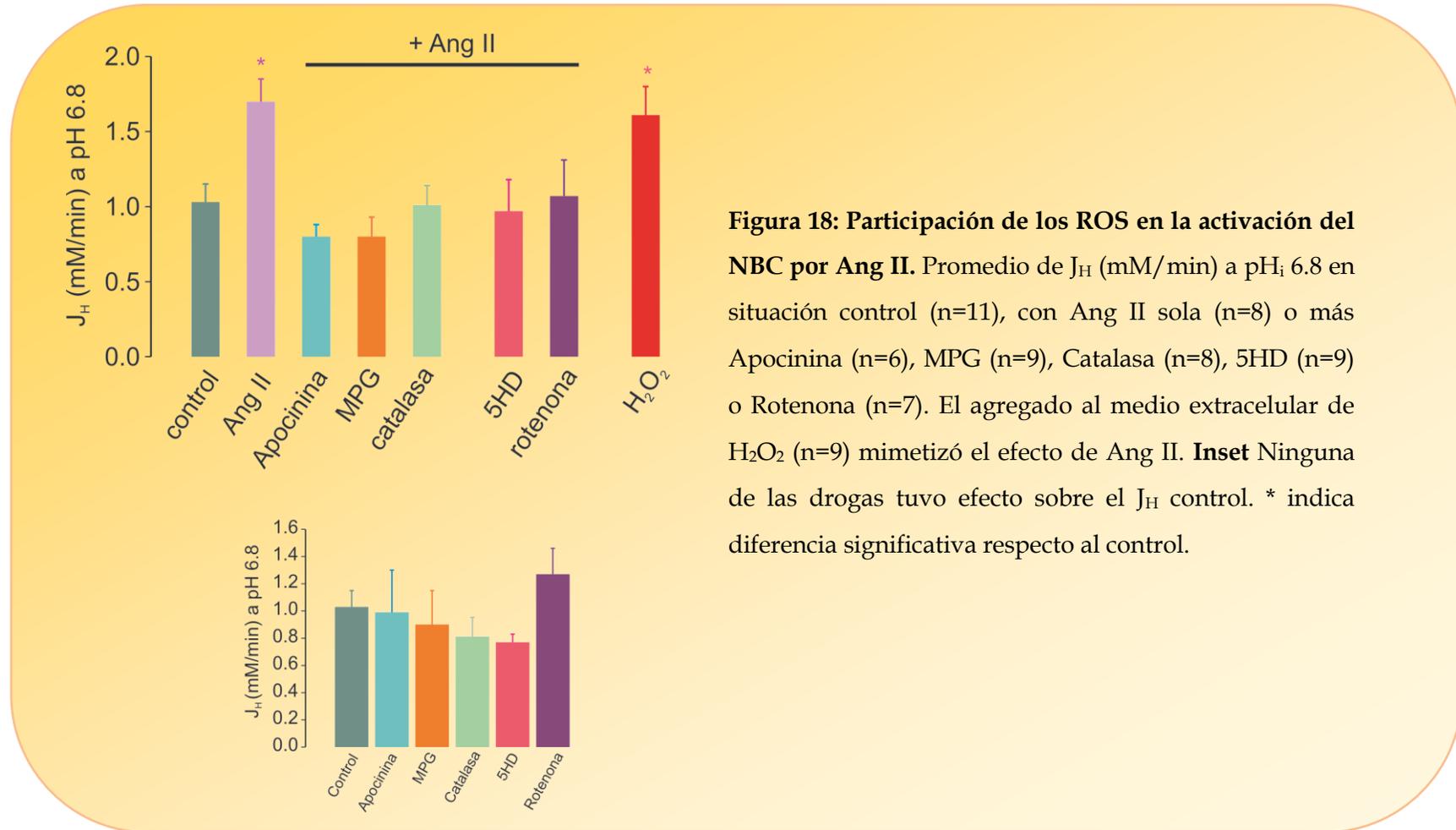


Figura 18: Participación de los ROS en la activación del NBC por Ang II. Promedio de J_{H} (mM/min) a pH_i 6.8 en situación control ($n=11$), con Ang II sola ($n=8$) o más Apocinina ($n=6$), MPG ($n=9$), Catalasa ($n=8$), 5HD ($n=9$) o Rotenona ($n=7$). El agregado al medio extracelular de H_2O_2 ($n=9$) mimetizó el efecto de Ang II. **Inset** Ninguna de las drogas tuvo efecto sobre el J_{H} control. * indica diferencia significativa respecto al control.

Para confirmar la participación de los ROS mitocondriales en la activación del NBC, diseñamos nuevos experimentos en los cuales los miocitos se preincubaron con el abridor de los mito K_{ATP} , Diasóxido ($100 \mu\text{M}$). Como muestra la *Figura 19*, el

Diasóxido aumentó la actividad del NBC (J_{H} $1.93 \pm 0.32 \text{ mM/min}$, $n=12$; $p < 0.05$), situación que fue prevenida tanto con 5-HD como con MPG (J_{H} 0.95 ± 0.16 y $1.08 \pm 0.18 \text{ mM/min}$; $n=6$), demostrando que efectivamente los ROS generados en la mitocondria a partir de la apertura de los $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ estaban involucrados en la activación del NBC. Por último, la preincubación de los miocitos con Apocinina fue incapaz de prevenir la activación del NBC generada por la apertura de los $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ con Diasóxido (J_{H} $2.12 \pm 0.36 \text{ mM/min}$; $n=4$). Estos últimos resultados son importantes, ya que por un lado descartan la posibilidad que, en nuestras condiciones y a las dosis utilizadas en estos experimentos, la Apocinina se haya comportado como un secuestrador de ROS, como fue propuesto por *Wind et al* (Heumuller, Wind et al. 2008), y por otro lado nos reafirmó la secuencia de activación, ubicando a la NOX por encima de la mitocondria.

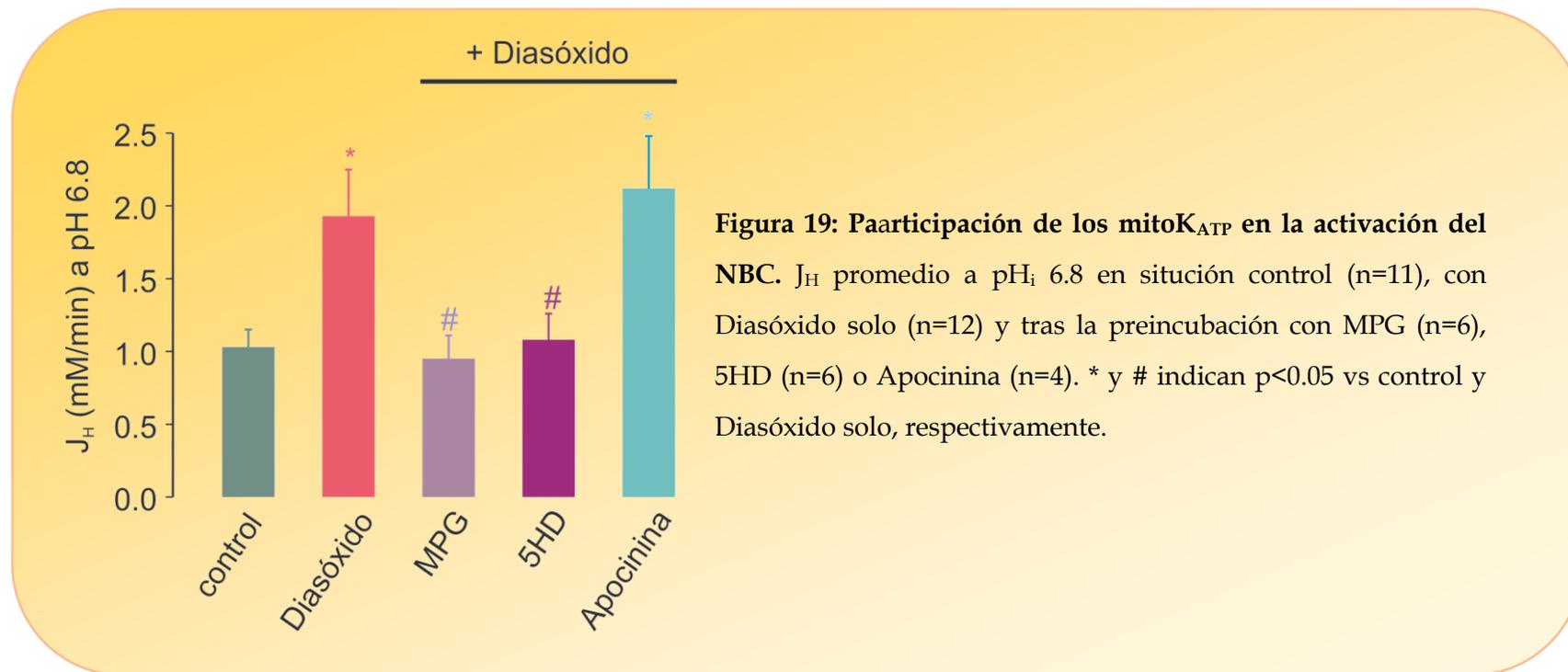


Figura 19: Paarticipación de los $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ en la activación del NBC. J_{H} promedio a pH_i 6.8 en situación control ($n=11$), con Diasóxido solo ($n=12$) y tras la preincubación con MPG ($n=6$), 5HD ($n=6$) o Apocinina ($n=4$). * y # indican $p < 0.05$ vs control y Diasóxido solo, respectivamente.

Papel de la MAPK ERK 1/2

Como fue expuesto en la *Introducción*, las MAPK son una familia de proteínas fuertemente implicadas en los efectos de Ang II. Baetz *et al* demostraron que la activación del NBC durante la recuperación de la acidosis por la Ang II está mediada por la vía de ERK 1/2 (Baetz, Haworth et al. 2002). Por otro lado, ha sido recientemente demostrado que la activación del NHE producida por el H₂O₂ es llevada a cabo tras la activación de la mencionada vía de kinasas (Snabaitis, Hearse et al. 2002). Para verificar la participación de ERK 1/2 en la activación del NBC se realizaron “Pulsos de amonio” en presencia de Ang II 100 nM, preincubando a las células con U0126 10 μM (inhibidor de la MEK, kinasa que fosforila a ERK 1/2). El J_H a pHi 6.8 fue 0.56±0.18 mM/min, n = 6; (*Figura 20, Panel A*), indicando que ERK 1/2 estaba involucrada en la activación del NBC.

Además, consistentemente con lo ya demostrado en miocitos de rata por el grupo de Baetz *et al* (Baetz, Haworth et al. 2002), la preincubación de los miocitos únicamente con U0126 10 μM disminuyó 50% el J_H control (0.54±0.07 mM/min, n = 5; p<0.05), indicando que la ERK 1/2 es activada por la acidosis y estimula al NBC, aún en ausencia de Ang II.

Estos resultados concuerdan con investigaciones que demuestran que la acidosis intracelular induce fosforilación y activación de ERK 1/2 de una manera tiempo-dependiente, comenzando al minuto y alcanzando su máximo a los 3 minutos de exposición (Haworth, Dashnyam et al. 2006). Si bien estos resultados se obtuvieron realizando los pulsos de amonio en un medio HEPES- sin bicarbonato y en ausencia de Na⁺ durante los primeros minutos del lavado del NH₄Cl, bloqueando al NHE y manteniendo así la acidosis intracelular (“acidosis sostenida”), en nuestro caso, al igual que en las investigaciones de Baetz *et al*, la presencia de HOE 642 había impedido una rápida salida de la acidosis, generando de otro modo una “acidosis sostenida” que indujo la fosforilación de ERK 1/2 y aumento de su actividad.

Hasta este momento, los resultados nos demostraban que tanto los ROS como la ERK 1/2 estaban implicados en la vía de activación del NBC por la Ang II. Consistentemente, sabíamos que los ROS activan a la ERK 1/2 y como resultado se activa al NHE (Rothstein, Byron et al. 2002; Snabaitis, Hearse et al. 2002); pero aún nuestros resultados no nos demostraban la relación entre los ROS y la ERK 1/2 en la vía de activación del NBC.

Así, para completar la vía a través de la cual la Ang II activa al NBC, realizamos un último experimento. Los miocitos se incubaron durante 20 minutos en platos de cultivo de 35 mm (aproximadamente 5 x 10⁵ células/plato) con las mismas soluciones utilizadas para la realización de los “Pulsos de amonio” (solución de bicarbonato con HOE 642 10 µM). Luego los miocitos, simulando un pulso, fueron expuestos durante 3 min a NH₄Cl 20 mM y al primer minuto del lavado se homogenizaron con el buffer de lisis para la posterior determinación de la fosforilación de ERK 1/2. Como se puede apreciar en la *Figura 20, Panel B* la Ang II aumentó significativamente la fosforilación de ERK 1/2, situación que fue prevenida con MPG.

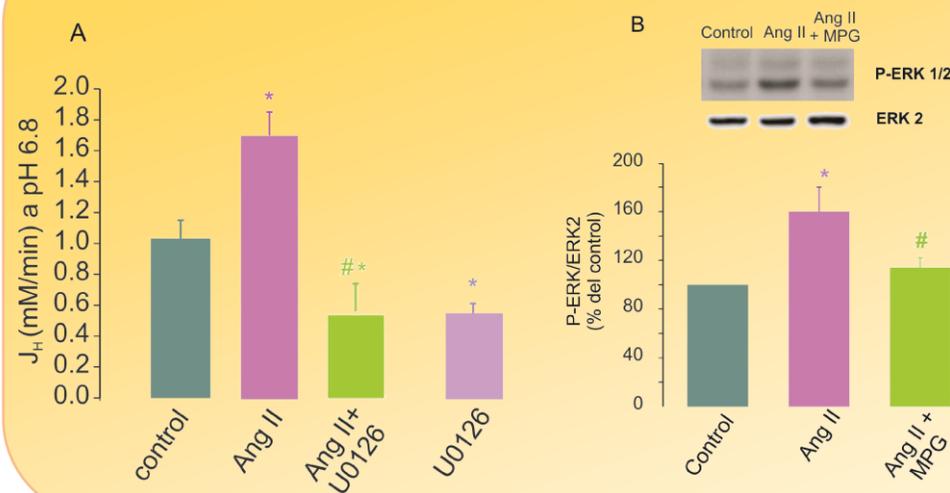


Figura 20: Rol de ERK 1/2 en la activación del NBC mediada por la Ang II. Panel A J_H a pH_i 6.8 en situación control (n=11), con Ang II sola (n=8) y tras la preincubación con U0126 (n=6). También se muestra el efecto del U0126 sobre el J_H control (n=5). * y # indican p<0.05 vs control y Ang II sola, respectivamente.

Panel B Fosforilación de ERK 1/2 durante el primer minuto de acidosis con Ang II sola y más MPG. Los datos se expresan como % del control (n=10 para todos los grupos). No se observaron cambios en la ERK2 (total). * y # indican p<0.05 vs control y Ang II sola, respectivamente.

En el año 2008 *Garciarena et al* demostraron un efecto mitocondrial directo del HOE 642, aparentemente independiente a su conocido efecto sobre el NHE sarcolemal, mediante el cual se impedía la producción de ROS mitocondriales y la fosforilación de ERK 1/2 en respuesta a Ang II 1 nM (*Garciarena, Caldiz et al. 2008*).

Estos resultados parecen contradecir los resultados obtenidos con nuestros experimentos, en los cuales la Ang II 100 nM fue capaz de inducir la producción de ROS y la fosforilación de ERK 1/2 en presencia de HOE 642. Sin embargo, esta aparente discrepancia puede ser explicada por la diferente concentración de Ang II usada en ambos casos.

Adicionalmente, nuestros experimentos fueron realizados en miocitos expuestos a acidosis intracelular mientras que en el caso de *Garciarena et al* los resultados se obtuvieron a partir de miocitos expuestos a pH_i basales.

Los resultados obtenidos en la primera parte de la presente *Tesis*, nos permiten concluir que la Ang II durante la acidosis, mediante el mecanismo de “Liberación de ROS inducida por ROS” y la activación de la ERK 1/2 estimula al NBC, acelerando la recuperación del pH_i (Figura 21).

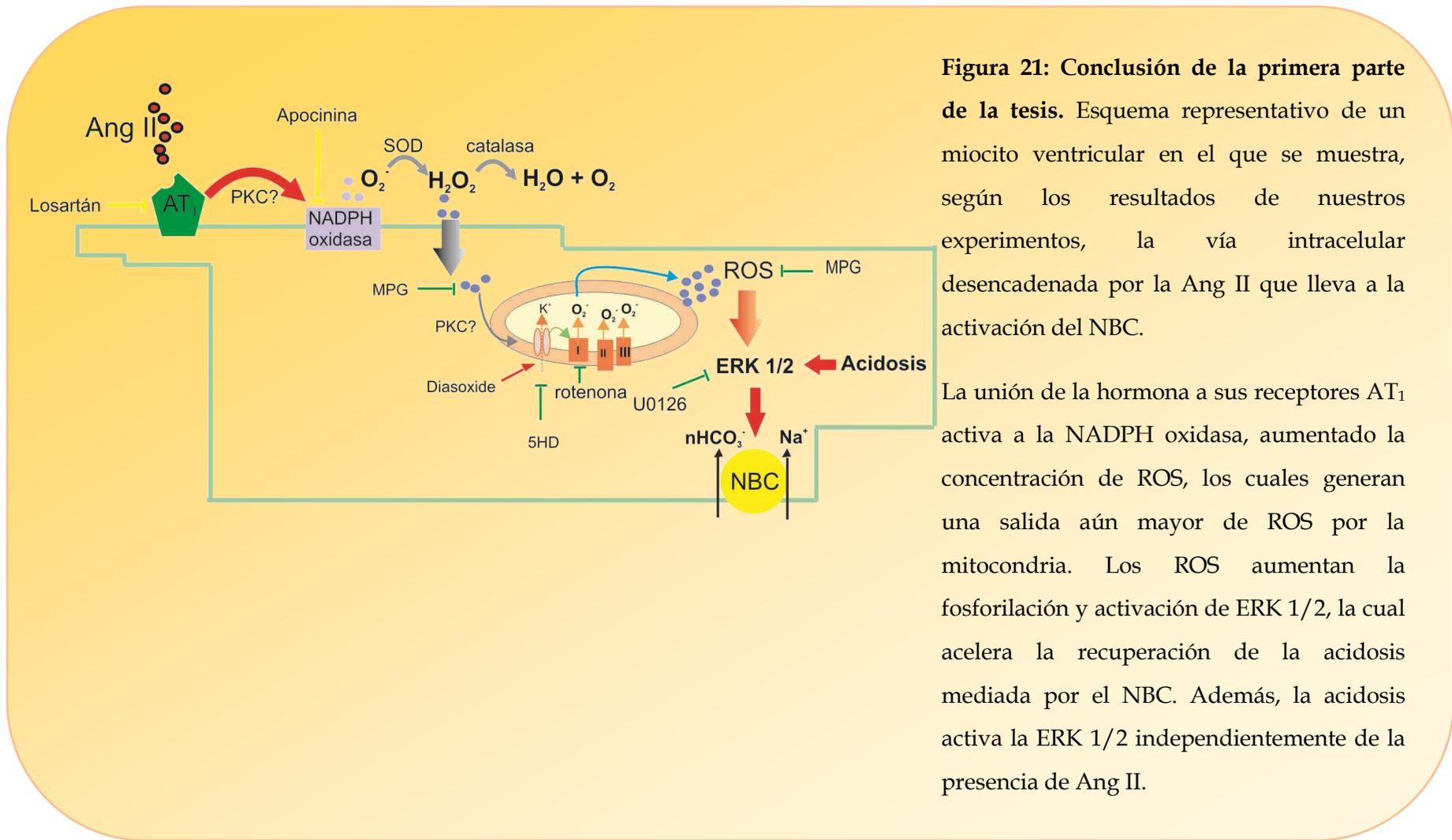


Figura 21: Conclusión de la primera parte de la tesis. Esquema representativo de un miocito ventricular en el que se muestra, según los resultados de nuestros experimentos, la vía intracelular desencadenada por la Ang II que lleva a la activación del NBC.

La unión de la hormona a sus receptores AT_1 activa a la NADPH oxidasa, aumentando la concentración de ROS, los cuales generan una salida aún mayor de ROS por la mitocondria. Los ROS aumentan la fosforilación y activación de ERK 1/2, la cual acelera la recuperación de la acidosis mediada por el NBC. Además, la acidosis activa la ERK 1/2 independientemente de la presencia de Ang II.

Segunda parte: El NBC electrogénico y la Ang II

El NBC tiene, como ya ha sido mencionado en la *Introducción*, dos modos de funcionamiento, uno electroneutro (NBCn), a cargo de la isoforma NBC3, y otro electrogénico (NBCe), representado por las isoformas NBC1 y NBC4. Nuestro laboratorio de electrofisiología se ha avocado principalmente al estudio del mecanismo electrogénico, describiendo por primera vez la corriente aniónica, I_{NBC} , generada por el NBCe, la cual acorta la duración del potencial de acción cardíaco (DPAC) un 25% al pasar de un medio HEPES - sin bicarbonato a otro medio con bicarbonato (Aiello, Petroff et al. 1998; Villa-Abrille, Petroff et al. 2007). La importancia que tiene el NBCe en la duración y la morfología del PA cardíaco genera que su caracterización y regulación sea un reto para nuestro laboratorio.

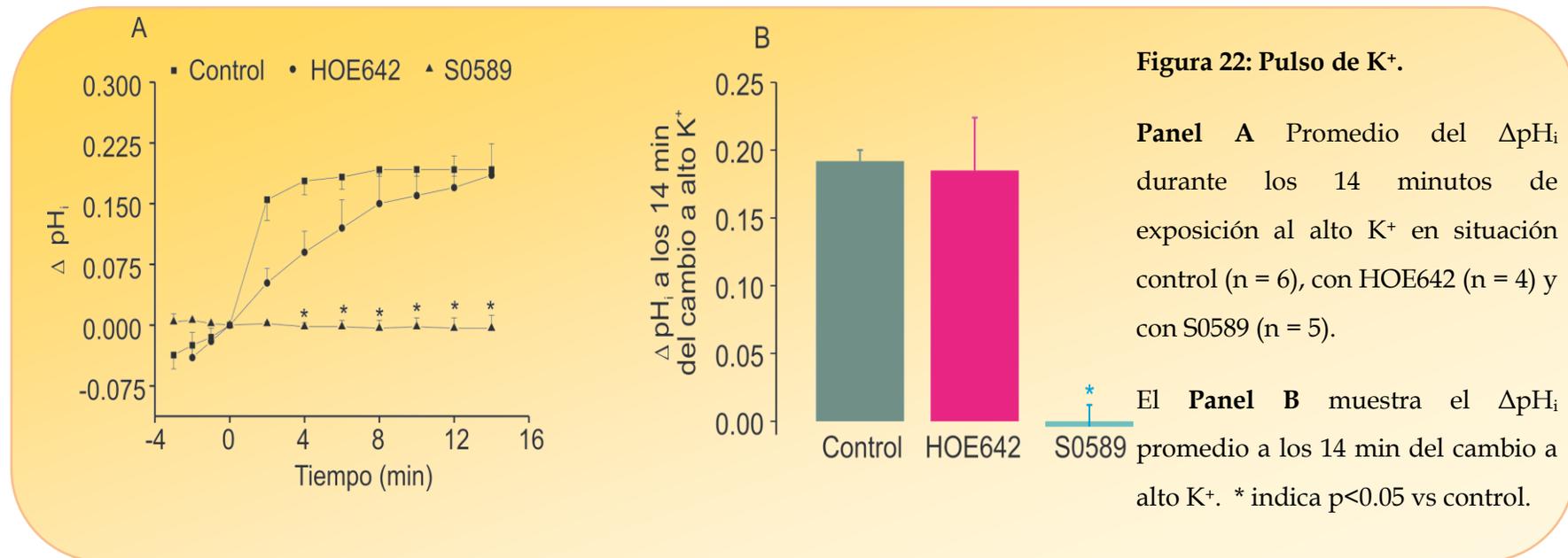
El objetivo de la Segunda Parte del presente trabajo de *Tesis* fue estudiar el efecto de la Ang II sobre el NBCe, dilucidando la vía intracelular implicada.

Nuestra hipótesis fue que la Ang II activaría al NBCe y para ello realizamos “Pulsos de K^+ ” en miocitos ventriculares cargados con BCECF, con el objeto de estudiar aisladamente la actividad del NBCe y su respuesta a la Ang II.

Efecto de la Ang II sobre el NBC electrogénico (NBCe) en el control del pH_i

Para estudiar al NBCe en forma aislada los miocitos fueron sometidos a “Pulsos de K⁺”, en los cuales las células se exponen a una elevada concentración de K⁺ extracelular (45 mM), generando una despolarización celular de aproximadamente 60 mV que activa selectivamente al NBCe (Yamamoto, Swietach et al. 2005), ver *Métodos*. El aumento de pH_i (Δ pH_i) a los 14 minutos de exposición al alto K⁺ obtenido se utilizó como medida de la actividad del NBCe.

El Δ pH_i control tras 14 minutos de exposición al alto K⁺ fue de 0.19 ± 0.008 , n=6. Este aumento del pH_i no se vio afectado al preincubar los miocitos con HOE 642 10 μ M (Δ pH_i 0.18 ± 0.04 ; n=4), pero sí fue anulado completamente con S0859 10 μ M (-0.004 ± 0.016 ; n=5*, *Figura 22*). Estos resultados nos demostraban que la técnica es apropiada para el estudio del NBCe en forma aislada.



Una vez afirmados los “Pulsos de K^+ ” como método válido para el estudio del NBCe, quisimos estudiar el efecto de Ang II 100 nM selectivamente sobre la actividad del NBCe.

Como se puede apreciar en la *Figura 23*, y para nuestro asombro según la hipótesis planteada inicialmente y los resultados expuestos en la primera parte de la *Tesis*, encontramos que la preincubación de los miocitos con Ang II abolió completamente el ΔpH_i secundario al alto K^+ ($\Delta\text{pH}_i -0.008\pm 0.018$; $n=5^*$), mostrando un novedoso efecto inhibitorio de la hormona sobre el NBCe.

El efecto inhibitorio fue prevenido preincubando las células con Losartán 1 μM ($\Delta\text{pH}_i 0.18\pm 0.02$; $n=4$, *Figura 23*). Contrariamente, el PD 123,319 1 μM (inhibidor de los receptores AT_2) no modificó el efecto de Ang II ($\Delta\text{pH}_i 0\pm 0.02$; $n=4^*$, *Figura 23*), demostrando que sólo los receptores AT_1 estaban implicados en el efecto de Ang II sobre el NBCe. El *inset* de la *Figura 23* muestra que los controles de los inhibidores no tuvieron efecto respecto al control.

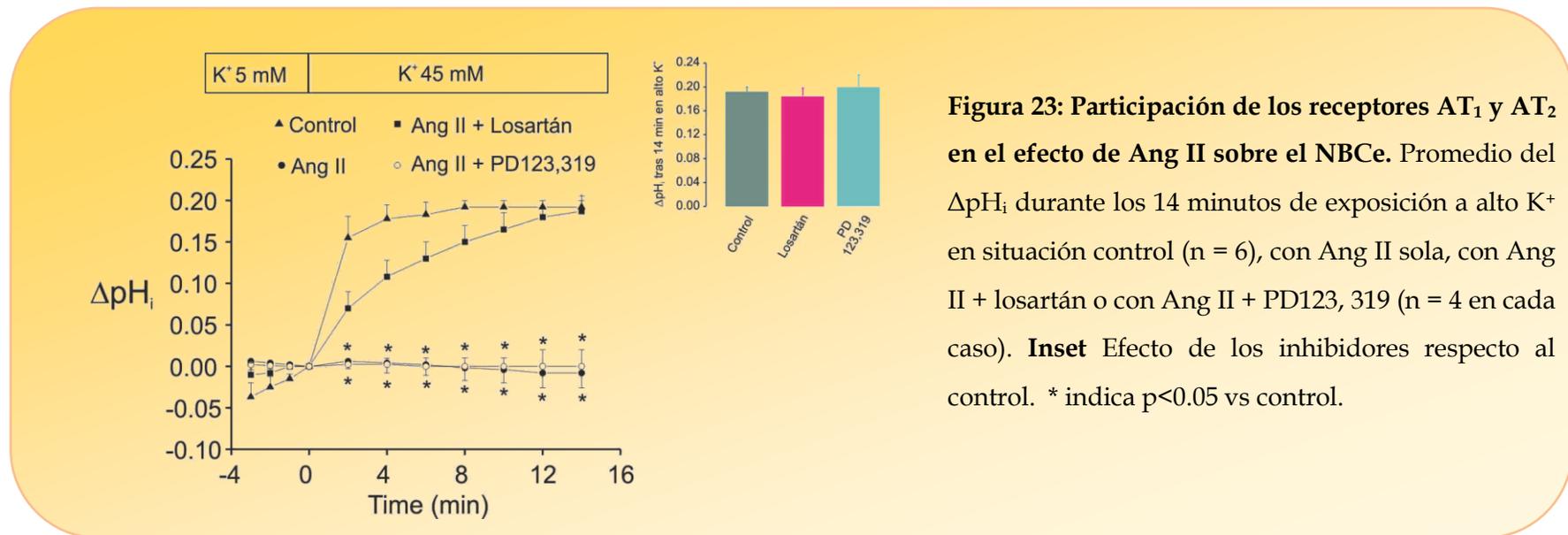
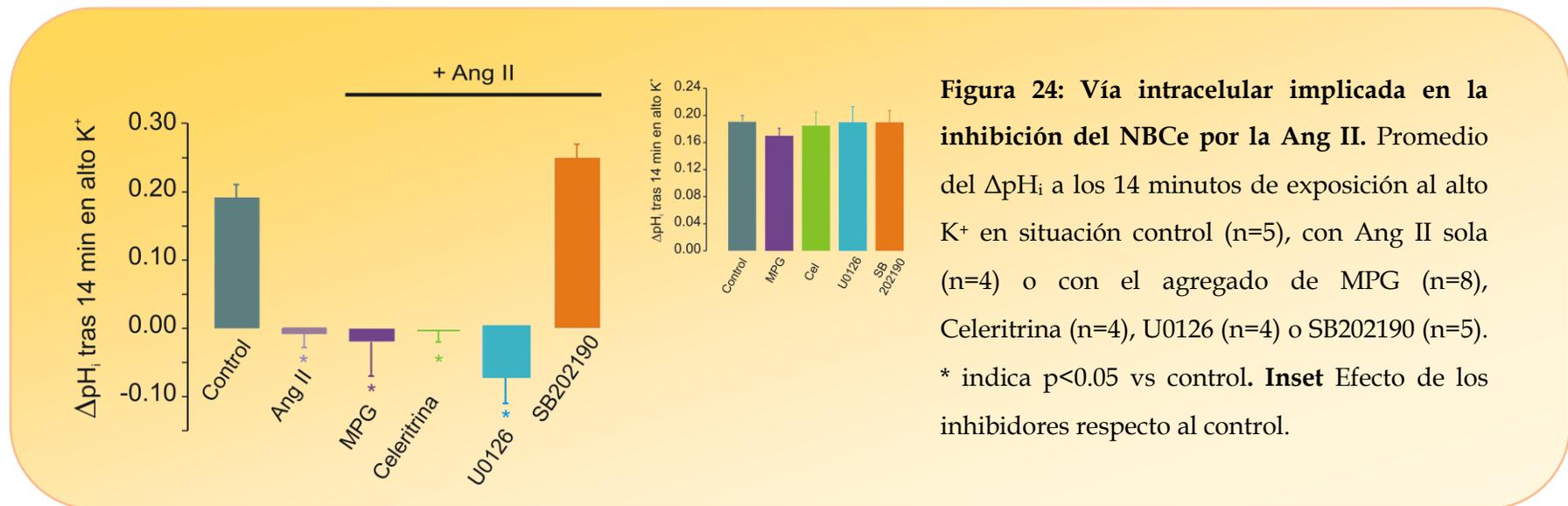


Figura 23: Participación de los receptores AT_1 y AT_2 en el efecto de Ang II sobre el NBCe. Promedio del ΔpH_i durante los 14 minutos de exposición a alto K^+ en situación control ($n = 6$), con Ang II sola, con Ang II + losartán o con Ang II + PD123, 319 ($n = 4$ en cada caso). **Inset** Efecto de los inhibidores respecto al control. * indica $p < 0.05$ vs control.

Con el fin de evaluar la vía intracelular involucrada en este sorpresivo efecto de Ang II, los miocitos se preincubaron con SB202190 10 μM (inhibidor de la p38 kinasa) ó U0126 10 μM . Mientras que el SB202190 previno el efecto de la Ang II (ΔpH_i 0.25 ± 0.06 , $n = 5$, *Figura 24*), el U0126 no afectó la inhibición del NBCe por la Ang II (ΔpH_i -0.07 ± 0.04 , $n = 4^*$, *Figura 24*).

Por otro lado, ni el MPG 2 mM ni la Celeritrina 2 μM previnieron el efecto inhibitorio de la Ang II (ΔpH_i -0.02 ± 0.05 , $n = 8^*$, -0.06 ± 0.04 ; $n = 4^*$, respectivamente, *Figura 24*). Ninguna de las drogas afectó el ΔpH_i control (*inset de la Figura 24*).

Estos resultados nos demostraban que la inhibición del NBCe por Ang II es llevada a cabo tras la unión a sus receptores AT1, siendo esta inhibición mediada por la p38 kinasa e independiente de los ROS, la PKC y la ERK 1/2.



Si bien estos nuevos resultados parecían entrar en contraposición con los resultados presentados anteriormente que mostraban que la Ang II acelera la recuperación del pH_i mediada por el NBC total, es importante citar que en dicha ocasión no fue evaluada la isoforma del NBC responsable de tal aumento.

En consecuencia, ante este novedoso panorama, nuevos *Pulsos de amonio* fueron realizados en presencia de Ang II más SB202190. Nuestra hipótesis era que, si la Ang II activaba 2 vías de señalización de kinasas, una estimuladora a cargo de la ERK 1/2 y otra inhibitoria a cargo de la p38 kinasa, al abolir esta última, el efecto de la Ang II sobre la recuperación del pH_i se vería potenciado.

Efectivamente, el J_{H} a pH_i 6.8 con Ang II en presencia del inhibidor de la p38 kinasa fue significativamente mayor al obtenido en ausencia del inhibidor (*Figura 25*), demostrando que la Ang II tras unirse a sus receptores AT1 podría activar a ambas kinasas y tener un efecto dual, inhibiendo al NBCe por medio de la p38 kinasa y activando al NBCn por medio de la producción de ROS y la activación de la ERK 1/2, pareciendo esta última vía ser más potente y resultando por tanto en un efecto estimulador neto de la Ang II sobre la actividad del NBC total durante la recuperación de la acidosis.

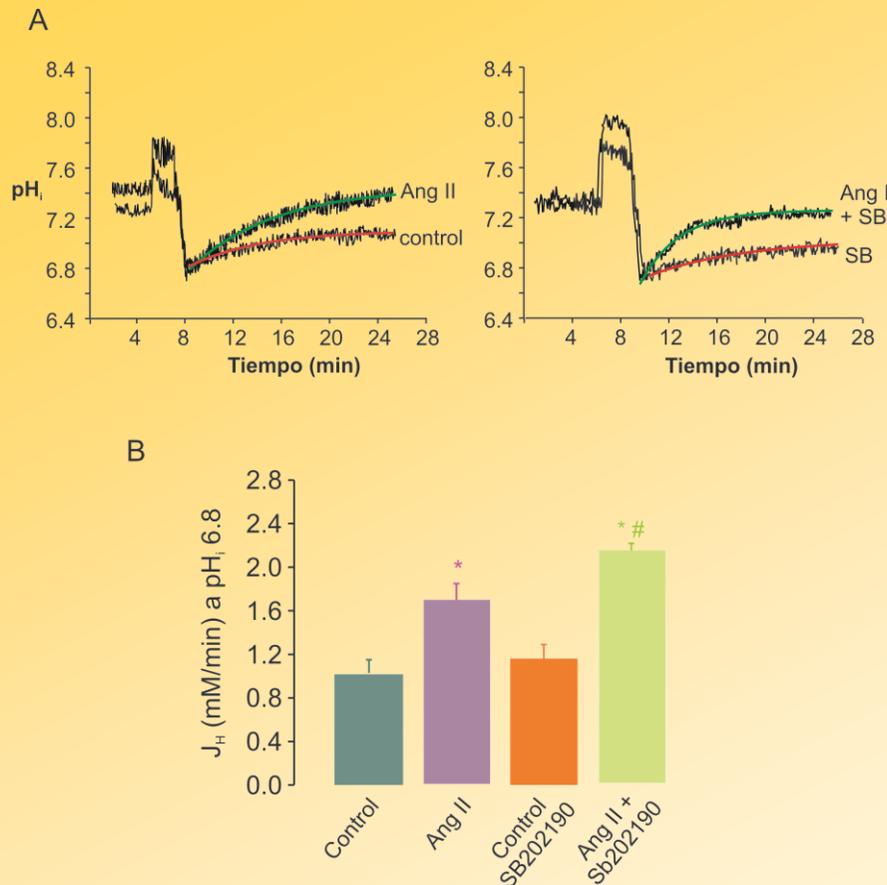


Figura 25: Efecto de la inhibición de la p38 kinasa en el efecto de Ang II sobre la actividad del NBC total durante la recuperación de la acidosis.

Panel A Pulsos de amonio representativos en ausencia o presencia de Ang II (lado izquierdo) o con o sin el agregado de Ang II en presencia continua de SB202190 (lado derecho).

Panel B J_H promedio a pH_i 6.8 en situación control ($n = 11$), con Ang II ($n = 8$), con SB 202190 ($n = 5$) o con Ang II + SB202190 ($n = 5$). * y # indican $p < 0.05$ vs control y vs Ang II sola, respectivamente.

La existencia o no de una conexión entre ambas vías de kinasas es una interesante inquietud que nos ha quedado aún por resolver. Es conocido que la ERK 1/2 y la p38 kinasa están implicadas en múltiples procesos celulares generando efectos opuestos, lo cual tiene una importante implicancia en la fisiología celular, por un lado dotándola de un mecanismo de “freno y autocontrol” de las señales extracelulares que recibe, y por otro creando un estado de equilibrio llevado a cabo por vías opuestas, del balance de las cuales surgirá la respuesta celular final.

Ha sido descrito que ambas kinasas pueden ser activadas en paralelo y desencadenar efectos opuestos ante un mismo estímulo extracelular (Szokodi, Kerkela et al. 2008) o, contrariamente que la p38 kinasa es capaz de inhibir la vía de la ERK 1/2 por intermedio de la activación de fosfatasas (Liu and Hofmann 2004), e incluso también se demostró la existencia de una intercomunicación positiva entre ambas kinasas (Houliston, Pearson et al. 2001).

Esta discrepancia, sumada a la compleja relación de las kinasas con los ROS en la regulación de la señalización celular genera un incesante campo para la investigación.

Efecto de la Ang II sobre el NBCe en el potencial de acción

En este punto, habiendo demostrado que la Ang II inhibe al NBCe, nos preguntamos si tal inhibición podría verse reflejada en la duración del potencial de acción cardíaco (DPAC). Es conocido que la Ang II genera un alargamiento de la DPAC, siendo la inhibición de las corrientes de K^+ el mecanismo más aceptado (Yu, Gao et al. 2000; Domenighetti, Boixel et al. 2007; Rivard, Paradis et al. 2008; Wang, Shi et al. 2008). Nosotros nos planteamos que en este alargamiento además podría estar implicada la inhibición que la Ang II ejerce sobre la corriente aniónica repolarizante emprendida por el NBCe.

Se registró la DPAC mediante la técnica de Patch-clamp en su configuración patch perforado al cambiar de una solución HEPES-sin bicarbonato a otra con bicarbonato, en ausencia o presencia de Ang II 100 nM en el medio extracelular. Para independizarnos de otros efectos de Ang II ajenos al ejercido sobre el NBCe, la hormona fue adicionada mientras los miocitos permanecían en la solución de HEPES-sin bicarbonato. Es necesario aclarar que bajo estas condiciones (HEPES-sin bicarbonato) la Ang II alargó la DPAC (*Figura 26*, 26.1 ± 9.3 %, $n=5$), como así también generó una leve hiperpolarización (-

$2.7 \pm 1.6 \text{ mV}$; $n=5$, *Figura 26*). Estos resultados coinciden con los datos mostrados previamente por diferentes autores, posiblemente por los efectos que presenta la Ang II sobre las corrientes de K^+ (Morita, Kimura et al. 1995; Yu, Gao et al. 2000; Domenighetti, Boixel et al. 2007; Rivard, Paradis et al. 2008; Wang, Shi et al. 2008).

Como se puede ver en la *Figura 26*, el cambio de los miocitos de una solución HEPES-sin bicarbonato a una solución extracelular con bicarbonato en ausencia de Ang II generó un acortamiento de la DPAC de aproximadamente 25% (Villa-Abrille, Petroff et al. 2007). Por el contrario, en presencia constante de Ang II, no se produjo dicho acortamiento ($0.54 \pm 3.4\%$; $n = 5$; $p < 0.05$).

En nuestros experimentos la Ang II impidió el acortamiento de la DPAC al pasar a un medio sin a otro con bicarbonato. Estos resultados nos permiten especular que la Ang II podría prolongar la DPAC debido a la inhibición del NBCe.

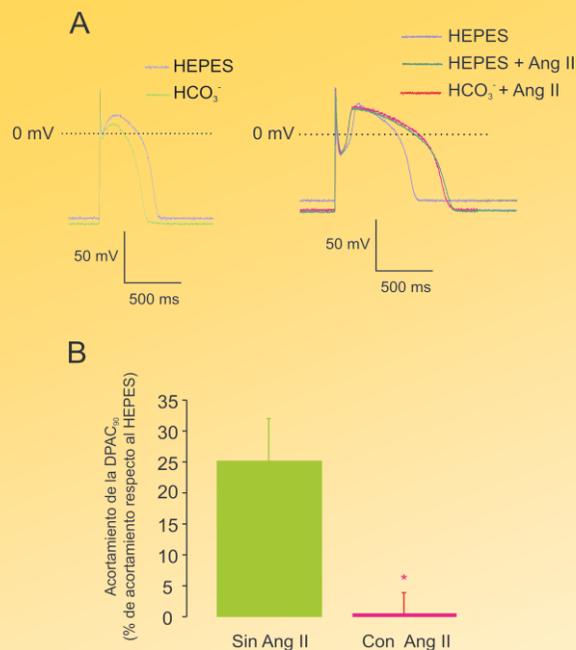


Figura 26: Efecto de la inhibición del NBCe por Ang II en la DPAC.

Panel A Registros típicos de PA al cambiar de un medio HEPES-sin bicarbonato a un medio con bicarbonato en ausencia (lado derecho) o presencia (lado izquierdo) de Ang II.

Panel B Promedio del acortamiento en la DPAC al 90% de la repolarización (DPAC_{90}) al cambiar de una solución HEPES a una solución con bicarbonato en ausencia ($n = 9$) y presencia de Ang II ($n = 5$). * implica $p < 0.05$ vs acortamiento sin Ang II.

Los resultados expuestos en la segunda parte de la presente *Tesis* nos permiten concluir que la Ang II, uniéndose a sus receptores AT1, y por medio de la activación de la p38 kinasa inhibe la actividad del NBCe.

Esta inhibición impide el acortamiento en la DPAC tras el cambio de una solución sin bicarbonato a otra en presencia dicho buffer fisiológico.

Por otro lado, los resultados obtenidos descartan la participación de la PKC, los ROS y la ERK 1/2 en la vía de señalización que conduce a la inhibición del NBCe (*Figura 27*).

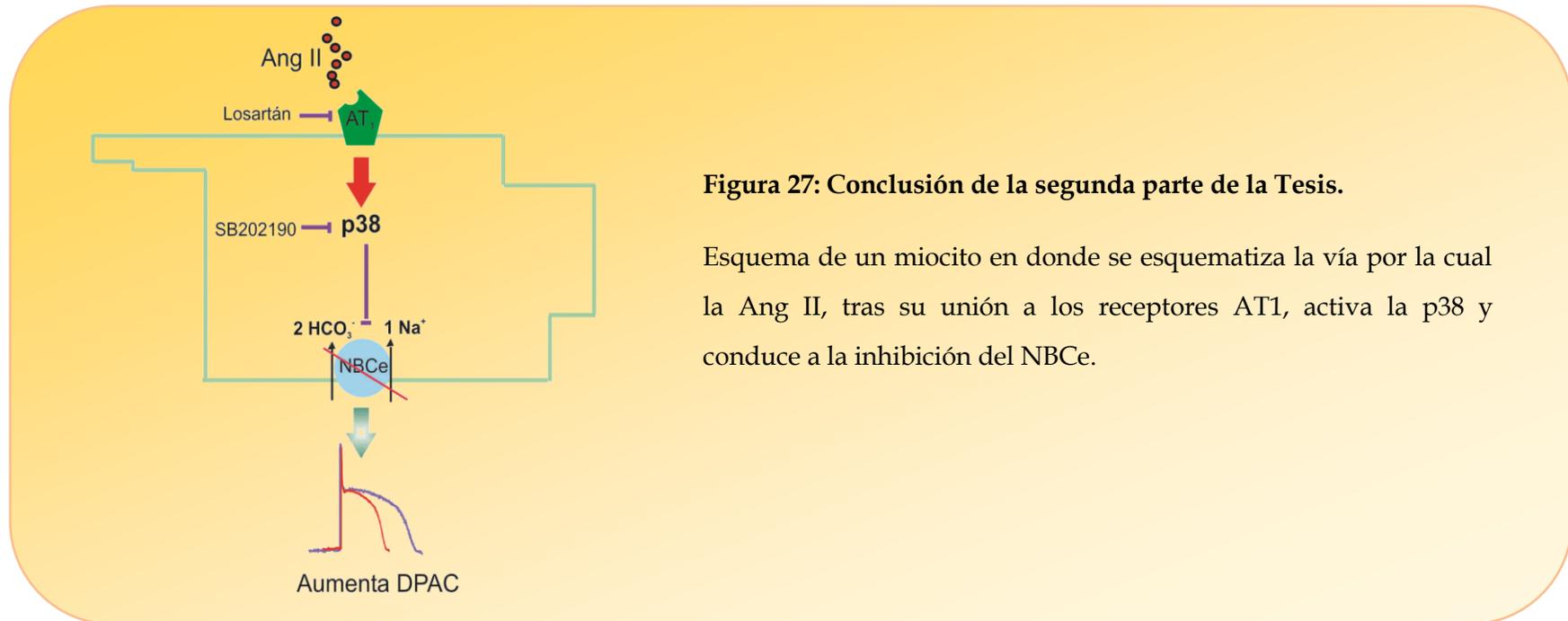


Figura 27: Conclusión de la segunda parte de la Tesis.

Esquema de un miocito en donde se esquematiza la vía por la cual la Ang II, tras su unión a los receptores AT1, activa la p38 y conduce a la inhibición del NBCe.

Tercera parte: Efecto de los Anticuerpos contra la isoforma electrogénica NBC1 en la fisiología de la célula cardíaca

Como ha sido previamente comentado en la *Introducción*, existen en el corazón al menos 3 isoformas del NBC, una electroneutra (NBC3) y dos electrogénicas (NBC1 y NBC4) (Vaughan-Jones, Spitzer et al. 2009). Recientemente fue presentado un inhibidor específico del NBC (Ch'en, Villafuerte et al. 2008) que permitió el inicio del estudio del NBC de forma aislada, siendo utilizado por nuestro laboratorio en el presente estudio de *Tesis*, pero dada la falta de inhibidores específicos frente a cada una de las isoformas, su participación diferencial de éstas en la fisiología cardíaca no ha sido aún aclarada. Por ello se diseñaron anticuerpos contra los dominios extracelulares 3 y 4 (a-L3 y a-L4, respectivamente) de la isoforma electrogénica NBC1, con el propósito de poder utilizarlos como una herramienta de trabajo que nos permitiese investigar la participación relativa de dicha isoforma en la fisiología del miocito ventricular.

La hipótesis planteada en la Tercera Parte del estudio de *Tesis* fue que los anticuerpos a-L3 y a-L4 serían capaces de reconocer al NBC1, y dado que están dirigidos a dominios extracelulares de la proteína, también capaces de interferir con la actividad del cotransportador.

Expresión del NBC1 en miocardio de gato

La expresión de la proteína del NBC1 en el miocardio de gato se estudió empleando dos anticuerpos diferentes, generados contra la secuencia predecida del dominio extracelular 3 o 4 del NBC1 humano, denominados α -L3 y α -L4, respectivamente, y con un anticuerpo comercial que reconoce el extremo amino-terminal del NBC1 (Millipore, Temecula) (ver *Métodos*).

En la *Figura 28, Panel A* se muestra la secuencia de alineamiento de aminoácidos de los dominios extracelulares 3 (EC 3) y 4 (EC 4) de los transportadores de bicarbonato humano, SLC4 (familias AE y NBC). Como se puede apreciar, aunque las secuencias mostraron la existencia de regiones conservadas, también se evidenciaron extensas regiones de aminoácidos no conservados, lo que aseguró la generación de determinantes antigénicos diferentes y minimizó el riesgo de inducir la producción de anticuerpos que lleven al reconocimiento cruzado entre los diferentes transportadores.

Se detectó una banda de aproximadamente 130 kDa, correspondiente al NBC1 (Alvarez, Loiselle et al. 2003) en presencia del anticuerpo comercial (*Figura 28, Panel B*), del α -L4 (*Panel C*) y del α -L3 (*Panel D*). Una banda de peso molecular similar se observa en lisados de células HEK 293 transfectadas con NBC1, utilizadas como control positivo (*Figura 28, Panel B-D*).

El NBC1 felino parece ser ligeramente más pesado que el NBC1 transfectado a las células HEK 293, posiblemente debido a la glicosilación de la proteína en el miocardio. No se detectó ninguna banda en células HEK 293 sin transfectar (*Figura 28 B-D*) ni en miocardio de gato incubado con el suero sham (*Figura 28, Panel E*).

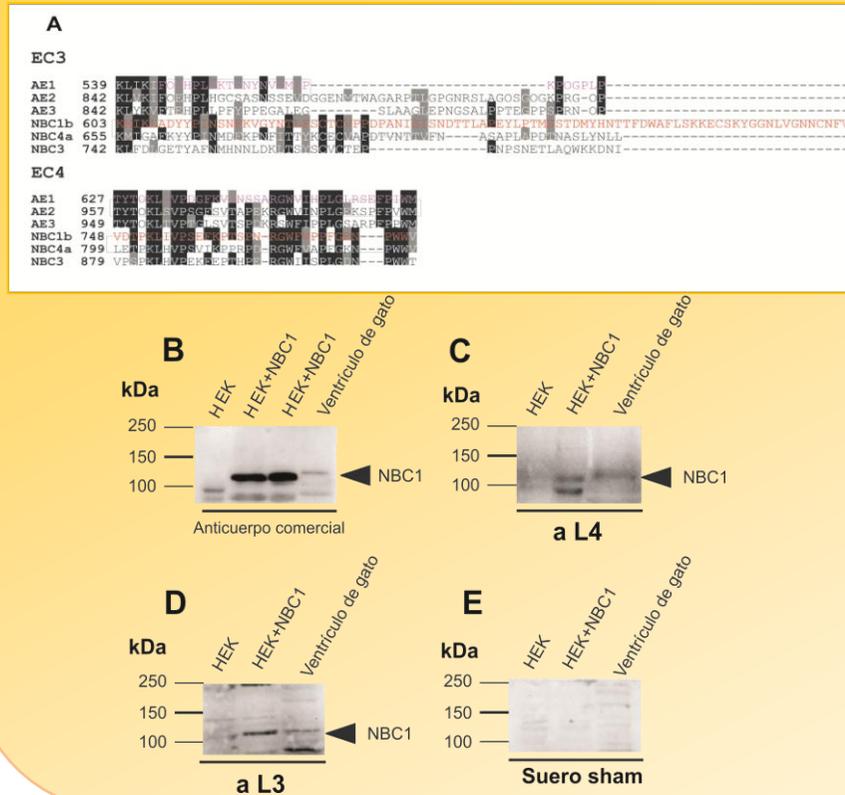


Figura 28: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los transportadores de bicarbonato y expresión del NBC1 en ventrículo de gato.

Panel A Secuencia de aminoácidos (aa) de los dominios extracelulares 3 (EC 3) y 4 (EC 4) de los transportadores de bicarbonato (Tang, Kovacs et al. 1999; Zhu, Lee et al. 2003). Las secuencias conservadas están indicadas con rectángulos negros (aa idénticos) y con rectángulos grises (aa similares). En rosa se indican los dominios EC 3 y EC 4 predecidos según el AE1. En naranja se indican los aa utilizados para la construcción del a L3 y a L4.

Panel B-E lisado de células HEK 293, células HEK 293 transfectadas con NBC1 o lisados de miocardio de felino fueron incubados con un anticuerpo comercial (B), a L4 (C), a L3 (D) o suero sham (E). La posición del NBC1 se indica con una flecha.

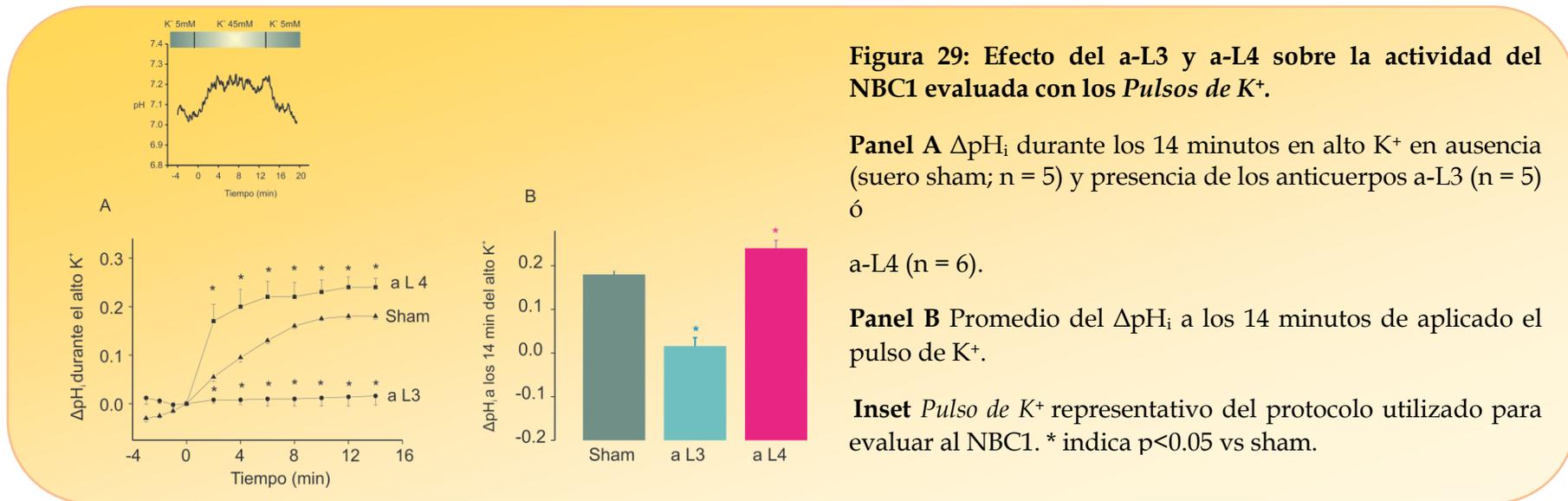
Efectos opuestos de los anticuerpos evaluados con Pulso de K⁺

Habiendo demostrado que los anticuerpos eran capaces de reconocer al NBC1, evaluamos la capacidad que tenían de interferir con su actividad. Se realizaron *Pulsos de K⁺* con ambos anticuerpos por separado y como control se utilizó suero sham. En situación control (sham; dilución 1/500) el ΔpH_i tras 14 minutos de la exposición al alto K⁺ fue de 0.18 ± 0.01 ; n=5 (Figura 29), valor semejante al obtenido en los experimentos precedentes en situación control (ver Figura 22), permitiendo

considerar al suero sham como un verdadero control contra el cual contrastar los resultados que obtendríamos con el uso de los anticuerpos.

En presencia del α -L3 (dilución 1/500) el ΔpH_i fue totalmente abolido (ΔpH_i 0.016 ± 0.02 ; $n = 5^*$, *Figura 29*), resultado que nos demostraba que en situación fisiológica el NBC1 es la única isoforma electrogénica funcionalmente activa en los miocitos ventriculares de gato. Si bien la presencia del NBC4 ha sido demostrada en corazón (Pushkin, Abuladze et al. 2000; Virkki, Wilson et al. 2002) podría estar presente en células cardíacas diferentes al miocito o bien estar expresado en este tipo celular, pero no ser activo en situaciones fisiológicas. En concordancia con nuestros resultados, *Yamamoto et al* demostraron la ausencia del ARNm del gen SLC4A5, correspondiente al NBC4, en corazones de rata (Yamamoto, Shirayama et al. 2007).

A continuación investigamos el efecto del segundo anticuerpo (α -L4), pensando que al igual que con el α -L3 obtendríamos un efecto inhibitorio sobre la actividad del NBC1. Para nuestra sorpresa, la incubación de las células con α -L4 (dilución 1/500) generó un ΔpH_i aún mayor al de la situación control (0.25 ± 0.018 ; $n = 6^*$, *Figura 29*), mostrando un efecto estimulador de este segundo anticuerpo.



Por último, se realizaron experimentos con el fin de evaluar si la dosis de anticuerpos que habíamos utilizado en los experimentos anteriores era la dosis con la que se obtenía su máximo efecto.

La *Figura 30* muestra la curva dosis-respuesta obtenida para diferentes diluciones del suero conteniendo los anticuerpos a-L3 (*Panel A*) o a-L4 (*Panel B*). La dilución 1/500 fue la dosis con la cual se obtuvo el efecto máximo, por lo que para el resto de los experimentos utilizamos dicha dilución tanto para los anticuerpos como para el suero sham.

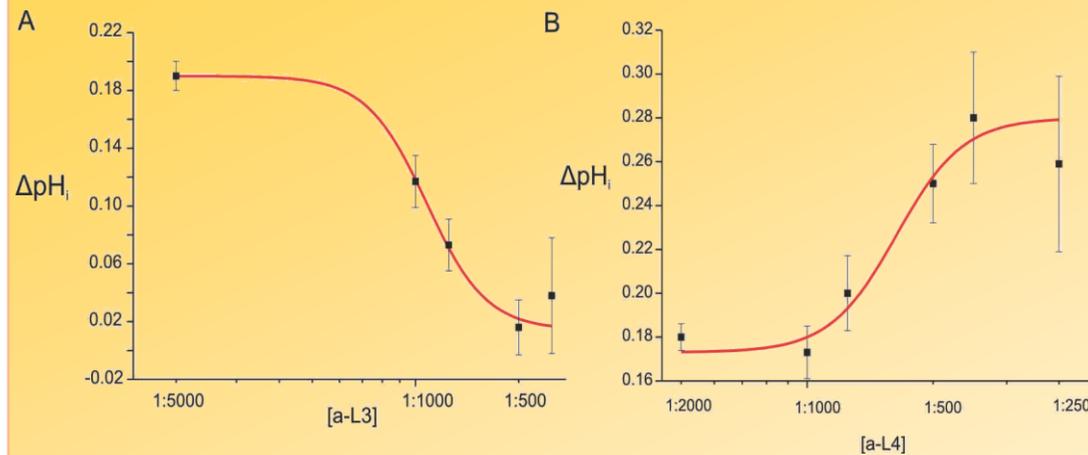


Figura 30: Curva dosis-respuesta de los anticuerpos.

Panel A Efecto sobre la actividad del NBC1 (medida como el ΔpH_i a los 14 minutos de exposición al alto K⁺) con diferentes concentraciones de suero conteniendo el a-L3 (dilución v/v): 1:5000 (n=5), 1:1000 (n=4), 1:800 (n=5), 1:500 (n=5), 1:400 (n=4).

Panel B Efecto sobre la actividad del NBC1 (medida como el ΔpH_i a los 14 minutos de exposición al alto K⁺) con diferentes concentraciones de suero conteniendo el a-L4 (dilución v/v): 1:2000 (n=5), 1:1000 (n=4), 1:800 (n=4), 1:500 (n=7), 1:400 (n=4), 1:250 (n=4).

Efectos opuestos de los anticuerpos evaluados con “Pulso de amonio”

Con los resultados anteriormente expuestos que nos indicaban, por un lado que el NBC1 era la única isoforma electrogénica funcional en los miocitos ventriculares de gato adulto, y por otro que contábamos con la promisoriosa posibilidad de inhibir o activar selectivamente a dicha isoforma, nos planteamos investigar la participación relativa del NBC1 en la recuperación del pH_i puesta en marcha por la actividad del NBC total tras la imposición de una acidosis intracelular.

Se realizaron “Pulsos de amonio” preincubando los miocitos con suero sham, a-L3 ó a-L4 (dilución 1/500). Es importante recordar que estos experimentos fueron realizados en un medio con bicarbonato burbujeadado con CO_2 5%/O₂ 95% y en presencia continua de HOE 642 10 μM . Como se puede apreciar en la *Figura 31*, en presencia del a-L3 el J_{H} a pH_i 6.8 disminuyó un 50% respecto al sham (1.32 ± 0.19 ; $n=5$ vs 0.59 ± 0.08 ; $n= 5^*$), indicando que la isoforma electroneutra (NBC3) y electrogénica (NBC1) del NBC participan de un modo equivalente en la recuperación del pH_i .

Consistentemente con los resultados obtenidos en los “Pulsos de K^+ ”, el a-L4 mostró un efecto estimulador sobre la actividad del NBC1, en esta oportunidad en un escenario diferente, como es la recuperación de un estado de acidosis (J_{H} 2.27 ± 0.29 ; $n = 6^*$, *Figura 31*).

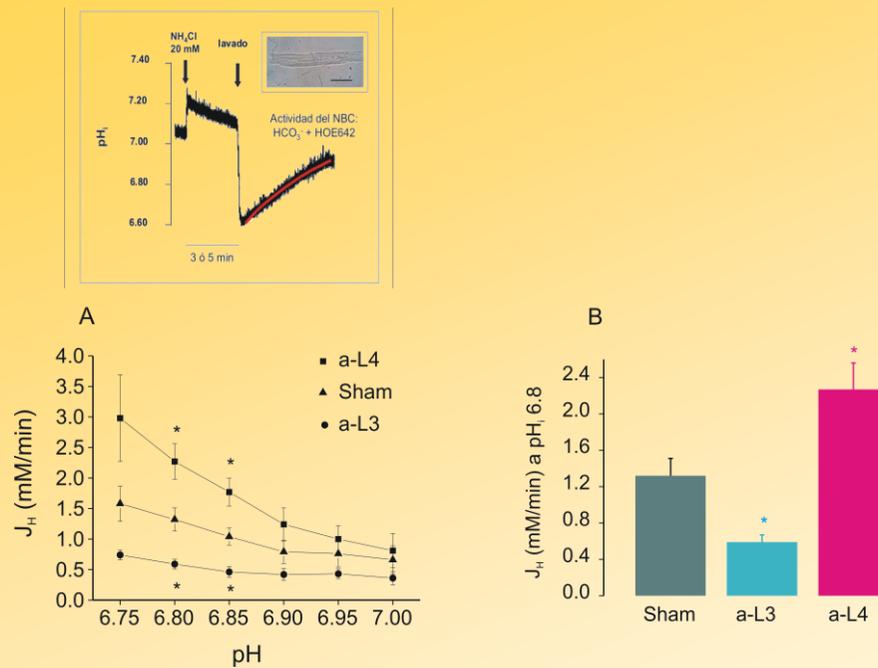


Figura 31: Efecto del a-L3 y a-L4 sobre la actividad del NBC1 evaluada en Pulsos de amonio.

Panel A Promedio del J_{H} durante la recuperación de la acidosis en situación control (sham) o en presencia del a-L3 ó a-L4.

Panel B J_{H} (mmoles/min) a pH_i 6.8 con sham ($n = 5$), a-L3 ($n = 5$) o con a-L4 ($n = 6$).

Inset Pulso de amonio representativo del protocolo utilizado para los experimentos. * indica $p < 0.05$ vs sham.

A continuación nos planteamos lo siguiente: si la aceleración en la recuperación de la acidosis generada por Ang II 100 nM (70 % mayor respecto al control, ver *Resultados primera parte, Figura 16*) era la resultante de la activación del NBC3 simultánea a la inhibición del NBC1, la incubación con a-L3 (para inhibir al NBC1) en presencia de Ang II debiera inducir la activación del NBC3 en ausencia de la simultánea inhibición del NBC1, y conducir a una recuperación del pH_i mayor al 70% a pH_i 6.8.

Efectivamente, cuando realizamos los *Pulsos de amonio*, en presencia continua de a-L3, la Ang II aceleró la recuperación de la acidosis un 130% (J_H 1.34±0.09; n=6* vs 0.59±0.08; n=5, *Figura 32*). Así, el uso de los anticuerpos dirigidos específicamente contra el NBC1 nos ayudaba a reforzar los resultados obtenidos anteriormente referidos al efecto dual de la Ang II 100 nM sobre las isoformas del NBC.

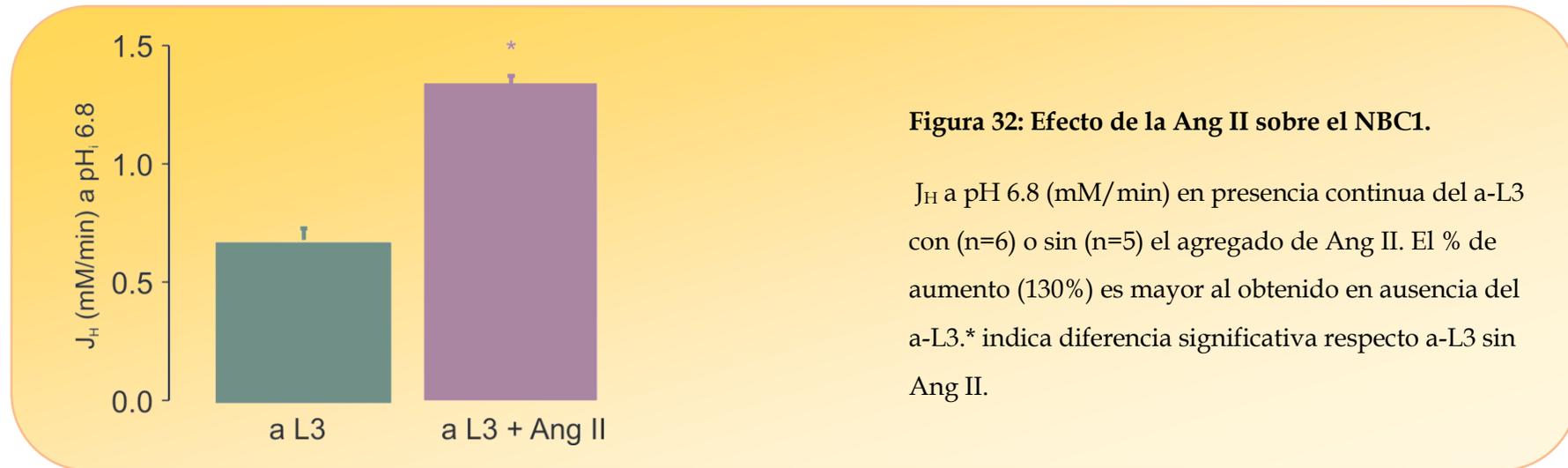


Figura 32: Efecto de la Ang II sobre el NBC1.

J_H a pH 6.8 (mM/min) en presencia continua del a-L3 con (n=6) o sin (n=5) el agregado de Ang II. El % de aumento (130%) es mayor al obtenido en ausencia del a-L3.* indica diferencia significativa respecto a-L3 sin Ang II.

Efectos opuestos de los anticuerpos evaluados con Patch-clamp perforado

Como fue anteriormente expuesto, nuestro laboratorio describió por primera vez la corriente aniónica generada por el NBCe cardíaco (I_{NBCe}), demostrando que es capaz de acortar la DPAC un 25% al pasar de un medio HEPES-sin bicarbonato a una solución con bicarbonato (Aiello, Petroff et al. 1998; Villa-Abrille, Petroff et al. 2007) tanto en miocitos de rata como de gato. A la luz de los resultados expuestos en la presente *Tesis*, esta corriente repolarizante generada por el mecanismo electrogénico del NBC sería exclusivamente dependiente del NBC1, única isoforma electrogénica funcional activa en los miocitos ventriculares. Asimismo, en los resultados expuestos en la *Segunda Parte de la Tesis*, mostramos que la Ang II 100 nM fue capaz de prevenir dicho acortamiento, posiblemente como consecuencia de inhibir al NBC1.

En este punto de nuestra investigación quisimos evaluar la posibilidad de modular la DPAC con el empleo de nuestros anticuerpos.

La *Figura 33, Panel A* muestra registros de PAs representativos antes y después del agregado de suero sham, de a-L3 o de a-L4 a la solución extracelular. Mientras que el suero sham no afectó la DPAC, el a-L3 alargó la DPAC y el a-L4 la acortó, resultados que corroboran la inhibición y activación, respectivamente, de la corriente aniónica repolarizante generada por el NBC1.

La *Figura 33, Panel B* muestra los datos promedios calculados al 90% de la DPAC (DPAC_{90}): el a-L3 alargó 17% la DPAC_{90} y el a-L4 la acortó 20% con respecto al control.

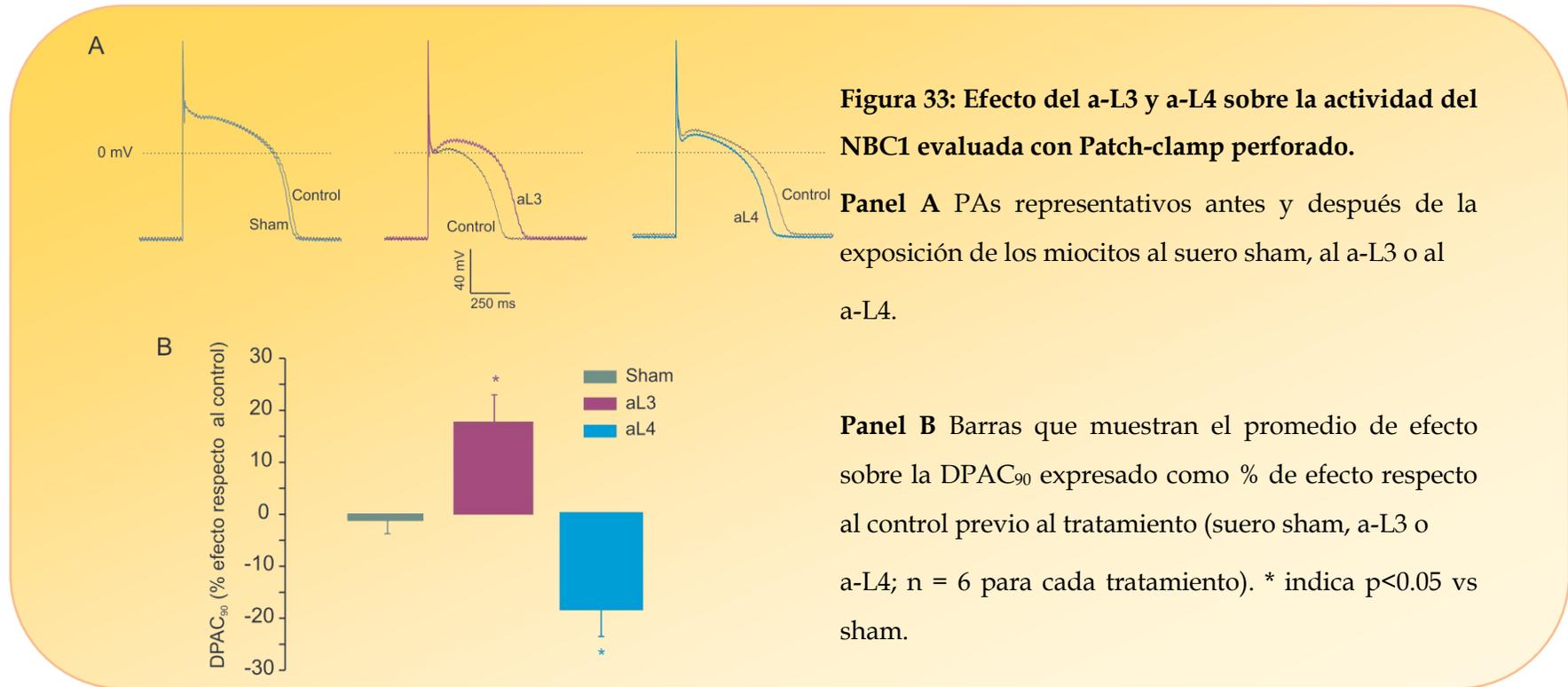


Figura 33: Efecto del α -L3 y α -L4 sobre la actividad del NBC1 evaluada con Patch-clamp perforado.

Panel A PAs representativas antes y después de la exposición de los miocitos al suero sham, al α -L3 o al α -L4.

Panel B Barras que muestran el promedio de efecto sobre la DPAC₉₀ expresado como % de efecto respecto al control previo al tratamiento (suero sham, α -L3 o α -L4; n = 6 para cada tratamiento). * indica p < 0.05 vs sham.

Los resultados de esta tercer parte la *Tesis*, nos muestran que contamos con la posibilidad de poseer en nuestro laboratorio con dos anticuerpos capaces de modificar la función del NBC1, y aún más, hacerlo de un modo opuesto, lo que representa para nosotros un hallazgo inesperado pero por lo demás promisorio.

Discusión y Perspectivas Futuras

“El deseo ardiente por el conocimiento, de hecho, es el único motivo que atrae y sustenta al investigador en sus esfuerzos (...)” Claude Bernard.

Los principales resultados del presente estudio de *Tesis* pueden resumirse de la siguiente manera:

El NBC es el responsable del 30% de la recuperación de la acidosis a pH_i 6.8 y del 50% a pH_i cercanos al basal, siendo el único mecanismo activo cuando el NHE está inhibido.

La única isoforma electrogénica funcionalmente activa de los miocitos ventriculares de gato en condiciones fisiológicas es el NBC1, indicando que el NBC4 (la restante isoforma electrogénica presente en el corazón) debe, o bien estar presente en otro tipo celular o bien expresarse en el miocito ventricular, pero no ser activa, al menos en condiciones fisiológicas.

Las isoformas electroneutra (NBC3) y electrogénica (NBC1) participan de un modo equivalente durante la recuperación de la acidosis mediada por la actividad del NBC total.

La Ang II aumenta un 70% la actividad del NBC total durante la recuperación de la acidosis.

La Ang II ejerce una acción diferencial sobre las isoformas del NBC por la cual activa al NBC3 e inhibe al NBC1.

La Ang II lleva a cabo ambos efectos (estimulante sobre el NBC3 e inhibitorio sobre el NBC1) tras su unión a los receptores AT1, a partir de lo cual activa dos vías de señalización: una vía en la que participa la PKC, se incrementa la producción de ROS mitocondriales y se estimula la fosforilación y actividad de ERK 1/2 llevando a la activación del NBC3, y otra vía en la que se activa la p38 kinasa, llevando a la inhibición del NBC1.

Los anticuerpos a-L3 y a-L4 reconocen al NBC1, demostrando su presencia en el miocardio de gato.

Los anticuerpos a-L3 y a-L4 interfieren en la función del NBC1 de un modo opuesto, permitiéndonos investigar la participación de dicha isoforma en el control del pH_i y en la configuración del potencial cardíaco.

Consideramos que nuestros resultados son interesantes. Por un lado, el hecho de que la Ang II, una hormona tan comprometida con la función cardíaca, no sólo module la actividad del NBC, sino que exhiba un efecto diferencial sobre sus isoformas, transforma la “*Caracterización del NBC cardíaco*” en sólo el comienzo de un estudio pormenorizado de la relación del cotransportador con la Ang II y de su implicancia en la fisiopatología cardíaca.

Por otro lado la posibilidad de contar con anticuerpos como herramientas para la investigación del NBC1, con la esperanza de que en un futuro puedan ser empleados terapéuticamente, es una herramienta inestimable que es necesario valorar y explotar.

Si bien en la actualidad la participación del NBC como un mecanismo alcalinizante activo en los miocitos ventriculares no representa un hecho totalmente novedoso, no deja de ser importante de remarcar. Hace algunos años las investigaciones eran realizadas en su mayoría en un medio extracelular HEPES-sin bicarbonato, situación en la cual el NHE era el único mecanismo alcalinizante activo y en consecuencia el NBC quedaba totalmente excluído del estudio y de las conclusiones formuladas a partir de los resultados obtenidos. Al utilizarse soluciones de bicarbonato burbujeado con O_2 95%/ CO_2 5% se puso en evidencia la presencia de un segundo mecanismo alcalinizante, dependiente de Na^+ y sensible a SITS, el cual en la actualidad se sabe, corresponde al NBC (Vaughan-Jones, Spitzer et al. 2009). Considero que, al ser el sistema $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ el principal sistema amortiguador del organismo, las investigaciones realizadas en su presencia semejan una condición más cercana a la fisiológica, y en consecuencia las conclusiones formuladas son más fidedignas de la realidad.

En el presente estudio de *Tesis* se presenta la relación entre el NBC y la Ang II en la especie felina. La Ang II ha sido relacionada con el NBC en miocitos de ratas, tanto neonatas (Kohout and Rogers 1995) como adultas (Baetz, Haworth et al. 2002), donde se demostró que la hormona estimula al cotransportador por una vía fosfoinositol-independiente o por activación de ERK 1/2, respectivamente.

Nuestros experimentos fueron realizados en miocitos ventriculares de gato con el fin de investigar si tal efecto era reproducible en una especie animal diferente y especialmente con el objeto de profundizar el estudio de la vía intracelular desencadenada por la hormona y el efecto diferencial sobre las isoformas del NBC.

En concordancia con las investigaciones realizadas en rata, según nuestros resultados, la Ang II 100 nM estimula la actividad del NBC total. Pero el mayor aporte de nuestra investigación es haber diferenciado el efecto de la hormona sobre las isoformas

del NBC llevado a cabo por la activación de dos vías de señalización diferentes: una que involucra a los ROS mitocondriales y la kinasa ERK 1/2 y otra en la que participa la p38 kinasa, teniendo la primera un efecto estimulante sobre la isoforma electroneutra, el NBC3 y la segunda ejerciendo su inhibición sobre la isoforma electrogénica, el NBC1.

El hecho de que se activen dos vías en paralelo con efectos opuestos, que a priori parecería contradictorio, es frecuente de encontrar durante los procesos fisiológicos, pudiendo representar un mecanismo de regulación y autocontrol de la célula, y el establecimiento de un estado de equilibrio entre vías estimulantes e inhibitorias, a partir del cual se desarrollará la respuesta celular final.

La investigación de la participación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en las vías de señalización intracelular ha crecido de manera notable y progresivamente se describen cada vez más procesos fisiológicos en los que existe participación de los ROS, quedando atrás el viejo concepto que asociaba a los ROS exclusivamente con la muerte celular (Bartosz 2009).

Ha sido demostrado que la Ang II es un potente activador de la NADPH oxidasa (NOX) (Seshiah, Weber et al. 2002; Giordano 2005), aumentando la concentración de O_2^- , el cual directa o indirectamente es el responsable de los efectos de la hormona. También se ha demostrado que el O_2^- generado por la NOX activa la producción de más O_2^- por la cadena respiratoria mitocondrial, denominándose a este fenómeno “*Producción de ROS inducida por ROS*” (Kimura, Zhang et al. 2005).

En el presente trabajo de *Tesis* se demostró la participación de los ROS en la estimulación generada por la Ang II del NBC durante la recuperación de la acidosis utilizando un secuestrador de dichas moléculas (MPG) y una inhibidor de la NOX

(Apocinina). Por otro lado, se mostró que el H_2O_2 , independientemente de la presencia de Ang II, es capaz de mimetizar el efecto de la hormona sobre la actividad del NBC.

Adicionalmente, la preincubación de los miocitos con Catalasa impermeable previno el efecto de Ang II, sugiriendo que la el O_2^- generado por la NOX quedaría en el lado extracelular y tras ser dismutado a H_2O_2 , esta molécula atravesaría la membrana celular y llevaría a cabo las señales desencadenadas por la Ang II. Consistentemente, el subtipo más importante de NOX presente en la membrana de los miocitos ventriculares es igual al presente en las células fagocíticas (NOX2) (Zhang, Lu et al. 2007), en las cuales la producción de O_2^- se produce hacia el medio extracelular.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la NOX produce el O_2^- hacia el exterior celular, allí se dismuta a H_2O_2 , y es esta molécula la que atraviesa la membrana y desencadena la vía de señalización intracelular inducida por la Ang II.

La participación de los ROS mitocondriales en el efecto de la Ang II sobre la actividad del NBC total fue comprobada con el empleo de 5HD (inhibidor específico de los $\text{mitoK}^+_{\text{ATP}}$) o Rotenona (bloqueante del complejo I de la cadena respiratoria), drogas que previnieron el efecto estimulante de la hormona sobre la recuperación del pH_i mediada por el NBC. Asimismo se utilizó Diasóxido (abridor de los $\text{mitoK}^+_{\text{ATP}}$), con el fin de aumentar la producción de ROS mitocondriales independientemente de Ang II, situación que nuevamente aceleró la recuperación de la acidosis mediada por el NBC.

Demostrado que tanto los ROS producidos por la NOX como los provenientes de la mitocondria participaban en la activación del NBC, era importante descifrar si en dicha regulación estaba implicado el mecanismo de “Producción de ROS inducida por ROS” o eran dos mecanismos de generación de ROS independientes entre sí.

En este punto adquieren importancia los experimentos que muestran que tanto el MPG como el 5HD previnieron el efecto del Dióxido, y en contraposición la Apocinina fue incapaz de interferir con la producción de O_2^- , ya desencadenada la apertura de los mitoK_{ATP}, que lleva a la activación del NBC.

Han sido demostrados diferentes mecanismos por los cuales son activados los mitoK_{ATP}, llevando a la generación de ROS mitocondriales. Ha sido demostrado un efecto directo del O_2^- (Zhang, Chen et al. 2001; Zhang, Lu et al. 2007) sobre los canales, mientras que el grupo de *Marban* mostró que la activación es llevada a cabo por la PKC (Sato, O'Rourke et al. 1998).

En nuestros experimentos, si bien demostramos la participación de la PKC en la activación del NBC desencadenada por la Ang II, no discernimos el lugar que tiene la kinasa en la vía, pudiendo ser la responsable de la activación de la NOX (Seshiah, Weber et al. 2002), de los mitoK_{ATP} (Sato, O'Rourke et al. 1998) o participar por debajo de la mitocondria activada por los ROS mitocondriales (Juhászová, Zorov et al. 2004). Adicionalmente, ha sido propuesta la existencia de dos isoformas de la PKC, denominada PKC epsilon 1 y 2 (PKC ϵ_1 , PKC ϵ_2) directamente relacionada con los mitoK_{ATP} y con el poro de transición mitocondrial (MPT), respectivamente (Costa, Jakob et al. 2006).

La vía de señalización de las MAPK ERK 1/2 y p38 kinasa es una de las cascadas intracelulares más importantes que median los efectos de la Ang II. En miocitos de rata la actividad del NBC durante la recuperación de la acidosis intracelular es estimulada por ERK 1/2, fosforilada por la acidosis per se y en mayor magnitud, en presencia de 100 nM Ang II (Baetz, Haworth et al. 2002). Según nuestros resultados son los ROS generados en respuesta a la Ang II los que llevan a la fosforilación y activación de la ERK 1/2. Más aún, con el uso del anticuerpo α -L3 demostramos que la mencionada vía de activación estaba solamente relacionada a la isoforma electroneutra, NBC3 (ver *Figura 32: Ang II + α -L3*).

Contrariamente, según nuestros resultados, la Ang II 100 nM mediante la p38 kinasa inhibe a la isoforma electrogénica, NBC1. La inhibición del NBC1 por la Ang II fue para nosotros un hallazgo inesperado, pero consistentemente con nuestros resultados, ha sido demostrado que dosis altas de Ang II inhiben al NBC renal (NBC1) por un mecanismo que involucra al Ácido araquidónico (AA) generado por la enzima fosfolipasa A2 citosólica (FLA₂) (Li, Yamada et al. 2008; Li, Yamada et al. 2008) y que el NHE vascular es inhibido por Ang II 100 nM por un mecanismo p38 kinasa-dependiente (Kusuhara, Takahashi et al. 1998).

Adicionalmente, ha sido demostrada una relación entre el AA y la p38 kinasa, pareciendo compartir la misma vía de señalización (Husain and Abdel-Latif 1999; Houliston, Pearson et al. 2001; Kalyankrishna and Malik 2003; Upmancis, Deeb et al. 2004; Nito, Kamada et al. 2008). En el presente trabajo de *Tesis* no estudiamos la vía de la FLA₂, aunque sería interesante investigar la posible relación entre dicha enzima y la vía de kinasas en tejido cardíaco.

Por otro lado, tampoco pudimos aclarar la existencia de un “cross-talk” entre las 2 vías de MAPK concerniente a regular la actividad del NBC. El tema es controvertido, existiendo investigaciones que muestran la inhibición de ERK 1/2 por la p38 kinasa mediada por fosfatasas (Liu and Hofmann 2004); la activación paralela de ambas kinasas, sin ninguna comunicación entre ellas (Szokodi, Kerkela et al. 2008), y más aún, la existencia de una regulación positiva entre ellas (Houliston, Pearson et al. 2001).

En nuestros experimentos, y por lo menos bajo nuestras condiciones, demostramos que la vía de la p38 kinasa no está relacionada con los ROS. Si bien es ampliamente aceptado que la p38 es una kinasa relacionada con procesos inflamatorios y con el estrés celular, los cuales implican a los ROS (Kyriakis and Avruch 2001; Chai, Wu et al. 2008) también se ha demostrado la existencia de diferentes rutas de señalización dependientes de la p38 e independientes de los ROS (Palomeque, Sapia et al.

2006; Spallarossa, Altieri et al. 2006). La disyuntiva es difícil de solucionar con una generalización, ya que las discrepancias en los resultados pueden ser debidas a las concentraciones de ROS (Kwon, Pimentel et al. 2003), el tiempo de exposición (Liu and Hofmann 2004) e incluso a la implicancia de diferentes isoformas de la p38 (Sabri and Lucchesi 2006).

Por último, en referencia a la patología cardíaca, si bien no es el tema central del presente estudio de *Tesis*, quisiera plantear algunas de nuestras hipótesis en relación a las implicancias de las isoformas del NBC y la Ang II en la aparición y evolución de las patologías cardiovasculares, así como también nuestras futuras líneas de investigación en lo concerniente a dicho tema.

Ha sido demostrado que durante la hipertrofia cardíaca secundaria a coartación aórtica la expresión y actividad del NBC está aumentada, siendo el Losartán (inhibidor de los receptores AT1) capaz de revertirla (Yamamoto, Shirayama et al. 2007), pero quedando aún por discernir si este aumento es causa o consecuencia de la hipertrofia desarrollada. Por otro lado, tampoco se ha investigado si esta sobreexpresión es beneficiosa, intentando de algún modo “combatir” la sobrecarga de presión; o perjudicial, empeorando el desarrollo de la hipertrofia.

Paralelamente, es ampliamente aceptado que la concentración, tanto sistémica como cardíaca, de Ang II está aumentada durante la hipertrofia y la insuficiencia cardíaca (De Mello and Danser 2000; Barlucchi, Leri et al. 2001; Serneri, Boddi et al. 2001; Palomeque, Delbridge et al. 2009). También ha sido demostrado un aumento en la expresión de los receptores AT1 en ventrículo izquierdo de ratas espontáneamente hipertensas (Cardinale, Sriramula et al.), conduciendo ambas situaciones a una mayor actividad de la hormona en el tejido cardíaco.

Por otro lado, en estas patologías se ha demostrado una elevación en la concentración del Na^+ y Ca^{2+} intracelulares (Gray, McIntyre et al. 2001; Despa, Islam et al. 2002; Verdonck, Volders et al. 2003). Según los resultados expuestos en la presente Tesis, el aumento en la concentración de dichos iones podrían, al menos en parte, ser consecuencia de la activación del NBC3, estimulado por la Ang II, la cual lleve al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) a funcionar en su modo reverso (Bril 2003; Baartscheer and van Borren 2008), como ya ha sido demostrado que ocurre durante el desarrollo de hipertrofia cardíaca tras la activación del NHE (Cingolani and Ennis 2007) y ha sido propuesto por *Khandoudi et al* para explicar los cambios hemodinámicos desarrollados durante la insuficiencia cardíaca en corazones de pacientes que mostraban una sobreexpresión del cotransportador (Khandoudi, Albadine et al. 2001).

Son necesarias más investigaciones respecto a la participación diferencial de ambas isoformas en esta sobrecarga de Na^+ y de Ca^{2+} , dado que si bien ambas isoformas participan de una manera equivalente durante la recuperación de la acidosis, no ocurre lo mismo para el influjo de Na^+ , donde el NBC3 tendría una mayor relevancia que el NBC1, debido a la menor cantidad de Na^+ que necesita acarrear este último para elevar el HCO_3^- hasta el mismo nivel (recordar la estequiometría de ambos mecanismos).

Durante la hipertrofia cardíaca existe un alargamiento en la duración del potencial de acción cardíaco (DPAC) (Carmeliet 2006), con la subsecuente predisposición a la aparición de post-despolarizaciones tempranas, las cuales ocurren sobre la meseta del potencial, y que son el puntapié inicial para el desencadenamiento de la actividad gatillada que finalmente culmina con la aparición de taquicardia ventricular y otras arritmias ventriculares potencialmente fatales (Domenighetti, Boixel et al. 2007). Si bien la inhibición de las corrientes repolarizantes de K^+ es el mecanismo más aceptado, según nuestros resultados la Ang II 100 nM inhibe a la isoforma electrogénica NBC1, y consecuentemente podría ser una causa adicional al perjudicial

alargamiento en la DPAC generado por la hormona. Por otro lado, si bien en general se acepta que el alargamiento en la DPAC es la consecuencia inicial electrofisiológica de la hipertrofia cardíaca, existen investigaciones que demuestran, que contrariamente, puede darse el fenómeno opuesto, por el cual el alargamiento en la DPAC induciría el desarrollo de hipertrofia cardíaca, posiblemente secundario a una mayor duración de la meseta, con mayor entrada de calcio a la célula (Lebeche, Kaprielian et al. 2006). Así, éste podría ser otro mecanismo por el cual el NBC y la Ang II estarían implicados en el desarrollo de patología cardiovascular, en este caso, producto de la inhibición de la isoforma NBC1 por la hormona.

En conclusión, pensamos que el NBC podría estar implicado en la patología cardiovascular por la acción diferencial que ejerce la Ang II sobre ambas isoformas del cotransportador, siendo perjudicial tanto la estimulación de la actividad del NBC3 a través de los ROS y la ERK 1/2 que llevarían a la sobrecarga de calcio; como la inhibición p38 kinasa-dependiente del NBC1, que generaría un alargamiento de la DPAC, predisponiendo a la aparición de fenómenos arrítmicos y participando de la sobrecarga de calcio intracelular. La *Figura 34* esquematiza los resultados obtenidos en el presente trabajo de *Tesis* e insinúa las posibles implicancias patológicas comentadas previamente, siendo nuestra esperanza seguir investigando este tema en los años subsiguientes.

Por último, los novedosos resultados obtenidos con los anticuerpos son en mi opinión, una puerta de entrada al estudio de la relevancia del NBC y sus isoformas en la fisiopatología cardiovascular. Si bien se han realizado investigaciones con el uso de anticuerpos (Khandoudi, Albadine et al. 2001; Chiappe de Cingolani, Ennis et al. 2006), es la primera vez que se cuenta con dos anticuerpos dirigidos contra dominios diferentes (EC 3 y EC4) de una misma proteína, los cuales desencadenan efectos opuestos en la actividad de la misma.

La acción estimuladora del α -L4 fue un resultado para nosotros novedoso, aunque ha sido demostrado que los anticuerpos pueden estimular la actividad de una proteína, habiéndose detectado anticuerpos estimulantes de los receptores β en el suero de pacientes con enfermedad de Chagas (Borda, Pascual et al. 1984) y con miocardiopatía dilatada idiopática (Magnusson, Wallukat et al. 1994). Adicionalmente, en la enfermedad endócrina de *Graves Basedow* los pacientes tienen anticuerpos contra el receptor de la hormona Tirotrófina, que al unirse al mismo lo activan y promueven la hipertrofia glandular y el aumento en la síntesis de hormonas tiroideas (Michalek, Morshed et al. 2009).

El modo en el que el α -L3 lleva a cabo su efecto inhibitorio y el α -L4 el estimulador está aún lejos de nuestro conocimiento, aunque hay ciertas evidencias que podrían ayudarnos a dilucidarlo. Con respecto al efecto inhibitorio del α -L3, está bien establecido el hecho de que los derivados del estilbene, como el SITS y el DIDS, inhibidores de los transportadores aniónicos, se unen covalentemente a la primer lisina del dominio TM 5, cercano al dominio extracelular 3 (EC3) en la mayoría de los transportadores de bicarbonato, incluidas todas las isoformas del NBC (Boron, Chen et al. 2009), por lo que la interferencia de la mencionada región, ya sea con los derivados del estilbene como con el α -L3, parecería influir en el funcionamiento del cotransportador. Consistentemente, el uso de anticuerpos inhibidores contra el EC3 del AE3 han sido desarrollados y utilizados con éxito por investigadores del Centro de Investigaciones Cardiovasculares (Chiappe de Cingolani, Ennis et al. 2006).

Ha sido demostrado que el NBC1 forma homo y heterodímeros a través de uniones del tipo “*Puentes disulfuro*” entre cuatro aminoácidos cisteína altamente conservados del EC3 (Kao, Sassani et al. 2008). La unión del α -L3 podría impedir o romper dicha dimerización. Aunque, dado que la fuerza generada en dichas uniones es de carácter covalente, esta posibilidad parece

poco probable. Por otro lado, tampoco está claro si la dimerización es un paso necesario para lograr un funcionamiento óptimo del cotransportador (Boron, Chen et al. 2009).

En referencia a la acción estimuladora del α -L4 las posibilidades que nos planteamos son las siguientes. La enzima anhidrasa carbónica (AC) acelera la reacción de hidratación del CO_2 , formando H_2CO_3 y luego aumentando la concentración de HCO_3^- . Ha sido demostrado que la isoforma extracelular IV de la AC forma una unidad funcional con el NBC1, llamada “metabolón” (Alvarez, Loiselle et al. 2003) ofreciéndole mayor sustrato y aumentando la eficacia del NBC1. El α -L4 podría de alguna manera estabilizar dicha relación entre el NBC1 y la AC, explicando su efecto estimulador.

Con respecto a esta hipótesis, es interesante comentar que planeamos realizar experimentos en células embrionarias de riñón (HEK 293) transfectadas con NBC1, las cuales carecen de la enzima AC IV, en las cuales estudiaremos la presencia o no del efecto estimulador del α -L4 sobre el NBC1.

Por otro lado, otra posibilidad a plantearse es que en realidad ambos anticuerpos sean inhibitorios, pero que actúen sobre una región autoestimuladora (EC3) y otra autoinhibitoria (EC4), resultando ello en una inhibición o estimulación de la actividad del NBC1, respectivamente. Con respecto a este punto, no se conoce aún si estos dominios extracelulares cumplirían dicha función, pero ya ha sido demostrada la existencia de regiones intracelulares autoestimuladoras y autoinhibitorias, cuya regulación es capaz de modificar la actividad del cotransportador (Boron, Chen et al. 2009).

Por último, si bien los resultados presentados en la presente *Tesis* son en su totalidad referidos a miocitos ventriculares de gato, es interesante el hecho de que actualmente comenzamos a utilizar los anticuerpos en miocitos de rata, y estamos obteniendo resultados similares a los expuestos en la presente investigación. Así, parecería que el efecto de los anticuerpos

podría generalizarse a distintas especies, y de esta manera, dado que la secuencia del EC3 y EC4 son similares a los del hombre, ser aplicable a la especie humana.

En el presente estudio de *Tesis*, demostramos que su empleo sirvió como herramienta en la investigación de la participación del NBC en la fisiología cardíaca, diferenciando tanto la actividad basal del NBC1 y NBC3 como la respuesta de ambas isoformas a la Ang II. Adicionalmente, pensamos que el contar con dichos anticuerpos será de extrema utilidad para investigar la implicancia del NBC1 en la aparición y evolución de diversas patologías cardiovasculares. Más aún, quizás en un futuro no muy lejano y apoyados en el avance biotecnológico, los anticuerpos podrán ser usados como herramienta terapéutica, como ya ocurre en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y ciertos tumores (Geyer and Muller-Ladner; Hodi; Jaglowski, Alinari et al.; Wiens, Venson et al.; Oei, Sweep et al. 2008).

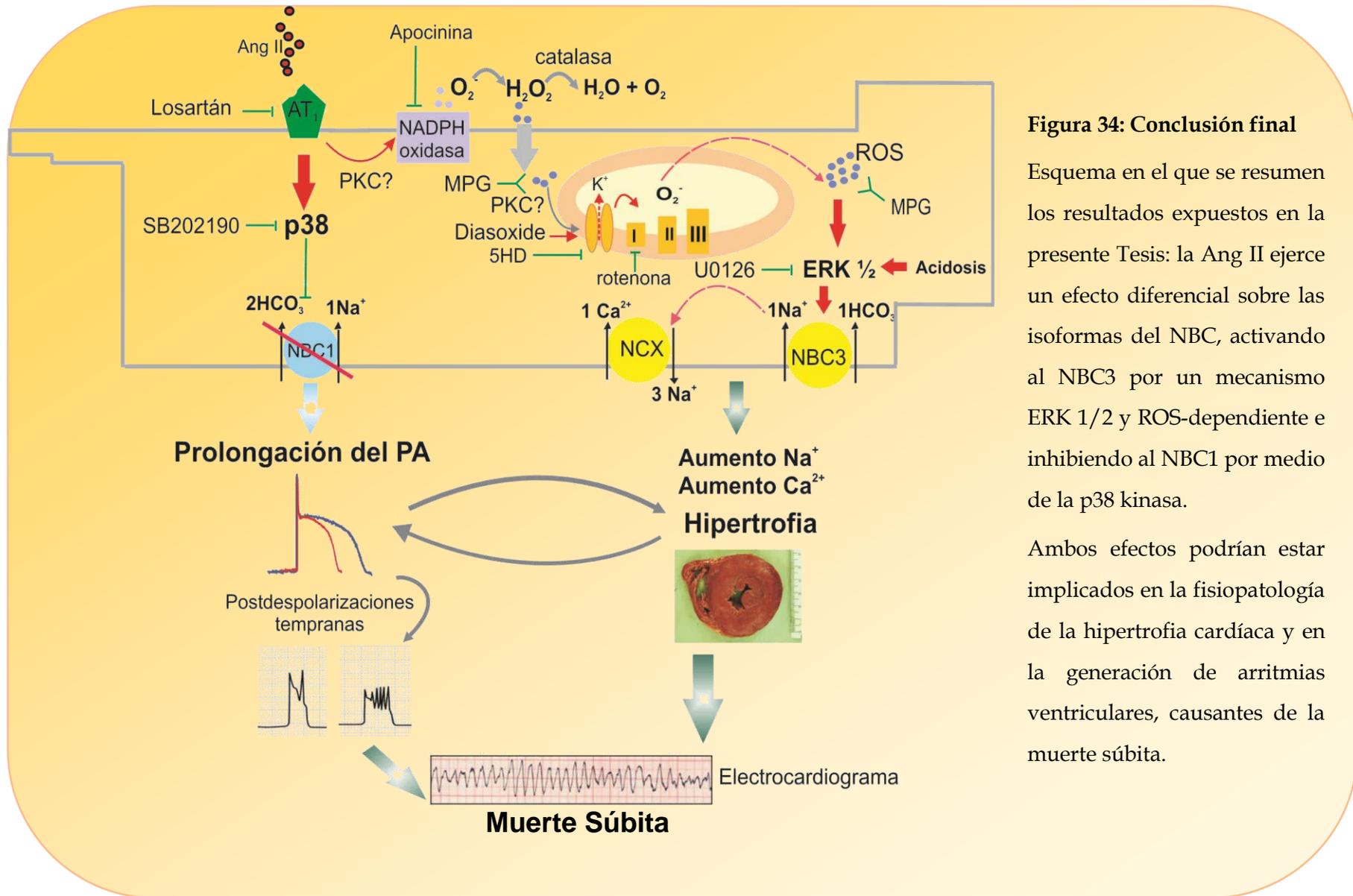


Figura 34: Conclusión final

Esquema en el que se resumen los resultados expuestos en la presente Tesis: la Ang II ejerce un efecto diferencial sobre las isoformas del NBC, activando al NBC3 por un mecanismo ERK 1/2 y ROS-dependiente e inhibiendo al NBC1 por medio de la p38 kinasa.

Ambos efectos podrían estar implicados en la fisiopatología de la hipertrofia cardíaca y en la generación de arritmias ventriculares, causantes de la muerte súbita.

Bibliografía

“Ciencia es salir al mundo con un preguntómetro, ver por qué y cómo son las cosas, no dejar nada sin indagar. Si algo tiene de importante es que rompe con el principio de autoridad, que dice que las cosas son de determinada manera porque las dice alguien”. Diego Golombek

- Aiello, E. A. and H. E. Cingolani (2001). "Angiotensin II stimulates cardiac L-type Ca(2+) current by a Ca(2+)- and protein kinase C-dependent mechanism." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(4): H1528-36.
- Aiello, E. A., M. G. Petroff, et al. (1998). "Evidence for an electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ symport in rat cardiac myocytes." J Physiol **512 (Pt 1)**: 137-48.
- Aiello, E. A., M. C. Villa-Abrille, et al. (2002). "Autocrine stimulation of cardiac Na⁽⁺⁾-Ca(2+) exchanger currents by endogenous endothelin released by angiotensin II." Circ Res **90**(4): 374-6.
- Aiello, E. A., M. C. Villa-Abrille, et al. (2005). "Endothelin-1 stimulates the Na⁺/Ca²⁺ exchanger reverse mode through intracellular Na⁺ (Naⁱ)-dependent and Naⁱ-independent pathways." Hypertension **45**(2): 288-93.
- Alvarez, B. V., F. B. Loiselle, et al. (2003). "Direct extracellular interaction between carbonic anhydrase IV and the human NBC1 sodium/bicarbonate co-transporter." Biochemistry **42**(42): 12321-9.
- Andrukhiv, A., A. D. Costa, et al. (2006). "Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(5): H2067-74.
- Aoki, H., M. Richmond, et al. (2000). "Specific role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro." Biochem J **347 Pt 1**: 275-84.
- Aon, M. A., S. Cortassa, et al. (2008). "Mitochondrial oscillations in physiology and pathophysiology." Adv Exp Med Biol **641**: 98-117.
- Baartscheer, A. and M. M. van Borren (2008). "Sodium ion transporters as new therapeutic targets in heart failure." Cardiovasc Hematol Agents Med Chem **6**(4): 229-36.
- Baetz, D., R. S. Haworth, et al. (2002). "The ERK pathway regulates Na⁽⁺⁾-HCO₃⁽⁻⁾ cotransport activity in adult rat cardiomyocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(5): H2102-9.
- Barlucchi, L., A. Leri, et al. (2001). "Canine ventricular myocytes possess a renin-angiotensin system that is upregulated with heart failure." Circ Res **88**(3): 298-304.
- Bartosz, G. (2009). "Reactive oxygen species: destroyers or messengers?" Biochem Pharmacol **77**(8): 1303-15.
- Borda, E., J. Pascual, et al. (1984). "A circulating IgG in Chagas' disease which binds to beta-adrenoceptors of myocardium and modulates their activity." Clin Exp Immunol **57**(3): 679-86.
- Boron, W. F., L. Chen, et al. (2009). "Modular structure of sodium-coupled bicarbonate transporters." J Exp Biol **212**(Pt 11): 1697-706.
- Bril, A. (2003). "[Ion transporters and cardiovascular diseases: pH control or modulation of intracellular calcium concentration]." Ann Cardiol Angeiol (Paris) **52**(1): 41-51.
- Burnham, C. E., M. Flagella, et al. (1998). "Cloning, renal distribution, and regulation of the rat Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter." Am J Physiol **274**(6 Pt 2): F1119-26.
- Caldiz, C. I., C. D. Garcarena, et al. (2007). "Mitochondrial reactive oxygen species activate the slow force response to stretch in feline myocardium." J Physiol **584**(Pt 3): 895-905.
- Camilion de Hurtado, M. C., B. V. Alvarez, et al. (1996). "Role of an electrogenic Na⁽⁺⁾-HCO₃⁻ cotransport in determining myocardial pH_i after an increase in heart rate." Circ Res **79**(4): 698-704.
- Camilion de Hurtado, M. C., N. G. Perez, et al. (1995). "An electrogenic sodium-bicarbonate cotransport in the regulation of myocardial intracellular pH." J Mol Cell Cardiol **27**(1): 231-42.

- Cardinale, J. P., S. Sriramula, et al. "HDAC inhibition attenuates inflammatory, hypertrophic, and hypertensive responses in spontaneously hypertensive rats." Hypertension **56**(3): 437-44.
- Carmeliet, E. (2006). "Action potential duration, rate of stimulation, and intracellular sodium." J Cardiovasc Electrophysiol **17 Suppl 1**: S2-S7.
- Cingolani, H. E. and I. L. Ennis (2007). "Sodium-hydrogen exchanger, cardiac overload, and myocardial hypertrophy." Circulation **115**(9): 1090-100.
- Cingolani, H. E., N. G. Perez, et al. (2005). "Intracellular signaling following myocardial stretch: an autocrine/paracrine loop." Regul Pept **128**(3): 211-20.
- Cingolani, H. E., N. G. Perez, et al. (2008). "Early signals after stretch leading to cardiac hypertrophy. Key role of NHE-1." Front Biosci **13**: 7096-114.
- Cingolani, H. E., N. G. Perez, et al. (2001). "An autocrine/paracrine mechanism triggered by myocardial stretch induces changes in contractility." News Physiol Sci **16**: 88-91.
- Cingolani, H. E., N. G. Perez, et al. (2003). "Stretch-elicited Na⁺/H⁺ exchanger activation: the autocrine/paracrine loop and its mechanical counterpart." Cardiovasc Res **57**(4): 953-60.
- Cingolani, H. E., M. C. Villa-Abrille, et al. (2006). "The positive inotropic effect of angiotensin II: role of endothelin-1 and reactive oxygen species." Hypertension **47**(4): 727-34.
- Cordat, E. and J. R. Casey (2009). "Bicarbonate transport in cell physiology and disease." Biochem J **417**(2): 423-39.
- Costa, A. D., R. Jakob, et al. (2006). "The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition." J Biol Chem **281**(30): 20801-8.
- Costa, A. D., C. L. Quinlan, et al. (2006). "The direct physiological effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(1): H406-15.
- Ch'en, F. F., F. C. Villafuerte, et al. (2008). "S0859, an N-cyanosulphonamide inhibitor of sodium-bicarbonate cotransport in the heart." Br J Pharmacol **153**(5): 972-82.
- Chai, W., Y. Wu, et al. (2008). "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase abolishes insulin-mediated myocardial protection against ischemia-reperfusion injury." Am J Physiol Endocrinol Metab **294**(1): E183-9.
- Chiappe de Cingolani, G. E., I. L. Ennis, et al. (2006). "Involvement of AE3 isoform of Na⁽⁺⁾-independent Cl⁽⁻⁾/HCO₃⁽⁻⁾ exchanger in myocardial pH(i) recovery from intracellular alkalization." Life Sci **78**(26): 3018-26.
- Choi, I., C. Aalkjaer, et al. (2000). "An electroneutral sodium/bicarbonate cotransporter NBCn1 and associated sodium channel." Nature **405**(6786): 571-5.
- Choi, I., M. F. Romero, et al. (1999). "Cloning and characterization of a human electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter isoform (hhNBC)." Am J Physiol **276**(3 Pt 1): C576-84.
- Dart, C. and R. D. Vaughan-Jones (1992). "Na⁽⁺⁾-HCO₃⁻ symport in the sheep cardiac Purkinje fibre." J Physiol **451**: 365-85.
- De Giusti, V. C., M. V. Correa, et al. (2008). "The positive inotropic effect of endothelin-1 is mediated by mitochondrial reactive oxygen species." Life Sci **83**(7-8): 264-71.
- De Mello, W. C. and A. H. Danser (2000). "Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system." Hypertension **35**(6): 1183-8.

- Despa, S., M. A. Islam, et al. (2002). "Intracellular Na(+) concentration is elevated in heart failure but Na/K pump function is unchanged." Circulation **105**(21): 2543-8.
- Dikalov, S., K. K. Griendling, et al. (2007). "Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies." Hypertension **49**(4): 717-27.
- Doggrell, S. A. and J. C. Hancox (2003). "Is timing everything? Therapeutic potential of modulators of cardiac Na(+) transporters." Expert Opin Investig Drugs **12**(7): 1123-42.
- Domenighetti, A. A., C. Boixel, et al. (2007). "Chronic angiotensin II stimulation in the heart produces an acquired long QT syndrome associated with IK1 potassium current downregulation." J Mol Cell Cardiol **42**(1): 63-70.
- Doughan, A. K., D. G. Harrison, et al. (2008). "Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction." Circ Res **102**(4): 488-96.
- Dulce, R. A., C. Hurtado, et al. (2006). "Endothelin-1 induced hypertrophic effect in neonatal rat cardiomyocytes: involvement of Na⁺/H⁺ and Na⁺/Ca²⁺ exchangers." J Mol Cell Cardiol **41**(5): 807-15.
- Ennis, I. L., C. D. Garcarena, et al. (2007). "Normalization of the calcineurin pathway underlies the regression of hypertensive hypertrophy induced by Na⁺/H⁺ exchanger-1 (NHE-1) inhibition." Can J Physiol Pharmacol **85**(3-4): 301-10.
- Fischer, R., R. Dechend, et al. (2007). "Angiotensin II-induced sudden arrhythmic death and electrical remodeling." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(2): H1242-53.
- Fliegel, L. and M. Karmazyn (2004). "The cardiac Na-H exchanger: a key downstream mediator for the cellular hypertrophic effects of paracrine, autocrine and hormonal factors." Biochem Cell Biol **82**(6): 626-35.
- Garcarena, C. D., C. I. Caldiz, et al. (2008). "Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitors decrease myocardial superoxide production via direct mitochondrial action." J Appl Physiol **105**(6): 1706-13.
- Geyer, M. and U. Muller-Ladner "Actual status of antiinterleukin-1 therapies in rheumatic diseases." Curr Opin Rheumatol **22**(3): 246-51.
- Giordano, F. J. (2005). "Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure." J Clin Invest **115**(3): 500-8.
- Goette, A. and U. Lendeckel (2008). "Electrophysiological effects of angiotensin II. Part I: signal transduction and basic electrophysiological mechanisms." Europace **10**(2): 238-41.
- Grace, A. A., J. C. Metcalfe, et al. (1996). "Angiotensin II stimulates sodium-dependent proton extrusion in perfused ferret heart." Am J Physiol **270**(6 Pt 1): C1687-94.
- Gray, R. P., H. McIntyre, et al. (2001). "Intracellular sodium and contractile function in hypertrophied human and guinea-pig myocardium." Pflugers Arch **442**(1): 117-23.
- Haworth, R. S., S. Dashnyam, et al. (2006). "Ras triggers acidosis-induced activation of the extracellular-signal-regulated kinase pathway in cardiac myocytes." Biochem J **399**(3): 493-501.
- Heumuller, S., S. Wind, et al. (2008). "Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant." Hypertension **51**(2): 211-7.
- Hodi, F. S. "Overcoming immunological tolerance to melanoma: Targeting CTLA-4." Asia Pac J Clin Oncol **6 Suppl 1**: S16-23.
- Honda, H. M., P. Korge, et al. (2005). "Mitochondria and ischemia/reperfusion injury." Ann N Y Acad Sci **1047**: 248-58.
- Hoshino, K. and M. Avkiran (2001). "Effects of moderate hypothermia on sarcolemmal Na(+)/H(+) exchanger activity and its inhibition by cariporide in cardiac ventricular myocytes." Br J Pharmacol **134**(7): 1587-95.
- Houliston, R. A., J. D. Pearson, et al. (2001). "Agonist-specific cross talk between ERKs and p38(mapk) regulates PGI(2) synthesis in endothelium." Am J Physiol Cell Physiol **281**(4): C1266-76.

- Husain A, K. A., Sung SS, Urata H, Bumpus FM (1994). Human Heart Chymase. The Cardiac Renin-Angiotensin System. G. D. E. Lindpaintner K. Armonk, New York, Futura Publishing: 309-332.
- Husain, S. and A. A. Abdel-Latif (1999). "Endothelin-1 activates p38 mitogen-activated protein kinase and cytosolic phospholipase A2 in cat iris sphincter smooth muscle cells." Biochem J **342 (Pt 1)**: 87-96.
- Ichiyanagi, O., K. Ishii, et al. (2002). "Angiotensin II increases L-type Ca²⁺ current in gramicidin D-perforated adult rabbit ventricular myocytes: comparison with conventional patch-clamp method." Pflugers Arch **444(1-2)**: 107-16.
- Ito, N., Y. Kagaya, et al. (1997). "Endothelin and angiotensin II stimulation of Na⁺-H⁺ exchange is impaired in cardiac hypertrophy." J Clin Invest **99(1)**: 125-35.
- Izumiya, Y., S. Kim, et al. (2003). "Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling." Circ Res **93(9)**: 874-83.
- Jaglowski, S. M., L. Alinari, et al. "The clinical application of monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia." Blood.
- Juhaszova, M., D. B. Zorov, et al. (2004). "Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore." J Clin Invest **113(11)**: 1535-49.
- Kalyankrishna, S. and K. U. Malik (2003). "Norepinephrine-induced stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by arachidonic acid metabolites generated by activation of cytosolic phospholipase A(2) in vascular smooth muscle cells." J Pharmacol Exp Ther **304(2)**: 761-72.
- Kao, L., P. Sassani, et al. (2008). "Oligomeric structure and minimal functional unit of the electrogenic sodium bicarbonate cotransporter NBCe1-A." J Biol Chem **283(39)**: 26782-94.
- Karmazyn, M. and M. P. Moffat (1993). "Role of Na⁺/H⁺ exchange in cardiac physiology and pathophysiology: mediation of myocardial reperfusion injury by the pH paradox." Cardiovasc Res **27(6)**: 915-24.
- Khandoudi, N., J. Albadine, et al. (2001). "Inhibition of the cardiac electrogenic sodium bicarbonate cotransporter reduces ischemic injury." Cardiovasc Res **52(3)**: 387-96.
- Kimura, S., G. X. Zhang, et al. (2005). "Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II." Hypertension **45(5)**: 860-6.
- Kohout, T. A. and T. B. Rogers (1995). "Angiotensin II activates the Na⁺/HCO₃⁻ symport through a phosphoinositide-independent mechanism in cardiac cells." J Biol Chem **270(35)**: 20432-8.
- Kumar, S., J. Boehm, et al. (2003). "p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases." Nat Rev Drug Discov **2(9)**: 717-26.
- Kusuhara, M., E. Takahashi, et al. (1998). "p38 Kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: effects on Na⁺/H⁺ exchange and ERK1/2." Circ Res **83(8)**: 824-31.
- Kusumoto, K., H. Igata, et al. (2002). "In vitro and in vivo pharmacology of a structurally novel Na⁺-H⁺ exchange inhibitor, T-162559." Br J Pharmacol **135(8)**: 1995-2003.
- Kwon, S. H., D. R. Pimentel, et al. (2003). "H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways." J Mol Cell Cardiol **35(6)**: 615-21.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." Physiol Rev **81(2)**: 807-69.

- Lagadic-Gossmann, D., K. J. Buckler, et al. (1992). "Role of bicarbonate in pH recovery from intracellular acidosis in the guinea-pig ventricular myocyte." J Physiol **458**: 361-84.
- Lagadic-Gossmann, D. and R. D. Vaughan-Jones (1993). "Coupling of dual acid extrusion in the guinea-pig isolated ventricular myocyte to alpha 1- and beta-adrenoceptors." J Physiol **464**: 49-73.
- Le Prigent, K., D. Lagadic-Gossmann, et al. (1997). "HCO₃⁻-dependent alkalizing transporter in adult rat ventricular myocytes: characterization and modulation." Am J Physiol **273**(6 Pt 2): H2596-603.
- Lebeche, D., R. Kaprielian, et al. (2006). "Modulation of action potential duration on myocyte hypertrophic pathways." J Mol Cell Cardiol **40**(5): 725-35.
- Leem, C. H., D. Lagadic-Gossmann, et al. (1999). "Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte." J Physiol **517 (Pt 1)**: 159-80.
- Li, Y., H. Yamada, et al. (2008). "Roles of ERK and cPLA2 in the angiotensin II-mediated biphasic regulation of Na⁺-HCO₃⁻ transport." J Am Soc Nephrol **19**(2): 252-9.
- Li, Y., H. Yamada, et al. (2008). "Arachidonic acid metabolites inhibit the stimulatory effect of angiotensin II in renal proximal tubules." Hypertens Res **31**(12): 2155-64.
- Liao, P., S. Q. Wang, et al. (2002). "p38 Mitogen-activated protein kinase mediates a negative inotropic effect in cardiac myocytes." Circ Res **90**(2): 190-6.
- Liu, Q. and P. A. Hofmann (2004). "Protein phosphatase 2A-mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(6): H2204-12.
- Lorell, B. H. (1995). "Cardiac renin-angiotensin system: role in development of pressure-overload hypertrophy." Can J Cardiol **11 Suppl F**: 7F-12F.
- Magnusson, Y., G. Wallukat, et al. (1994). "Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect." Circulation **89**(6): 2760-7.
- Matejikova, J., J. Kucharska, et al. (2009). "Protection against ischemia-induced ventricular arrhythmias and myocardial dysfunction conferred by preconditioning in the rat heart: involvement of mitochondrial K(ATP) channels and reactive oxygen species." Physiol Res **58**(1): 9-19.
- Matejikova, J., T. Ravingerova, et al. (2009). "Mitochondrial KATP opening confers protection against lethal myocardial injury and ischaemia-induced arrhythmias in the rat heart via PI3K/Akt-dependent and -independent mechanisms." Can J Physiol Pharmacol **87**(12): 1055-62.
- Michalek, K., S. A. Morshed, et al. (2009). "TSH receptor autoantibodies." Autoimmun Rev **9**(2): 113-6.
- Moor, A. N., X. T. Gan, et al. (2001). "Activation of Na⁺/H⁺ exchanger-directed protein kinases in the ischemic and ischemic-reperfused rat myocardium." J Biol Chem **276**(19): 16113-22.
- Morita, H., J. Kimura, et al. (1995). "Angiotensin II activation of a chloride current in rabbit cardiac myocytes." J Physiol **483 (Pt 1)**: 119-30.
- Nito, C., H. Kamada, et al. (2008). "Role of the p38 mitogen-activated protein kinase/cytosolic phospholipase A2 signaling pathway in blood-brain barrier disruption after focal cerebral ischemia and reperfusion." J Cereb Blood Flow Metab **28**(10): 1686-96.
- Oei, A. L., F. C. Sweep, et al. (2008). "The use of monoclonal antibodies for the treatment of epithelial ovarian cancer (review)." Int J Oncol **32**(6): 1145-57.
- Oldenburg, O., Q. Qin, et al. (2004). "Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(1): H468-76.

- Oldenburg, O., X. M. Yang, et al. (2003). "P1075 opens mitochondrial K(ATP) channels and generates reactive oxygen species resulting in cardioprotection of rabbit hearts." J Mol Cell Cardiol **35**(9): 1035-42.
- Pain, T., X. M. Yang, et al. (2000). "Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals." Circ Res **87**(6): 460-6.
- Palomeque, J., L. Delbridge, et al. (2009). "Angiotensin II: a regulator of cardiomyocyte function and survival." Front Biosci **14**: 5118-33.
- Palomeque, J., L. Sapia, et al. (2006). "Angiotensin II-induced negative inotropy in rat ventricular myocytes: role of reactive oxygen species and p38 MAPK." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(1): H96-106.
- Park, J. K., R. Fischer, et al. (2007). "p38 mitogen-activated protein kinase inhibition ameliorates angiotensin II-induced target organ damage." Hypertension **49**(3): 481-9.
- Perez, N. G., B. V. Alvarez, et al. (1995). "pHi regulation in myocardium of the spontaneously hypertensive rat. Compensated enhanced activity of the Na(+)-H+ exchanger." Circ Res **77**(6): 1192-200.
- Perez, N. G., M. C. de Hurtado, et al. (2001). "Reverse mode of the Na⁺-Ca²⁺ exchange after myocardial stretch: underlying mechanism of the slow force response." Circ Res **88**(4): 376-82.
- Pushkin, A., N. Abuladze, et al. (2000). "Cloning, characterization and chromosomal assignment of NBC4, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family." Biochim Biophys Acta **1493**(1-2): 215-8.
- Pushkin, A. and I. Kurtz (2006). "SLC4 base (HCO₃⁻, CO₃²⁻) transporters: classification, function, structure, genetic diseases, and knockout models." Am J Physiol Renal Physiol **290**(3): F580-99.
- Rivard, K., P. Paradis, et al. (2008). "Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization." Cardiovasc Res **78**(1): 53-62.
- Romero, M. F., C. M. Fulton, et al. (2004). "The SLC4 family of HCO₃⁻ transporters." Pflugers Arch **447**(5): 495-509.
- Roos, A. and W. F. Boron (1981). "Intracellular pH." Physiol Rev **61**(2): 296-434.
- Rothstein, E. C., K. L. Byron, et al. (2002). "H₂O₂-induced Ca²⁺ overload in NRVM involves ERK1/2 MAP kinases: role for an NHE-1-dependent pathway." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(2): H598-605.
- Sabri, A., K. L. Byron, et al. (1998). "Hydrogen peroxide activates mitogen-activated protein kinases and Na⁺-H⁺ exchange in neonatal rat cardiac myocytes." Circ Res **82**(10): 1053-62.
- Sabri, A. and P. A. Lucchesi (2006). "ANG II and cardiac myocyte contractility: p38 is not stressed out!" Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(1): H72-3.
- Sadoshima, J. and S. Izumo (1996). "Autocrine secretion of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro." Contrib Nephrol **118**: 214-21.
- Sadoshima, J., Y. Xu, et al. (1993). "Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro." Cell **75**(5): 977-84.
- Sandmann, S., M. Yu, et al. (2001). "Differential effects of angiotensin AT1 and AT2 receptors on the expression, translation and function of the Na⁺-H⁺ exchanger and Na⁺-HCO₃⁻ symporter in the rat heart after myocardial infarction." J Am Coll Cardiol **37**(8): 2154-65.
- Sassani, P., A. Pushkin, et al. (2002). "Functional characterization of NBC4: a new electrogenic sodium-bicarbonate cotransporter." Am J Physiol Cell Physiol **282**(2): C408-16.
- Sato, T., B. O'Rourke, et al. (1998). "Modulation of mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels by protein kinase C." Circ Res **83**(1): 110-4.

- Schafer, C., Y. V. Ladilov, et al. (2000). "Importance of bicarbonate transport for protection of cardiomyocytes against reoxygenation injury." Am J Physiol Heart Circ Physiol **278**(5): H1457-63.
- Serteri, G. G., M. Boddi, et al. (2001). "Cardiac angiotensin II formation in the clinical course of heart failure and its relationship with left ventricular function." Circ Res **88**(9): 961-8.
- Seshiah, P. N., D. S. Weber, et al. (2002). "Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators." Circ Res **91**(5): 406-13.
- Snabaitis, A. K., D. J. Hearse, et al. (2002). "Regulation of sarcolemmal Na(+)/H(+) exchange by hydrogen peroxide in adult rat ventricular myocytes." Cardiovasc Res **53**(2): 470-80.
- Soleimani, M. and C. E. Burnham (2000). "Physiologic and molecular aspects of the Na⁺:HCO₃⁻ cotransporter in health and disease processes." Kidney Int **57**(2): 371-84.
- Spallarossa, P., P. Altieri, et al. (2006). "Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase." Cardiovasc Res **69**(3): 736-45.
- Szokodi, I., R. Kerkela, et al. (2008). "Functionally opposing roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of cardiac contractility." Circulation **118**(16): 1651-8.
- Takimoto, E. and D. A. Kass (2007). "Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling." Hypertension **49**(2): 241-8.
- Tang, X. B., M. Kovacs, et al. (1999). "Identification of residues lining the translocation pore of human AE1, plasma membrane anion exchange protein." J Biol Chem **274**(6): 3557-64.
- Upmancis, R. K., R. S. Deeb, et al. (2004). "Involvement of the mitogen-activated protein kinase cascade in peroxynitrite-mediated arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells." Am J Physiol Cell Physiol **286**(6): C1271-80.
- Vaughan-Jones, R. D., K. W. Spitzer, et al. (2009). "Intracellular pH regulation in heart." J Mol Cell Cardiol **46**(3): 318-31.
- Vaughan-Jones, R. D., F. C. Villafuerte, et al. (2006). "pH-Regulated Na(+)-influx into the mammalian ventricular myocyte: the relative role of Na(+)-H(+) exchange and Na(+)-HCO Co-transport." J Cardiovasc Electrophysiol **17** Suppl 1: S134-S140.
- Verdonck, F., P. G. Volders, et al. (2003). "Increased Na⁺ concentration and altered Na/K pump activity in hypertrophied canine ventricular cells." Cardiovasc Res **57**(4): 1035-43.
- Villa-Abrille, M. C., M. G. Petroff, et al. (2007). "The electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransport modulates resting membrane potential and action potential duration in cat ventricular myocytes." J Physiol **578**(Pt 3): 819-29.
- Virkki, L. V., D. A. Wilson, et al. (2002). "Functional characterization of human NBC4 as an electrogenic Na⁺-HCO cotransporter (NBCe2)." Am J Physiol Cell Physiol **282**(6): C1278-89.
- Wang, Y. H., C. X. Shi, et al. (2008). "Inhibition of the rapid component of the delayed rectifier potassium current in ventricular myocytes by angiotensin II via the AT1 receptor." Br J Pharmacol **154**(2): 429-39.
- Wenzel, S., G. Taimor, et al. (2001). "Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes." Faseb J **15**(12): 2291-3.
- Wiens, A., R. Venson, et al. "Meta-analysis of the efficacy and safety of adalimumab, etanercept, and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis." Pharmacotherapy **30**(4): 339-53.
- Yamaguchi, S. and T. Ishikawa (2008). "The electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter NBCe1-B is regulated by intracellular Mg²⁺." Biochem Biophys Res Commun **376**(1): 100-4.

- Yamamoto, T., T. Shirayama, et al. (2007). "Enhanced activity of ventricular Na⁺-HCO₃⁻ cotransport in pressure overload hypertrophy." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(2): H1254-64.
- Yamamoto, T., P. Swietach, et al. (2005). "Functional diversity of electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransport in ventricular myocytes from rat, rabbit and guinea pig." J Physiol **562**(Pt 2): 455-75.
- Yao, Z., J. Tong, et al. (1999). "Role of reactive oxygen species in acetylcholine-induced preconditioning in cardiomyocytes." Am J Physiol **277**(6 Pt 2): H2504-9.
- Yu, H., J. Gao, et al. (2000). "Effects of the renin-angiotensin system on the current I_(to) in epicardial and endocardial ventricular myocytes from the canine heart." Circ Res **86**(10): 1062-8.
- Zaniboni, M., P. Swietach, et al. (2003). "Intracellular proton mobility and buffering power in cardiac ventricular myocytes from rat, rabbit, and guinea pig." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(3): H1236-46.
- Zhang, D. X., Y. F. Chen, et al. (2001). "Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels." Circ Res **89**(12): 1177-83.
- Zhang, G. X., X. M. Lu, et al. (2007). "Role of mitochondria in angiotensin II-induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation." Cardiovasc Res **76**(2): 204-12.
- Zhou, C., C. Ziegler, et al. (2006). "Angiotensin II and stretch activate NADPH oxidase to destabilize cardiac Kv4.3 channel mRNA." Circ Res **98**(8): 1040-7.
- Zhu, Q., D. W. Lee, et al. (2003). "Novel topology in C-terminal region of the human plasma membrane anion exchanger, AE1." J Biol Chem **278**(5): 3112-20.
- Zorov, D. B., C. R. Filburn, et al. (2000). "Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes." J Exp Med **192**(7): 1001-14.
- Zorov, D. B., M. Juhaszova, et al. (2006). "Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review." Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 509-17.