

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
Centro de Investigaciones Cardiovasculares - Cátedra de Fisiología con Biofísica



ANGIOTENSINA II: MODULACION DE LA CONTRACTILIDAD Y LA RELAJACION MIOCARDICA

Trabajo de Tesis Doctoral

Julieta Palomeque

Director

Dra. Alicia R. Mattiazzi

Profesor Adjunto D.E. de la Cátedra de Fisiología con Biofísica

Facultad de Ciencias Médicas, UNLP

Investigador Principal (CONICET)

Codirector

Dr. Martín G. Vila Petroff

Jefe de Trabajos Prácticos D.E. de la Cátedra de Fisiología con Biofísica

Facultad de Ciencias Médicas, UNLP

Investigador Asistente (CONICET)

Año 2002

*A Lalo, por su apoyo infinito
A mi Padre, por su herencia invaluable*

Agradecimientos:

Al Dr. Martín Vila Petroff, por ser mi mentor.

A la Dra. Alicia Mattiazzi, por la formación científica excepcional que me brinda diariamente.

Al Dr. Horacio E. Cingolani, por permitirme trabajar en el Centro de Investigaciones Cardiovasculares.

A la Dra. Margarita Salas, por su predisposición para discutir y solucionar los problemas que pudieran presentarse.

A Mónica Rando, por su excelente asesoramiento técnico.

A mis compañeros del Centro de Investigaciones Cardiovasculares: Alejandro Aiello, Gustavo Pérez, Celeste Villa Abrille y Alfredo Gende por su constante colaboración.

A mis amigas Carla y Celeste por haber cuidado de mi hija en los momentos de más arduo trabajo.

A todos los que de alguna manera colaboraron, haciendo de este trabajo una realidad.

INTRODUCCION	0
1-Acoplamiento éxcito-contráctil	1
2-Modulación de la contractilidad miocárdica	11
2.1-Cambios del Ca ²⁺ citosólico	12
2.1.1-Regulación del influjo de Ca ²⁺	12
2.1.2-Regulación de la carga de Ca ²⁺ del RS	13
2.2-Respuesta al Ca ²⁺ de los miofilamentos	14
3-La Angiotensina II	16
ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA	24
OBJETIVOS	30
METODOS	33
1-Aislamiento de miocitos	34
2-Medición de la fluorescencia de Indo-1 y del acortamiento celular	35
3-Medición de pH _i	39
4-Músculos papilares	40
5-Materiales	41
6-Análisis estadístico	41

RESULTADOS	42
1- Ang II, contracción y pH_i	43
2- Ang II, relajación y pH_i	49
3- Ang II, contracción y Ca^{2+} intracelular	54
4- Ang II y respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos	56
5- Ang II e intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$	60
6- Ang II y retículo sarcoplasmático	62
7- Ang II y PKC	67
DISCUSION	70
1- Efecto inotrópico positivo	72
2- Efecto lusitrópico negativo	76
BIBLIOGRAFIA	78
RESUMEN	97

INTRODUCCION

La Angiotensina II (Ang II) es la molécula efectora del sistema renina-angiotensina, y se ha visto implicada en varios procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Su efecto vasoconstrictor es el más conocido ⁽¹⁾; sin embargo, en los últimos años ha adquirido importancia la modulación que la Ang II ejerce sobre el acoplamiento excito-contráctil y la contractilidad en el músculo cardíaco ⁽²⁻¹²⁾. El conocimiento de los mecanismos de acción de la Ang II sobre el miocardio en condiciones fisiológicas, favorecerá la interpretación de la fisiopatología de aquellas enfermedades que la involucren ⁽¹³⁻¹⁶⁾. Para una mejor comprensión de los mecanismos subcelulares por medio de los cuales la Ang II modula la contractilidad cardíaca resulta fundamental hacer una revisión de los eventos que participan en el acoplamiento excito-contráctil en el miocardio y de su regulación.

ACOPLAMIENTO EXCITO-CONTRACTIL

El acoplamiento excito-contráctil (AEC), como se esquematiza en la figura 1, comprende la secuencia de procesos involucrados desde la despolarización de la membrana plasmática hasta que se produce la contracción muscular ⁽¹⁷⁾. En los miocitos cardíacos, la transición desde el estado de reposo, o diástole, hasta el de contracción o sístole, ocurre debido a una entrada de Ca^{2+} por la membrana sarcolemal ⁽¹⁸⁾. Esta entrada de Ca^{2+} , que en la mayoría de las especies no sería suficiente para explicar la fuerza que realiza el músculo cardíaco en un latido ⁽¹⁸⁾, induce la liberación de una cantidad mayor de Ca^{2+} por el retículo sarcoplasmático (RS) ^(20,21). El Ca^{2+} liberado se une a las proteínas contráctiles produciendo la contracción. La remoción del Ca^{2+} citosólico es el paso que cierra el ciclo, llevando al miocito a su estado de reposo original.

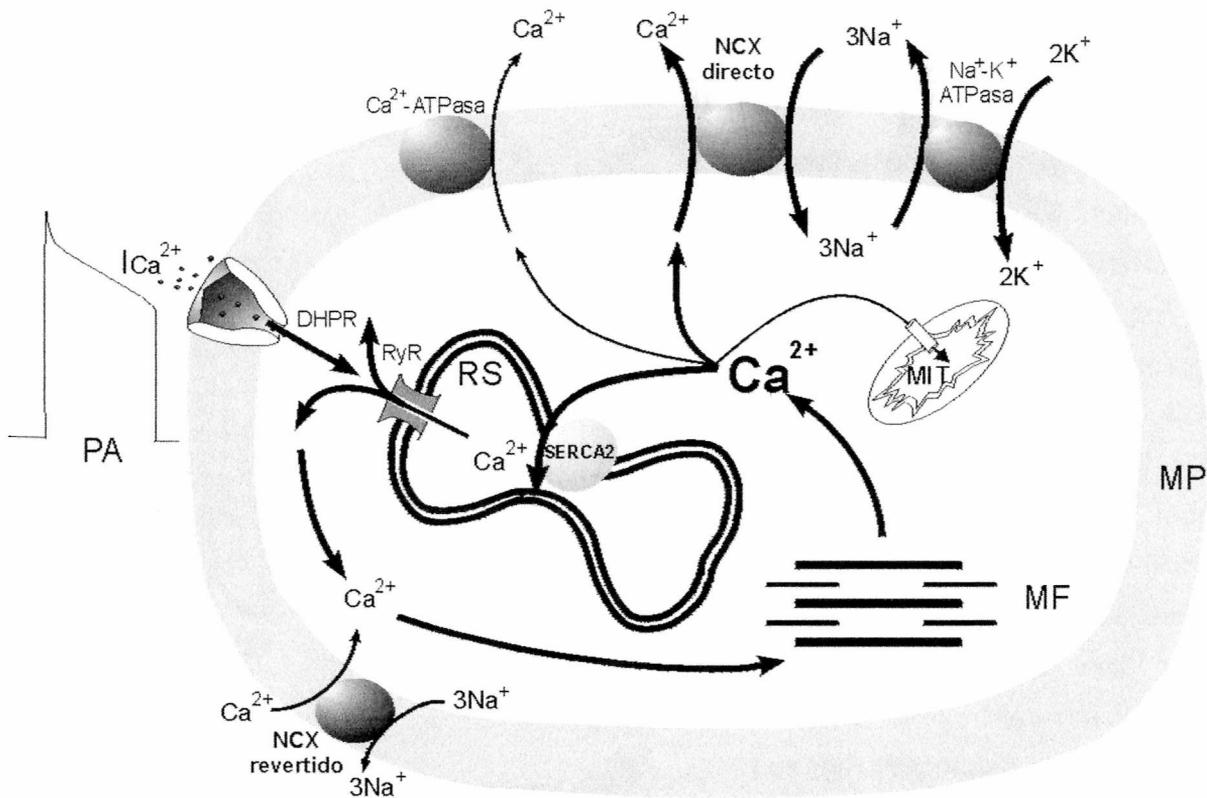


Figura 1: Esquema de los eventos que participan del acoplamiento excito-contráctil. La corriente de Ca^{2+} que se genera durante el potencial de acción (PA) produce la entrada del ion por los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes o receptores de dihidropiridinas (DHPR). Esta entrada de Ca^{2+} produce una mayor liberación del mismo del retículo sarcoplásmico (RS) a través de los canales de Ca^{2+} de éste o receptores de rianodina (RyR). El aumento de Ca^{2+}_i produce la interacción de los miofilamentos (MF), actina y miosina, produciendo así la contracción. Otro mecanismo que podría participar en el aumento del Ca^{2+}_i es el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) trabajando en su modo revertido. Los mecanismos que reducen la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para relajar al miocito son principalmente la SERCA2 o bomba de Ca^{2+} del RS y también el NCX trabajando en su modo directo. Tanto la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (MP), como el transportador de Ca^{2+} mitocondrial (MIT), contribuyen con menos del 1% de la remoción del Ca^{2+} durante la relajación. (Modificado de Cingolani HE y colaboradores. En *Fisiología Humana de Houssay*. Sección I Fisiología General. (ed) El Ateneo 2000, pp 59-93, Buenos Aires).

La secuencia de sucesos que comprende el AEC es la siguiente:

a) Entrada de Ca^{2+} . El evento inicial en el acoplamiento entre la excitación y la contracción es la entrada de Ca^{2+} a la célula que ocurre fundamentalmente a través de los canales de Ca^{2+} de tipo L durante la meseta del potencial de acción (PA) (figura 1). El estímulo externo produce una despolarización localizada que provoca la apertura de los canales de Na^+ dependientes del voltaje⁽²²⁾. El cambio de potencial dado por la entrada de Na^+ se propaga por la membrana despolarizando al miocito. La despolarización de la membrana abre los canales de Ca^{2+} operados por voltaje o tipo L, que generan una corriente hacia adentro, debido al influjo de Ca^{2+} , que mantiene la

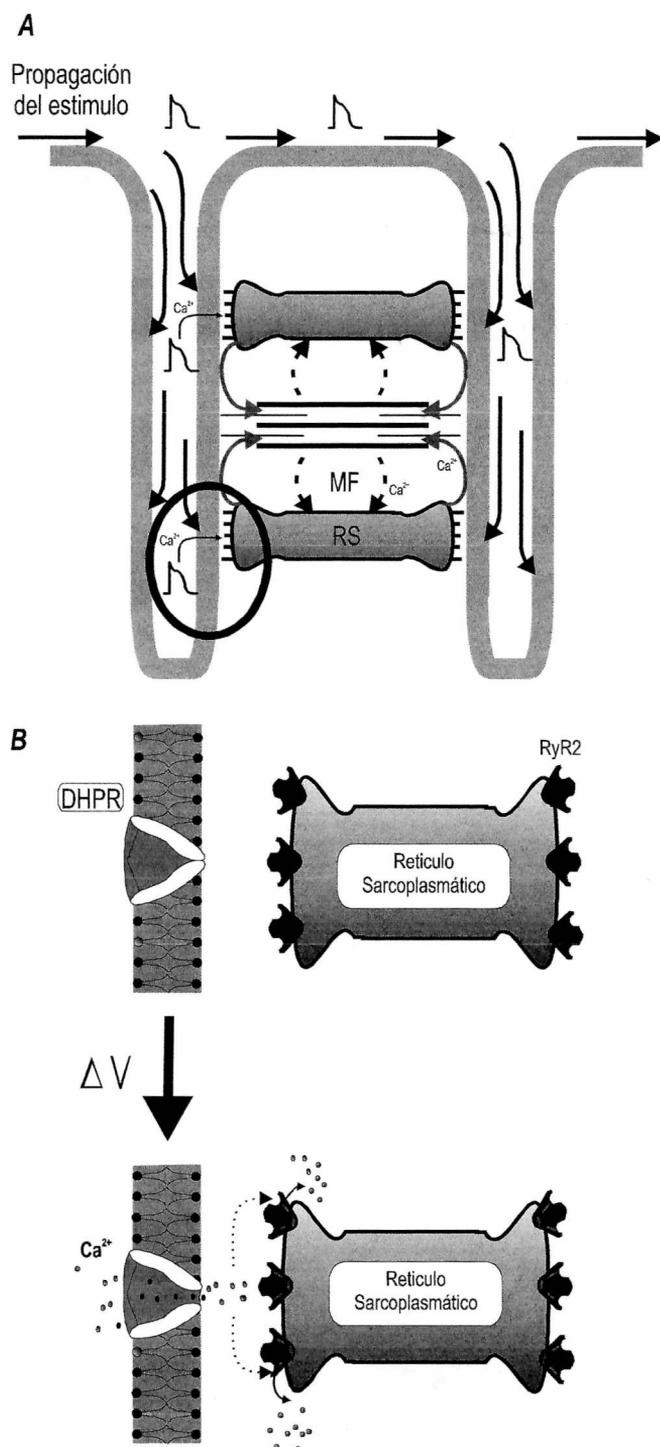


Figura 3: Esquema del fenómeno de CICR. **A:** acoplamiento éxito-contráctil. **B:** amplificación de la zona remarcada en **A**. Los receptores de dihidropiridinas (DHPR) se encuentran próximos a los RyR. Con la despolarización se produce una variación en el potencial (V) de la membrana plasmática que abre a los DHPR generando un pulso de Ca^{2+} que activa a los RyR. (Modificado de Cingolani HE y colaboradores. En *Fisiología Humana de Houssay. Sección I Fisiología General*. (ed) El Ateneo 2000, pp 59-94, Buenos Aires).

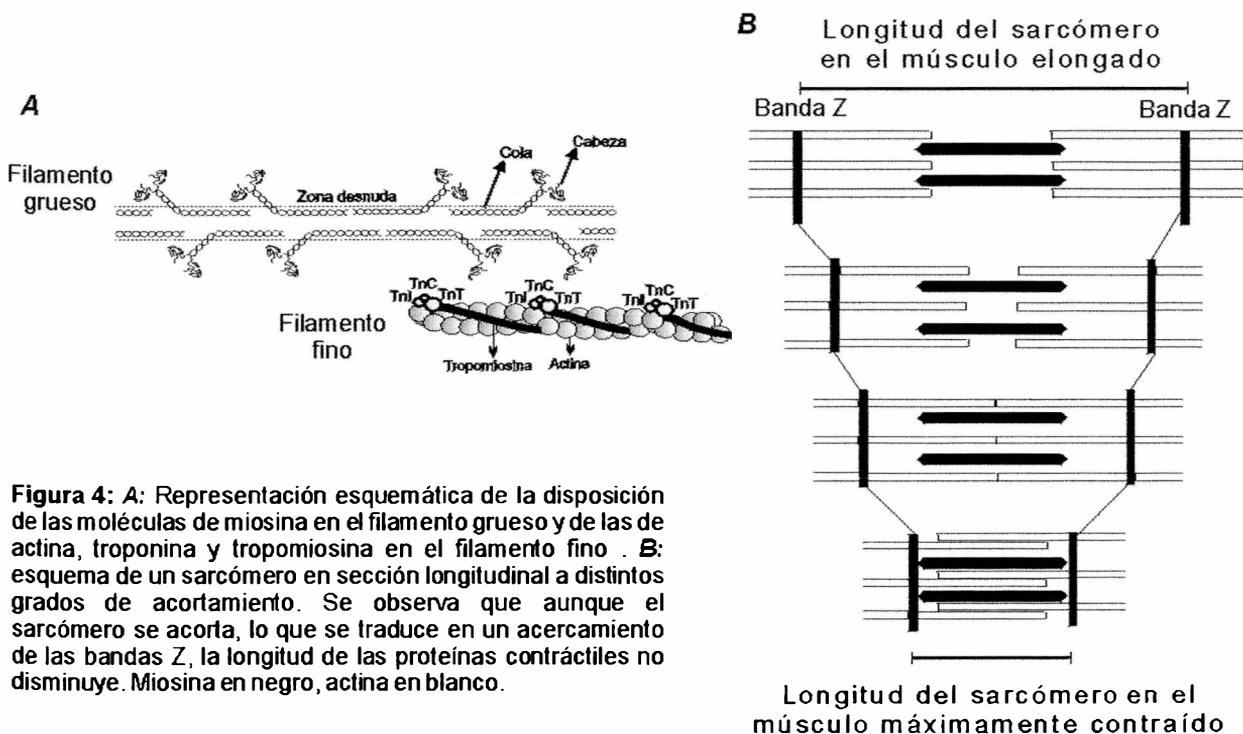
Actualmente se conocen dos tipos diferentes de canales que liberan Ca^{2+} de depósitos intracelulares y que están localizados en el RS, llamados receptores de rianodina (RyR) ⁽²⁸⁾ (debido a su alta afinidad por el alcaloide del mismo nombre) y receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃R) ⁽²⁹⁻³⁴⁾. En el RS cardíaco el RyR es mucho más relevante en el AEC que el IP₃R, cuya participación en el AEC miocárdico, como se verá más adelante, es controvertida ^(30,33-36). Los RyR responden a la rianodina en forma dual ⁽³⁷⁾, ya que a bajas concentraciones ($<10\mu M$) el alcaloide induce su apertura con una baja conductancia, deplecionando los depósitos de Ca^{2+} del RS, y a concentraciones mayores bloquea completamente el canal. Se ha demostrado que la probabilidad de apertura de estos canales aumenta cuando son expuestos a concentraciones de Ca^{2+} en el rango micromolar y a metilxantinas como la cafeína ^(38,39). El efecto descrito para la rianodina ha sido usado como herramienta para corroborar la hipótesis de que el Ca^{2+} requerido para una contracción proviene fundamentalmente del RS. Así, Mitchell y colaboradores ⁽⁴⁰⁾

encontraron que la rianodina a altas concentraciones no alteraba la corriente lenta de Ca^{2+} y, sin embargo, disminuía o suprimía por completo la contracción. Los RyR se localizan en la vecindad de los canales de Ca^{2+} de tipo L y son activados durante el AEC por un incremento local del Ca^{2+} luego del influjo de Ca^{2+} transarcolema a través de la corriente de Ca^{2+} de tipo L ⁽²³⁾ (figura 3).

La contribución de la liberación de Ca^{2+} del RS al aumento del Ca^{2+} intracelular para la activación de los miofilamentos, varía según las diferentes especies. Por ejemplo, en el ventrículo de rana depende fundamentalmente del Ca^{2+} que entra a la célula por los canales de Ca^{2+} de tipo L ⁽⁴¹⁾, en el conejo el aumento del Ca^{2+} citosólico proviene tanto del influjo a través la corriente de Ca^{2+} de tipo L como del liberado por el RS ⁽⁴¹⁾, y en la rata el aporte está dado principalmente por el Ca^{2+} del RS ^(41,42).

La intervención en la contracción normal del miocardio de los IP_3R , aunque están presentes en el músculo cardíaco, es discutida. Sin embargo, los IP_3 constituyen el principal canal que media el acoplamiento farmacomecánico en el músculo liso ^(32,36), y tanto estructural como funcionalmente comparten homologías considerables con los RyR ⁽³⁴⁾.

c) Contracción cardíaca. El aumento del Ca^{2+} citosólico, inicia una serie de procesos que desencadenan la contracción por fijación del ion a las proteínas contráctiles (figura 4). La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta aproximadamente 100 veces su valor de reposo, permitiendo así la interacción de las proteínas contráctiles, actina y miosina, produciendo la contracción ⁽⁴³⁾.



La unidad contráctil fundamental que permite la contracción muscular es el sarcómero (figura 4) ^(43,44). Cada sarcómero está compuesto por un conjunto de filamentos gruesos y finos interdigitados entre sí. Los filamentos gruesos están formados por miosina. Esta proteína tiene forma de bastoncito, con una cola orientada hacia el centro del filamento y una cabeza globular flexible, que se proyecta fuera de él y tiene actividad ATPasa. La cabeza de la miosina conforma la base molecular del puente cruzado. Los filamentos finos se extienden desde las líneas Z, que constituyen los límites del sarcómero, hacia el centro del mismo (figura 4). Estos filamentos están compuestos fundamentalmente por actina, pero también contienen otras proteínas, la troponina y la tropomiosina, que resultan indispensables en la regulación de la contracción muscular ^(43,45). La actina posee la capacidad de interactuar con la miosina y de activar la ATPasa de esta última. Las moléculas de tropomiosina son largas y delgadas y se extienden a lo largo del filamento fino. La troponina está constituida por la troponina T (TnT), la I (TnI) y la C (TnC), que en conjunto forman lo que se denomina complejo troponínico. La TnT es la que une el complejo troponínico a la tropomiosina, la TnI inhibe, junto con la tropomiosina, la interacción entre la actina y la miosina, y la TnC tiene la capacidad de unirse al Ca^{2+} ^(43,45,46). Aunque existen otras proteínas en el sarcómero, éstas son las principales en el proceso de contracción muscular.

El acortamiento del músculo estriado durante la contracción muscular es el resultado del deslizamiento de los filamentos finos sobre los gruesos hacia el centro del sarcómero, lo que se traduce en una disminución de la longitud de cada uno de los sarcómeros (figura 4), y por lo tanto del músculo, sin que la longitud de los filamentos individuales se modifique. La interacción cíclica entre las cabezas de miosina (puentes transversales) con la actina, asociada con la hidrólisis del ATP, sería la base molecular de la contracción muscular y lo que causaría que la actina se deslice entre las cadenas de miosina ^(43,46) (figura 5).

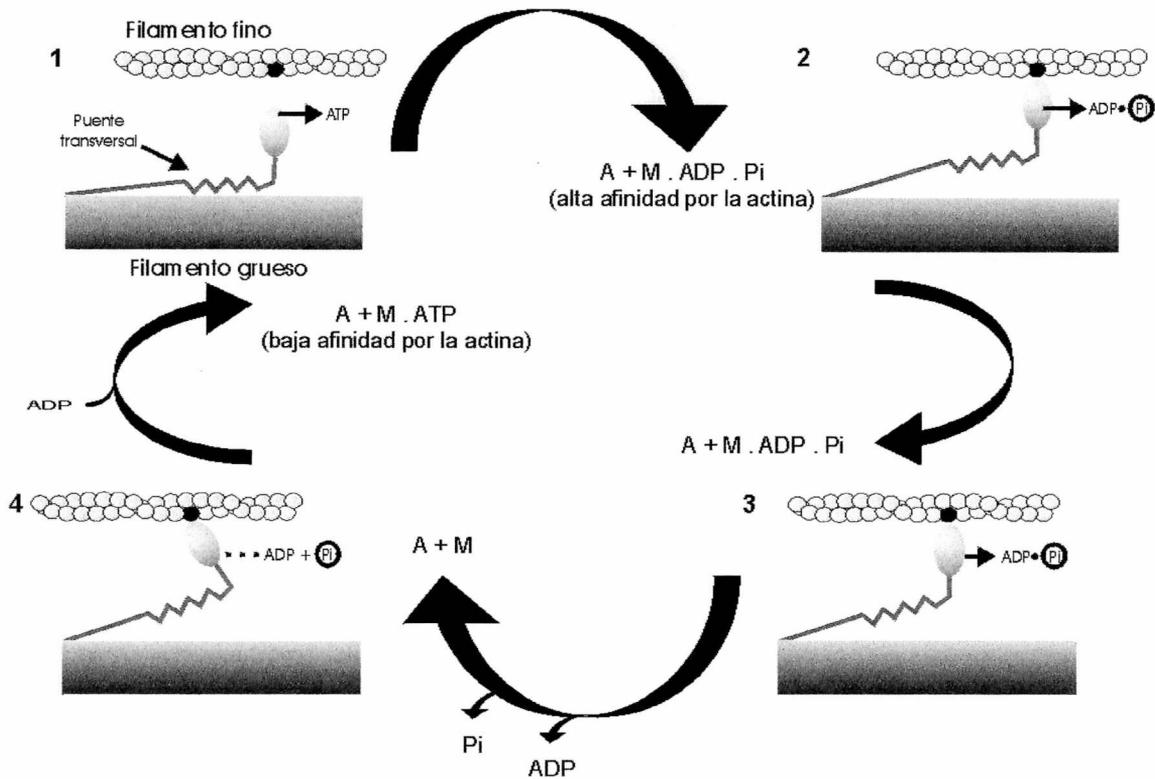


Figura 5: Procesos bioquímicos durante un ciclo de contracción. El puente cruzado se une al filamento fino y girando sobre su eje genera tensión y tracciona sobre el filamento fino, que se desliza sobre el grueso; luego la cabeza de miosina se libera para volver a fijarse en otro punto del filamento de actina, y así sucesivamente. Los puentes cruzados de las mitades opuestas del sarcómero giran en direcciones opuestas y de esta forma acercan cada mitad del sarcómero al centro (ver figura 4). La energía para este trabajo proviene de la hidrólisis del ATP en ADP y Pi. El ATP se une a la cabeza de la miosina inhibiendo la unión de ésta a la actina (1). Por su baja capacidad ATPasa la miosina, todavía no activada por la actina, desdobla lentamente el ATP en ADP y Pi formando un complejo intermedio, miosina-ADP-Pi (2), que se disocia muy lentamente. Este complejo es capaz de unirse a la actina formando lo que se denomina el complejo activo, actina-miosina-ADP-Pi (3). La interacción así formada entre la actina y la miosina promueve la actividad ATPasa de la miosina produciéndose la liberación del fosfato de alta energía del ATP, lo que determina un cambio en la posición del puente cruzado y provoca el deslizamiento del filamento fino sobre el grueso (4). De esta manera la energía química del ATP se ha transformado en trabajo mecánico. Este último estado descrito se conoce como complejo de rigor y permanece intacto hasta que una nueva molécula de ATP se une a la cabeza de la miosina.

El deslizamiento entre los miofilamentos está regulado por la troponina y la tropomiosina, que inhiben naturalmente la contracción en ausencia de Ca^{2+} , impidiendo la interacción entre la actina y la miosina ^(43,45,46). En presencia del ion la contracción se inicia, no por una activación del proceso contráctil en sí, sino por una reversión de la inhibición preexistente. Durante la diástole, el complejo troponina-tropomiosina cubre físicamente el sitio activo de la actina, lo que bloquea la interacción entre los miofilamentos. Cuando durante el AEC el Ca^{2+} citosólico aumenta, se produce la desinhibición del bloqueo (figura 6). El Ca^{2+} se une a la troponina C produciendo un cambio en el complejo regulatorio, que determina el corrimiento de la

tropomiosina, lo que libera el sitio activo de la actina y permite la unión entre la actina y la miosina.

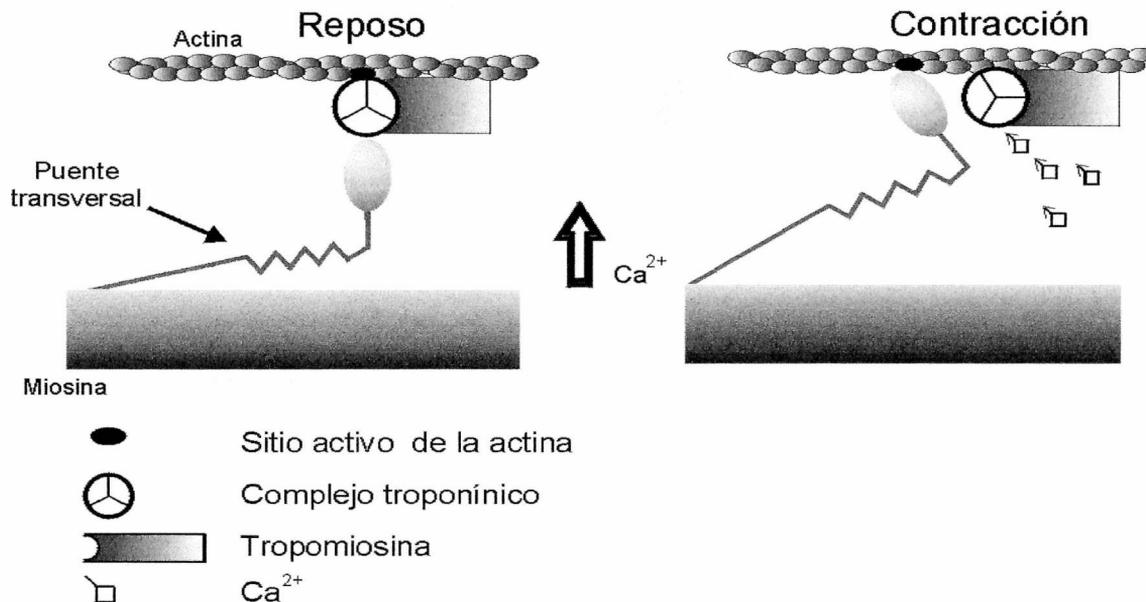


Figura 6: Regulación de la contracción por el Ca^{2+} . En reposo la tropomiosina y la troponina "tapan" el sitio de unión entre la actina y la miosina, impidiendo la interacción entre ambas moléculas. Al incrementarse la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la unión del ion a la troponina C produce el corrimiento del complejo troponina-tropomiosina, liberando el sitio activo de la actina.

d) Relajación miocárdica. Una vez que se ha desarrollado la fuerza y/o el acortamiento del músculo cardíaco, para que éste se relaje es necesario que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vuelva a valores de reposo. Cuatro sistemas compiten por el Ca^{2+} citosólico durante la relajación en el músculo cardíaco, la Ca^{2+} ATPasa del RS, el NCX, la Ca^{2+} ATPasa del sarcolema, y el transportador de Ca^{2+} de la mitocondria⁽⁴⁷⁾. La proporción en que cada uno de estos sistemas contribuye a la extrusión de Ca^{2+} del citosol varía según las especies y las condiciones patofisiológicas⁽⁴⁷⁾, pero en general la Ca^{2+} ATPasa del RS es el principal sistema encargado de la recuperación de los valores diastólicos de Ca^{2+}_i , seguido por el NCX (figura 7). Como ya se mencionó (figura 1), la Ca^{2+} ATPasa del sarcolema, y el transportador de Ca^{2+} de la mitocondria tienen una participación menor al 1% en la reducción del Ca^{2+} citosólico, sin embargo, la bomba de Ca^{2+} sarcolemal, por lo menos en algunas especies, podría jugar un rol importante en el mantenimiento del Ca^{2+} diastólico.

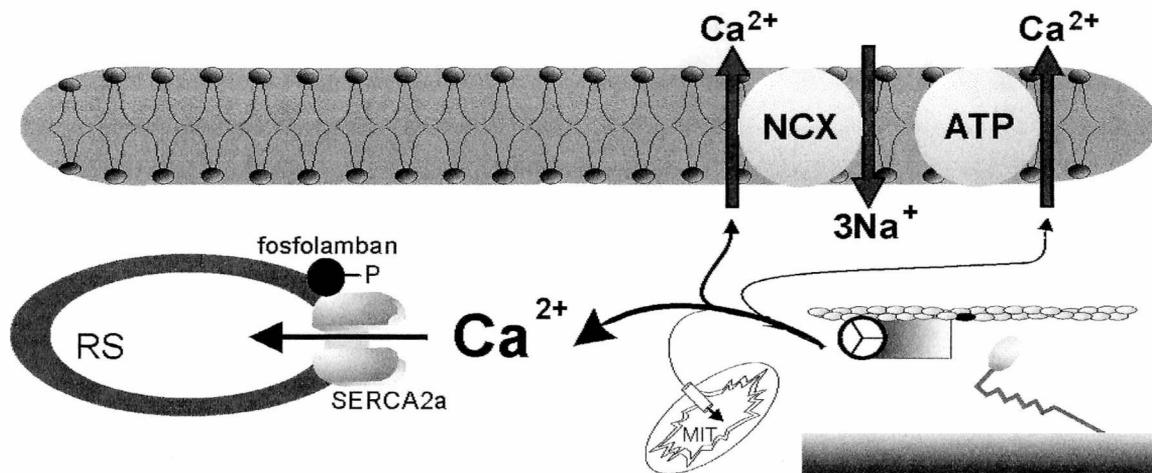


Figura 7: Representación esquemática de las vías de salida de Ca^{2+} . Una vez que el ciclo de contracción ha finalizado, el complejo troponina-tropomiosina libera el Ca^{2+} . La disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se produce principalmente a través de la SERCA2a. La SERCA2 está inhibida tónicamente por otra proteína del RS, la fosfolamban. La fosforilación (P) de fosfolamban revierte esta inhibición. Otro mecanismo que participa en la disminución del Ca^{2+}_i es el NCX trabajando en su modo directo. Como se mencionó en la figura 1, la Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática y el transportador de Ca^{2+} mitocondrial participan en menos del 1% en la disminución del Ca^{2+}_i .

La Ca^{2+} ATPasa del RS cardíaco, SERCA2a (sarcoplasmic Ca^{2+} -ATPase), ha sido bien caracterizada en estudios de retoma de Ca^{2+} donde se utilizaron vesículas de membrana de RS⁽⁴⁸⁾. El KCa para el transporte de Ca^{2+} es de 300-400nM⁽⁴⁹⁾, por lo que la SERCA2a es fuertemente activada a las concentraciones de Ca^{2+} fisiológicas que maneja la célula en cada ciclo de contracción-relajación. La velocidad con que la Ca^{2+} ATPasa del RS del miocardio transporta el Ca^{2+} está regulada por medio de la fosforilación de otra proteína, denominada fosfolamban⁽⁵⁰⁾ (figura 8). Esta proteína, cuando está desfosforilada, tiene la capacidad de fijarse a la SERCA2a e inhibir el transporte de Ca^{2+} ⁽⁵¹⁾. Cuando se fosforila se remueve la inhibición de la fosfolamban, resultando fundamentalmente en una menor KCa para el transporte de Ca^{2+} ⁽⁵⁵⁾. La fosforilación de fosfolamban puede ocurrir a través de la proteína quinasa dependiente de AMPc (proteína quinasa A, PKA) a nivel del residuo serina 16 (Ser^{16})^(52,53) y/o por la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (CaMKII) (la calmodulina es otra proteína aceptora de Ca^{2+} que cuando tiene todos sus sitios de unión para el ion ocupados, es capaz de activar a la proteína quinasa) en el residuo treonina 17 (Thr^{17})⁽⁵⁴⁾. Este aumento de la velocidad con que el Ca^{2+} es recapturado por el RS aumenta la velocidad de relajación y además el contenido de Ca^{2+} del mismo, incrementando de esta forma la CICR en la próxima contracción. Es decir, que el grado de fosforilación de la fosfolamban regula tanto la relajación como la contracción miocárdica. Este es el mecanismo principal por el cual la mayoría de las intervenciones que aumentan el AMPc, como por ejemplo los

agentes β -adrenérgicos, el dibutilil AMPc, la forskolina y el glucagón entre otros, producen un efecto relajante e inotrópico positivo ^(56-58,59). Pero además, la regulación de la actividad de fosfolamban resulta de un equilibrio entre la acción de proteínas kinasas y de proteínas fosfatasas ⁽⁶⁰⁾, por lo que un mecanismo alternativo de regulación sería la estimulación o inhibición de la proteína fosfatasa tipo 1 (PP1) que desfosforila a fosfolamban. PP1 es activada, por ejemplo, por estimulación colinérgica e inhibida por agonistas β -adrenérgicos y por acidosis ⁽⁶¹⁻⁶³⁾.

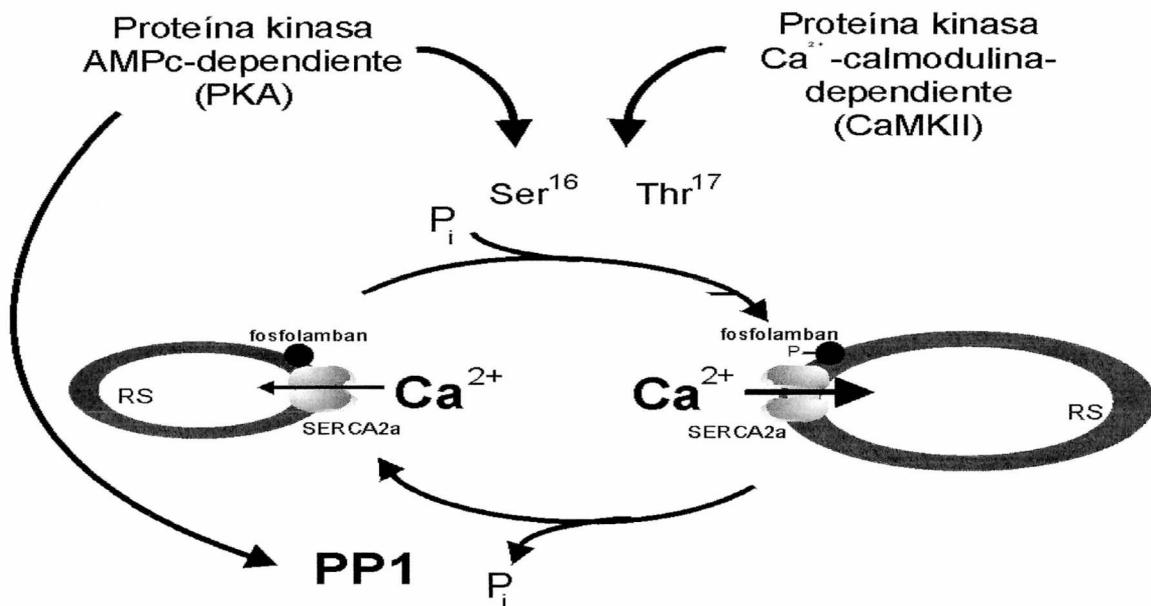


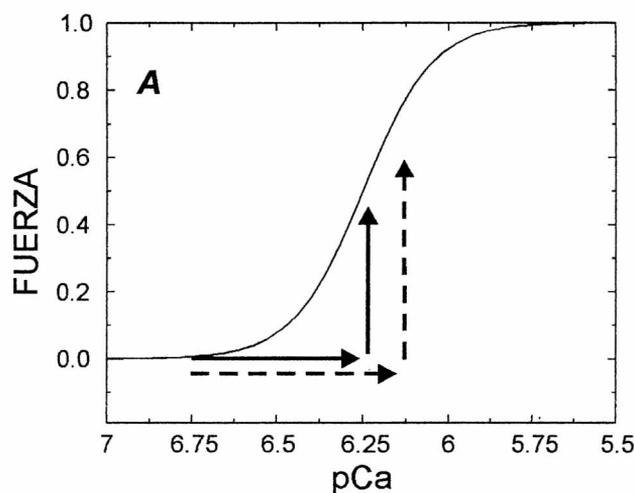
Figura 8: Regulación de la SERCA1a. La fosfolamban desfosforilada interactúa con la SERCA2a inhibiéndola, disminuyendo de esta manera el secuestro de Ca^{2+} por el RS. Cuando la fosfolamban es fosforilada (P) en el residuo Ser¹⁶, por PKA, o en Thr¹⁷, por CaMKII, se libera la inhibición sobre la SERCA2a y se estimula la retoma de Ca^{2+} y la carga de Ca^{2+} del RS. El proceso se revierte por acción de la proteína fosfatasa tipo 1 (PP1), que desfosforila a fosfolamban. Esta proteína es inhibida por PKA, lo que potencia el efecto β -adrenérgico.

Otro medio por el cual el miocito disminuye la $[Ca^{2+}]_i$, es la extrusión de Ca^{2+} por el NCX ^(47,64), aunque en la mayoría de las especies el principal mecanismo para este fin es la retoma de Ca^{2+} por el RS. Como se mencionó en el inciso a, durante la mayor parte del potencial de acción, las concentraciones de Na^+ y Ca^{2+} y el voltaje de la membrana plasmática condicionan al NCX para que éste funcione en su modo directo extruyendo Ca^{2+} de la célula y disminuyendo así la $[Ca^{2+}]_i$.

MODULACION DE LA CONTRACTILIDAD MIOCARDICA

En el músculo cardíaco la fuerza contráctil puede ser regulada, a nivel subcelular, por dos mecanismos básicos, no excluyentes el uno del otro. Estos son: 1) un cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ y/o 2) una modificación en la respuesta de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} . Esta última modificación podría deberse a un aumento o disminución en la sensibilidad, a nivel de las proteínas regulatorias de los filamentos finos, y/o por un aumento o disminución en la fuerza máxima, a nivel de los puentes transversales en los filamentos gruesos ⁽⁶⁵⁾ (figura 9).

Cambios en la concentración intracelular de calcio



Cambios en la respuesta de los miofilamentos al calcio

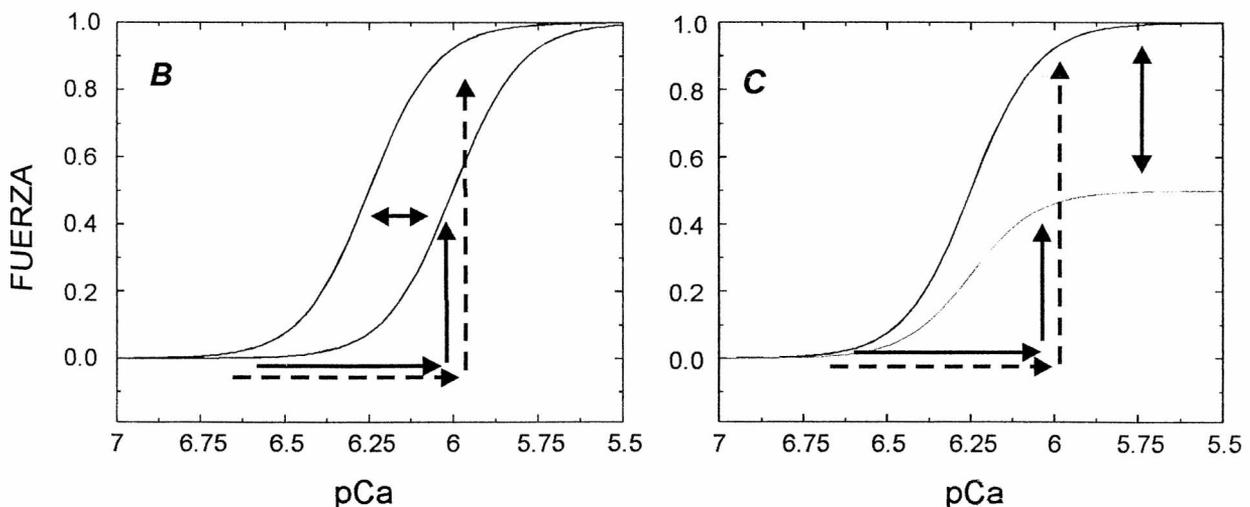


Figura 9: Modulación de la contractilidad miocárdica. **A:** aumento de la fuerza por aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ produce un aumento de la contractilidad sin modificaciones de la relación fuerza-pCa (pCa es el logaritmo negativo de la $[Ca^{2+}]_i$). Al aumentar el Ca^{2+} , hay un desplazamiento sobre la misma curva a valores mayores de fuerza. **B:** aumento de la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} . Se observa un desplazamiento paralelo de la relación fuerza-pCa, lo que se traduce en una mayor fuerza desarrollada para cada $[Ca^{2+}]_i$ a partir de donde se empieza a desarrollar fuerza (umbral) y una menor $[Ca^{2+}]_i$ necesaria para alcanzar la fuerza máxima. **C:** aumento de la fuerza máxima. La fuerza máxima es mayor, esta se alcanza a la misma $[Ca^{2+}]_i$ que en la situación control y también la $[Ca^{2+}]_i$ umbral es la misma en las dos situaciones.

1) Cambios en el Ca^{2+} citoplasmático

Los aumentos de Ca^{2+} citoplasmático se traducen en un aumento de la fuerza de acuerdo con la relación fuerza- Ca^{2+} ⁽⁶⁶⁾ (figura 9A). En otras palabras incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (*transient* de Ca^{2+}), tales como los que producen diferentes intervenciones inotrópicas positivas, desplazan la fuerza a lo largo de la curva fuerza- Ca^{2+} correspondiente. Este cambio en la capacidad del sarcómero para realizar fuerza o acortarse por aumentos en el *transient* de Ca^{2+} se produce porque el ascenso del ion aumenta el Ca^{2+} unido a la troponina C con el consecuente aumento de la capacidad de desarrollo de fuerza del corazón ⁽⁶⁷⁾.

Como ya se ha mencionado, el aumento del Ca^{2+}_i necesario para una contracción está dado principalmente por el mecanismo de CICR durante el AEC. Este fenómeno puede ser regulado a varios niveles, por un lado modulando el influjo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática ^(68,69), lo que constituye el disparador del proceso de CICR; por otro regulando la "ganancia" del proceso de CICR ⁽⁷⁰⁻⁷²⁾, que determinará la cantidad de Ca^{2+} liberada a través del mismo para un dado influjo de Ca^{2+} a una determinada velocidad; y por último modificando la cantidad de Ca^{2+} que se acumula en el RS ⁽⁷³⁾, lo que constituirá el reservorio de Ca^{2+} , y por lo tanto, el Ca^{2+} que será liberado en la contracción siguiente.

Regulación del influjo de Ca^{2+}

Dado que la entrada de Ca^{2+} gatilla la liberación de Ca^{2+} por el RS, las variaciones del influjo de Ca^{2+} afectarán la cantidad de Ca^{2+} liberada por el RS. Ya se ha mencionado con anterioridad que la entrada de Ca^{2+} a la célula en el AEC está dada principalmente por la corriente de Ca^{2+} de tipo L. Esta tiene varios puntos de control, a saber, a) por voltaje ⁽⁷⁴⁾ y por Ca^{2+} ⁽⁷⁵⁾, b) por agonistas y antagonistas ^(76,77) y c) por regulación hormonal, mediante fosforilación, ya sea de la PKA ⁽⁷⁸⁾ o de la proteína kinasa C (PKC) ⁽⁷⁹⁻⁸³⁾.

a) La rápida despolarización de la membrana plasmática desde potenciales relativamente negativos promueve la apertura de los canales de Ca^{2+} . La corriente de Ca^{2+} de tipo L muestra dos tipos de inactivación: lenta y rápida. La primera es dependiente del voltaje, ya que a -25mV el canal se encuentra 50% inactivado ⁽⁷⁴⁾; mientras que la segunda es causada por el aumento del Ca^{2+}_i ⁽⁷⁵⁾ a través de un mecanismo de retroalimentación negativa. En esta inactivación Ca^{2+} -dependiente

participaría la calmodulina que, unida al Ca^{2+} , podría fijarse a un motivo del canal inactivándolo.

b) Con respecto al control por agonistas y antagonistas, se sabe que los canales de Ca^{2+} de tipo L son blanco de una cantidad de drogas clínicamente importantes. Dentro de los antagonistas las de mayor relevancia son las dihidropiridinas (DHP) y las fenilalquilaminas (PAA) tales como la nifedipina y el verapamilo respectivamente ⁽⁷⁶⁾. Entre los agonistas, el más utilizado es el BayK8644 ⁽⁷⁷⁾ en experimentos de laboratorio.

c) La regulación humoral está dada por la fosforilación del canal de Ca^{2+} de tipo L. La fosforilación del canal dependiente de AMPc a través de PKA, aumenta la disponibilidad del canal a abrirse durante la despolarización. Esta propiedad de los canales hace que la acción inotrópica positiva de las catecolaminas sea causada, en parte, por un aumento del influjo de Ca^{2+} a través de la corriente de tipo L ⁽⁷⁸⁾.

Por otro lado, la acción de la PKC sobre los canales de Ca^{2+} de tipo L es muy controvertida. Se ha descrito que los ésteres de forbol, que estimulan directamente a la PKC, pueden incrementar ⁽⁸⁰⁾, disminuir ⁽⁸¹⁾, tener un efecto bifásico ⁽⁸²⁾ o incluso carecer de efecto ⁽⁸³⁾ sobre la corriente de Ca^{2+} de tipo L.

Además, no se debe olvidar que el aumento del Ca^{2+} citosólico que dispara el CICR podría estar dado también, al menos en parte, por el NCX ^(84,85). El Ca^{2+} , podría aumentar a través de este mecanismo por un aumento de la actividad del intercambiador en su modo revertido, es decir haciendo entrar Ca^{2+} en la célula, o por una disminución de su actividad en su modo directo, sacando menos Ca^{2+} del espacio intracelular.

La corriente del NCX tiene varios puntos de control. Ya se mencionó su regulación por voltaje y aquella que tiene lugar cuando las concentraciones de sustrato, Ca^{2+} y Na^+ , cambian ^(26,27). Se ha sugerido también que, en la regulación del transportador, estarían involucrados los receptores acoplados a proteína G ⁽⁸⁶⁾, siendo Gq la que estimula la actividad del intercambiador, ya que se ha mostrado que la Ang II, la endotelina 1 y la fenilefrina median el aumento de su actividad ⁽⁸⁷⁾. Por otro lado, estudios de Shigematsu y Arita ⁽⁸⁸⁾ concluyeron que la acidosis disminuye tanto la corriente hacia adentro como la corriente hacia fuera del intercambiador.

Regulación de la carga de Ca^{2+} del RS

El estado de carga que tiene el RS para el CICR es de crucial importancia ya que la fracción del contenido de Ca^{2+} que es liberada en cada contracción puede ser

influenciada fuertemente por la cantidad de Ca^{2+} almacenada en el RS ⁽⁸⁹⁾, y por lo tanto determinará la magnitud de la contracción, en ausencia de cambios en la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles. Una de las fuentes de Ca^{2+} que participa en la carga del RS incluiría a la corriente de Ca^{2+} ⁽⁹⁰⁾. Otra fuente que ha sido sugerida para esta función es el NCX funcionando en su modo directo ^(84,85). Como se mencionó, el NCX compite por la disminución del Ca^{2+} , durante la relajación con la SERCA2, y por lo tanto, cuanto más Ca^{2+} extruya el NCX, menor será la retoma del ion por la bomba del RS y menor la carga de Ca^{2+} del mismo. Es decir, el NCX podría contribuir a la carga del RS si la actividad del intercambiador funcionando en modo directo estuviese enlentecida, por el contrario, si la actividad del NCX en modo directo estuviese acelerada la carga del RS disminuiría. Pero sin duda, debido a que la actividad de la SERCA2 es más importante en la mayoría de las especies, la carga del RS es responsabilidad principal de la Ca^{2+} -ATPasa, cuya regulación está dada fundamentalmente por medio de la fosforilación de la fosfolamban ⁽⁵⁰⁾.

Por otro lado, la carga del RS puede modificarse farmacológicamente por medio de agentes que, por ejemplo, disminuyen la retoma de Ca^{2+} . La tapsigargina ⁽⁹¹⁾ y el ácido ciclopiazónico ⁽⁹²⁾ inhiben directamente la Ca^{2+} -ATPasa del RS, impidiendo el secuestro de Ca^{2+} y por lo tanto también su liberación. Otras drogas, como la rianodina, que como ya se ha explicado, tiene un efecto dual ⁽³⁷⁾, produce a bajas concentraciones la depleción de los depósitos de Ca^{2+} del RS y a altas concentraciones bloquea completamente el canal. La cafeína y la teofilina activan la liberación de Ca^{2+} ⁽⁹³⁾ del RS incrementando la probabilidad de apertura del canal.

2) Cambios en la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos

Como se describió más arriba, la contractilidad puede ser también modulada, además de por variaciones en el Ca^{2+} intracelular, por cambios en la respuesta de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} , que a su vez pueden deberse a alteraciones en la sensibilidad de los miofilamentos (figura 9B), y/o en la fuerza máxima (figura 9C) ⁽⁶⁵⁾.

Los aumentos en la sensibilidad se reflejan en desplazamientos paralelos hacia la izquierda de la relación fuerza- Ca^{2+} , lo que se traduce en una mayor fuerza a una dada $[\text{Ca}^{2+}]_i$, o una menor $[\text{Ca}^{2+}]_i$, para lograr una fuerza dada. El mecanismo básico por el cual cambia la sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos es una modificación en la afinidad de la TnC por el Ca^{2+} ^(45,46). Esta afinidad está determinada por la velocidad de asociación y disociación entre el Ca^{2+} y la TnC. Entonces, si disminuye la velocidad con la que el Ca^{2+} se disocia de la TnC, el Ca^{2+} quedará unido a ella por más tiempo, aumentando la afinidad de la TnC por el Ca^{2+} , y produciendo así una mayor interacción

de las proteínas contráctiles, lo que resulta en un aumento de la fuerza para esa $[Ca^{2+}]_i$. Este fenómeno no afecta directamente los puentes cruzados y por lo tanto no hay efectos sobre la fuerza máxima.

Las alteraciones en la fuerza máxima pueden deberse a un cambio en la disponibilidad de puentes cruzados, en el número de puentes cruzados unidos fuertemente a la actina o en la fuerza que pueda realizar cada uno de los puentes ⁽⁶⁵⁾.

Generalmente en las intervenciones que producen una alteración de la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles es difícil diferenciar si esta alteración se debe a cambios en la sensibilidad o en la fuerza máxima, ya que, por un lado, la mayoría de las intervenciones que modifican la sensibilidad frecuentemente alteran también la fuerza máxima, y por otro, las modificaciones en la fuerza máxima son de difícil comprobación en preparaciones intactas.

Dentro de las situaciones que afectan la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos se pueden nombrar a los cambios en la longitud inicial ⁽⁹⁴⁾, la acidosis ⁽⁹⁵⁾, la fosforilación de las cadenas livianas de miosina ⁽⁹⁶⁾ y la estimulación α y β adrenérgica⁽⁹⁷⁾, entre otras.

LA ANGIOTENSINA II

La Ang II produce un efecto inotrópico positivo en diferentes especies animales ^(2-9,11,12), que ocurre asociado a un efecto antirrelajante o lusitrópico negativo⁽⁹⁸⁾. Los mecanismos subcelulares que determinan estos efectos son aún motivo de controversia, aunque se sabe la activación de receptores acoplados a proteína G por el péptido, y la consecuente generación de segundos mensajeros, serían los responsables de los efectos biológicos de la hormona. Con el propósito de comprender mejor el mecanismo de acción de la Ang II, se revisarán los mecanismos involucrados en las trasducciones de señales.

TRASDUCCION DE SEÑALES

Los mecanismos homeostáticos que ajustan la función del miocito cardíaco a las diversas intervenciones que se realicen sobre ellos, requieren, debido a la presencia de la membrana plasmática, de una comunicación entre el medio intra y el extracelular. La transmisión de una señal involucra la interacción de un ligando con su receptor transmembrana, que habitualmente es una proteína integral de la membrana plasmática que posee dominios a ambos lados de la bicapa lipídica. El receptor activado por su ligando gatilla una actividad catalítica en el citosol generando una segunda señal (segundo mensajero), siendo la amplitud de esta última mucho mayor que 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. Este sistema escalonado de reacciones se denomina trasducción de señales ⁽⁹⁹⁾ (figura 10). 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 interaccionar 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 ⁽¹⁰⁰⁾.

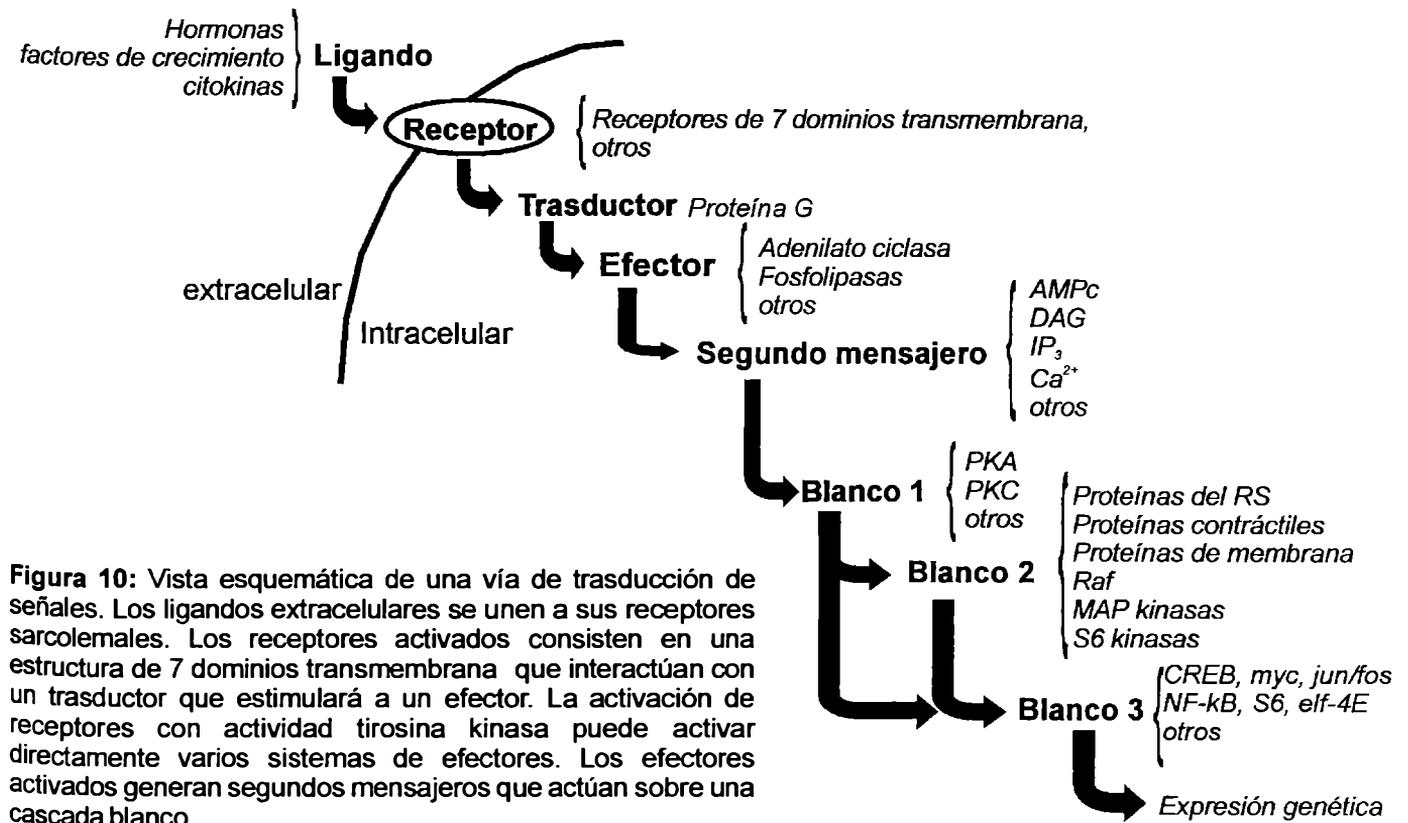


Figura 10: Vista esquemática de una vía de transducción de señales. Los ligandos extracelulares se unen a sus receptores sarcolemales. Los receptores activados consisten en una estructura de 7 dominios transmembrana que interactúan con un transductor que estimulará a un efector. La activación de receptores con actividad tirosina kinasa puede activar directamente varios sistemas de efectores. Los efectores activados generan segundos mensajeros que actúan sobre una cascada blanco.

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 receptor que les da inicio, siendo los de mayor importancia los receptores que poseen actividad proteína kinasa en su dominio citosólico, y los que están acoplados a proteína G, como es el caso del receptor de la Ang II⁽⁹⁹⁾.

Los receptores con actividad proteína kinasa se activan por unión de su ligando, lo que promueve que el dominio intracitoplasmático se fosforile a sí mismo; esta autofosforilación activa a otras proteínas diana dentro de la célula, las cuales se convierten en nuevos sustratos para próximas reacciones enzimáticas. Los receptores con actividad proteína kinasa más comunes son tirosina kinasa pero también hay algunos serina/treonina kinasa⁽⁹⁹⁾.

Los receptores que se acoplan a proteína G, la cual recibe este nombre por la capacidad de fijar nucleótidos de guanina, están compuestos por tres subunidades, α , β y γ . Este trímero inactivo está constitutivamente asociado al receptor. Cuando éste es activado, por unión de su ligando, se produce un cambio conformacional a nivel de

la subunidad α que causa la liberación del GDP que tiene unido en estado basal. Como la concentración de GTP citosólico es mucho mayor que la de GDP, el sitio vacante para el nucleótido es ocupado por el GTP, lo que induce a la subunidad α a disociarse del receptor y de las subunidades $\beta\gamma$, acarreando el GTP. Tanto el monómero α como el dímero $\beta\gamma$, pueden actuar sobre proteínas blanco generalmente asociadas con la membrana, las cuales actuarán sobre otros blancos en el citoplasma. La subunidad α tiene actividad GTPasa, por lo que al hidrolizar el GTP a GDP puede reasociarse con el dímero $\beta\gamma$ y de esta manera reiniciar el ciclo (figura 11) ^(101,102). Las proteínas G traducen señales de una gran cantidad de receptores y a su vez hay una gran variedad de proteínas G (tabla 1) ⁽⁹⁹⁾. Los segundos mensajeros más comunes son los nucleótidos cíclicos como el AMPc; sin embargo, otro grupo importante consiste en pequeñas moléculas lipídicas, como los fosfoinositósidos y el diacilglicerol.

Proteína G	Función sobre el efector	Segundo mensajero	Ejemplo de receptor
s	+ adenilato cilasa	↑ AMPc	β -adrenérgico (β_1, β_2)
olf	+ adenilato ciclasa	↑ AMPc	receptores olfatorios
i	- adenilato ciclasa abre canales de K^+	↓ AMPc ↑ potencial de membrana	SSTR (receptor para somatostatina), β_2
o	Cierra canales de Ca^{2+}	↓ potencial de membrana	M_2 colinérgico
t	+ fosfodiesterasas del GMPc	↓ GMPc	Receptor para rodopsina
q	+ fosfolipasa C	↑ IP_3 y DAG	AT1

Tabla 1: clases de proteína G, sus efectores, segundos mensajeros y ejemplos de agonistas que las activan. +, estimulación. -, inhibición. IP_3 , inositol 1,4,5-trifosfato. DAG, diacilglicerol.

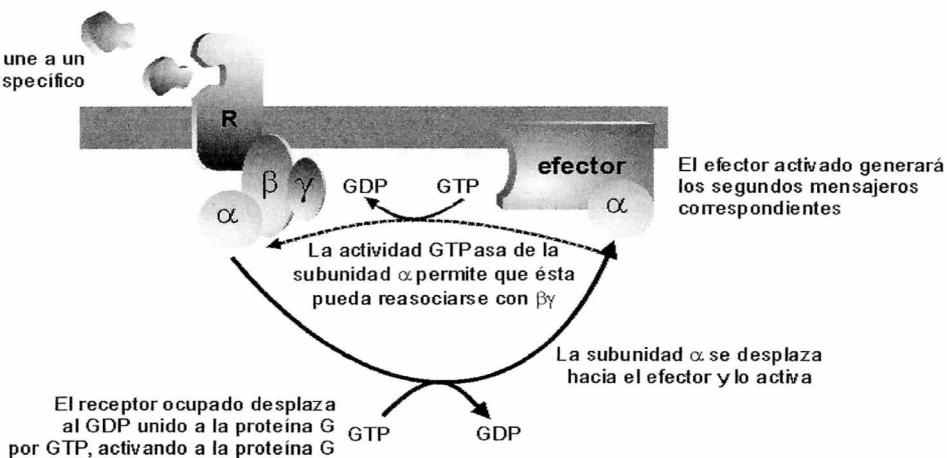


Figura 11: Mecanismo de acción de un receptor acoplado a proteína G.

Las acciones biológicas de la Ang II comienzan cuando el péptido se une a receptores específicos en la membrana plasmática, estando éstos acoplados a una proteína Gq. El complejo hormona-receptor produce la disociación de la subunidad α y ésta, traslocándose por la membrana produce la activación de la isoforma β de la fosfolipasa C, enzima que hidroliza fosfoinosítidos de membrana (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) en 1,2-diacilglicerol (DAG), que activa a la PKC, e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃)^(98,99). Estos segundos mensajeros, PKC e IP₃, a través de su acción sobre distintos blancos intracelulares, producen la mayoría de los efectos biológicos de la Ang II. 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 y de las MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases), principalmente a través de PKC⁽¹⁰³⁾. Además, estudios recientes indican que la Ang II no sólo activa a la PLC, sino que también sería el ligando que desencadena la activación de fosfolipasa A₂⁽¹⁰⁴⁾ y la producción de óxido nítrico⁽¹⁰⁵⁾.

Ligandos

La Ang II es el producto final del sistema renina-angiotensina (SRA). El SRA participa en el control de la presión arterial por vía humoral, pero también está presente en el sistema nervioso central⁽¹⁰⁶⁾, en la pared de los vasos sanguíneos⁽¹⁰⁷⁾ e incluso en el músculo cardíaco⁽¹⁰⁸⁾. La renina, elaborada por las células yuxtglomerulares de la pared de la arteriola aferente del glomérulo renal, es una enzima proteolítica que es secretada ante una caída de la presión arterial o depleción del Na⁺ con disminución del compartimiento del líquido extracelular⁽¹⁰⁹⁾. Al ser liberada actúa sobre el angiotensinógeno, producido en el hígado, del cual libera un decapeptido, la angiotensina I, cuya actividad biológica se desconoce. La enzima convertidora de angiotensina (ECA), presente principalmente en pulmón, pero también en otros tejidos⁽¹⁰⁶⁾, cataliza la conversión de angiotensina I en Ang II, un octapeptido. La Ang II, que ejerce los principales efectos fisiológicos del sistema, es inactivada por las angiotensinasas, peptidasas presentes en la mayoría de los tejidos que hacen que la vida media de la Ang II sea de aproximadamente un minuto⁽¹¹⁰⁾.

Receptores

Por estudios de unión (binding) de la Ang II a su receptor se ha determinado la presencia de varios subtipos de receptores en diferentes tejidos⁽¹¹¹⁾. En el corazón se han descrito dos tipos de receptores por los cuales la Ang II tiene la misma afinidad, y que son susceptibles de inhibición farmacológica, el AT1, sensible al bloqueo por

losartan ⁽¹¹²⁾, y el AT2, capaz de ser inhibido por PD123177 ⁽¹¹³⁾. Ambos subtipos se expresan en varias especies, incluyendo rata, conejo, gato, y humano ^(114,115); y median acciones contrapuestas, principalmente en lo que se refiere a la regulación del crecimiento celular ^(116,117). Se ha demostrado que la estimulación del AT2 media un efecto antiproliferativo, en contraposición a la promoción del crecimiento que produce la activación del AT1 sobre el músculo liso vascular ⁽¹¹⁸⁾. También hay evidencia de que la estimulación de los AT2 se opone al efecto hipertrófico de los AT1 en miocitos ventriculares de ratas neonatas ⁽¹¹⁷⁾, a la inducción de síntesis proteica en corazones de ratas adultas ⁽¹¹⁹⁾ y al efecto cronotrópico en corazón de ratones adultos ^(119,120). Pero además, en estudios, en donde el gen para la expresión de AT2 ha sido ablacionado o sobreexpresado, han revelado que el AT2 atenúa el efecto presor de la Ang II mediado por los AT1 ⁽¹²¹⁾. Además, Gunasegaram y colaboradores ⁽¹²²⁾, demuestran que la estimulación del AT1 incrementa la actividad del intercambiador Na^+/H^+ , y este efecto disminuye si el AT2 no es bloqueado, lo que indica que el AT2 tendría un efecto opuesto al del AT1 sobre este intercambiador. Se ha observado también que el bloqueo del efecto inotrópico positivo de la Ang II, en las especies que lo presentan, es posible con losartan pero no con PD123177, sugiriendo que el AT1 sería el receptor implicado en el aumento del inotropismo dado por la Ang II ^(11,123,124). Por otro lado, aunque ambos receptores coexistan en el corazón, la proporción relativa en la cual éstos están expresados, varía entre las diferentes especies. Por ejemplo en la rata y el conejo ambos receptores se expresan por igual ⁽¹¹⁴⁾, mientras que los corazones de bovinos y simios expresan principalmente AT1 ^(114,115) y el miocardio de los humanos, AT2 ⁽¹¹⁵⁾. También, esta proporción puede variar ante determinadas circunstancias, como en casos de hipertrofia por sobrecarga de presión, en donde se observa una disminución de los receptores AT1 ⁽¹²⁵⁾. Además, recientemente ha sido descrito un nuevo tipo de receptor de Ang II, el AT4 ⁽¹²⁶⁾, que tiene una alta afinidad por un metabolito de la Ang II, la Ang IV; y aunque estos receptores se han identificado en preparaciones cardíacas ⁽¹²⁷⁾, los efectos sobre la contractilidad miocárdica están aún por dilucidarse.

El receptor AT1 está compuesto por 359 aminoácidos y contiene 7 dominios transmembrana que exhiben un 20-30% de homología en la secuencia con otros receptores acoplados a proteína G ⁽¹²⁸⁾. Los residuos tirosina localizados en los lazos citoplasmáticos y en el dominio C-terminal son potenciales sitios de fosforilación. El receptor posee motivos de anclaje para Stat3, Src y PI-3 kinasa, que participarían en el acoplamiento de la vía JAK-STAT y en la activación de otras cascadas de señales.

Segundos mensajeros

Como se mencionó anteriormente, la unión de la Ang II con el receptor AT1 activa a la fosfolipasa C, la cual metaboliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en IP₃, que al ser hidrosoluble difunde por el citoplasma, y DAG, que permanece en la membrana y activa a la PKC^(98,99).

IP₃

Los datos publicados sobre músculo liso han demostrado fehacientemente que el IP₃ generado produce liberación de Ca²⁺ de depósitos intracelulares no mitocondriales⁽³⁴⁻³⁶⁾. Este hecho ha llevado a varios laboratorios a investigar el posible rol del IP₃ como segundo mensajero en el AEC del músculo estriado, arrojando, desafortunadamente, resultados contradictorios⁽¹²⁹⁻¹³³⁾. La sospecha de que el IP₃ participe del AEC en el corazón está basada en que: 1) la cascada del IP₃ está presente en el músculo cardíaco y es activada por drogas y hormonas que producen efecto inotrópico positivo con elevación del Ca²⁺ citoplasmático⁽¹³⁴⁾; 2) el IP₃ produce la contracción de fibras cardíacas desprovistas de membrana⁽¹³⁴⁾; 3) microsomas cardíacos fusionados con bicapas lipídicas planares exhiben canales de Ca²⁺ cuya actividad está modulada por el IP₃⁽¹³⁴⁾ y 4) análisis de Western y Northern blot, usando tejido cardíaco, indican que el receptor para IP₃ está presente en el corazón⁽¹³⁴⁾. No obstante, la liberación de Ca²⁺ del RS cardíaco inducida por IP₃ no ha sido demostrada convincentemente, y el papel del receptor de IP₃ en el miocardio es aún controvertido. Tanto en células como en preparaciones multicelulares, desprovistas de membrana, coexisten varios problemas para el estudio de la función del IP₃. Uno de ellos es que la difusión dificulta el incremento en la concentración de IP₃ alrededor del RS lo suficientemente rápido como para mimetizar el aumento que ocurre en las células intactas⁽¹³⁵⁾. Otro factor adicional, es el rápido metabolismo del IP₃ por la actividad de fosfatasas o kinasas⁽¹³⁶⁾. Para evitar estos inconvenientes Kentish y colaboradores⁽¹³⁰⁾ utilizaron IP₃ enjaulado ("caged IP₃"), una molécula inactiva pero fotolábil que difunde a través de la preparación (trabéculas ventriculares desprovistas de membrana con saponina) y que es liberada y activada por fotólisis, lo que produce un rápido y homogéneo incremento de IP₃ en la preparación. Con esta técnica, este grupo de investigadores, mostró que el IP₃ podría afectar al RS y precipitar la liberación de Ca²⁺ produciendo una respuesta contráctil, aunque más débil y más lenta que la producida por la CICR. Por otro lado, dado que experimentos en músculo esquelético sugirieron que el IP₃ tendría un efecto directo sobre la maquinaria contráctil⁽¹³⁷⁾, aumentando la respuesta al Ca²⁺ de los miofilamentos, Nosek y colaboradores estudiaron este hecho en el músculo cardíaco⁽¹³³⁾. Estos autores

comprobaron que el IP_3 no tiene efecto ni sobre la sensibilidad al Ca^{2+} ni sobre la fuerza máxima de las proteínas contráctiles, y que esta ausencia de efecto no se debía a la degradación del IP_3 . En base a los datos expuestos, la Ang II podría producir sus efectos sobre el músculo cardíaco a través del IP_3 ya que, por un lado, produce liberación de Ca^{2+} del RS, y por otro aumenta el metabolismo de los fosfoinosítidos. Sin embargo esta posibilidad no ha sido estudiada aún.

PKC

Las PKC están emparentadas con la familia de las serina/treonina kinasas, y existen varias isoformas ⁽¹³⁸⁾. La PKC actúa como señal intracelular de diversas sustancias, y su activación puede, además, modular indirectamente otras cascadas de señales como la Raf-MEK1-MAPK y la PI3 kinasa-Akt ⁽¹³⁹⁾. Hasta el momento se han documentado al menos 12 isoformas ⁽¹³⁸⁾ de PKC. Las más conocidas pueden ser agrupadas como PKC convencionales (α , β I, β II, y γ), que son Ca^{2+} dependientes y se activan por fijación del DAG y de fosfatidilserina (PS); nuevas PKC (δ , ϵ , η y θ), que son Ca^{2+} independientes pero que también se activan por DAG y PS; y PKC atípicas (ζ y ι/λ), las cuales son Ca^{2+} y DAG independientes pero sensibles a PS. La distribución de estas isoformas depende del tejido y la especie en cuestión. A su vez, las diferentes isoformas tienen distintas funciones celulares, debido a una localización celular específica y a una aparente activación preferencial en respuesta a estímulos hormonales o biológicos. Por ejemplo, la PKC β I (PKC convencional) se trasloca desde el citosol a regiones perinucleares cuando es activada, en contraposición a la PKC δ y ϵ (nuevas PKC), que se localizan en el perinúcleo y el núcleo en estado basal y cuando son activadas se traslocan al citoesqueleto fibrilar ⁽¹³⁸⁾. Además, se ha demostrado que puede haber cambios en isoformas específicas localizadas en el miocardio, en situaciones de isquemia-reperfusión, preconditionamiento isquémico, insuficiencia cardíaca por miocardiopatía y diabetes ⁽¹⁴⁰⁾. Para determinar los efectos biológicos de cada isoforma de PKC, se han usado animales transgénicos en donde se sobreexpresa o se produce la ablación de una isoforma. También se ha inhibido o activado una isoforma en particular por medio de la manipulación de la interacción entre las distintas isoformas de PKC con sus proteínas de anclaje específicas (RACKs) ⁽¹⁴¹⁾. Se ha postulado que estas proteínas fijan y traslocan cada isoforma de PKC. Los resultados provenientes de estos estudios han revelado evidencia definitiva de que, por ejemplo, la PKC ϵ tendría importantes efectos sobre el crecimiento de los cardiomiocitos y facilitaría la protección miocárdica del preconditionamiento isquémico ⁽¹⁴²⁾, mientras que la PKC β disminuiría la contractilidad miocárdica y aumentaría la fibrosis ⁽¹⁴⁰⁾. Sin embargo, mucho queda por saber acerca de las funciones de otras isoformas de PKC.

Enzimáticamente, la PKC fosforila residuos serina o treonina, utilizando como sustrato MgATP, con un Km para el ATP en un rango menor a μM ⁽¹⁴³⁾. Con respecto a los efectos de la PKC sobre la regulación del Ca^{2+}_i , por el NCX, Ballard y Schaffer⁽⁸⁷⁾ han publicado que un inhibidor de la kinasa atenúa el efecto estimulador de la Ang II sobre el NCX. En cuanto a los canales de Ca^{2+} de tipo L, los datos disponibles son poco claros, ya que, como se ha dicho con anterioridad (ver página 7), la actividad de la PKC sobre la corriente de Ca^{2+} de tipo L es muy controvertida⁽⁷⁹⁻⁸³⁾. En la regulación del pH_i , se ha observado que la PKC aumenta la actividad del intercambiador Na^+/H^+ ⁽¹⁴⁴⁾, así como también activa al intercambiador $\text{Cl}/\text{HCO}_3^- \text{Na}^+$ independiente⁽¹⁴⁵⁾.

ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

POSIBLES MECANISMOS SUBCELULARES DEL EFECTO INOTROPICO POSITIVO Y LUSITROPICO NEGATIVO DE LA ANG II

Debido a que se ha encontrado que la Ang II ejerce un efecto inotrópico positivo en múltiples especies animales e incluso en los seres humanos ^(2-9,11,12), en los últimos años varios laboratorios han enfocado sus esfuerzos en determinar los mecanismos subcelulares que provocan este efecto inotrópico positivo, siendo los resultados muy contradictorios. A pesar de que parte de la controversia podría deberse a las diferentes especies utilizadas ⁽⁹⁾, resultados opuestos fueron también reportados dentro de la misma especie. Por otro lado, los mecanismos intrínsecos del efecto antirrelajante asociado al efecto inotrópico positivo de la Ang II son desconocidos.

La Ang II podría modificar la fuerza contráctil del corazón, por medio de un cambio en la concentración del Ca^{2+} citosólico y/o a través de un cambio en la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos. Con respecto a la relajación cardíaca, los mecanismos a través de los cuales la Ang II podría prolongarla, serían, por un lado, como en el caso de la contracción, un aumento en la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles; y por otro, una mayor permanencia del Ca^{2+} en el citosol debido a una disminución en la actividad de los mecanismos de remoción del Ca^{2+} , o a una prolongación del influjo de Ca^{2+} .

Modifica, la Ang II, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$?

Corriente de Ca^{2+} de tipo L (I_{Ca})

Los trabajos que estudian modificaciones en la I_{Ca} son muy contradictorios; pues se ha visto que la Ang II podría aumentar la I_{Ca} ^(4,146,147), disminuirla ⁽¹⁴⁸⁾ o incluso no modificarla ^(8,149). Parte de esta discrepancia podría ser explicada por el uso de diferentes técnicas para medir la I_{Ca} , ya que experimentos recientes han demostrado que el aumento en la I_{Ca} evocado por agentes que comparten la cascada de señales de la Ang II, como la fenilefrina o la endotelina-1, sólo podría ser detectado por la técnica de patch-clamp bajo la configuración de patch-perforado o cell-attached (registros de corriente unitaria), dos condiciones que preservan el medio intracelular ^(150,151). Por otro lado, Kaibara y colaboradores ⁽¹⁴⁵⁾ concluyeron que el aumento en la I_{Ca} , por la Ang II, en miocitos de conejo, era debido a un incremento en el pH_i , resultado de la activación del intercambiador Na^+/H^+ . Contrariamente, Ikenouchi y colaboradores ⁽⁸⁾ describieron en la misma especie, un aumento en el pH_i sin cambios significativos en la I_{Ca} . Por su parte, usando herramientas farmacológicas, Talukder y Endoh ⁽¹⁵²⁾, concluyeron que el influjo de Ca^{2+} a través de los canales de

Ca^{2+} de tipo L era uno de los mecanismos de mayor importancia por los cuales la Ang II incrementaba el Ca^{2+}_i .

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

Tanto Watanabe y Endoh⁽¹⁵³⁾ como Barry y colaboradores⁽¹⁵⁴⁾, sugieren que el NCX puede ser uno de los mecanismos responsables del aumento en el Ca^{2+}_i producido por la Ang II. La base de este razonamiento reside en que el aumento del Na^+_i , producido por la Ang II a través de la activación del intercambiador Na^+/H^+ , favorecería el influjo de Ca^{2+} a través del NCX en su modo revertido. Este aumento en la carga de Na^+_i podría producir también un enlentecimiento del modo directo del intercambiador, produciendo una disminución del eflujo de Ca^{2+} a través del mismo, y de esta forma aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Además, se ha mostrado, en experimentos in vitro, que la Ang II produce una activación directa del intercambiador, al igual que otros agentes que también desdoblan el fosfatidilinositol, como la fenilefrina y la endotelina-1⁽⁸⁷⁾.

Retículo sarcoplasmático (RS)

Un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la Ang II, también podría deberse a una mayor liberación de Ca^{2+} por el RS inducida por IP_3 . Aunque el efecto inotrópico positivo de la Ang II se ha asociado con un incremento de los niveles de IP_3 , una relación de causa y efecto entre el IP_3 y el efecto inotrópico positivo inducido por la Ang II no ha sido estudiada.

Respecto al efecto lusitrópico negativo de la Ang II, aunque no ha sido estudiado previamente, una explicación posible para este fenómeno, podría ser el retardo en la retoma de Ca^{2+} por el RS. Este hecho enlentecería la caída del *transient* de Ca^{2+} y de esta manera prolongaría la relajación. Los efectos de la modulación de la retoma de Ca^{2+} por el RS por la PKC son controversiales⁽¹⁵⁵⁻¹⁵⁷⁾. Avalando la hipótesis planteada, en miocitos cultivados y permeabilizados de ratas neonatas, se ha demostrado una disminución de la retoma de Ca^{2+} por el RS mediada por la activación de PKC⁽¹⁵⁷⁾. Sin embargo, Movsesian y colaboradores⁽¹⁵⁵⁾, han descrito una fosforilación de fosfolamban dependiente de PKC y un subsecuente aumento en la retoma de Ca^{2+} en preparaciones de RS cardíaco de perro. Por otro lado, un trabajo realizado en corazones de conejo⁽¹⁵⁶⁾, mostró que no se observaba fosforilación de fosfolamban mediada por PKC, a través de la estimulación α -adrenérgica.

Duración del potencial de acción (DPA)

Se ha descrito que la Ang II produce un aumento de la DPA ⁽⁴⁾, así como también un cambio bifásico en la misma, disminuyéndola inicialmente, y luego aumentándola de manera sostenida ⁽¹⁵⁸⁾. Sin embargo, en este último estudio, la contribución de la prolongación en la DPA al efecto inotrópico positivo de la Ang II, no fue evaluada. Morita y colaboradores ⁽¹⁵⁸⁾, observaron en corazones de conejo una disociación en el curso en el tiempo entre el efecto inotrópico positivo inducido por la Ang II y el aumento que provoca en la corriente de Cl⁻. Este incremento de la corriente de Cl⁻, que en esta especie contribuiría a la prolongación de la DPA, no explicaría el efecto inotrópico positivo de la Ang II debido a la disociación en el tiempo que existe entre ambos efectos.

Por otro lado, el aumento de la DPA podría explicar el efecto lusitropico negativo de la Ang II. El mantenimiento del potencial de membrana a valores más positivos por períodos mayores, podría, como se dijo, mantener durante más tiempo la entrada de Ca²⁺ por los canales de Ca²⁺ de tipo L. Además, podría también disminuir el eflujo o aumentar el influjo de Ca²⁺ a través del NCX, por una disminución de su actividad en modo directo, o un aumento de la misma en su modo revertido, respectivamente. Este hecho daría como resultado un mayor período en el cual el Ca²⁺_i estaría elevado, retardando el tiempo de relajación.

Cambia, la Ang II, la respuesta al Ca²⁺ de los miofilamentos?

La modulación que la Ang II podría tener sobre la respuesta al Ca²⁺ de las proteínas contráctiles, fue propuesta en primera instancia por Ikenouchi y colaboradores en 1994 ⁽⁸⁾, quienes observaron, en miocitos de conejo, que el efecto inotrópico positivo de la Ang II estaba asociado a un incremento del pH_i, y no a un aumento en el Ca²⁺_i. Este hecho permitió que los autores concluyeran que el mecanismo predominante por el cual la Ang II ejercía su efecto inotrópico positivo era un aumento en la respuesta al Ca²⁺ de los miofilamentos debida a una alcalosis intracelular mediada por la activación del intercambiador Na⁺/H⁺. Esta hipótesis se consideró muy factible ya que, por un lado, la estimulación α -adrenérgica y la producida por la ET-1, producen un efecto inotrópico positivo a través de este mecanismo ^(97,159); y por otro, existen evidencias que indican que la Ang II incrementa la actividad del intercambiador Na⁺/H⁺ ⁽¹¹⁹⁾. Además, experimentos más recientes, del mismo laboratorio, demostraron que la Ang II inducía también un aumento en el Ca²⁺_i en la misma especie ⁽¹⁶¹⁾. Por otro lado, la activación del intercambiador Na⁺/H⁺ no debe ser tomada como sinónimo de alcalosis intracelular ⁽¹¹⁾. Experimentos realizados

en un buffer fisiológico ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$), han demostrado que la Ang II activa tanto a un mecanismo alcalinizante, al intercambiador Na^+/H^+ ⁽¹¹⁾, como a uno acidificante, al intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Na^+ -independiente ⁽¹⁶²⁾, siendo el resultado final una ausencia de cambio en el pH_i . Además, en estos experimentos se observó que aunque el pH_i no se modificaba en presencia de Ang II el efecto inotrópico positivo seguía estando presente ⁽¹¹⁾. Por lo tanto el hecho de que un incremento en el pH_i sea el responsable del aumento de contractilidad inducido por la Ang II es discutido.

La respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos podría estar aumentada por otros mecanismos independientes del pH_i . El IP_3 ha sido identificado como causante de este efecto ⁽¹³⁷⁾, sin embargo este hecho no concuerda con los resultados de otros autores ⁽¹³³⁾, como ya se ha mencionado (ver página 21). Una controversia similar se presenta con respecto a la PKC, ya que se ha documentado que la kinasa produce un aumento ⁽¹⁶³⁾, no cambio ⁽¹⁶⁴⁾, e incluso una disminución ⁽¹⁶⁵⁾ de la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles. Estos hallazgos dejan abierta la posibilidad de pensar en que un aumento de la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles pH_i -independiente podría contribuir al efecto inotrópico positivo producido por la Ang II.

Por otra parte, y respecto al efecto antirrelajante de la Ang II, es conocido que la alcalosis intracelular disminuye la velocidad de disociación del Ca^{2+} unido a la TnC ⁽¹⁶⁶⁾. La disociación lenta del Ca^{2+} de los sitios regulatorios del complejo troponínico podría retardar la relajación. Este es el mecanismo propuesto para explicar el efecto lusitrópico negativo de la estimulación α -adrenérgica ⁽¹⁶⁷⁾, cuya cascada de señales intracelulares es la misma que la de la Ang II. Pero, por otro lado, el aumento del pH_i no es el único mecanismo que puede aumentar la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos. Como ya se mencionó, la estimulación α -adrenérgica produce la fosforilación de las proteínas contráctiles, lo que vincularía la activación de la PKC con el efecto antirrelajante.

Cuáles son los segundos mensajeros responsables del efecto inotrópico positivo y lusitrópico negativo de la Ang II?

Como se ha descrito, tanto el IP_3 como la PKC podrían desempeñar un rol fundamental en la producción del efecto inotrópico positivo y lusitrópico negativo que la Ang II produce en el miocardio. Sin embargo, la reciente identificación de distintos subtipos de receptores para la Ang II en muchos tejidos, implica que esta hormona podría estimular múltiples cascadas de señalización en sus células blanco. Como se ha mencionado, estudios recientes indican que la Ang II no sólo activa a la PLC ^(98,99), sino que también activaría múltiples vías de trasducción de señales como ser la activación de

fosfolipasa A_2 ⁽¹⁰⁴⁾, la producción de óxido nítrico ⁽¹⁰⁵⁾ y la regulación de las proteínas kinasas activadas por mitógenos ⁽¹⁰³⁾.

Estos estudios sugieren que otras alternativas puedan entrar en juego en la modulación de la contractilidad y relajación miocárdica mediada por Ang II, además de la clásica más aceptada (IP_3 y/o PKC).

OBJETIVOS

El presente estudio está dirigido a examinar, en el miocardio de gato, los mecanismos involucrados en el efecto inotrópico positivo y lusitrópico negativo o antirrelajante de la Ang II, que son los menos conocidos y los más controvertidos comparados con los de otras intervenciones que también aumentan el metabolismo del fosfatidilinositol.

Se pondrá especial interés en diseccionar si el efecto inotrópico positivo se produce a través de un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ o de la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos y en este último caso si ésta es dependiente o no de los cambios del pH_i . Se caracterizará el efecto lusitrópico negativo de la Ang II, así como también se intentará diseccionar los posibles mecanismos celulares a través de los cuales la hormona produce este efecto. Se investigarán además, las posibles cascadas de señales que puedan estar vinculadas con la regulación de la contractilidad y de la relajación miocárdica mediada por Ang II. Para esta finalidad, se usarán miocitos ventriculares aislados e intactos y músculos papilares. Las células intactas aisladas son las preparaciones indicadas, en contraposición a la fibra hiperpermeable, para evaluar tanto cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ y del pH_i así como cambios en la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles cuando se intenta dilucidar si éstos ocurren o no como consecuencia de un cambio del medio intracelular, como es un cambio en el pH_i . Los músculos papilares constituyen una preparación ideal para examinar la contracción y fundamentalmente la relajación cardíaca en condiciones isométricas.

El presente estudio intenta responder específicamente las siguientes preguntas:

1. El efecto inotrópico positivo de la Ang II es mediado por un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$? De ser un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, el responsable de los efectos observados:
 - Cuál o cuáles de los mecanismos involucrados en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$, es responsable del aumento del $[Ca^{2+}]_i$ producido por la Ang II

2. El efecto inotrópico positivo de la Ang II es mediado por un aumento de la respuesta de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} ? De ser esta la vía a través de cual la Ang II produce su efecto inotrópico positivo, cuál es el mecanismo de la mayor respuesta de las miofibrillas al Ca^{2+} ?
 - Una mayor sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{2+} ? o

- Un aumento de la fuerza máxima que las proteínas contráctiles pueden realizar?
 - Y de existir alguno de estos mecanismos, son ellos producto de cambios en el pH_i ?
3. Cuáles son los mecanismos subcelulares responsables del efecto lusitrópico negativo de la Ang II?
- Un aumento en la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles? o
 - Una mayor permanencia del Ca^{2+} en el citosol debido a un retardo en su remoción? De ser esta la hipótesis correcta, cuál es el mecanismo que retarda la disminución del Ca^{2+}_i luego de la contracción, una menor retoma del ion por el RS, o una menor actividad del NCX trabajando en su modo directo?
4. Qué papel juegan los segundos mensajeros, el IP_3 y el DAG, y la consecuente activación de la PKC en el efecto inotrópico positivo y en el lusitrópico negativo de la Ang II?

METODOS

ASLAMIENTO DE MIOCITOS

Se realizaron experimentos en miocitos de gato enzimáticamente aislados con una técnica que se utiliza de rutina en nuestro laboratorio ^(168,169). Gatos adultos fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (35 mg (Kg peso)⁻¹). Los corazones sujetos por la aorta a través de una cánula, fueron extraídos rápidamente y colocados en un sistema de perfusión tipo Langendorff. Los mismos fueron perfundidos retrógradamente a 37°C y a presión de perfusión constante (70-80 mmHg) durante 7 minutos para lavarlo de sangre y estabilizarlo con una solución Krebs-Henseleit con la siguiente composición (mM): 146.2 ClNa, 4.7 ClK, 1.35 Cl₂Ca, 10.0 ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 0.35 PO₄NaH₂, 1.05 SO₄Mg, 10.0 glucosa, ajustada a pH 7.4 con OHNa (llamaremos a dicha solución, solución de HEPES). La solución fue continuamente burbujeada con O₂ al 100%. Luego de ese lapso, la perfusión continuó con la misma solución, pero ahora nominalmente libre de Ca²⁺, por 5 minutos. Este período de perfusión con una solución sin Ca²⁺ es de crucial importancia, ya que la integridad de los discos intercalares depende del Ca²⁺ y se ha descrito que bajos niveles del ion reducen la adherencia entre las células ⁽¹⁷⁰⁾. Posteriormente se hizo recircular por 7-12 minutos la misma solución con 0.61mg/ml de colagenasa tipo II (160U/ml), 0.07mg/ml de pronasa y 0.4 mg/ml de suero de albúmina bovina (BSA). Durante la perfusión con las enzimas, se agregó 36 μM de Cl₂Ca y luego 20 μM de Cl₂Ca cada 5 min. El Ca²⁺ actúa como un cofactor que activa a las enzimas, por lo tanto, el agregado gradual de Cl₂Ca permite regular la actividad de las enzimas⁽¹⁷¹⁾. La perfusión continuó hasta que los corazones presentaron flacidez (15-25 min), momento en que fueron removidos del aparato de perfusión cortándolos a nivel de la unión atrio-ventricular. Los miocitos aislados se separaron del tejido no digerido y se lavaron varias veces con solución HEPES conteniendo 1% de BSA, y 0.5 mM de Cl₂Ca. El tejido ventricular no digerido fue cortado y disociado con pinzas. Dicho tejido se incubó durante 3-5 min a 37°C, agitándolo lentamente en una atmósfera de O₂ en la misma solución con enzimas (solución de HEPES + enzimas + BSA al 10%). Luego de este procedimiento, los miocitos desagregados fueron separados del tejido sin digerir a través de una tela de nylon (con poros de 300 μm), y colocados en un tubo de centrifuga con el doble de volumen de tejido de una solución de HEPES con 0.2 mM de Cl₂Ca. Se centrifugaron por 1 minuto a velocidad lenta (aproximadamente 1000 rpm). Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en una solución de HEPES con 0.5 mM de Cl₂Ca. Al tejido remanente en el nylon sin digerir, se lo incubó en el agitador como se describe más arriba. Este proceso se repitió tantas veces como fue necesario,

hasta digerir la mayor cantidad de tejido posible. Luego de cada lavado, las células fueron dejadas sedimentar durante 10 min, y en cada resuspensión se fue incrementando paulatinamente la concentración de Ca^{2+} extracelular hasta alcanzar una concentración final de Ca^{2+} extracelular de 1.35 mM. La recalcificación lenta y escalonada tiene por objetivo minimizar los efectos adversos de la "paradoja del Ca^{2+} "^(172, 173), es decir, evitar el deterioro que se produce cuando se recalcifica luego de un período de perfusión libre de Ca^{2+} ⁽¹⁷⁴⁾. Los miocitos aislados suspendidos en solución HEPES fueron mantenidos a temperatura ambiente (20-22°C) hasta su utilización.

Para la realización de los experimentos descritos se utilizaron solamente aquellos miocitos con forma alargada, estriaciones claramente definidas y con evidente respuesta de acortamiento y relajación al ser estimulados. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

MEDICION DE LA FLUORESCENCIA DE INDO-1 Y DEL ACORTAMIENTO CELULAR

Los miocitos aislados fueron cargados con Indo-1/AM. Los indicadores actualmente disponibles para las medidas de Ca^{2+}_i (Quin-2, fura-2, indo-1, Fluo-3, Rhod-2), han sido diseñados en base al EGTA, un quelante selectivo del Ca^{2+} . Las modificaciones químicas que han sufrido estos indicadores, sumado al uso de dos longitudes de onda (ya sea para la excitación, fura-2, como para la emisión, indo-1), permiten calcular el Ca^{2+}_i libre a través de la proporción de indicador unido al Ca^{2+} y de indicador libre de Ca^{2+} cuando el indicador está en equilibrio con la concentración de Ca^{2+} libre. Esta característica permite manejar los datos de fluorescencia como relación de la intensidad de fluorescencia a dos longitudes de onda (método del cociente). Con este método, variables que perturban las mediciones pueden ser eliminadas; por ejemplo, factores independientes de los iones que afectan la intensidad de la señal, como concentración intracelular no uniforme del indicador, pérdida del indicador, inactivación a lo largo del tiempo cuando entra en contacto con la luz de excitación, espesor de la célula y artefactos de movimiento. Tanto el Indo-1 como el Fura-2, son los apropiados para las medidas de Ca^{2+} en células aisladas. Si bien el Indo-1 es más susceptible a la inactivación por contacto con la luz de excitación que el Fura-2, el primero presenta menos problemas de hidrólisis incompleta y compartimentalización. En el caso del fura-2 la doble-excitación/simple-emisión dificulta el monitoreo de cambios rápidos de Ca^{2+}_i ; ya que no hay una verdadera simultaneidad en el registro de las dos longitudes de onda utilizadas para obtener el cociente. El Indo-1, o cualquier otro indicador, en su forma permeable de ester de acetometilo (AM), se comporta como

una molécula hidrofóbica y sin carga; estas propiedades le permiten atravesar las membranas celulares. Una vez en el citosol, las esterasas endógenas "activan" al indicador transformándolo en su forma ácida, la cual es impermeable al sarcolema, lo que impide que el indicador se "escape" de la célula. Una propiedad importante del indicador de Ca^{2+} es su selectividad por el Ca^{2+} sobre el Mg^{2+} ; el Indo-1 tiene un K_d para el Ca^{2+} de aproximadamente 250 nM, por lo que es muy específico para la medición del Ca^{2+}_i . Otro ion que puede competir por los sitios de unión para el Ca^{2+} del Indo-1 es el H^+ . El EGTA, que tiene un pKa de 9.5, se encuentra protonado dentro de rangos de pH_i fisiológicos (6.5 - 8), y por lo tanto no puede unirse al Ca^{2+} citosólico. Los indicadores fluorescentes de Ca^{2+} tienen, en cambio, un pKa menor a 6.5, por esta razón dentro de rangos de pH_i fisiológicos no se encuentran protonados y pueden fijarse al Ca^{2+} . Los problemas que pueden citarse del manejo de estos indicadores son: 1) la amortiguación que producen sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo que puede alterar los cambios cinéticos del Ca^{2+} y por lo tanto influenciar las respuestas transitorias de Ca^{2+} ; 2) la compartimentalización en las organelas (especialmente en mitocondrias), que en el caso del Indo-1 alcanza un 50% en miocitos cardíacos; 3) la incompleta desesterificación, que resulta en una contribución de fluorescencia insensible al Ca^{2+} y 4) la contribución de fluorescencia dada por la autofluorescencia celular, debida a la producción de NAD(P)H mitocondrial ^(170,175).

La luz de excitación para el Indo-1 se centra a 350nm, mientras que la

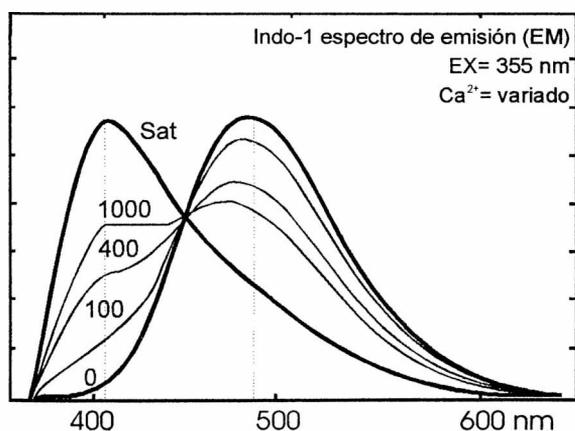


Figura 12: Espectro de emisión del Indo-1. Espectro de emisión del Indo-1 AM obtenido en un buffer de la siguiente composición (mM): 120 KCl, 20 HEPES, 10 NaCl, 0.5 MgCl₂, con Ca^{2+} a las concentraciones indicadas en la figura más 1 mM EGTA, a pH 7.2. La saturación (Sat) del Ca^{2+} se obtiene con 1mM de CaCl_2 . (Modificado de Thomas, AP y Delaville F. En Cellular Calcium. *The use of fluorescent indicators for measurement of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cell*. Ed. J. G. McCormak and P. H. Cobbold. IRL Press, Oxford. 1-54. 1988).

fluorescencia emitida se recoge a 410nm y a 490nm. En la figura 12 se observa que la fluorescencia emitida a 410nm en una solución libre de Ca^{2+} es prácticamente nula, mientras que la emitida a 490nm en la misma solución es máxima. Al contrario, cuando la concentración de Ca^{2+} satura al indicador, la máxima emisión se observa a 410nm mientras que a 490nm la emisión es mínima. Esta emisión dual del Indo-1 a las longitudes de onda de 490 (para el indicador libre de Ca^{2+}) y de 410 (para el indicador unido al Ca^{2+}) permite, como ya se ha mencionado, calcular la relación o cociente (ratio) de la

fluorescencia emitida a las dos longitudes de onda (410/490), lo que posibilita corregir la pérdida de indicador que se produce a lo largo del tiempo, ya sea porque se "escapa" de la célula o por la inactivación que sufre por contacto con la luz de excitación. Debido a que cuando los miocitos aislados son cargados con Indo-1/AM, hay una compartimentalización significativa del indicador en las mitocondrias, cuyo grado varía de célula a célula, los resultados no se expresaron como valores absolutos de $[Ca^{2+}]_i$ sino como relación de fluorescencia. Este cociente de fluorescencia del Indo-1 se considera, entonces, como una estimación del Ca^{2+}_i .

Los miocitos se incubaron con Indo-1/AM, disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) y ácido plurónico, para lograr una mejor dispersión del indicador. El indicador se incubó durante 9 min a una concentración de 17 μM y a temperatura ambiente, de acuerdo al método de Spurgeon y colaboradores ⁽¹⁷⁶⁾. En general, los experimentos en los que se miden cambios cinéticos de iones intracelulares requieren tiempos de carga cortos (10-30 min), baja concentración del indicador, temperatura ambiente y alta densidad celular. La combinación de estos factores, que se determinan en cada condición experimental, permitirá obtener el máximo número de moléculas de indicador internalizadas por cada célula individual ^(177,178). Luego de este período de incubación con el indicador, las células se lavaron y se las dejó desesterificar durante 45 min, lapso que se considera suficiente para la hidrólisis de la mayoría de los ésteres AM ⁽¹⁷⁷⁾.

Las células cargadas con el indicador de Ca^{2+} fueron colocadas sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon Diaphot 200) adaptado para epifluorescencia. Se las perfundió continuamente con HEPES (pH 7.4) a un flujo constante de 1 ml/min. Se realizó estimulación por campo a través de dos electrodos de platino colocados a cada lado de la cámara de perfusión (ondas cuadradas de 2 ms de duración y de una intensidad de 20% por encima del umbral) a una frecuencia de 30 pulsos/min. Las células fueron iluminadas por un haz de luz centrado a 350 nm y la fluorescencia emitida por las mismas registrada a 410 y 490 nm, fue adquirida por dos fotomultiplicadores. La fluorescencia inespecífica (fondo) se sustrajo de cada señal, antes de obtener el cociente de fluorescencia 410/490. Para obtener el cociente de fluorescencia diastólico se consideró el valor promedio de dicho cociente en un período de 100 ms luego de que la contracción se completara. El cociente de fluorescencia sistólico fue determinado directamente en el pico del cociente registrado.

La platina del microscopio fue iluminada con luz roja (640-750 nm) a través de su sistema óptico para luz visible, con el fin de permitir mediciones simultáneas de fluorescencia y acortamiento celular (figura 13). La longitud del miocito en reposo y el acortamiento del mismo fueron medidos por un detector de movimiento de bordes (Crescent electronics, UT, SA) y los datos almacenados en un software para su

posterior análisis. El acortamiento celular fue registrado simultáneamente en un registrador analógico de dos canales (Gould RS 3200). El equipo utilizado se esquematiza en la figura 13.

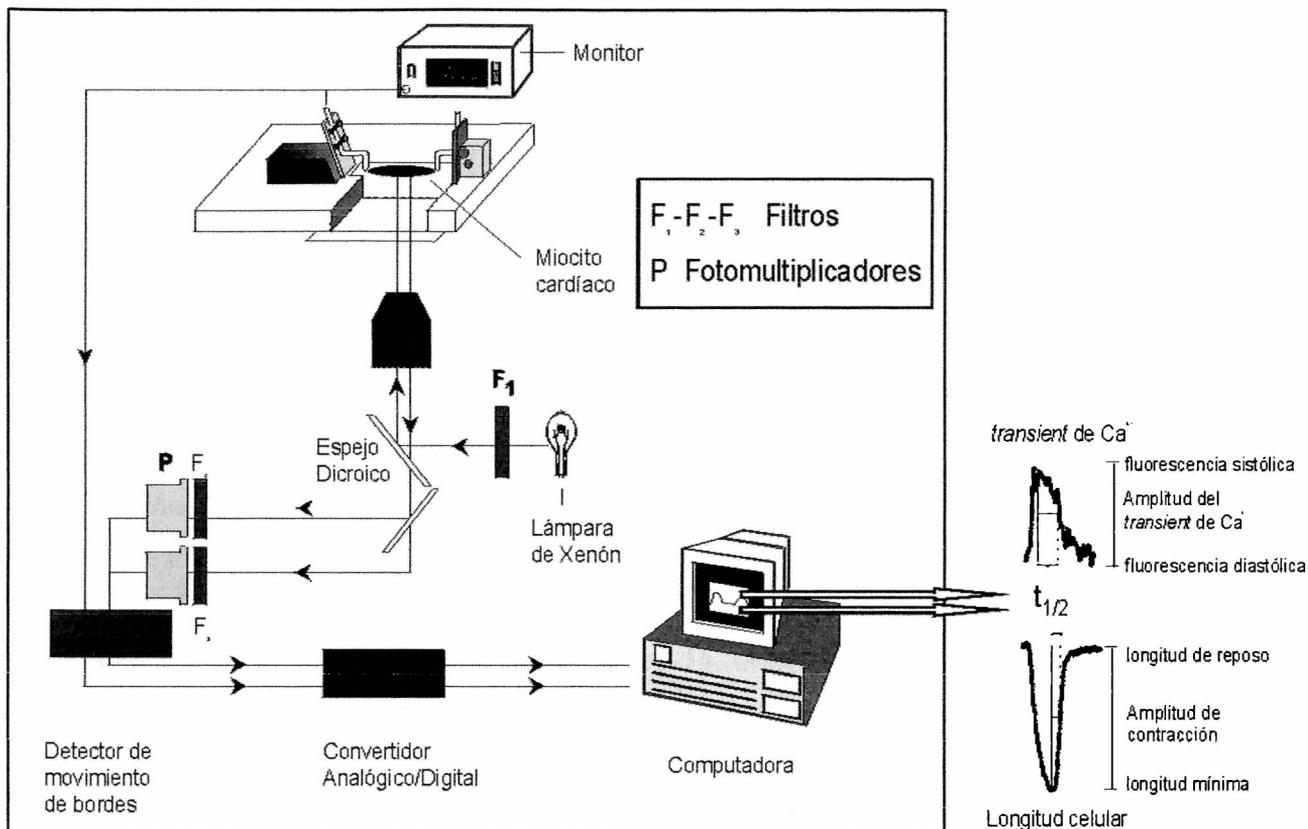


Figura 13: Esquema que muestra la disposición del instrumental utilizado para la determinación del pH_i y el Ca²⁺_i por epifluorescencia, y el acortamiento celular. Tanto para la medida de pH_i como para la determinación del Ca²⁺_i, se utiliza como fuente de luz una lámpara de xenón cuyo haz de luz es centrado a la longitud de onda correcta a través del filtro adecuado para excitar apropiadamente a cada indicador. Este haz de luz es reflejado por un espejo dicróico que concentra la luz en el miocito seleccionado. La fluorescencia emitida por la célula es recolectada por un fotomultiplicador a través de los filtros adecuados, según la emisión del indicador, y por medio de un convertidor analógico/digital la señal puede ser analizada posteriormente. La computadora posee un software que archiva y permite el análisis ulterior. Simultáneamente, se detecta la variación de longitud celular a través de un monitor y un detector de bordes que emiten una señal también digitalizada y almacenada en la computadora. A la derecha del instrumental se observa un registro de fluorescencia (*transient* de Ca²⁺) y uno de longitud celular, en donde aparecen indicados los parámetros usados para medir contracción y relajación. t_{1/2}, tiempo hasta la mitad de la relajación del acortamiento o hasta la mitad de la caída del *transient* de Ca²⁺.

MEDICION DE pH_i

Para las mediciones del pH_i , los miocitos fueron cargados con el indicador fluorescente H^+ -sensible SNARF-1/AM, tal como se realizó con el Indo-1/AM, en su forma permeable de éster de acetoximetilo. Los indicadores de pH_i más utilizados son el BCECF y el SNARF-1. El BCECF es excitado secuencialmente a dos longitudes de onda alternantes, y el cociente es obtenido de la fluorescencia emitida para cada excitación ⁽¹⁷⁹⁻¹⁸¹⁾. Esta propiedad del BCECF (doble excitación/simple emisión), al igual que el fura-2, no permite monitorear cambios rápidos del pH_i porque no hay simultaneidad en el registro de las longitudes de onda usadas para obtener el cociente ⁽¹⁸²⁾, lo que ha favorecido el uso de el SNARF-1 en la medida de cambios del pH_i en miocitos aislados ^(183,184). Además, hay evidencia de que el SNARF-1 no presenta compartimentalización en las mitocondrias ⁽¹⁸²⁾. Debido a que las mitocondrias representan el 40%, aproximadamente, del volumen de los miocitos y a que estas organelas tienen un pH 0.3-0.5 unidades más alcalinas que el citosol, cualquier compartimentalización en las mismas complicaría la interpretación de las medidas de pH_i . Como se observa en la figura 14, el SNARF-1 excitado a 530 nm tiene un espectro de emisión con dos picos bien separados a 590 y 640 nm que corresponden a las formas ácidas (o protonado) y básicas (o libre de H^+) del indicador, respectivamente. Nótese que cuando la concentración H^+ es mayor (pH 6.5 en el ejemplo), la emisión es máxima a 590nm y mínima a 640nm. La emisión dual del SNARF-1 permite calcular el cociente de la fluorescencia emitida a las dos

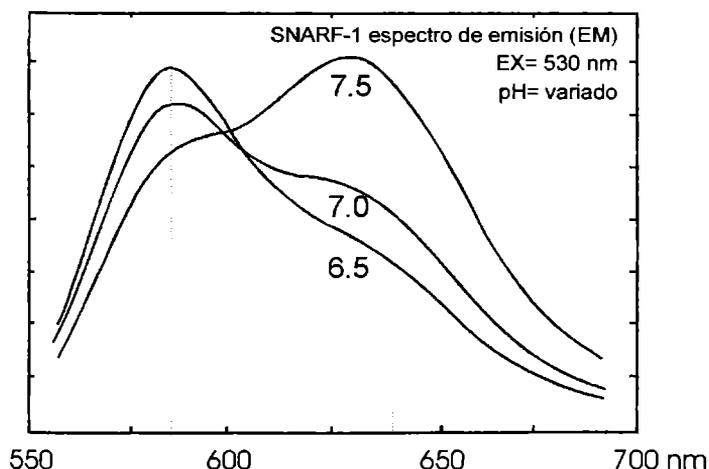


Figura 14. Espectro de emisión del SNARF-1. Espectro de emisión de $2\mu M$ de SNARF-1 en la siguiente solución (mM): 140 KCl, 10 buffer (PIPES, pH 6.5; HEPES, pH 7.0 y 7.5), a $25^\circ C$. (Modificado de Blank PS y colaboradores. En *Cytosolic pH measurements in single cardiac myocytes using carboxy-seminaphthorhodafluor-1*. Am J Physiol. 1992; 263: H276-H284)

longitudes de onda que, como se mencionó para el Indo-1/AM, corrige la inactivación que sufre el indicador por contacto con la luz de excitación o la pérdida de indicador de la célula.

El método de carga de las células con el indicador de pH es similar al utilizado para el Indo-1. Se preparó una solución de SNARF-1/AM, agregando

140µl de DMSO a 50µg de SNARF-1/AM para exponer a los miocitos a una concentración final de 4 µM de SNARF-1/AM. Luego de 10 minutos, los miocitos fueron suavemente centrifugados durante 2 minutos, resuspendidos en solución de HEPES y mantenidos a temperatura ambiente hasta su uso posterior. El pH_i y la longitud celular fueron registrados en miocitos colocados sobre la platina de un microscopio invertido modificado, como fue descrito previamente ⁽¹⁸²⁾. Debido a que, como ya se ha mencionado, el SNARF no se compartamentaliza, la señal de fluorescencia fue calibrada *in vivo*, en los miocitos cargados con el indicador, a valores absolutos de pH. Para la calibración, las preparaciones fueron expuestas a una solución sin Ca^{2+} extracelular y con EGTA. Esta etapa es importante para prevenir la injuria celular por sobrecarga de Ca^{2+} cuando las células son despolarizadas. Las preparaciones fueron luego expuestas a las soluciones de calibración con la siguiente composición, en mM: Hepes 12; ClK 140; Cl_2Mg 1; EGTA 2; BDM 15; nigericina 12µM. El BDM previene la hipercontractura de la célula ya que desacopla la excitación de la contracción impidiendo la interacción entre la actina y la miosina. La nigericina es un contratransportador H^+/K^+ que permite anular el gradiente de pH transarcolemal. El pH de las soluciones fue ajustado con OHK a cuatro diferentes valores de pH entre 7.5 y 6.5. El período de equilibrio inicial fue de aproximadamente 10 min. Los datos de calibración fueron tomados en los siguientes 5 a 10 min. Para evitar errores sistemáticos los miocitos fueron expuestos a las soluciones de calibración sin un patrón preestablecido; en cada célula se aplicaron cinco soluciones de diferentes valores de pH siendo la quinta la misma que la primera para observar la capacidad de reproductibilidad, que revela la integridad de la célula⁽¹⁸⁸⁾.

MUSCULOS PAPILARES

Se extrajeron rápidamente corazones de gatos anestesiados de la misma manera que para la obtención de miocitos aislados. De estos corazones se disecó un músculo papilar del ventrículo derecho y se montó en una cámara vertical diseñada para que se contraigan isométricamente. El área de sección del músculo fue calculada a través de la medición del peso y de la longitud del mismo, asumiendo que el músculo es un cilindro con área de sección uniforme y una densidad de 1.0. El extremo mural de cada músculo papilar fue firmemente sujetado a la parte inferior de la cámara y el extremo tendinoso se ató a un gancho de acero inoxidable conectado a un transductor de fuerza (Statham G1-4-250 -Costa Mesa, CA, USA- or Hewlett Packard FTA-10-1 -Palo Alto, CA, USA). El músculo fue estimulado a una frecuencia constante de 30 pulsos/min y se mantuvo a una

temperatura de 30°C, también constante, con una solución de la siguiente composición (mM): 128.3 NaCl, 4.7 KCl, 1.35 Cl_2Ca , 20.25 NaHCO_3 , 0.35 NaH_2PO_4 , 1.05 MgSO_4 , 10 glucosa (solución a la que llamaremos de bicarbonato). Esta solución fue equilibrada con una mezcla gaseosa de 5% de CO_2 y 95% de O_2 (pH 7.4). En algunos grupos de experimentos se utilizó la solución de HEPES, descripta para el aislamiento de los miocitos, para mantener los músculos (ver resultados). La contractilidad fue medida a través de la tensión desarrollada (TD), y la máxima velocidad de desarrollo de la fuerza (+T). La relajación se evaluó a través de dos índices de relajación: el tiempo hasta la mitad de la relajación ($t_{1/2}$) y la relación entre +T y la máxima velocidad de relajación, -T, (+T/-T) ^(167,185).

Luego de que el músculo papilar fue montado, se estiró hasta alcanzar la longitud a la cual desarrollaba la máxima fuerza. En esta condición se lo dejó estabilizar durante 1 hora. Después del período de estabilización, la preparación fue incubada por 30 min con 1 μM de atenolol y 1 μM de prazosin para prevenir potenciales efectos debidos a la liberación de catecolaminas endógenas.

MATERIALES

La collagenasa tipo B fue comprada a Worthington Biochemical Corp. Lakewood, N.J; la pronasa a Boehringer Mannheim Corp. GmbH, Mannheim, Germany; la seroalbúmina bovina (BSA) esencialmente libre de ácidos grasos, la tpsigarguina y la angiotensina II a Sigma Chemical Co, St. Louis, MO; indo-1-AM y SNARF-1-AM a Molecular Probes Inc, Eugene, Or; el KB-R7943 (2-[2-[4-(4-nitrobromonyloxy) phenyl]ethyl]isothiourea methanesulphonate a Kanebo, Osaka, Japón; la calfofostina C a Research Biochemical International (RBI), Natick, MA, USA; la celeritrina a Calbiochem, La Jolla, CA, USA. Todos los demás reactivos químicos fueron de la máxima pureza obtenible.

ANALISIS ESTADISTICO

Los datos se presentan como media \pm ES. 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. El análisis de covarianza se utilizó para comparar el efecto de la Ang II a diferentes tiempos y el efecto del aumento del Ca^{2+}_0 sobre la amplitud de contracción y la fluorescencia del Indo-1, como se indica en el texto (ver resultados). Un valor de $p < 0.05$ se consideró como indicador de significación estadística.

RESULTADOS

ANG II, CONTRACCION Y pH_i

El efecto de 1 μM de Ang II sobre la contracción y el pH_i fue evaluado simultáneamente en miocitos cardíacos aislados, cargados con el indicador SNARF-1 y estimulados eléctricamente. La concentración de Ang II fue elegida en base a los resultados de experimentos controles en los que se determinó que el máximo efecto inotrópico positivo de la Ang II ocurría en el rango de 0,5-1 μM , hecho que está de acuerdo con resultados previos^(2,11,124).

La figura 15 muestra un ejemplo representativo del efecto de la Ang II sobre la contracción de un miocito aislado. La Ang II indujo un efecto inotrópico positivo que consistió en un aumento inicial de la amplitud de la contracción que alcanzó un pico entre 5 y 7 minutos, seguido de una lenta caída que llegó al estado estable luego de 20 minutos de incubación con la droga. En algunas células, como en el ejemplo de la figura, el aumento inicial de la amplitud de contracción producida por la Ang II fue precedida por un efecto inotrópico negativo. El panel central muestra las contracciones individuales del miocito, en el control, a los 5 y a los 20 minutos luego de la aplicación de Ang II. Este efecto inotrópico positivo de la Ang II siguió el mismo patrón en músculos papilares contrayéndose isométricamente. En estas preparaciones (n=17) la hormona produjo un aumento máximo de la tensión desarrollada entre los 5 y 10 min ($196 \pm 12.3\%$), el cual fue decayendo lentamente hasta estabilizarse a los 20 min ($153 \pm 9.6\%$). El panel inferior de la figura 1A muestra un trazado típico del efecto de la Ang II sobre el pH_i monitoreado continuamente, en una célula miocárdica, durante 20 minutos. Nótese que luego de 5 minutos de la administración de la Ang II, el pH_i todavía no fue afectado mientras que el efecto inotrópico positivo alcanzó su máximo valor.

La figura 15B muestra los resultados totales de los experimentos en los que se estudió el curso en el tiempo del efecto de la Ang II sobre la amplitud de la contracción celular y el pH_i . La Ang II produjo un aumento máximo de la amplitud de la contracción de $163 \pm 22\%$ antes de que el aumento del pH_i llegara a valores significativos. El aumento del pH_i llegó a valores estadísticamente significativos luego de 15 minutos de incubación con la droga, alcanzando un máximo valor de $0,06 \pm 0.03$ unidades de pH luego de 20 minutos. A este tiempo el efecto inotrópico positivo de la Ang II cayó desde su valor pico hasta $129 \pm 14\%$ del control.

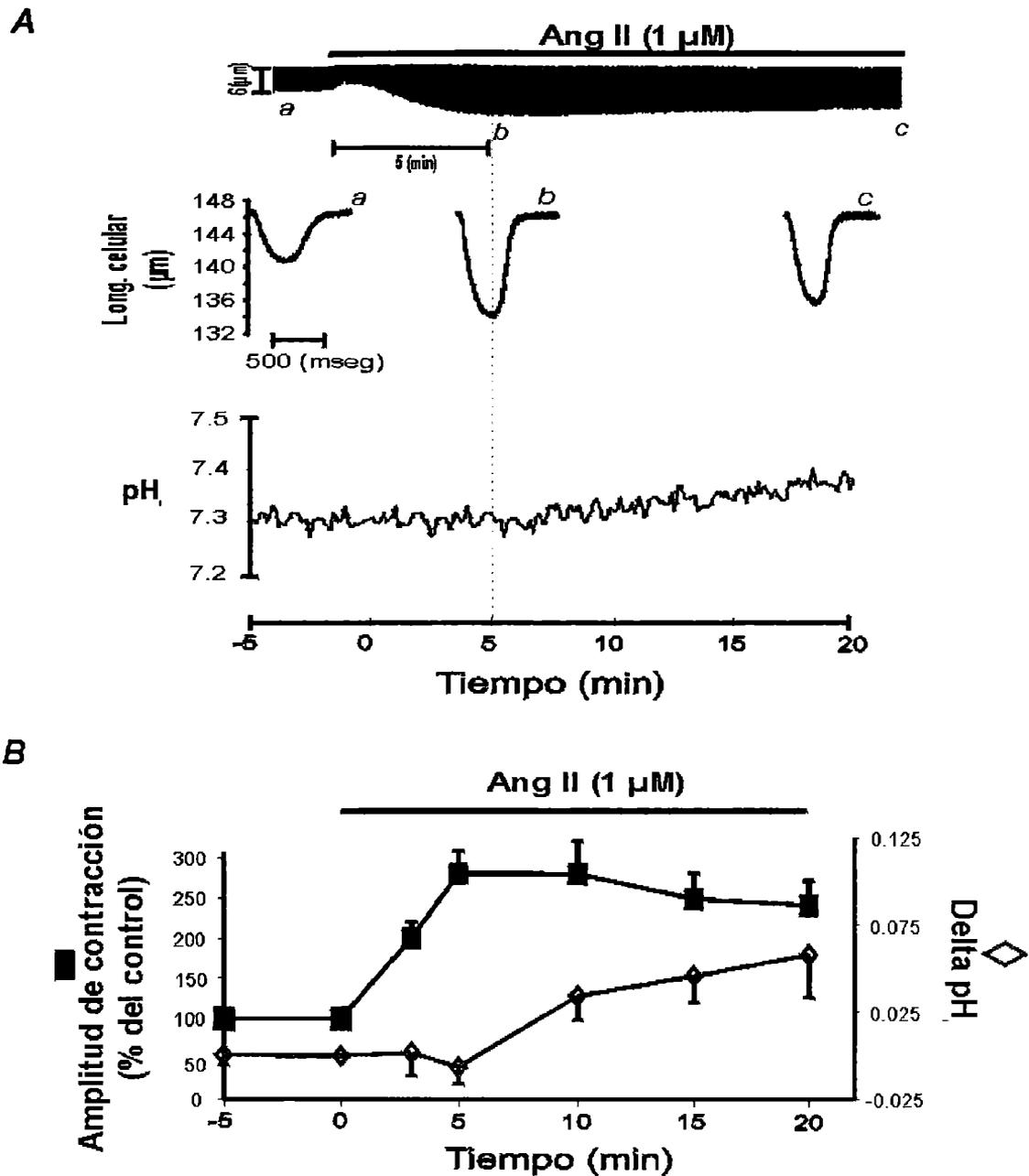


Figura 15. A: efecto de la Ang II sobre el acortamiento y el pH_i . El panel superior muestra un registro continuo de la longitud celular de un miocito donde se observa el curso en el tiempo del efecto inotrópico positivo inducido por la Ang II. En la célula cardiaca de gato se observa un efecto inotrópico negativo transitorio previo al efecto inotrópico positivo típico de la hormona. Debajo se observan las contracciones individuales de los puntos señalados en el registro continuo (a, b y c). El registro de pH_i muestra el curso en el tiempo del efecto de la Ang II. La Ang II produce un incremento en la amplitud de la contracción que precede al aumento lento de pH_i . **B:** Ilustra los resultados promedio de estos experimentos ($n=9$) indicando la disociación temporal entre el efecto inotrópico y alcalinizante de la Ang II. El efecto inotrópico positivo inducido por la Ang II alcanza su máximo valor antes de que se puedan detectar cambios significativos en el pH_i (ΔpH_i). El incremento en el pH_i se torna significativo a los 15 min de la aplicación de la Ang II, cuando el efecto inotrópico positivo ya está decayendo. Los datos se obtuvieron promediando los valores medios de cinco medidas sucesivas de pH_i y amplitud de contracción de cada experimento a los tiempos indicados. El valor basal de pH_i previo a la administración de Ang II fue de 7.31 ± 0.05 .

El pH_i ejerce una gran influencia sobre la contractilidad. Es conocido que una disminución del mismo reduce la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles ⁽⁹²⁾ produciendo un efecto inotrópico negativo, y lo inverso ocurre cuando el pH_i aumenta, como se mencionó en la pagina 15. La figura 16 muestra un esquema de los mecanismos que participan en la regulación del pH_i . Los tres mecanismos esquematizados en el lado izquierdo de la figura: el intercambiador Na^+/H^+ , el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependiente de Na^+ , y el cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ son los denominados "mecanismos alcalinizantes", es decir que eliminan H^+ y/o introducen HCO_3^- a la célula. A la derecha de la figura se muestra los mecanismos acidificantes, el

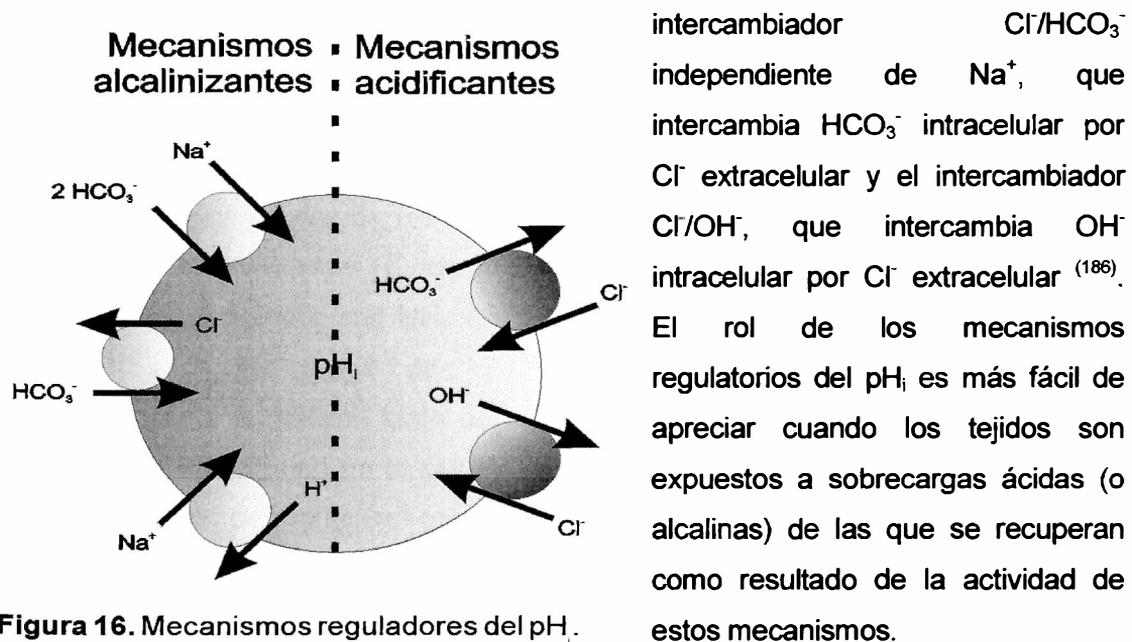


Figura 16. Mecanismos reguladores del pH_i .

Cuando las células son perfundidas con solución HEPES, el mecanismo alcalinizante que fundamentalmente regula el pH_i es el intercambiador Na^+/H^+ debido a que no hay HCO_3^- en el medio, y por lo tanto, los transportadores dependientes de este ion no funcionan, o lo hacen mínimamente. Por lo tanto, el aumento de pH_i producido por la Ang II, en solución HEPES, puede atribuirse a la activación del intercambiador Na^+/H^+ .

Para profundizar en el estudio de la posible dependencia del efecto inotrópico positivo de la Ang II de la alcalosis intracelular se realizaron dos protocolos adicionales. (1) Se indujo una acidosis intracelular por el lavado de células sometidas a un pulso de CINH_4 de 3 minutos de duración. Al perfundir las células con CINH_4 se produce una alcalosis intracelular debido a la difusión rápida, a través de la membrana de NH_3 y la subsecuente asociación de esta molécula con los H^+ intracelulares. A la vez,

también difunde, pero más lentamente, NH_4 , el cual se disocia y aporta una cantidad extra de H^+ al medio intracelular, produciendo una leve caída del pH_i . Cuando el CINH_4 es removido del medio se observa una acidificación debida a la generación intracelular de H^+ , como causa de la disociación del NH_4 en H^+ y NH_3 , y del aporte de H^+ provenientes de la difusión lenta del NH_4 . El NH_3 es extruído de la célula y los H^+ que permanecen en el medio intracelular son los responsables de la disminución del pH_i ^(187,188). Esta acidosis intracelular activa al intercambiador Na^+/H^+ , y la velocidad de recuperación del pH_i que ocurre al lavar el CINH_4 indica, en una solución de HEPES, la actividad del intercambiador Na^+/H^+ ⁽¹⁸⁹⁾. La velocidad de recuperación del pH_i se obtuvo ajustando una regresión lineal a los 3 minutos iniciales de la recuperación de la acidosis ⁽¹⁹⁴⁾ producida por el lavado del pulso de CINH_4 . La reproducibilidad de la recuperación del pH_i luego de 2 pulsos

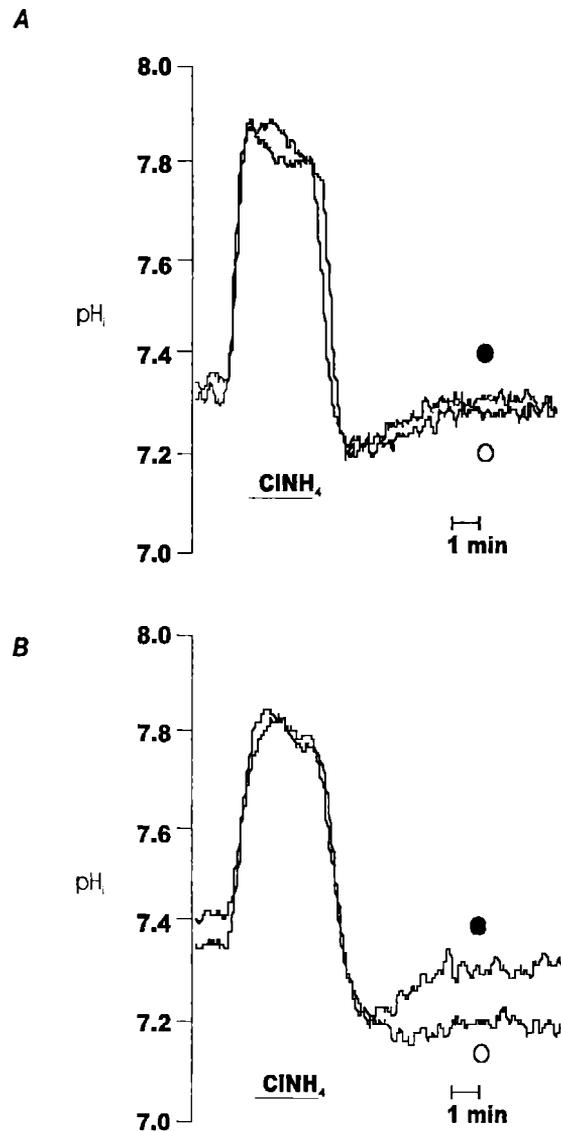


Figura 17: Efecto de la Ang II en la recuperación del pH_i ante una acidosis intracelular. Registros representativos de pH_i obtenidos durante dos pulsos consecutivos de 15 mM de CINH_4 . El segundo pulso fue realizado luego de 5 (A) o 20 (B) minutos de la exposición de las células a Ang II (●). La incubación con Ang II por un periodo de 5 minutos no afectó la recuperación del pH_i ($n=4$) mientras que luego de 20 minutos de exposición a la Ang II la recuperación de la acidosis se aceleró significativamente ($n=5$).

consecutivos de ClNH_4 fue establecida en experimentos controles. Mediante este procedimiento examinamos la actividad del intercambiador Na^+/H^+ previa a la aplicación de Ang II (primer pulso ácido) y luego de la aplicación de la droga (segundo pulso), tanto a los 5 min de aplicación, cuando el efecto inotrópico positivo alcanza su máximo valor, como luego de 20 minutos, cuando la respuesta contráctil de la Ang II alcanza el estado estable y el aumento del pH_i ya había alcanzado niveles significativos. La figura 17A muestra los registros representativos de pH_i de dos pulsos de ClNH_4 consecutivos que han sido superpuestos para su comparación. El perfil del segundo pulso obtenido luego de un período de 5 minutos de incubación con Ang II, fue similar a aquel obtenido durante el primer pulso (control). Los resultados totales mostraron que no se encuentran diferencias significativas en la velocidad de recuperación de la acidosis entre el primer pulso (control) ($\Delta\text{pH}_i/\Delta t$: 0.082 ± 0.002 unidades de pH min^{-1}) y el segundo pulso (Ang II 5 minutos) (0.084 ± 0.03 unidades de pH min^{-1}), indicando que la Ang II aún no había producido activación detectable del intercambiador Na^+/H^+ a los 5 minutos de su aplicación. Sin embargo cuando las células fueron tratadas con Ang II por 20 minutos antes del segundo pulso (Fig. 17B), la velocidad de recuperación del pH_i de la acidosis aumentó significativamente. Los resultados totales indicaron una variación de 0.075 ± 0.002 unidades de pH min^{-1} en el primer pulso (control) a 0.11 ± 0.01 unidades de pH min^{-1} en el segundo pulso (Ang II 20 minutos), indicando que la recuperación de la acidosis se aceleró. (2) El efecto de la Ang II sobre la amplitud de la contracción se examinó en presencia y ausencia de un inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ , HOE 642 (HOE entre 10 y 50 μM). Experimentos de Avkiran y colaboradores demostraron que 1 μM de HOE producía una inhibición del intercambiador Na^+/H^+ de aproximadamente un 80% ⁽¹⁹⁰⁾. Para asegurar una completa inhibición del intercambiador se utilizaron dosis 10 y 50 veces mayores. El HOE no produjo cambios significativos en los niveles de contractilidad basal. La administración de hasta 50 μM de HOE no produjo efectos cuando se aplicó luego de que el efecto inotrópico positivo de la Ang II había alcanzado el estado estable (figura 18A). De manera similar, la preincubación de células con 10 μM del bloqueante no previno el efecto inotrópico positivo de la Ang II ($n=5$) (figura 18B). Estos resultados indican que en el miocardio de gato el efecto inotrópico positivo y alcalinizante de la Ang II no son fenómenos asociados.

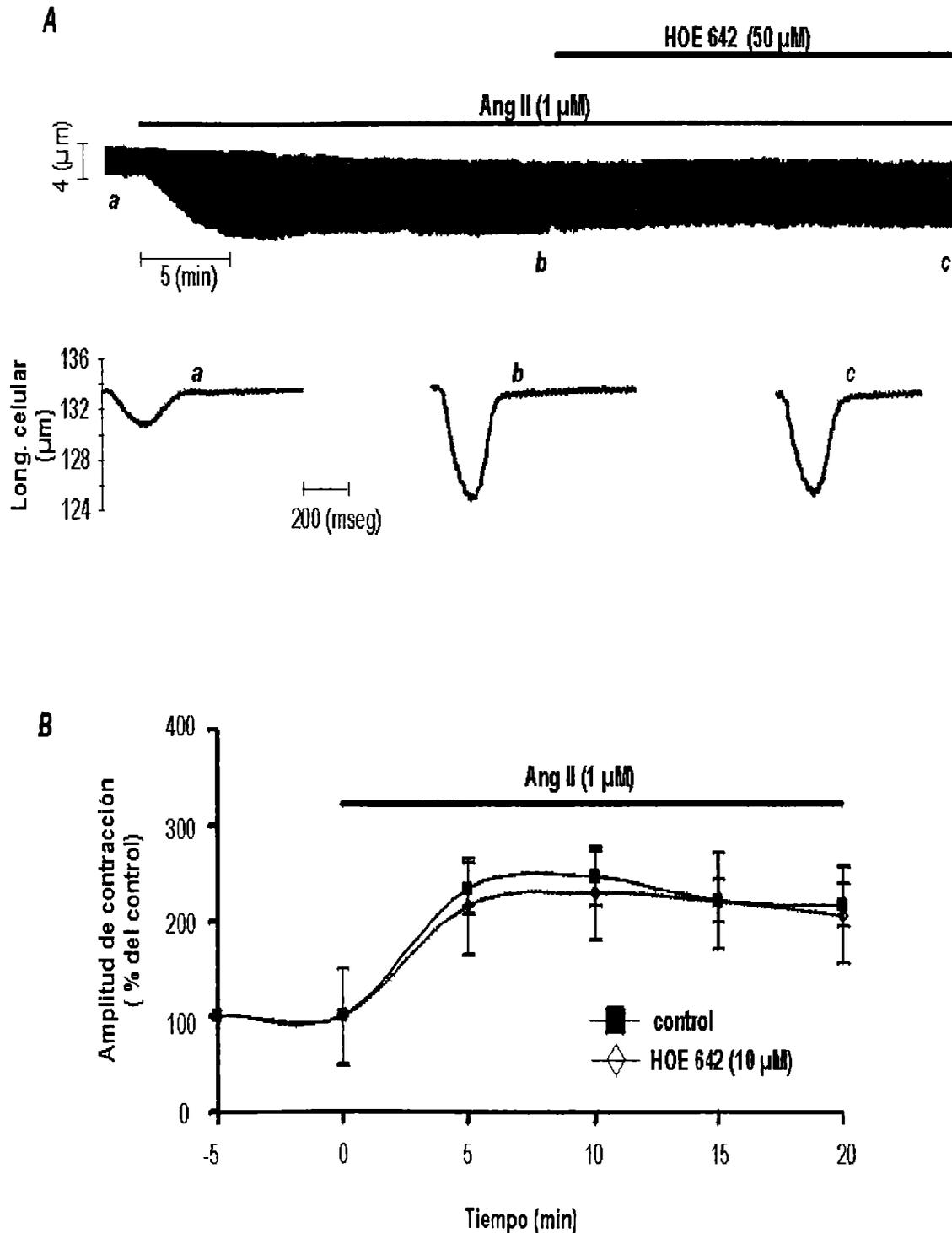


Figura 18. El inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ (HOE 642) no bloquea el efecto inotrópico positivo inducido por la Ang II. **A:** Ejemplo representativo del efecto del HOE en un registro continuo de acortamiento celular administrado en presencia de Ang II. Debajo del mismo se observan las contracciones individuales de los puntos señalados en el registro continuo (*a*, *b* y *c*). El efecto inotrópico positivo sostenido de la Ang II no fue afectado por la adición de HOE 50 μM . **B:** Resultados totales del efecto de la Ang II en ausencia y presencia continua de HOE (10m μM) sobre la amplitud de contracción, expresados como porcentaje de los valores controles. No hay diferencias significativas en el efecto inotrópico positivo producido por la Ang II entre las células controles y las tratadas con HOE.

ANG II, RELAJACION Y pH_i

Para estudiar el efecto de la Ang II sobre la relajación se comparó, en miocitos aislados, el efecto de la hormona sobre diferentes parámetros de relajación para un mismo efecto inotrópico positivo producido por Ang II o por aumento del Ca^{2+} extracelular (Ca^{2+}_o). Los parámetros de relajación evaluados fueron el tiempo hasta la mitad de la relajación ($t_{1/2}$ del acortamiento) y el tiempo hasta la mitad de la declinación del *transient* de Ca^{2+}_i ($t_{1/2}$ del *transient*). El hecho de comparar iguales aumentos del inotropismo con una u otra intervención se debe a que la caída del *transient* de Ca^{2+} se ve influenciada por el pico que éste alcance ⁽¹⁹¹⁾. Es decir, cuanto mayor sea el pico alcanzado por el *transient* de Ca^{2+} mayor será la velocidad de caída del mismo. En este contexto, nuestros experimentos revelaron (figura 19) que el aumento del Ca^{2+}_o (amplitud de contracción $310 \pm 59\%$, $n=8$) produce una disminución del $t_{1/2}$ del acortamiento (34 ± 6.3 mseg) que se acompaña con una disminución en el $t_{1/2}$ del *transient* de Ca^{2+} (62 ± 15.6 mseg). Para un mismo aumento de la contracción con Ang II ($263 \pm 26.3\%$, $n=8$), en cambio, aunque también se produce una disminución del $t_{1/2}$ del acortamiento (28.9 ± 4.9 mseg) no se modifica significativamente el $t_{1/2}$ del *transient* (9.7 ± 16 mseg). Este hecho indicaría que un mecanismo antirrelajante estaría interviniendo, en el caso de la Ang II, ya que para el mismo pico de Ca^{2+}_i alcanzado por ambas intervenciones, el efecto relajante del aumento del Ca^{2+}_i no se produjo con Ang II. En otras palabras, esta "prolongación" relativa del *transient* de Ca^{2+} respecto del alto Ca^{2+} observada en presencia de Ang II puede considerarse como la manifestación del efecto lusitrópico negativo de la Ang II en condiciones isotónicas. La explicación de que el efecto lusitrópico negativo de la Ang II se observe solamente en el *transient* de Ca^{2+} y no en el acortamiento no es clara. Ha sido descrito que perturbaciones mecánicas de la longitud del músculo, como el acortamiento isotónico, producen una liberación extra de Ca^{2+} de la TnC. Esta liberación extra de Ca^{2+} durante el acortamiento se ha atribuido a una menor afinidad de la TnC por el Ca^{2+} producida por la disminución de la longitud del músculo ^(192,193). Esta menor afinidad de la TnC por Ca^{2+} acelera la relajación mecánica. Es posible que esta disminución de la afinidad al Ca^{2+} de la TnC sea tan importante que impida la detección de un efecto lusitrópico negativo, a pesar de la prolongación del *transient* de Ca^{2+} .

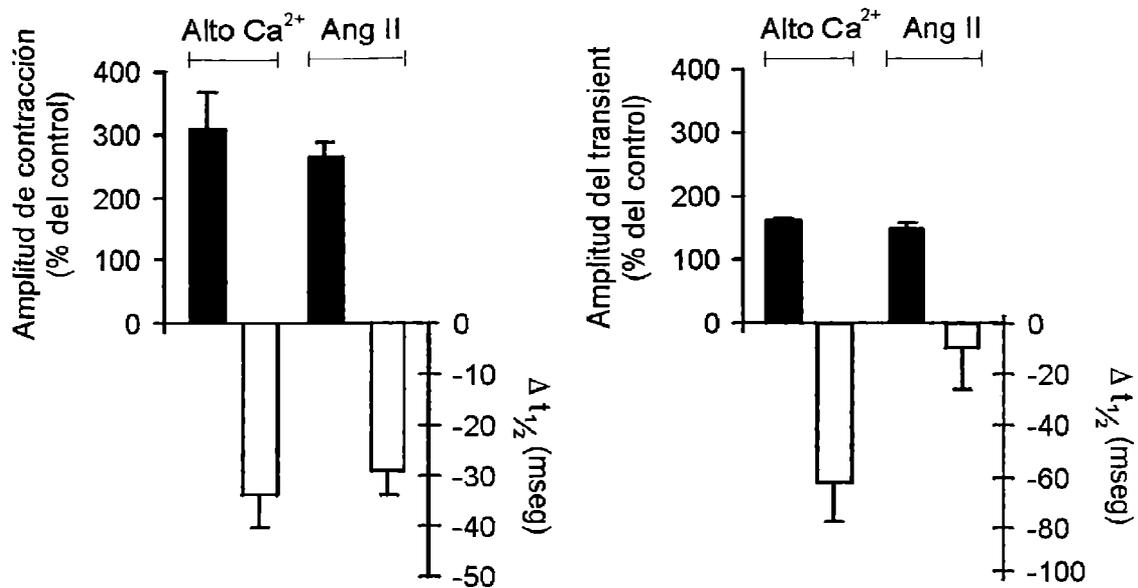


Figura 19. Efecto lusitrópico negativo de la Ang II en miocitos aislados. En el gráfico de la izquierda se observa que un mismo acortamiento producido tanto por alto Ca²⁺ como por Ang II, se acompaña de una disminución del $t_{1/2}$ del acortamiento. En el gráfico de la derecha, el mismo aumento en la amplitud del *transient* producida por las mismas intervenciones produce una disminución del $t_{1/2}$ del *transient* para el alto Ca²⁺ y sin embargo no modifica el $t_{1/2}$ del *transient* para la Ang II.

Como se dijo más arriba, la inactivación en el miocito también está modulada por la carga impuesta a la célula durante el ciclo de contracción-relajación, a mayor acortamiento (menor carga) mayor velocidad de relajación, ya que cuanto menor sea la fuerza desarrollada (mayor acortamiento), menor será la sensibilidad de los miofilamentos al Ca²⁺(193,194). Debido a que el comportamiento de la relajación cardíaca es dependiente de la carga en los mamíferos (195), decidimos estudiar el efecto lusitrópico negativo de la Ang II en músculos papilares contrayéndose isométricamente, es decir, sometidos a una carga máxima.

Así como la caída del *transient* de Ca^{2+} , en miocitos aislados, está influenciada por el pico alcanzado, en preparaciones isométricas, los aumentos en +T están habitualmente asociados con un aumento proporcional en -T en intervenciones inotrópicas positivas que no poseen un efecto relajante, como por ejemplo la elevación del Ca^{2+}_o ^(167,185). Debido a esta dependencia del inotropismo, los cambios en -T tienen que relacionarse con los cambios en +T para evaluar el lusitropismo. Además, para una mejor interpretación de los resultados, es conveniente comparar los datos obtenidos de la intervención en estudio con una elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ que mimetice el aumento de contractilidad alcanzado por el agente inotrópico positivo. A modo de ejemplo, un aumento proporcionalmente mayor en +T que en -T, con lo cual aumenta el cociente +T/-T, y un aumento en el $t_{1/2}$, reflejan un efecto lusitrópico negativo típico ⁽¹⁹¹⁾. La figura 20 muestra que, para un aumento similar en la contractilidad (tensión desarrollada, TD) producido tanto por el incremento de Ca^{2+}_o como por la administración de Ang II, hay un comportamiento diferente en los parámetros de relajación ($t_{1/2}$ y +T/-T). El recuadro de la figura muestra un experimento típico en donde el Ca^{2+}_o se aumentó lo necesario para alcanzar la misma contractilidad producida por la Ang II. A la derecha, las contracciones individuales superpuestas y normalizadas en una escala de tiempo expandida, de una contracción control y una luego de la intervención, muestran que la Ang II prolongó la relajación mientras que la elevación del Ca^{2+}_o no lo hizo. Los gráficos de barras muestran los resultados totales del efecto de la Ang II y el aumento del Ca^{2+}_o sobre los distintos parámetros estudiados. Cuando se elevó el Ca^{2+}_o hubo un incremento proporcional en +T y en -T, por lo que no hubo cambios en la relación +T/-T. Contrariamente, la Ang II produjo un aumento menor de -T que de +T, por lo que la relación +T/-T se incrementó significativamente. El efecto antirrelajante de la Ang II también fue detectado a través de la prolongación del $t_{1/2}$, parámetro que no se modificó con el aumento del Ca^{2+}_o .

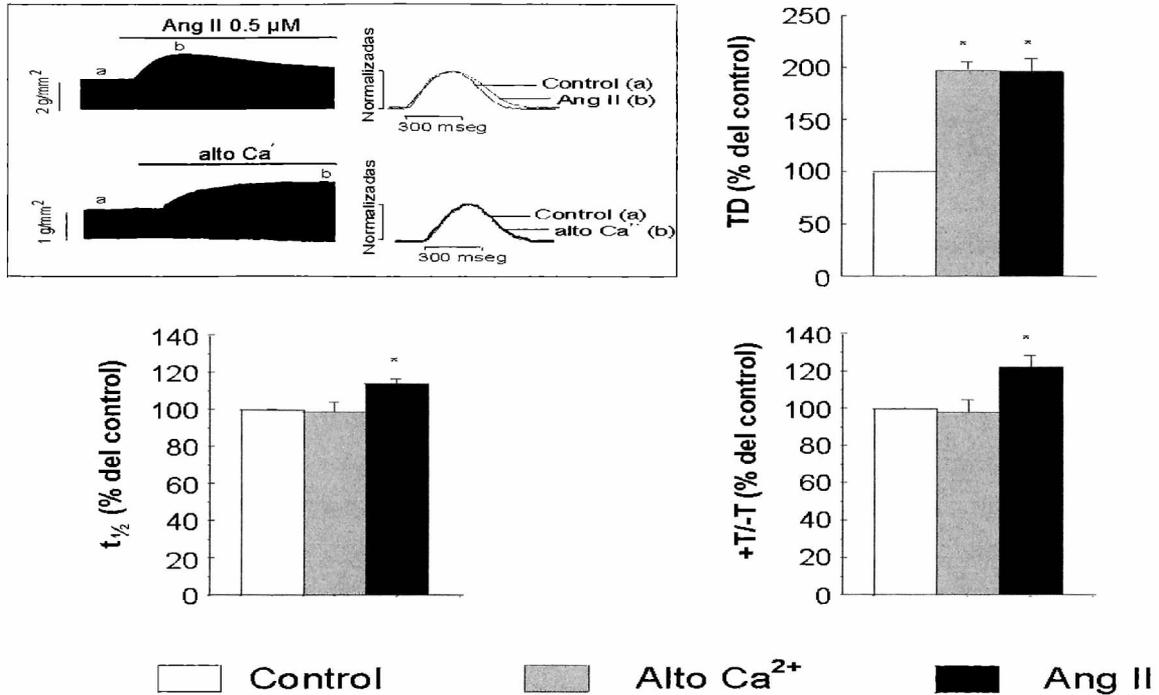


Figura 20. Efecto de la Ang II sobre la relajación. El recuadro muestra registros continuos de la tensión desarrollada (TD) por un músculo papilar contrayéndose isométricamente en presencia de Ang II o de una $[Ca^{2+}]_0$ tal que mimetice el aumento en la contractilidad producido por la Ang II. A la derecha se observan las contracciones individuales de los puntos señalados en el registro continuo (a y b), normalizadas a la máxima TD, indicando que, a diferencia del efecto que produce el aumento del Ca^{2+}_0 , la Ang II produce una significativa prolongación de la relajación. Los gráficos de barras muestran los resultados totales del efecto de la Ang II ($n=17$) y el alto Ca^{2+} ($n=6$) sobre distintos parámetros (TD, $t_{1/2}$ y +T/-T). Para un efecto inotrópico positivo similar alcanzado por las dos intervenciones (TD), sólo la Ang II induce un prolongación de los parámetros de relajación ($t_{1/2}$ y +T/-T). *P 0.05 con respecto al control.

Habiendo caracterizado el efecto lusitrópico negativo de la Ang II, examinamos la dependencia de este efecto con el pH_i , para lo cual realizamos, también en músculos papilares, experimentos en distintas soluciones buffer y en ausencia y presencia de HOE. La figura 21 ilustra los registros típicos y los resultados totales de estos experimentos. En el panel superior se observan las contracciones individuales superpuestas y normalizadas, en una escala expandida de tiempo, en solución HEPES, donde la regulación de pH_i está dada prácticamente por el intercambiador Na^+/H^+ ; en solución bicarbonato, en donde la Ang II no produce cambios del pH_i , como se mencionó en la introducción (ver pagina 44); y en solución HEPES en ausencia y presencia de $1\mu M$ de HOE, en donde la alcalinización producida por la activación del intercambiador Na^+/H^+ inducida por la Ang II quedaría anulada por el inhibidor del intercambiador. Como se puede observar, la Ang II produjo un efecto antirrelajante en todas las situaciones. Estos resultados

concordarían con los obtenidos al examinar el efecto inotrópico positivo de la hormona, y confirmarían que el efecto lusitrópico negativo de la Ang II no puede ser atribuido a un aumento de la respuesta al Ca^{2+} dependiente de cambios en el pH_i .

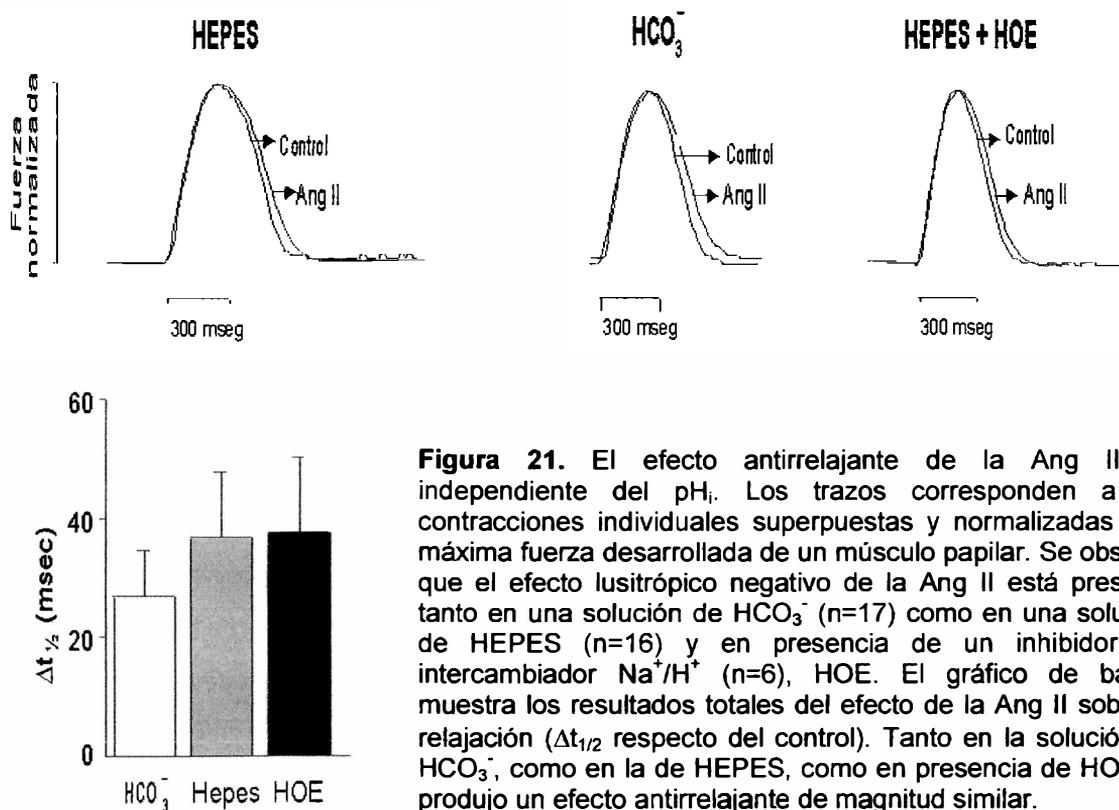


Figura 21. El efecto antirrelajante de la Ang II es independiente del pH_i . Los trazos corresponden a las contracciones individuales superpuestas y normalizadas a la máxima fuerza desarrollada de un músculo papilar. Se observa que el efecto lusitrópico negativo de la Ang II está presente tanto en una solución de HCO_3^- ($n=17$) como en una solución de HEPES ($n=16$) y en presencia de un inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ ($n=6$), HOE. El gráfico de barras muestra los resultados totales del efecto de la Ang II sobre la relajación ($\Delta t_{1/2}$ respecto del control). Tanto en la solución de HCO_3^- , como en la de HEPES, como en presencia de HOE se produjo un efecto antirrelajante de magnitud similar.

Debido a que, tanto el efecto inotrópico positivo como el lusitrópico negativo inducido por la Ang II, no puede ser atribuido a un aumento en la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles mediado por una alcalosis intracelular, examinamos los mecanismos alternativos que podrían ser responsables del efecto inotrópico positivo y antirrelajante de la Ang II, entre ellos, un aumento del Ca^{2+} intracelular (Ca^{2+}_i) y/o un aumento de la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos, independiente del pH_i .

ANG II, CONTRACCIÓN Y Ca^{2+} INTRACELULAR

Para investigar el efecto de la Ang II ($1 \mu\text{M}$) sobre la contracción y el Ca^{2+}_i , se usaron miocitos ventriculares cargados con el indicador Indo-1. La figura 22A muestra un ejemplo representativo del efecto inotrópico positivo de la Ang II y del aumento de Ca^{2+}_i asociado al mismo. El aumento inicial de la amplitud de la contracción producido por la Ang II fue seguido de una lenta caída de la misma y se acompañó de un perfil similar de aumento y lenta caída de la amplitud del Ca^{2+}_i y del Ca^{2+} sistólico pico. Ni la longitud celular diastólica ni el Ca^{2+}_i diastólico fueron afectados significativamente por la Ang II. Como ya se mencionó, en algunas células un efecto inotrópico negativo precede al aumento de la amplitud de contracción producida por la Ang II, hecho que se asocia con una disminución del Ca^{2+}_i . La figura 22B muestra los resultados totales de estos experimentos indicando el curso en el tiempo del efecto de la Ang II sobre la amplitud de la contracción y del Ca^{2+}_i . Considerando la similitud del curso en el tiempo del efecto de la Ang II sobre la contracción y sobre el Ca^{2+}_i , es razonable sugerir que el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} inducida por Ang II es el mecanismo dominante responsable del efecto inotrópico positivo observado.

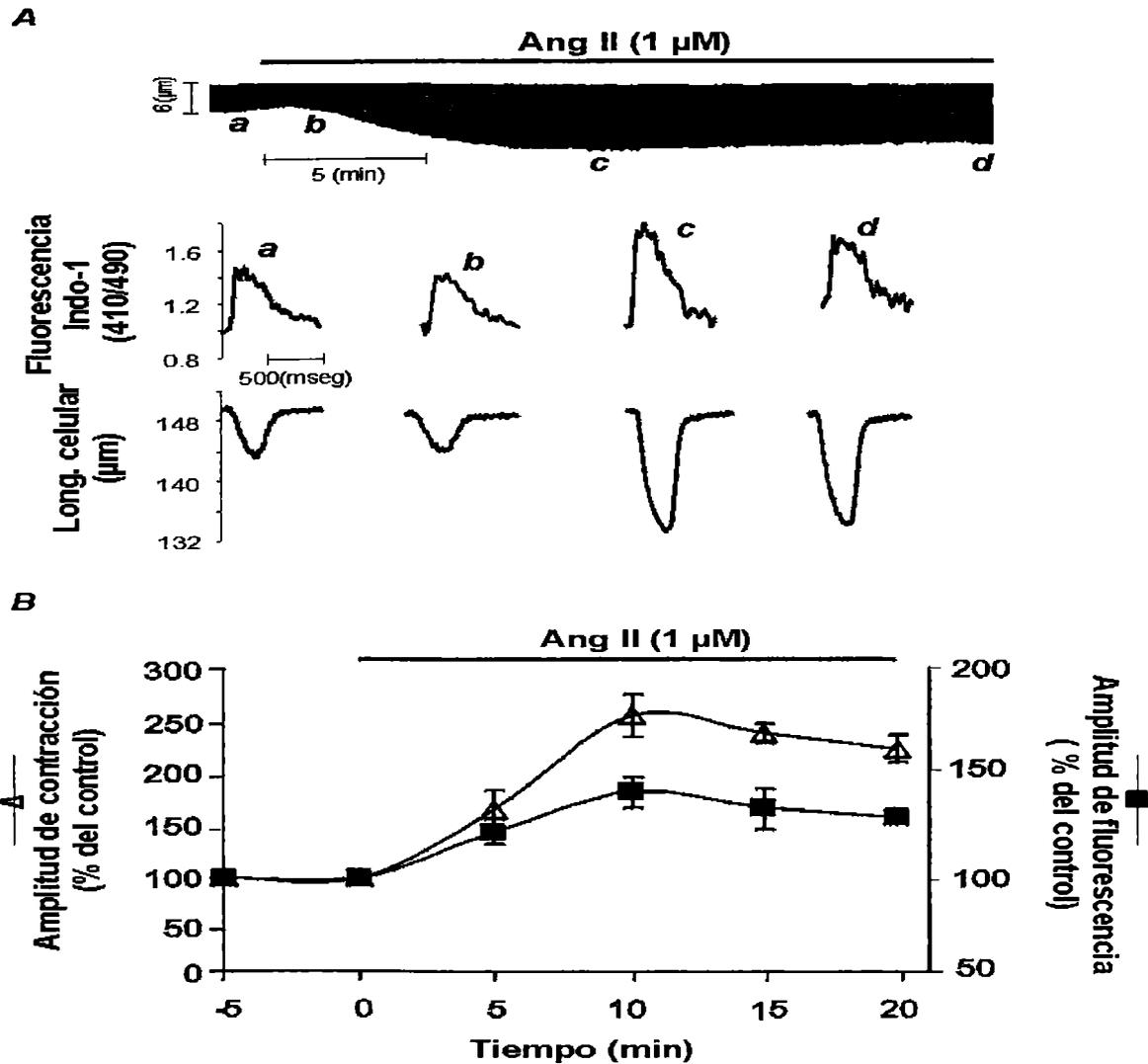


Figura 22. Efecto de la Ang II sobre la fluorescencia del Indo-1 y la amplitud de la contracción. **A:** Los trazos inferiores de fluorescencia de Indo-1 y longitud celular fueron obtenidos a los tiempos indicados por las letras en el registro continuo de acortamiento que está más arriba (*a*, *b*, *c* y *d*). La condición control (*a*) es seguida por una disminución transitoria de la amplitud de la contracción, como también se observa en la figura 1, y de la amplitud de la fluorescencia de Indo-1 (*b*), y subsecuentemente por un efecto inotrópico positivo que es máximo y luego decae hasta alcanzar un estado estable. El trazo *c* representa el pico de aumento de la amplitud de contracción y el trazo *d*, el estado estable de la contracción alcanzada luego de 20 min de la administración de la Ang II. Estos efectos están asociados con cambios similares en la amplitud de la fluorescencia de Indo-1. **B:** Resultados totales del curso en el tiempo del efecto de la Ang II sobre la contracción y la amplitud de la fluorescencia de Indo-1 expresados como porcentaje de los valores controles. Los datos son la media \pm SEM de cinco células. La Ang II induce cambios paralelos de la amplitud de la contracción y de la fluorescencia de Indo-1.

ANG II Y RESPUESTA AL Ca^{2+} DE LOS MIOFILAMENTOS

Para evaluar si un aumento en la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles independiente del pH_i contribuye también al efecto inotrópico positivo de la Ang II, se usaron dos procedimientos diferentes. (1) Se utilizó el método de Spurgeon y colaboradores ⁽¹⁷⁶⁾, que consiste en graficar la longitud instantánea del miocito versus la medida simultánea de la fluorescencia por indo-1 (Ca^{2+}_i) durante una contracción (diagrama en fase-plana o bucle). El valor de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cambia tan lentamente durante la fase final de la relajación, que los autores que describieron este método concluyeron que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la longitud celular estaban en un equilibrio dinámico durante este período. Aceptando esta suposición, esta fase puede usarse para establecer la relación entre el Ca^{2+}_i y el acortamiento. Así, para contracciones individuales con diferente grado de inotropismo, en donde no hay cambios en la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos (como por ejemplo un aumento de la concentración de Ca^{2+}_o), la relación entre la longitud celular y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ antes de que la relajación se complete es igual para todas las contracciones, describiendo en el diagrama de fase-plana una trayectoria común al final de la relajación (figura 23A). Al contrario del ejemplo citado, intervenciones que disminuyen la respuesta de los miofilamentos al Ca^{2+} (ej., acidosis) desvían la trayectoria hacia abajo y hacia la derecha, indicando que para un dado Ca^{2+} el acortamiento es menor, mientras que, intervenciones que incrementan la respuesta de los miofilamentos al Ca^{2+} (ej., drogas sensibilizantes al Ca^{2+}) tienen efectos opuestos. La figura 23B ilustra un ejemplo de cada caso. La posición de la trayectoria de la fase final de la relajación reflejaría entonces la respuesta de los miofilamentos al Ca^{2+} .

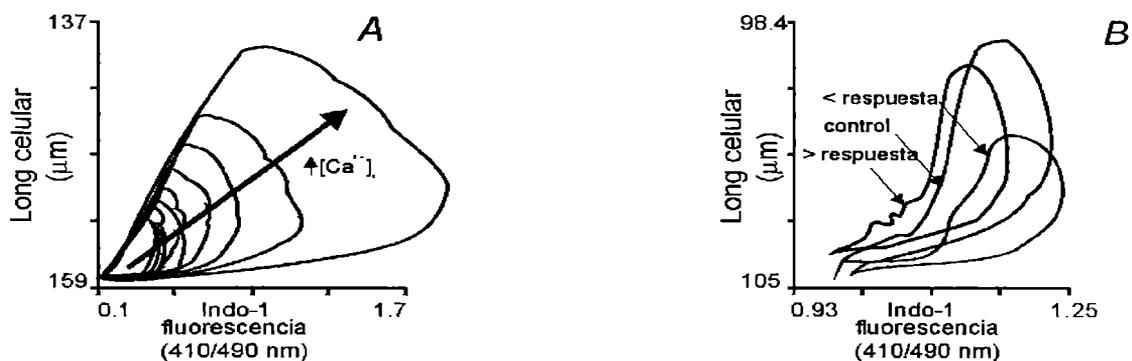


Figura 23. Diagramas en fase plana. **A:** Acortamiento celular vs. relación de fluorescencia a varias concentraciones diferentes de Ca^{2+}_o . Obsérvese la trayectoria común durante la fase de relajación. **B:** Diagramas de fase plana para intervenciones que modifican la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos. Obsérvese como se desplaza el bucle hacia la izquierda a medida que disminuye la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles.

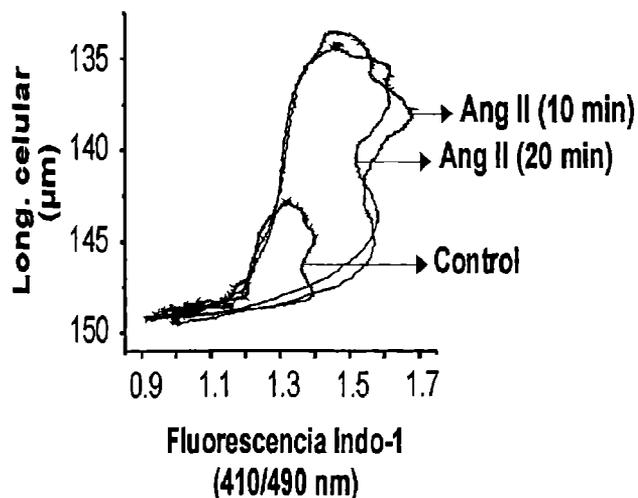


Figura 24. El efecto de la Ang II sobre la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos. Diagrama de la fluorescencia de Indo-1 vs. la longitud celular (diagrama en fase plana) para las contracciones en situación control, en el pico (10 min) y en el estado estable (20 min) del efecto inotrópico positivo de la Ang II. La trayectoria común durante la fase de la relajación de los miocitos que se observa entre los bucles del control y los de la Ang II, reflejaría la ausencia de efecto de la Ang II sobre la respuesta de los miofilamentos al Ca^{2+} .

Se compararon, entonces, diagramas en fase plana (bucles) obtenidos de contracciones en condiciones controles y luego de 10 y 20 minutos de la aplicación de Ang II, tiempos en los que el efecto inotrópico positivo de la Ang II alcanzó el pico y el estado estable, respectivamente (figura 24). La fase final de la relajación de los bucles obtenidos de las contracciones controles, y de las obtenidas luego de 10 y 20 minutos de la aplicación de la Ang II tienen una trayectoria común indicando que la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos no fue modificada luego de la administración de la Ang II. Diagramas en fase plana similares fueron observados en otras 5 células expuestas a $1 \mu\text{M}$ de Ang II.

(2) El segundo procedimiento para evaluar la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos consistió en comparar los aumentos del Ca^{2+} sistólico pico inducidos por elevar la concentración extracelular de Ca^{2+} con el aumento del Ca^{2+} sistólico pico producido por Ang II ($1 \mu\text{M}$). Se tuvo especial cuidado para conseguir que los aumentos en la amplitud de la contracción producidos por aumentar el Ca^{2+}_o y por la Ang II fueran similares. La figura 25 muestra un ejemplo representativo obtenido siguiendo este protocolo. Para un aumento similar en la amplitud de la contracción producida por un aumento del Ca^{2+}_o o por Ang II también hubo un aumento similar del Ca^{2+} sistólico pico.

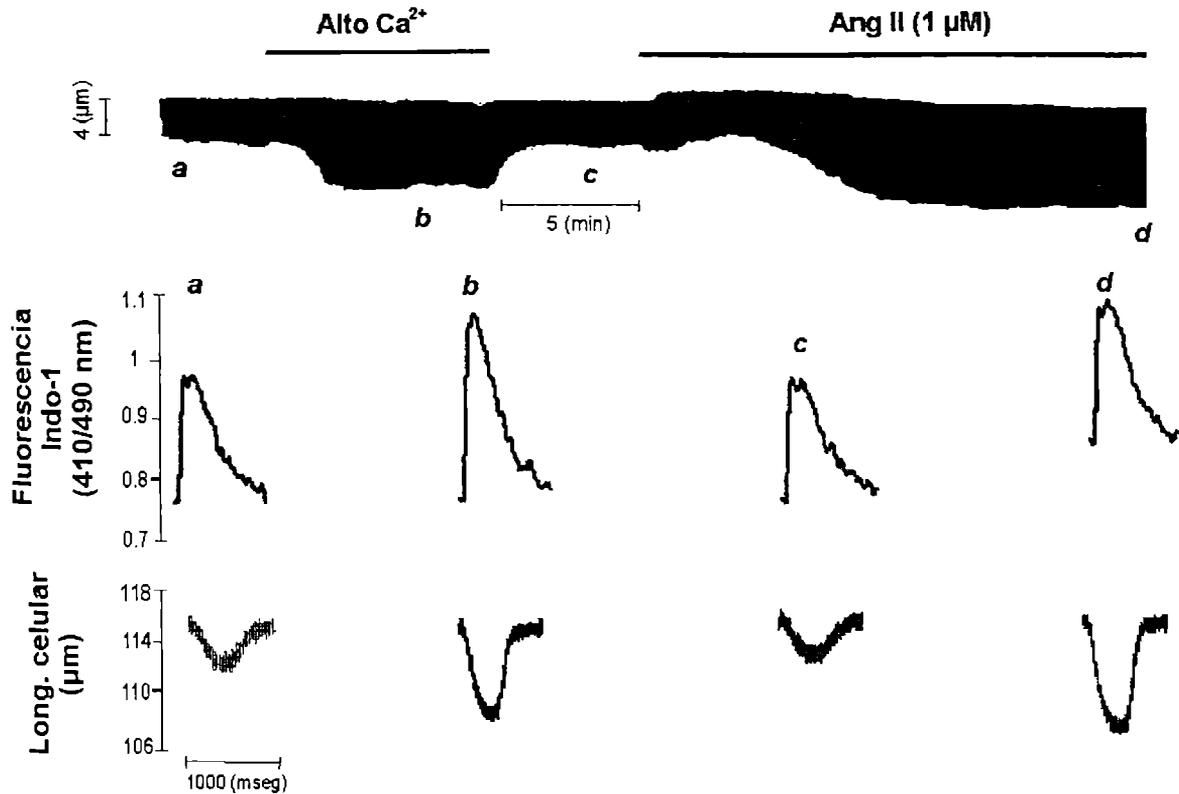


Figura 25. Ausencia de efecto de la Ang II sobre la respuesta de los miofilamentos al Ca^{2+} . Registro continuo típico del acortamiento celular que muestra aumentos similares en el acortamiento celular inducidos tanto por elevaciones del Ca^{2+} , como por la administración de Ang II. Debajo están los trazos de las contracciones individuales y las variaciones de la fluorescencia del Indo-1 correspondientes a los tiempos indicados por las letras *a* a *d* en el registro continuo.

Los resultados promedio ($n=8$) del efecto de aumentar el Ca^{2+}_o (entre 3 y 5 mM) o de administrar Ang II sobre la contracción y la amplitud del Ca^{2+} intracelular se muestran en la figura 26A y en la tabla 1.

	AC (% de Lo)	Fluorescencia Indo-1 (410/490)		
		Diastólica	Sistólica	Amplitud
n	8	8	8	8
Control	1.82 ± 0.60	1.01 ± 0.10	1.21 ± 0.10	0.21 ± 0.03
Alto Ca^{2+}	$4.4 \pm 0.80^*$	1.05 ± 0.10	$1.37 \pm 0.10^*$	$0.34 \pm 0.05^*$
Control	2.2 ± 0.60	0.97 ± 0.10	1.16 ± 0.10	0.19 ± 0.03
Ang $1 \mu\text{M}$	$4.9 \pm 0.80^*$	1.05 ± 0.10	$1.32 \pm 0.10^*$	$0.29 \pm 0.04^*$

AC, indica amplitud de la contracción; Los valores son la media \pm SEM. * significativo vs valor control ($P < 0.05$)

En la figura 26B se comparan las relaciones que existen entre el aumento en el Ca^{2+} sistólico pico y el pico del acortamiento obtenidas luego de 10 y 20 minutos de Ang II y luego de aumentar el Ca^{2+}_o . Las pendientes de las rectas ajustadas a los tres distintos grupos de puntos no fueron significativamente distintas entre sí (análisis por covarianza). Esto significa que para un mismo aumento del Ca^{2+}_i producido por el aumento del Ca^{2+}_o y por Ang II, se produce el mismo aumento en la amplitud de contracción. En conjunto, estos resultados son consistentes con una falta de efecto de la Ang II sobre la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles a todo lo largo del curso en el tiempo del efecto inotrópico positivo de la Ang II. Estos resultados indican que la Ang II aumenta la contratilidad miocárdica por un aumento del Ca^{2+}_i sin modificar significativamente la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles, y por lo tanto nos permiten excluir a este mecanismo como responsable del efecto lusitrópico negativo. Decidimos entonces, explorar a continuación los mecanismos mediante los cuales este aumento del Ca^{2+}_i puede ocurrir.

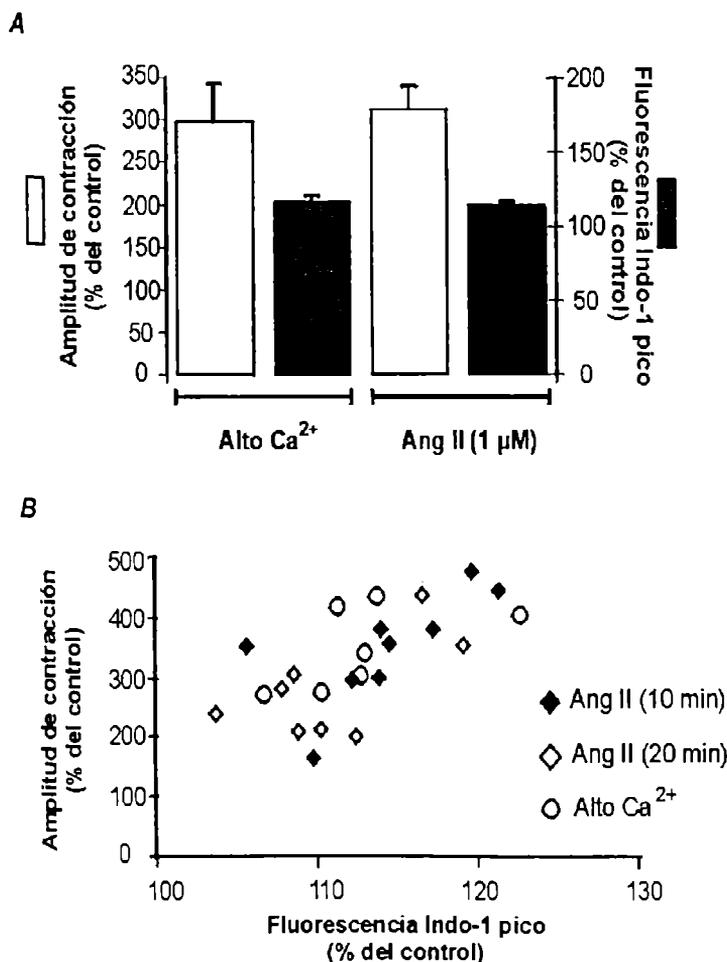


Figura 26. La Ang II no modula la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos. **A:** Resultados totales del efecto del alto Ca^{2+}_o y de la Ang II sobre la amplitud de la contracción y la fluorescencia pico de Indo-1 ($n=8$). Ambas intervenciones produjeron aumentos similares de la amplitud de contracción y de la fluorescencia pico. **B:** Relación entre el aumento de la fluorescencia pico de Indo-1 y el pico del acortamiento luego de 10 min (efecto inotrópico positivo máximo) y 20 min (estado estable) de la aplicación de Ang II. Estos resultados son comparados con la relación obtenida por un aumento del Ca^{2+}_o . Todos los puntos pueden ser ajustados a una misma relación.

ANG II E INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)

Si la duración del potencial de acción está prolongada por la Ang II, como ha sido previamente descrito^(4,158), las células están a un potencial de membrana más positivo por un período mayor, y por lo tanto, este hecho disminuiría el eflujo de Ca^{2+} a través del NCX funcionando en modo directo o aumentaría el influjo de Ca^{2+} por medio de una mayor actividad del intercambiador en modo revertido. Entonces, un aumento en la entrada de Ca^{2+} a través del NCX funcionando en modo revertido podría jugar un rol, tanto en el efecto inotrópico positivo como en el lusitrópico negativo de la Ang II. Para examinar la posibilidad de que la Ang II produjera un aumento de la actividad del NCX produciendo una mayor entrada de Ca^{2+} , estudiamos el efecto de la Ang II en presencia de 2.5 μM de KB-R7943 (KB), un inhibidor específico del NCX en su modo revertido⁽¹⁹⁶⁾. En primer término, se realizaron experimentos destinados a determinar si esta concentración de KB bloqueaba el aumento de Ca^{2+}_i luego de la activación del modo revertido del NCX (figura 27) provocado por una reducción del Na^+ extracelular desde 143 a 70 mM (el ClNa se reemplazó por cloruro de colina). Cuando se reduce abruptamente la concentración de Na^+ extracelular se fuerza al NCX a funcionar en modo revertido, es decir, extruyendo Na^+ e ingresando Ca^{2+} a la célula. El aumento del Ca^{2+}_i producido, como se observa en la figura, es anulado por la concentración de KB utilizada, indicando la efectividad de la droga a esa dosis para inhibir el modo revertido del intercambiador. Un método similar para forzar al NCX a funcionar en modo revertido, fue usado previamente por Ladilov y col.⁽¹⁹⁷⁾. A pesar de que el KB produjo una significativa disminución del acortamiento celular basal ($45 \pm 10\%$), el aumento porcentual de la amplitud de la contracción producido por la Ang II en presencia de KB no fue significativamente distinto de aquel producido en ausencia del bloqueante del NCX ($n=5$) (figura 27). En presencia de KB la Ang II aumentó la amplitud del *transient* de Ca^{2+}_i un $27 \pm 3\%$. Este incremento no fue significativamente diferente de aquel producido en ausencia del bloqueante del NCX. Estos resultados están de acuerdo con resultados obtenidos en experimentos adicionales realizados en músculos papilares de gato contrayéndose isométricamente. En estas preparaciones, concentraciones de KB de hasta 5 μM produjeron sólo una modesta disminución de la contractilidad basal ($7 \pm 1.9\%$, $n=12$). Esta concentración de KB no modificó significativamente el efecto inotrópico positivo de 0.5 y 1 μM de Ang II.

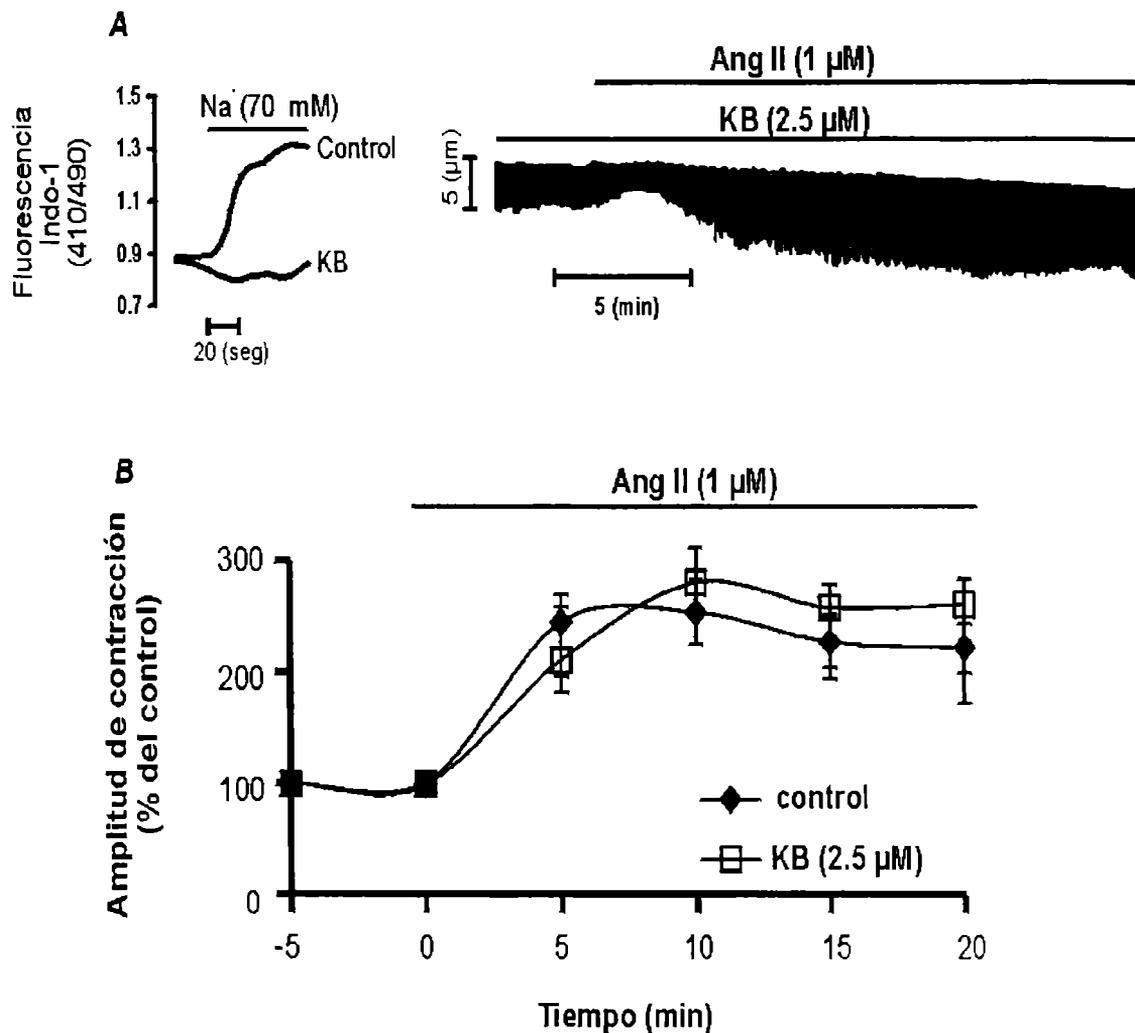
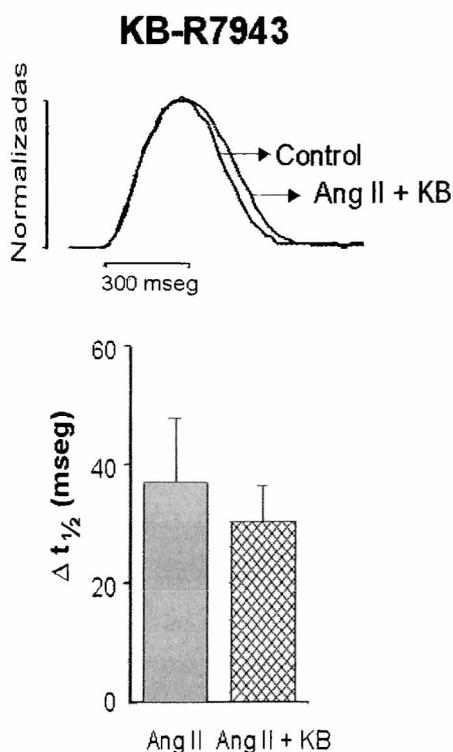


Figura 27. KB no previene el efecto inotrópico positivo de la Ang II. Los trazos de la izquierda corresponden al efecto del KB sobre el modo revertido del NCX. Cuando se reduce abruptamente el Na⁺ extracelular, el NCX se ve forzado a funcionar en modo revertido, por lo que aumenta el Ca²⁺_i (condición control). Al realizar la misma intervención en presencia de 2.5 μM del bloqueante del modo revertido del intercambiador, éste es incapaz de ingresar Ca²⁺ al miocito. El registro continuo de acortamiento celular muestra el efecto típico de la Ang II sobre la contracción de un miocito pretratado y perfundido continuamente con el bloqueante del modo revertido del NCX. Debajo, los resultados totales muestran del curso en el tiempo de los efectos contráctiles de la Ang II administrada sólo, y en presencia continua de KB. Los datos son la media ± SEM; n=5 células por grupo.



La contribución de un aumento de la actividad del modo revertido del NCX al efecto antirrelajante de la Ang II también fue examinada en músculos papilares. La figura 28 muestra que el efecto lusitrópico negativo de la Ang II aun se evidenciaba en presencia de $5\mu\text{M}$ de KBR.

Figura 28. El efecto antirrelajante de la Ang II no depende de la actividad del modo directo de NCX. En el panel superior se observan las contracciones individuales superpuestas y normalizadas a la máxima fuerza desarrollada de un músculo papilar, las cuales muestran que el efecto lusitrópico negativo de la Ang II se manifiesta aún en presencia del bloqueante del modo revertido del NCX, KB. El gráfico de barras muestra los resultados totales del efecto lusitrópico negativo de la Ang II en una solución de HEPES ($n=16$) y en presencia continua de KB.

ANG II Y RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO (RS)

La liberación de Ca^{2+} del RS juega un papel fundamental en el acoplamiento éxcito-contráctil del miocardio de mamífero, como se explicó en la introducción. Por lo tanto estudiamos el rol del RS como un posible mediador del efecto inotrópico positivo y lusitrópico negativo de la Ang II. Para ello, el RS fue funcionalmente anulado mediante el pretratamiento de las células con rianodina (Ry 500nM). Como ya se mencionó en la página 4, bajas concentraciones de Ry, hasta $10\mu\text{M}$, mantienen los canales de Ca^{2+} del RS en un estado de semiapertura que depleciona al RS de Ca^{2+} . Para evaluar la habilidad de la Ry para abolir funcionalmente el RS en nuestras condiciones experimentales, se usaron contracturas inducidas por cafeína en presencia y ausencia de Ry. Los trazos de la figura 29 muestran que la aplicación de 15 mM de cafeína indujo una contracción fásica que no pudo ser reproducida cuando la cafeína era administrada luego de la incubación con Ry, indicando la incapacidad del RS para acumular y liberar Ca^{2+} en presencia de Ry. El

registro continuo de la figura 29 es un ejemplo representativo del efecto de la Ang II en presencia continua de Ry. A pesar de que, como era esperable, la Ry produjo un descenso significativo del acortamiento celular basal ($53 \pm 7\%$) asociado con una prolongación del tiempo hasta el acortamiento pico ($37 \pm 7\%$) y del tiempo hasta la mitad de la relajación ($61 \pm 12\%$), el incremento porcentual de la amplitud de la contracción producido por la Ang II en presencia de Ry no fue significativamente diferente de aquel producido por la Ang II sola. El efecto inotrópico positivo de la Ang II observado en presencia de Ry ocurrió asociado con un aumento del $35 \pm 9\%$ de la amplitud del Ca^{2+}_i que no fue distinto de aquel producido por la Ang II sola. El resultado un tanto inesperado de que el RS parece no ser necesario para el desarrollo del efecto inotrópico positivo de la Ang II, nos llevó a examinar el rol del RS en el caso de una intervención inotrópica más típica como es la de aumentar el Ca^{2+}_o . Estos experimentos demostraron que un aumento del acortamiento celular producido por elevar el Ca^{2+}_o similar al producido por la Ang II no fue deprimido por la presencia de Ry 500 nM (4 mM $[Ca^{2+}]_o$: $191 \pm 13\%$ vs 4 mM $[Ca^{2+}]_o$ + 500 nM Ry: $187 \pm 19\%$ n=6). La figura 29 muestra los resultados totales del efecto de 1 μ M de Ang II sobre la amplitud de la contracción en presencia y ausencia de Ry. Resultados similares se obtuvieron en otras tres células en presencia de 500 nM de Ry + 1 μ M de tapsigarguina, droga que bloquea la SERCA2, como se mencionó en la pagina 14, inhibiendo la retoma de Ca^{2+} por el RS, y por lo tanto deplecionándolo también de Ca^{2+} .

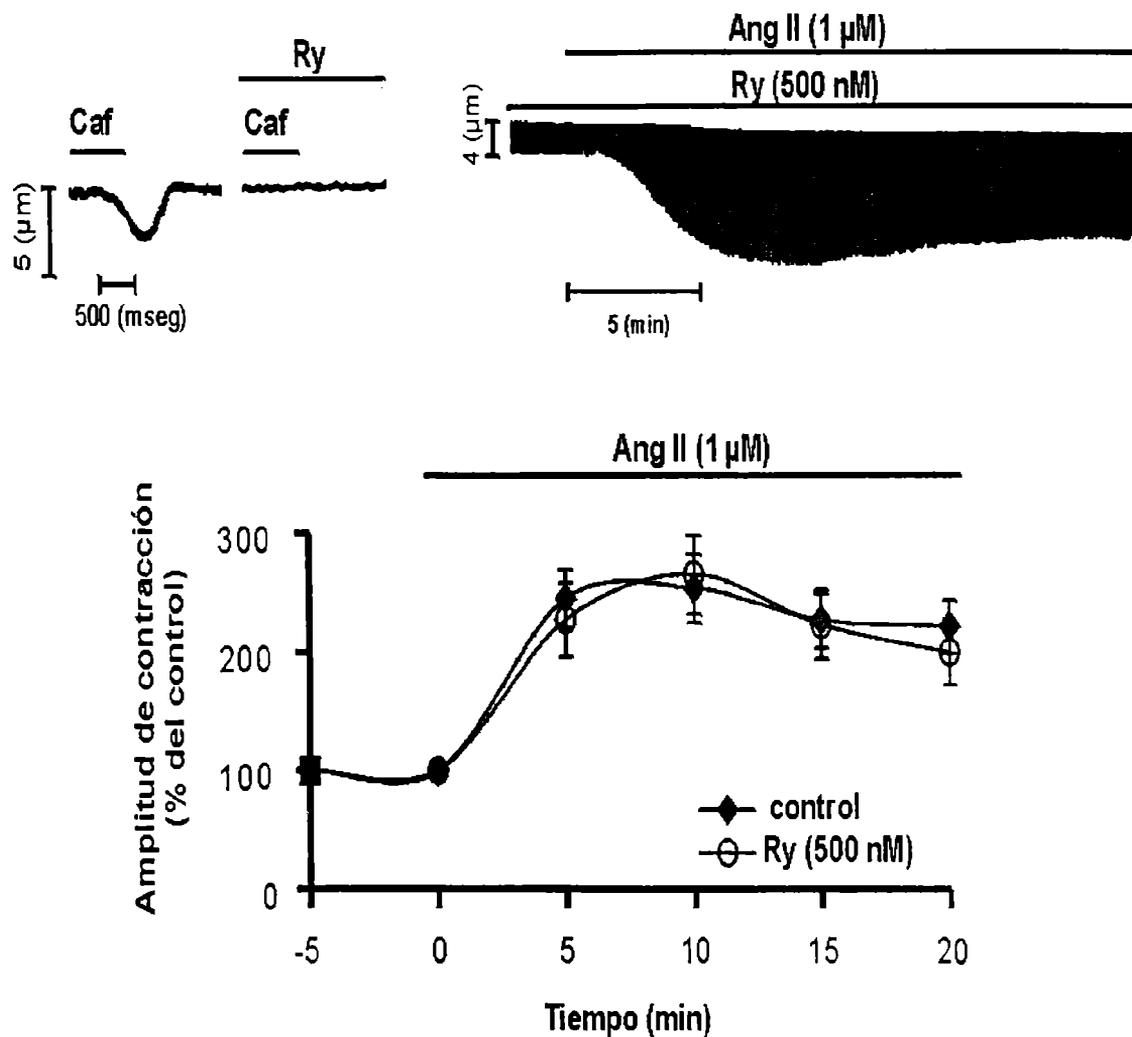


Figura 29. Ry no previene el efecto inotrópico positivo de la Ang II. Los trazos de la izquierda corresponden a un ejemplo representativo del efecto de la cafeína (Caf 15 mM) administrada en ausencia y presencia de Ry (500nM). La rápida aplicación de cafeína indujo una contracción fásica que no pudo ser reproducida luego de que las células fueran tratadas con Ry. Resultados similares se obtuvieron en otras 5 células. El registro continuo de acortamiento celular muestra el efecto típico de la Ang II sobre la contracción de un miocito pretratado y perfundido continuamente con Ry (500 nM). Debajo, los resultados totales muestran del curso en el tiempo de los efectos contráctiles de la Ang II administrada sólo, y en presencia continua de Ry. Los datos son la media \pm SEM; $n=5$ células por grupo.

Para explorar la contribución del IP_3 al efecto inotrópico positivo de la Ang II, se evaluó en miocitos aislados el efecto de la hormona sobre la contracción y la amplitud del *transient* de Ca^{2+} en presencia de 2-APB, un inhibidor selectivo de los receptores de IP_3 ^(198,199). Ha sido demostrado previamente que 1-10 μM de 2-APB es capaz de inhibir la liberación de Ca^{2+} del RS inducida por IP_3 ⁽¹⁹⁸⁾. Además, se diseñaron experimentos controles para asegurar la capacidad del 2-APB de inhibir la

liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 en tiras de aorta aisladas de gato, una preparación en donde el Ca^{2+} liberado de depósitos internos inducido por IP_3 es un fenómeno prominente. En las tiras aórticas, la contractura inducida por fenilefrina en presencia de un bloqueante de los receptores β -adrenérgicos y en una solución libre de Ca^{2+} fue tomada como una estimación de la liberación de Ca^{2+} inducida por fenilefrina. En estos experimentos, 10, 25 y 50 μM de 2-APB disminuyó la respuesta a la fenilefrina en 5 ± 5 , 45 ± 16.9 y $93 \pm 7\%$ ($n=3$ para cada concentración de 2-APB). Basados en estos resultados y en los de Gysembergh y colaboradores ⁽¹⁹⁸⁾, mencionados más arriba, se utilizaron en estos experimentos concentraciones de 5 y 50 μM de 2-APB. Estas concentraciones de 2-APB no modificaron significativamente la amplitud de contracción basal. La aplicación de 1 μM de Ang II a miocitos aislados en presencia de las concentraciones mencionadas de 2-APB preincubados durante 10 min, produjo un aumento de la contracción y de la amplitud del *transient* de Ca^{2+}_i , similar al obtenido en ausencia del inhibidor de los receptores de IP_3 (figura 30). Los resultados promedio de estos experimentos revelaron que en presencia de 2-APB la administración de 1 μM de Ang II producía un máximo incremento de la contracción y de la amplitud del *transient* de Ca^{2+}_i de $230.1 \pm 27.2\%$ y $132.4 \pm 11.0\%$, respectivamente (5 μM) y de $178.7 \pm 14.6\%$ y $152.2 \pm 12.9\%$, respectivamente (50 μM). Estos datos no fueron significativamente diferentes de los obtenidos en ausencia del inhibidor de los receptores de IP_3 . Resultados similares se obtuvieron cuando el periodo de incubación con 50 μM de 2-APB se prolongó por 60 min. La evidencia dada por estos experimentos indica que una concentración de 2-APB capaz de inhibir el 90% de la liberación de Ca^{2+} inducida por fenilefrina en aorta de gato, no afecta significativamente ni el incremento de la amplitud del *transient* de Ca^{2+}_i ni el aumento del acortamiento producido por la Ang II. Los resultados nos permiten excluir al IP_3 como segundo mensajero involucrado en el aumento del Ca^{2+}_i y del efecto inotrópico positivo inducido por la Ang II.

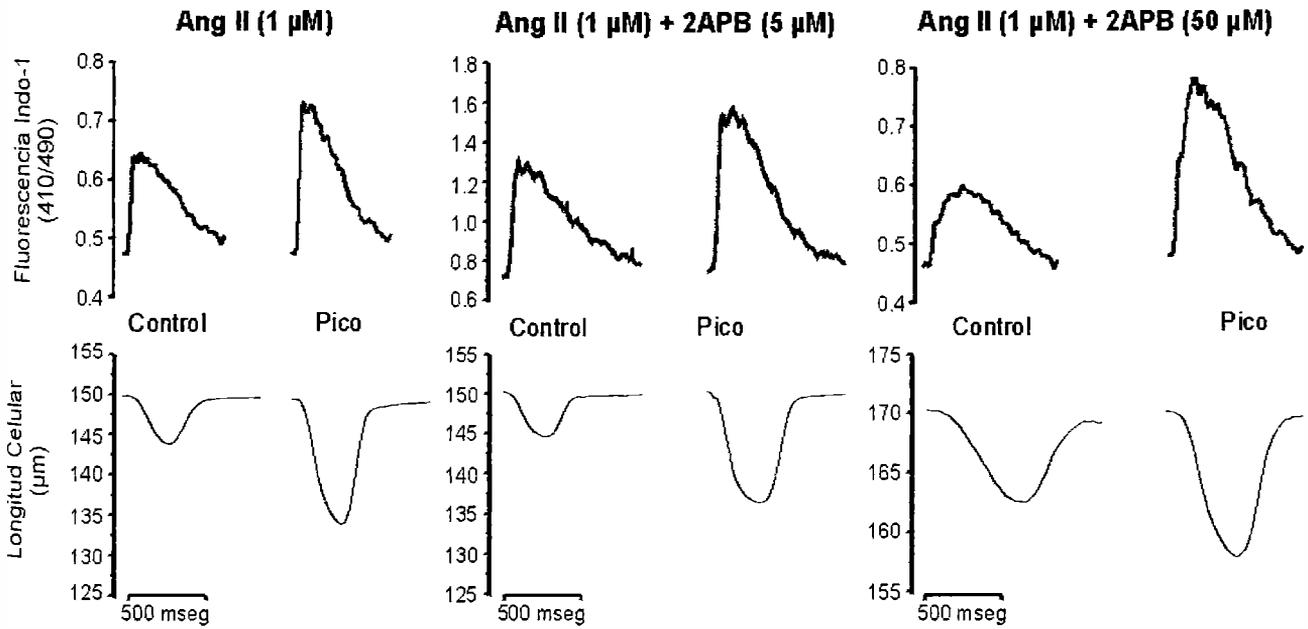
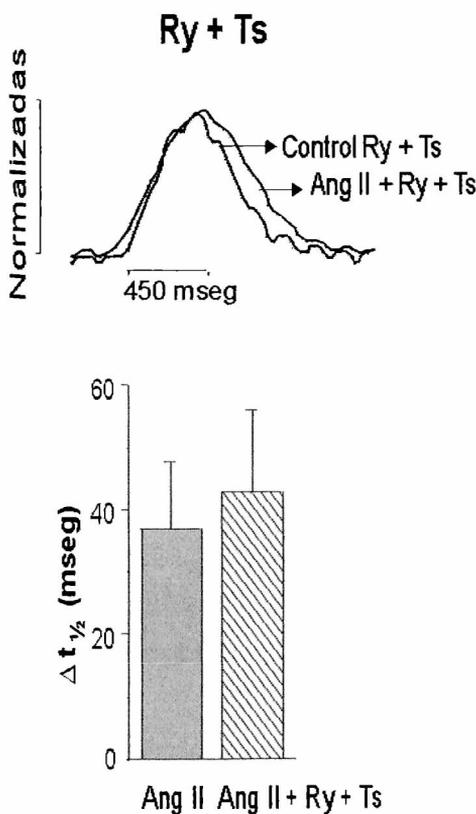


Figura 30. El inhibidor de los receptores de IP₃ (2-APB) no bloquea el efecto inotrópico positivo ni el aumento del *transient* de Ca²⁺ inducido por la Ang II. Trazos representativos del efecto máximo de la Ang II sobre el *transient* de Ca²⁺ y la contracción en ausencia y presencia de dos concentraciones diferentes del bloqueante de los receptores de IP₃, 2-APB (5 μM y 50 μM). El aumento en la contracción y la amplitud del *transient* de Ca²⁺ producido por la Ang II no fue afectado por el bloqueante.



La participación del RS al efecto lusitrópico negativo de la Ang II se examinó en músculos papilares utilizando las mismas concentraciones de Ry + Tg que en los miocitos aislados. La figura 31 muestra los resultados de estos experimentos, que indicarían que una disminución de la retoma de Ca²⁺ por RS no sería el mecanismo subcelular responsable del efecto antirrelajante de la Ang II.

Figura 31. El efecto antirrelajante de la Ang II no está determinado por una menor retoma de Ca²⁺ por el RS. En el panel superior se observan las contracciones individuales superpuestas y normalizadas a la máxima fuerza desarrollada de un músculo papilar, las cuales muestran que la prolongación de la relajación inducida por la Ang II se observa aún en ausencia de un RS funcional. El gráfico de barras muestra los resultados totales del efecto lusitrópico negativo de la Ang II en una solución de HEPES (n=16) y en presencia continua de Ry + Tg (n=6).

Estos resultados evidencian, por un lado, que la presencia de un RS funcional no sería necesaria para que la Ang II sea capaz de desarrollar un efecto inotrópico positivo típico, ni tampoco el efecto antirrelajante propio del péptido. Por otro, que uno de los posibles segundos mensajeros del efecto inotrópico positivo de la Ang II, el IP_3 , que podría actuar liberando Ca^{2+} del RS, no estaría involucrado en este efecto.

ANG II Y PKC

Como se describió en la introducción, la Ang II, al unirse al receptor AT1 aumenta la hidrólisis de los fosfoinosítidos y produce dos segundos mensajeros, el IP_3 y el DG que a su vez activa a la PKC que podrían mediar su efecto inotrópico positivo y lusitrópico negativo,. Los experimentos previos permitirían descartar al IP_3 como posible mediador. Exploramos entonces la posible participación de la PKC, en músculos papilares profundos con solución de HEPES o de bicarbonato en presencia continua de 20 μM de celeritrina (CHE) o de otro inhibidor de la PKC no relacionado químicamente, 1 μM de calfoestina C (CC). En solución HEPES, la incubación con CHE produjo una disminución de la contractilidad basal de $78.40 \pm 8.01\%$ (TD), la cual fue completamente estabilizada luego de 2 hs de incubación con la droga, y no modificó los parámetros de relajación. En presencia de esta droga el efecto inotrópico positivo en el estado estable producido por la Ang II se anuló. Resultados similares se obtuvieron en los experimentos realizados en solución de bicarbonato, en donde la CHE a la misma dosis, también disminuyó la contractilidad basal, la cual se estabilizó luego de 2hs de incubación con la droga. En presencia de CHE, el efecto inotrópico positivo de la Ang II también fue completamente anulado. La CC no afectó la contractilidad basal ni tampoco los parámetros basales de relajación, pero suprimió el efecto inotrópico positivo de la Ang II (figura 32A). Experimentos realizados en miocitos aislados con las mismas drogas develaron resultados similares (figura 32B). Ni 10 μM de CHE ni 1 μM de CC modificaron los parámetros contráctiles basales. Sin embargo la Ang II fue incapaz de reproducir el efecto inotrópico positivo típico en las células pretratadas con los inhibidores de la PKC.

Para verificar si la PKC era el segundo mensajero responsable del efecto lusitrópico negativo de la Ang II, se utilizó el mismo protocolo que para examinar la

dependencia de la PKC del efecto inotrópico positivo de la hormona en músculos papilares, en donde se examinó el $t_{1/2}$. La figura 32C muestra que la prolongación del $t_{1/2}$ producida por la Ang II no se produjo en presencia de las drogas utilizadas para bloquear la actividad de la PKC. Resultados similares se obtuvieron cuando se consideró la relación +T/-T.

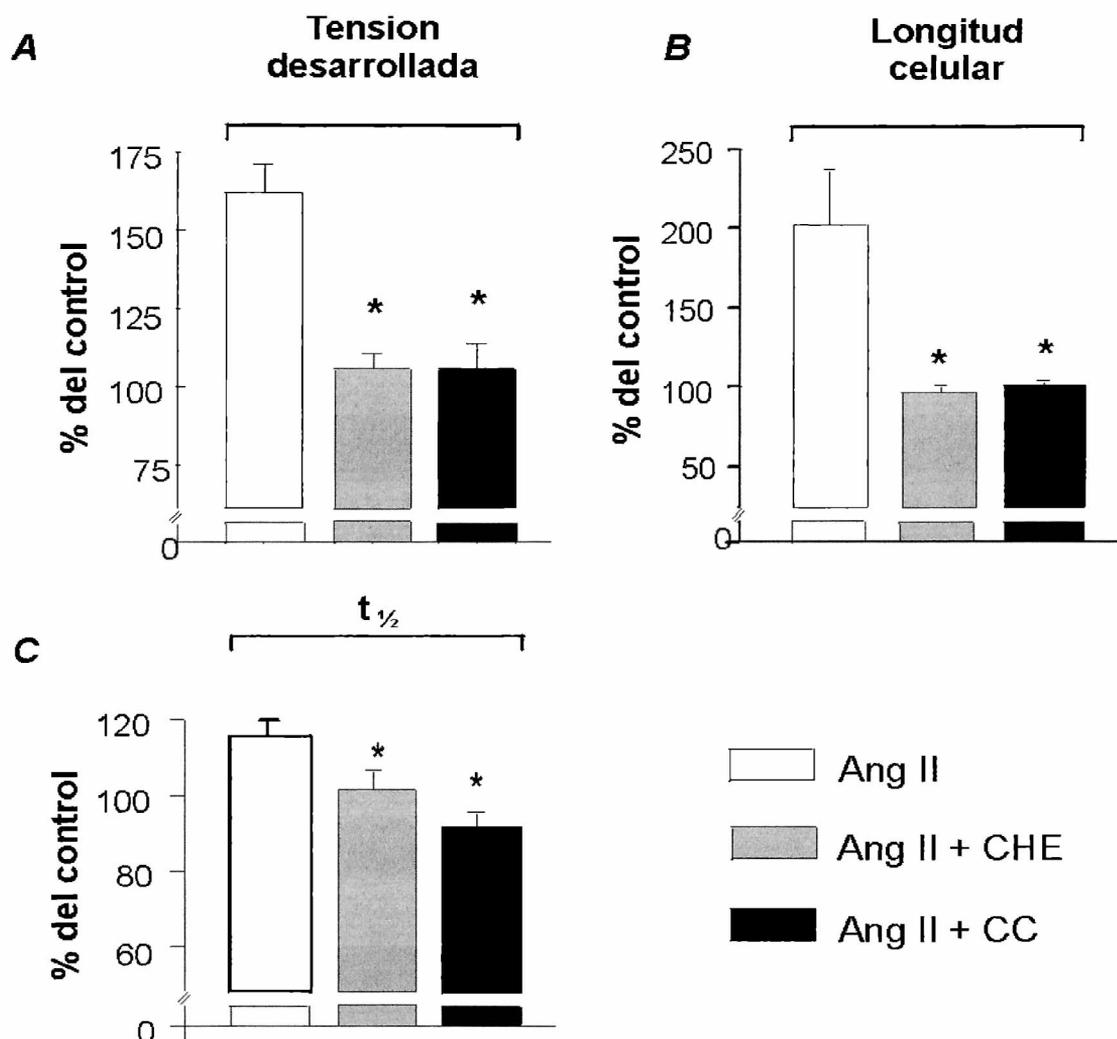


Figura 32. El efecto inotrópico positivo y lusitrópico negativo de la Ang II es dependiente de la activación de la PKC. **A:** La incubación de los músculos papilares tanto con CHE (n=8) (20 μ M, barras grises) como con CC (n=4) (1 μ M, barras negras) elimina por completo el efecto inotrópico positivo (tensión desarrollada) de la Ang II (barras blancas) en el estado estable. **B:** Resultados similares se observan en el acortamiento (longitud celular) de miocitos aislados utilizando la misma concentración de CC (n=4) y 10 μ M de CHE (n=4). **C:** los inhibidores de la PKC anulan el efecto antirrelajante de la hormona en músculos papilares. Los valores están expresados como porcentaje de los valores controles. *P<0.05 respecto de Ang II.

Estos resultados (figura 32) indican que el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ y la subsiguiente producción de un efecto inotrópico positivo típico inducido por la Ang II es dependiente de la activación de PKC. Asimismo, el efecto antirrelajante producido por la hormona es también mediado por la activación de este segundo mensajero.

DISCUSSION

La Ang II ha sido reconocida recientemente como potencial péptido fisiológico modulador de la contractilidad cardíaca, produciendo un efecto inotrópico positivo en varias especies incluida la humana. Los niveles plasmáticos de Ang II se encuentran dentro de las concentraciones umbrales para la producción del efecto inotrópico positivo del péptido ⁽¹⁾. Sin embargo, la importancia fisiológica de la Ang II como moduladora de la contractilidad miocárdica se refuerza en vista de las evidencias experimentales que muestran que los niveles de Ang II en el tejido cardíaco pueden alcanzar concentraciones hasta 100 veces mayores que los niveles plasmáticos ⁽²⁰⁰⁾. Además, el efecto antirrelajante de la hormona, cobra más importancia aún si se tiene en cuenta que la relajación cardíaca (lusitropismo) es un elemento esencial para una apropiada función del corazón como bomba. Este concepto incluye la trascendencia clínica de evaluar el estado de relajación del miocardio en situaciones patológicas e intervenciones farmacológicas.

Los mecanismos subcelulares responsables del efecto inotrópico positivo de la Ang II son aún motivo de controversia. Los diferentes resultados obtenidos en diversas especies de mamíferos pueden ser atribuidos, al menos en parte, a variaciones entre especies, lo cual parece ser una característica común entre los agentes que incrementan el metabolismo del fosfatidilinositol ⁽⁹⁾. El gato es una especie en la cual la Ang II produce un marcado efecto inotrópico positivo ^(2,11). A su vez el efecto lusitrópico negativo del péptido no ha sido nunca antes estudiado en detalle. Los mecanismos subyacentes de estos efectos (inotrópico y lusitrópico) constituyeron el objetivo de este estudio.

El presente estudio demostró que: (1) el principal mecanismo involucrado en el efecto inotrópico positivo de una concentración máxima de Ang II es un aumento del Ca^{2+}_i ; (2) el aumento de la contractilidad y el incremento del Ca^{2+}_i , es dependiente de la activación de PKC; (3) en este fenómeno no interviene ni un aumento en la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos ni el NCX funcionando en modo revertido; (4) un RS funcional tampoco es necesario para que la Ang II desarrolle el efecto inotrópico positivo observado; (5) el IP_3 no sería un segundo mensajero involucrado en el aumento del Ca^{2+}_i producido por la Ang II. Además, respecto al efecto lusitrópico negativo, se determinó que: (1) es también debido a la activación de la PKC; (2) consistentemente

con el efecto inotrópico positivo, tampoco se debe a un aumento de la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos; (3) el NCX funcionando en modo revertido no parece estar participando ni tampoco sería atribuible a una menor retoma del ion por el RS. Estos resultados nos permiten sugerir que la mayor duración del *transient* de Ca^{2+} , que a su vez prolonga la relajación, podría deberse al aumento de la duración del potencial de acción. La prolongación de la duración del potencial de acción, enlentecería el modo directo del NCX, lo que retardaría el eflujo de Ca^{2+}_i , y/o proveería una entrada de Ca^{2+} durante un periodo más prolongado a través de los canales de Ca^{2+} de tipo L.

EFEECTO INOTROPICO POSITIVO

Incremento en el Ca^{2+} intracelular vs. incremento en la respuesta de los miofilamentos al Ca^{2+} ; papel del pH_i

La disociación temporal entre el incremento del pH_i y de la contractilidad producidos por la Ang II sumada al hecho de que el efecto inotrópico se encuentra preservado en presencia de HOE, indican que la alcalosis intracelular inducida por la Ang II no modula la respuesta de los miofilamentos al Ca^{2+} . Considerando los resultados de Fabiato y Fabiato ⁽⁹⁵⁾, este no es un hallazgo inesperado ya que, usando células cardíacas sin membrana, estos autores demostraron que era necesario un incremento del pH_i de 0.4 unidades para producir un modesto incremento en la tensión (aproximadamente 30% a pCa 6.0). Más aún, un cambio del pH_i sólo produjo cambios en la fuerza máxima cuando este cambio fue hacia la acidosis, pero no hacia la alcalosis ⁽⁹⁵⁾. De este modo, si es válido extrapolar estos resultados al miocardio de gato y a una preparación más intacta que las células sin membrana, como son los miocitos aislados, el incremento de pH_i de 0.06 unidades producido por la Ang II en estas preparaciones, no sería suficiente para inducir un incremento detectable de la respuesta de los miofilamentos al Ca^{2+} . Experimentos previos de Ikenouchi y col ⁽⁸⁾ en corazón de conejo no pudieron detectar un aumento significativo en el Ca^{2+} intracelular luego de la administración de la Ang II. Estos autores concluyeron que el incremento de la contractilidad producido por la Ang II (más del 100%) fue debido enteramente a un aumento de la respuesta de los miofilamentos al Ca^{2+} dependiente del pH_i . Sin embargo el aumento de pH_i inducido por la Ang II en estos experimentos (aproximadamente 0.2 unidades), aunque mayor que el detectado en ventrículo de gato (por Mattiazzi y col. ⁽¹¹⁾

y los resultados presentes) tampoco sería suficiente de acuerdo a los resultados de Fabiato y Fabiato ⁽⁹⁵⁾, para justificar totalmente el aumento de la contractilidad observado. Confirmando esta idea, experimentos más recientes del mismo grupo de investigadores y en la misma especie, demostraron que la Ang II también induce un incremento del Ca^{2+} intracelular en el corazón de conejo ⁽¹⁶¹⁾. Por otra parte, otras evidencias experimentales indican que la activación del intercambiador Na^+/H^+ inducida por la Ang II no implica necesariamente la producción de una alcalosis intracelular ^(11,162,201,202). Como se ha mencionado (pagina 27), trabajando con un buffer más fisiológico como es el bicarbonato, se ha demostrado que la Ang II, no produce cambios en el pH_i ya que activa mecanismos contrapuestos en cuanto a la regulación del mismo ^(11,201). No obstante en estas condiciones (buffer bicarbonato), el efecto inotrópico positivo de la Ang II estuvo presente ⁽¹¹⁾. De este modo, la conclusión de que el incremento del pH_i juega un papel predominante en la determinación del incremento de contractilidad inducido por Ang II no puede generalizarse y debe ser avalada por un incremento del pH_i de magnitud suficiente para explicar una relación causa-efecto. Nuestros hallazgos indican que el efecto inotrópico de la Ang II no está relacionado con cambios del pH_i en miocitos aislados de ventrículo de gato. Esta conclusión está de acuerdo con resultados previos en la misma especie utilizando preparaciones multicelulares ⁽¹¹⁾.

La respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles podría aumentar por un mecanismo independiente del pH_i , por ejemplo por una fosforilación de las cadenas livianas de miosina ⁽⁶⁵⁾ o por acción del IP_3 ⁽¹³⁷⁾. Sin embargo, los experimentos presentes demuestran que la Ang II no produce aumentos de la respuesta al Ca^{2+} ni por vías pH -dependientes ni independientes. Los resultados revelaron que aumentos similares de contractilidad producidos tanto por administración de Ang II como por un incremento del Ca^{2+}_o se asocian con similares incrementos en el Ca^{2+}_i (figura 25 y 26). Estos resultados, junto con aquellos obtenidos con el análisis de los diagramas en fase plana del acortamiento celular vs. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (figura 24) medidos ya sea en el pico del efecto inotrópico positivo de la Ang II o cuando este efecto alcanza su nivel de estabilización, indican que, en el ventrículo de gato, la Ang II no produce cambios en la respuesta de los miofilamentos al Ca^{2+} y que, al menos en esta especie, el efecto inotrópico positivo inducido por la Ang II está enteramente determinado por cambios en el Ca^{2+}_i .

Mecanismos subcelulares del incremento del Ca^{2+} intracelular

Experimentos recientes en corazón de conejo han sugerido que el NCX puede representar el principal mecanismo por el cual el Ca^{2+} aumenta luego de administrar Ang II ⁽²⁰³⁾. Como se mencionó al plantear el estado actual del problema, la posible contribución del NCX al efecto inotrópico positivo de la Ang II ha sido sugerida también por varios autores ^(153,154). Además, ha sido demostrado en experimentos in vitro que la Ang II activa directamente al NCX ⁽⁶⁷⁾. Sin embargo, los resultados expuestos en el presente trabajo niegan una participación significativa del NCX en el incremento del Ca^{2+} inducido por $1\mu\text{M}$ de Ang II debido a las siguientes razones: (1) no se detectaron cambios significativos del pH_i en el momento en que el efecto inotrópico positivo de la Ang II alcanzó su valor máximo; (2) la presencia de HOE no modificó el efecto inotrópico positivo de la Ang II; y (3) el efecto inotrópico positivo y el incremento del Ca^{2+} inducido por la Ang II a una concentración máxima, estuvieron preservados en presencia del bloqueante específico del modo revertido del NCX.

La liberación de Ca^{2+} del RS mediada por IP_3 en el acoplamiento éxcito-contráctil cardíaco es aún, como ya se ha mencionado, muy controvertida (pagina 21). La Ang II es una molécula que podría producir su efecto sobre la contractilidad miocárdica mediado por la producción de IP_3 debido a que se ha documentado la correlación entre el efecto inotrópico positivo y el aumento del metabolismo de los fosfoinosítidos ⁽¹²⁴⁾. El 2-APB, es una nueva herramienta experimental para el estudio de los receptores de IP_3 ^(198,199), y se ha demostrado que una concentración de $5\mu\text{M}$ es suficiente para bloquear la liberación de Ca^{2+} del RS inducida por IP_3 en miocitos aislados ⁽²⁰⁸⁾. Los experimentos del presente trabajo demostraron que ni esta concentración de 2-APB ni una 10 veces mayor del inhibidor (capaz de bloquear más del 90% de la contractura inducida por fenilefrina en aorta de gato) fue capaz de afectar el aumento del *transient* de Ca^{2+} ni el efecto inotrópico positivo de la Ang II. La incapacidad de la rianodina y la tapsigarguina de prevenir el efecto inotrópico positivo de la Ang II no debe ser tomado como evidencia de que la liberación de Ca^{2+} del RS no contribuye normalmente al aumento del inotropismo de la hormona. Sin embargo, los presentes resultados demostraron que la presencia de un RS funcional no es necesaria para que la Ang II desarrolle una típica respuesta inotrópica positiva. Estos resultados concuerdan con los de Kentish y colaboradores ⁽¹³⁷⁾ quienes, como se comentó en la introducción, a pesar de haber encontrado una respuesta contráctil con "caged" IP_3 concluyeron que la liberación de

Ca^{2+} por IP_3 del RS no juega un papel significativo en el acoplamiento excito-contráctil del músculo cardíaco.

Debido a que los presentes experimentos excluyen al NCX funcionando en modo revertido y al RS en el aumento del Ca^{2+}_i y el consecuente efecto inotrópico positivo de la Ang II, y a que el incremento del Ca^{2+}_i sería realmente el responsable de este efecto, cabe sugerir que un aumento de la I_{Ca} sería la determinante del fenómeno observado. El incremento en la I_{Ca} inducido por Ang II en miocitos cardíacos ha sido detectado en algunos pero no en todos los estudios previos. De hecho se ha encontrado que la I_{Ca} estaba aumentada ^(4,146,147), no cambiaba ^(8,149) o aparecía disminuida en presencia de Ang II ⁽¹⁴⁸⁾. La razón de estas discrepancias no es clara. Podría deberse, al menos en parte, a las diversas especies utilizadas y/o a las diferentes técnicas empleadas para medir la I_{Ca} . El presente estudio nos permite sugerir a la I_{Ca} como mecanismo responsable del efecto inotrópico positivo inducido por la Ang II, en concordancia con los trabajos en los cuales se demuestra un aumento de la I_{Ca} inducida por la Ang II, entre ellos, un reciente estudio de nuestro laboratorio ⁽²⁰⁴⁾. Este estudio conecta además el aumento de la I_{Ca} inducido por el péptido con la activación de la PKC. Sin embargo, no podemos excluir como mediador del aumento del Ca^{2+}_i al modo directo del NCX. Debido a que la Ang II prolonga la duración del potencial de acción ^(4,158), este hecho podría disminuir el eflujo de Ca^{2+} a través del NCX funcionando en modo directo y de esta manera aumentar el Ca^{2+}_i . La prolongación de la duración del potencial de acción, al mantener el potencial de membrana por un período mayor a valores superiores a los 40 mV, haría que el NCX funcione menos tiempo en modo directo, produciendo así el efecto descrito. Esto mismo también podría ocurrir a nivel de los canales de Ca^{2+} de tipo L. Es decir, la duración del potencial de acción prolongada aumentaría el tiempo en que la I_{Ca} estaría activada.

Por otra parte, la supresión del efecto inotrópico positivo (figura 18) con los inhibidores de la PKC, calfoestina C (CC) y celeritrina (CHE), indican que es la activación de la PKC y no el IP_3 el segundo mensajero involucrado en el efecto inotrópico positivo de la Ang II. La CC, es un inhibidor que interactúa con el dominio regulatorio de la PKC e inhibe a la enzima por competición con el DG a nivel del sitio de unión de los ésteres de forbol ⁽²⁰⁵⁾, en tanto que la CHE interactúa con el dominio catalítico de la PKC, comportándose como un inhibidor competitivo de sustrato y como un inhibidor no competitivo para el ATP ⁽²⁰⁶⁾. El hecho de que se hayan obtenido resultados similares con dos inhibidores estructuralmente diferentes y químicamente no relacionados de la

PKC permite descartar que la inhibición de los efectos de la Ang II sean debidos a una acción inespecífica de estos inhibidores.

EFEECTO LUSITROPICO NEGATIVO

Los mecanismos subcelulares y la cascada de señales del efecto antirrelajante de la Ang II no han sido nunca considerados. Este efecto no es una consecuencia directa del aumento de la contractilidad producida por el péptido, ya que un efecto inotrópico positivo de magnitud similar producido por un aumento del Ca^{2+}_o , en músculos papilares, no fue capaz de mimetizar el incremento del $t_{1/2}$ o de la relación +T/-T observado con Ang II. Además, en miocitos aislados contrayéndose isotónicamente, usando el mismo protocolo, se detectó el efecto lusitrópico negativo de la hormona a través de una prolongación de la caída del *transient* de Ca^{2+} con respecto a la caída del mismo en condiciones de alto Ca^{2+}_o .

Los resultados presentados nos permiten señalar a la PKC como el segundo mensajero involucrado en el efecto lusitrópico negativo inducido por la Ang II. Respecto a los mecanismos que estarían determinando el efecto antirrelajante del péptido, se ha visto con anterioridad, como se comentó en la introducción, que un aumento de la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles dependiente del pH_i contribuía al efecto antirrelajante de la estimulación α -adrenérgica ⁽¹⁶⁷⁾, quien comparte la misma cascada de señales que la Ang II. Sin embargo, éste no parece ser el mecanismo responsable del efecto antirrelajante de la Ang II ya que no sólo no afecta el pH_i en el miocardio de gato contrayéndose en una solución de bicarbonato ⁽¹¹⁾, sino que además el efecto lusitrópico negativo de la hormona siguió estando presente aún en presencia de un inhibidor del intercambiador Na^+/H^+ en una solución de HEPES, en donde la Ang II aumenta leve, pero significativamente, el pH_i una vez alcanzado el estado estable del efecto inotrópico positivo. Pero lo más destacable es, como se demostró para el efecto inotrópico positivo, que la Ang II no modifica la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos a los diferentes tiempos estudiados. No obstante, el efecto lusitrópico negativo del péptido se mantiene presente.

Otra posibilidad para explicar el efecto antirrelajante inducido por la Ang II es un retardo en la retoma de Ca^{2+} por el RS, lo que demoraría la caída del *transient* de Ca^{2+} y, de esta manera, la relajación mecánica. Si bien en experimentos *in vitro* hay un trabajo que avala la menor retoma de Ca^{2+} por el RS ⁽¹⁵⁷⁾, los datos referentes al efecto

de la PKC son contradictorios e indican que la PKC no actúa sobre la retoma de Ca^{2+} por el RS o la aumenta ⁽¹⁵⁵⁻¹⁵⁷⁾. Sin embargo, los presentes experimentos, en donde aún en ausencia de un RS funcional, el efecto lusitrópico negativo producido por la Ang II estuvo presente, nos permite sugerir que un retardo en la retoma de Ca^{2+} por el RS dependiente de la PKC no parecería ser el mecanismo por medio del cual la Ang II ejerce su acción antirrelajante en el ventrículo de gato. Por otro lado, un posible mecanismo que debe ser considerado para explicar este fenómeno es la prolongación de la duración del potencial de acción inducida por la Ang II. El aumento de la duración del potencial de acción, que ha sido previamente descrito ^(4,158), produciría una mayor permanencia del Ca^{2+} en la célula, produciendo un efecto antirrelajante, por una disminución del eflujo de Ca^{2+} a través del NCX funcionando en modo directo y/o por un aumento en el influjo del ion debido a una mayor actividad del modo revertido del intercambiador. Esta última posibilidad fue descartada, ya que el efecto lusitrópico negativo de la Ang II no se modificó en presencia de una concentración de KB-R7943 que bloquea selectivamente el modo revertido del NCX.

En resumen, el presente trabajo revela los mecanismos responsables del efecto inotrópico positivo y lusitrópico negativo de la Ang II. Habiéndose examinado los distintos eventos del AEC en presencia de Ang II y estudiado los pasos de señalización intracelular involucrados en el efecto inotrópico positivo y antirrelajante de la hormona, los resultados presentados demuestran por primera vez que en el miocardio de gato el efecto inotrópico positivo inducido por Ang II está mediado exclusivamente por un incremento en el Ca^{2+} intracelular a través de la activación de la PKC y que este fenómeno está asociado con una acción antirrelajante. El efecto lusitrópico negativo de la hormona sería también mediado por la activación del mismo segundo mensajero y podría atribuirse a una reducción en el eflujo de Ca^{2+} a través del modo directo del NCX debido a la prolongación de la duración del potencial de acción. Sin embargo, la prolongación de la duración del potencial de acción podría aumentar el tiempo que los canales de Ca^{2+} de tipo L permanecen abiertos, lo que aumentaría la entrada al citosol del ion.

BIBLIOGRAFIA

1. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA and Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* 1993; **45**: 205-251.
2. Koch-Weser J. Nature of the inotropic action of angiotensin II on ventricular myocardium. *Circ. Res.* 1965; **16**: 230-237.
3. Drimal J and Boska D. Effects of angiotensin-II on myocardial mechanics and contractile state of heart muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 1973; **21**: 130-138.
4. Kass RS and Blair ML. Effects of angiotensin II on membrane current in cardiac Purkinje fibers. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1981; **13**: 797-809.
5. Baker KM and Aceto JA. Characterization of avian angiotensin II cardiac receptors: coupling to mechanical activity and phosphoinositide metabolism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1989; **21**: 375-382.
6. Moravec CS, Schluchter MD, Paranandi L, Czerska B, Stewart RW, Rosenkranz E and Bond M. Inotropic effects of angiotensin II on human cardiac muscle in vitro. *Circulation.* 1990; **82**: 1973-1984.
7. Capasso JM, Li P, Zhang X, Meggs LG and Anversa P. Alterations in Ang II responsiveness in left and right myocardium after infarction-induced heart failure in rats. *Am. J. Physiol.* 1993; **264**: H2056-2067.
8. Ikenouchi I, Barry WH, Bridge JHB, Weiberg EO, Apstein CS and Lorell H. Effects of Angiotensin II on intracellular Ca^{2+} and pH in isolated rabbit hearts and myocytes loaded with the indicator indo-1. *J. Physiol.* 1994; **480**: 203-215.
9. Ishihata A and Endoh M. Species-related differences in inotropic effects of angiotensin II in mammalian ventricular muscle: receptors, subtypes and phosphoinositide hydrolysis. *Br. J. Pharmacol.* 1995; **114**: 447-453.
10. Ito N, Kagaya Y, Weinberg EO, Barry WH and Lorell BH. Endothelin and angiotensin II stimulation of Na^+-H^+ exchange is impaired in cardiac hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 1997; **99**: 125-35.
11. Mattiazzi A, Pérez NG, Vila-Petroff MG, Alvarez BV, Camilión de Hurtado MC and Cingolani HE. Dissociation between the positive and alkalinizing effects of angiotensin II in feline myocardium. *Am. J. Physiol.* 1997; **272**: H1131-H1136.
12. Holubarsch C, Hassenfuss G, Schmidt-Schweda S, Knorr A, Pieske B, Ruf T, Fasol R and 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.* 1993; **88**: 1228-37.

13. Aceto JF and Baker KM. [Sar1] angiotensin II receptor-mediated stimulation of protein synthesis in chick heart cells. *Am. J. Physiol.* 1990; **258**: H806-H813.
14. Fleming S. Malignant hypertension - the role of the paracrine renin-angiotensin system. *J. Pathol.* 2000; **192**: 135-139.
15. Wilson DP, Saward L, Zahradka P and Cheung PK. Angiotensin II receptor antagonists prevent neointimal proliferation in a porcine coronary artery organ culture model. *Cardiovasc. Res.* 1999; **42**: 761-772.
16. CONSENSUS. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. *N. Engl. J. Med.* 1987; **316**:1429-1435.
17. Langer GA. Heart: excitation-contraction coupling. *Ann. Rev. Physiol.* 1973, **35**: 55.
18. Hess P, Lasman JP and Tsien RW. Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations: Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. *J. Gen. Physiol.* 1986; **88**: 293-319.
19. Solaro RJ, Wise RM, Shiner JS and Briggs FN. Calcium requirements for cardiac myofibrillar activation. *Circ. Res.* 1974; **34**: 525-30.
20. Fabiato A. Myoplasmic free calcium concentration reached during the twitch of an intact isolated cardiac cell and during calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned cardiac cell from the adult rat or rabbit ventricle. *J. Gen. Physiol.* 1981; **78**: 457-497.
21. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* 1985, **85**:189-320.
22. Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y and Minamino N. Primary structure of electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature.* 1984; **312**:121-7.
23. Beuckelmann DJ and Wier WG. Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells. *J. Physiol.* 1988 ; **405**: 233-55.
24. Balke CW and Shorofsky SR. Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc. Res.* 1998; **37**:290-299.
25. Nuss HB and Houser SR. Sodium-calcium exchange-mediated contractions in feline ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 1992; **263**: H1161-H1169.
26. Pitts BJ. Stoichiometry of sodium-calcium exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *J. Biol. Chem.* 1979; **254**: 6232-6235.

27. Philipson KD and Nishimoto AY. Stimulation of Na^+ - Ca^{2+} exchange is affected by membrane potential in cardiac sarcolemmal vesicles. *J. Biol. Chem.* 1980; **255**: 6880-6882.
28. Sutko JL, Willerson JT, Templeton GH, Jones LR and Besch HRJr. Ryanodine: Its alterations of cat papillary muscle contractile state and responsiveness to inotropic interventions and a suggested mechanism of action. *J. Phar. Exp. Ther.* 1979; **209**: 37-47.
29. Fleischer S and Inui M. Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1989; **18**: 333-64.
30. Chadwick CC, Saito A and Fleischer S. Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; **87**: 2132-6.
31. Walker JW, Somlyo AV, Goldman YE, Somlyo AP and Trentham DR. Kinetics of smooth and skeletal muscle activation by laser pulse photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature.* 1987; **327**: 249-52.
32. Berridge MJ and Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature.* 1989; **341**: 197-205.
33. Ferris CD, Haganir RL, Supattapone S and Snyder SH. Purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles. *Nature.* 1989; **342**: 87-9.
34. Mignery GA, Sudhof TC, Takei K and De Camilli P. Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature.* 1989; **342**: 192-5.
35. Moschella MC and Marks AR. Inositol 1,4,5-trisphosphato receptor expression in cardiac myocytes. *J. Cell. Biol.* 1993; **120**: 1137-1146.
36. Lesh RE, Nixon GF, Fleischer S, Airey JA, Somlyo AP and Somlyo AV. Localization of ryanodine receptors in smooth muscle. *Circ. Res.* 1998; **82**: 175-85.
37. Nayler WG, Daile P, Chipperfield D and Gan K. Effect of ryanodine on calcium in cardiac muscle. *Am. J. Physiol.* 1970; **9**: 1620-1626.
38. Fairhurst AS and Hasselbach W. Calcium efflux from heavy sarcotubular fraction. Effects of ryanodine, caffeine and magnesium. *Eur. J. Biochem.* 1970; **13**: 504-509.
39. Rousseau E and Meissner G. Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel: activation by caffeine. *Am. J. Physiol.* 1989; **256**: H328-H333.

40. Mitchell MR, Powell T, Terrar DA and Twist VW. Ryanodine prolongs Ca-currents while suppressing contraction in rat ventricular muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 1984; **81**: 13-5.
41. Fabiato A and Fabiato F. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1978; **307**: 491-522.
42. Bers D. Calcium influx and sarcoplasmic reticulum release in cardiac muscle activation during post-rest recovery. *Am. J. Physiol.* 1985; **248**: H366-H381.
43. Katz AM. Excitation-contraction coupling. In *Physiology of the heart.* (ed) AM Katz Raven Press. 1977, pp137-149. New York.
44. Sommer JR and Jonson EA. Ultrastructure of cardiac muscle. In *Handbook of Physiology, Section 2 The Cardiovascular System, Volume 1 The Heart,* (ed) Berne RM, pp113-86. American Physiological Society, Bethesda.
45. El-Saleh SC, Warber KD and Potter JD. The role of tropomyosin-troponin in the regulation of skeletal muscle contraction. *J. Muscle. Res. Cell Motil.* 1986; **7**: 387-404.
46. Rüegg JC. Cardiac contractility: how calcium activates the myofilaments. *Naturwissenschaften.* 1998; **85**: 575-82.
47. Bers D. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ. Res.* 2000; **87**: 275-281.
48. Meissner G. Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 1975; **389**: 51-58.
49. Tada M, Yamada M, Kadoma M, Inui M and Ohmori F. Calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum and phosphorylation of phospholamban. *Mol. Cell. Biochem.* 1982; **46**: 73-95.
50. Tada M, Kirchberger MA and Katz AM. Phosphorylation of 22,000 dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 1975; **250**: 2640-2647.
51. Suzuki T and Wang JH. Stimulation of bovine cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump and blocking of phospholamban phosphorylation and dephosphorylation by a phospholamban monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 1986; **261**: 7018-7023.
52. Hicks MJ, Shigekawa M and Katz AM. Mechanism by which cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase stimulates calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ. Res.* 1979; **44**: 384-391.

53. Kranias EG, Mandel F, Wang T and Schwartz A. Mechanism of the stimulation of calcium dependent adenosine triphosphatase of cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry*. 1980; **19**: 5434-5439.
54. Bilezikjian LM, Kranias EG, Potter JD and Schwartz A. Studies on phosphorylation of canine cardiac sarcoplasmic reticulum by calmodulin-dependent protein kinase. *Circ. Res.* 1981; **49**: 1356-1362.
55. Inui M, Chamberlain BK, Saito A and Fleischer S. The nature of the modulation of Ca^{2+} transport as studied by reconstitution of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 1986; **261**: 1794-1800.
56. Lindemann JP and Watanabe AM. Phosphorylation of phospholamban in intact myocardium. Role of Ca^{2+} -calmodulin-dependent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1985; **260**: 4516-4525.
57. Vittone I, Mundiña C, Chiappe de Cingolani G and Mattiazzi A. cAMP and calcium-dependent mechanisms of phospholamban phosphorylation in intact hearts. *Am. J. Physiol.* 1990; **258**: H318-H325.
58. Vittone I, Mundiña C, Chiappe de Cingolani G and Mattiazzi A. Role of Ca^{2+} -calmodulin dependent phospholamban phosphorylation on the relaxant effect of β -adrenergic agonists. *Mol. Cell. Biochem.* 1993; **124**: 33-42.
59. Cingolani H, Vittone L, Grassi AO and Argel B. Relaxant effect of pharmacological interventions increasing heart cyclic AMP and its protein kinase. *Adv. Myocardiol.* 1982; **3**: 67-75
60. Mac Dougall LK, Jones LR and Cohen P. Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur. J. Biochem.* 1991; **196**: 725-734.
61. Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, Scholz H, Nairn AC and Watanabe AM. Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circ. Res.* 1991; **69**: 1450-1457.
62. Mundiña C, Vittone L, Cingolani H, Orchard R. Effects of acidosis phosphorylation of phospholamban and troponin I in rat cardiac muscle. *Am. J. Physiol.* 1996 **39**: C107-C114.
63. Vittone L, Mundiña-Weilenmann C, Said M and Mattiazzi A. Mechanisms involved in the acidosis enhancement of the isoproterenol-induced phosphorylation of phospholamban in the intact heart. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 9804-9811.

64. Bridge JJHB, Smolley J, Spitzer KW and Chin TK. Voltage dependence of sodium-calcium exchange and the control of calcium extrusion in the heart. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1991; **639**: 34-49.
65. Lee JA and Allen DG. Altering the strength of the heart: basic mechanisms. In *Modulation of Cardiac Calcium Sensitivity. A New Approach to Increasing the Strength of the Heart.* (ed) Oxford University Press. 1993; pp 1-36, Oxford.
66. Yue DT, Marban E and Wier EG. Relationship between force and intracellular $[Ca^{2+}]$ in tetanized mammalian heart muscle. *J. Gen. Physiol.* 1986; **87**: 223-242.
67. Solaro RJ and Rarick HM. Troponin and tropomyosin-proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ. Res.* 1998; **83**: 471-480.
68. London B and Krueger JW. Contraction in voltage-clamped internally perfused single heart cells. *J. Gen. Physiol.* 1986; **88**: 475-505.
69. duBell WH and Houser SR. Voltage and beat dependence of the Ca^{2+} transient in feline ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 1989; **257**: H746-H759.
70. Bassani JW, Yuan W and Bers DM. Fractional SR Ca^{2+} release is regulated by trigger Ca^{2+} and SR Ca content in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 1995; **268**: C1313-9.
71. Han S, Schiefer A and Isenberg G. Ca^{2+} load of guinea-pig ventricular myocytes determines efficacy of brief Ca^{2+} currents as trigger for Ca^{2+} release. *J. Physiol.* 1994; **480**: 411-21.
72. Janczewski AM, Spurgeon HA, Stern MD and Lakatta EG. Effects of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} load on the gain function of Ca^{2+} release by Ca^{2+} current in cardiac cells. *Am. J. Physiol.* 1995; **268**: H916-20.
73. Shannon TR, Ginsburg KS and Bers DM. Potentiation of fractional SR Ca release by total and free intra-SR Ca concentration. *Biophys. J.* 2000; **78**: 334-343.
74. Wilson DL, Morimoto K, Tsuda Y and Brown AM. Interaction between calcium ions and surface charge as it relates to calcium currents. *J. Membr. Biol.* 1983; **72**: 117-130.
75. Lee KS, Marban E and Tsien RW. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J. Physiol.* 1985; **364**: 395-411.
76. Mc Donald TF, Pelzer S, Trautwein W and Pelzer DP. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal and smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* 1994; **74**: 365-507.

77. Brown AM, Kunze DL and Yatani A. The agonist effect of dihydropyridines on Ca²⁺ channels. *Nature*. 1984; **311**: 570-572.
78. Perets T, Blumenstein Y, Shistik E, Lotan I and Dascal N. A potential site of functional modulation by protein kinase A in the cardiac Ca²⁺ channel alpha 1C subunit. *FEBS Lett*. 1996; **384**: 189-192.
79. Allen DG, Cohen NM, Gaa ST, Lederer WJ and Rogers TB. Angiotensin II increases spontaneous contractile frequency and stimulates calcium current in cultured neonatal rat heart myocytes: insights into the underlying biochemical mechanisms *Circ. Res*. 1988; **62**: 524-534.
80. Dosemeci A, Dhallan RS, Cohen NM, Lederer WJ and Rogers TB. Phorbol ester increases calcium current and stimulates the effects of angiotensin II on cultured neonatal rat heart myocytes. *Circ. Res*. 1988; **62**: 347-357.
81. Tseng GN and Boyden PA. Different effects of intracellular Ca and protein kinase C on cardiac T and L Ca currents. *Am. J. Physiol*. 1991; **261**: H364-H379.
82. Lacerda AE, Rampe D and Brown AM. Effects of protein kinase C on cardiac Ca²⁺ channels. *Nature*. 1988; **335**: 249-251.
83. Zuhlke RD and Reuter H. Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the α 1c subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; **95**: 3287-3294.
84. Leblanc N and Hume JR. Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science*. 1990; **248**: 372-6.
85. Bouchard RA, Clark RB and Giles WR. Role of sodium-calcium exchange in activation of contraction in rat ventricle. *J. Physiol*. 1993; **472**: 391-413.
86. Ballard C, Mozaffari M and Schaffer S. Signal transduction mechanism for the stimulation of the sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger by insulin. *Mol. Cell. Biochem*. 1994; **135**: 113-9.
87. Ballard C and Schaffer S. Stimulation of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger by phenylephrine, angiotensin II and endothelin 1. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 1996; **28**: 11-7.
88. Shigematsu S and Arita M. Anoxia depresses sodium-calcium exchange currents in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 1999; **31**: 895-906.
89. Satoh H, Blatter LA and Bers DM. Effects of [Ca²⁺]_i, SR Ca²⁺ load, and rest on Ca²⁺ spark frequency in ventricular myocytes. *Am. J. Physiol*. 1997; **272**: H657-68.

90. Fabiato A. Interactions and feedbacks between sarcolemma and sarcoplasmic reticulum in cardiac excitation-contraction coupling. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 1982; **508**: 16.
91. Kirby MS, Sagara Y, Gaa S, Inesi G, Lederer WJ and Rogers TB. Thapsigargin inhibits contraction and Ca^{2+} transient in cardiac cells by specific inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**: 12545-51.
92. Seidler NW, Jona I, Vegh M and Martonosi A. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 1989; **264**: 17816-23.
93. Rousseau E and Meissner G. Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channel: activation by caffeine. *Am. J. Physiol.* 1989; **256**: H328-33.
94. Allen DG and Kentish JC. The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1985; **17**: 821-840.
95. Fabiato A and Fabiato R. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac skeletal muscle. *J. Physiol.* 1978; **276**: 233-255.
96. Morano I, Bachle-Stolz C, Katus A and Rüegg JC. Increased calcium sensitivity of chemically skinned human atria by myosin light chain kinase. *Basic Res. Cardiol.* 1988; **83**: 350-359.
97. Endoh M and Blinks JR. Actions of sympathomimetic amines on the Ca^{2+} transients and contraction of rabbit myocardium: reciprocal changes in myofibrillar responsiveness to Ca^{2+} mediated through α and β -adrenoceptors. *Circ. Res.* 1988; **62**: 247-265.
98. Mattiazzi A. Positive inotropic effect of angiotensin II. Increases in intracellular Ca^{2+} or changes in myofilament Ca^{2+} responsiveness? *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 1997; **37**: 205-214.
99. Lewin B. Signal transduction. In *Genes VII.* (ed) Oxford University Press 2000, pp 801-834.
100. Hug H and Sarre TF. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem. J.* 1993; **291**: 329-343.
101. Neer EJ and Clapham DE. Roles of G protein subunits in transmembrane signaling. *Nature.* 1988; **333**: 129-134.
102. Clapham DE and Neer EJ. New roles of G protein by-dimers in transmembrane signaling. *Nature.* 1993; **365**: 403-406.

103. Dostal DE, Hunt RA, Kule CE, Bhat GJ, Karoor V, McWhinney CD and Baker KM. Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997; **29**: 2893-902.
104. Lokuta AJ, Cooper C, Gaa ST, Wang HE and Rogers T. Angiotensin II stimulates the release of phospholipid-derived second messengers through multiple receptor subtypes in heart cells. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 4832-4838.
105. Schena M, Mulatero P, Schiavone D, Mengozzi G, Tesio L, Chandussi L and Veglio F. Vasoactive hormones induce nitric oxide synthase mRNA expression and nitric oxide production in human endothelial cells and monocytes. *Am. J. Hypertens.* 1999; **12**: 388-397.
106. Haulica I, Petrescu G, Slatineanu S and Bild W. Current data on the extrarenal renin-angiotensin system. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* 1999; **103**: 25-34.
107. Dzau VJ. Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: evidence, possibilities and hypotheses. *J. Hypertens.* 1989; **7**: 933-936.
108. Lindpaintner K and Ganten D. The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circ. Res.* 1991; **68**: 905-921.
109. Barajas L and Powers K. The structure of the juxtaglomerular apparatus and the control of renin secretion: an update. *J. Hypertension.* 1984; **2**: 3.
110. Cingolani HE, Houssay AB. Control de la presión arterial. En *Fisiología Humana de Houssay. Sección VII Sistema Circulatorio.* (ed) El Ateneo 2000, pp 334-352, Buenos Aires.
111. Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* 1977; **2**: 13-70.
112. Dudley DT, Panek RL, Major TC, Lu GH, Bruns RF, Klinkefus BA, Hodges JC and Weishaar RE. Subclasses of angiotensin II binding sites and their functional significance. *Mol. Pharmacol.* 1990; **38**: 370-377.
113. Whitebread S, Mele M, Kamber B and de Gasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; **163**: 284-291.
114. Chang RS and Lotti VJ. Angiotensin receptor subtypes in rat, rabbit and monkey tissues: relative distribution and species dependency. *Life Sci.* 1991; **49**: 1485-1490.

115. Nozawa Y, Haruno A, Oda N, Yamasaki Y, Matsuura N, Yamada S, Inabe K, Kimura R, Suzuki H and Hoshino T. Angiotensin II receptor subtypes in bovine and human ventricular myocardium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994; **270**: 566-571.
116. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R and Unger T. The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1995; **95**: 651-7.
117. Booz GW and Baker KM. Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension.* 1996; **28**: 635-40.
118. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE and Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; **92**: 10663-7.
119. Bartunek J, Weinberg EO, Tajima M, Rohrbach S and Lorell BH. Angiotensin II type 2 receptor blockade amplifies the early signals of cardiac growth response to angiotensin II in hypertrophied hearts. *Circulation.* 1999; **99**: 22-5
120. 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 and Matsubara H. Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT₂ receptor causes attenuated response to AT₁ receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J. Clin. Invest.* 1998; **101**: 527-35.
121. Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL and Inagami T. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature.* 1995; **377**: 748-50.
122. Gunasegaram S, Haworth RS, Hearse DJ and Avkiran M. Regulation of sarcolemmal Na⁺/H⁺ exchanger activity by angiotensin II in adult rat ventricular myocytes: opposing actions via AT (1) versus AT(2) receptors. *Circ. Res.* 1999; **85**: 919-30.
123. Scott AL, Chang RS, Lotti VJ and , Siegl PK. Cardiac angiotensin receptors: effects of selective angiotensin II receptor antagonists, DUP 753 and PD 121981, in rabbit heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; **261**: 931-935.
124. Ishihata A and Endoh M. Pharmacological characteristics of the positive inotropic effect of angiotensin II in the rabbit ventricular myocardium. *B. J. Pharmacol.* 1993; **108**: 999-1005.

125. Lopez JJ, Lorell BH, Ingelfinger JR, Weinberg EO, Schunkert H, Diamant D and Tang SS. Distribution and function of cardiac angiotensin AT1- and AT2-receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am. J. Physiol.* 1994; **267**: H844-52.
126. Wang L, Eberhard M, Kohler E and Erne P. A specific binding site for angiotensin II (3-8), angiotensin IV, in rabbit cardiac fibroblasts. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 1995; **15**: 517-527..
127. Hanesworth JM, Sardinia MF, Krebs LT, Hall KL and Harding JW. Elucidation of a specific binding site for angiotensin II(3-8), angiotensin IV, in mammalian heart membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993; **266**:1036-1042.
128. Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS and Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature.* 1991; **351**: 233-6.
129. Vites AM and Pappano A. Inositol 1,4,5-trisphosphate releases intracellular Ca^{2+} in permeabilized chick atria. *Am. J. Physiol.* 1990; **258**: H1745-H1752.
130. Kentish JC, Barsotti RJ, Lea TJ, Mulligan IP, Patel JR and Ferenczi MA. Calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum induced by photorelease of calcium or $Ins(1,4,5)P_3$. *Am. J. Physiol.* 1990; **258**: H610-H615.
131. Movsesian MA, Thomas AP, Selak M and Williamson JR. Inositol trisphosphate does not release Ca^{2+} from permeabilized cardiac myocytes and sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 1985; **185**: 328-332.
132. Fabiato A. Two kinds of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1992; **311**: 245-262.
133. Nosek TM, Clein PD and Godt RE. Inositol trisphosphate has no direct effect on the contractile apparatus of skinned cardiac muscles. *Pflügers Arch.* 1990; **417**: 370-4.
134. Kijima Y, Saito A, Jetton TL, Magnuson MA and Fleischer S. Different intracellular localization of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 1993; **268**: 3499-506.
135. Vergara J, Tsien RY and Delay M. Inositol 1,4,5-triphosphate: a possible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985; **82**: 6352-6356.
136. Chilvers ER, Batty IH, Challiss RA, Barnes PJ and Nahorski SR. Determination of mass changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and evidence for agonist-

- stimulated metabolism of inositol 1,4,5-trisphosphate in airway smooth muscle. *Biochem. J.* 1991; **275**: 373-9.
137. Thieleczek R and Heilmeyer LMJr. Inositol 1,4,5-trisphosphate enhances Ca^{2+} -sensitivity of the contractile mechanism of chemically skinned rabbit skeletal muscle fibres. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986; **135**: 662-9.
138. Way KJ, Chou E and King GL. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol. Sci.* 2000; **21**: 181-7.
139. Takahashi T, Ueno H and Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 1999; **18**: 2221-30.
140. Naruse K and King GL. Protein kinase C and myocardial biology and function. *Circ. Res.* 2000; **86**: 1104-6.
141. Mochly-Rosen D, Khaner H and Lopez J. Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; **88**: 3997-4000.
142. Dorn GW, Souroujon MC, Liron T, Chen CH, Gray MO, Zhou HZ, Csukai M, WuG, Lorenz JN and Mochly-Rosen D. Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; **96**: 12798-803.
143. Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 1995; **270**: 28495-8.
144. Kramer BK, Smith TW and Kelly RA. Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes. Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent Na^+H^+ exchanger. *Circ. Res.* 1991; **68**: 269-279.
145. Alvarez BV, Fujinaga J and Casey JR. Molecular basis for angiotensin II-induced increase of chloride/bicarbonate exchange in the myocardium. *Circ. Res.* 2001; **89**: 1246-53.
146. Allen IS, Cohen NM, Dhallan RS, Gaa ST, Lederer WJ and Rogers TB. Angiotensin II increases spontaneous contractile frequency and stimulates calcium current in cultured neonatal rat heart myocytes: insights into the underlying biochemical mechanisms. *Circ. Res.* 1988; **62**: 524-534.
147. Kaibara M, Matiarai S, Yano K and Kameyama M. Involvement of Na^+H^+ antiporter in the regulation of L-type Ca^{2+} channel current by angiotensin II in rabbit ventricular myocytes. *Circ. Res.* 1994; **75**: 1121-1125.

148. Habuchi Y, Lu LL, Morikawa J and Yoshimura M. Angiotensin II inhibition of L-type Ca^{2+} current in sinoatrial node cell of rabbits. *Am. J. Physiol.* 1995; **268**: H1053-H1060.
149. Ai T, Horie M, Obayashi K and Sasayama S. Accentuated antagonism by angiotensin II on guinea-pig cardiac L-type Ca-currents enhanced by beta-adrenergic stimulation. *Pflügers Arch.* 1998; **436**: 168-174.
150. Liu SJ and Kennedy RH. α_1 -Adrenergic activation of L-type Ca current in rat ventricular myocytes: perforated patch-clamp recordings. *Am. J. Physiol.* 1998; **274**: H2203-H2207.
151. Zhang S, Hiraoka M and Hirano Y. Effects of α_1 -adrenergic stimulation on L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1998; **30**: 1955-1965.
152. Talukder MAH and Endoh M. Pharmacological differentiation of synergistic contribution of L-type Ca^{2+} channels and Na^+/H^+ exchange to the positive inotropic effect of phenylephrine, endothelin-3 and angiotensin II in rabbit ventricular myocardium. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1997; **355**: 87-96.
153. Watanabe A and Endoh M. Relationship between the increase in Ca^{2+} transient and contractile force induced by angiotensin II in aequorin-loaded rabbit ventricular myocardium. *Cardiovasc. Res.* 1998; **37**: 524-531.
154. Barry WH, Matsui H, Bridge JH and Spitzer KW. Excitation-contraction coupling in ventricular myocytes: effects of angiotensin II. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995; **382**: 31-39.
155. Movsesian MA, Nishikawa M and Adelstein RS. Phosphorylation of phospholamban by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Stimulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium uptake. *J. Biol. Chem.* 1984; **259**: 8029-8032.
156. Talosi L and Kranias EG. Effect of α -adrenergic stimulation on activation of protein kinase C and phosphorylation of phospholamban in intact rabbit hearts. *Circ. Res.* 1992; **70**: 670-678.
157. Rogers TB, Gaa ST, Massey C and Dosemeci A. Protein kinase C inhibits Ca^{2+} accumulation in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 1990; **265**: 4302-4308.
158. Morita H, Kimura J and Endoh M. Angiotensin II activation of a chloride current in rabbit cardiac myocytes. *J. Physiol.* 1995; **483**: 119-130.
159. Wang JX, Paik G and Morgan JP. Endothelin 1 enhances myofilament Ca^{2+} responsiveness in aequorin-loaded ferret myocardium. *Circ. Res.* 1991; **69**: 582-589.

160. Fabiato A and Fabiato F. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J. Physiol. (Lond)*. 1978; **276**: 233-255.
161. Skolnick RL, Litwin SE, Barry WH and Spitzer KW. Effect of angiotensin II on pH_i , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and contraction in rabbit ventricular myocytes from infarcted hearts. *Am. J. Physiol.* 1998; **275**: H1788-H1797.
162. Camilión de Hurtado MC, Alvarez BV, Pérez NG, Ennis IL and Cingolani HE. Angiotensin II activates Na^+ -independent $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in ventricular myocardium. *Circ. Res.* 1998; **82**: 473-481.
163. Clement O, Puceat M, Walsh MP and Vassort G. Protein kinase C enhances myosin light-chain kinase effects on force development and ATPase activity in rat single skinned cardiac cells. *Biochem. J.* 1992; **285**: 311-317.
164. Puceat M, Clement O, Lechene P, Pelosin JM, Ventura-Clapier R and Vassort G. Neurohormonal control of calcium sensitivity of myofilaments in rat single heart cells. *Circ. Res.* 1990; **67**: 517-524.
165. Venema RC and Kuo JF. Protein kinase C-mediated phosphorylation of troponin I and C-protein in isolated myocardial cells is associated with inhibition of myofibrillar actomyosin MgATPase. *J. Biol. Chem.* 1993; **268**: 2705-2711.
166. Blanchard EM and Solaro RJ. Inhibition of the activation and troponin calcium binding of dog cardiac myofibrils by acidic pH. *Circ. Res.* 1984; **55**: 382-391.
167. Vila Petroff M, Perez G, Alvarez B, Cingolani H. and Mattiazzi A. Mechanism of negative lusitropic effect of α_1 -adrenoceptor stimulation in cat papillary muscles. *Am. J. Physiol.* 1996; **270**: H701-H709.
168. Aiello A, Vila-Petroff MG, Mattiazzi A. and Cingolani HE. Evidences for an electrogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ symport in rat cardiac myocytes. *J. Physiol.* 1998; **512**: 137-148.
169. 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.* 1999; **31**: 1873-1883.
170. Sollott SJ, Ziman BD and Lakatta EG. Novel technique to load indo-1 free acid into single adult cardiac myocytes to assess cytosolic Ca^{2+} . *Am. J. Physiol.* 1992; **262**: H1941-9
171. Bkaily G, Sperelakis N and Doane J. A new method for preparation of isolated single adult myocytes. *Am. J. Physiol.* 1984; **247**: H1018-H1026.

172. 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.* 2000; **279**: H429-36.
173. Powell T. The isolation and characterization of calcium-tolerant myocytes. *Basic Res. Cardiol.* 1985; **80**: 15-18.
174. Zimmerman ANE. Substraat-geïnduceerde contractiliteitsremming en de "calciumparadox" bij het geïsoleerde doorstroomderatte heart. Thesis, Amsterdam. 1965.
175. Thomas AP and Delaville F. The use of fluorescent indicators for measurement of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells. *In Cellular Calcium*. J.G. McCormak and P.H. Cobbold editors. IRL Press, 1988, Oxford. 1-54.
176. Spurgeon HA, Stern MD, Baartz G, Raffaelli S, Hansford RG, Talo A, Lakatta EG and Capogrossi MC. Simultaneous measurements of Ca^{2+} , contraction, and potential in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 1990; **258**: H574-H586.
177. Hougland R. Intracellular ion indicators. *Molecular Probes*, Eugene, OR, USA. Chapter three.
178. Williams DA, Cody SH, Dubbin PN. Introducing and calibrating fluorescent probes in cells and organelles. *Department of Physiology, The University of Melbourne, Australia*. Chapter twenty five.
179. Davis MH, Altschuld RA, Jung DW and Brierley GP. Estimation of intramitochondrial pCa and pH by fura-2 and 2,7-biscarboxyethyl-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF) fluorescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987; **149**: 40-50.
180. Jung DW, Davis MH and Brierley GP. Estimation of matrix pH in isolated heart mitochondria using a fluorescent probe. *Anal. Biochem.* 1989; **178**: 348-354
181. Reers M, Kelly RA and Smith TW. Calcium and proton activities in rat cardiac mitochondria. Effect of matrix environment on behaviour of fluorescent probes. *Biochem. J.* 1989; **257**: 131-42.
182. Blank PS, Silverman HS, Chun OY, Hogue BA, Stern MD, Hansford RG, Lakatta EG, and Capogrossi MC. Cytosolic pH measurements in single cardiac myocytes using carboxy-seminaphthorhodafleur-1. *Am. J. Physiol.* 1992; **263**: H276-H284.

183. Blank PS, Silverman HS, Chung OY, Stern MD, Hansford RG, Lakatta EG and Capogrossi MC. pH measurements in single cardiac myocytes with C.SNARF. *Biophys. J.* 1990; **57**:137A.
184. Spitzer KW and Bridge JHB. pH_i-induced changes in ventricular myocytes length. *Biophys. J.* 1991; **59**: 468A.
185. Grassi de Gende AO, Perez Alzueta AD and Cingolani HE. Effect of isoproterenol on relation between maximal rate of contraction and maximal rate of relaxation. *Am. J. Physiol.* 1977; **2**: H404-H409.
186. Leem CH, Lagadic-Gossmann D and Vaughan-Jones RD. Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte. *J. Physiol.* 1999; **517**: 159-180
187. Boron WF and Weer P. Active proton transport stimulated by CO²/HCO₃⁻, blocked by cyanide. *Nature.* 1976; **259**: 240-1.
188. Sperelakis N. Intracellular pH Regulation. In *Cell Physiology Source Book* . Ed Academic Press. 1998;pp: 293-311. San Diego, California, USA.
189. Vandenberg JI, Metcalfe JC and Grace AA. Intracellular pH recovery during respiratory acidosis in perfused hearts. *Am. J. Physiol.* 1994; **266**: C489-497.
190. Shipolini AI, Yokoyama H, Galiñanes M, Edmonds J, Hearse D and Avkiran M. Na⁺/H⁺ Exchange activity does not contribute to protection by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Circulation.* 1997; **96**: 3617-3625.
191. Bers DM and Berlin JR. Kinetics of [Ca]_i decline in cardiac myocytes depend on peak [Ca]_i. *Am. J. Physiol.* 1995; **268**: C271-7
192. Wang Y, Xu Y, Guth K, and Kerrick G. Troponin C regulates the rate constant for the dissociation of force-generating myosin cross-bridges in cardiac muscle. *J. Muscle Res. Cell Mot.* 1999; **20**: 645-653.
193. Chemla D, Coirault C, Hebert JL and Lecarpentier Y. Mechanics of relaxation of human heart. *NIPS.* 2000; **15**: 78-83.
194. Coudray N, Beregi JP, Lecarpentier Y and Chemla D. Effects of isoproterenol on myocardial relaxation rate: influence of the level of load. *Am. J. Physiol.* 1993; **265**: H1645-H1653.
195. Lecarpentier Y, Chemla D and Riou B. Does load dependence of relaxation differ between left and right cardiac muscle? *Circ. Res.* 1991; **68**: 903-904.

196. Iwamoto T, Watano T and Shigekawa M. A novel isothioureia derivative selectively inhibits the reverse mode of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in cells expressing NCX1. *J. Biol. Chem* 1996; **271**: 22391-22397.
197. Ladilov Y, Haffner S, Balsler-Schafer C, Maxeiner H and Piper H. Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. *Am. J. Physiol.* 1999; **276**: H1868-1876.
198. Gysemberg A, Lemaire S, Piot C, Sportouch C, Richard S, Klöner RA and Przyklenk K. Pharmacological manipulation of $\text{ins}(1,4,5)\text{P}_3$ signaling mimics preconditioning in rabbit heart. *Am. J. Physiol.* 1999; **277**: H2458-H2469.
199. Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T and Mikoshiba K. 2-APB. 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of $\text{ins}(1,4,5)\text{P}_3$ induced Ca^{2+} release. *J. Biochem.* 1997; **122**: 498-505.
200. Dell' Italia L, Meng Q, Barcells E, Wei C, Palmer R, Hageman J, Hankens G and Oparil S. Compartmentalization of angiotensin II generation in the dog heart. Evidence for independent mechanisms in intravascular and interstitial spaces. *J. of Clin. Invest.* 1997, **100**: 253-258.
201. Boron W, Boyarsky G and Ganz M. Regulation of intracellular pH in renal mesangial cells. *Annals. NY Acad. Sci.* 1989; **574**: 321-332.
202. Ganz M, Boyarsky G, Sterzel R and Boron W. Arginine vasopressin enhances pH_i regulation in the presence of HCO_3^- by stimulating three acid-base transport systems. *Nature.* 1989; **337**: 648-651.
203. Fujita S and Endoh M. Influence of a Na^+/H^+ exchange inhibitor, ethylisopropylamiloride, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitor KBR7943 and their combination on the increases in contractility and Ca^{2+} transient induced by angiotensin II in isolated adult rabbit ventricular myocytes *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of pharmacology.* 1999; **360**: 575-584.
204. Aiello E and Cingolani H. Angiotensin II stimulates cardiac L-type Ca^{2+} current by a Ca^{2+} -and protein kinase C-dependent mechanism. *Am. J. Physiol.* 2001; **280**: H1528-H1536.
205. Kobayashi E, Nakano H, Morimoto M and Tomaoki T. Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; **159**: 548-553.

-
206. Herbert JM, Augereau JM, Gleye J and Maffreand JP. Chelerytrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; **172**: 993-999.

RESUMEN

La Angiotensina II (Ang II) produce un efecto inotrópico positivo y lusitrópico negativo en varias especies animales e incluso en el ser humano, cuyos mecanismos subcelulares y segundos mensajeros involucrados no están aclarados.

Con el fin de dilucidar los mecanismos subcelulares y los segundos mensajeros involucrados en los efectos citados se realizaron experimentos en miocitos ventriculares y en músculos papilares de gato. Se utilizaron indicadores sensibles al Ca^{2+}_i y al pH_i con el objetivo de diseccionar si un aumento en el Ca^{2+}_i o un aumento en la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos (dependiente o no de cambios en el pH_i) estaban involucrados en los efectos de la Ang II. A la vez se investigó la cascada de señales involucrada en el efecto inotrópico positivo y lusitrópico negativo de la hormona.

EFFECTO INOTROPICO POSITIVO

- La Ang II ($1\mu\text{M}$) produjo en músculos papilares contrayéndose isométricamente un aumento máximo de la tensión desarrollada entre los 5 y 10 min de aplicada la droga de 196 ± 12.3 % del control. Además, en miocitos aislados se observaron incrementos paralelos en la amplitud de la contracción y del Ca^{2+}_i y una alcalinización intracelular que se desarrolló lentamente. Los máximos incrementos, en las células cardíacas, en la amplitud de la contracción y en la amplitud del Ca^{2+}_i fueron 163 ± 22 y 43 ± 8 % del control, respectivamente, y ocurrieron entre los 5 y los 7 min posteriores a la administración de Ang II, en tanto que el aumento de pH_i (0.06 ± 0.03) se tornó significativo sólo 15 min después del agregado de Ang II. Además, el efecto inotrópico de la Ang II no se modificó por el bloqueo del intercambiador Na^+/H^+ . Estos resultados indican que el efecto inotrópico positivo de la Ang II es independiente de los cambios del pH_i .

- En miocitos aislados, incrementos similares en la contractilidad, producidos tanto por elevaciones en el Ca^{2+} extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) como por la aplicación de Ang II, produjeron similares incrementos en el Ca^{2+} sistólico pico. Estos resultados indican que el efecto inotrópico positivo inducido por la Ang II no puede ser atribuido a un aumento en la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos.
- El efecto inotrópico positivo de la Ang II, en las células cardíacas, no fue modificado ni en presencia de KB-R7943, un bloqueante específico del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, trabajando en modo revertido, ni de rianodina más tapsigarguina, usadas para bloquear la función del retículo sarcoplasmático
- El 2-APB, un bloqueante de los receptores de IP_3 , tampoco logró anular el aumento de contractilidad producido por la hormona. Sin embargo, los inhibidores de proteína kinasa C (PKC), celeritrina y calfofina inhibieron completamente, tanto en miocitos aislados como en músculos papilares, el efecto inotrópico positivo inducido por la Ang II.

EFFECTO LUSITROPICO NEGATIVO

- En miocitos aislados, contrayéndose en condiciones isotónicas el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ produjo una disminución del $t_{1/2}$ del acortamiento (33.9 ± 6.3 msec) que se acompañó con una disminución en el $t_{1/2}$ del *transient* de Ca^{2+} (62.1 ± 15.6 msec). En cambio, para un mismo aumento de la contracción con Ang II, aunque hubo una disminución en el $t_{1/2}$ del acortamiento (28.9 ± 4.9 msec), el $t_{1/2}$ del *transient* no se modificó. Esta "prolongación" relativa del *transient* de Ca^{2+} respecto del alto calcio observada en presencia de Ang II sería la manifestación del efecto lusitropico negativo de la Ang II en condiciones isotónicas.
- En músculos papilares contrayéndose isométricamente, la Ang II produjo una prolongación de la relajación, que se reflejó en un aumento del tiempo hasta la mitad de la relajación ($t_{1/2}$); este efecto no se observó cuando la contractilidad fue

aumentada a valores similares al producido por el péptido por un aumento del Ca^{2+}_o . Estos resultados caracterizan un efecto lusitrópico negativo típico.

- En músculos papilares, en buffer bicarbonato y en buffer HEPES en presencia de un bloqueante específico del intercambiador Na^+/H^+ , el efecto lusitrópico negativo que produce la Ang II no se modificó, aun en ausencia de cambios del pH_i .
- La contribución del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ trabajando en su modo revertido, al efecto antirrelajante de la Ang II, fue descartada por medio de experimentos en los cuales se utilizó un bloqueante del intercambiador en dicho modo, en los cuales el efecto lusitrópico negativo de la Ang II seguía siendo evidente. Además, la exclusión de la SERCA2 y del retículo sarcoplasmático, por medio del uso de rianodina más tapsigarguina, no logró anular el efecto lusitrópico negativo
- El efecto antirrelajante de la Ang II fue anulado por la administración de inhibidores de la PKC.

Estos resultados nos permiten concluir que en el ventrículo de gato, por un lado, el efecto inotrópico positivo inducido por la Ang II 1) es independiente de los cambios de pH_i ; 2) es producido por un aumento en el Ca^{2+}_i sin cambios en la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos; 3) no depende de la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ trabajando en modo revertido; 4) ocurre en ausencia del retículo sarcoplasmático funcional, lo que, sumado al hecho de que no se modifica en presencia del bloqueante de los receptores de IP_3 , permitiría descartar la participación de una liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático inducida por IP_3 en el aumento del Ca^{2+}_i producido por la la hormona y 5) es dependiente de la PKC. Por otro lado, el efecto lusitrópico negativo que se asocia al efecto inotrópico positivo inducido por el péptido, 6) también es independiente de pH_i ; 7) se debe a una mayor permanencia del Ca^{2+} en la célula sin un aumento de la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos, 8) no se debe a una disminución en la retoma de Ca^{2+} por el

retículo sarcoplasmático ni a un aumento del influjo de Ca^{2+} a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; 9) al igual que el efecto inotrópico positivo, depende de la PKC. 10) Sugerimos entonces, que la Ang II modularía la contractilidad y la relajación miocárdica a través de la activación de la PKC y que el aumento en el Ca^{2+}_i inducido por la Ang II se debería fundamentalmente a un mayor influjo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} de tipo L. La prolongación de la relajación producida por el péptido podría deberse a un mayor tiempo del influjo de Ca^{2+} por los canales y/o a una disminución del eflujo de Ca^{2+} por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ funcionando en modo directo.