



Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas

# “MODULACIÓN DEL INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ DE MIOCITOS CARDÍACOS MEDIANTE LA VÍA AUTOCRINA ANG II /ET”

María Celeste Villa-Abrille

Director

Dr. Ernesto A. Aiello

Codirector

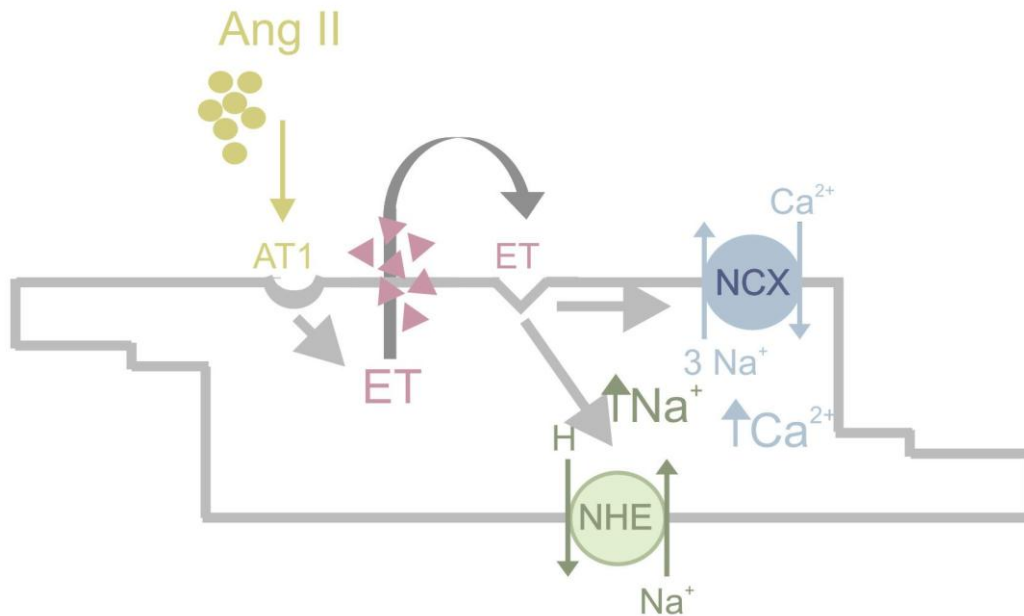
Dr. Horacio E. Cingolani

Asesora Académica

Dra. Angela Grassi de Gende

Tesis Doctoral

-2005-



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

## **El intercambiador sodio-calcio (NCX)**

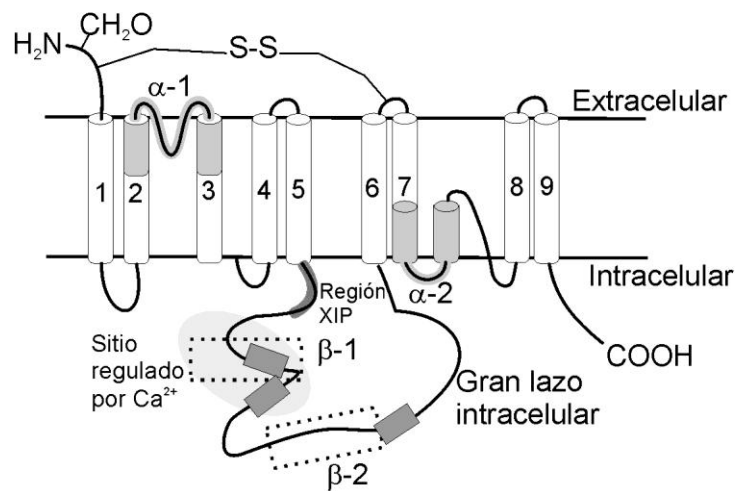
El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) es una proteína integral de membrana que promueve el transporte de 3 iones  $\text{Na}^+$  por cada ión  $\text{Ca}^{2+}$  en direcciones opuestas, generando de este modo un flujo neto de una carga positiva en cada ciclo, caracterizándolo como un transportador electrogénico. El NCX está en la membrana plasmática de gran parte de las células de mamíferos, ayudando a mantener la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Existen 3 isoformas (1), derivadas de 3 genes diferentes: NCX1 o tipo cardíaco (2), NCX2 o tipo músculo esquelético (3) y NCX3 o tipo cerebro (4). NCX1 está distribuido ubicuamente pero es más abundante en el corazón y el cerebro. Tiene bajos niveles en la retina, músculo liso y esquelético (5).

### **NCX Cardíaco (NCX1)**

La expresión del NCX1 ocurre en etapas muy tempranas de la cardiogénesis (6). En mamíferos normales el nivel de expresión del NCX1 es máximo cerca del nacimiento, y luego va disminuyendo en la vida postnatal (7). Esto se opone a la expresión de la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA) la cual aumenta en la vida postnatal (8-11). Klitzner y col (12) han sugerido que el papel del NCX va cambiando durante el desarrollo. Así en los neonatos estaría involucrado directamente en el acoplamiento eléctrico-contráctil (AEC) de dos maneras diferentes: por un lado participando de la contractilidad (12) y por el otro extruyendo  $\text{Ca}^{+2}$  para que se produzca la relajación. Por lo tanto la contribución del NCX en el control del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es mayor en corazones inmaduros que en corazones adultos. Por técnicas inmunohistoquímicas se determinó que el NCX se encuentra en toda la membrana de los miocitos cardíacos, pero hay una mayor densidad en los tubulos t que en el sarcolema externo (13-16).

## Estructura

El NCX1 tiene 970 aminoácidos (aminoácidos=aa) y un peso molecular de 110 kDa (2). Posee 9 segmentos transmembrana (sTM) (17-19). La porción amino-terminal está localizada fuera de la membrana mientras que la porción carboxilo-terminal se localiza dentro del citoplasma (17-19). El NCX1 posee además un gran lazo interno (entre los aa 250 y 796) hidrofílico entre los sTM 5 y 6. En la figura 1 se esquematiza la estructura del NCX.



**Figura 1:** Esquema de la estructura del NCX1.

La eliminación de este gran lazo muestra que no es esencial para el transporte del  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Ca}^{2+}$ , sin embargo sí lo es para la regulación alostérica intracelular por  $\text{Ca}^{2+}$  y por  $\text{Na}^+$  (20,21) (se detalla más adelante). Dentro de este gran lazo intracelular se encuentra una región peptídica (entre los aminoácidos 219 y 238) conocida como XIP (**ex**change **i**nhibitory **p**eptide) que cuando se adiciona al medio intracelular un péptido sintético con la misma secuencia inhibe al intercambiador (22,23). (En la figura 1 se puede visualizar la ubicación de este sitio). En el NCX existen 2 secuencias repetitivas conservadas en todos los miembros de la familia denominadas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , que poseen aproximadamente 40 aminoácidos (24) y que están ubicadas en lados opuestos de la membrana. La

región  $\alpha 1$  esta formada por una porción del sTM 2 y otra porción del sTM 3 y por el lazo que une a ambos. Mientras que la región  $\alpha 2$  esta formada por una porción del sTM 7 y una región continua a este dentro del citosol. Existe mucha evidencia que sugiere que las regiones repetitivas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  participan en la vía de translocación de los iones que el NCX1 transporta (25-29). Dentro del gran lazo citoplasmático del NCX1 hay 2 regiones, de 70 aa aproximadamente cada una, denominadas repeticiones  $\beta$  (24). Ambas regiones están conservadas dentro de la familia de los NCX. La función de ambas secuencias todavía no está aclarada. La primera de ellas,  $\beta 1$ , se encuentra superpuesta (entre los aa 407 y 478) con la región amino-terminal del sitio para la regulación por  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual es requerido para la unión de alta afinidad de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (30). La secuencia  $\beta 2$  se localiza en la región carboxilo-terminal del sitio de regulación por  $\text{Ca}^{2+}$  (entre los aa 539 y 613).

## Regulación

La función del NCX1 es regulada por una variedad de factores intra y extracelulares. En la tabla 1 se resumen factores que afectan de modo agudo la actividad del NCX de mamíferos.

Efecto	Músculo cardíaco
Activación del NCX1	$\text{Ca}^{2+}_i$ (sitio regulatorio) Activación de PKC ATP agentes redox
Inhibición del NCX1	$\text{Na}^+$ (Inactivación dependiente de $\text{Na}^+_i$ ) Protones ( $\downarrow\text{pH}$ ) XIP KB-R7943 $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{La}^{3+}$ , $\text{Cd}^{2+}$

**Tabla 1:** Moduladores de la actividad del NCX.

La actividad del NCX es estimulada por agonistas que activan la PLC como fenilefrina (FE), Angiotensina II (Ang II), Endotelina-1 (ET-1) y algunos factores de crecimiento en miocitos adultos y neonatales de rata (31-33), y en células transfectadas con NCX1 de perro (34). Los efectos de estos agonistas son reproducidos por los ésteres de forbol (1,31,33) o con el inhibidor de fosfatasa, el ácido ocadaico (31). Además estos efectos estimulatorios son bloqueados cuando se usan inhibidores de la proteína kinasa C (PKC) (33,35,36). En miocitos neonatales y en células transfectadas con NCX1, el NCX1 es fosforilado en un residuo específico de serina; esta fosforilación es abolida cuando se usan inhibidores de la PKC (31,33), tanto en condiciones basales como cuando las células son estimuladas (31,33). Sin embargo, esta fosforilación no es necesaria para la activación del NCX1 por PKC, ya que células que expresan un mutante de NCX1 (tienen mutado la serina por alanina) que no puede ser fosforilado presentan una activación normal por PKC (33).

Iwamoto y colaboradores demostraron que el lazo intracelular es fosforilado tanto por PKA como por PKC (31). También fue descrito que tanto en ovocitos de *Xenopus* expresando el NCX1 como en miocitos adultos de rata la fosforilación dependiente de PKA estimula la actividad del NCX1 (37). Además fue descrito que el NCX1 forma un complejo macromolecular con distintas kinasas, fosfatasa y proteínas de anclaje (38). Recientemente se ha descrito la unión de calcineurina (serina-treonina fosfatasa dependiente de  $Ca^{2+}$ ) a la región  $\beta 1$  del gran lazo intracelular del NCX (39). En miocitos ventriculares de ratas neonatales, hipertrofiadas por el tratamiento crónico con PE, se describió que el aumento de la asociación de calcineurina al NCX deprimió la actividad del NCX1 (39).

La actividad del NCX1 es regulada también por el ATP. Cuando los niveles de ATP intracelulares disminuyen en un 90% por el tratamiento con inhibidores metabólicos la actividad del NCX1 disminuye aproximadamente un 80 % (40). Deplecionar de ATP a células que expresan el NCX1 clonado también reduce la actividad del intercambiador (31,41). La depleción de ATP afecta múltiples aspectos del metabolismo celular, causando una disminución de la fosforilación de distintas proteínas o metabolitos activos como el PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-

bifosfato), alteración de la estructura del citoesqueleto e inducción de distintas respuestas por el stress (42). En células de ovario de hámster (CHO) que expresan NCX1 clonado los efectos de la depleción de ATP son mimetizados por la administración de citocalasina D, un agente que aumenta la despolimerización de los filamentos de actina (41). El NCX1 está unido a la ankirina, una proteína del citoesqueleto (43). Por lo tanto la depleción de ATP inhibiría la actividad del NCX por cambiar el anclado del intercambiador a la membrana. Varios investigadores han encontrado que concentraciones de ATP del orden milimolar activan marcadamente la corriente del NCX1 en patch gigantes de membrana de miocitos de cobayos o en ovocitos que expresan el NCX1 (44-46). Este efecto activador del ATP es mimetizado por la administración de PIP2 exógeno, aplicado en la superficie citoplasmática del patch, y es abolido cuando se usan anticuerpos antiPIP2 (44,47). De esta manera pareciera ser que el efecto activador del ATP sobre el NCX1 es debido a la formación del PIP2.

La actividad del NCX también es afectada por los iones que transporta ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ). Tanto el  $\text{Ca}^{2+}$  como el  $\text{Na}^+$  intracelular modulan la actividad del NCX1 (46,48-50). Ambos modos del intercambiador sólo son activos cuando se encuentra  $\text{Ca}^{2+}$  unido al sitio intracelular de alta afinidad localizado en la parte central del gran lazo intracelular (51,52). Aunque existe controversia acerca del valor de la constante de afinidad de este sitio ( $K_{1/2}$ ), este valor se encontraría entre 0.022 y 0.4  $\mu\text{M}$ .

En presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y de  $\text{Ca}^{2+}$  en el sitio regulatorio intracelular, altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  en la superficie citoplasmática activan rápidamente el transporte, seguido de una caída lenta hacia el estado estacionario (50). Este proceso se conoce como inactivación dependiente de  $\text{Na}^+$  (53). Y se sugirió que ocurre cuando el sitio de transporte está muy cargado con  $\text{Na}^+$  (50, 53). La inactivación dependiente de  $\text{Na}^+$  está influenciada por una gran variedad de factores: es aumentada cuando aumentan los niveles de  $\text{H}^+$  intracelulares (bajo  $\text{pH}_i$ ) (50,54) y atenuada por concentraciones micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$ , milimolares de ATP, o PIP2 (44, 46, 47). Esta inactivación está ausente cuando la superficie intracelular es digerida parcialmente con una enzima proteolítica (20); esto

sugeriría que el lazo intracelular está involucrado en esta inactivación. Además el tratamiento del NCX1 con distintos agentes redox (ditiotreitól y  $\text{FeSO}_3$ ) produce un aumento de la actividad (55). Estudios de Philipson y colaboradores han demostrado que estos agentes redox aumentan la actividad del NCX pues atenúan la inactivación dependiente de  $\text{Na}^+$  (56).

La actividad del NCX1 exhibe una pronunciada dependencia con el  $\text{pH}_i$ . A  $\text{pH}_i$  cercano a 6 no tiene prácticamente actividad llegando a una actividad casi máxima a  $\text{pH}_i$  cercano a 9 (54,57).

Goldhaber y colaboradores encontraron que los radicales libres derivados del oxígeno incrementan la actividad del NCX en miocitos ventriculares de conejos (58). El mecanismo mediante el cual los radicales libres incrementan la actividad del NCX todavía no está dilucidado. Más recientemente, Eigel y colaboradores demostraron que los radicales libres del oxígeno producidos durante la reoxigenación post-hipoxia reactivan al NCX (59).

Existen muchos cationes divalentes y trivalentes que funcionan como bloqueantes del NCX, como  $\text{La}^{3+}$  (60),  $\text{Ni}^{2+}$  (61,62) y  $\text{Cd}^{2+}$  (63,64).

Por otra parte, el KB-R7943 es un potente y selectivo inhibidor del NCX (65,66). Es una molécula anfifílica con un grupo isotiourea cargado positivamente a pH neutros. La acción inhibitoria es relativamente rápida y puede ser removida fácilmente salvo que hayan estado expuestas durante un período mayor a 5 minutos. Este bloqueante posee un efecto inhibitorio preferencial sobre el modo inverso del NCX (65-67), cuando es utilizado a concentraciones menores a  $5 \mu\text{M}$ .

## **Función**

La función primaria del NCX es la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en el corazón. Bajo condiciones fisiológicas e imaginando que los gradientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  permanecen constantes en el espacio subsarcolemal podemos estimar que el potencial de inversión del NCX ( $E_{\text{NCX}}$ , nivel de corriente cero) es aproximadamente  $-40\text{mV}$  donde:

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

$$E_{\text{Na}}: (RT/F) \ln\{[\text{Na}^+]_e/[\text{Na}^+]_i\}$$

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

$E_{\text{Na}}$  y  $E_{\text{Ca}}$  son respectivamente los potenciales de equilibrio para el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Ca}^{2+}$ , R la constante de los gases; T la temperatura absoluta (Kelvin) y F la constante de Faraday.  $[\text{Na}^+]_e$  y  $[\text{Na}^+]_i$  son las concentraciones extra e intracelulares de  $\text{Na}^+$  respectivamente y  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  son las concentraciones extra e intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  respectivamente. La fuerza impulsora (FI) está determinada por la diferencia que existe entre el potencial de membrana ( $V_m$ ) y el  $E_{\text{NCX}}$  ( $\text{FI} = V_m - E_{\text{NCX}}$ ). Cuando el  $V_m$  es igual al  $E_{\text{NCX}}$  no se registra corriente, pues la FI es igual a cero. Potenciales de membrana más negativos que el  $E_{\text{NCX}}$  favorecen el eflujo de  $\text{Ca}^{2+}$  y el simultáneo influjo de  $\text{Na}^+$  (modo directo o “forward”, corriente catiónica hacia adentro de la célula o “inward”) promoviendo la relajación celular. Por otra parte flujos opuestos de estos iones se producen a potenciales positivos al  $E_{\text{NCX}}$  (modo inverso o “reverse”, corriente catiónica hacia fuera de la célula o “outward”) promoviendo la contracción celular. Es importante aclarar que existe una amplia controversia sobre la contribución del modo inverso a la contractilidad basal (67-71) ya que durante el PA la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumenta impidiendo que se supere el potencial de inversión real y la operación de este modo. Sin embargo la mayoría de los estudios están de acuerdo en que bajo ciertas condiciones farmacológicas y/o patológicas el modo inverso contribuye con la contractilidad, como se describió para los efectos de Ang II (72) y ET-1 (73) y para la hipertrofia (8), la insuficiencia cardíaca (74,75) y la isquemia y reperfusión (76).

La implicancia fisiológica en el acoplamiento éxcito-contráctil (AEC) (ver más adelante las bases del AEC) del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  por el modo inverso del NCX en el músculo cardíaco es controvertida. La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS inducida por  $\text{Ca}^{2+}$



entrando por el NCX1 durante la despolarización del potencial de membrana es mucho menos eficiente que el  $\text{Ca}^{2+}$  entrando vía los canales tipo L (69,77). Sin embargo ambos mecanismos actuando simultáneamente parecen amplificar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por el retículo sarcoplasmático (68). En la insuficiencia cardíaca se encuentra aumentada la expresión del NCX como un mecanismo compensador para la defectuosa función del RS (74,75), y poder mantener la función contráctil. En esta y en otras condiciones patológicas como isquemia y reperfusión el aumento de  $\text{Na}^+$  intracelular favorece el influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  por el modo inverso y/o enlentece la salida de este catión por el modo directo del NCX produciendo una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , que conduce a la disfunción mecánica de los miocitos (76).

## **Angiotensina II, mecanismo autocrino/paracrino Angiotensina II-Endotelina**

Debido a que en el presente trabajo de tesis se estudió el efecto de la Ang II, de la ET-1 y de la interrelación entre ambos sobre el NCX se revisan a continuación características básicas de cada uno de los sistemas.

La Angiotensina II (Ang II) es el producto final del sistema renina-angiotensina (SRA). El SRA participa del control de la presión arterial por vía humoral y también está presente en el sistema nervioso central (78,79), en la pared de los vasos sanguíneos y en el músculo cardíaco (80). La renina es una enzima proteolítica liberada por las células yuxtglomerulares de la pared de la arteriola aferente del glomérulo renal en respuesta a una disminución en la presión arterial o a una depleción de  $\text{Na}^+$  con disminución del líquido extracelular (81). Cuando la renina es liberada al plasma actúa sobre el angiotensinógeno, que es producido principalmente en el hígado, liberando un dodecapéptido, la Angiotensina I. Luego la enzima convertidora de la Ang (ECA), presente principalmente en el pulmón y otros tejidos, cliva la Ang I produciendo un octapéptido, la Ang II. La Ang II que es el efector final del sistema, tiene una vida media corta (aproximadamente un minuto) pues es clivada por distintas peptidasas, presentes en la mayoría de los tejidos (81). La Ang II es un potente agente inotrópico positivo en diferentes especies animales (82-91).

Por estudios de unión (binding) se ha determinado la existencia de varios subtipos de receptores ( $R_c$ ) de Ang II en diferentes tejidos (92). En el corazón se han descrito 2 tipos de receptores para la Ang II, que son inhibibles por distintos fármacos, el receptor tipo 1, AT1, sensible al bloqueo con losartán (Los) (93) y el receptor tipo 2, AT2, capaz de ser inhibido por PD123177 (94). Ambos tipos de receptores se expresan en varias especies, como gato, rata, conejo, monos y humano (95,96). La distribución de los subtipos de receptores cambia de acuerdo a la especie y al tejido. En miocardio adulto de rata y de conejo aproximadamente el 50-70% del binding específico es AT1, la fracción remanente es AT2. (89,97-99). El miocardio de ventrículo bovino posee un 70% de AT1 y un 30% de AT2,

(96). Esta proporción puede modificarse en determinadas circunstancias, como en el caso de hipertrofia por sobrecarga de presión, en donde se observa una disminución de los AT1 (100). En lo que se refiere a la regulación del crecimiento celular ambos subtipos poseen acciones opuestas. La estimulación de los AT2 se opone al efecto inotrópico y cronotrópico positivo mediado por AT1 en el corazón de ratones adultos (101), a la hipertrofia por AT1 en miocitos de ventrículo de rata neonatales (102) y a la inducción de la síntesis proteica en corazones de ratas adultas (103). También ha sido demostrado que la estimulación de los AT2 media un efecto antiproliferativo, proapoptótico, diferenciación celular, disminución de la matriz celular en el corazón (104,105), producción de óxido nítrico (NO) y disminución del efecto cronotrópico en el corazón (106,107). La sobreexpresión de Rc AT2 en el corazón de ratones se atenúa el efecto presor y cronotrópico de la Ang II (101). El efecto inotrópico de la Ang II es bloqueado con losartán pero no con PD123177, indicando que el Rc involucrado en el efecto inotrópico positivo (EIP) es el AT1 (108,109). La mayoría de los efectos que influyen en el miocardio, incluyendo el EIP, vasoconstricción, secreción de aldosterona y vasopresina, expresión génica y síntesis proteica que conducen a la hipertrofia cardíaca, fibrosis post-infarto y remodelamiento vascular; son mediados por la activación de los Rc AT1 (110-114).

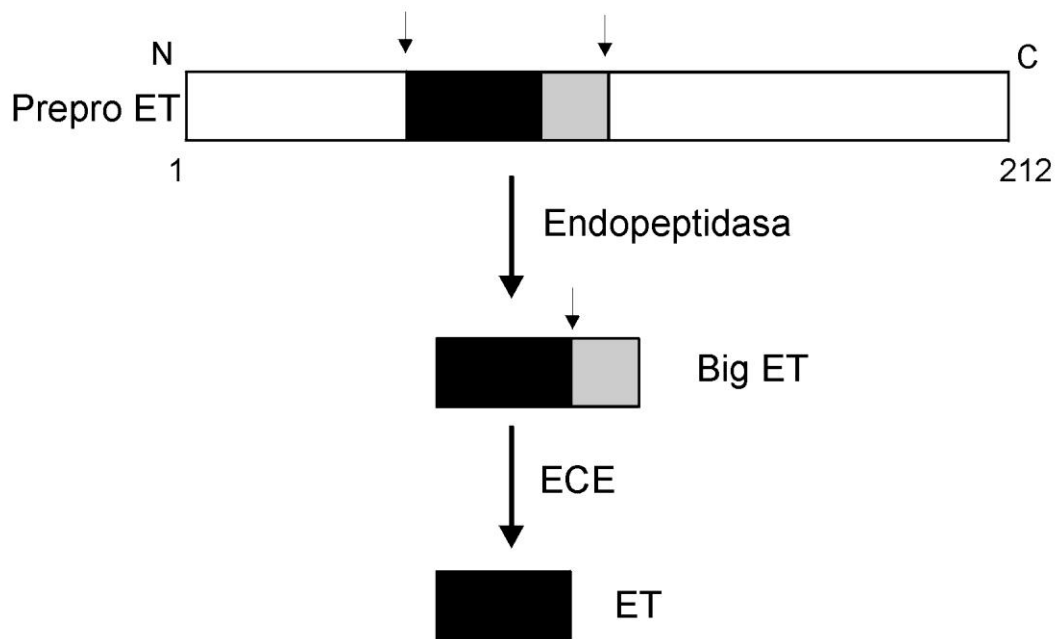
El Rc AT1 está compuesto por 359 aminoácidos, contiene 7 segmentos transmembrana y tiene un 30% de homología con el Rc AT2. Ambos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G tipo q (Gq) (115,116). Más adelante dentro de la introducción se pueden observar las características del funcionamiento de los receptores acoplados a proteína G.

La unión de Ang II con el Rc AT1 produce la disociación de la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gq y esta, traslocándose por la membrana produce la activación de la isoforma  $\beta$  de la fosfolipasa C, enzima que hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) de la membrana en inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), que difunde por el citoplasma, y diacilglicerol (DAG), que permanece en la membrana y activa a alguna de las isoformas de la proteína quinasa tipo C (PKC) (117,118). Estos segundos mensajeros, PKC e IP<sub>3</sub>, median la mayoría de los efectos de la Ang II

actuando sobre distintos blancos intracelulares. Sin embargo la cascada de señales de la Ang II no es tan simple ni lineal, sino que media también la activación de la vía JAK-STAT (Janus kinase-signal transducers and activators of transcription) y de la MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases), principalmente a través de PKC (119). Además, estudios recientes indican que la Ang II también activa fosfolipasa A2 (120) y la producción de NO (121).

La Endotelina-1 (ET-1) es un potente vasoconstrictor que fue originalmente aislada del medio de cultivo de células endoteliales de aorta de porcinos (122). Las Endotelinas (ET) forman una familia de péptidos compuestos por 21 aminoácidos que incluyen al menos 3 isoformas ET-1, ET-2, ET-3 derivadas de genes diferentes (123). La biosíntesis de las ETs, al igual que otras hormonas y transmisores, requiere de 2 pasos proteolíticos hasta llegar al péptido activo (en la figura 2 se resumen los pasos involucrados en la biosíntesis de la ET). Las endotelinas derivan de prehormonas polipeptídicas, preproendotelina (de unos 200 aminoácidos) que son clivadas por una proteasa similar a la furina (124,125) dando como producto a la big-ET (de 38 aminoácidos). Luego las big-ETs son clivadas por una metaloproteasa, llamada enzima convertidora de Endotelina (ECE) (figura 2). Hasta el momento han sido descritas tres isoenzimas: ECE-1, ECE-2 y ECE-3. ECE-1 es una proteína de membrana que existe en 4 isoformas diferentes derivadas de un mismo gen (ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c, ECE-1d) (126), que varían en la secuencia N-terminal y en el patrón de localización subcelular (127). El ARNm de la ECE-1 se encuentra en miocitos cardíacos humanos, células endoteliales e intersticiales aisladas de ventrículo. Así como ECE-1, la ECE-2 es más selectiva para big-ET-1 que para big-ET-2 y big-ET-3, pero esta última solo es activa a pH ácido y no es expresada en la membrana celular (128). La ECE-3 fue descrita como muy específica para Big-ET3 en microsomas de iris bovino (129).

## Introducción



**Figura 2:** *Procesamiento de la prepro-ET.*

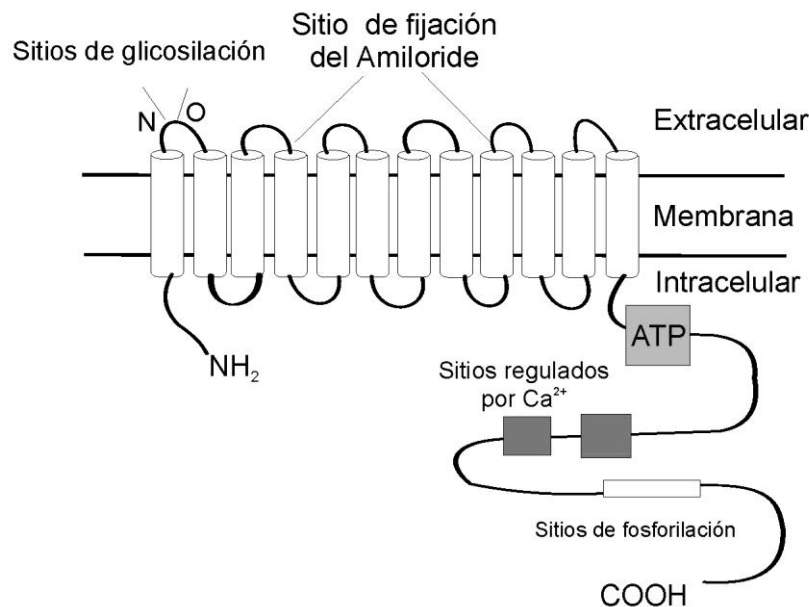
Han sido clonados e identificados 2 receptores específicos para las ETs,  $ET_A$  y  $ET_B$ . Ambos son miembros de la superfamilia de receptores asociados a proteína G. Poseen la clásica estructura de los Rc de esta familia, tienen 7 segmentos transmembrana separados por 3 loops intracelulares y 3 extracelulares, la porción amino terminal es extracelular y la porción carboxilo terminal intracelular. Los 2 tipos de Rc tienen un 50% de similitud, y la estructura está conservada en los distintos mamíferos. Ambos Rc son expresados en una gran cantidad de tejidos en distintas proporciones cada uno. Se expresan en riñón, células endoteliales, sistema nervioso, huesos, próstata, hígado, miocardio, ovario, glándula suprarrenal etc. Ambos tipos de Rc han sido identificados en el tejido cardíaco de una gran cantidad de especies (130,131). La afinidad de las distintas ET por los receptores es distinta. ET-1 es más potente que ET-3 sobre el Rc  $ET_A$ . Sin embargo ET-1 y ET-3 tienen la misma potencia sobre el Rc  $ET_B$ . ET-2 tiene una potencia similar a ET-1 sobre ambos receptores (132).

Las distintas isoformas de las ETs son producidas en una gran variedad de tejidos y células. La ET-1 es generada principalmente por las células endoteliales (123,133) pero también es producida en el corazón (cardiomiocitos), riñón, sistema nervioso central y células de músculo liso vascular (134). ET-2 es producida en riñón, intestino, placenta, miocardio y células endoteliales (135,136). ET-3 fue encontrada en grandes cantidades en cerebro y también se encuentra en el tracto gastrointestinal y en el corazón (137). Endoh y colaboradores encontraron que las tres isoformas producen un efecto inotrópico positivo en preparaciones multicelulares de miocardio, con igual eficacia y potencia (138). Cuando los efectos son estudiados en miocitos aislados, sin embargo, la ET-1 posee mayor eficacia y potencia que ET-3, a diferencia de lo observado en las preparaciones multicelulares (139).

Evidencias previas indican que ciertos efectos de la Ang II sobre el miocardio son debidos en realidad a la liberación de Endotelina (ET) endógena. Ito y coautores describieron en miocitos cardíacos neonatales de rata la inhibición de la hipertrofia inducida por la Ang II usando inhibidores del receptor  $ET_A$  (BQ 123) o con oligonucleótidos antisense (sentido contrario) contra ARNm de preproendotelina (140). Adicionalmente, el aumento de la presión arterial en rata inducido por la infusión de Ang II fue revertido por un bloqueante de  $ET_A$ , PD155080 (141), y por un bloqueante de  $ET_A/ET_B$ , Bosentan (142). Estudios de nuestro grupo de trabajo realizados en músculos papilares de gato demostraron la existencia de un mecanismo autocrino-paracrino en donde la activación del intercambiador  $Na^+/H^+$  (143), la estimulación del intercambiador  $Cl^-/HCO_3^- Na^+$  independiente (144) y la segunda fase del estiramiento cardíaco (145,146) se deben a la acción de ET endógena liberada por Ang II. Todavía no está claro si la ET es liberada por los miocitos o por otras células presentes en preparaciones multicelulares (fibroblastos, células endoteliales etc) (140,147,148).

## Intercambiador Sodio-Hidrógeno (NHE)

El pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ) regula muchos procesos celulares como el metabolismo, homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , expresión génica, movilidad y contractilidad celular, muerte celular, etc. En la mayoría de las células de mamíferos, incluidos los cardiomiocitos, el  $\text{pH}_i$  se mantiene entre 7.1-7.2. Para mantener este  $\text{pH}_i$  la célula posee varios mecanismos que participan en su regulación. Existen mecanismos acidificantes y alcalinizantes. Los mecanismos alcalinizantes aumentan el  $\text{pH}_i$  eliminando  $\text{H}^+$  o introduciendo  $\text{HCO}_3^-$ . Dentro de los alcalinizantes están el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) y el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ . Los mecanismos acidificantes disminuyen el  $\text{pH}_i$ , como el intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , que intercambia  $\text{Cl}^-$  extracelular por  $\text{HCO}_3^-$  intracelular y el intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{OH}^-$ , que intercambia  $\text{OH}^-$  intracelular por  $\text{Cl}^-$  extracelular (149). El mecanismo más difundido en todas las células para regular su pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ) es la expulsión de  $\text{H}^+$  en contra de su gradiente electroquímico a través del NHE el cual usa la energía potencial acumulada como gradiente de  $\text{Na}^+$ .



**Figura 3:** Esquema de la estructura del NHE-1.

Existen al menos 7 isoformas de este intercambiador con una estructura básicamente similar (Tabla 2). Debido a que la isoforma predominante en el miocardio es NHE-1 de ahora en más hablaremos exclusivamente de ella. Tiene un PM de 91 kDa, 12 dominos transmembrana y 2 sitios de glicosilación en los lazos extracelulares (figura 3). Tanto el extremo N-terminal como el C-terminal son citoplasmáticos (figura 3). En el extremo C-terminal del NHE-1 hay un sitio de unión a ATP, dos sitios de unión para calmodulina y varios residuos fosforilables que están involucrados en la regulación de la actividad del intercambiador frente a distintas hormonas y factores de crecimiento (figura 3). El transporte se activa cuando la célula recibe cargas ácidas y se detiene, aun cuando se mantenga una fuerza impulsora importante, cuando el  $pH_i$  llega a valores cercanos a 7,2 (“punto de ajuste” o set point, es el punto en el cual el flujo neto de protones es igual a cero).

Isoformas	Localización	Caracterización
NHE-1	Casi todas las células. Isoforma predominante en el corazón.	Mayor sensibilidad al amiloride y al cariporide (HOE643).
NHE-2	Tracto gastrointestinal	
NHE-3, NHE-4	Cerebro, útero y riñón	
NHE-5	Cerebro	
NHE-6	Todo tipo de células	Membrana mitocondrial
NHE-7	Todo tipo de células	Intracelular

**Tabla 2:** *Isoformas del NHE.*

Pierce y Philipson sugirieron que el NHE-1 se localiza en una fracción del sarcolema en el corazón de perro (150). Sin embargo, estudios más recientes utilizando inmunofluorescencia in situ y microscopía confocal, describieron que el NHE-1 está localizado preferentemente en los discos intercalares y los túbulos t, y que está ausente en el sarcolema lateral (151).

La actividad del NHE es regulada por distintos agonistas externos. Agonistas  $\alpha_1$  y  $\beta$  adrenérgicos, ET y Ang II regulan la actividad en células cardíacas aisladas (152,153). Estos agonistas activan el intercambio iónico pues modifican la sensibilidad al pH del intercambiador, desplazándose hacia valores más alcalinos.



La expresión del NHE se encuentra regulada durante el desarrollo cardíaco. El ARNm del NHE-1 es más abundante en neonatos que en adultos. También la actividad del intercambiador es mayor en miocitos cardíaco de ratas neonatales que en los adultos (151). Otros factores estimulan la expresión del NHE-1. Por ejemplo en conejos la sobrecarga de presión sobre el ventrículo luego de la constricción aórtica duplica los niveles basales comparados con los controles (154). En músculos papilares de gato aislados de ratas espontáneamente hipertensas (SHR), con una hipertrofia asociada a la hipertensión, se encuentra una mayor actividad del NHE comparada con ratas normotensas controles (155). Además Camilión de Hurtado y colaboradores encontraron que en ratas SHR el tratamiento crónico con inhibidores del NHE regresionan la hipertrofia cardíaca sin normalizar la presión arterial (156).

En experimentos previos de nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que el estiramiento de músculos papilares de animales adultos dispara un mecanismo autocrino-paracrino en donde la activación del NHE es un paso fundamental. La activación del NHE, es inducida por una cascada de eventos que incluye la liberación secuencial de Ang II y ET resultando en un incremento del sodio intracelular ( $\text{Na}^+_i$ ) sin cambios significativos del  $\text{pH}_i$ . El aumento de la concentración de sodio intracelular ( $[\text{Na}^+_i]$ ) favorece el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del modo inverso del NCX, produciendo un incremento de la contractilidad. Este aumento de la fuerza constituye la consecuencia mecánica del mecanismo paracrino/autocrino disparado por el estiramiento y es conocido como fase lenta de aumento de fuerza post-estiramiento o simplemente segunda fase de aumento de fuerza (146).

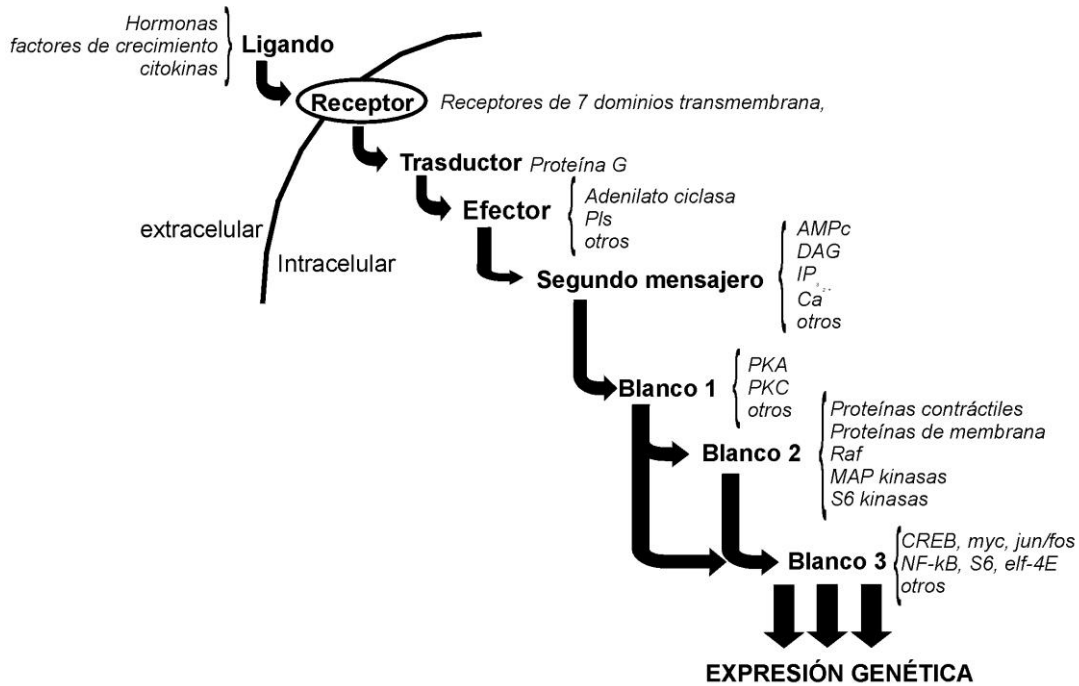
## Transducción de señales

Los mecanismos homeoestáticos que regulan la función del miocito cardíaco requieren, debido a la presencia de la membrana plasmática, de una comunicación entre el medio intra y extracelular. La transmisión de una señal involucra la interacción de una molécula (ligando) que se une específicamente con su receptor transmembrana, que generalmente es una proteína integral de membrana con dominios a ambos lados de la bicapa lipídica. El proceso mediante el cual una señal química extracelular produce algún cambio metabólico intracelular se denomina “transducción de señales” (157). Generalmente lo hacen mediante un sistema escalonado de reacciones (158). En la figura 4 se resumen los pasos de la cascada de eventos desde la activación del receptor hasta el efecto final. El receptor cuando es activado por su ligando genera una segunda señal (segundo mensajero) en el citosol de mayor amplitud a la señal extracelular original. El segundo mensajero puede a su vez activar una serie de proteínas o puede incrementar la cantidad de alguna molécula pequeña dentro de la célula que producirá el efecto final. Los puntos de control son en general de una molécula sobre la activación de la siguiente (“downstream”), pero las cascadas de señales pueden ramificarse o bifurcarse generando distintos productos de los cuales cada uno producirá otro compuesto diferente. Estos productos, a su vez, pueden interactuar entre sí y amplificar o inhibir reacciones dentro de la misma cascada o de otra (“cross-talk”); o pueden modular por retroalimentación (“upstream”) el efecto final (159).

Las intervenciones que modifican la respuesta inotrópica del miocardio, generalmente no afectan directamente a las proteínas contráctiles del miocito sino que inician sus acciones cuando se acoplan a receptores de membrana e inician una cascada de señales intracelulares que culminan en un efecto dado sobre la maquinaria contráctil.

Las cascadas de transducción de señales pueden clasificarse de acuerdo al tipo de receptor que les da inicio, siendo los receptores acoplados a proteína G y

los que poseen actividad quinasa en su dominio citosólico los de mayor importancia.

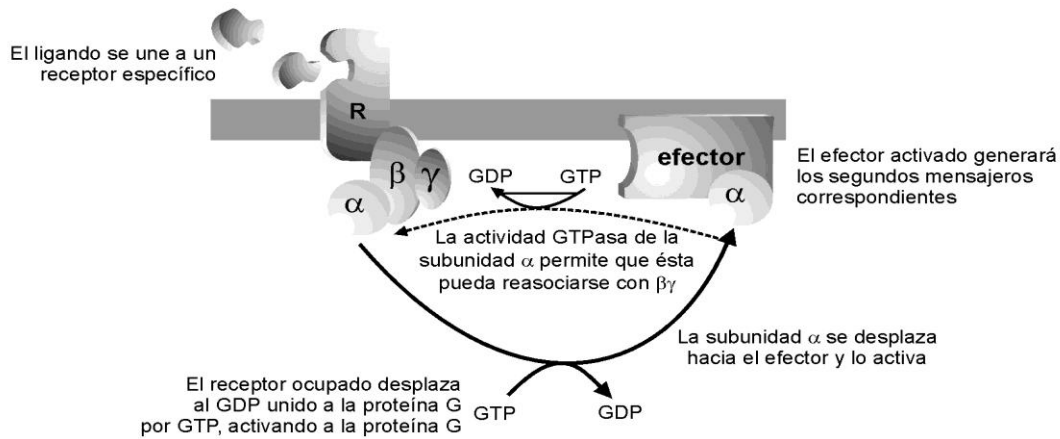


**Figura 4:** Esquema de las cascadas de transducción de señales. Los ligandos extracelulares se unen a sus receptores. Los receptores interactúan con una trasductor que interactúa con un efector. Los efectores activados generan segundos mensajeros que actúan sobre algún blanco.

Los receptores con actividad proteína quinasa se activan por unión de su ligando, lo que promueve una autofosforilación en el dominio citoplasmático. Esta fosforilación activa otras proteínas blanco dentro de la célula, las cuales se convierten en nuevos sustratos para otras reacciones enzimáticas. Los receptores con actividad proteína quinasa poseen actividad de tirosina quinasa o de serina/treonina quinasa. Los más comunes son los de tirosina quinasa como es el caso del receptor de Insulina o el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

Los receptores acoplados a proteína G, la cual recibe este nombre por la capacidad de fijar nucleótidos de guanina, están compuestos por tres

subunidades, alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gama ( $\gamma$ ). La subunidad  $\alpha$  tiene el sitio de unión para los nucleótidos de guanina y la actividad GTPasa. El heterotrímero está asociado inactivo al receptor en estado basal. Durante el estado inactivo una molécula de GDP se halla unida a la subunidad  $\alpha$ . Cuando es activado, por unión del ligando al receptor, la subunidad  $\alpha$  sufre un cambio conformacional que causa la liberación del GDP, la unión de GTP y la disociación del trímero. Por un lado queda un dímero  $\beta\gamma$  y por otro la subunidad  $\alpha$  unida a GTP. Ambas partes pueden actuar sobre proteínas blanco generalmente asociadas a la membrana plasmática. La vida media de la subunidad  $\alpha$  unida a GTP es baja debido a la actividad GTPasa que posee esta subunidad. Cuando el GTP es hidrolizado a GDP la subunidad  $\alpha$  vuelve a unirse al dímero  $\beta\gamma$  conformando nuevamente el trímero y reiniciando el ciclo. En la figura 5 se esquematiza el mecanismo de acción de un receptor acoplado a proteína G.



**Figura 5:** Mecanismo de acción de receptores acoplados a proteína G.

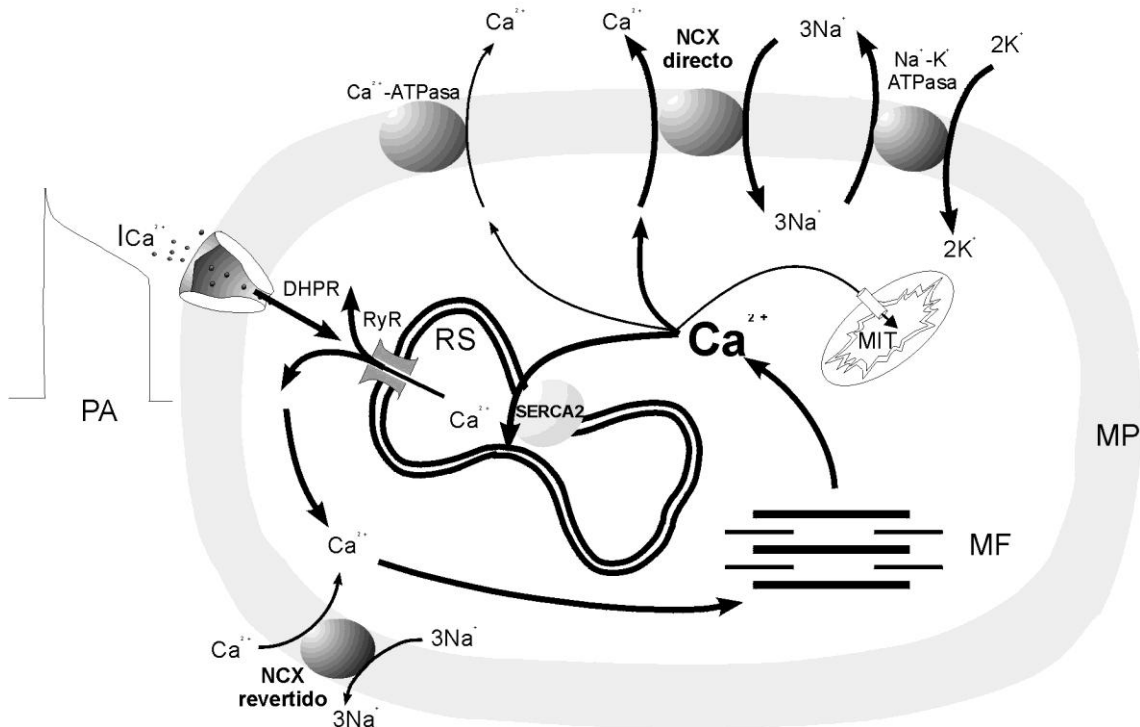
Existe una gran variedad de proteínas G que están acopladas a una gran cantidad de receptores. En la tabla 3 se muestran los tipos de proteínas G que fueron descritos hasta el momento con algún ejemplo de receptor acoplado a cada tipo de proteína G. En el presente trabajo de tesis se utilizaron agonistas cuyos receptores están acoplados a proteínas Gq, como Ang II y ET-1.

Proteína G	Función sobre el efector	Segundo mensajero	Ejemplo de receptor
s	+ adenilato ciclasa	↑ AMPc	β-adrenérgico (β <sub>1</sub> , β <sub>2</sub> )
i	- adenilato ciclasa Abre canales de K <sup>+</sup>	↓ AMPc ↑ potencial de membrana	Receptor para acetilcolina
o	Cierra canales de Ca <sup>+2</sup>	↓ potencial de membrana	M2 colinérgico
t	+ fosfodiesterasas del GMPc	↓ GMPc	Receptor para rodopsina
q	+ fosfolipasa C	↑ IP3 y DAG	AT1, ETA

**Tabla 3:** Clases de proteína G, sus efectores, segundos mensajeros y ejemplos que la activan. + estimulación, – inhibición, ↑ aumenta, ↓ disminuye, IP3 inositol 1,4,5- trifosfato, DAG diacilglicerol, AT1 receptor de Ang II tipo 1, ETA receptor de ET tipo A.

## Acoplamiento éxcito-contráctil

Se denomina acoplamiento éxcito-contráctil (AEC) al conjunto de procesos que comienzan con la despolarización de la membrana plasmática y terminan en la contracción muscular (160).



**Figura 6:** Esquema de los eventos que participan en el acoplamiento éxcito-contráctil. La corriente de  $Ca^{2+}$  que se genera durante el potencial de acción produce la entrada del ión por los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L o receptores de dihidropiridinas (DHPR). Esta entrada de  $Ca^{2+}$  produce una mayor liberación del mismo del RS a través de los canales de  $Ca^{2+}$  de éste o receptores de rianodina (RyR). El aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular produce la interacción de los miofilamentos, actina y miosina, produciendo así la contracción. Otro mecanismo que podría participar en el aumento del  $Ca^{2+}$  es el modo inverso del NCX. Los mecanismos que reducen el  $[Ca^{2+}]_i$  para relajar al miocitos son principalmente la SERCA2a y también el modo directo del NCX. (Modificado de Cingolani HE, Houssay AB y colaboradores. Fisiología Humana de Houssay. Sección I. Fisiología General (ed) El Ateneo 2000, pp 59-94, Buenos Aires)

Los procesos que comprende el AEC, como se esquematizan en la figura 6 son:

- 1- Entrada de  $Ca^{2+}$ .

- 2- Liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por calcio.
- 3- Contracción cardíaca
- 4- Relajación del miocardio.

### **1-Entrada de calcio:**

Cuando se aplica un estímulo de intensidad adecuada en la membrana del miocito se produce la apertura de canales rápidos de  $\text{Na}^+$ , entrada de  $\text{Na}^+$ , y cambio del potencial de membrana (161). Este cambio de potencial producido por la entrada de  $\text{Na}^+$  se propaga por toda la membrana y despolariza al miocito, provocando un potencial de acción (PA). El PA de miocitos ventriculares (cardíacos) presenta una meseta (fase 2 del PA) en donde el potencial de membrana permanece constante durante varios milisegundos, debido al balance de corrientes despolarizantes y repolarizantes. La principal corriente despolarizante de la meseta es la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ), a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L (por long lasting). Se sabe que las células cardíacas contienen al menos dos tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje (162,163). Por un lado están los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo T (rápidos), que por sus propiedades y distribución, se ha hipotetizado que participan de la actividad marcapaso del corazón (164), y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, que son los responsables de la mayoría del  $\text{Ca}^{2+}$  que entra en los miocitos a través del sarcolema durante la meseta del PA. Estos últimos se encuentran en todas las células cardíacas, son responsables de la corriente hacia adentro lenta, se activan a potenciales mayores de -40 mV generando un pico de corriente hacia adentro a 0 mV, aproximadamente, y se inactivan lentamente. Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L conducen  $\text{Ba}^{2+}$  mejor que  $\text{Ca}^{2+}$  y son bloqueados por compuestos orgánicos, como las dihidropiridinas y las fenilalquilaminas, e inorgánicos, como el  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  y  $\text{Mn}^{3+}$  (162,165). El ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales L durante la meseta del PA es lo que liga los acontecimientos eléctricos del PA con los mecánicos, debido a que produce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares (liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ ).

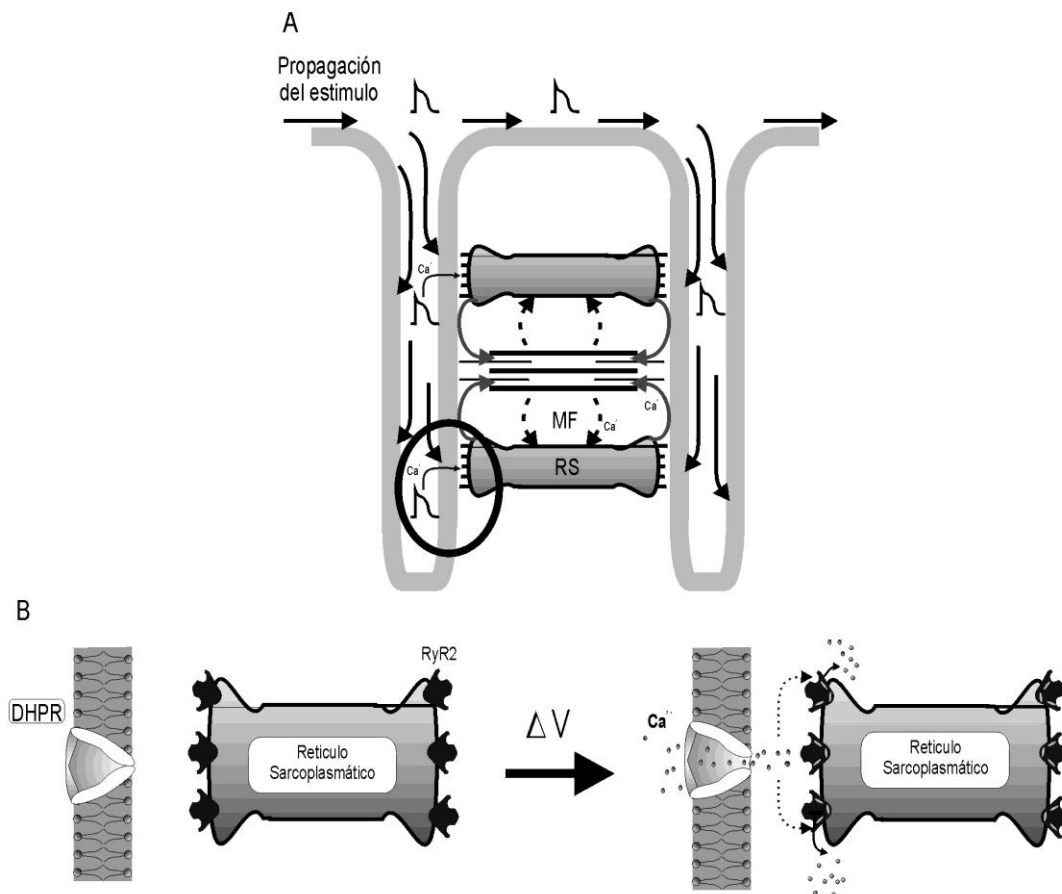
Como se observa en la figura 6, otra posible vía a través de la cual podría ingresar  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula durante el AEC, sería el NCX trabajando en el modo inverso (166) (al principio de la introducción fueron descritas las características estructurales y funcionales del NCX). El funcionamiento de este intercambiador, es determinado por las concentraciones intra y extracelulares de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y por el voltaje de la membrana celular (167) (se observa en la figura 2). A concentraciones diastólicas de  $\text{Ca}^{2+}$  el intercambiador actuaría extruyendo un ion  $\text{Ca}^{2+}$  por cada tres iones  $\text{Na}^+$  que entran en el miocito (168), modo directo. El potencial de inversión del NCX ( $E_{\text{NCX}}$ ), potencial en el cual cambia el modo de operación, es aproximadamente  $-40$  mV (64,168,169), por debajo de éste actúa en su modo directo sacando  $\text{Ca}^{2+}$  y metiendo  $\text{Na}^+$ , y por encima trabaja en modo inverso haciendo lo opuesto, aunque depende de las concentraciones intracelulares que alcance el  $\text{Na}^+$ . Teóricamente la despolarización abrupta de la membrana hacia el  $E_{\text{NCX}}$  podría producir una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta situación podría ser además potenciada por el aumento de la  $[\text{Na}^+]$  subsarcolemal causado por el influjo de  $\text{Na}^+$  a través de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes del voltaje. Como mencionamos previamente la contribución del NCX en el AEC y en la contracción de los miocitos en condiciones fisiológicas es discutida, sin embargo adquiere importancia en distintas condiciones en donde por ejemplo aumenta el  $\text{Na}^+$  intracelular.

## **2. Liberación de Ca inducida por Ca:**

En el músculo cardíaco el principal reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$  es el retículo sarcoplásmico (RS). En el RS se conocen 2 tipos de canales diferentes que liberan  $\text{Ca}^{2+}$ , llamados receptores de rianodina (RyR) (170-171) (tienen alta afinidad por el alcaloide rianodina) y receptores de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3R) (sensibles al IP3) (172-174).



## Introducción



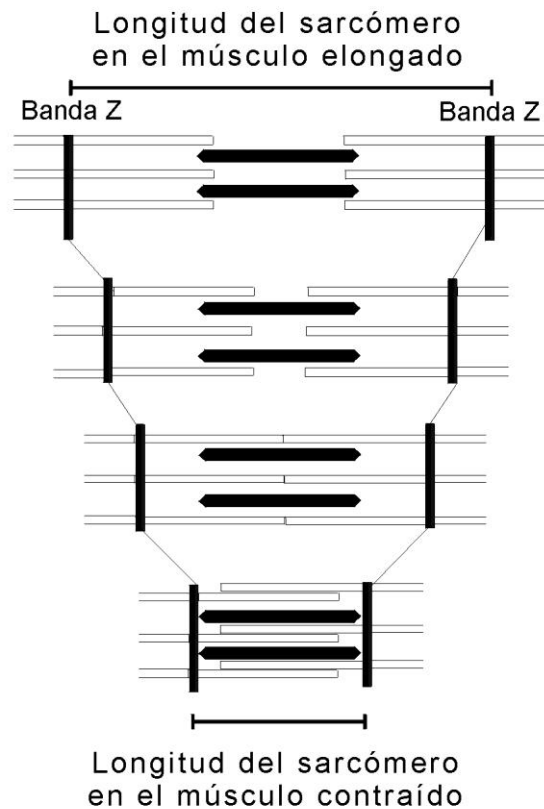
**Figura 7:** Esquema del fenómeno de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR). Panel A: AEC. Panel B: amplificación de la zona remarcada en A. Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L se encuentran próximos a los RyR. Los canales tipo L de  $\text{Ca}^{2+}$  se abren en respuesta al cambio del potencial de membrana ( $V$ ) y generan un pulso de  $\text{Ca}^{2+}$  que activa a los RyR. (Modificado de Cingolani HE, Houssay AB y colaboradores. Fisiología Humana de Houssay. Sección I. Fisiología General (ed) El Ateneo 2000, pp 59-94, Buenos Aires)

El RyR es más importante en el AEC cardíaco ya que la participación de IP3R en el AEC cardíaco es discutida. Los RyR están localizados en la vecindad de los canales tipo L. Luego de la despolarización y entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se produce un aumento local de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y activación de los RyR (175). En la figura 7 se esquematiza el CICR. La activación de un RyR o un pequeño grupo de estos produce elevaciones microscópicas de la concentración de calcio citoplasmática conocidas en inglés como “sparks” (chispas de Ca). La sumación

espacial y temporal de varios de estos sparks produce el aumento transitorio de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, conocida como transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$ .

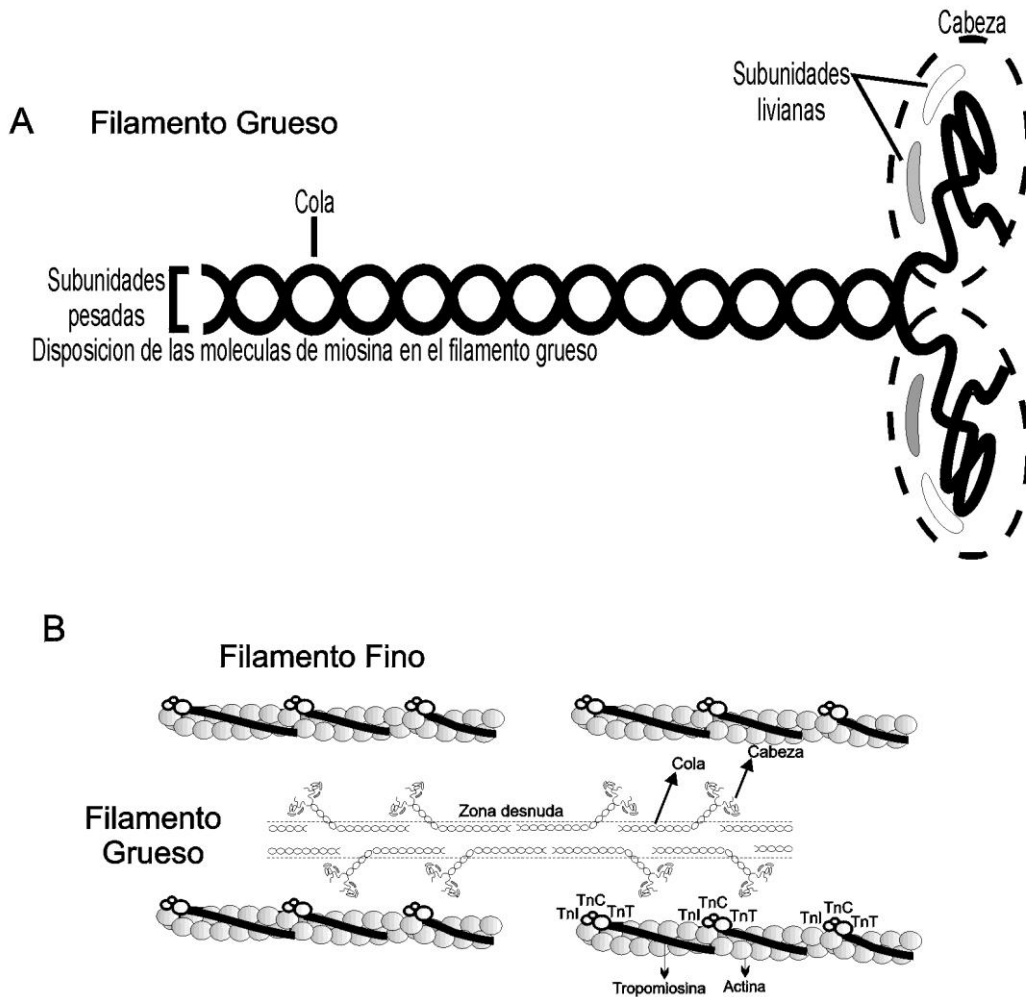
### 3. Contracción cardíaca:

Luego de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de RS, el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico aumenta desde aproximadamente un valor de  $10^{-7}$  M a  $10^{-6}$  M, o sea 100 veces su valor en reposo. Este incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inicia distintos procesos que culminan en la contracción del miocardio debido a la fijación de este ión a las proteínas contráctiles.



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

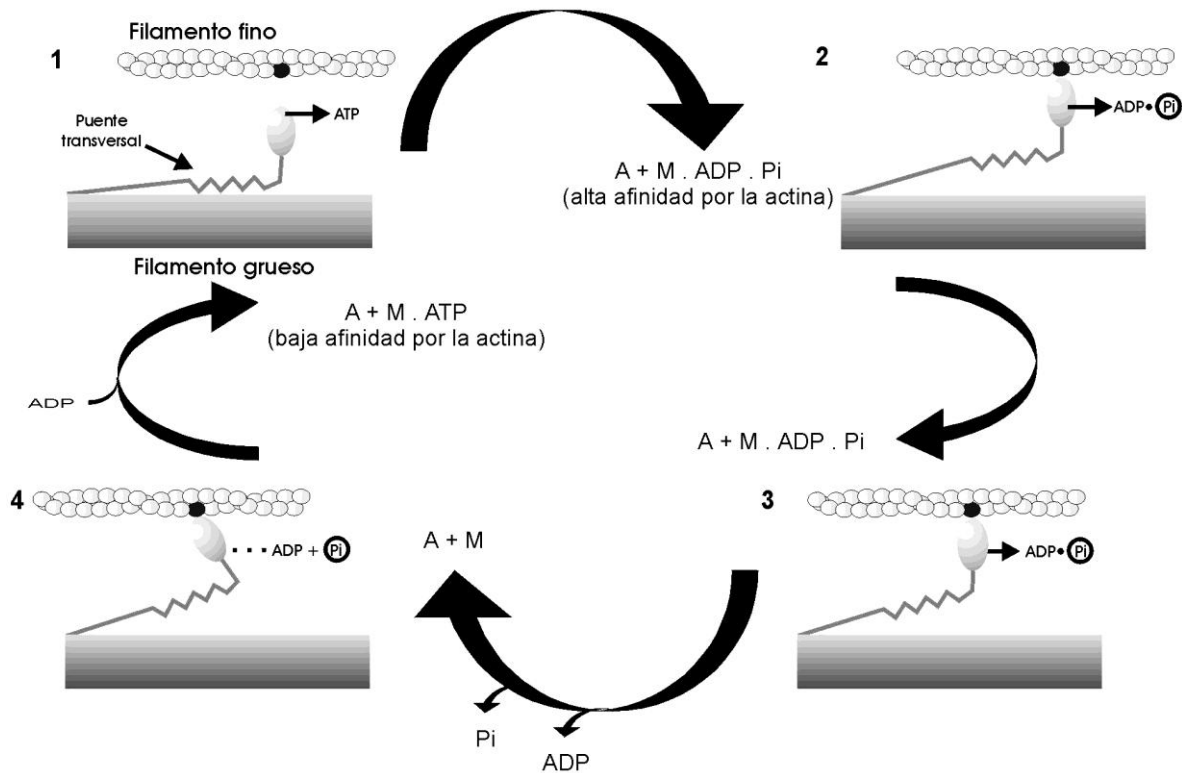
La unidad contráctil del músculo se denomina sarcómero y está limitada por 2 líneas Z (figura 8) (176,177). Cada sarcómero es un conjunto interdigitado de filamentos finos y gruesos. Cada filamento grueso tiene una longitud aproximada de 1.55  $\mu\text{m}$  y está compuesto por una proteína llamada miosina.



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

La miosina tiene forma de bastoncito y posee una cola que está orientada hacia el centro del filamento y una cabeza globular flexible que se orienta hacia fuera. La cabeza es la base molecular de puente cruzado debido a la actividad ATPasa que posee. Los filamentos finos tienen una longitud aproximada de  $1\ \mu\text{m}$  y se extienden de la línea Z hasta el centro del sarcómero. Están compuestos en su mayoría por una proteína denominada actina y por otras proteínas regulatorias, la troponina y la tropomiosina (176,178). Los monómeros de actina se ordenan formando el filamento fino. La actina puede interactuar con la miosina y activar la actividad ATPasa de la cabeza de ésta. La tropomiosina es una molécula delgada y larga que se extiende en todo el filamento fino. Cada molécula de tropomiosina se extiende sobre 7 de actina. La troponina esta formada por tres componentes, la troponina T (TnT), la I (TnI) y la C (TnC). El conjunto de estas tres se denomina complejo troponínico. La TnT es la que une el complejo con la Tropomiosina, la TnI junto con la tropomiosina inhibe la unión de la actina con la miosina, y la TnC se une al  $\text{Ca}^{2+}$  (176,178,179). Además de las proteínas contráctiles y regulatorias mencionadas, que son las principales en el proceso de contracción, existen otras proteínas asociadas al sarcómero que contribuyen al mantenimiento de la estructura. En la figura 9 se esquematiza la estructura de los filamentos.

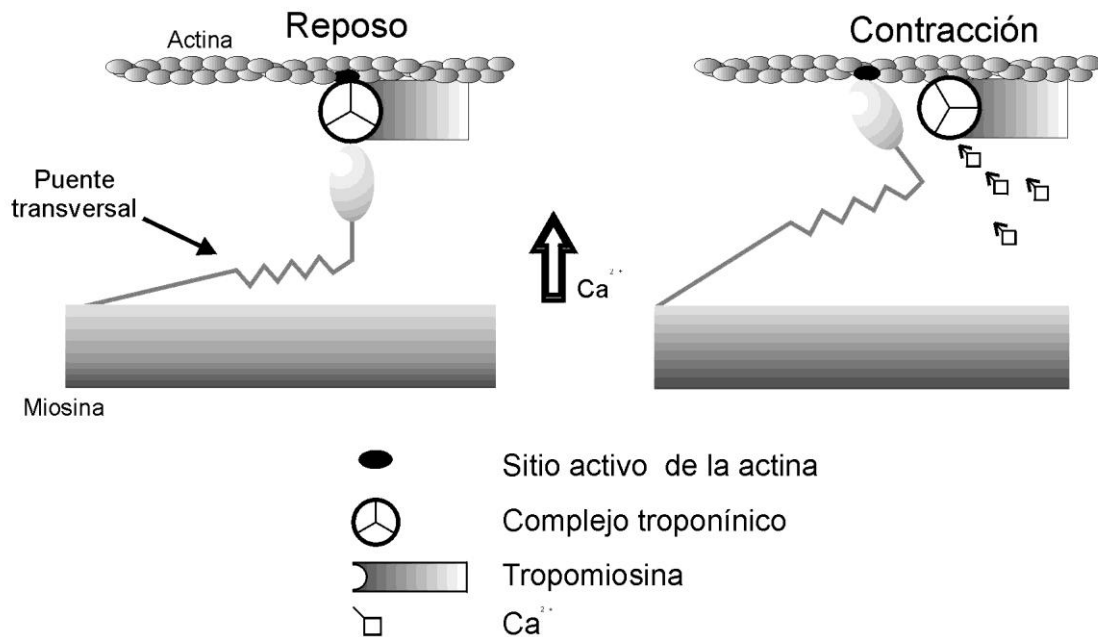
## Introducción



**Figura 10:** *Procesos bioquímicos durante un ciclo de contracción.* El puente transversal se une al filamento fino girando sobre sí mismo y generando tensión tracciona del filamento fino, que se desliza sobre el grueso; luego la cabeza de miosina se libera para volver a fijarse en otro punto del filamento de actina, y así sucesivamente. Los puentes transversales de las mitades opuestas del sarcómero giran en direcciones opuestas y de esta forma acercan cada mitad del sarcómero al centro. La energía para la contracción proviene de la hidrólisis de ATP en ADP y Pi. El ATP se une a la cabeza de miosina inhibiendo la unión de esta con la actina (1). La baja actividad ATPasa de la miosina hace que el ATP sea desdoblado lentamente en ADP y Pi formando un complejo intermedio, miosina-ADP-Pi (2). Este complejo es capaz de unirse a la actina formando el complejo activo, actina-miosina-ADP-Pi (3). Esta nueva interacción formada promueve la actividad ATPasa de la miosina haciendo que se libere el fosfato de alta energía del ATP, determinando un cambio en la posición del puente transversal y el deslizamiento del filamento fino sobre el grueso (4). De esta manera la energía química es transformada en mecánica. El nuevo estado (4) se conoce como complejo de rigor y permanece así hasta que una nueva molécula de ATP se une a la cabeza de miosina. (Modificado de Cingolani HE, Houssay AB y colaboradores. Fisiología Humana de Houssay. Sección I. Fisiología General (ed) El Ateneo 2000, pp 59-94, Buenos Aires).

Según la teoría del deslizamiento de los filamentos el acortamiento del músculo estriado se produce debido al deslizamiento de los filamentos finos sobre

los gruesos hacia el centro del sarcómero provocando que cada uno de los sarcómeros se acorte sin que se modifique la longitud de los filamentos. La base molecular de la contracción muscular es debida a la interacción cíclica de la actina con las cabezas de miosina (puentes cruzados) asociada a la hidrólisis de ATP (176,179) (figura 10). El deslizamiento de los filamentos y su consecuencia, la contracción muscular, están regulados por la troponina y la tropomiosina. Estas 2 proteínas actúan como inhibidores naturales de la interacción actina y miosina.



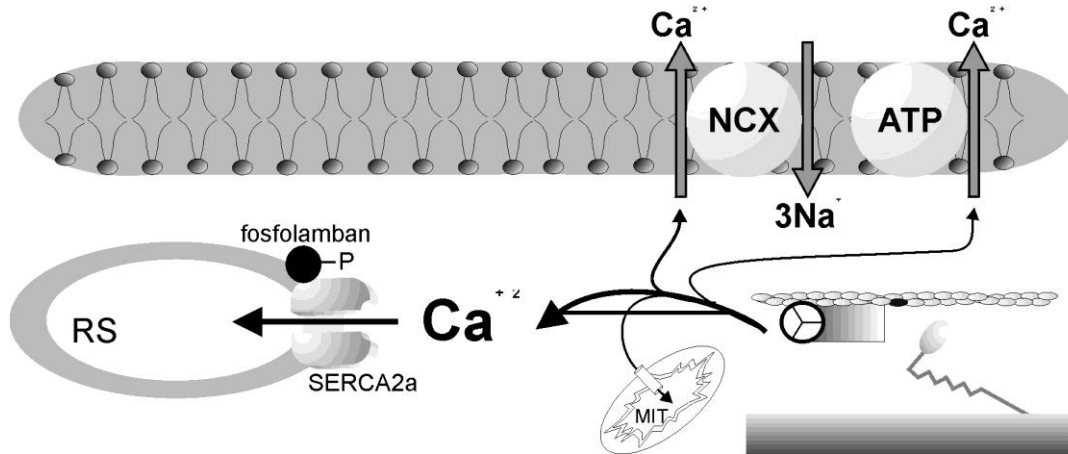
**Figura 11:** Regulación de la contracción por  $Ca^{2+}$ . En reposo la Tm y el complejo troponínico bloquean el sitio activo de la actina. Al incrementarse la  $[Ca^{2+}]_i$ , luego de la despolarización, este ión se une a la Tn C y produce el corrimiento del complejo Tm y Tn, liberando el sitio activo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

Para que desaparezca la inhibición y se inicie la contracción es necesaria la presencia de  $Ca^{2+}$ . Cuando la concentración de  $Ca^{2+}$  es baja, en el músculo en reposo, el complejo tropomiosina-troponina bloquea la interacción entre los filamentos ya que cubren el sitio activo de la actina. Cuando aumenta la  $[Ca^{2+}]_i$  se revierte la inhibición preexistente y se desencadena la contracción muscular

(figura 11). El  $\text{Ca}^{2+}$  se une a la TnC y produce un cambio en el complejo tropomiosina-troponina que hace que se libere el bloqueo del sitio activo de la actina y de esta forma puedan interactuar la actina y la miosina, esta interacción produce la activación de la actividad ATPasa de la miosina, lo que produce la hidrólisis del ATP y la liberación del fosfato de alta energía ( $\text{P}_i$ ) del ATP. Esta liberación provoca una unión fuerte entre la actina y la miosina, provocando el deslizamiento del filamento fino sobre el grueso.

#### **4. Relajación del miocardio:**

Para que el músculo se relaje es necesario que baje la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Cuatro sistemas están involucrados en la disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, la proporción en que cada uno de ellos contribuye varía según la especie y las condiciones fisiopatológicas. El principal responsable de la relajación muscular es el RS ya que posee en la membrana una proteína Ca-ATPasa denominada SERCA2a (sarcoplasmic-endoplasmic-reticulum calcium ATPasa). La SERCA produce el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol hacia el RS, retoma de  $\text{Ca}^{2+}$ , a una velocidad suficiente como para producir la relajación. La capacidad de transporte de la SERCA está regulada por medio de la fosforilación de una proteína, fosfolamban, que se encuentra unida a ella. Cuando la fosfolamban está desfosforilada se fija a la SERCA2a e inhibe el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que cuando está fosforilada libera la inhibición produciéndose la retoma de  $\text{Ca}^{2+}$  (180,181).



**Figura12:** Representación esquemática de las vías de salida del  $\text{Ca}^{2+}$ . Luego de la contracción el complejo troponina-tropomiosina libera el  $\text{Ca}^{2+}$ . La disminución de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se produce principalmente a través de la SERCA2a, cuya inhibición preexistente se revierte cuando fosfolamban se fosforila. Otros mecanismos que participan en la relajación son el modo directo del NCX, la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del sarcolema y el transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial.

Otros de los mecanismos involucrados en la relajación muscular, pero con menor importancia, son el NCX, actuando en el modo directo, la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa de la membrana celular y el transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (182). En especies en donde el RS es menos importante tienen más peso estos últimos mecanismos. Por ejemplo en el sapo, que carece de RS y de SERCA2a, la relajación del miocardio es mayoritariamente responsabilidad del modo directo del NCX (183).



## Objetivos

## Objetivos

El presente estudio está dirigido a estudiar la modulación del NCX por la vía autocrina Ang II/ET a través del registro de la corriente generada por este intercambiador ( $I_{NCX}$ ). Esto se realizará en miocitos cardíacos de ventrículo de gato utilizando la técnica de patch-clamp. Se medirá el acortamiento celular mediante un detector de bordes en forma simultánea con el registro de la  $I_{NCX}$ . Estudiaremos los efectos de la Ang II y la ET-1 sobre la contractilidad basal de miocitos aislados intactos midiendo el acortamiento de los sarcómeros mediante una video-cámara asociada a un software específico. Estudiaremos también la influencia de la activación del NHE por la vía Ang II/ET sobre los efectos de esta vía sobre la  $I_{NCX}$  y la contractilidad. La  $I_{NCX}$  y la contractilidad se determinará en presencia y ausencia de KB-R7943 (un bloqueante específico del modo inverso del NCX), de TAK044 (bloqueante de receptores de ET) y de HOE642 (bloqueante del NHE).

En el presente estudio se intenta responder los siguientes interrogantes:

1) ¿Cuál es la fuente secretora de ET luego de la acción de la Ang II observada en las preparaciones multicelulares previamente empleadas por nuestro grupo de trabajo? ¿Son los miocitos, las células endoteliales o los fibroblastos? Al utilizar miocitos aislados y bloqueantes de los receptores de estas hormonas, intentaremos responder a esta pregunta en el presente proyecto. Si los bloqueantes de los receptores de ET son capaces de inhibir la respuesta a la Ang II sabremos si la ET es producida por el propio miocito (acción autocrina).

2) ¿Está el modo inverso del NCX implicado en el aumento de la contractilidad producido por la vía Ang II/ET? El registro de  $I_{NCX}$  outward en simultáneo con la medida de acortamiento celular en presencia de Ang II nos permitirá evaluar esta posibilidad. Además, el rol fisiológico de este mecanismo se determinará registrando la contractilidad basal en miocitos intactos expuestos a Ang II en presencia y ausencia de bloqueo de los receptores de ET y de inhibidores del NHE y del modo inverso del NCX.

3) ¿Es  $I_{NCX}$  outward estimulada directamente por la ET liberada por la Ang II o es estimulada por un aumento del  $[Na^+]_i$  por activación del NHE o es estimulada por ambas? El registro de  $I_{NCX}$  outward en presencia de un bloqueante del NHE será importante para contestar esta pregunta. Para evaluar la influencia de la activación del NHE por la vía Ang II/ET sobre el NCX se determinarán los efectos del HOE642 sobre el  $E_{NCX}$  y la  $I_{NCX}$ . Si ET-1 negativiza el  $E_{NCX}$  y este efecto es bloqueado por el HOE642, podremos sugerir que el desplazamiento negativo del  $E_{NCX}$  es debido al aumento del  $[Na^+]_i$  producido por la activación del NHE. Por otra parte si el HOE642 anula totalmente el aumento de  $I_{NCX}$  outward significará que todo el efecto de la vía Ang II/ET sobre este transportador es debida a la activación del NHE. Si en cambio el HOE642 disminuye pero no cancela este efecto significará que ambos mecanismos, el indirecto (activación del NHE) y el directo (activación per se del NCX) están involucrados.

4) ¿Actúan los bloqueantes de los receptores de ET de manera selectiva, sin interferir sobre los receptores de Ang II? Para responder esta pregunta se seguirán dos caminos: 1) se utilizarán dos bloqueantes de los receptores de ET estructuralmente diferentes (TAK044 y PD142,893) y 2) se determinará el efecto del TAK044 sobre el efecto activador de la Ang II sobre la corriente de  $Ca^{2+}$  tipo L ( $I_{Ca}$ ). Nosotros demostramos recientemente que la Ang II aumenta  $I_{Ca}$  cuando los registros se realizan en patch-perforado o en whole-cell sin amortiguación del  $Ca^{2+}$  intracelular (184), mientras que la ET-1 solamente activa  $I_{Ca}$  en patch-perforado (185). Estos resultados indican que el aumento de  $I_{Ca}$  observados en whole-cell no pueden ser debidos a los efectos de la ET-1 endógena. Si encontramos que TAK044 no afecta el aumento de  $I_{Ca}$  producido por la Ang II significará que este antagonista de los receptores de ET no interfiere con los receptores de Ang II.

## Métodos

## Métodos

### Aislamiento de miocitos

#### Soluciones utilizadas en el aislamiento de las células:

- Solución Krebs-Henseleit (K-H): Composición (mM): 146.2 ClNa, 4.7 ClK, 10.0 ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 0.35 PO<sub>4</sub>NaH<sub>2</sub>, 1.05 SO<sub>4</sub>Mg, 10.0 glucosa, ajustada a pH 7.4 con NaOH.
- Solución Krebs-Henseleit con Calcio (K-H + Ca): Sc K-H + CaCl<sub>2</sub> 1.35 mM.
- Solución Krebs-Henseleit libre de Calcio (K-H s/Ca): Sc K-H + EGTA 0.1 mM.
- Solución de digestión (SD): Sc. K-H más el agregado de 0.61 mg/ml de colagenasa tipo II (160 U/ml), 0.07 mg/ml de proteasa, 0.4 mg/ml de suero de albúmina bovina (BSA) y 40 μM CaCl<sub>2</sub>.

Se realizaron experimentos en miocitos de gato enzimáticamente aislados con una técnica que se utiliza de rutina en nuestro laboratorio (186,187). Gatos adultos fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (35 mg/Kg peso). El corazón sujeto por la aorta a través de una cánula, fue extraído rápidamente, para evitar la isquemia, y colocado en un sistema de perfusión tipo Langendorff. Se perfundió retrógradamente a 37°C y a presión de perfusión constante (70-80 mmHg) durante 7 minutos para lavarle la sangre y estabilizarlo, con una solución K-H + Ca. La solución fue continuamente burbujeada con O<sub>2</sub> al 100%. Durante esta etapa de estabilización el corazón siguió latiendo espontáneamente. Seguidamente fue perfundido con la misma solución pero ahora libre de Ca<sup>2+</sup> durante 5 minutos. Este procedimiento es muy importante para facilitar la separación de los miocitos, ya que la integridad de los discos intercalares depende del Ca<sup>2+</sup> y ha sido descrito que bajos niveles del ion reducen la adherencia entre las células (188). Posteriormente se hizo recircular por 7-12 minutos con la solución de digestión. Durante la perfusión con las enzimas, el Cl<sub>2</sub>Ca se agrega porque el Ca<sup>2+</sup> actúa como un cofactor activando a

las enzimas, por lo tanto el agregado gradual de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  permite regular la actividad enzimática (189). La perfusión continuó hasta que el corazón presentó flaccidez (15-25 min), momento en que fue removido del aparato de perfusión cortándolo a nivel de la unión atrio-ventricular. Los miocitos aislados se separaron del tejido no digerido y se lavaron varias veces con la solución K-H conteniendo 1% de BSA y 0.5 mM de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ . El tejido ventricular no digerido fue cortado y dissociado con pinzas. Dicho tejido se incubó durante 3-5 min a  $37^\circ$ , agitándolo lentamente en una atmósfera de  $\text{O}_2$  en la misma solución con enzimas (solución de digestión). Luego de este procedimiento, los miocitos desagregados fueron separados del tejido sin digerir a través de una tela de nylon (con poros de  $300\ \mu\text{m}$ ), y colocados en un tubo de centrifuga con el doble de volumen de tejido de una solución de K-H con 0.2 mM de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ . Se centrifugaron por 1 minuto a velocidad lenta (aproximadamente 1000 rpm). Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en una solución de K-H con 0.5 mM de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ . Al tejido remanente del nylon sin digerir, se lo incubó en el agitador como se describió antes. Este proceso se repitió tantas veces como fuese necesario para digerir la mayor cantidad de tejido. Luego de cada lavado, las células fueron dejadas sedimentar durante 10 minutos, y en cada resuspensión se fue incrementando paulatinamente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular hasta alcanzar una concentración final de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular de 1.35 mM. La recalcificación lenta y escalonada tiene por objetivo minimizar los efectos adversos de la “paradoja del  $\text{Ca}^{2+}$ ” (190,191), es decir evitar el deterioro que se produce cuando se recalcifica luego de un período de perfusión libre de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los miocitos aislados suspendidos en solución K-H + Ca fueron mantenidos a temperatura ambiente ( $20\text{-}22^\circ\text{C}$ ) hasta su utilización.

Para la realización de los experimentos descritos se utilizaron solamente aquellos miocitos con forma alargada, estriaciones claramente diferenciables y con evidente respuesta de acortamiento y relajación al ser estimulados.

## REGISTRO DE CORRIENTES IÓNICAS EN MIOCITOS AISLADOS

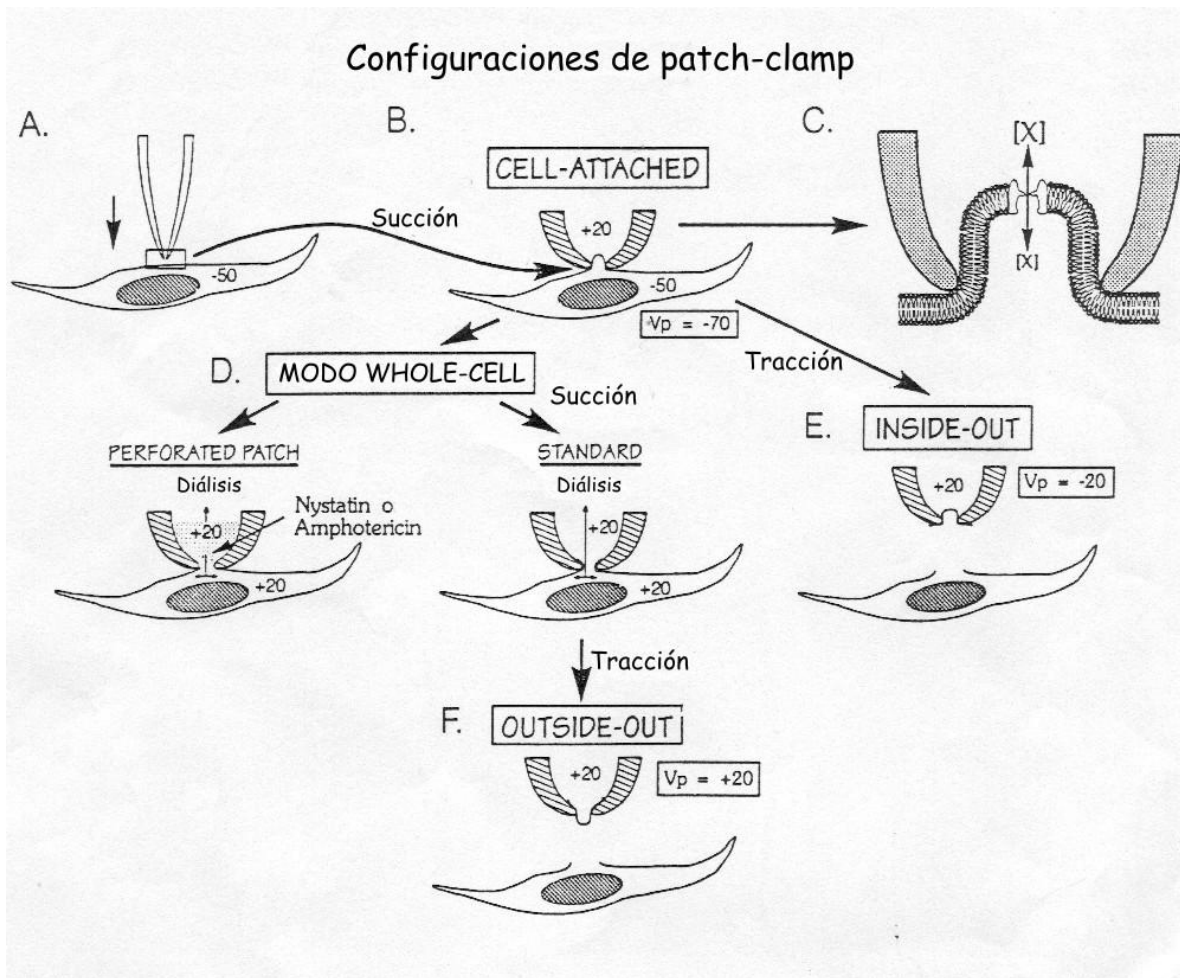
### Técnica de patch-clamp. Consideraciones generales

La técnica de “patch-clamp” (PC) fue descrita por Hamill y colaboradores (192). Diez años más tarde (1991) del trabajo original, dos de los autores Sakman y Neher fueron galardonados con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina por el desarrollo de esta técnica. A continuación se describirá brevemente la técnica. Mediante esta técnica pueden registrarse corrientes o potenciales de membrana. Hay 2 métodos que pueden utilizarse: método del potencial controlado (VC del inglés voltage-clamp) y método de corriente controlada (CC del inglés current-clamp). Según la ley de Ohm ( $V=RI$ ) el potencial de membrana es directamente proporcional a la corriente a través de la membrana. La constante de proporcionalidad es la resistencia ( $R$ ), la cual depende de la conductancia ( $C=1/R$ ) de los canales de la membrana. En el método de VC una diferencia de potencial a través de la membrana es mantenida con un circuito retroalimentador utilizando amplificadores diferenciales rápidos y de bajo ruido eléctrico. Simultáneamente se registra la corriente a través de la membrana.

Existen distintas configuraciones en las cuales puede usarse el PC, de acuerdo a lo que se quiera medir será la que se elige (193). En la figura 13 se resumen los pasos para obtener las distintas configuraciones de la técnica de PC. Una pipeta conteniendo una apropiada solución filtrada en contacto directo con un alambre de plata/cloruro de plata ( $Ag/ClAg$ ) conectado a un amplificador de PC, es aproximada a la superficie celular (vista bajo alta resolución óptica, 400X) con la ayuda de un micromanipulador (Figura 13 A). Una vez que se toca la membrana de la célula se aplica una débil presión negativa de aire a través de una jeringa conectada al sostén de la pipeta (Figura 13 B). Se monitorea el sello eléctrico mediante la aplicación de pulsos de voltaje repetitivos (5-20 mV de amplitud) a través de la pipeta a la vez que es registrada la corriente. Antes de tocar la membrana la corriente es una medida directa de la resistencia de la pipeta

definida por la ley de Ohm y es del orden de 1-10 megaohms (1-10 MΩ). Cuando la pipeta toca la célula la resistencia al flujo de la corriente aumenta, una vez que fue aplicada la presión negativa llega a ser del orden de  $10^9 \Omega$  o 1 GΩ (giga-sello). Con el uso de microscopia de alta resolución se determinó que cuando se forma el giga-sello la membrana se invagina en el interior de la pipeta formando una semiesfera (figura 13 C), esta configuración se llama “cell-attached” (CA). En la configuración CA no hay acceso al interior celular, conservándose intacto el medio intracelular. La solución del interior de la pipeta está en contacto con la cara externa de la membrana celular. El pequeño sector de la membrana (patch), y los canales que en el se encuentran, rodeado por la pipeta, están aislados eléctricamente, por lo cual puede registrarse la corriente de los canales contenidos en el patch (corrientes de canal unitario o “single channels”). La configuración CA es el paso obligado para lograr cualquiera de las otras. Debido a la gran estabilidad de la interacción membrana-pipeta en el giga-sello, es posible separar el patch de membrana del resto de la célula, manteniendo intacto el sello, simplemente levantando la pipeta con el micromanipulador. Esta manipulación permite que el interior del patch (lado citoplásmico) enfrente a la solución externa, dándole el nombre de “inside-out” (IO) a la configuración obtenida (figura 13E).





**Figura 13:** Configuraciones de la técnica de patch-clamp.

La suma de las aperturas de todos los canales de la membrana celular da como resultado las corrientes macroscópicas que se observan bajo la configuración de whole-cell (WC) de PC. Existen dos variantes de esta última: “Standard WC” y “perforated patch” (figura 13 D).

a- “Standard WC”: a partir de la configuración de CA se aplica una mayor presión negativa a través de pipeta lo cual rompe el sector de membrana por debajo de la misma y permite la conexión eléctrica entre el electrodo y el interior celular. Al romperse la membrana permite el intercambio del medio citoplasmático y la solución de pipeta, alcanzándose el equilibrio en cuestión de segundos debido al gran volumen de la pipeta comparado con el volumen celular. Cuando esto ocurre obtenemos lo que conoce como “acceso”. El acceso a la célula se pone en

evidencia por la aparición de las espigas capacitativas en respuesta al repetitivo pulso de voltaje (20-50 mV) aplicado a la pipeta. Estas espigas reflejan la carga y descarga de la membrana que actúa como un capacitor. Cuando se integra el área bajo la espiga representa la capacitancia celular y es un índice directo de la superficie total de la célula pues incluye evaginaciones e invaginaciones (y túbulos t en el caso de los miocitos cardíacos) las cuales no se resuelven con el microscopio óptico. La capacitancia de las membranas celulares es del orden de  $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ . Esta configuración también puede ser utilizada para medir voltaje clampeando la corriente (modo “current-clamp”), pudiéndose medir potenciales de acción y potencial de membrana en reposo.

b- “Perforated Patch”: En este método se utiliza Nystatina o gramicidina en la solución de pipeta. Estos fármacos difunden lentamente formando poros permeables en la membrana a iones monovalentes y moléculas cargadas menores a 8 nm. De esta manera se produce contacto de baja resistencia con el medio intracelular, con una mínima difusión de sustancias citoplasmáticas hacia la pipeta. Con esta configuración pueden registrarse corrientes macroscópicas y potenciales sin modificar demasiado el medio intracelular.

Por último, la técnica de PC permite registrar corrientes a través de canales unitarios en la configuración “outside-out” (OO) (figura 13 F). Es la más difícil de obtener y tiene muy poca estabilidad. Se obtiene levantando la pipeta luego de estar en la configuración de standard whole-cell. Al hacer tracción se rompe la membrana y se vuelve a sellar formando un patch con el lado externo de la membrana enfrentando la solución de perfusión.

### **Medida de la corriente del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$**

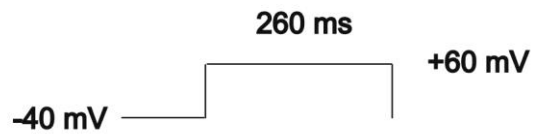
Los miocitos aislados fueron diluidos y ubicados en una cámara de perfusión y bañados con solución externa a una velocidad de flujo constante de 1.5 ml/min. Las corrientes de membrana se registraron en la configuración de whole-cell de la técnica de patch-clamp en el modo voltage-clamp (192) utilizando un amplificador (Axopatch 200 A, Axon Instruments, Foster City, Calif.). Las pipetas para patch

fueron construidas con un estirador de pipetas PP-83 (Narishige, Tokyo, Japan) y pulidas a fuego con una Microforja MF-83 (Narishige) hasta alcanzar una resistencia final de 1-3 M $\Omega$  al ser llenadas con solución de pipeta. La punta de la pipeta fue ubicada sobre la célula, y su potencial se neutralizó. Las corrientes de whole-cell (filtradas a 1 kHz) fueron registradas digitalmente y almacenadas en el disco duro mediante un convertidor analógico-digital (Digidata 1200, Axon Instruments) en interfase con una computadora IBM compatible con el software pClamp y Axotape (Axon Instruments). El análisis de los datos fue realizado con pClamp (Clampfit, Axon Instruments).

La solución externa contiene (en mM): 140 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucosa, 5 HEPES, pH 7.4 con Tris base. Esta solución también contiene (en  $\mu$ M): 10 Nifedipina, 100 ácido-2,2'-disulfónico-4-acetamido-4'-isotiocianato-stillbeno (SITS) y 0.5 ouabaína para bloquear respectivamente las corrientes de Ca<sup>+2</sup> tipo L, de Cl<sup>-</sup> y de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa. Los bloqueantes de NCX KB-R7943 y Ni<sup>+2</sup> (NiCl<sub>2</sub>) se adicionaron en la solución externa en algunos experimentos. La solución interna contenía (mM): 20 NaCl, 110 CsCl, 0.4 MgCl<sub>2</sub>, 1.75 CaCl<sub>2</sub>, 5 glucosa, 10 HEPES, 5 MgATP, 20 Cloruro de Tetraetilamonio (TEA) y 5 BAPTA, el pH se ajustó en 7.2 con Tris base. Con 5 mM de BAPTA y 1.75 mM de Ca<sup>+2</sup> se obtiene una concentración Ca<sup>+2</sup> ([Ca<sup>+2</sup>]) libre en el medio intracelular de 200 nM (calculada utilizando el programa Maxchelator, D. Bers, Loyola University, Chicago, III). El potencial de junta líquida (-2.3 mV) no fue corregido.

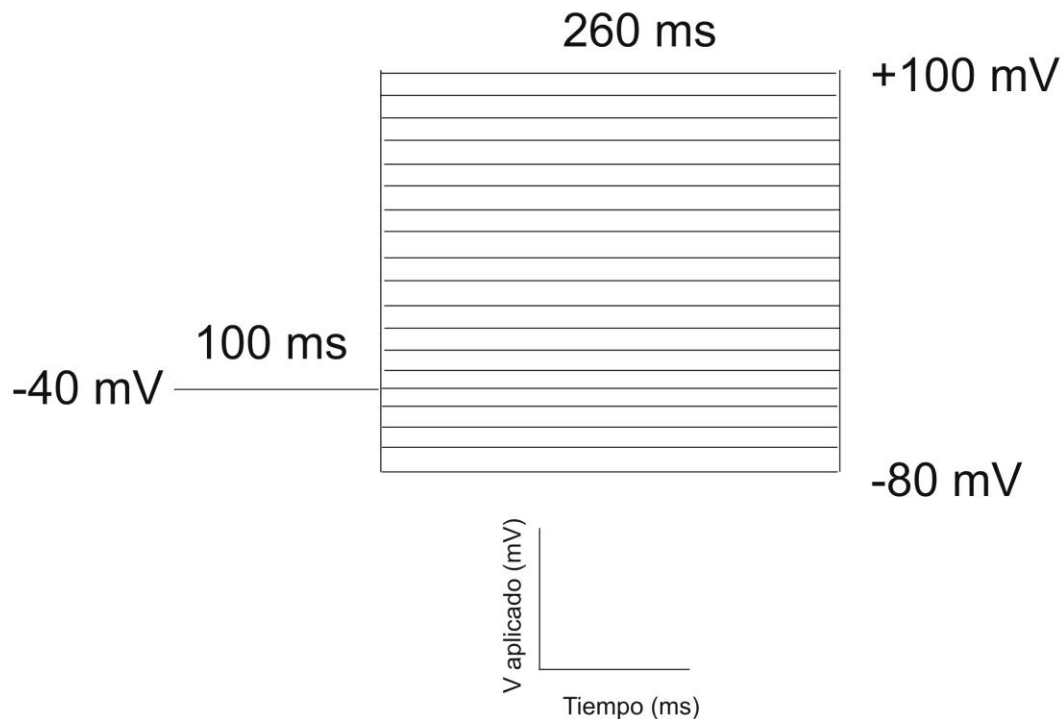
Para medir I<sub>NCX</sub> se utilizaron 3 tipos de protocolos:

1. **Protocolo de pulso de voltaje a + 60 mV.** Para obtener la corriente de membrana se utilizaron pulsos despolarizantes (de 260 ms de duración) a +60 mV cada 10 s y desde un potencial de membrana sostenido de -40 mV. Bajo nuestras condiciones, a +60mV, la mayor parte de la corriente registrada debiera ser la corriente del modo inverso del NCX. Luego de obtener las corrientes controles y con distintas intervenciones se mide la corriente obtenida al final del pulso (figura 14).



**Figura 14:** *Protocolo de pulso de voltaje a +60 mV.* Esquema del pulso despolarizante a +60 mV.

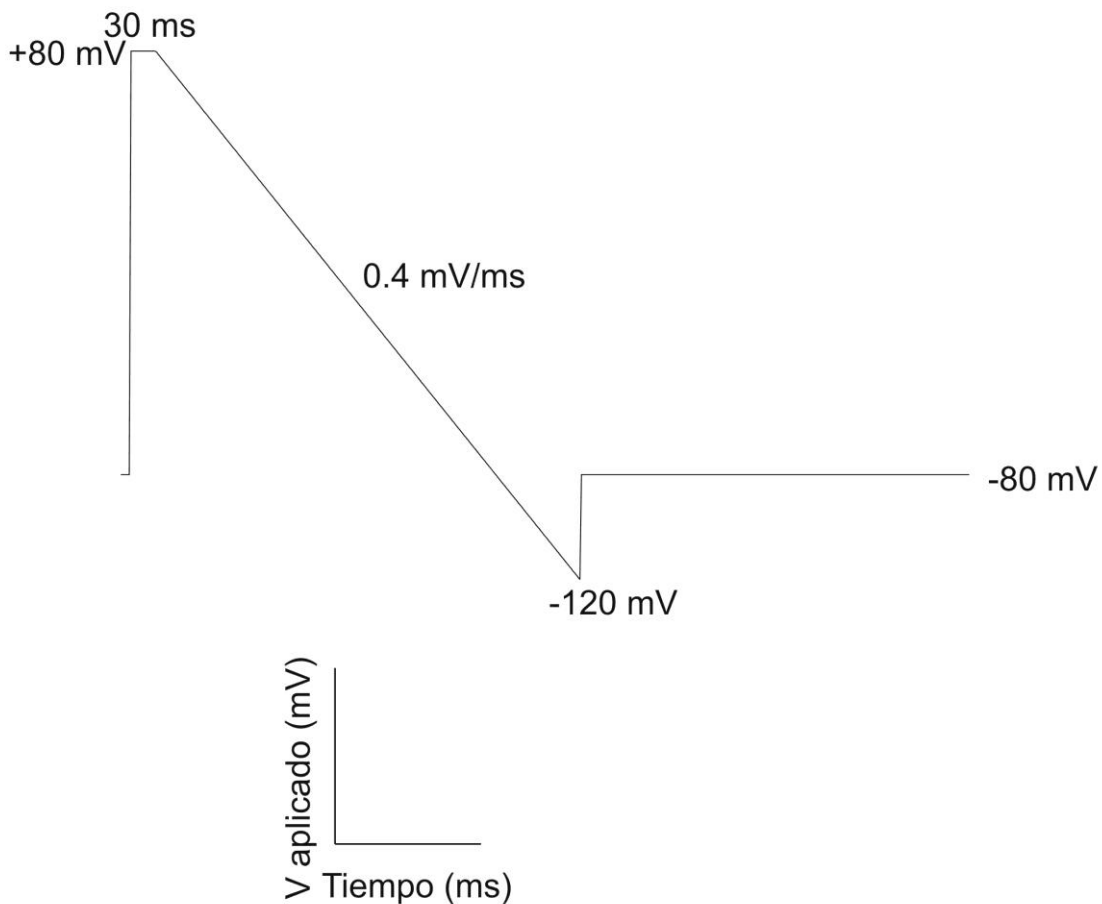
2. **Protocolos de pulsos de voltaje.** Se utilizaron pulsos despolarizantes (de 260 ms de duración y aplicados cada 10 segundos) entre -80 y +80 mV o +100 mV en incrementos de 10 mV desde un potencial sostenido de -40 mV para provocar las corrientes de membrana (figura 15).



**Figura 15:** *Protocolo de pulsos de voltaje.* Esquema de los pulsos de voltaje despolarizantes aplicados para obtener las corrientes de membrana.

Utilizando este protocolo se pueden obtener las curvas de corriente en función del voltaje. Para ello se debe medir las corrientes al final del pulso en cada potencial y utilizando el programa de análisis, pClamp (Clampfit, Axon Instruments), graficar la corriente en las ordenadas y el voltaje en las abscisas.

3. **Protocolos de rampas de voltaje.** Las corrientes de membrana fueron obtenidas aplicando rampas descendentes despolarizantes desde +80 mV a -120 mV ( $dV/dt = 0.4$  mV/ms), desde un potencial de membrana sostenido de -80 mV (figura 16).



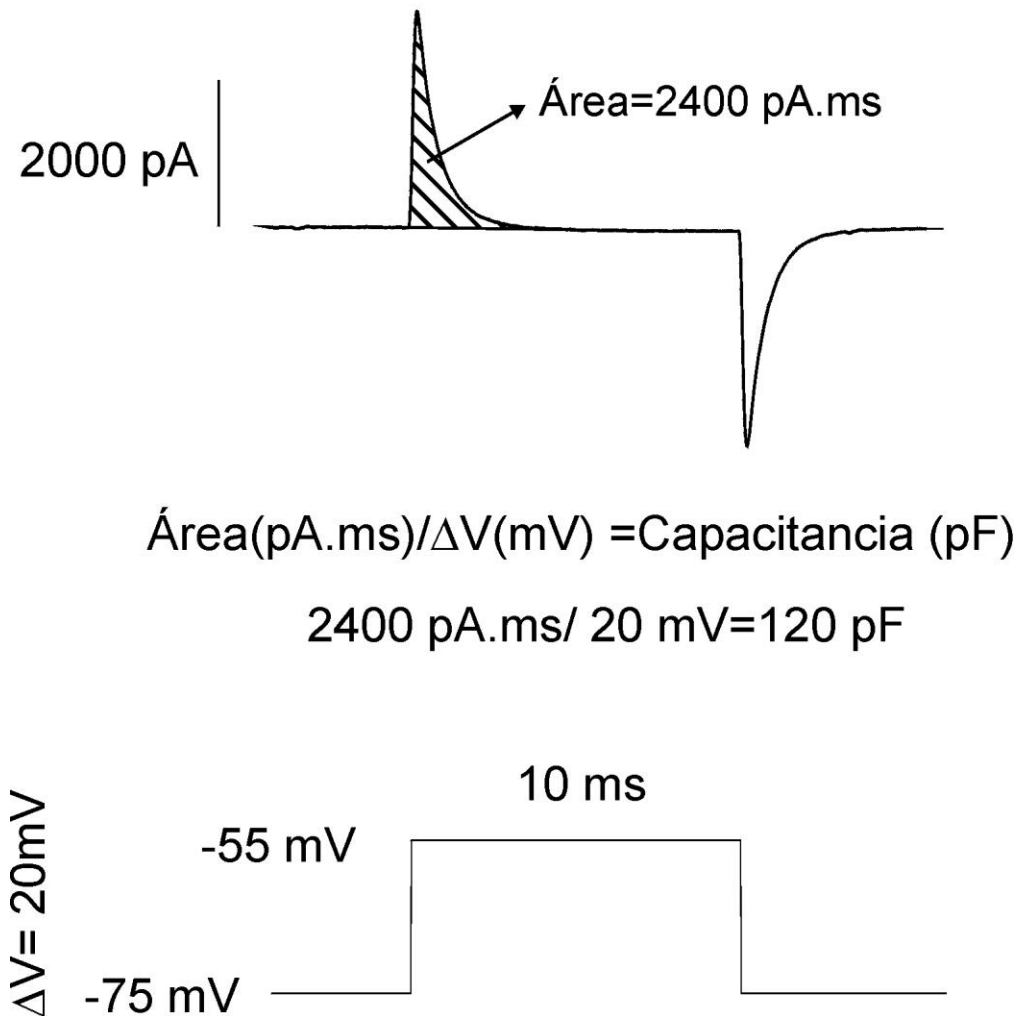
**Figura 16:** Protocolo de rampa de voltaje. Esquema mostrando el protocolo despolarizante en forma de rampa descendente.

Antes de la rampa descendente el potencial de membrana se mantuvo en +80 mV durante 30 ms con el fin de eliminar corrientes capacitativas contaminantes no compensadas. El intervalo entre pulsos fue 10 segundos.

En todos los casos al final de cada intervención se agregó alguno de los bloqueantes del NCX (KB-R7943 o  $\text{Ni}^{2+}$ ). El componente inhibible por KB-R7943 o  $\text{Ni}^{2+}$  representa la corriente generada por el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (para obtener la corriente sensible a KB-R7943 o  $\text{Ni}^{2+}$  se hace la resta entre la corriente obtenida con cada intervención y la observada con cada uno de los bloqueantes).

Se midió en cada célula la capacitancia de la membrana y fue utilizada luego para normalizar las corrientes. Para medir la capacitancia se debe tener acceso a la célula, el que se pone en evidencia por la aparición de las espigas capacitativas en respuesta al repetitivo pulso de voltaje (20 mV) aplicado a la pipeta en la configuración de WC. En la figura 17 se observan las espigas que reflejan la carga y descarga de la membrana, que actúa como un capacitor en respuesta al estímulo aplicado de 20 mV (desde -75 mV a -55 mV, figura 17 parte superior) durante 10 ms. Se integra el área bajo la espiga (área rayada figura 17) y se divide por la diferencia de voltaje aplicada, obteniéndose de este modo la capacitancia. Haciendo el cociente entre la corriente obtenida a cada voltaje y la capacitancia se obtiene la densidad de corriente.

La capacitancia promedio de los miocitos cardíacos de gato utilizados en el presente estudio fue  $129 \pm 6$  pF ( $n=105$ ).



**Figura 17:** Esquema de las corrientes capacitativas. En el panel superior se observan las espigas de carga de descarga de la membrana celular provocadas por el protocolo de voltaje esquematizado en el panel inferior. El área sombreada es la utilizada para calcular la capacitancia. En la parte media se muestra un ejemplo de calculo de la capacitancia celular.

Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente o a 30°C. Para registrar la corrientes a 30°C se utilizó un sistema que controla la temperatura

(TC2, Cell micro controls) de la cámara en donde están ubicadas las células y un sistema que calienta las soluciones antes de perfundir las células.

## **Medida del Acortamiento celular y de la longitud del sarcómero.**

### **Registro del acortamiento celular**

La longitud de reposo y el acortamiento celular (AC) fueron medidos simultáneamente con las corrientes iónicas, usando un detector de movimientos de bordes controlado por vídeo (Crescent Electronics, Salt Lake City, Utah). Los datos fueron almacenados para su posterior análisis.

### **Determinación de la longitud de sarcómero**

Las células fueron colocadas sobre una cámara de perfusión sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon). Se las perfundió continuamente a una velocidad de 1 ml/min con una solución que contenía: (en mM): 5 KCl, 118 NaCl, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 0.8 Cl<sub>2</sub>Mg, 1.35 Cl<sub>2</sub>Ca, 10 glucosa, 20 NaHCO<sub>3</sub>, el pH es ajustado en 7.4 burbujeando permanentemente con una mezcla gaseosa de CO<sub>2</sub> 5% y O<sub>2</sub> 95%. Los miocitos se estimularon por campo con dos electrodos de platino colocados a cada lado de la cámara de perfusión a una frecuencia de 0.5 Hz.

La longitud de sarcómero fue registrada utilizando un software específico (Ion Wizard). Mediante una cámara acoplada a un microscopio se observan las células y se selecciona una zona en la región media del miocito, en la cual se mide longitud de los sarcómeros. El programa determina la longitud de sarcómero más frecuente, y por lo tanto más representativa, que se observa dentro de la zona elegida. Esta imagen digitalizada del miocito es analizada on-line con una transformada de Fourier (Ion Optix).

Antes de cada intervención se esperó a que las células estén estabilizadas. Aproximadamente a los 15 minutos tenían la longitud de sarcómero en un valor estable.



La longitud de sarcómero fue medida a 30°C utilizando un sistema que controla la temperatura (TC2, Cell micro controls).

### **Materiales**

La colagenasa tipo 2 fue comprada a Worthington Biochemical Corp. Lakewood, N.J; la proteasa, la seroalbúmina bovina (BSA) esencialmente libre de ácidos grasos, la Ang II, la ET-1, el Bapta, el ATP, el SITS, la nifedipina a Sigma Chemical Co St. Louis, MO. El KB-R7943 fue adquirido en Tocris Cookson, Ellisville, MO, USA. El TAK044 se adquirió en Takeda Pharmaceutical CO, Osaka, Japón. El HOE642 fue comprado a Aventis Sanofi Pharma, Alemania. El Cl<sub>2</sub>Ni se compró a Carlo Erba farmitalia Spa., Italia. El Losartán, se adquirió a Merck & Co., Inc, EEUU.

### **Análisis estadístico**

Los datos se presentan como media  $\pm$  Error Standard (ES). El análisis estadístico utilizado dependió del protocolo experimental. Las comparaciones fueron hechas por test de t de Student para muestras apareadas, cuando se comparó el efecto de un tratamiento con respecto al control, o independientes, cuando se compararon dos grupos diferentes.

Para comparar 2 o más intervenciones sobre una misma célula se usó ANOVA de una vía para muestras apareadas seguido de un test de Student-Newman-Keuls.

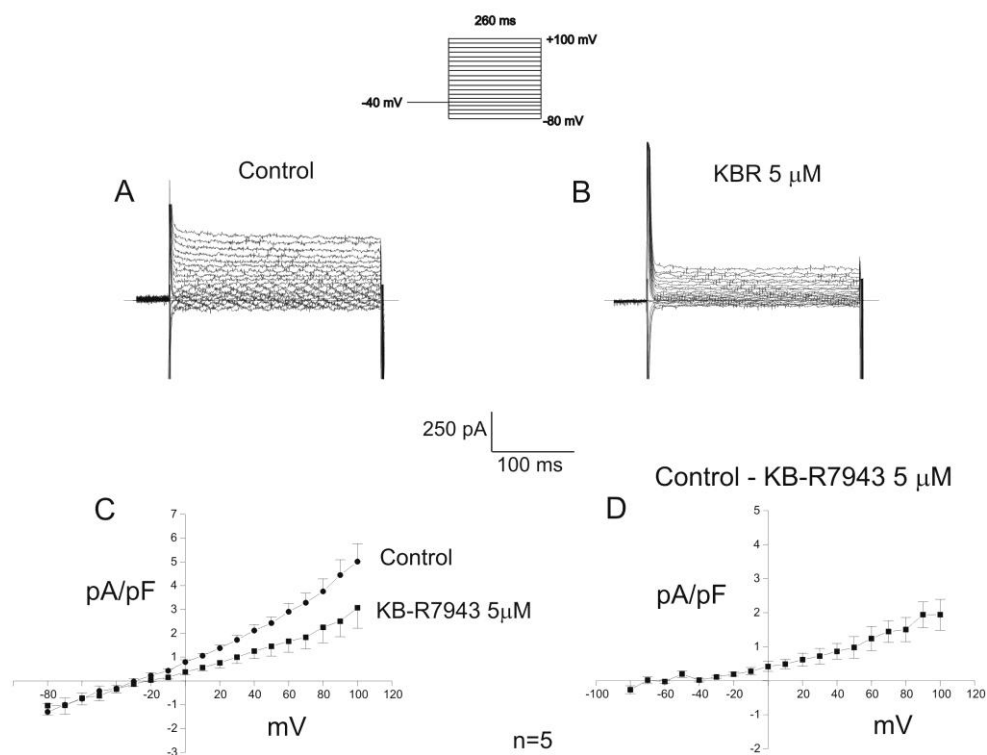
Se usaron los programas Sigma-stat y Graphpad Instat para realizar estas pruebas estadísticas.

Un valor de  $p < 0.05$  se consideró como significativo estadísticamente.

## Resultados

## Caracterización de $I_{NCX}$

Con el objeto de caracterizar la corriente que genera el NCX se bloquearon el resto de las corrientes de membrana (ver métodos) y se usaron dos bloqueantes del NCX, KB-R7943 y  $Ni^{+2}$  ( $NiCl_2$ ). Debido a que uno de los objetivos era evaluar el efecto de la Ang II sobre el modo inverso del NCX se midió  $I_{NCX}$  en condiciones en donde se favorecía este modo sobre el directo. En la figura 18, paneles A y B se muestran los trazos representativos de corrientes de membrana de un miocito provocadas por pulsos despolarizantes desde -80 a +100 mV en intervalos de 10 mV desde un potencial sostenido de -40mV.

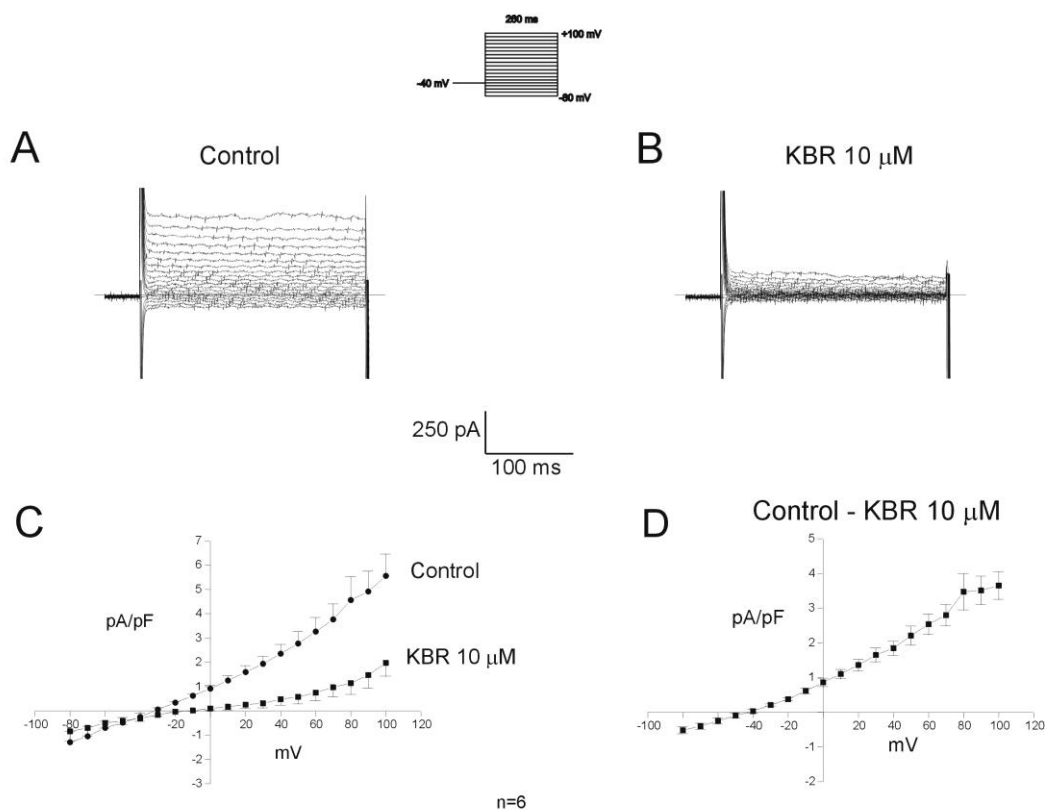


**Figura 18:** Caracterización de  $I_{NCX}$ . Trazos representativos de corrientes de membrana en condiciones control (A) y en presencia de KB-R7943 5 $\mu$ M (B). Promedios (n=5) de la relación de la densidad de corriente en función del voltaje en condiciones control y con KB-R7943 5  $\mu$ M (C). D: Relación de la densidad de corriente-voltaje promedio de las corrientes sensibles a KB-R7943 5 $\mu$ M.

Como fue presentado en la introducción las corrientes negativas representan al NCX funcionando en el modo directo, mientras que las corrientes positivas representan el modo inverso del NCX. Las corrientes fueron registradas antes (panel A) y después (panel B) de exponer al miocito al bloqueante del modo inverso del NCX, KB-R7943 (5  $\mu$ M). El KB-R7943 5  $\mu$ M bloquea parcialmente las corrientes. En el panel C de la figura 18 se muestran los datos promedios de la relación de la densidad de corriente en función del voltaje en condiciones control y con KB-R7943 5  $\mu$ M. En el panel D se observa la relación corriente-voltaje promedio de la corriente sensible a KB-R7943 5  $\mu$ M, obtenida restando la corriente en presencia de KB-R7943 5  $\mu$ M de la corriente control.

Debido a que con KB-R7943 5  $\mu$ M no se bloqueó completamente la corriente utilizamos una concentración más alta de este bloqueante. En la figura 19 se muestran los trazos representativos de las corrientes de membrana de un miocito provocadas por pulsos despolarizantes desde  $-80$  mV a  $+100$  mV desde un potencial sostenido de  $-40$  mV en presencia (B) y ausencia (A) de KB-R7943 10  $\mu$ M. En el panel C de la figura 19 se muestran los datos promedios de la relación de la densidad de corriente en función del voltaje en condiciones control y en presencia de KB-R7943 10  $\mu$ M. La relación corriente-voltaje promedio de la corriente sensible a KB-R7943 10  $\mu$ M se observa en el panel D, siendo esta última la corriente del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  ( $I_{\text{NCX}}$ ). El KB-R7943 5  $\mu$ M bloquea solo las corrientes positivas (outward) sin afectar a las corrientes negativas (inward), coincidiendo con la acción selectiva de esta concentración de la droga sobre el modo inverso del NCX (66). Como fue descrito previamente la concentración más alta de KB-R7943 usada (10  $\mu$ M) bloquea ambos modos del NCX (66).

## Resultados

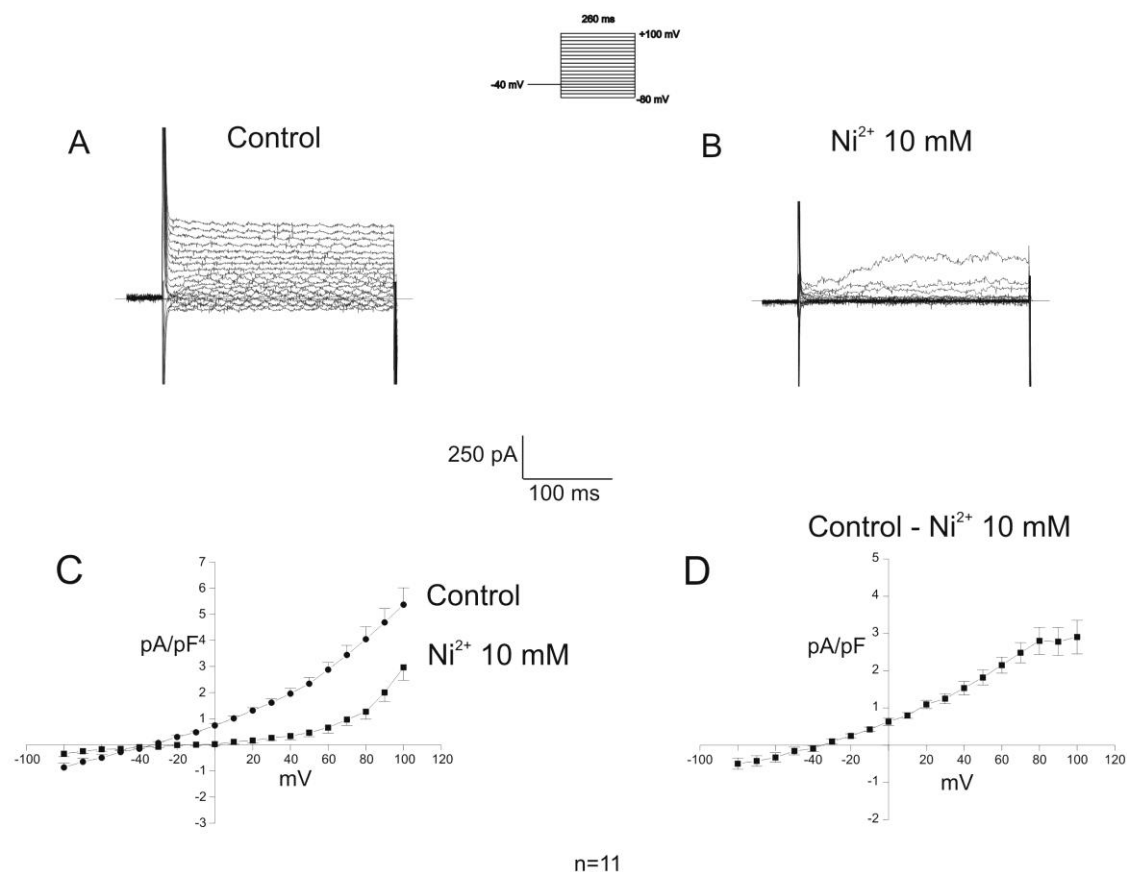


**Figura 19:** Caracterización de  $I_{NCX}$ . Trazos representativos de corrientes de membrana en condiciones control (A) y en presencia de KB-R7943 10  $\mu$ M (B). Promedios (n=6) de la relación de la densidad de corriente en función del voltaje en condiciones control y con KB-R7943 10  $\mu$ M (C). D: Relación de la densidad de corriente-voltaje promedio de las corrientes sensibles a KB-R7943 10  $\mu$ M.

Con el fin de asegurarnos que la caracterización efectuada es correcta utilizamos otro bloqueante del NCX,  $Ni^{2+}$  10 mM. En la figura 20 se observan los trazos representativos de las corrientes de membrana provocadas por pulsos despolarizantes desde -80 mV a +100 mV desde un potencial sostenido de -40 mV, en un miocito en ausencia (A) y presencia de  $Ni^{2+}$  10 mM (B). En el panel C de la figura 20 se muestran los datos promedios de la relación de la densidad de corriente en función del voltaje en condiciones control y en presencia de  $Ni^{2+}$  10 mM. La relación corriente-voltaje promedio de la corriente sensible a  $Ni^{2+}$  10 mM se observa en el panel D, siendo esta última la corriente del intercambiador  $Na^+/Ca^{+2}$  ( $I_{NCX}$ ). Del mismo modo que el KB-R7943 10  $\mu$ M el  $Ni^{2+}$  10 mM bloquea

## Resultados

completamente la corriente. El potencial de inversión del NCX ( $E_{NCX}$ ) fue aproximadamente  $-40$  mV.



**Figura 20:** Caracterización de  $I_{NCX}$ . Trazos representativos de corrientes de membrana en condiciones control (A) y en presencia de  $Ni^{2+}$   $10$  mM (B). Promedios ( $n=11$ ) de la relación de la densidad de corriente en función del voltaje en condiciones control y con  $Ni^{2+}$   $10$  mM (C). D: Relación de la densidad de corriente-voltaje promedio de las corrientes sensibles a  $Ni^{2+}$   $10$  mM.

En promedio los  $E_{NCX}$  fueron  $-44.4 \pm 2.5$  mV ( $n=6$ ) y  $-39.5 \pm 4.1$  mV ( $n=11$ ) estimados como el potencial en donde el nivel de corriente sensible a KBR  $10$   $\mu$ M y  $Ni^{2+}$ , respectivamente es cero. Estos valores son similares a los valores de  $E_{NCX}$  informados previamente por otros autores (64) que trabajaron en las mismas condiciones que las del presente trabajo. Hobai y O'Rourke (169) midiendo  $I_{NCX}$  en miocitos ventriculares de perro y utilizando soluciones similares a las usadas aquí calcularon el  $E_{NCX}$  teórico y estimaron un valor de  $-90$  mV. Sin embargo, ellos

encontraron un valor experimental de  $E_{NCX} = -41.24 \pm 1.27$  mV. Dichos autores atribuyen la discrepancia entre el valor teórico y el experimental a gradientes iónicos locales cercanos al sarcolema, como fue descrito por otros autores (64,194). Coincidiendo con esta discrepancia, Kimura y colaboradores (168) midieron el  $E_{NCX}$  en miocitos ventriculares de cobayos utilizando diferentes potenciales sostenidos (HP de holding potential) previos a los pulsos despolarizantes para la medida de  $I_{NCX}$  y siempre usando soluciones similares a las del presente trabajo. Estos autores encontraron que el  $E_{NCX}$  se acerca al HP utilizado en cada uno de los protocolos, de acuerdo con una fuerte tendencia del NCX a alcanzar el equilibrio en valores cercanos al HP mediante cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  y/o  $[Na^+]_i$ , haciendo que en el estado estacionario el valor del  $E_{NCX}$  tienda al valor del HP. En nuestro caso, del mismo modo que en el trabajo de Hobai y O'Rourke (169), el HP utilizado es de -40 mV, por lo tanto teniendo en cuenta lo descrito por Kimura y colaboradores (168) no es sorprendente encontrar un  $E_{NCX}$  cercano al valor de HP utilizado. En base a los resultados expuestos hasta aquí podemos admitir que las corrientes de whole-cell registradas son principalmente  $I_{NCX}$ .

### **Efectos de la Ang II sobre $I_{NCX}$**

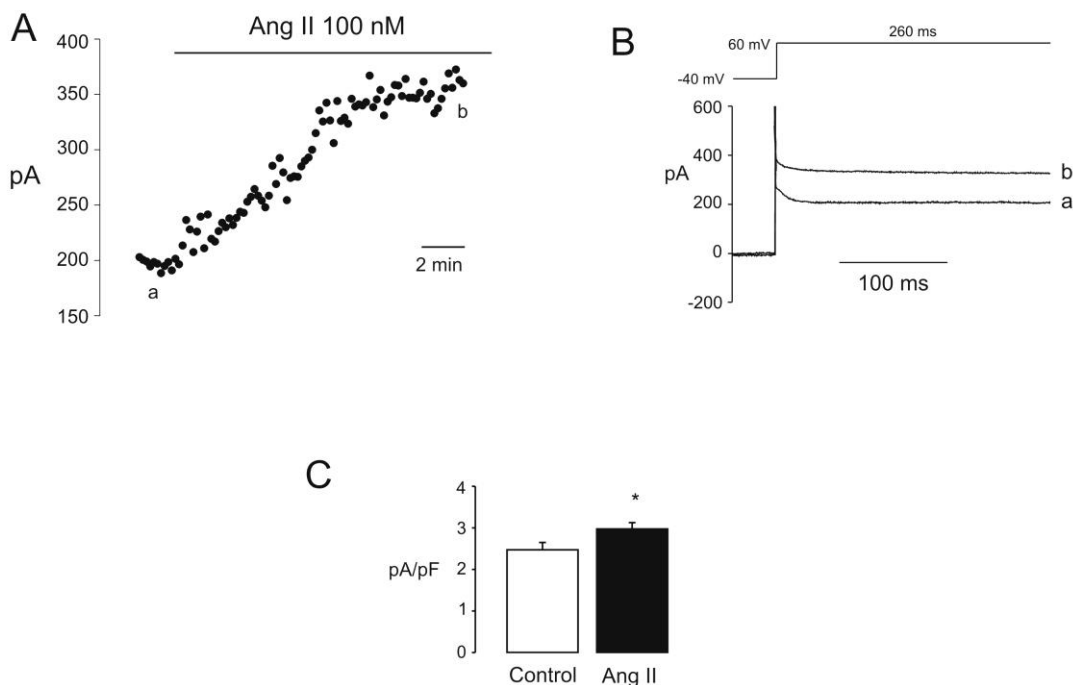
En el panel A de la figura 21 se muestra el curso en el tiempo del efecto de la Ang II (100 nM) sobre la corriente medida al final del pulso a +60 mV. La Ang II induce un aumento gradual de la corriente, alcanzándose el estado estacionario después de 5 min de la adición del péptido a la solución externa.

En el panel B de la figura 21 se ven los trazos representativos individuales correspondientes a los puntos indicados en el panel A. En el panel C se ven los datos promedios de la densidad de la corriente registrada a +60 mV en ausencia y presencia de Ang II.

La corriente positiva, registrada a +60 mV es mayoritaria pero no totalmente  $I_{NCX}$  debido a que luego de utilizar los bloqueantes del NCX,  $Ni^{2+}$  o KB-R7943, existe una pequeña corriente remanente. Seguidamente evaluamos si la Ang II

## Resultados

tenía algún efecto sobre la corriente insensible a  $\text{Ni}^{2+}$ . En presencia de  $\text{Ni}^{+2}$  (10 mM) la Ang II no induce aumento de la corriente (a +60 mV la amplitud de la corriente fue  $0.75 \pm 0.31$  pA/pF en  $\text{Ni}^{+2}$  y  $0.78 \pm 0.36$  en  $\text{Ni}^{+2}$  más Ang II,  $n=5$ , NS), indicando que la corriente afectada por Ang II es  $I_{\text{NCX}}$ .

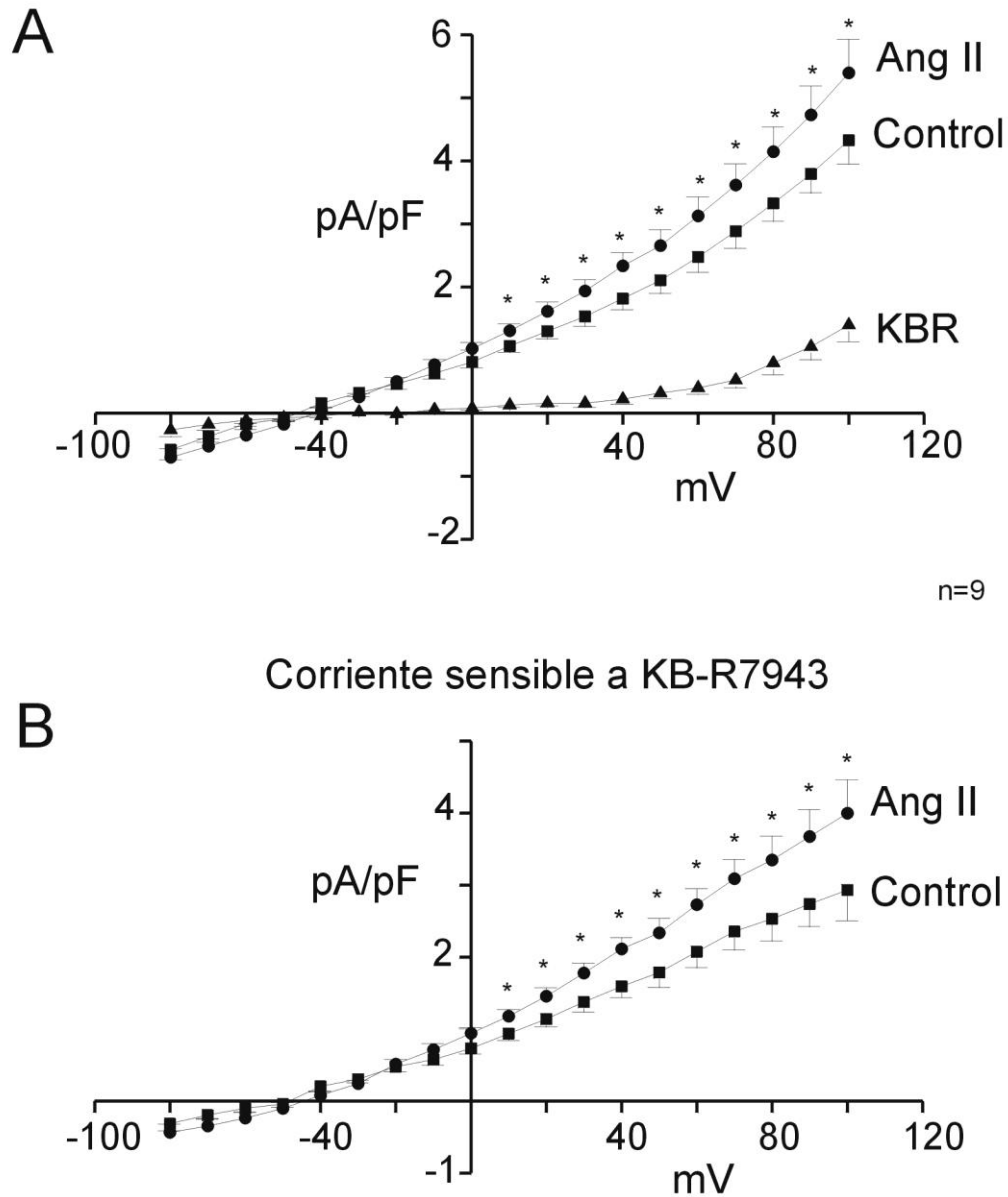


**Figura 21:** Efectos de la Ang II sobre  $I_{\text{NCX}}$ . **A:** Curso en el tiempo de los efectos de la Ang II, medido al final del pulso de la corriente registrada a +60mV. **B:** Trazos representativos de las corrientes de whole-cell correspondientes a los puntos indicados en el panel A. **C:** Promedios de la densidad de corriente registrada a +60 mV antes y después de la adición de Ang II (100 nM) ( $n=26$ ). (\*indica diferencia significativa con respecto al control).

Con el fin de confirmar que la Ang II afecta  $I_{\text{NCX}}$  estudiamos el efecto de este péptido sobre la corriente sensible a KB-R7943 10  $\mu\text{M}$ . En el panel A de la figura 22 se pueden observar los datos promedios de la relación corriente-voltaje luego de la sucesiva adición de Ang II (100 nM) y KB-R7943 (10  $\mu\text{M}$ ) a la solución externa. En el panel B se observan los datos promedios del efecto de la Ang II sobre la corriente sensible a KB-R7943, que representa a  $I_{\text{NCX}}$ . En presencia de Ang II la corriente se incrementa significativamente a partir de +10 mV y hasta



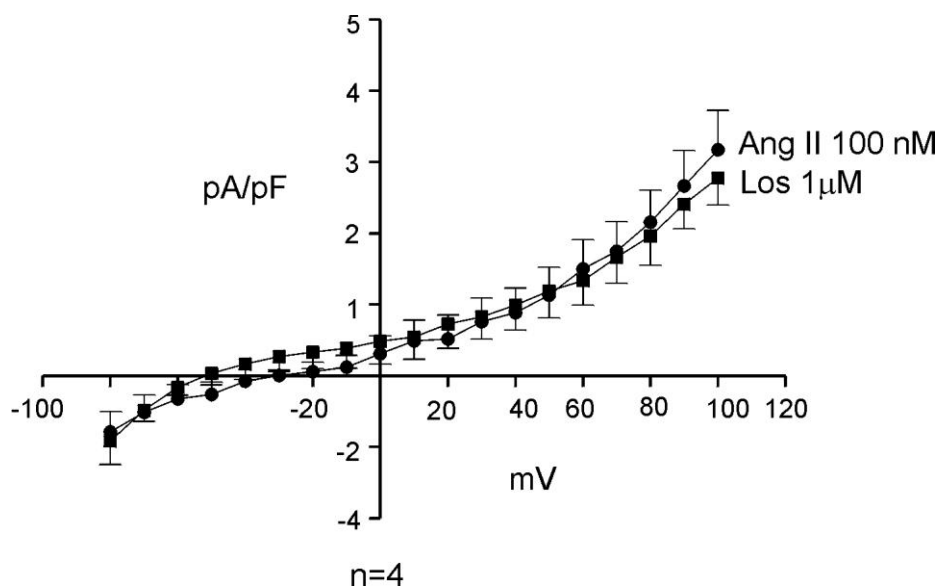
+100mV. La Ang II indujo a +60 mV un aumento de  $38.7 \pm 14.6\%$  ( $n=26$ ) en la densidad de  $I_{NCX}$ .



**Figura 22:** Efectos de la Ang II sobre  $I_{NCX}$ . A: Promedio relación de la densidad de corriente en función del voltaje luego de la sucesiva adición de Ang II 100 nM y KBR7943 10  $\mu$ M ( $n=9$ ). Panel B: Relación corriente-voltaje promedio del efecto de la Ang II sobre la densidad de  $I_{NCX}$ . (\*indica diferencia significativa con respecto al control).

*-Ausencia del efecto de la Ang II en presencia del antagonista del receptor AT1*

Con el fin de evaluar la vía mediante la que la Ang II actúa sobre el NCX usamos un antagonista selectivo del receptor de Ang II tipo 1 (AT1), Losartán 1  $\mu\text{M}$  (Los). Este antagonista previno el aumento de  $I_{\text{NCX}}$  producido por la Ang II.

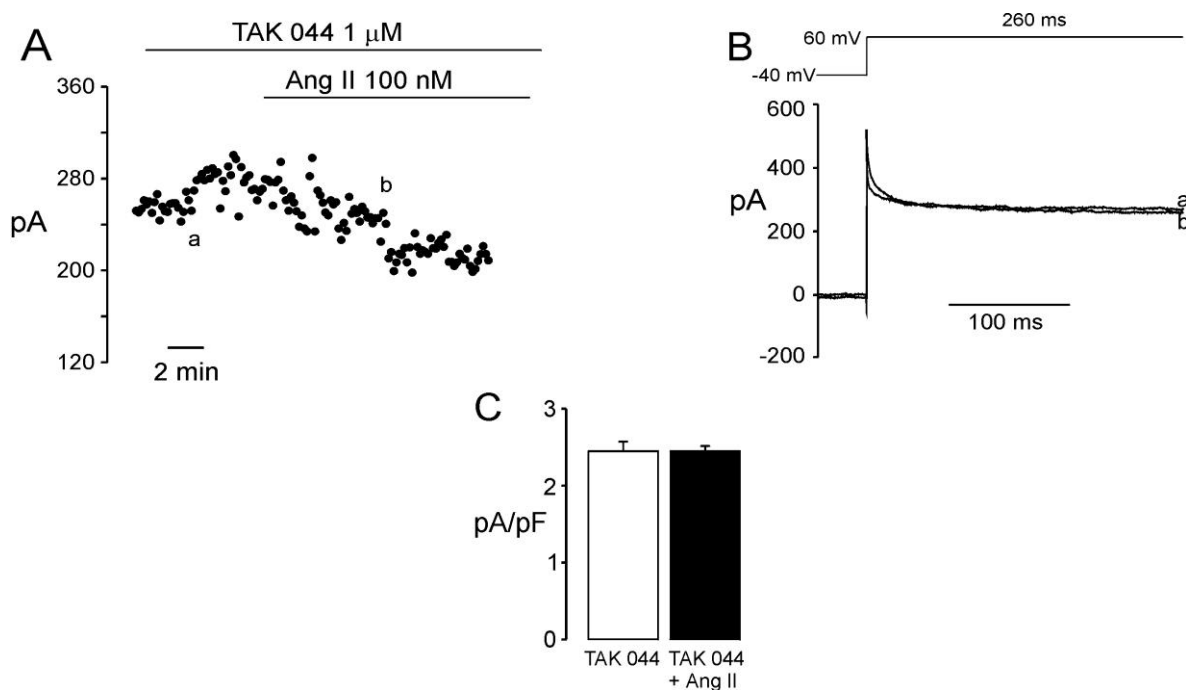


**Figura 23:** Ausencia del efecto de la Ang II en presencia del antagonista del receptor AT1: Promedio de la relación de la densidad de corriente en función del voltaje en células pretratadas con Los 1  $\mu\text{M}$ .

En la figura 23 se muestra el promedio de la relación de la densidad de corriente en función del voltaje con Ang II 100 nM cuando las células son pretratadas con Los 1  $\mu\text{M}$  (n=4, NS). Como se observa claramente, la Ang II no produce ningún efecto sobre  $I_{\text{NCX}}$  cuando las células son pretratadas con el antagonista AT1. Esto indicaría que el Rc AT1 es el que está involucrado en el efecto de la Ang II 100 nM sobre  $I_{\text{NCX}}$ .

*-Inhibición de los efectos de la Ang II sobre  $I_{NCX}$  por TAK044.*

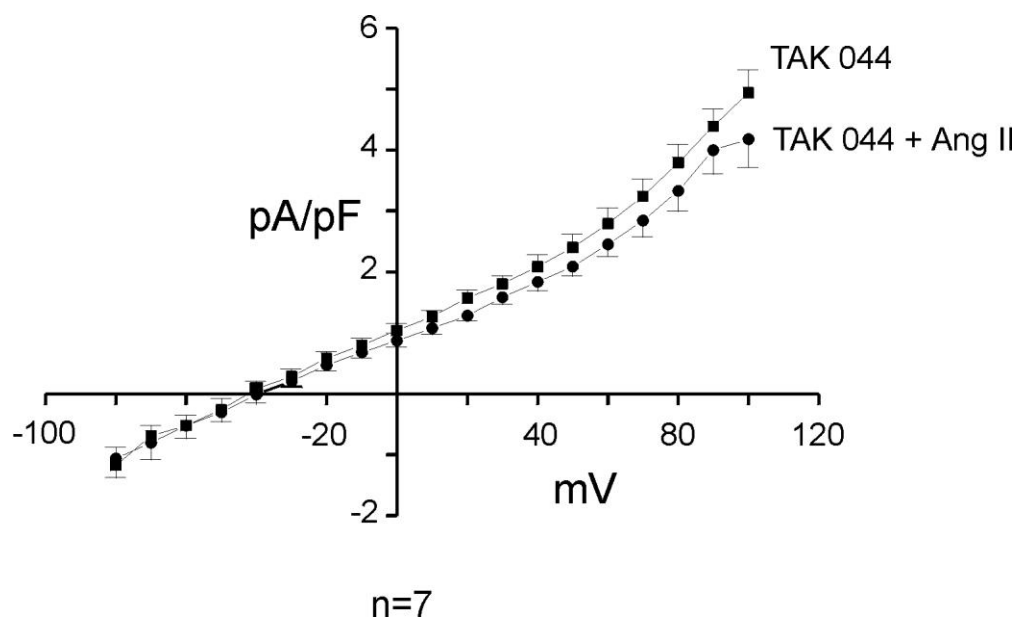
Como fue presentado en la introducción, resultados previos obtenidos en preparaciones multicelulares indican que ciertos efectos de la Ang II son mediados por la liberación de ET endógena (143-146). Para evaluar si el aumento producido por la Ang II sobre  $I_{NCX}$  que observamos es mediado por la liberación de ET endógena, pretratamos las células con un bloqueante no selectivo (bloqueante  $ET_A/ET_B$ ) de receptores de ET, TAK044 (1  $\mu$ M).



**Figura 24:** Efectos de la Ang II sobre  $I_{NCX}$  en presencia de TAK044. **A:** Curso en el tiempo de los efectos de la Ang II en presencia de TAK044 sobre la corriente medida al final del pulso a +60 mV. **B:** Trazos representativos de las corrientes de whole-cell correspondientes a los puntos indicados en panel A. **C:** Promedios de la densidad de corriente registrada a +60 mV antes y después de la adición de Ang II (100 nM) en la solución extracelular en miocitos pretratados con TAK044 (1 $\mu$ M) (n=13).

Este bloqueante no afecta la  $I_{NCX}$  basal: la amplitud de  $I_{NCX}$  normalizada a +60 mV fue  $2.59 \pm 0.15$  pA/pF en control y  $2.45 \pm 0.06$  pA/pF en miocitos tratados

con TAK044 (n=13, NS). El panel A de la figura 24 muestra el curso en el tiempo de los efectos de la Ang II sobre la  $I_{NCX}$  a +60 mV en presencia de TAK044. En presencia de este bloqueante de receptores de ET la Ang II no induce un aumento de  $I_{NCX}$ . En el panel B se observan los trazos representativos de los puntos indicados en el panel A. En promedio no se observan efectos de la Ang II en presencia de TAK044 sobre la  $I_{NCX}$  a +60 mV (panel C) ni a ninguno de los otros voltajes testeados (promedio de la relación corriente-voltaje, figura 25).

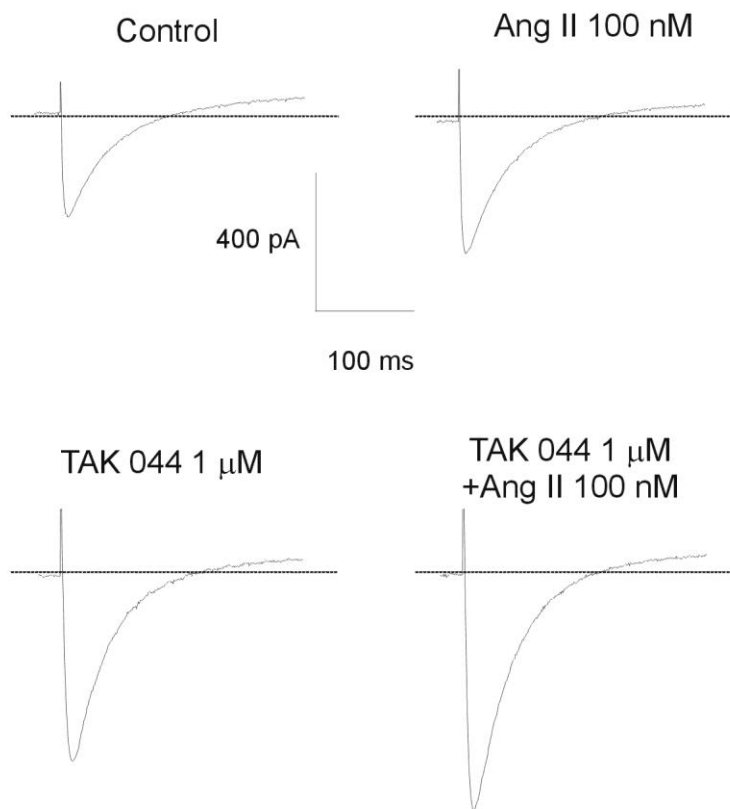


**Figura 25:** Promedio del efecto de Ang II en presencia de TAK044. Promedio del efecto de la Ang II 100 nM sobre la relación corriente-voltaje de densidad de  $I_{NCX}$  en células pre-tratadas con TAK044 (1  $\mu$ M) (n=7, NS).

#### *-Ausencia de efecto del TAK044 sobre $I_{Ca}$*

Para descartar la posibilidad de que el TAK044 esté actuando inespecíficamente sobre los receptores de Ang II, medimos la corriente de calcio tipo L ( $I_{Ca}$ ) en presencia y ausencia de Ang II con y sin TAK044 en la solución extracelular. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado recientemente que la Ang II aumenta la  $I_{Ca}$  por activación de los receptores de Ang II tipo 1 (AT1) en miocitos

cardíacos de gato (184). Utilizando las mismas condiciones del presente estudio (pero en ausencia de nifedipina en la solución extracelular)  $I_{Ca}$  a 0 mV aumentó un  $23 \pm 8\%$  ( $n=5$ ) luego de 10 minutos de aplicar Ang II. En presencia de TAK044, luego de 10 minutos de Ang II el aumento porcentual de  $I_{Ca}$  fue similar al observado en ausencia del bloqueante de los receptores de ET ( $21 \pm 7\%$ ,  $n=5$ ).



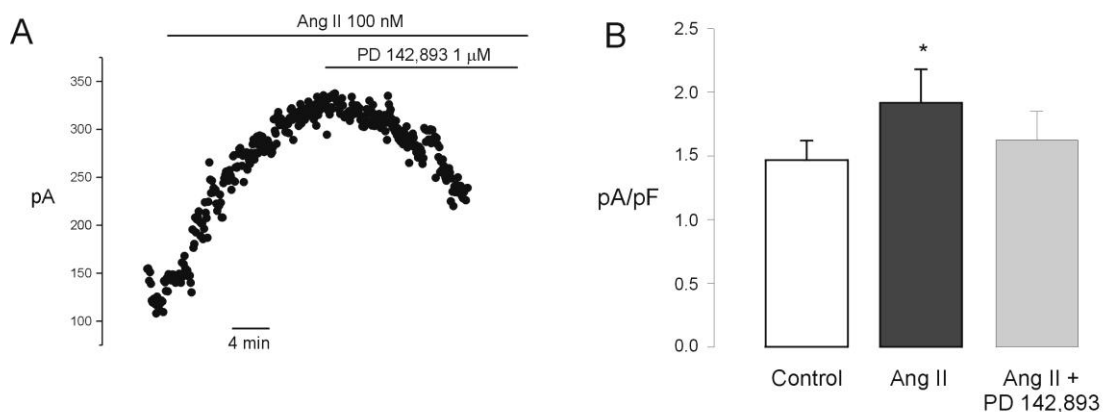
**Figura 26:** Ausencia de efecto de TAK044 sobre  $I_{Ca}$ . Trazos representativos de la corriente registrada a 0 mV en presencia y ausencia de Ang II 100 nM, panel superior, y en miocitos pretratados con TAK044 en ausencia y presencia de Ang II, panel inferior.

La figura 26 muestra un ejemplo representativo de lo expuesto anteriormente. Estos resultados indican que TAK044 no se une inespecíficamente a los receptores AT1 y que la liberación de ET endógena inducida por la Ang II no afecta a la  $I_{Ca}$ . Si bien se ha demostrado que la ET-1 incrementa  $I_{Ca}$  (185) los resultados del presente estudio están de acuerdo con lo descrito por Kelso y

colaboradores (195) en donde la ET-1 no afecta  $I_{Ca}$  cuando se utiliza la configuración de whole-cell.

*-Capacidad del PD142,893 para revertir el efecto de la Ang II sobre  $I_{NCX}$*

La figura 27, panel A muestra en un miocito individual el curso en el tiempo del incremento de  $I_{NCX}$  inducido por la Ang II y la habilidad de otro bloqueante de los receptores de  $ET_A/ET_B$ , PD142,893 ( $1 \mu\text{M}$ ), para revertir este efecto. El panel B muestra el promedio de la densidad de corriente de 6 miocitos expuestos al protocolo del panel A. La densidad de  $I_{NCX}$  promedio a  $+60 \text{ mV}$  luego de 5-7 minutos de Ang II aumentó  $29 \pm 7\%$  (con respecto al control) y disminuyó al  $10 \pm 6\%$  por encima del control después de 5-7 minutos en PD142,893 y en continua presencia de Ang II ( $n=6$ ,  $p < 0.05$ ). El PD142,893 no afectó el valor de  $I_{NCX}$  basal (a  $+60 \text{ mV}$ ,  $I_{NCX}$  fue  $2.4 \pm 0.5 \text{ pA/pF}$  y  $2.2 \pm 0.4 \text{ pA/pF}$  antes y después de agregar PD142,983 a la solución externa, respectivamente;  $n=6$ , NS).

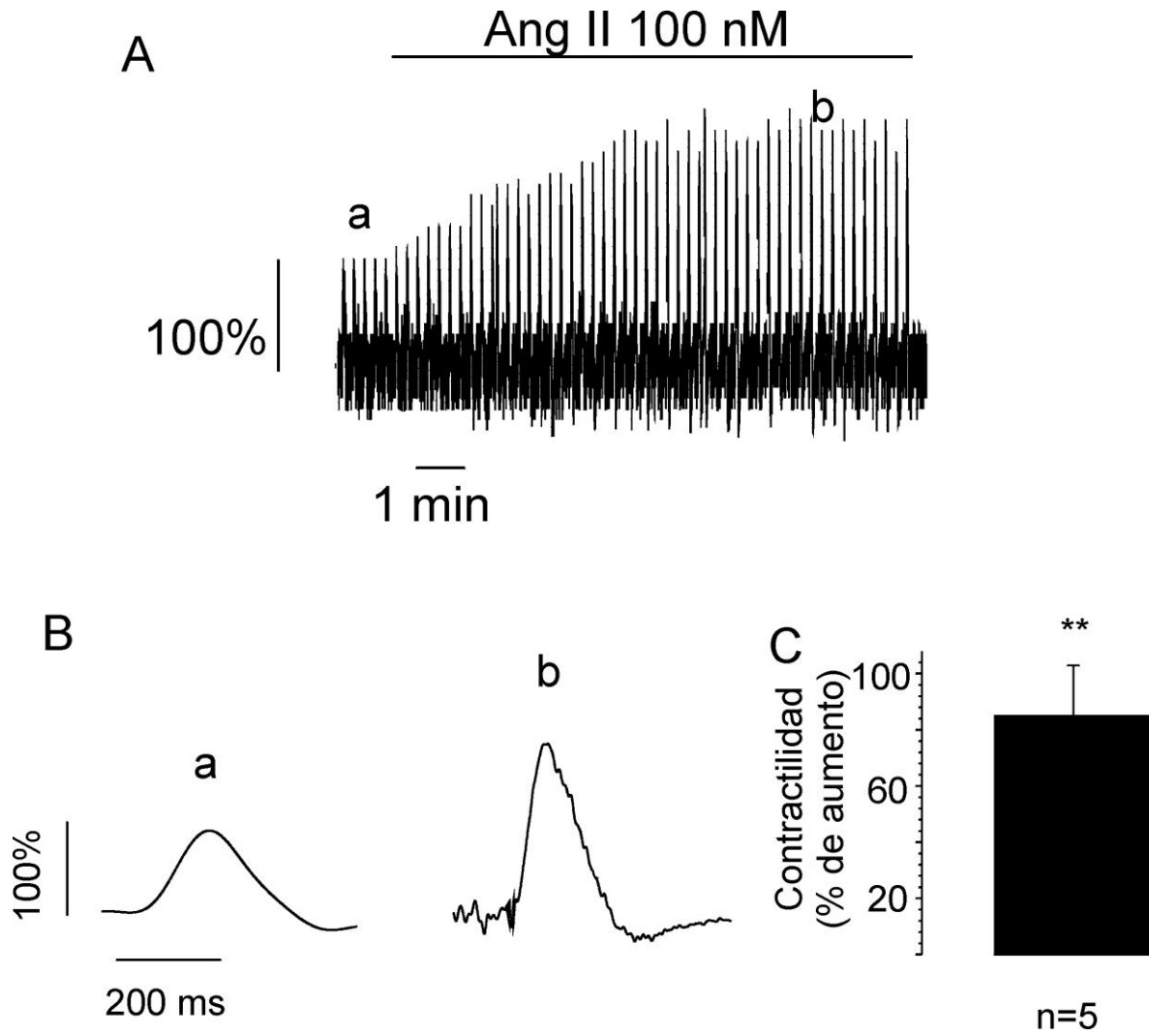


**Figura 27:** Capacidad del PD142,893 para revertir los efectos de la Ang II sobre  $I_{NCX}$ . **A:** Curso en el tiempo de los efectos de Ang II y del PD 142,893 ( $1 \mu\text{M}$ ) sobre  $I_{NCX}$  registrada a  $+60 \text{ mV}$ . **B:** Promedios ( $n=5$ ) de la densidad de corriente registrada a  $+60 \text{ mV}$  en miocitos expuestos sucesivamente a Ang II ( $100 \text{ nM}$ ) y PD142,893 ( $1 \mu\text{M}$ ). (\* indica significativamente distinto del control por ANOVA para muestras apareadas).

En conjunto, estos resultados nos sugieren que la estimulación de  $I_{NCX}$  producida por la Ang II en miocitos cardíacos de gato es mediada por la acción autocrina de ET endógena liberada por la Ang II.

## **Acortamiento celular y Ang II**

Con el objetivo de conocer si el incremento de la  $I_{NCX}$  provocado por la Ang II afecta a la contractilidad de los miocitos aislados medimos simultáneamente la  $I_{NCX}$  provocada por pulsos de +60 mV y la contractilidad con un detector de bordes. En este caso se utilizó la misma solución empleada en los experimentos anteriores. En la solución de pipeta solo se eliminó el BAPTA y el agregado de  $Cl_2Ca$ , para poder observar el evento mecánico. En el panel A de la figura 28 se muestra un registro continuo del acortamiento celular provocado por un pulso a +60 mV (durante 260 ms) desde un potencial sostenido de -40 mV, antes y después de adicionar Ang II 100 nM al medio extracelular. En el panel B de la figura 28 se muestran los trazos representativos de acortamiento celular correspondientes a los puntos indicados en el panel A. En el panel C de la figura 28 se observan los valores promedios de aumento de acortamiento celular ( $n=5$ ) graficado como efecto porcentual de la Ang II respecto del control. Los resultados nos indicarían que bajo nuestras condiciones de registro aislado de  $I_{NCX}$ , la Ang II fue capaz de aumentar la contractilidad, sugiriendo que el incremento de  $I_{NCX}$  inducido por Ang II podría contribuir al efecto inotrópico positivo de esta hormona.



**Figura 28:** Efecto de la Ang II sobre la contractilidad. Panel A: Registro continuo del acortamiento celular provocado por un pulso a +60 mV (durante 260 ms) desde un potencial sostenido de -40 mV, antes y después de agregar Ang II al medio extracelular. Panel B: Trazos representativos del acortamiento celular correspondientes a los puntos indicados en el panel A. Panel C: Promedio de aumento de acortamiento celular (n=5) graficado como efecto porcentual de la Ang II respecto del control, obtenido a los 10 minutos del agregado de Ang II (\*\* indica diferente significativamente de cero).



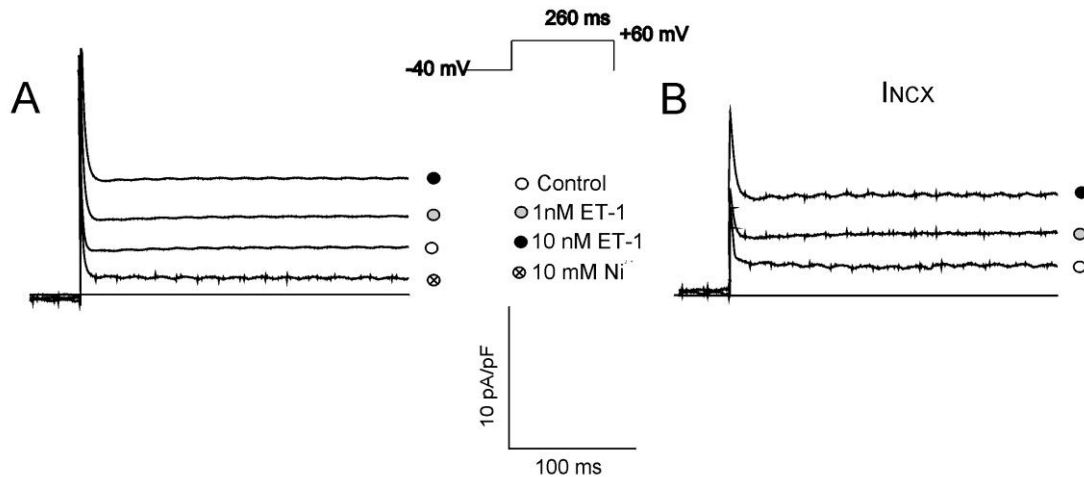
## Efectos de la ET-1 sobre $I_{NCX}$

### *-Efecto de la Endotelina-1 (ET-1) exógena sobre $I_{NCX}$*

En los experimentos previos demostramos que la Ang II estimula  $I_{NCX}$  por medio de la acción autocrina de la ET endógena liberada por el octapéptido. En los experimentos siguientes intentamos investigar si la ET-1 exógena mimetiza los efectos de la Ang II. Si bien desconocemos la isoforma de ET liberada en respuesta a la Ang II se utilizó ET-1 y no ET-2 o ET-3 basándonos en evidencias previas que indican que la Ang II produce un incremento de la expresión de preproET-1 (140,196). Debido a que en experimentos pilotos preliminares realizados a temperatura ambiente encontramos que tres células de un total cinco no incrementaron la densidad de  $I_{NCX}$  cuando fueron expuestas a ET-1 exógena decidimos trabajar a 30°C, basándonos en la conocida dependencia de la actividad del NCX con la temperatura (197). Elegimos esta temperatura pues nuestro grupo de trabajo trabajando con músculos papilares a 30°C encontró un EIP producido por la ET-1 sensible al KB-R7943 (198).

En la figura 29 A se muestran los trazos representativos de la densidad de corriente a +60 mV antes (Control) y después de la adición sucesiva de ET-1 (1 y 10 nM) y  $Ni^{2+}$  al medio extracelular, a 30°C. La densidad de corriente fue incrementada de manera dosis dependiente por ET-1. Al igual que lo observado en los experimentos previos la corriente registrada a +60 mV fue en su mayoría, pero no en su totalidad  $I_{NCX}$ , ya que existe una corriente remanente insensible a  $Ni^{2+}$ . En experimentos en los cuales se adicionó ET-1 luego del efecto del  $Ni^{2+}$  se demostró que esta corriente remanente insensible a  $Ni^{2+}$  no es afectada por la ET-1 (a +60 mV:  $0.52 \pm 0.18$ ,  $0.52 \pm 0.17$  y  $0.62 \pm 0.19$  pA/pF en control, ET-1 1 nM y ET-1 10 nM, respectivamente  $n=6$ ).

## Resultados



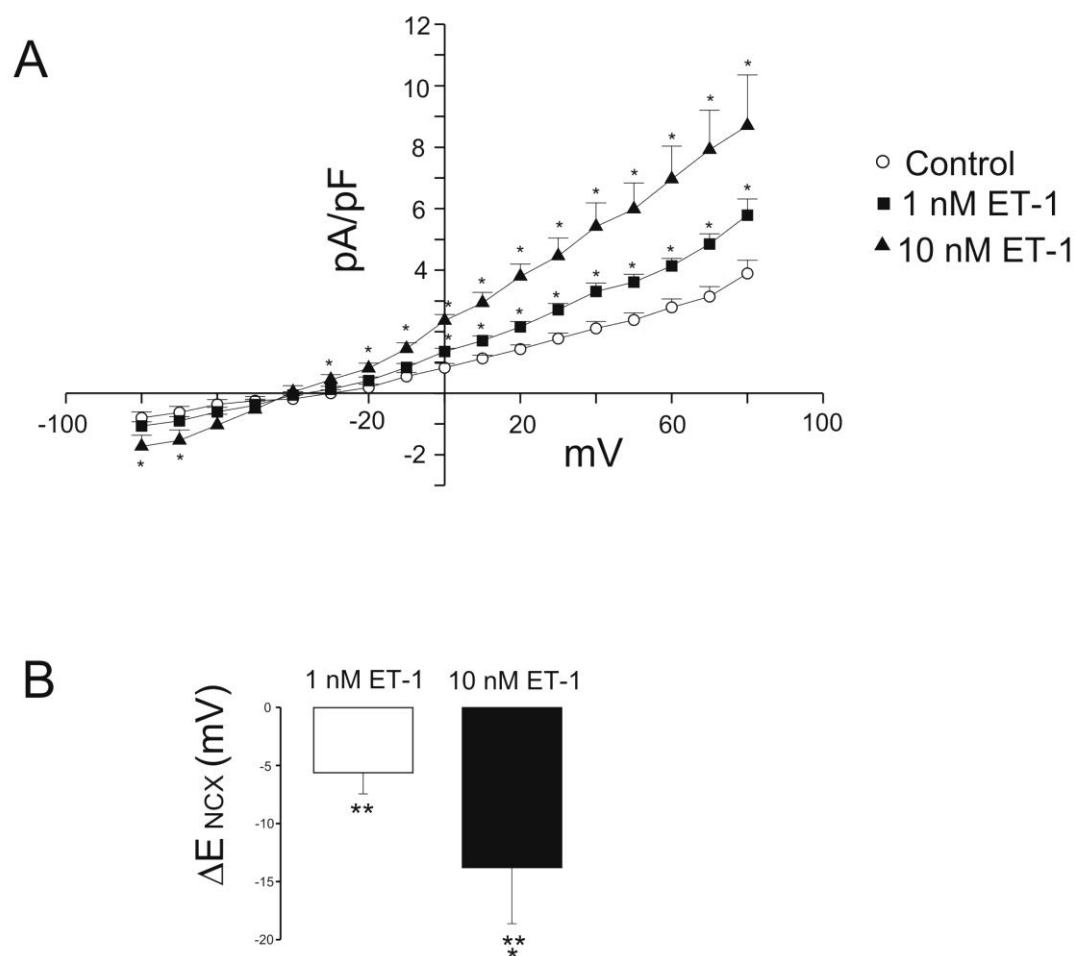
**Figura 29:** Efecto de la ET-1 exógena sobre la  $I_{NCX}$ : Panel A: Trazos representativos de las corrientes de membrana a +60 mV en condiciones control y luego de la sucesiva adición al medio extracelular de ET-1 1 nM, ET-1 10 nM y Ni<sup>2+</sup> 10 mM. Panel B: Corriente sensible a Ni<sup>2+</sup> 10 mM ( $I_{NCX}$ ) en condiciones control y con ET-1 1 nM y ET-1 10 nM.

En el panel B de la figura 29 se muestra el efecto de ambas dosis de ET-1 sobre la corriente sensible Ni<sup>2+</sup>. Estas corrientes, que representan  $I_{NCX}$ , se obtuvieron restando la corriente en presencia de Ni<sup>2+</sup> a las corrientes obtenidas antes y después de agregar ET-1 al medio extracelular.

En la figura 30 A se observan los datos promedios de la relación corriente-voltaje de la densidad de  $I_{NCX}$  antes y después de exponer el miocito a ET-1 1 y 10 nM. De manera similar al efecto de la Ang II la ET-1 produjo un incremento de la densidad de  $I_{NCX}$ . El incremento de la  $I_{NCX}$  provocado por la ET-1 mostró ser dosis dependiente. La ET-1 1 nM incrementó la  $I_{NCX}$  desde 0 mV a +80 mV. En estos potenciales el NCX se encuentra funcionando en el modo inverso. Por otro lado, la otra dosis de ET-1 usada, 10 nM, incrementó la  $I_{NCX}$  desde -30 mV a +80 mV (modo inverso) y desde -70 mV a -80 mV (modo directo), mostrando que la ET-1 afecta la  $I_{NCX}$  en ambos modos de operación del intercambiador.

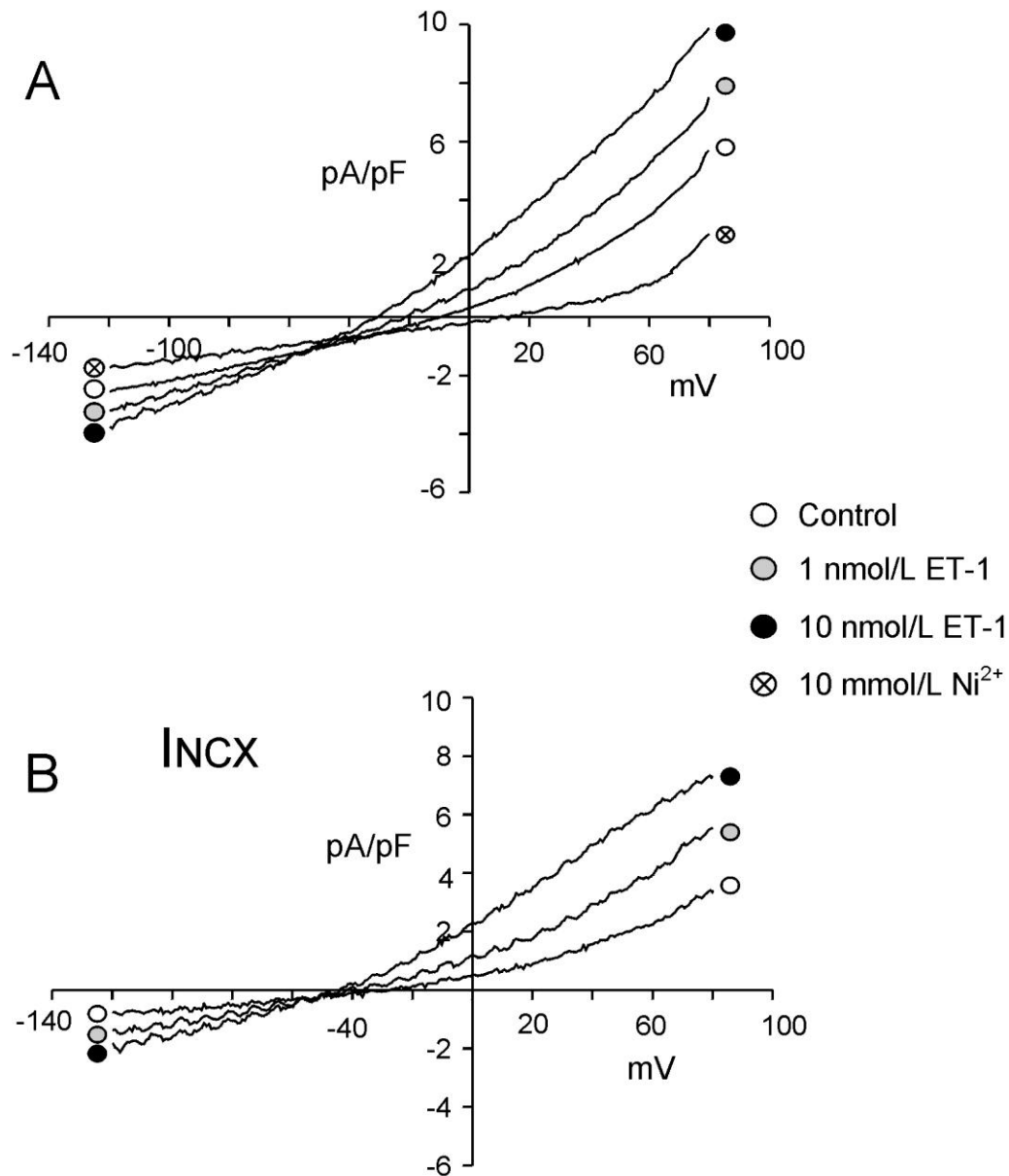
Además del aumento de ambos modos del NCX y a diferencia de lo ocurrido con Ang II, la ET-1 produjo un desplazamiento del  $E_{NCX}$  hacia potenciales negativos. Para obtener el valor de  $E_{NCX}$  se detectó el valor de potencial en donde

la corriente es cero en el ajuste lineal de los valores de  $I_{NCX}$  a potenciales que van desde -80 a 0 mV para cada célula individual. La figura 30 B muestra el promedio del desplazamiento negativo promedio del  $E_{NCX}$  antes y después de agregar sucesivamente al medio extracelular ET-1 1 y 10 nM. La ET-1 negativizó el  $E_{NCX}$  de manera dosis dependiente.



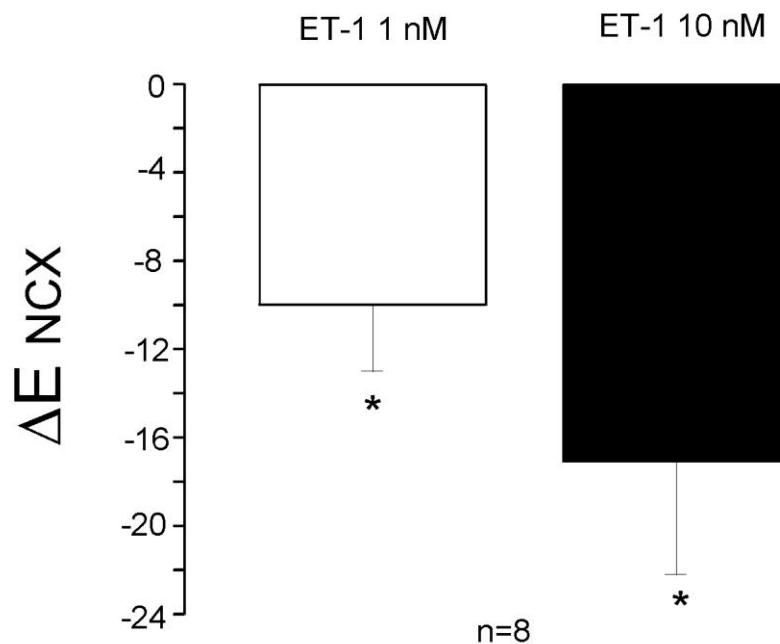
**Figura 30:** Efectos de la ET-1 exógena sobre  $I_{NCX}$ . En el panel A se observa la densidad promedio de  $I_{NCX}$  en función del voltaje en condiciones control y con ET-1 1 y 10 nM a 30°C (\*indica diferencia significativa respecto al control). En el panel B se muestra el  $\Delta E_{NCX}$  provocado por las 2 dosis de ET-1 usadas (\*indica diferencia significativa respecto a ET-1 1 nM, \*\*indica diferencia significativa respecto de cero).

Con el fin de visualizar con mayor precisión el  $E_{NCX}$  evaluamos el efecto de ET-1 exógena sobre  $I_{NCX}$  utilizando un protocolo de rampas descendentes despolarizantes, que van desde +80 mV a -120 mV a una velocidad de 0.4mV/ms desde un potencial sostenido de -80 mV. En el panel A de la figura 31 se observan los trazos representativos de la densidad de corriente de membrana, en un miocito control y luego de la sucesiva adición de ET-1 1 y 10 nM, y  $Ni^{2+}$  10 mM en la solución extracelular. En el panel B de la figura 31 se muestra la densidad de  $I_{NCX}$  (corriente sensible a  $Ni^{2+}$  10 mM) en función del potencial. Al igual que lo observado con el protocolo de pulsos despolarizantes aquí vemos que la ET-1 en forma dosis dependiente produce un incremento de la densidad de corriente y un desplazamiento negativo del  $E_{NCX}$ . Es importante destacar que si bien las rampas son descendentes (el curso en el tiempo transcurre desde potenciales positivos a negativos) el gráfico fue realizado en función del potencial, desde valores negativos a positivos.



**Figura 31:** Efecto de ET-1 exógena sobre  $I_{NCX}$  utilizando rampas. Panel A: trazos representativos de la densidad de corriente de membrana en función del potencial control y luego de adicionar ET-1 1 y 10 nM, y  $Ni^{2+}$ . Panel B: Densidad de  $I_{NCX}$  (corriente sensible a  $Ni^{2+}$ ) en presencia de ET-1 1 y 10 nM.

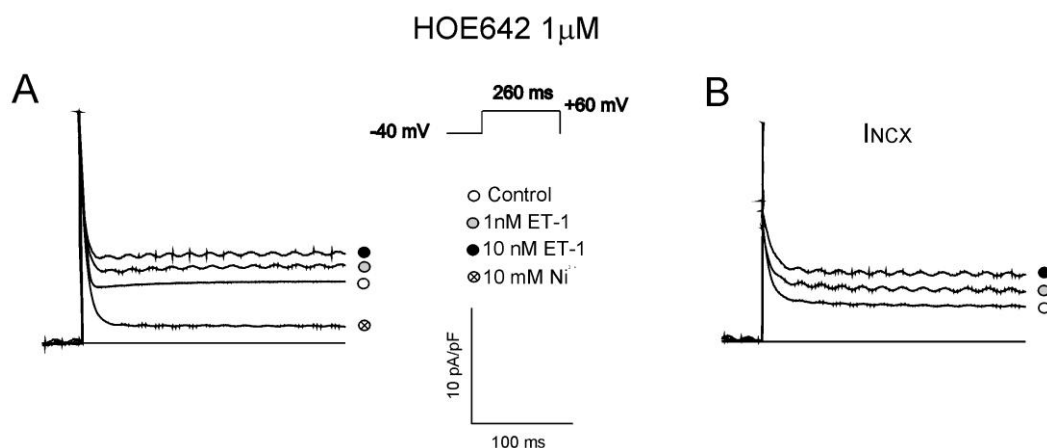
En la figura 32 se observan los valores de los desplazamientos del  $E_{NCX}$  ( $\Delta E_{NCX}$ ) producidos por ambas dosis de ET-1 cuando se utiliza el protocolo en forma de rampa para obtener la  $I_{NCX}$ . La magnitud del desplazamiento determinada con ambos protocolos de voltaje no fue significativamente diferente con ( $\Delta E_{NCX}$  ET-1 1 nM (mV) =  $-5.64 \pm 1.81$  vs  $-10 \pm 3$  con pulsos de voltajes y rampas, respectivamente; y  $\Delta E_{NCX}$  ET-1 10 nM (mV) =  $-13.8 \pm 4.52$  vs  $-17.3 \pm 5.1$  con pulsos de voltajes y rampas, respectivamente).



**Figura 32:** Desplazamiento del  $E_{NCX}$ . Promedios del desplazamiento del  $E_{NCX}$  provocado por la ET-1 1 nM (en blanco) y 10 nM (en negro) utilizando el protocolo de rampas descendentes. (\* indica significativamente distinto de cero).

Es sabido que la ET-1 estimula la actividad del intercambiador  $Na^+/H^+$  (NHE) (199). Estudios de nuestro grupo de trabajo, en músculos papilares de gato, demostraron la presencia de un nexo claro entre la activación de NHE por ET-1 (5 nM), el aumento de la  $[Na^+]_i$  y el efecto inotrópico positivo (EIP) provocado por esta hormona. Una explicación para este nexo es que el aumento de la  $[Na^+]_i$  produce un desplazamiento del  $E_{NCX}$  hacia valores más negativos favoreciendo el

modo inverso del NCX durante el PA, promoviendo el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula y aumentando la contractilidad (198). Por lo tanto el desplazamiento negativo del  $E_{\text{NCX}}$  observado en nuestros experimentos podría ser debido al incremento de la  $[\text{Na}^+]_i$  provocado por estimulación del NHE por la ET-1. Con el fin de evaluar esta hipótesis analizamos el efecto de ET-1 exógena sobre  $I_{\text{NCX}}$  y el  $E_{\text{NCX}}$  en miocitos aislados en presencia del inhibidor selectivo del NHE, HOE642. Debido a que el desplazamiento negativo de  $E_{\text{NCX}}$  producido por la ET-1 fue cancelado cuando las células se preincubaron con HOE642 nosotros sugerimos que este efecto es el resultado del aumento de la  $[\text{Na}^+]_i$  inducido por la estimulación del NHE por este péptido.

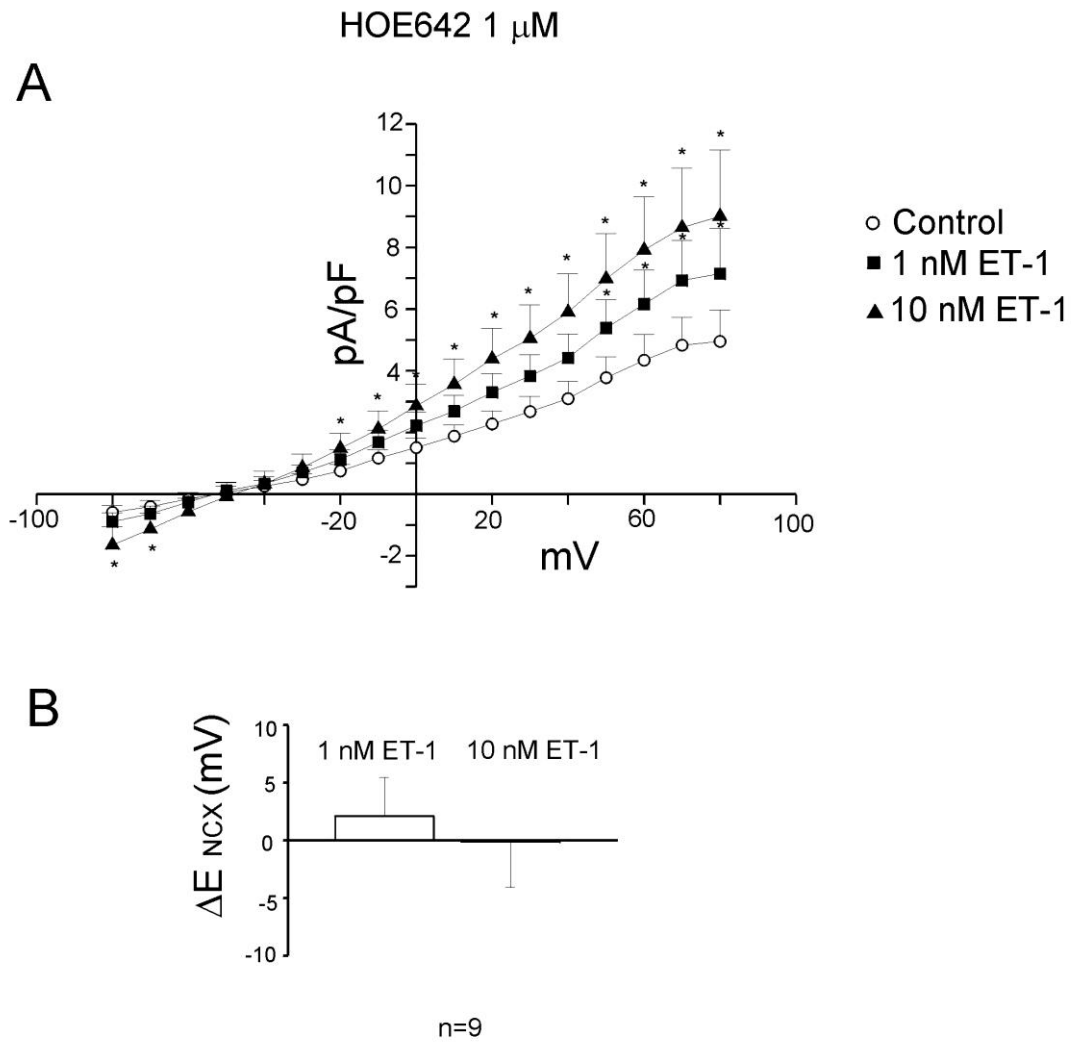


**Figura 33:** Efecto de la ET-1 exógena en presencia de HOE642 1 μM. Panel A: Trazos representativos de las corrientes de membrana a +60 mV en condiciones control y luego de la sucesiva adición al medio extracelular de ET-1 1 nM, ET-1 10 nM y Ni<sup>2+</sup> 10 mM, siempre en presencia de HOE642. Panel B: Corriente sensible a Ni<sup>2+</sup> 10 mM en condiciones control y con ET-1 1 nM y ET-1 10 nM, en presencia de HOE642.

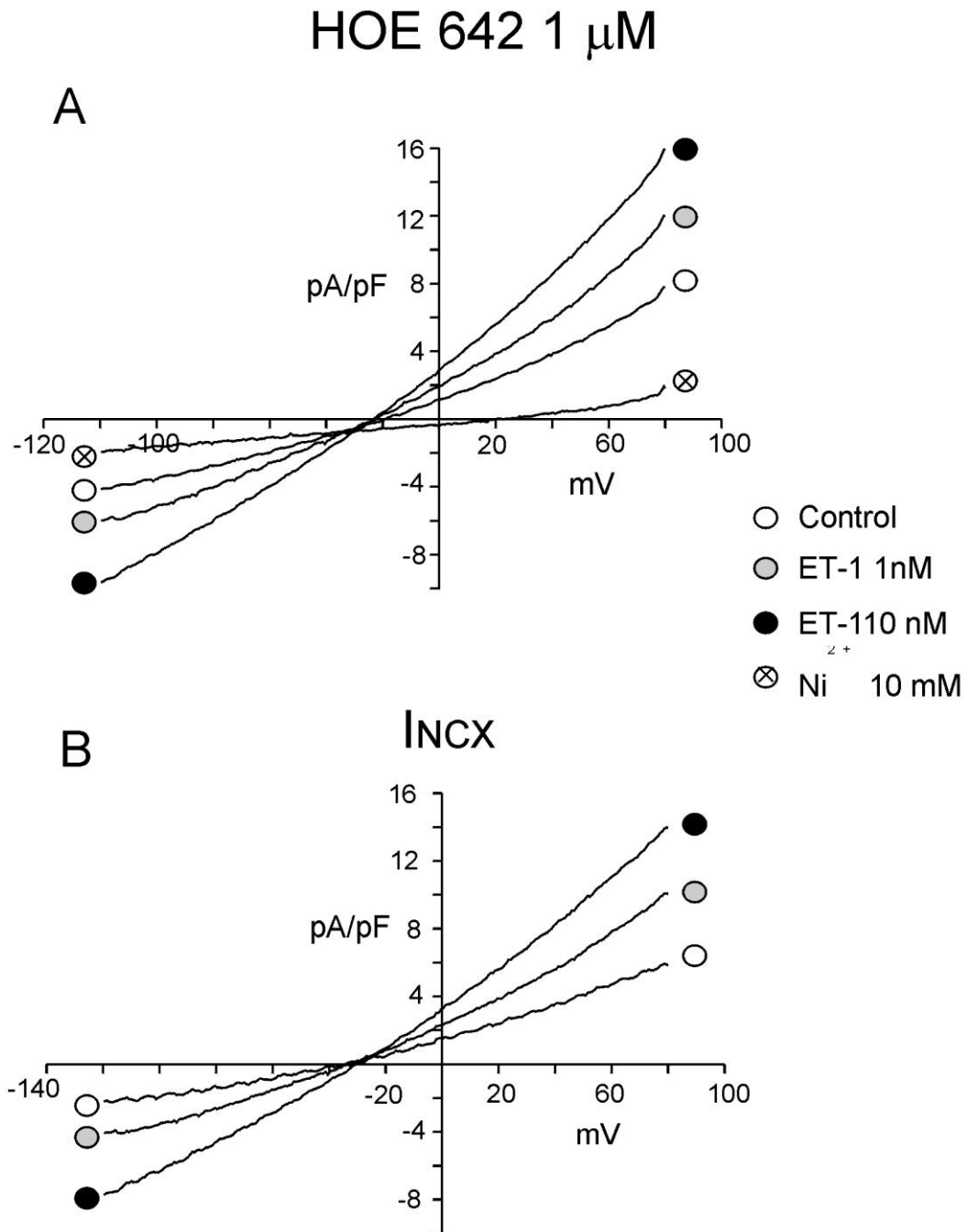
En el panel A de la figura 33 se observan los trazos representativos de la densidad de corriente a +60 mV antes (control) y después de la sucesiva adición de ET-1 1 y 10 nM, y Ni<sup>2+</sup> al medio extracelular, siempre en presencia de HOE642. En la figura 33 B se observan las corrientes sensibles a Ni<sup>2+</sup>.

En la figura 34 A se muestran los datos promedios ( $n=9$ ) de la relación corriente-voltaje de la densidad de  $I_{NCX}$ . El HOE642 no afecta significativamente el  $E_{NCX}$  basal ( $E_{NCX}$  fue  $-39.2 \pm 5.4$  y  $-49.5 \pm 5.1$ , en ausencia,  $n=8$ , y en presencia,  $n=8$ , de HOE642, respectivamente NS) pero sí cancela totalmente el desplazamiento negativo del  $E_{NCX}$  inducido por la ET-1, como se observa en los datos promedios de la figura 34B. En presencia de HOE642, a pesar de que el desplazamiento negativo del  $E_{NCX}$  es cancelado, la ET-1 incrementa la densidad de  $I_{NCX}$  en forma dosis dependiente. Con ET-1 1 nM se observa que incrementa la  $I_{NCX}$  significativamente desde +50 mV y hasta +80 mV, potenciales en donde el NCX esta funcionando en el modo inverso. En cambio ET-1 10 nM produce un incremento significativo tanto en las corrientes positivas (desde -20 a +80 mV, modo inverso) como en las negativas (desde -70 a -80 mV, modo directo). Por lo tanto la ET-1 favorecería el funcionamiento del NCX en ambos modos.



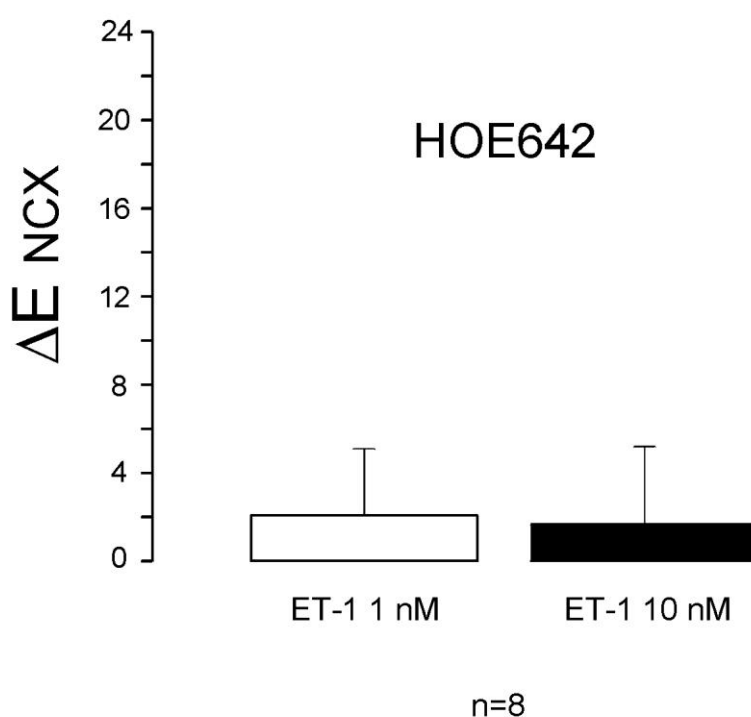


**Figura 34:** Efecto de ET-1 exógena en presencia de HOE642 1  $\mu$ M. En el panel A se observa la densidad de  $I_{NCX}$  promedio en función del voltaje control y luego de adicionar ET-1 1 y 10 nM en continua presencia de HOE642 1  $\mu$ M. Panel B: Variación promedio del  $E_{NCX}$  con ambas dosis de ET-1. (\* indica significativamente diferente del control).



**Figura 35:** Efecto de ET-1 exógena en presencia de HOE642. Panel A: Rampa representativa control y luego de adicionar ET-1 1 y 10 nM, y Ni<sup>2+</sup> al medio extracelular, en presencia de HOE642. Panel B: I<sub>NCX</sub> control y con ambas dosis de ET-1 en presencia de HOE642.

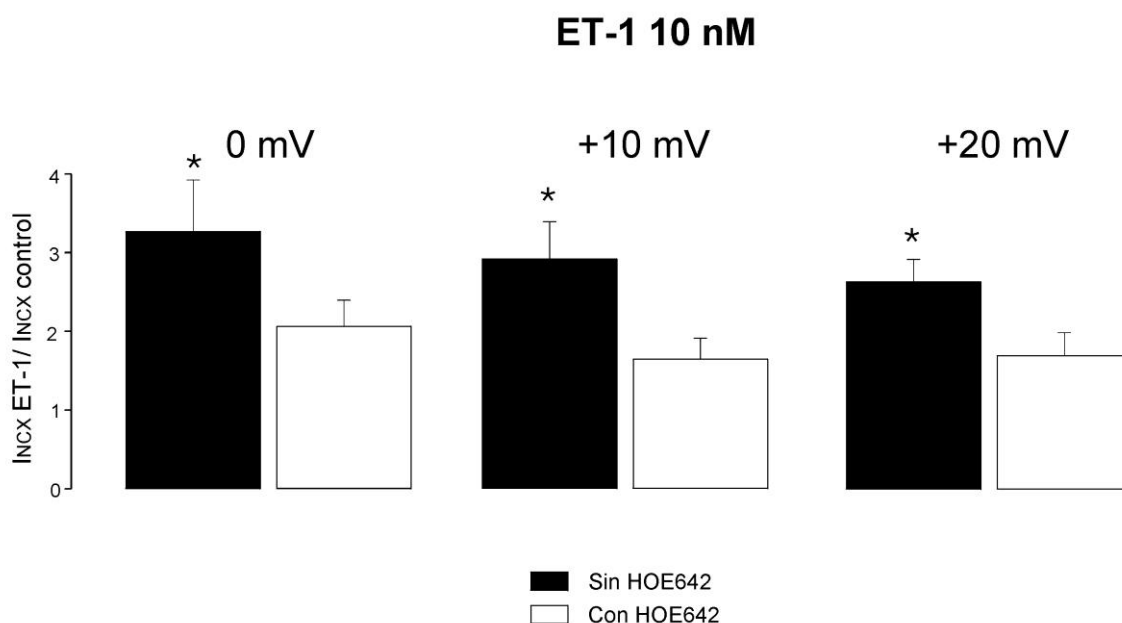
También se registraron las rampas con ambas dosis de ET-1 en presencia continua de HOE642 1  $\mu$ M. Como se muestra en la figura 35 con este nuevo protocolo la ET-1 sigue aumentando la  $I_{NCX}$  con ambas dosis de ET-1 cuando las células son pre-tratadas con HOE642 1  $\mu$ M. Sin embargo en presencia del inhibidor del NHE la ET-1 no produce el desplazamiento del  $E_{NCX}$  hacia valores negativos (figura 36), indicando que este último efecto de ET-1 se debe a la activación del NHE por este péptido.



**Figura 36:**  $\Delta E_{NCX}$  con ET-1 en presencia de HOE642. Promedio del  $\Delta E_{NCX}$  luego del tratamiento con ET-1 1 y 10 nM en presencia de HOE642 utilizando un protocolo de rampa.

Con el objeto de analizar con mayor detalle el efecto de ET-1 sobre  $I_{NCX}$  trabajando en el modo inverso comparamos el incremento relativo de  $I_{NCX}$  inducido por ET-1 10 nM en ausencia y presencia de HOE642 1  $\mu$ M. Se analizó el efecto de ET-1 10 nM a 0, +10 y +20 mV. ET-1 10 nM induce un incremento significativamente mayor en ausencia de HOE642 que cuando este inhibidor está

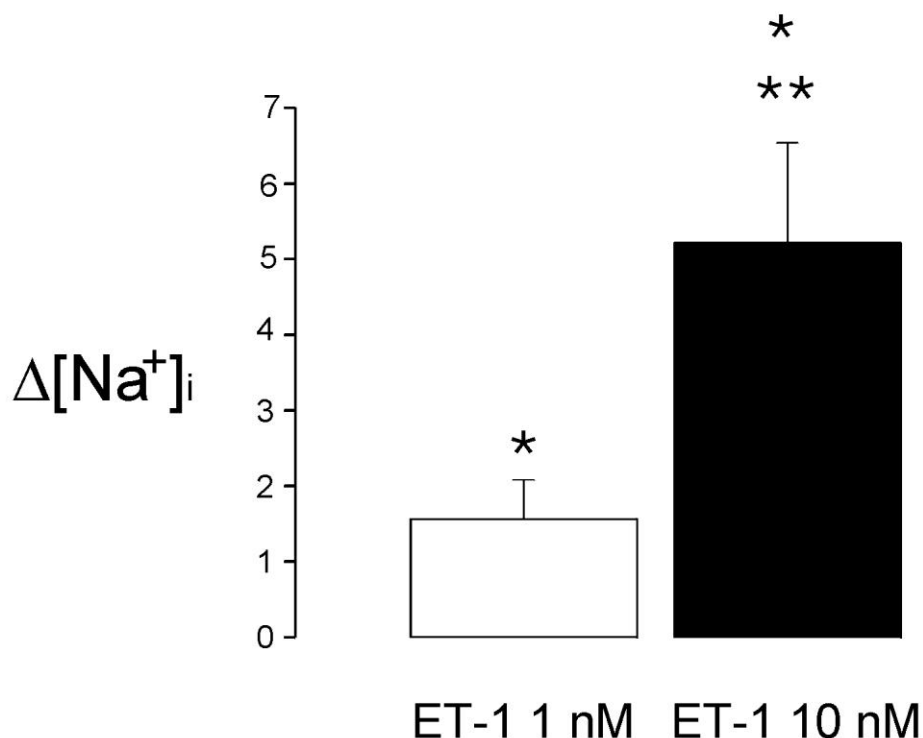
presente (figura 37). La interpretación más apropiada para este resultado es que cuando se previene el desplazamiento negativo del  $E_{\text{NCX}}$  por el pretratamiento con HOE642 la estimulación del NCX por ET-1 es mediada por un efecto directo del péptido sobre el NCX. Por otro lado, cuando el incremento de la  $[\text{Na}^+]_i$  está presente, debido a la estimulación del NHE por ET-1, participan dos efectos sumados de la ET-1 sobre el NCX: a- un efecto indirecto debido al desplazamiento negativo del  $E_{\text{NCX}}$  producido por el incremento de la  $[\text{Na}^+]_i$  y b- un efecto directo, independiente de cambios en el  $\text{Na}^+_i$ . Este último efecto directo, posiblemente producido por la fosforilación del NCX por PKC (36), incrementaría la actividad del NCX en ambos modos de operación de este transportador (figura 37). Sin embargo, el desplazamiento negativo del  $E_{\text{NCX}}$  favorecería el funcionamiento del modo inverso del NCX y desfavorecería el funcionamiento del modo directo de este intercambiador.



**Figura 37:** Efecto de la ET-1 a 0, +10 y +20 mV. Promedio de la relación entre la  $I_{\text{NCX}}$  en presencia de ET-1 10 y la  $I_{\text{NCX}}$  control a 0, a +10 y +20 mV en ausencia (n=9) (en negro) y en presencia (en blanco) de HOE642 (n=8). (\* indica diferencia significativa respecto al valor en presencia de HOE642).

## Resultados

La variación de la  $[Na^+]_i$  ( $\Delta[Na^+]_i$ ) producida por la ET-1 puede ser calculada, utilizando la ecuación del  $E_{NCX}$  presentada en la introducción ( $E_{NCX}=3E_{Na} - 2E_{Ca}$ ), teniendo en cuenta la magnitud del desplazamiento del  $E_{NCX}$  producido por la ET-1 exógena y considerando que las  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $[Ca^{2+}]_e$  y  $[Na^+]_e$  son 200 nM, 2 mM y 140 mM, respectivamente.



**Figura 38:** Estimación de la variación de la  $[Na^+]_i$  por ET-1: Promedio (n=8) de  $\Delta[Na^+]_i$  (mM) provocada por ET-1 1 y 10 nM, estimada de acuerdo al  $\Delta E_{NCX}$  obtenido con el protocolo de pulsos despolarizantes. (\* indica estadísticamente distinto de cero y \*\* indica diferencia significativa entre ambas dosis de ET-1).

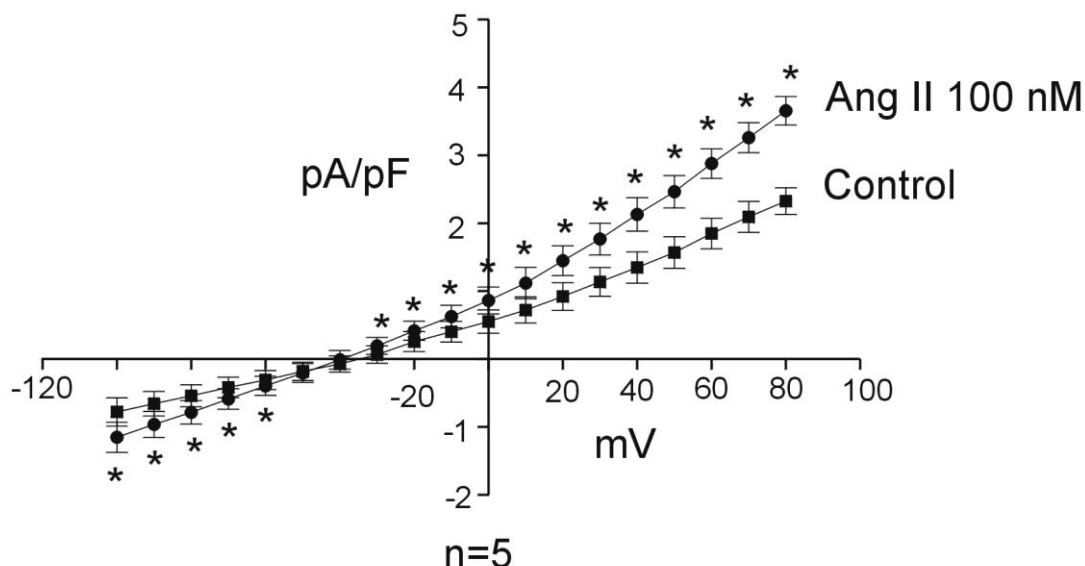
En la figura 38 se muestran los valores promedios de  $\Delta[Na^+]_i$  (mM) calculados luego de agregar al medio extracelular ET-1 1 y 10 nM. Estos valores se encuentran en el rango de los valores obtenidos cuando se mide la  $\Delta[Na^+]_i$  en el citosol por epifluorescencia en músculos papilares de gato luego de la adición de

ET-1 5 nM (200). Es importante aclarar que la variación de la  $[Na^+]_i$  estimada en el presente estudio se realizó en miocitos aislados dializados con una solución de pipeta (modo whole-cell) conteniendo una  $[Na^+]_i$  constante ( $[Na^+]_i = 20$  mM). Por lo tanto podemos especular que el incremento de la  $[Na^+]_i$  reflejaría cambios de este ion en el espacio subsarcolemal, y que en este espacio la diálisis de la pipeta no sería capaz de mantener la  $[Na^+]_i$  en un valor constante.

*-Efectos de la Ang II sobre  $I_{NCX}$  a 30°C.*

En el presente trabajo se demostró que el efecto de Ang II 100 nM sobre la  $I_{NCX}$  a temperatura ambiente es mediado por la liberación de ET endógena. Cuando evaluamos el efecto de ET-1 exógena sobre  $I_{NCX}$  a 30°C además de encontrar un incremento de  $I_{NCX}$  encontramos un desplazamiento del  $E_{NCX}$  hacia potenciales más negativos. Como con Ang II a temperatura ambiente no veíamos ese desplazamiento, a pesar de ver que el efecto de ese péptido era mediado por ET, realizamos experimentos con Ang II 100 nM pero a 30°C. En la figura 39 se observa el promedio de la relación de la densidad de corriente en función del voltaje en la corriente sensible a KB-R7943 10  $\mu$ M a 30°C. Como se puede observar la densidad de  $I_{NCX}$  fue significativamente mayor en presencia de Ang II 100 nM desde -40 mV a +80 mV y desde -60 mV a -100 mV.

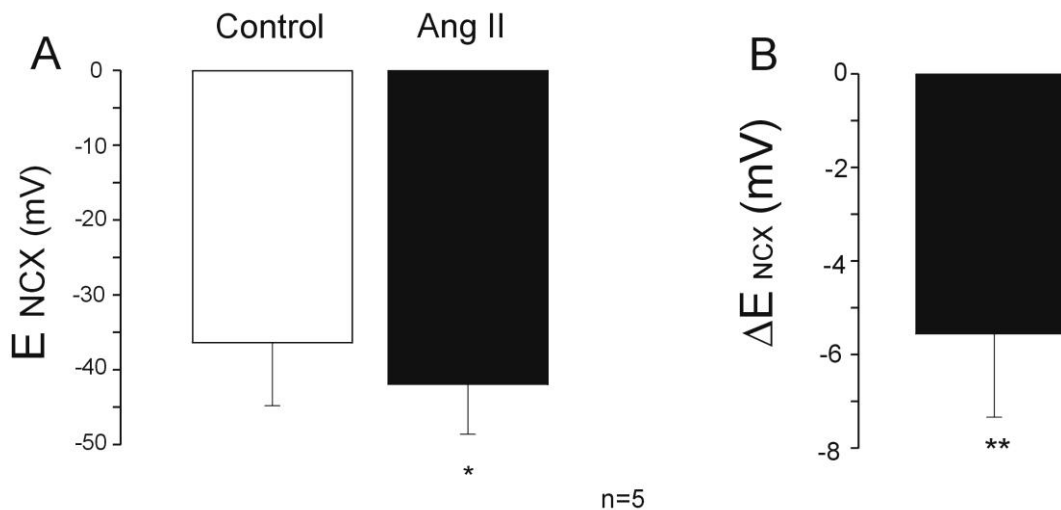
## Resultados



**Figura 39:** Efecto de la Ang II 100 nM sobre  $I_{NCX}$  a 30 °C. Promedio de la densidad de corriente sensible a KB-R 7943 10  $\mu$ M en función del voltaje en condiciones control y luego de adicionar Ang II 100 nM a 30 °C (n=5). (\* indica diferencia significativa respecto a l control).

Si bien no hay diferencias en el nivel de la densidad de  $I_{NCX}$  basal a ambas temperaturas (a +60 mV  $2.03 \pm 0.18$  pA/pF a temperatura ambiente vs  $1.84 \pm 0.22$  pA/pF a 30°C NS) existen diferencias en la magnitud del efecto de Ang II 100 nM. A diferencia de lo que ocurre a temperatura ambiente la Ang II 100 nM a 30°C incrementa significativamente la densidad de  $I_{NCX}$  en potenciales en los que el NCX está actuando en el modo directo (desde -60 mV y hasta -100 mV). Por otro lado a 30°C la Ang II incrementa significativamente  $I_{NCX}$  outward (modo inverso) a potenciales en los cuales no lo hacía a temperatura ambiente (desde -30 mV a +10 mV). Además a 30°C la Ang II produce un desplazamiento del  $E_{NCX}$  hacia valores negativos no observado a temperatura ambiente. En el panel A de la figura 40 se observa como a 30 °C la Ang II produce un desplazamiento significativo del  $E_{NCX}$  hacia valores negativos. El  $E_{NCX}$  es medido como el potencial en donde la  $I_{NCX}$  observada es cero. En el panel B de la figura 40 se muestra el valor promedio

del desplazamiento del  $E_{NCX}$  luego de tratar a las células con Ang II 100 nM. En promedio el desplazamiento fue de  $-5.56 \pm 1.78$  (n=5), valor que se encuentra en el orden de magnitud del desplazamiento del  $E_{NCX}$  producido por la ET-1 1 nM.



**Figura 40:** Efecto sobre el  $E_{NCX}$  de la Ang II 100 nM 30°C. Panel A: Valores promedios del  $E_{NCX}$  medidos como nivel de corriente cero en la corriente sensible a KB-R7943 10  $\mu$ M. Panel B: desplazamiento promedio del  $E_{NCX}$  provocado por la Ang II 100 nM (\* indica diferencia significativa respecto al control, \*\* indica diferencia significativa respecto de cero).

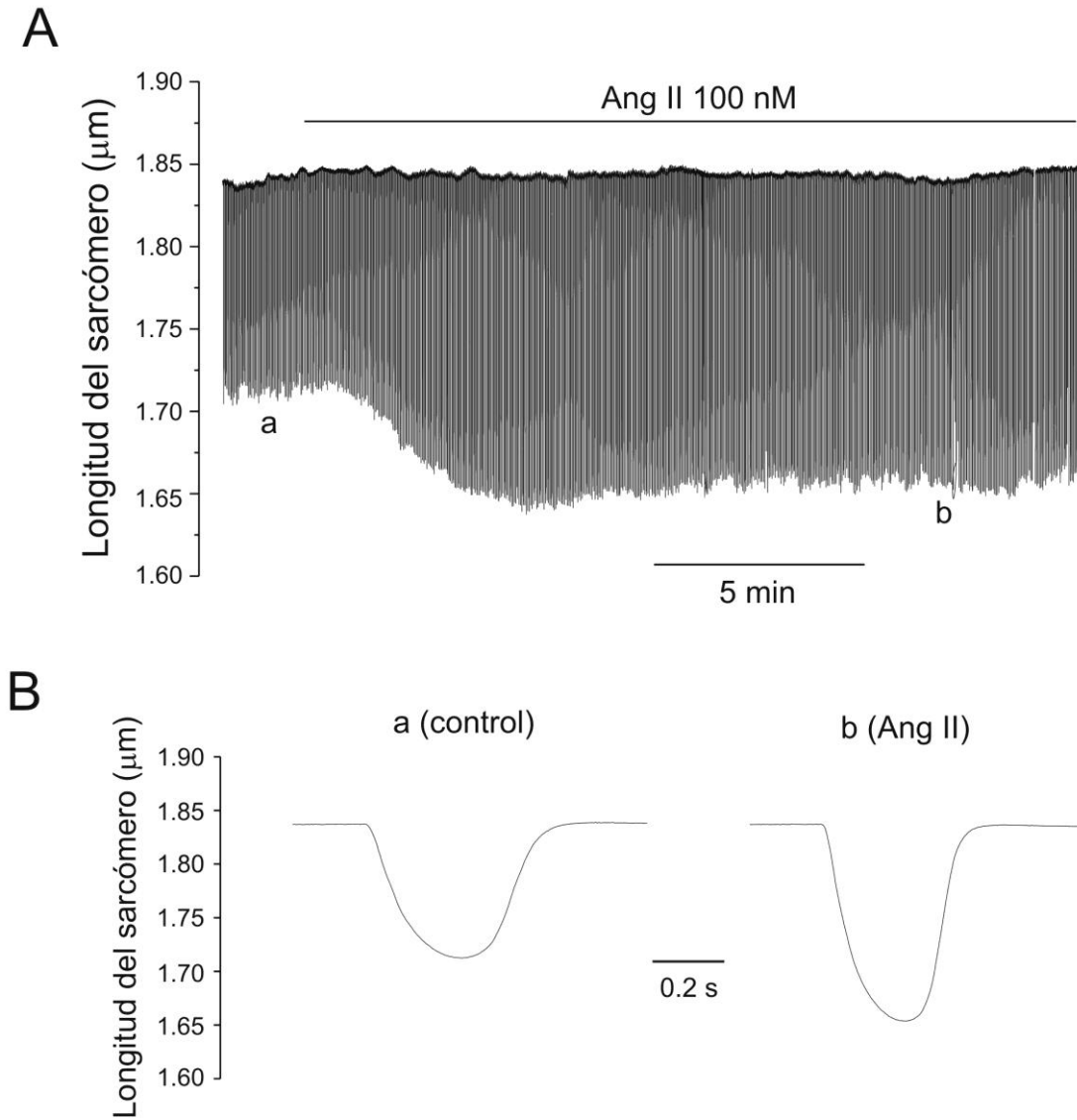
## Contractilidad y Ang II

### -Efecto de la Ang II sobre la longitud de sarcómero

A continuación medimos la longitud de sarcómero en miocitos aislados a una temperatura de 30°C en presencia y ausencia de Ang II 100 nM. La solución extracelular con la cual las células son perfundidas tiene como buffer al bicarbonato ( $HCO_3^-$ ), de manera que en la regulación del  $pH_i$  participan también los mecanismos  $HCO_3^-$  dependientes. Esto nos permitiría descartar modificaciones del  $pH_i$  inducidas por Ang II (198). Las células fueron estimuladas a una frecuencia de 0.5 Hz. La figura 41 muestra la longitud del sarcómero registrada



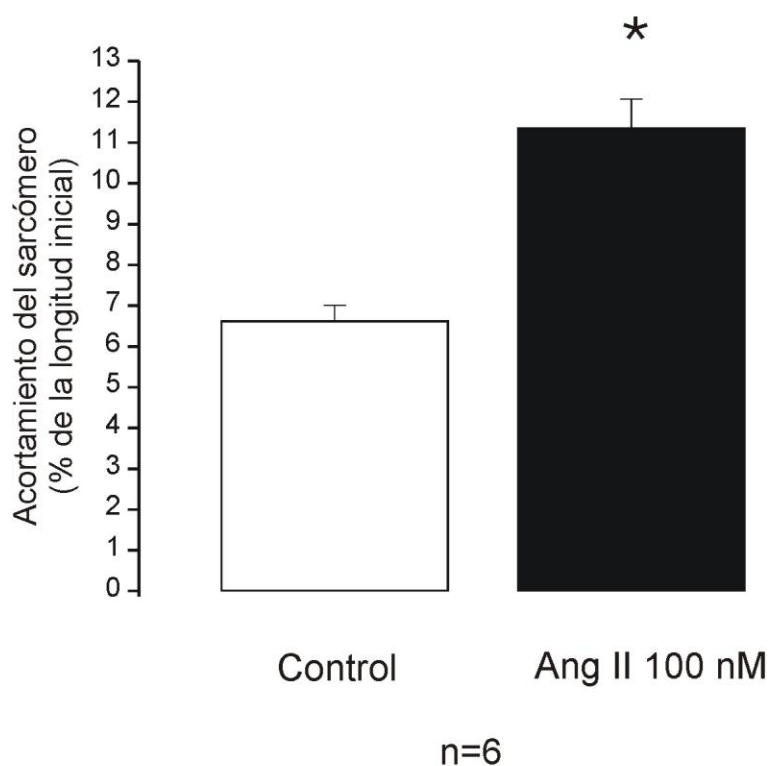
continuamente en función del tiempo. La Ang II 100 nM se agregó en el medio extracelular.



**Figura 41:** Efecto de la Ang II 100 nM sobre la longitud de sarcómero. En el panel A se observa un trazo representativo de la longitud de sarcómero antes y después del agregado de Ang II 100 nM en función del tiempo. La Ang II alcanza el estado estacionario a los 12 minutos. En el panel B se muestran los puntos individuales indicados en el panel A.

La longitud de sarcómero empieza a aumentar aproximadamente luego de 2-3 minutos de adicionar la Ang II 100 nM, y alcanzando el estado estacionario a los 12-15 minutos. Por este último motivo todos los valores promedios que se presentan a continuación se realizaron con datos obtenidos en ese tiempo.

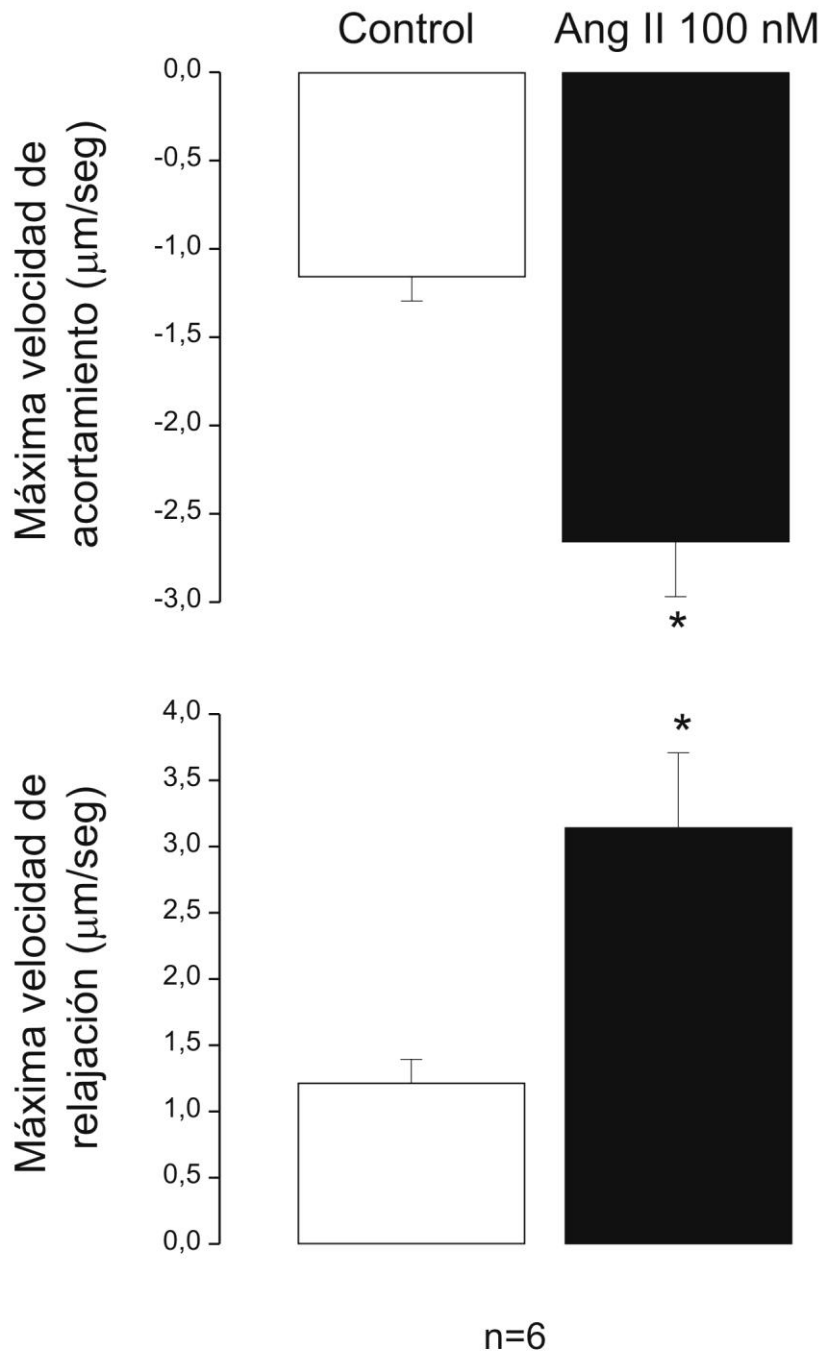
En la figura 42 se muestra el valor promedio del acortamiento del sarcómero, expresada como porcentaje respecto a la longitud de sarcómero inicial, antes y después de Ang II 100 nM. La Ang II 100 nM incrementó el acortamiento porcentual aproximadamente en un 70% (observar más adelante en la figura 50).



**Figura 42:** Promedio del efecto de la Ang II 100 nM. Promedio (n=6) del acortamiento del sarcómero antes (en blanco) y después del tratamiento con Ang II 100 nM (en negro). (\* indica significativamente diferente del control).

En los paneles superior e inferior de la figura 43 se muestran la máxima velocidad de acortamiento ( $-dL/dt$ ) y la máxima velocidad de relajación ( $+dL/dt$ ), respectivamente. La Ang II 100 nM incrementó significativamente ambas velocidades.

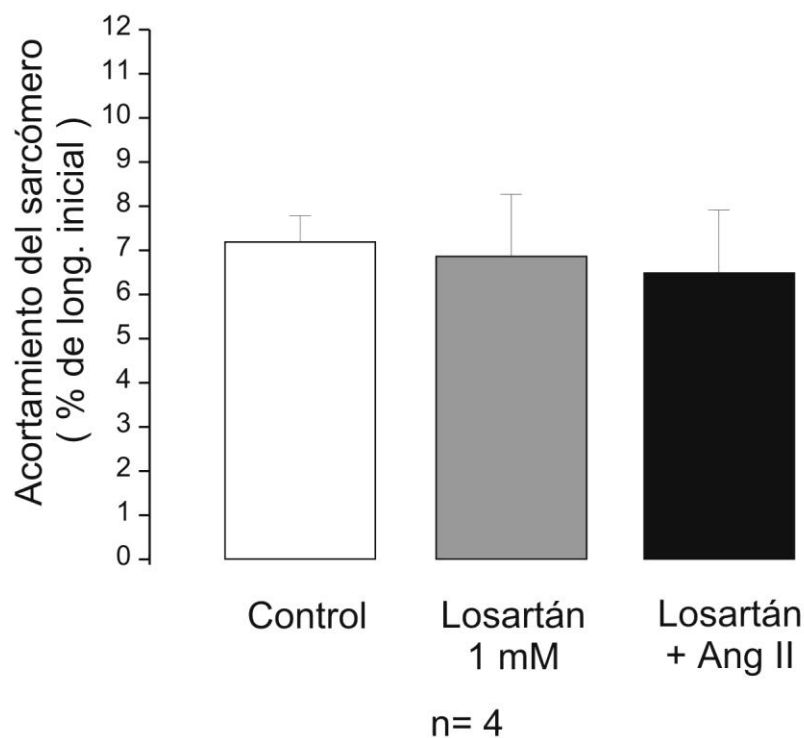
## Resultados



**Figura 43:** Promedio del efecto de la Ang II 100 nM. Promedio (n=6) de la máxima velocidad de acortamiento (panel superior) y de la máxima velocidad de relajación (panel inferior), antes (en blanco) y después del tratamiento con Ang II 100 nM (en negro). (\* indica significativamente diferente del control).

- Efecto de la Ang II 100 nM en presencia de losartán.

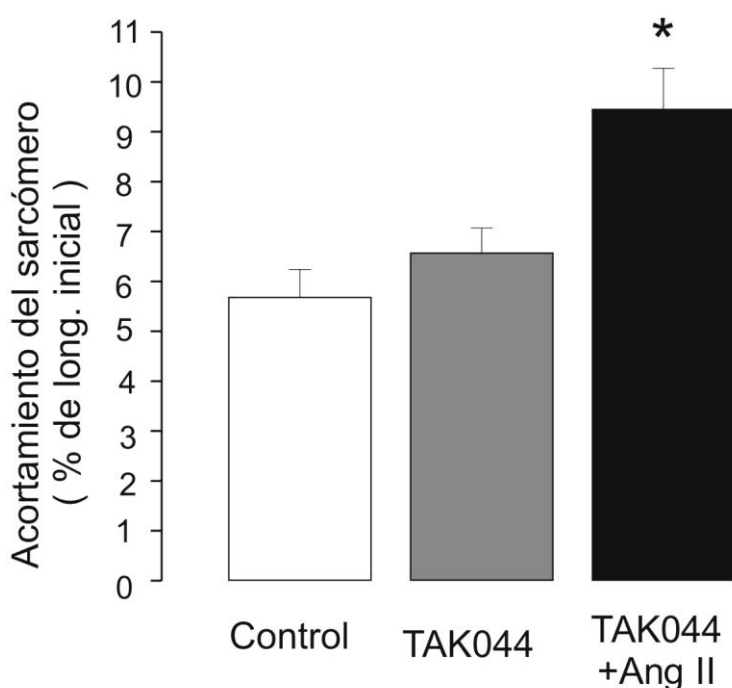
De manera de conocer cuales son los receptores de Ang II involucrados en el EIP de este octapéptido, pretratamos a las células con el bloqueante AT1, losartán (Los). En la figura 44 se observa el acortamiento porcentual (respecto a la longitud inicial) del sarcómero en condiciones control y luego de la sucesiva adición en el medio extracelular de Los y Ang II 100 nM. Como se puede observar cuando las células son pretratadas con Los, la Ang II no incrementa el acortamiento porcentual del sarcómero, indicándonos que el receptor involucrado en el EIP de la Ang II es el AT1. El Los no afecta el acortamiento porcentual basal.



**Figura 44:** Promedio del efecto de Ang II en presencia de Los. Promedio (n=4) del acortamiento del sarcómero antes (en blanco) y después la sucesiva adición de Los (en gris) y Ang II (en negro).

*-Efecto de Ang II en presencia de TAK044.*

Con el fin de evaluar si la vía autocrina Ang II/ET participa en el EIP de la Ang II en miocitos aislados, evaluamos la longitud del sarcómero pre-tratando las células con TAK044 1  $\mu$ M. En la figura 45 se observa el promedio del acortamiento porcentual del sarcómero antes y después de la sucesiva adición de TAK044 y Ang II 100 nM al medio extracelular a 30°C.



**Figura 45:** Efecto de la Ang II sobre la longitud de sarcómero en presencia de TAK044. Promedio (n=6) del acortamiento del sarcómero antes y después la sucesiva adición de TAK044 y Ang II. (\* indica significativamente diferente del control y de TAK044).

En presencia de TAK044 la Ang II 100 nM produce un EIP de menor magnitud que el observado sin el bloqueante. En ausencia de TAK044 la Ang II produce un incremento del acortamiento porcentual de aproximadamente un 70%, sin embargo cuando está presente el bloqueante  $ET_A/ET_B$  la Ang II incrementa el acortamiento porcentual en aproximadamente un 40% (figura 50). Por lo tanto

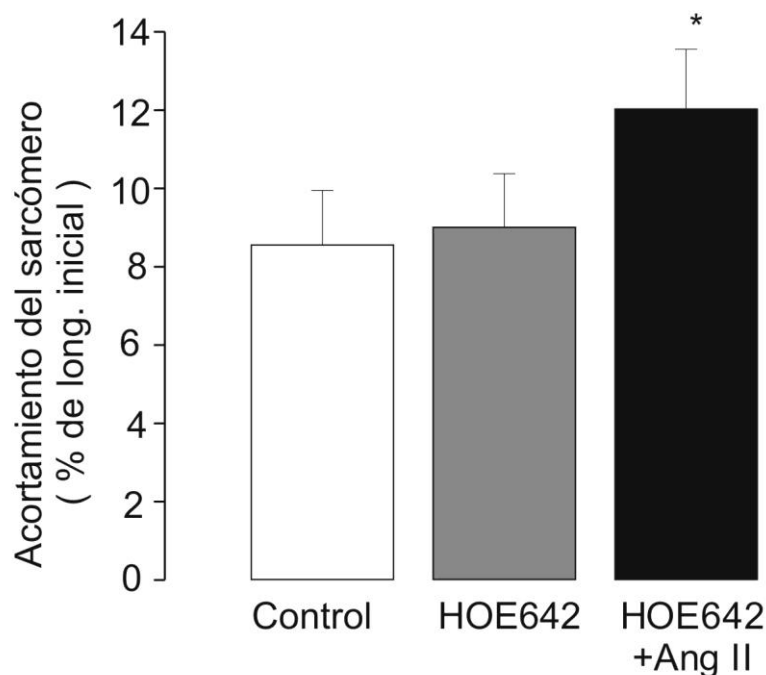
podemos asumir que la vía autocrina Ang II/ET esta involucrada, al menos en parte, en el EIP de la Ang II.

En presencia de TAK044 la Ang II incrementa tanto la máxima velocidad de acortamiento y de relajación. Sin embargo el incremento producido sobre estos dos parámetros es de menor proporción cuando hay TAK044 en la solución de perfusión ( $-dL/dt = -2.66 \pm 0.31$  con Ang II 100 nM y  $-1.72 \pm 0.27$  con TAK044+Ang II 100 nM  $p < 0.05$ ;  $+dL/dt = 3.14 \pm 0.55$  con Ang II 100 nM y  $1.43 \pm 0.24$  con TAK044+Ang II 100 nM  $p < 0.05$ ).

*-Efecto de Ang II en presencia de HOE642.*

Con el objeto de evaluar si la estimulación del NHE por la vía autocrina Ang II/ET cumple algún rol en el EIP producido por la Ang II 100 nM utilizamos el bloqueante del NHE, HOE642. Para hacer las medidas pretratamos a las células con el HOE642 monitoreando continuamente la longitud del sarcómero. En presencia de HOE642 la Ang II 100 nM produce un EIP de menor magnitud que el observado sin el bloqueante (figura 46). En ausencia de HOE642 la Ang II produce un incremento del acortamiento porcentual de aproximadamente un 70%, sin embargo cuando está presente el bloqueante del NHE la Ang II incrementa el acortamiento porcentual en aproximadamente un 36% (figura 50). Por lo tanto podemos asumir que el NHE está involucrado, al menos en parte, en el EIP de la vía autocrina Ang II/ET.

## Resultados

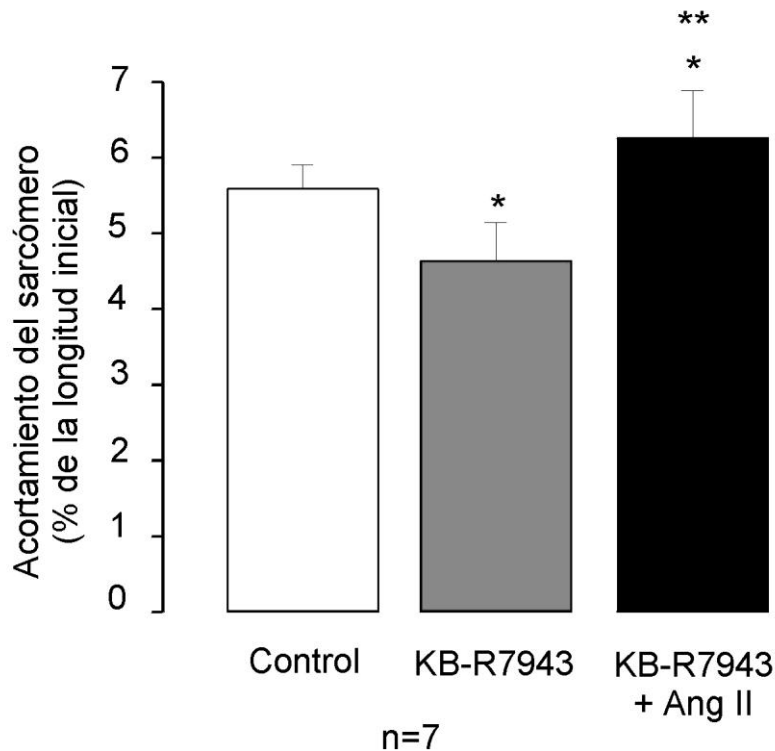


**Figura 46:** Efecto de la Ang II sobre la longitud de sarcómero en presencia de HOE642 10  $\mu$ M. Promedio (n=6) del acortamiento del sarcómero antes y después la sucesiva adición de HOE642 y Ang II. (\* indica significativamente diferente del control y de HOE642).

### *-Efecto de Ang II en presencia de KB-R7943*

Con el objeto de evaluar el rol del NCX actuando en el modo inverso en el EIP producido por la Ang II 100 nM utilizamos el bloqueante del modo inverso NCX, KB-R7943. Para hacer las medidas las células fueron pretratadas con el KB-R7943 1 $\mu$ M monitoreando continuamente la longitud del sarcómero y luego de 10 minutos se agregó la Ang II 100 nM. Como puede observarse en la figura 47 en presencia de KB-R7943 la Ang II 100 nM produce un EIP de menor magnitud que el observado sin el bloqueante. En ausencia de KB-R7943 la Ang II produce un incremento del acortamiento porcentual de aproximadamente un 70%, sin embargo cuando está presente el bloqueante del modo inverso del NCX la Ang II

incrementa el acortamiento porcentual en aproximadamente un 35% (figura 50). Por lo tanto podemos asumir que el modo inverso del NCX está involucrado, al menos en parte, en el EIP de la vía autocrina Ang II/ET.

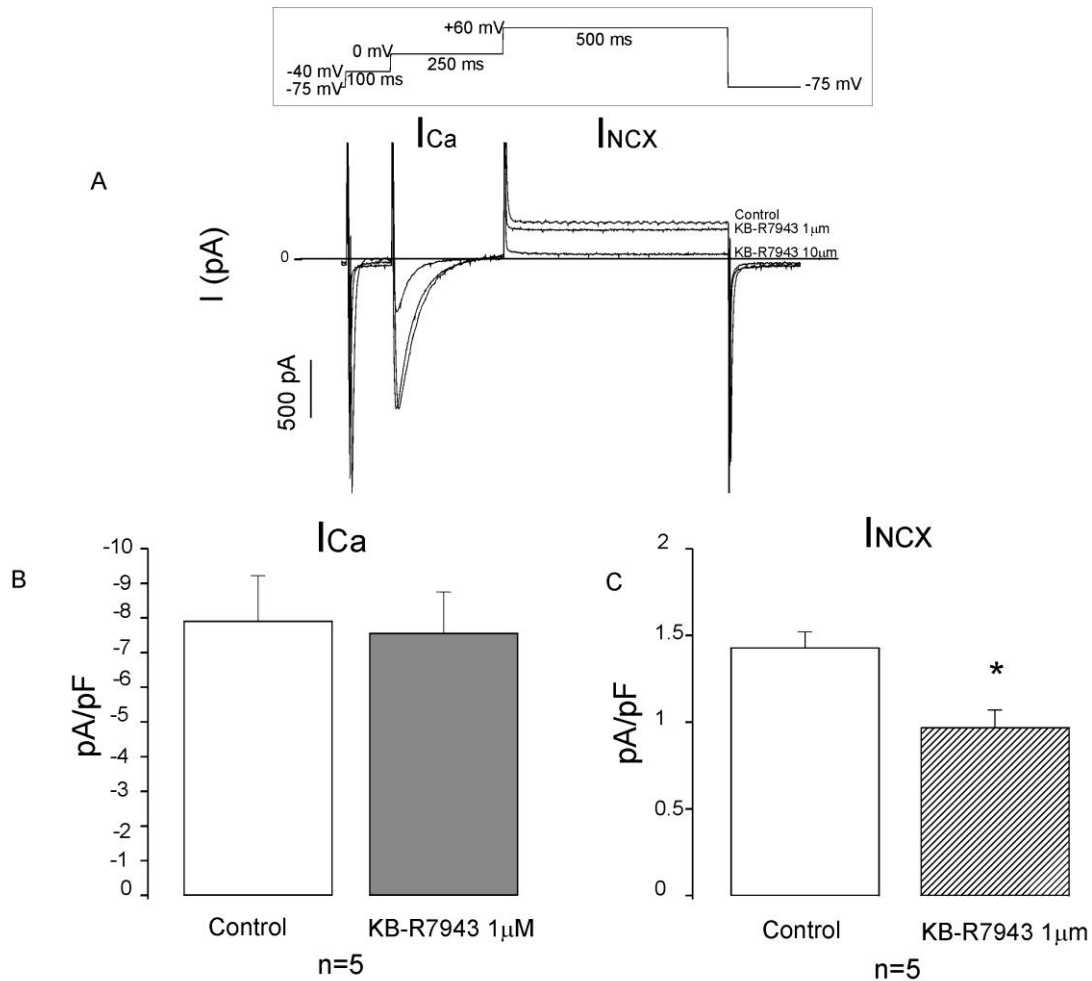


**Figura 47:** Efecto de la Ang II sobre la longitud de sarcómero en presencia de KB-R7943 1  $\mu$ M. Promedio (n=7) del acortamiento del sarcómero antes y después la sucesiva adición de KB-R7943 y Ang II 100 nM. (\* indica significativamente diferente del control y \*\* de indica significativamente diferente de KB-R7943).

Existe evidencia previa que muestra que la dosis de KB-R7943 usada en los experimentos de contractilidad del presente trabajo bloquea el modo inverso del NCX en miocitos cardíacos intactos de gato (201). Como puede observarse en la figura 47 el KB-R7943 disminuye significativamente la longitud de sarcómero basal. Este resultado podría deberse a la potencial contribución del modo inverso del NCX a la contracción basal de los miocitos cardíacos de gato o a efectos inespecíficos del KB-R7943, como por ejemplo inhibición de  $I_{Ca}$ . Ha sido descrito una acción depresora del KB-R7943 sobre  $I_{Ca}$ , aunque a dosis superiores de este



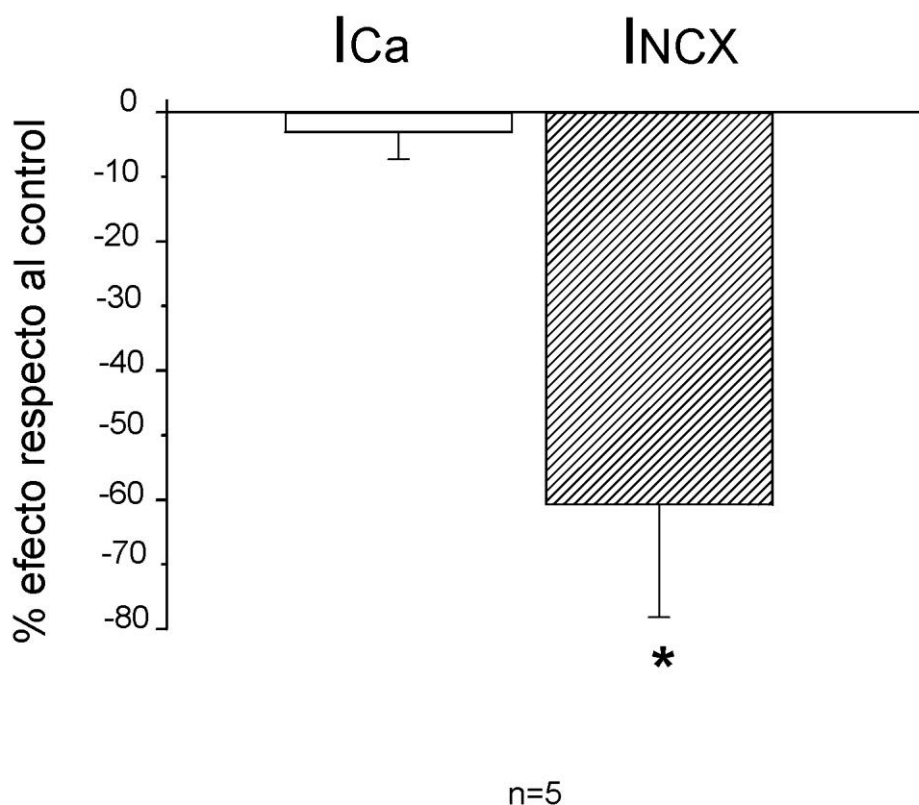
bloqueante (66) a las utilizadas en los experimentos de acortamiento de la longitud del sarcómero realizadas en el presente estudio. De todas maneras para evitar interpretaciones erróneas de los datos, se realizaron experimentos en los cuales se registró simultáneamente  $I_{Ca}$  e  $I_{NCX}$  en presencia y ausencia de KB-R7943  $1\mu\text{M}$  y  $10\mu\text{M}$ .



**Figura 48:** Efecto del KB-R7943 sobre  $I_{Ca}$  e  $I_{NCX}$ . En el recuadro superior se observa el protocolo de voltaje utilizado para obtener ambas corrientes simultáneamente. Panel A: trazo representativo del registro de  $I_{Ca}$  e  $I_{NCX}$  simultáneamente antes y después de adicionar sucesivamente al medio extracelular KB-R7943  $1\mu\text{M}$  y  $10\mu\text{M}$ . Panel B: promedio de la densidad de  $I_{Ca}$  control y con KB-R7943  $1\mu\text{M}$ . Panel C: promedio de la densidad de  $I_{NCX}$  control y en presencia de KB-R7943  $1\mu\text{M}$ . (\* indica significativamente diferente respecto al control).

En los experimentos de la figura 48 se utilizaron las mismas soluciones de pipeta y de perfusión que en los experimentos previos de patch-clamp en los que se midió  $I_{NCX}$  con la excepción de la adición de nifedipina al medio extracelular.

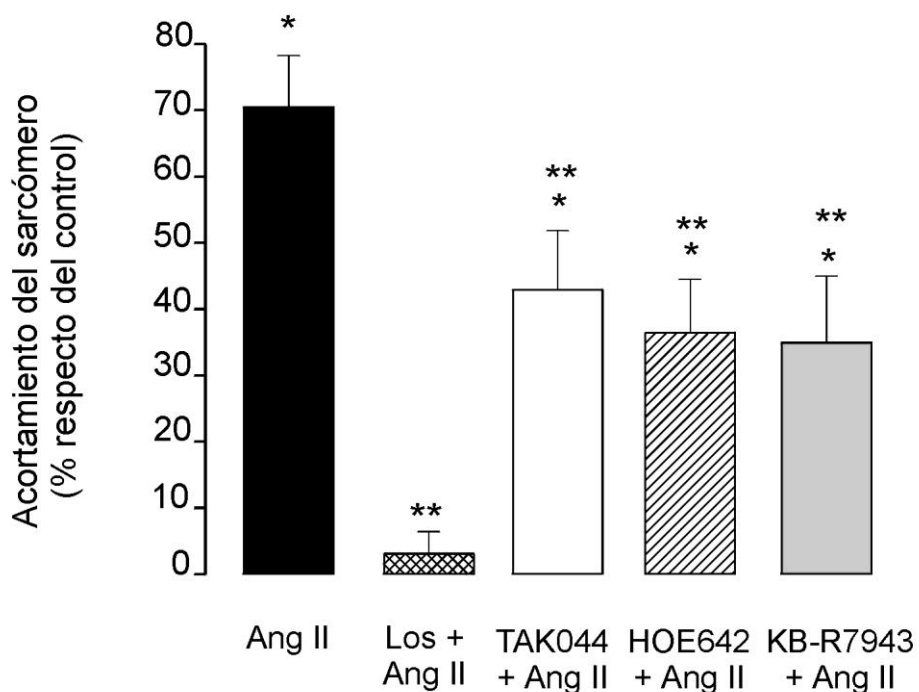
En el panel A de la figura 48 se observa un trazo representativo del registro simultáneo de  $I_{Ca}$  e  $I_{NCX}$  antes y después de la sucesiva adición de KB-R7943 1  $\mu$ M y KB-R7943 10  $\mu$ M. En el recuadro de la figura 48 se observa el protocolo de voltaje utilizado para obtener ambas corrientes en simultáneo. La  $I_{Ca}$  se registró a 0 mV y la  $I_{NCX}$  a +60 mV. En el panel B se observa el promedio (n=5) de la densidad de  $I_{Ca}$  antes y después de adicionar KB-R7943 1  $\mu$ M. Dicha concentración del bloqueante del modo inverso del NCX, la cual utilizamos en los experimentos realizados en miocitos intactos para evaluar la longitud de sarcómero, no afecta la densidad de  $I_{Ca}$  (figura 49).



**Figura 49:** Efecto del KB-R7943 sobre  $I_{Ca}$  e  $I_{NCX}$ . Efecto porcentual del KB-R7943 1  $\mu$ M sobre  $I_{Ca}$  e  $I_{NCX}$ .

Este último resultado indicaría que la depresión de la contractilidad basal por KB-R7943 no es debida a un efecto inespecífico del bloqueante sobre  $I_{Ca}$ . Por otro lado cuando utilizamos KB-R7943  $1 \mu\text{M}$  la densidad de  $I_{NCX}$  disminuye un 30% aproximadamente (panel C de la figura 48 y figura 49). La dosis más alta de KB-R7943 utilizada,  $10\mu\text{M}$ , bloquea ambas corrientes:  $I_{Ca}$  aproximadamente un 50% e  $I_{NCX}$  casi por completo (panel A de la figura 48).

Resumiendo en la figura 50 se muestra el efecto porcentual sobre la longitud de sarcómero de la Ang II 100 nM en ausencia y en presencia de Los, TAK044 HOE642 y KB-R7943. La Ang II incrementa aproximadamente un 70% la longitud de sarcómero.



**Figura 50:** *Acortamiento del sarcómero respecto al control.* Efecto porcentual de la Ang II 100 nM (en negro, n=6), Ang II+Los (cuadriculado, n=4), Ang II+TAK044 (en blanco, n=6), Ang II+HOE642 (rayado, n=6) y KB-R7943 (en gris, n=7). (\* indica significativamente diferente respecto a cero, \*\* indica significativamente diferente a Ang II, por ANOVA de una sola vía para muestras no apareadas seguido de un test de Student-Newman-Keuls).

## Resultados

En presencia de Los la Ang II no incrementa la longitud de sarcómero. Cuando las células son pretratadas con TAK044, HOE642 o KB-R7943 la Ang II produce un aumento en la longitud de sarcómero que alcanza en los tres casos un nivel similar (34-40%), sugiriendo que forman parte de la misma vía de señalización intracelular.

## Discusión

## DISCUSIÓN

Los resultados principales del presente estudio de tesis pueden resumirse brevemente de la siguiente forma:

- 1- La Ang II 100 nM incrementa la densidad de  $I_{NCX}$  a través de la acción de la ET endógena liberada por el octapéptido. El aumento de la  $I_{NCX}$  produce un aumento en la contractilidad.
- 2- El EIP de la Ang II es abolido cuando se bloquean los receptores AT1 con losartán. Cuando se bloquean los receptores de ET con TAK044, cuando se inhibe el NHE con HOE642 o cuando se inhibe el modo inverso del NCX con KB-R7943, el EIP de la Ang II es bloqueado parcialmente hasta aproximadamente un mismo nivel.
- 3- La ET-1 en forma dosis dependiente produce un incremento en la densidad de  $I_{NCX}$  y un desplazamiento del  $E_{NCX}$  hacia valores negativos. El desplazamiento del  $E_{NCX}$  es prevenido cuando las células son pre-tratadas con el HOE642 mientras que el incremento de  $I_{NCX}$  outward es disminuído por este bloqueante.

Nosotros consideramos que el resultado más importante de este estudio es la demostración de la existencia de un mecanismo autocrino en células cardíacas mediante el cual la Ang II produce la liberación de ET endógena que a su vez estimula el NCX. Para llegar a esta conclusión nos basamos en el hecho de que dos bloqueantes de receptores de ET (bloqueantes  $ET_A/ET_B$ ) no relacionados estructuralmente, TAK044 y PD142,890, son capaces de prevenir y revertir el aumento de  $I_{NCX}$  inducido por la Ang II. La unión de estos bloqueantes a los receptores de Ang II fue descartada. Los efectos de la Ang II sobre la  $I_{Ca}$  no son afectados en presencia de TAK044 en cardiomiocitos aislados de gato. Adicionalmente, dado que los efectos de Ang II sobre  $I_{NCX}$  son totalmente bloqueados por el antagonista AT1, losartán, concluimos que los receptores AT2 no participan del mecanismo autocrino Ang II/ET.

Los mecanismos subcelulares que median la liberación de ET endógena por Ang II y el aumento de  $I_{\text{NCX}}$  no fueron evaluados en este estudio. Recientemente nuestro grupo de trabajo ha informado que la segunda fase del aumento de fuerza inducida por el estiramiento miocárdico es debida a la estimulación del modo inverso del NCX por ET (146). La ET es el efector final de una cadena de eventos en donde el estiramiento induce la liberación de Ang II que activa los receptores AT1, produciendo la liberación y/o aumento de producción de ET, activación de receptores  $\text{ET}_A$ , estimulación del NHE y aumento de la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  ( $[\text{Na}^+]_i$ ). Este cambio en la  $[\text{Na}^+]_i$  desplaza el balance termodinámico del NCX, promoviendo el modo inverso del NCX incrementando el  $\text{Ca}^{+2}_i$  y la fuerza de contracción. Por otra parte, Ballard y Schaffer (34) han descripto que la ET-1 incrementa directamente (de manera independiente de los cambios en el  $\text{Na}^+_i$ ) la actividad del NCX en vesículas sarcolemales cardíacas caninas. En conjunto estos resultados sustentan los datos presentados en el presente estudio ya que hemos demostrado que la ET-1 produce un desplazamiento negativo del  $E_{\text{NCX}}$  consistente con un incremento del  $\text{Na}^+_i$  (sensible a la inhibición del NHE) y un incremento directo de la  $I_{\text{NCX}}$  independiente del desplazamiento negativo del  $E_{\text{NCX}}$  (insensible a la inhibición del NHE).

Utilizando miocitos cardíacos intactos, en el presente estudio se demostró que parte del efecto inotrópico positivo de la Ang II 100 nM es bloqueado por la inhibición de los receptores de ET con TAK044. Estos resultados indican que la vía autocrina Ang II/ET participa del bien conocido EIP de la Ang II. Adicionalmente, los resultados electrofisiológicos obtenidos en el presente estudio nos permitieron avizorar que el incremento en la contractilidad era, al menos en parte, la consecuencia de la activación del NHE y del modo inverso del NCX. Esta hipótesis fue confirmada por los experimentos mecánicos en los cuales la inhibición de estos mecanismos disminuyeron el EIP inducido por la Ang II 100 nM. El hecho de que el bloqueo de los receptores de ET, del NHE o del modo inverso del NCX deprimieron de manera similar el EIP de la Ang II 100 nM sugiere que el componente de este EIP disparado por la ET endógena es enteramente debido a la activación del NHE y del modo inverso del NCX. Debido a que los

experimentos de contractilidad fueron realizados en presencia del buffer fisiológico  $\text{HCO}_3^-$ , proponemos que la activación del NHE produce un aumento del  $\text{Na}^+_i$  en ausencia de cambios en el  $\text{pH}_i$  (ver explicación más adelante), que consecuentemente favorece el modo inverso del NCX, el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  y el aumento de la contractilidad.

En el presente trabajo de tesis no se pretendió evaluar el mecanismo responsable de la fracción del EIP inducido por Ang II no mediada por la activación de la vía Ang II/ET/NHE/modo inverso del NCX. Sin embargo basándonos en evidencias previas (184,202), la activación de  $I_{\text{Ca}}$  por Ang II podría ser el mecanismo responsable de la fracción del EIP inducido por esta hormona independiente de ET/NHE/modo inverso del NCX.

Los datos electrofisiológicos obtenidos en el presente estudio determinaron que la ET-1 incrementa el modo inverso del NCX mediante dos mecanismos, uno dependiente del aumento del  $\text{Na}^+_i$  por activación del NHE, y otro independiente del  $\text{Na}^+_i$  por estimulación directa del NCX. Sin embargo, el hecho de que la inhibición del NHE en los experimentos de contractilidad deprime el EIP de la Ang II hasta un nivel similar al que producen la inhibición del modo inverso del NCX o el bloqueo de los receptores de ET sugiere que todo el EIP inducido por la ET endógena es debido a la activación del mecanismo  $\text{Na}^+_i$ -dependiente. Sin embargo existe la posibilidad de que el efecto  $\text{Na}^+_i$ -independiente se ponga en evidencia únicamente luego del incremento del  $\text{Na}^+_i$ , convirtiendo a este último mecanismo en imprescindible pero no exclusivo para el desarrollo del EIP inducido por la ET endógena. En otras palabras, el efecto directo  $\text{Na}^+_i$ -independiente sólo podría observarse una vez que el NCX se estableció en su modo inverso gracias al incremento de  $\text{Na}^+_i$  por activación del NHE. Esta hipótesis fue confirmada por experimentos recientes realizados en músculos papilares de gato en los cuales se incrementó el  $\text{Na}^+_i$  mediante la inhibición de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa previamente a la estimulación por ET-1 en la continua presencia de la inhibición del NHE (200).

Los resultados del presente estudio de tesis están sustentados por evidencias previas. Se ha descrito, en miocitos cardíacos de conejo, que la estimulación del modo inverso del NCX por Ang II (72) o por ET-1 (73) produce un



efecto inotrópico positivo. Adicionalmente nuestro grupo de trabajo ha demostrado que el EIP inducido por Ang II 1 nM en músculos papilares de gato es totalmente cancelado por inhibición de los receptores de ET o del NCX (198). Contrariamente, resultados previos de Vila-Petroff y colaboradores no habían podido demostrar la participación del NCX en el efecto inotrópico positivo inducido por la Ang II 1  $\mu$ M en miocitos cardíacos de gato (202). Una posible explicación para esta discrepancia podría ser, además de la diferencia en las dosis de Ang II utilizadas, la temperatura a la cual fueron realizados los experimentos, ya que los resultados en papilares (198) y miocitos (202) de gato fueron obtenidos a 30°C y a temperatura ambiente, respectivamente. Wassertrom y Vites han descrito que la contribución del modo inverso del NCX en la contracción basal de miocitos cardíacos de gato está sólo presente a temperaturas mayores de 30°C (197). Es importante remarcar que en los resultados electrofisiológicos del presente estudio que fueron obtenidos a temperatura ambiente el aumento significativo de  $I_{\text{NCX}}$  por Ang II fue observado a partir de +20 mV. En cambio cuando los experimentos se realizaron a 30°C el aumento de  $I_{\text{NCX}}$  por Ang II fue significativo a partir de -40 mV. Es decir, el efecto de la Ang II dentro del rango de potenciales fisiológicos de la célula se vio incrementado cuando se trabajó a 30°C.

Según lo descrito por Kimura y colaboradores (168) el  $E_{\text{NCX}}$  se acomoda al valor de potencial sostenido utilizado en el protocolo de voltaje para obtener la  $I_{\text{NCX}}$  como reflejo de la actividad del NCX al potencial establecido, que participa de los flujos transarcolemales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^{+}$  hasta alcanzar un equilibrio. Estas conclusiones están de acuerdo con el valor de  $E_{\text{NCX}}$  encontrado en el presente estudio cuando  $I_{\text{NCX}}$  se registró utilizando pulsos cuadrados despolarizantes (potencial sostenido=-40 mV;  $E_{\text{NCX}}$  promedio=-39 $\pm$ 1 mV). Sin embargo, en el protocolo de rampas descendentes utilizado en el presente trabajo, en el cual el potencial sostenido fue de -80 mV, encontramos un  $E_{\text{NCX}}$  similar al obtenido utilizando un potencial sostenido de -40 mV (-39.1 $\pm$ 4,1 mV). Es posible que al ser una rampa descendente, es decir que va de potenciales positivos a negativos, al comenzar a potenciales en donde funciona el modo inverso del NCX se podría estar incrementando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}_i$  en el espacio subsarcolemal. Este

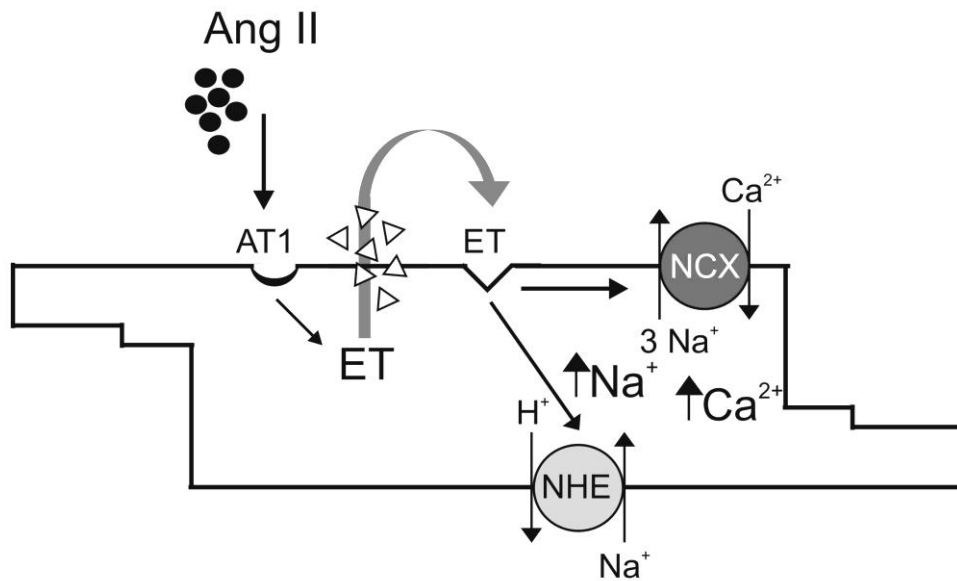
aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  podría hacer que el  $E_{\text{NCX}}$  se mueva hacia valores menos negativos oponiéndose a la acomodación observada en otro tipo de protocolos. Consistentemente, Zhang y colaboradores encontraron un valor de  $E_{\text{NCX}}$  cercano a -40 mV utilizando protocolos de rampas descendentes similares a los que usamos aquí (37). Más aún, Kimura y colaboradores (168) determinaron valores de  $E_{\text{NCX}}$  de aproximadamente -40 mV y -80 mV utilizando rampas descendentes y ascendentes, respectivamente, desde un potencial sostenido de -80 mV en ambos casos. Cabe aclarar por último que, a menos que se realicen los experimentos en presencia de tetrodotoxina, no es conveniente utilizar rampas ascendentes rápidas para medir  $E_{\text{NCX}}$  ya que la corriente de  $\text{Na}^+$  interfiere con los registros.

En el presente trabajo nosotros demostramos que la ET-1 produce un desplazamiento del  $E_{\text{NCX}}$  sensible al HOE642. Este desplazamiento es causado por el incremento de la  $[\text{Na}^+]_i$  debido a la activación del NHE por la ET-1. Un factor importante de remarcar es que en nuestros experimentos de patch-clamp utilizamos ouabaína en la solución extracelular para bloquear a la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa con el objetivo de evitar la contaminación de los registros de la  $I_{\text{NCX}}$  con la corriente generada por esta bomba. Sería pertinente plantearse si en condiciones fisiológicas en donde la bomba está funcionando este incremento de la  $[\text{Na}^+]_i$  llega a producirse. Sin embargo en los experimentos realizados en músculos papilares de gato en ausencia de ouabaína se demostró por técnicas de epifluorescencia que la Ang II y la ET-1 producen un aumento similar de la  $[\text{Na}^+]_i$  al estimado en el presente estudio en miocitos aislados. También en el presente trabajo de tesis se observó que el EIP de la Ang II 100 nM tiene un componente sensible al HOE642. Ambas observaciones indican que aún en condiciones en las cuales la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa está funcionando normalmente, la Ang II o la ET-1 son capaces de producir un incremento de la  $[\text{Na}^+]_i$  por activación del NHE que consecuentemente produce un desplazamiento del  $E_{\text{NCX}}$  y aumento de la contractilidad.

El acortamiento celular se ve influenciado por cambios en el  $\text{pH}_i$ . Es conocido el efecto del cambio de la sensibilidad de las proteínas contráctiles por el  $\text{pH}_i$  (203). La Ang II activa a la vez en miocardio mecanismos acidificantes y alcalinizantes. En músculos papilares de gato ha sido demostrado que la Ang II

produce aumento de  $\text{Na}^+_i$  y alcalinización secundarias a la activación del NHE, solo si se trabaja en HEPES (en ausencia de  $\text{HCO}_3^-$ ) (143). Por el contrario cuando se trabaja en presencia de  $\text{HCO}_3^-$  sólo se observa el incremento de  $\text{Na}^+_i$ , pues el mecanismo acidificante dependiente de  $\text{HCO}_3^-$  (intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ) también se activa por Ang II y evita el cambio de  $\text{pH}_i$  (144, 145). En las medidas de la longitud de sarcómero presentadas en el presente estudio se utilizó para perfundir las células una solución que contenía al buffer fisiológico. Por lo tanto en este caso no es probable que el  $\text{pH}_i$  se modifique por el tratamiento con Ang II. Contrariamente en las medidas de acortamiento celular realizadas simultáneamente con el registro de  $I_{\text{NCX}}$  (a +60 mV) la solución con la cual fueron perfundidos los miocitos carecía del buffer fisiológico,  $\text{HCO}_3^-$ , pudiendo entonces haber modificaciones del  $\text{pH}_i$  cuando se aplica la Ang II. Sin embargo en este grupo de experimentos las células están dializadas con la solución de pipeta la cual posee el buffer HEPES para mantener constante el  $\text{pH}_i$ . Adicionalmente estos resultados se obtuvieron a temperatura ambiente, condición en la cual no se observó desplazamiento negativo del  $E_{\text{NCX}}$  consistente con activación del NHE.

El mecanismo por el cual la Ang II libera o forma la ET no fue explorado en el presente estudio. Aunque existen controversias al respecto, la activación de la enzima convertidora de ET por Ang II podría constituir una explicación posible (196,204). Un estudio reciente realizado en miocitos de músculo liso vascular sugirió que la Ang II induce la formación de ET-1 a través de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y de la fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) (205).



**Figura 51:** Esquema de un miocito en donde se resumen las vías descritas en el texto.

La liberación de ET endógena inducida por Ang II fue previamente descrita en células neonatales de corazón de rata (140,196) y en músculo liso vascular de ratas adultas (206). Los resultados presentados en el presente estudio indican que este mecanismo está también presente en cardiomiocitos aislados de gatos adultos. Aunque sabemos que los miocitos son las células blanco de la ET endógena, al intentar dilucidar el tipo de células que producen la ET no podemos descartar totalmente una posible contaminación de los miocitos con fibroblastos (207) que podrían estar produciendo ET (mecanismo paracrino) (147,148). Consideramos que esto último es muy poco probable ya que no se detectaron fibroblastos luego de la disociación enzimática de los corazones. Además durante los registros, minimizamos la contaminación con cualquier otro tipo de células mediante una cuidadosa dilución de los miocitos en la cámara de trabajo. Por lo tanto proponemos la existencia de un mecanismo autocrino en el corazón en donde los miocitos son al mismo tiempo productores y blanco de la ET endógena. La figura 51 resume los resultados y las conclusiones del presente trabajo en donde se observa como la Ang II induce la producción y/o liberación de ET

endógena, que actuando de manera autocrina estimula la actividad del NHE, aumentando el  $\text{Na}^+_i$  y favoreciendo el modo inverso del NCX con el consecuente aumento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  y de la contractilidad. Se propone además el posible efecto directo ( $\text{Na}^+_i$ -independiente) de la ET endógena sobre el NCX.

## Referencias

## Referencias

1. Linck B, Qiu Z, He Z, Tong Q, Hilgemann DW, Philipson KD. Functional comparison of the three isoforms of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX1, NCX2, NCX3). *Am J Physiol.* 274: C415-23, 1998.
2. Nicoll DA, Longoni S, Philipson KD. Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Science.* 250(4980):562-5, 1990.
3. Li Z, Matsuoka S, Hryshko LV, Nicoll DA, Bersohn MM, Burke EP, Lifton RP. Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. Philipson KD. *J Biol Chem.* 269(26):17434-9, 1994.
4. Nicoll DA, Quednau BD, Qui Z, Xia YR, Lusic AJ, Philipson KD. Cloning of a third mammalian Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger, NCX3. *J Biol Chem.* 271(40):24914-21, 1996.
5. Komuro I, Wenninger KE, Philipson KD, Izumo S. Molecular cloning and characterization of the human cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(10):4769-73, 1992.
6. Koushik SV, Bundy J, Conway SJ. Sodium-calcium exchanger is initially expressed in a heart-restricted pattern within the early mouse embryo. *Mech Dev.* 88(1):119-22, 1999.
7. Boerth SR, Zimmer DB, Artman M. Steady-state mRNA levels of the sarcolemmal Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger peak near birth in developing rabbit and rat hearts. *Circ Res.* 74(2):354-9, 1994.
8. Studer R, Reinecke H, Vetter R, Holtz J, Drexler H. Expression and function of the cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in postnatal development of the rat, in experimental-induced cardiac hypertrophy and in the failing human heart. *Basic Res Cardiol.* 92 Suppl 1:53-8, 1997.
9. Vetter R, Studer R, Reinecke H, Kolar F, Ostadalova I, Drexler H. Reciprocal changes in the postnatal expression of the sarcolemmal Na<sup>+</sup>-Ca<sup>(2+)</sup>-exchanger and SERCA2 in rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 27(8):1689-701, 1995.

10. Koban MU, Moorman AF, Holtz J, Yacoub MH, Boheler KR. Expressional analysis of the cardiac Na-Ca exchanger in rat development and senescence. *Cardiovasc Res.* 37(2):405-23, 1998.
11. Moorman AF, Vermeulen JL, Koban MU, Schwartz K, Lamers WH, Boheler KR. Patterns of expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and phospholamban mRNAs during rat heart development. *Circ Res.* 76(4):616-25, 1995.
12. Klitzner TS, Chen FH, Raven RR, Wetzel GT, Friedman WF. Calcium current and tension generation in immature mammalian myocardium: effects of diltiazem. *J Mol Cell Cardiol.* 23(7):807-15, 1991.
13. Kieval RS, Bloch RJ, Lindenmayer GE, Ambesi A, Lederer WJ. Immunofluorescence localization of the Na-Ca exchanger in heart cells. *Am J Physiol.* 263(2 Pt 1):C545-50, 1992.
14. Frank JS, Mottino G, Reid D, Molday RS, Philipson KD. Distribution of the Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchange protein in mammalian cardiac myocytes: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study. *J Cell Biol.* 117(2):337-45, 1992
15. Chen F, Mottino G, Klitzner TS, Philipson KD, Frank JS. Distribution of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange protein in developing rabbit myocytes. *Am J Physiol.* 268(5 Pt 1):C1126-32, 1995.
16. Wetzel GT, Chen F, Klitzner TS. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange and cell contraction in isolated neonatal and adult rabbit cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 268(4 Pt 2):H1723-33, 1995.
17. Cook O, Low W, Rahamimoff H. Membrane topology of the rat brain Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Biochim Biophys Acta.* 1371(1):40-52, 1998.
18. Iwamoto T, Nakamura TY, Pan Y, Uehara A, Imanaga I, Shigekawa M. Unique topology of the internal repeats in the cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *FEBS Lett.* 446(2-3):264-8, 1999.
19. Nicoll DA, Ottolia M, Lu L, Lu Y, Philipson KD. A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Biol Chem.* 274(2):910-7, 1999.



20. Matsuoka S, Nicoll DA, Reilly RF, Hilgemann DW, Philipson KD. Initial localization of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(9):3870-4, 1993.
21. Hilgemann DW. Giant excised cardiac sarcolemmal membrane patches: sodium and sodium-calcium exchange currents. *Pflugers Arch*. 415(2):247-9, 1989.
22. Li Z, Nicoll DA, Collins A, Hilgemann DW, Filoteo AG, Penniston JT, Weiss JN, Tomich JM, Philipson KD. Identification of a peptide inhibitor of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Biol Chem*. 266(2):1014-20, 1991.
23. Chin TK, Spitzer KW, Philipson KD, Bridge JH. The effect of exchanger inhibitory peptide (XIP) on sodium-calcium exchange current in guinea pig ventricular cells. *Circ Res*. 72(3):497-503, 1993.
24. Schwarz EM, Benzer S. Calx, a Na-Ca exchanger gene of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(19):10249-54, 1997.
25. Iwamoto T, Uehara A, Imanaga I, Shigekawa M. The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger NCX1 has oppositely oriented reentrant loop domains that contain conserved aspartic acids whose mutation alters its apparent Ca<sup>2+</sup> affinity. *J Biol Chem*. 275(49):38571-80, 2000.
26. Nicoll DA, Hryshko LV, Matsuoka S, Frank JS, Philipson KD. Mutation of amino acid residues in the putative transmembrane segments of the cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *J Biol Chem*. 271(23):13385-91, 1996.
27. Doering AE, Nicoll DA, Lu Y, Lu L, Weiss JN, Philipson KD. Topology of a functionally important region of the cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *J Biol Chem*. 273(2):778-83, 1998.
28. Iwamoto T, Uehara A, Nakamura TY, Imanaga I, Shigekawa M. Chimeric analysis of Na(+)/Ca(2+) exchangers NCX1 and NCX3 reveals structural domains important for differential sensitivity to external Ni(2+) or Li(+). *Biol Chem*. 274(33):23094-102, 1999.
29. Iwamoto T, Kita S, Uehara A, Inoue Y, Taniguchi Y, Imanaga I, Shigekawa M. Structural domains influencing sensitivity to isothiourea derivative inhibitor KB-R7943 in cardiac Na(+)/Ca(2+) exchanger. *Mol Pharmacol*. 59(3):524-31, 2001.

30. Levitsky DO, Nicoll DA, Philipson KD. Identification of the high affinity Ca(2+)-binding domain of the cardiac Na(+)-Ca2+ exchanger. *J Biol Chem.* 269(36):22847-52, 1994.
31. Iwamoto T, Pan Y, Wakabayashi S, Imagawa T, Yamanaka HI, Shigekawa M. Phosphorylation-dependent regulation of cardiac Na+/Ca2+ exchanger via protein kinase C. *J Biol Chem.* 271(23):13609-15, 1996.
32. Stengl M, Mubagwa K, Carmeliet E, Flameng W. Phenylephrine-induced stimulation of Na+/Ca2+ exchange in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 38(3):703-10, 1998.
33. Iwamoto T, Pan Y, Nakamura TY, Wakabayashi S, Shigekawa M. Protein kinase C-dependent regulation of Na+/Ca2+ exchanger isoforms NCX1 and NCX3 does not require their direct phosphorylation. *Biochemistry.* 37(49):17230-8, 1998.
34. Ballard C, Schaffer S. Stimulation of the Na+/Ca2+ exchanger by phenylephrine, angiotensin II and endothelin 1. *J Mol Cell Cardiol.* 28(1):11-7, 1996.
35. Ruknudin A, He S, Lederer WJ, Schulze DH. Functional differences between cardiac and renal isoforms of the rat Na+-Ca2+ exchanger NCX1 expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 529 Pt 3:599-610, 2000.
36. Zhang YH, James AF, Hancox JC. Regulation by endothelin-1 of Na+-Ca2+ exchange current (I(NaCa)) from guinea-pig isolated ventricular myocytes. *Cell Calcium.* 30(5):351-60, 2001.
37. Ruknudin A, Schulze DH. Phosphorylation of the Na+/Ca2+ exchangers by PKA. *Ann N Y Acad Sci.* 976:209-13, 2002.
38. Schulze DH, Muqhal M, Lederer WJ, Ruknudin AM. Sodium/calcium exchanger (NCX1) macromolecular complex. *J Biol Chem.* 278(31):28849-55, 2003.
39. Katanosaka Y, Iwata Y, Kobayashi Y, Shibasaki F, Wakabayashi S, Shigekawa M. Calcineurin inhibits Na+/Ca2+ exchange in phenylephrine-treated hypertrophic cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 280(7):5764-72, 2005.

40. Haworth RA, Goknur AB, Hunter DR, Hegge JO, Berkoff HA. Inhibition of calcium influx in isolated adult rat heart cells by ATP depletion. *Circ Res.* 60(4):586-94, 1987.
41. Condrescu M, Gardner JP, Chernaya G, Aceto JF, Kroupis C, Reeves JP. ATP-dependent regulation of sodium-calcium exchange in Chinese hamster ovary cells transfected with the bovine cardiac sodium-calcium exchanger. *J Biol Chem.* 270(16):9137-46, 1995.
42. Hilgemann DW. Cytoplasmic ATP-dependent regulation of ion transporters and channels: mechanisms and messengers. *Annu Rev Physiol.* 59:193-220, 1997.
43. Li ZP, Burke EP, Frank JS, Bennett V, Philipson KD. The cardiac Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger binds to the cytoskeletal protein ankyrin. *J Biol Chem.* 268(16):11489-91, 1993.
44. He Z, Tong Q, Quednau BD, Philipson KD, Hilgemann DW. Cloning, expression, and characterization of the squid Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX-SQ1). *J Gen Physiol.* 111(6):857-73, 1998.
45. Collins A, Somlyo AV, Hilgemann DW. The giant cardiac membrane patch method: stimulation of outward Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange current by MgATP. *J Physiol.* 454:27-57, 1992.
46. Hilgemann DW, Collins A, Matsuoka S. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Secondary modulation by cytoplasmic calcium and ATP. *J Gen Physiol.* 100(6):933-61, 1992.
47. Hilgemann DW, Ball R. Regulation of cardiac Na<sup>+</sup>,Ca<sup>2+</sup> exchange and KATP potassium channels by PIP<sub>2</sub>. *Science.* 273(5277):956-9, 1996.
48. DiPolo R, Beauge L. Characterization of the reverse Na/Ca exchange in squid axons and its modulation by Cai and ATP. Cai-dependent Nai/Cao and Nai/Na<sub>o</sub> exchange modes. *J Gen Physiol.* 90(4):505-25, 1987.
49. Kimura J, Noma A, Irisawa H. Na-Ca exchange current in mammalian heart cells. *Nature.* 319(6054):596-7, 1986.

50. Hilgemann DW, Matsuoka S, Nagel GA, Collins A. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Sodium-dependent inactivation. *J Gen Physiol.* 100(6):905-32, 1992.
51. Matsuoka S, Nicoll DA, Hryshko LV, Levitsky DO, Weiss JN, Philipson KD. Regulation of the cardiac Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchanger by Ca<sup>2+</sup>. Mutational analysis of the Ca(2+)-binding domain. *J Gen Physiol.* 105(3):403-20, 1995.
52. Levitsky DO, Nicoll DA, Philipson KD. Identification of the high affinity Ca(2+)-binding domain of the cardiac Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *J Biol Chem.* 269(36):22847-52, 1994.
53. Dyck C, Maxwell K, Buchko J, Trac M, Omelchenko A, Hnatowich M, Hryshko LV. Structure-function analysis of CALX1.1, a Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger from *Drosophila*. Mutagenesis of ionic regulatory sites. *J Biol Chem.* 273(21):12981-7, 1998.
54. Doering AE, Lederer WJ. The mechanism by which cytoplasmic protons inhibit the sodium-calcium exchanger in guinea-pig heart cells. *J Physiol.* 466:481-99, 1993.
55. Reeves JP, Bailey CA, Hale CC. Redox modification of sodium-calcium exchange activity in cardiac sarcolemmal vesicles. *J Biol Chem.* 261(11):4948-55, 1986.
56. Santacruz-Toloza L, Ottolia M, Nicoll DA, Philipson KD. Functional analysis of a disulfide bond in the cardiac Na(+)-Ca(2+) exchanger. *J Biol Chem.* 275(1):182-8, 2000.
57. Philipson KD, Bersohn MM, Nishimoto AY. Effects of pH on Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles. *Circ Res.* 50(2):287-93, 1982.
58. Goldhaber JI. Free radicals enhance Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 271(3 Pt 2):H823-33, 1996.
59. Eigel BN, Gursahani H, Hadley RW. ROS are required for rapid reactivation of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in hypoxic reoxygenated guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286(3):H955-63, 2004.

60. Trosper TL, Philipson KD. Effects of divalent and trivalent cations on Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 731(1):63-8, 1983.
61. Kimura J, Miyamae S, Noma A. Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. *J Physiol*. 384:199-222, 1987.
62. Ehara T, Matsuoka S, Noma A. Measurement of reversal potential of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange current in single guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol*. 410:227-49, 1989.
63. Stengl M, Carmeliet E, Mubagwa K, Flameng W. Modulation of transient outward current by extracellular protons and Cd<sup>2+</sup> in rat and human ventricular myocytes. *J Physiol*. 511 (Pt 3):827-36, 1998.
64. Hobai IA, Bates JA, Howarth FC, Levi AJ. Inhibition by external Cd<sup>2+</sup> of Na/Ca exchange and L-type Ca channel in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 272(5 Pt 2):H2164-72, 1997.
65. Iwamoto T, Watano T, Shigekawa M. A novel isothioureia derivative selectively inhibits the reverse mode of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in cells expressing NCX1. *J Biol Chem*. 271(37):22391-7, 1996.
66. Watano T, Kimura J, Morita T, Nakanishi H. A novel antagonist, No. 7943, of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange current in guinea-pig cardiac ventricular cells. *Br J Pharmacol*. 119(3):555-63, 1996.
67. Satoh H, Ginsburg KS, Qing K, Terada H, Hayashi H, Bers DM. KB-R7943 block of Ca<sup>2+</sup> influx via Na<sup>(+)</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange does not alter twitches or glycoside inotropy but prevents Ca<sup>2+</sup> overload in rat ventricular myocytes. *Circulation*. 101(12):1441-6, 2000.
68. Litwin SE, Li J, Bridge JH. Na-Ca exchange and the trigger for sarcoplasmic reticulum Ca release: studies in adult rabbit ventricular myocytes. *Biophys J*. 75(1):359-71, 1998.
69. Sipido KR, Maes M, Van de Werf F. Low efficiency of Ca<sup>2+</sup> entry through the Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger as trigger for Ca<sup>2+</sup> release from the sarcoplasmic reticulum. A comparison between L-type Ca<sup>2+</sup> current and reverse-mode Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange. *Circ Res*. 81(6):1034-44, 1997.

70. Wasserstrom JA, Vites AM. The role of Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchange in activation of excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 493 (Pt 2):529-42, 1996.
71. Bers DM, Christensen DM, Nguyen TX. Can Ca entry via Na-Ca exchange directly activate cardiac muscle contraction? *J Mol Cell Cardiol.* 20(5):405-14, 1988.
72. Fujita S, Endoh M. Influence of a Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange inhibitor ethylisopropylamiloride, a Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange inhibitor KB-R7943 and their combination on the increases in contractility and Ca<sup>2+</sup> transient induced by angiotensin II in isolated adult rabbit ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 360(5):575-84, 1999.
73. Yang HT, Sakurai K, Sugawara H, Watanabe T, Norota I, Endoh M. Role of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in endothelin-1-induced increases in Ca<sup>2+</sup> transient and contractility in rabbit ventricular myocytes: pharmacological analysis with KB-R7943. *Br J Pharmacol.* 126(8):1785-95, 1999.
74. Hasenfuss G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res.* 37(2):279-89, 1998.
75. Mattiello JA, Margulies KB, Jeevanandam V, Houser SR. Contribution of reverse-mode sodium-calcium exchange to contractions in failing human left ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 37(2):424-31, 1998.
76. Tani M. Mechanisms of Ca<sup>2+</sup> overload in reperfused ischemic myocardium. *Annu Rev Physiol.* 52:543-59, 1990.
77. Crespo LM, Grantham CJ, Cannell MB. Kinetics, stoichiometry and role of the Na-Ca exchange mechanism in isolated cardiac myocytes. *Nature.* 345(6276):618-21, 1990.
78. Haulica I, Petrescu G, Slatineanu S, Bild W. Current data on the extrarenal renin-angiotensin system. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 103(3-4):25-34, 1999.
79. Dzau VJ. Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: evidence, possibilities and hypotheses. *J Hypertens.* 7(12):933-6, 1989.
80. Lindpaintner K, Ganten D. The cardiac renin-angiotensin system: a synopsis of current experimental and clinical data. *Acta Cardiol.* 46(3):385-97, 1991.

81. Cingolani HE, Housay AB. Control de la presión arterial. En Fisiología Humana de Housay. Sección IV Sistema Circulatorio. (ed) El Ateneo 2000, pp 334-352, Buenos Aires.
82. Koch-Weser J. Nature of the inotropic action of angiotensin on ventricular myocardium. *Circ Res.* 16:230-7, 1965.
83. Drimal J, Boska D Effects of angiotensin-II on myocardial mechanics and contractile state of heart muscle. *Eur J Pharmacol.* 21(2):130-8, 1973.
84. Kass RS, Blair ML. Effects of angiotensin II on membrane current in cardiac Purkinje fibers. *J Mol Cell Cardiol.* 13(9):797-809, 1981.
85. Baker KM, Aceto JA. Characterization of avian angiotensin II cardiac receptors: coupling to mechanical activity and phosphoinositide metabolism. *J Mol Cell Cardiol.* 21(4):375-82, 1989.
86. Moravec CS, Schluchter MD, Paranandi L, Czerska B, Stewart RW, Rosenkranz E, Bond M. Inotropic effects of angiotensin II on human cardiac muscle in vitro. *Circulation.* 82(6):1973-84. 1990.
87. Capasso JM, Li P, Zhang X, Meggs LG, Anversa P. Alterations in ANG II responsiveness in left and right myocardium after infarction-induced heart failure in rats. *Am J Physiol.* 264(6 Pt 2):H2056-67, 1993.
88. Ikenouchi H, Barry WH, Bridge JH, Weinberg EO, Apstein CS, Lorell BH. Effects of angiotensin II on intracellular Ca<sup>2+</sup> and pH in isolated beating rabbit hearts and myocytes loaded with the indicator indo-1. *J Physiol.* 15;480 ( Pt 2):203-15, 1994.
89. Ishihata A, Endoh M. Species-related differences in inotropic effects of angiotensin II in mammalian ventricular muscle: receptors, subtypes and phosphoinositide hydrolysis. *Br J Pharmacol.* 114(2):447-53, 1995.
90. Mattiazzi A, Perez NG, Vila-Petroff MG, Alvarez B, Camilion de Hurtado MC, Cingolani HE. Dissociation between positive inotropic and alkalinizing effects of angiotensin II in feline myocardium. *Am J Physiol.* 272(3 Pt 2):H1131-6, 1997.
91. Holubarsch C, Hasenfuss G, Schmidt-Schweda S, Knorr A, Pieske B, Ruf T, Fasol R, Just H. Angiotensin I and II exert inotropic effects in atrial but not in

- ventricular human myocardium. An in vitro study under physiological experimental conditions. *Circulation*. 88(3):1228-37, 1993.
92. Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev*. 57(2):313-70, 1977.
93. Dudley DT, Panek RL, Major TC, Lu GH, Bruns RF, Klinkefus BA, Hodges JC, Weishaar RE Subclasses of angiotensin II binding sites and their functional significance. *Mol Pharmacol*. 38(3):370-7, 1990.
94. Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun*. 163(1):284-91, 1989.
95. Chang RS, Loti VJ. Angiotensin receptor subtypes in rat, rabbit and monkey tissues: relative distribution and species dependency. *Life Sci*. 49: 1485-1490, 1991.
96. Nozawa Y, Haruno A, Oda N, Yamasaki Y, Matsuura N, Yamada S, Inabe K, Kimura R, Suzuki H, Hocino T. Angiotensin II receptor subtypes in bovine and human ventricular myocardium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270:566-571, 1994.
97. Rogg H, Schmid A, de Gasparo M. Identification and characterization of angiotensin II receptor subtypes in rabbit ventricular myocardium. *Biochem Biophys Res Commun*. 173(1):416-22, 1990.
98. Scott AL, Chang RS, Lotti VJ, Siegl PK. Cardiac angiotensin receptors: effects of selective angiotensin II receptor antagonists, DUP 753 and PD 121981, in rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther*. 261(3):931-5, 1992.
99. Sechi LA, Griffin CA, Grady EF, Kalinyak JE, Schambelan M. Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. *Circ Res*. 71(6):1482-9, 1992.
100. Lopez JJ, Lorell BH, Ingelfinger JR, Weinberg EO, Schunkert H, Diamant D, Tang SS. Distribution and function of cardiac angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am. J. Physiol*. 267:H844-52, 1994.
101. Masaki H, Kurihara T, Yamaki A, Inomata N, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kizima K, Maruyama K, Horiuchi M, Dzau VJ, Takahashi H, Iwasaka T, Inada M, Matsubara H. Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor



causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J. Clin. Invest.* 101:527-35, 1998.

102. Booz GW, Baker KM. Role of type 1 and 2 angiotensin receptors in angiotensin induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension.* 28:635-40, 1996.

103. Bartunek J, Weinberg EO, Tajima M, Rohrbach S, Lorell BH. Angiotensin II type 2 receptor blockade amplifies the early signals of cardiac growth response to angiotensin II in hypertrophied hearts. *Circulation.* 99: 22-5, 1999.

104. Dzau VJ, Sasamura H, Hein L. Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications. *Hypertens Suppl.* 11(3):S13-8, 1993.

105. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest.* 95(2):651-7, 1995.

106. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res.* 83(12):1182-91, 1998.

107. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension.* 33(2):613-21, 1999.

108. Ishihata A, Endoh M. Pharmacological characteristics of the positive inotropic effect of angiotensin II in rabbit myocardium. *B. J. Pharmacol.* 108: 999-1005, 1993.

109. Scott AL, Chang RS, Lotti VJ, Siegl PK. Cardiac angiotensin receptors: effects of selective angiotensin II receptor antagonist, DUP753 and PD121981 in rabbit heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261: 931-935, 1992.

110. Dudley DT, Panek RL, Major TC, Lu GH, Bruns RF, Klinkefus BA, Hodges JC, Weishaar RE. Subclasses of angiotensin II binding sites and their functional significance. *Mol Pharmacol.* 38(3):370-7, 1990.

111. Catt K, Abbott A. Molecular cloning of angiotensin II receptors may presage further receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci.* 12(8):279-81, 1991.

112. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 45(2):205-51, 1993.

113. Schmermund A, Lerman LO, Ritman EL, Rumberger JA. Cardiac production of angiotensin II and its pharmacologic inhibition: effects on the coronary circulation. *Mayo Clin Proc.* 74(5):503-13, 1999.
114. Silvestre JS, Heymes C, Oubenaissa A, Robert V, Aupetit-Faisant B, Carayon A, Swynghedauw B, Delcayre C. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation.* 99(20):2694-701, 1999.
115. Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin receptor. *Nature.* 351: 233-236, 1991.
116. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T et al. International Union of Pharmacology: XXIII: the angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* 52: 415-472, 2000.
117. Lewin B. Signal transduction. *In Genes VII. (ed) Oxford university press*, pp 801-834, 2000.
118. Mattiazzi A. Positive inotropic effect of angiotensin II. Increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> or changes in myofilament Ca<sup>2+</sup> responsiveness? *Pharmacol Toxicol Methods.* 37(4):205-14, 1997.
119. Dostal DE, Hunt RA, Kule CE, Bhat GJ, Karoor V, McWhinney CD, Baker KM. Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 29(11):2893-902, 1997.
120. Lokuta AJ, Cooper C, Gaa ST, Wang HE, Rogers TB. Angiotensin II stimulates the release of phospholipid-derived second messengers through multiple receptor subtypes in heart cells. *J Biol Chem.* 269(7):4832-8, 1994.
121. Schena M, Mulatero P, Schiavone D, Mengozzi G, Tesio L, Chiandussi L, Veglio F. Vasoactive hormones induce nitric oxide synthase mRNA expression and nitric oxide production in human endothelial cells and monocytes. *Am J Hypertens.* 12(4 Pt 1):388-97, 1999.

122. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 332(6163):411-5, 1988.
123. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86(8):2863-7, 1989.
124. Laporte S, Denault JB, D'Orleans-Juste P, Leduc R. Presence of furin mRNA in cultured bovine endothelial cells and possible involvement of furin in the processing of the endothelin precursor. *J Cardiovasc Pharmacol*. 22 Suppl 8:S7-10, 1993.
125. Blais V, Fugere M, Denault JB, Klarskov K, Day R, Leduc R. Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. *FEBS Lett*. 524(1-3):43-8, 2002.
126. Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G, Thouard A, Barret A, Vranckx R, Tougard C, Michel JB. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *Eur J Biochem*. 264(2):341-9, 1999.
127. Valdenaire O, Barret A, Schweizer A, Rohrbacher E, Mongiat F, Pinet F, Corvol P, Tougard C. Two di-leucine-based motifs account for the different subcellular localizations of the human endothelin-converting enzyme (ECE-1) isoforms. *J Cell Sci*. 112 Pt 18:3115-25, 1999.
128. Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem*. 270(25):15262-8, 1995.
129. Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa S, Shimohama S, Kimura J, Masaki T. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett*. 428(3):304-8, 1998.
130. Takanashi M, Endoh M. Characterization of positive inotropic effect of endothelin on mammalian ventricular myocardium. *Am J Physiol*. 261(3 Pt 2):H611-9, 1991.

131. Gu XH, Ou RC, Casley DJ, Daly MJ, Nayler WG. Effect of age on endothelin-1 binding sites in rat cardiac ventricular membranes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 19(5):764-9, 1992.
132. Ishikawa T, Li LM, Shinmi O, Kimura S, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T. Characteristics of binding of endothelin-1 and endothelin-3 to rat hearts. Developmental changes in mechanical responses and receptor subtypes. *Circ Res.* 69(4):918-26, 1991.
133. Yanagisawa M, Inoue A, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene: possible regulation by endothelial phosphoinositide turnover signaling. *Cardiovasc Pharmacol.* 13 Suppl 5:S13-7; discussion S18, 1989.
134. Gray GA. Generation of endothelin. En *Molecular biology and pharmacology of the endothelins.* Gray GA, Webb DJ, eds RG Landers: Austin. 13-32, 1995.
135. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med.* 333(6):356-63, 1995.
136. Levin ER. Endothelins as cardiovascular peptides. *Am J Nephrol.* 16(3):246-51, 1996.
137. Shinmi O, Kimura S, Sawamura T, Sugita Y, Yoshizawa T, Uchiyama Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T, Kanazawa I. Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 164(1):587-93, 1989.
138. Endoh M, Fujita S, Yang HT, Talukder MA, Maruya J, Norota I. Endothelin: receptor subtypes, signal transduction, regulation of Ca<sup>2+</sup> transients and contractility in rabbit ventricular myocardium. *Life Sci.* 62: 1485-1489, 1998.
139. Talukder MA, Norota I, Sakurai K, Endoh M. Inotropic response of rabbit ventricular myocytes to endothelin-1: difference from isolated papillary muscles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281(2):H596-605, 2001.
140. Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Marumo F, Hiroe M. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 92:398-403, 1993.

141. Rajagopalan S, Laursen JB, Borthayre A, Kurz S, Keiser J, Haleen S, Giaid A, Harrison DG. Role for endothelin-1 in Angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension*. 30:29-34, 1997.
142. Ortiz MC, Sanabria E, Manriquez MC, Romero JC, Juncos LA. Role of endothelin and isoprostanes in slow pressor responses to angiotensin II. *Hypertension*. 37:505-510, 2001.
143. Cingolani HE, Alvarez BV, Ennis IL, Camili3n de Hurtado MC. Stretch-induced alkalization of feline papillary muscle. An autocrine-paracrine system. *Circ Res*. 83:775-780, 1998.
144. Camili3n de Hurtado MC, Alvarez BV, Ennis IL, Cingolani HE. Stimulation of myocardial Na<sup>+</sup>-independent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger by angiotensin II is mediated by endogenous endothelin. *Circ Res*. 86:622-62, 2000.
145. Alvarez BV, P3rez NG, Ennis IL, Camili3n de Hurtado MC, Cingolani HE. Mechanisms underlying the increase in force and calcium transient that follows stretch of cardiac muscle: A possible explanation of the Anrep effect. *Circ Res*. 85:716-722, 1999.
146. P3rez NG, Camili3n de Hurtado MC, Cingolani HE. Reverse mode of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange after myocardial stretch. Underlying mechanism of the slow force response. *Circ Res*. 88:376-382, 2001.
147. Harada M, Itoh H, Nakagawa O, Ogawa Y, Miyamoto Y, Kuwahara K, Ogawa E, Igaki T, Yamashita J, Masuda I, Yoshimasa T, Tanaka I, Saito Y, Nakao K. Significance of ventricular myocytes and nonmyocytes interaction during cardiocyte hypertrophy: evidence for endothelin-1 as a paracrine hypertrophic factor from cardiac nonmyocytes. *Circulation*. 96:3737-3744, 1997.
148. Calaghan SC, White E. Contribution of angiotensin II, endothelin-1, and the endothelium to the slow inotropic response to stretch in ferret papillary muscle. *Pfluegers Arch*. 441:514-520, 2001.
149. Leem CH, Lagadic-Gossmann D, Vaughan-Jones RD. Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol*. 517 (Pt 1):159-80, 1999.

150. Pierce GN, Philipson KD. Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 818(2):109-16, 1985.
151. Petrecca K, Atanasiu R, Grinstein S, Orlowski J, Shrier A. Subcellular localization of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1 in rat myocardium. *Am J Physiol*. 276(2 Pt 2):H709-17, 1999.
152. Puceat M, Clement-Chomienne O, Terzic A, Vassort G. Alpha 1-adrenoceptor and purinoceptor agonists modulate Na-H antiport in single cardiac cells. *Am J Physiol*. 264(2 Pt 2):H310-9, 1993.
153. Puceat M, Vassort G. Neurohumoral modulation of intracellular pH in the heart. *Cardiovasc Res*. 29(2):178-83, 1995.
154. Takewaki S, Kuro-o M, Hiroi Y, Yamazaki T, Noguchi T, Miyagishi A, Nakahara K, Aikawa M, Manabe I, Yazaki Y, et al. Activation of Na<sup>(+)</sup>-H<sup>+</sup> antiporter (NHE-1) gene expression during growth, hypertrophy and proliferation of the rabbit cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol*. 27(1):729-42, 1995.
155. Perez NG, Alvarez BV, Camilion de Hurtado MC, Cingolani HE. pH<sub>i</sub> regulation in myocardium of the spontaneously hypertensive rat. Compensated enhanced activity of the Na<sup>(+)</sup>-H<sup>+</sup> exchanger. *Circ Res*. 77(6):1192-2000, 1995.
156. Camili3n de Hurtado MC, Portiansky EL, Perez NG, Rebolledo OR, Cingolani HE. Regression of cardiomyocyte hypertrophy in SHR following chronic inhibition of the Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger. *Cardiovasc Res*. 53(4):862-8, 2002.
157. Sleight RG, Lieberman MA. Signal Transduction.
158. Lewin B. Signal transduction. In *Genes VII*. (ed) Oxford University Press. 2000, pp 801-834.
159. Hug H, Sarre TF. Protein kinase C isoenzymes: divergente in signal transduction? *Biochem. J*. 291: 3429-3433, 1993.
160. Langer GA. Heart: excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol*. 35:55-86, 1973.
161. Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*. 312(5990):121-7, 1984.

162. Hess P, Lansman JB, Tsien RW. Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. *J Gen Physiol.* 88(3):293-319, 1986
163. Hess P, Lansman JB, Nilius B, Tsien RW. Calcium channel types in cardiac myocytes: modulation by dihydropyridines and beta-adrenergic stimulation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 8 Suppl 9:S11-21, 1986.
164. Cingolani HE, Housay AB. Origen y propagación del impulso cardíaco. Actividad eléctrica del corazón. En Fisiología Humana de Housay. Sección IV. Sistema Circulatorio. (ed) El Ateneo 2000, pp 243-265, Buenos Aires.
165. Lansman JB, Hess P, Tsien RW. Blockade of current through single calcium channels by  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and  $\text{Ca}^{2+}$ . Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. *J Gen Physiol.* 1986 Sep;88(3):321-47.
166. Nuss HB, Houser SR. Sodium-calcium exchange-mediated contractions in feline ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 263(4 Pt 2):H1161-9, 1992.
167. Philipson KD, Nishimoto AY.  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange is affected by membrane potential in cardiac sarcolemmal vesicles. *J Biol Chem.* 255(14):6880-2, 1980.
168. Hinata M, Yamamura H, Li L, Watanabe Y, Watano T, Imaizumi Y, Kimura J. Stoichiometry of  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange is 3:1 in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol.* 545(Pt 2):453-461, 2002.
169. Hobai IA, O'Rourke B. Enhanced  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange activity in canine pacing-induced heart failure. *Circ Res.* 87:690-698, 2000.
170. Sutko JL, Willerson JT, Templeton GH, Jones LR, Besch HR Jr. Ryanodine: its alterations of cat papillary muscle contractile state and responsiveness to inotropic interventions and a suggested mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther.* 209(1):37-47, 1979.
171. Fleischer S, Inui M. Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 18:333-64, 1989.
172. Chadwick CC, Saito A, Fleischer S. Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(6):2132-6, 1990.

173. Walker JW, Somlyo AV, Goldman YE, Somlyo AP, Trentham DR. Kinetics of smooth and skeletal muscle activation by laser pulse photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature*. 327(6119):249-52, 1987.
174. Ferris CD, Haganir RL, Supattapone S, Snyder SH. Purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles. *Nature*. 342(6245):87-9, 1989.
175. Ruegg JC. Cardiac contractility: how calcium activates the myofilaments. *Naturwissenschaften*. 85(12):575-82, 1998.
176. Katz AM. Excitation-contraction coupling. In *Physiology of the heart*. (ed) AM Katz Raven Press. 1977, pp137-149. New York.
177. Sommer JR, Johnson EA. Ultrastructure of cardiac muscle. In *Handbook of Physiology, section 2 The Cardiovascular System, Volume 1 The Heart*, (ed) Berne RM, pp 113-86. American Physiological Society, Bethesda.
178. el-Saleh SC, Warber KD, Potter JD. The role of tropomyosin-troponin in the regulation of skeletal muscle contraction. *J Muscle Res Cell Motil*. 7(5):387-404, 1986.
179. Ruegg JC. Cardiac contractility: how calcium activates the myofilaments. *Naturwissenschaften*. 85(12):575-82, 1998.
180. Tada M, Yamada M, Kadoma M, Inui M, Ohmori F. Calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum and phosphorylation of phospholamban. *Mol Cell Biochem*. 46(2):73-95, 1982.
181. Tada M, Kirchberger MA, Katz AM. Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 250(7):2640-7, 1975.
182. Bers DM. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res*. 87(4):275-81, 2000.
183. Nabauer M, Morad M. Modulation of contraction by intracellular Na<sup>+</sup> via Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange in single shark (*Squalus acanthias*) ventricular myocytes. *J Physiol*. 457:627-37, 1992.



184. Aiello EA, Cingolani HE. Angiotensin II stimulates cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current by a  $\text{Ca}^{2+}$ - and protein kinase C-dependent mechanism. *Am J Physiol.* 280:H1528-H1536, 2001.
185. He JQ, Pi QY, Walker JW, Kamp TJ. Endothelin-1 and photoreleased diacylglycerol increase L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current by activation of protein kinase C in rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* 524.3: 807-820, 2000.
186. Aiello EA, Vila Petroff MG, Mattiazzi A and Cingolani HE. Evidences for an electrogenic  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  symport in rat cardiac myocytes. *J. Physiol.* 512: 137-148, 1998.
187. Morgan PE, Aiello EA, Chiappe de Cingolani GE, Mattiazzi AR and Cingolani HE. Chronic administration of nifedipine induces up-regulation of functional calcium channels in rat myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31:1873-1883, 1999.
188. Sollot SJ, Ziman BD and Lakatta EG. Novel technique to load indo-1 free acid into single adult cardiac myocytes to asses cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ . *Am. J. Physiol.* 262:H1941-9, 1992.
189. Bkaily G, Sperelakis N and Doane J. A new method for preparation of isolated single adult myocytes. *Am. J. Physiol.* 247: H1018-H1026, 1984.
190. Zhou YY, Wang SQ, Zhu WZ, Chruscinski A, Kobilka BK, Ziman B, Wang S, Lakatta EG, Cheng H and Xiao RP. Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology. *Am. J. Physiol.* 279:H429-36, 2000.
191. Powell T. The isolation and characterization of calcium-tolerant. *Basic. Res. Cardiol.* 80: 15-18, 1985.
192. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv.* 391:85-100, 1981.
193. Aiello EA en "Calcio, pH, Sodio intracelular". En: "Introducción al análisis científico del aparato cardiovascular en bioingeniería", Parte II: Modelos Experimentales en Bioingeniería, capítulo 11, págs. 183-202. Editorial Talleres Gráficos, Buenos Aires, Argentina. ISBN 950-42-0039-7, 2004. Editado por:

Facultad Regional Buenos Aires, Universidad Tecnológica Nacional, Comité de Ciencias Básicas de la Federación Argentina de Cardiología y Centro de Procesamiento de Señales e Imágenes de la FRBA-UTN. cap 10, pags. 171-182.

194. Convery MK, Hancox JC. Comparison of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange current elicited from isolated rabbit ventricular myocytes by voltage ramp and step protocols. *Pflugers Arch.* 437(6):944-54, 1999.

195. Kelso E, Spiers P, Mc Dermott B, Schofield N, Silke B. Dual effects of endothelin-1 on the L-type Ca<sup>2+</sup> current in ventricular cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol.* 308:351-355, 1996.

196. Xia Y, Karmazyn M. Obligatory role for endogenous Endothelin in mediating the hypertrophic effects of phenylephrine and angiotensin II in neonatal rat ventricular myocytes: evidence for two distinct mechanisms for endothelin regulation. *J. Phar. Exp. The.* 310:43-51, 2004.

197. Wasserstrom JA, Vites AM. Activation of contraction in cat ventricular myocytes: effects of low Cd<sup>2+</sup> concentration and temperature. *Am. J. Physiol.* 277: H488-H498, 1999.

198. Pérez NG, Villa-Abrille MC, Aiello EA, Dulce RA, Cingolani HE, Camilión de Hurtado MC. A low dose of angiotensin II increases inotropism through activation of reverse Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange by endothelin release. *Cardiovasc. Res.* 60(3):589-597, 2003.

199. Kramer BK, Smith TW, Kelly RA. Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes. Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent Na(+)-H<sup>+</sup> exchanger. *Circ Res.* 68(1):269-79, 1991.

200. Aiello EA, Villa-Abrille MC, Dulce RA, Cingolani HE, Perez NG. Endothelin-1 stimulates the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger reverse mode through intracellular Na<sup>+</sup> (Na<sup>+</sup>i)-dependent and Na<sup>+</sup>i-independent pathways. *Hypertension.* 45(2):288-93, 2005.

201. Vila Petroff MG, Palomeque J, Mattiazzi AR. Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchange function underlying contraction frequency inotropy in the cat myocardium. *J Physiol.* 550(Pt 3):801-17, 2003.

202. Vila Petrof MG, Aiello EA, Palomeque J, Salas M, Mattiazzi A. Subcellular mechanisms of the positive inotropic effect of angiotensin II in cat myocardium. *J Physiol.* 529.1: 189-203, 2000.
203. Fabiato A, Fabiato F. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J Physiol.* 276:233-55, 1978.
204. Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P, Luscher TF. Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 238(3):861-5, 1997.
205. Hong HJ, Chan P, Liu JC, Juan SH, Huang MT, Lin JG, Cheng TH. Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 61(1):159-68, 2004.
206. Sung CP, Arleth AJ, Storrer BL, Ohlstein EH. Angiotensin type 1 receptors mediate smooth muscle proliferation and endothelin biosynthesis in rat vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271: 429-437, 1994.
207. Sil P, Sen S. Angiotensin II and myocyte growth: role of fibroblasts. *Hypertension.* 30:209-216, 1997.