

LIBERACION DE ENDOTELINA-1 POR ANGIOTENSINA II EN MIOCITOS CARDIACOS AISLADOS

MARIA C. VILLA-ABRILLE**, HORACIO E. CINGOLANI*, CAROLINA D. GARCIAARENA**,
IRENE L. ENNIS*, ERNESTO A. AIELLO*

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata

Resumen Muchos de los efectos de la angiotensina II (Ang II) son mediados en realidad por la acción de endotelina (ET) endógena liberada y/o producida en respuesta a la Ang II. En este trabajo evaluamos la interacción Ang II/ET-1, sus consecuencias en la contractilidad cardíaca y el papel de las especies reactivas del oxígeno (EROs). Se usaron cardiomiocitos aislados de gato. La Ang II, 1 nM, produjo un efecto inotrópico positivo (EIP) de $31.8 \pm 3.8\%$ que fue cancelado por inhibición de los receptores AT₁, de los receptores de ET, del intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE), del modo inverso del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (NCX) o por el secuestro de EROs. La Ang II, 100 nM, produjo un EIP de $70.5 \pm 7.6\%$ que fue cancelado por inhibición de los receptores AT₁ y bloqueado en parte por inhibición de los receptores de ET, del NHE, del modo inverso del NCX o por el secuestro de EROs. La Ang II, 1 nM, incrementó el ARNm de la preproET-1 lo cual fue anulado por el bloqueo de los receptores AT₁. Los resultados permiten concluir que el EIP de la Ang II es debido a la acción de la ET-1 endógena liberada/formada por la Ang II. La ET-1 produce: estimulación del NHE, activación del modo inverso del NCX y un consecuente EIP. Dentro de esta cascada también participarían los EROs.

Palabras clave: angiotensina II, endotelina, intercambiador Na⁺/Ca²⁺, especies reactivas del oxígeno, intercambiador Na⁺/H⁺

Abstract *Angiotensin II-induced endothelin-1 release in cardiac myocytes.* Many of the effects thought to be due to angiotensin II (Ang II) are due to the release/formation of endothelin (ET). We tested whether Ang II elicits its positive inotropic effect (PIE) by the action of endogenous ET-1 and the role played by the reactive oxygen species (ROS) in this mechanism. Experiments were performed in cat isolated ventricular myocytes in which sarcomere shortening (SS) was measured to assess contractility after pharmacological interventions and the effect of Ang II on inotropism were analyzed. Ang II 1 nM increased SS by $31.8 \pm 3.8\%$ ($p < 0.05$). This PIE was cancelled by AT₁ receptor blockade, by ET-1 receptors blockade, by Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) inhibition, by reverse mode Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) blockade or by ROS scavenging. Ang II 100 nM increases SS by $70.5 \pm 7.6\%$ ($p < 0.05$). This PIE was completely abolished by AT₁ receptors blockade and were partially blocked by ET-1 receptors blockade, by NHE inhibition, by reverse mode NCX blockade or by ROS scavenging. Ang II increased preproET-1 mRNA, effect that was blunted by AT₁ receptors blockade. We conclude that Ang II induces (through its AT₁ receptor) release/formation of ET-1, which acting in autocrine fashion on ET receptors of the isolated myocytes increases inotropism through NHE stimulation and NCX reverse mode activation. The participation of ROS is involved in this chain of events.

Key words: angiotensin II, endothelin, Na⁺/Ca²⁺ exchanger, reactive oxygen species, Na⁺/H⁺ exchanger

Evidencias previas indican que ciertos efectos cardiovasculares de la angiotensina II (Ang II) observados tanto *in vitro* como *in vivo*, son debidos en realidad a la acción de la endotelina (ET) endógena liberada y/o formada en respuesta a la Ang II¹⁻¹¹.

Ito y coautores describieron en miocitos cardíacos neonatales de rata la inhibición de la hipertrofia inducida por la Ang II usando inhibidores del receptor ET_A (BQ 123) o oligonucleótidos antisense contra ARNm de preproendotelina¹. Adicionalmente, Liang y Gardner², trabajando también con miocitos neonatales de ratas demostraron que el incremento de la actividad del promotor del gen del péptido natriurético cerebral inducido por Ang II es prevenido bloqueando los receptores ET_A. Por otra parte, el aumento de la presión arterial en rata inducido por la infusión de Ang II fue revertido por un bloqueante de los receptores ET_A, PD155080³, o por un bloqueante de los receptores ET_A y ET_B, Bosentan⁴. En conjunto, esta información sugiere que la Ang II induce

Recibido: 8-XI-2005

Aceptado: 11-IV-2006

* Miembros de la Carrera del Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

** Becarias del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Dirección postal: Dra. María Celeste Villa-Abrille, Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, 60 y 120, 1900 La Plata, Argentina.

Fax: (54-221) 483-4833 e-mail: mcvillaabrille@atlas.med.unlp.edu.ar

la liberación y/o formación de ET que actuando en forma autocrina o paracrina media distintas señales intracelulares.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el nexo existente entre la Ang II y la ET-1 en miocitos cardíacos aislados, sus consecuencias en la contractilidad cardíaca, y el papel que cumplen las especies reactivas del oxígeno (EROs) en dicho nexo.

Materiales y métodos

Aislamiento de los miocitos

Los experimentos se realizaron en miocitos de gato enzimáticamente aislados mediante una técnica descrita anteriormente¹² que involucra la reperfusión de los corazones con colagenasa por el método de Langendorff.

Medida de la longitud de los sarcómeros

Para medir la longitud de sarcómero (LS), las células fueron colocadas en una cámara de perfusión sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon). Se las perfundió continuamente a una velocidad de 1 ml/min con una solución que contenía: (en mM): 5 KCl, 118 NaCl, 1.2 MgSO₄, 0.8 Cl₂Mg, 1.35 Cl₂Ca, 10 glucosa, 20 NaHCO₃, el pH es ajustado en 7.4 burbujando permanentemente con una mezcla gaseosa de CO₂ 5% y O₂ 95%. Los miocitos se estimularon por campo con dos electrodos de platino colocados a cada lado de la cámara de perfusión a una frecuencia de 0.5 Hz. La LS fue registrada utilizando un software específico (Ion Wizard). Mediante una cámara acoplada al microscopio se observan las células y se selecciona una zona en la región media del miocito. El programa determina la LS más frecuente observada en la zona elegida. Esta imagen digitalizada del miocito es analizada online con una transformada de Fourier (Ion Optix). Antes de cada intervención se esperó a que las células estén estabilizadas. Aproximadamente a los 15 minutos tenían la LS en un valor estable. La LS fue medida a 30°C utilizando un sistema que controla la temperatura (TC2, Cell micro controls).

Medida de ARNm por RT-PCR

Para la determinación de preproET-1 por real time RT-PCR, de acuerdo a lo descrito previamente¹³, se utilizó el ARN total aislado (*RNeasy Mini Kit*, Qiagen) de los miocitos y se realizó una transcripción reversa (*Omniscript RT Kit*, Qiagen). El ADNc se sometió a cuantificación relativa mediante PCR en tiempo real (*Bio-Rad, iCycler iQ Real-Time PCR Detection System*) mediante la técnica de *SYBR Green* con *Taq DNA Polymerase (Invitrogen)* y GAPDH como estándar interno. La determinación de la especificidad de los productos y la cuantificación se realizaron a partir del software del equipo (*iCycler IQ OSS, version 3.0a, Bio-Rad*).

Estadística

Los datos se presentan como media \pm error estándar (ES). Las comparaciones fueron hechas por test de t de Student para muestras apareadas o por ANOVA de una vía para muestras apareadas seguido de un test de Student-Newman-Keuls, según corresponda. Un valor de $p < 0.05$ se consideró como significativo estadísticamente.

Resultados

En el panel A de la Fig. 1 se observa el curso en el tiempo de los cambios de la longitud de los sarcómeros de un miocito antes y después de agregar 1 nM de Ang II al medio extracelular. En el panel B se muestra el acortamiento individual de los puntos indicados en el panel A. La Ang II incrementa el acortamiento de los sarcómeros alcanzando el estado estacionario aproximadamente a los 10 minutos. En el panel C se muestra el acortamiento promedio ($n=16$), expresado como % de la longitud inicial, antes (control) y luego de 15 minutos de agregar Ang II, 1 nM, al medio extracelular. La Ang II produjo un efecto inotrópico positivo (EIP) (respecto a la longitud basal) de 31.8 ± 3.8 % ($p < 0.05$).

Dosis mayores de Ang II incrementaron el EIP hasta alcanzar el efecto máximo con 100 nM de Ang II. Por este motivo, en el presente trabajo nos propusimos evaluar y comparar los efectos de 1 y 100 nM de Ang II. En el panel A de la Fig. 2 se muestra el curso en el tiempo del acortamiento de los sarcómeros antes y después de agregar Ang II, 100 nM, al medio extracelular. En el panel B se muestran los trazos individuales de los puntos indicados en el panel A. La Ang II, 100 nM, incrementó el acortamiento un 70.5 ± 7.6 % ($p < 0.05$).

Con el fin de conocer que tipo de receptor de Ang II estaba involucrado en el EIP, se evaluó el acortamiento de los sarcómeros en ambas dosis de Ang II pero en presencia del antagonista de los receptores tipo 1 (AT₁), losartan. En el panel A de la Fig. 3 se observa el acortamiento promedio ($n=4$) en condiciones control y luego de adicionar sucesivamente losartan 1 μ M, y Ang II, 1 nM, (panel A) o 100 nM (panel B) al medio extracelular. El losartan no modificó el acortamiento basal de los sarcómeros pero sí previno el EIP inducido por ambas dosis de Ang II, indicando que el receptor involucrado en el EIP inducido por Ang II es el AT₁.

Para conocer el rol que cumple la ET en el EIP inducido por ambas dosis de Ang II, se midió el efecto de la Ang II sobre el acortamiento de los sarcómeros en células pre-tratadas con un bloqueante de los receptores de ET (bloqueante ET_A y ET_B), TAK044, 1 μ M. En el panel A de la Fig. 4 se observa el promedio del acortamiento en condiciones control y luego de adicionar sucesivamente al medio extracelular TAK044 y Ang II, 1 nM. El TAK044 no modificó el acortamiento basal. El bloqueo por TAK044 previno totalmente el EIP inducido por 1 nM de Ang II, indicando que todo el EIP inducido por esta concentración de Ang II es mediado por la acción de ET endógena liberada por la Ang II. Por otro lado, como puede observarse en el panel B de la Fig. 4, en presencia de TAK044 la Ang II, 100 nM, produce un EIP pero de menor magnitud (aproximadamente 40%) al observado en su ausen-

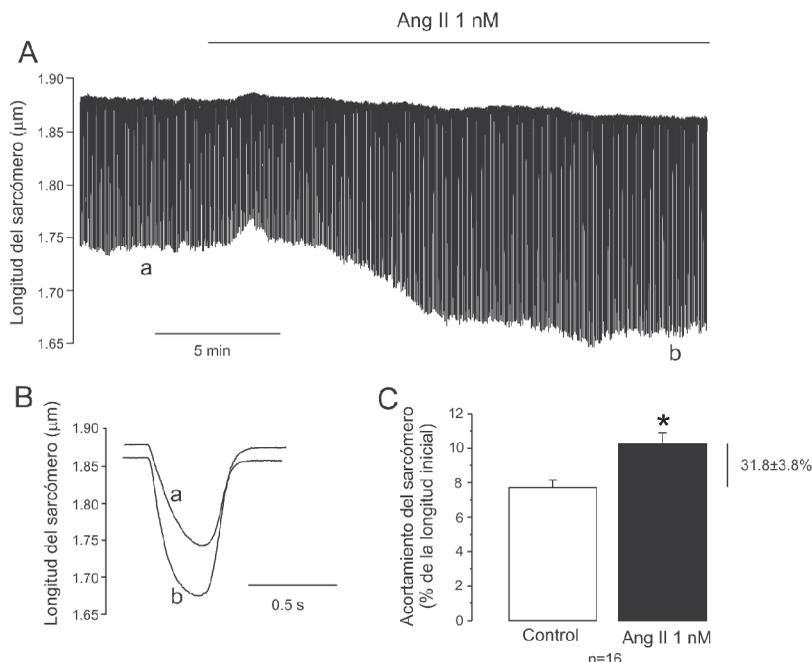


Fig. 1.— Panel A: Registro continuo representativo de la longitud de los sarcómeros de un miocito antes y después de agregar Ang II (1 nM) a la solución extracelular. Panel B: Acortamiento individual de los puntos indicados en el panel A, a: control y b: después de 15 minutos con Ang II (1 nM). Panel C: Promedio del acortamiento de los sarcómeros (AS) expresado como porcentaje de la longitud inicial (%Li), en condiciones control y luego de 15 minutos de Ang II (1 nM). La Ang II produjo un EIP de $31.8 \pm 3.8\%$ ($p < 0.05$, $n = 16$). * indica diferencia significativa respecto al control por test de t para muestras apareadas.

cia (Fig. 2). Estos resultados indican que en el EIP inducido por Ang II, 100 nM, interviene además una vía independiente de ET.

Con el fin de evidenciar si la Ang II induce la formación de ET-1 se midió la expresión del ARNm de la preproET-1 en cardiomiocitos aislados luego de incubarlos 15 minutos con Ang II, 1 nM. En la Fig. 5 se observa cómo el nivel de ARNm de preproET-1 se vio incrementado desde $100 \pm 4\%$ en control ($n = 7$) hasta $267 \pm 45\%$ ($n = 7$) luego de Ang II. Este incremento fue anulado por losartan ($76 \pm 21\%$, $n = 3$).

Hemos demostrado previamente en músculos papilares de gato que el EIP producido por Ang II, 1 nM, es totalmente prevenido por la inhibición del intercambiador Na^+/H^+ (NHE) con el bloqueante selectivo de este transportador, HOE642, y por el bloqueante selectivo del modo inverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), KB-R7943¹⁴. Para evaluar si la estimulación del NHE-1 y del modo inverso del NCX cumplen algún rol en el EIP producido por la Ang II en miocitos aislados, estudiamos el efecto de ambas dosis de Ang II en presencia de 10 mM HOE642 o de 1 µM KB-R7943. En el panel A de la Fig. 6 se observa que en presencia de HOE642 la Ang II, 1 nM, es inca-

paz de producir un incremento en el acortamiento celular. Por otro lado, como se observa en el panel B de esta figura, en presencia de HOE642 la Ang II, 100 nM, produce un EIP de menor magnitud al observado sin el bloqueante, ya que cuando está inhibido el NHE la Ang II incrementa el acortamiento porcentual en aproximadamente un 35%. Por lo tanto, podemos asumir que la activación del NHE está involucrada enteramente en el EIP de la dosis de Ang II más baja utilizada y al menos en parte en el EIP inducido por 100 nM de Ang II.

En el panel C de la Fig. 6, se observa que en presencia del bloqueante del modo inverso del NCX la Ang II, 1 nM, no produce EIP, indicando que la totalidad del EIP inducido por esta concentración de Ang II es mediado por la estimulación del modo inverso del NCX. Por otro lado, en presencia de KB-R7943 (Fig. 6 D) la Ang II, 100 nM, produce un EIP de menor magnitud (aproximadamente 35%) que el observado en ausencia del bloqueante. Por lo tanto, de manera similar al NHE, podemos asumir que el modo inverso del NCX está involucrado en el EIP de la vía autocrina Ang II/ET.

Existe evidencia previa que muestra que la dosis de KB-R7943 utilizada en el presente trabajo bloquea el

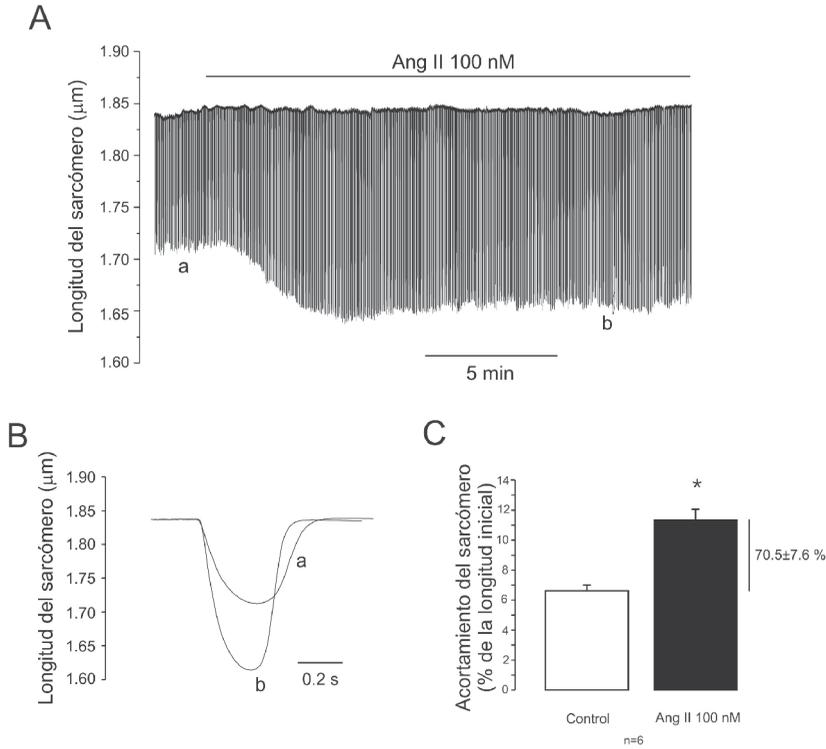


Fig. 2.– Panel A: Registro continuo representativo de la longitud de los sarcómeros de un miocito antes y después de agregar Ang II (100 nM) a la solución extracelular. Panel B: Acortamiento individual de los puntos indicados en el panel A, a: control y b: luego de 15 minutos con Ang II (100 nM). Panel C: Promedio del AS expresado como %Li en condiciones control y luego de 15 minutos de Ang II (100 nM). La Ang II produjo un EIP de $70.5 \pm 7.7\%$ ($p < 0.05$, $n = 6$). * indica diferencia significativa respecto al control por test de t para muestras apareadas.

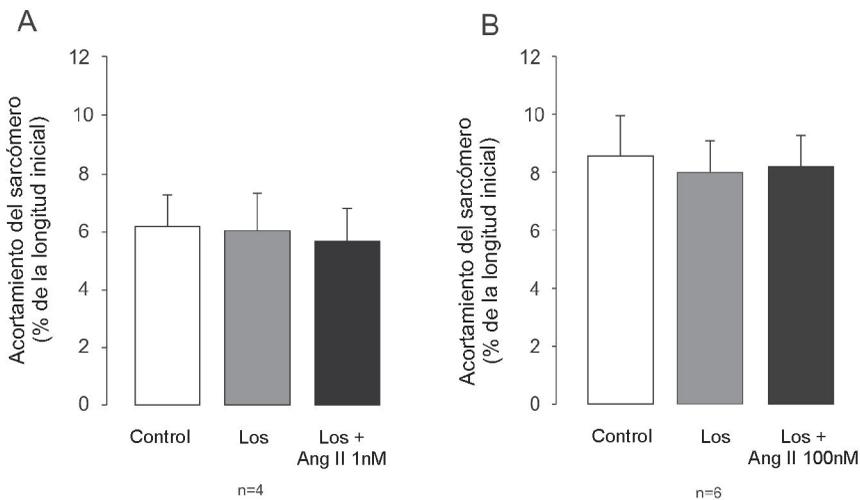


Fig. 3.– Panel A: Promedio del AS ($n = 4$) expresado como %Li en condiciones control y luego de agregar a la solución extracelular sucesivamente losartan 1 µM y Ang II 1 nM + losartan. Panel B: Promedio del AS ($n = 4$) expresado como %Li en condiciones control y luego de agregar a la solución extracelular sucesivamente losartan 1 µM y Ang II 100 nM + losartan (Los).

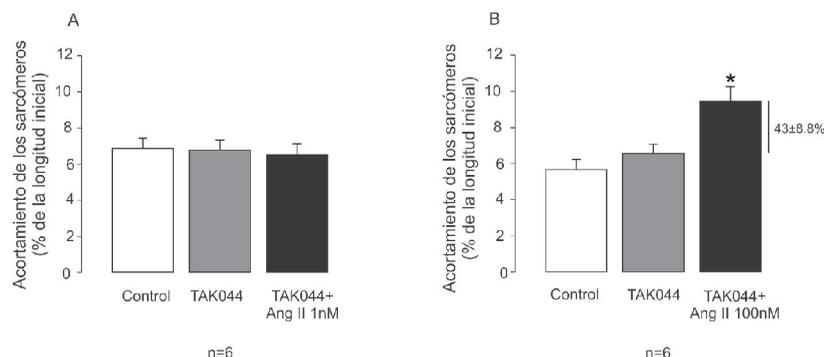


Fig. 4.– Panel A: AS promedio (n=6) expresado como %Li en condiciones control y luego de agregar a la solución extracelular sucesivamente TAK044, 1 μ M, y Ang II, 1 nM + TAK044. TAK044 previno totalmente el EIP inducido por la Ang II, 1 nM. Panel B: Promedio del AS (n=6) expresado como %Li en condiciones control y luego de adicionar a la solución extracelular sucesivamente TAK044, 1 μ M, y Ang II, 100 nM, + TAK044. En presencia de TAK044 la Ang II indujo un EIP de $43.0 \pm 8.8\%$ ($p < 0.05$, n=6). * indica diferencia significativa respecto al control por ANOVA para muestras apareadas.

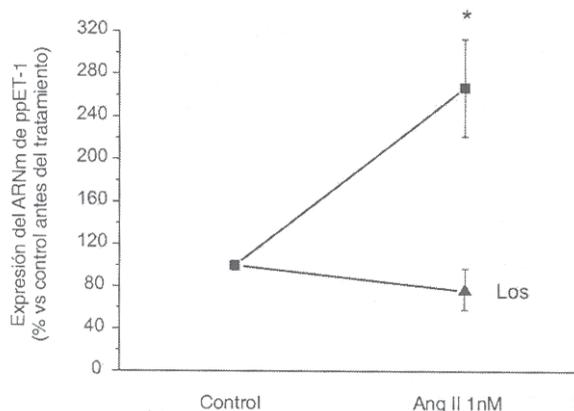


Fig. 5.– Incremento de la expresión del ARNm de la preproET-1 inducido por el tratamiento con Ang II, 1 nM. La expresión del ARNm de la preproET-1 fue incrementada significativamente desde 100 ± 4.8 en control hasta $267.2 \pm 45.6\%$ ($p < 0.05$) luego de incubar las células 15 minutos con Ang II, 1 nM. Este incremento fue anulado cuando las células fueron pretratadas con losartan (Los).

modo inverso del NCX en miocitos cardíacos¹⁵⁻¹⁷. Como puede observarse en la Fig. 6 el KB-R7943 disminuye significativamente el acortamiento basal de los sarcómeros. Este resultado podría deberse a la contribución del modo inverso del NCX a la contracción basal de los miocitos cardíacos de gato o a efectos inespecíficos del KB-R7943. Han sido descriptos diferentes efectos inespecíficos de esta droga, pero a dosis mayores a las

utilizadas en este trabajo^{17, 18}. Sin embargo no podemos descartar completamente que este compuesto actúe a través de un mecanismo diferente del bloqueo del modo inverso del NCX.

Debido a que la producción de EROs por Ang II y/o ET es una acción bien aceptada de estos péptidos^{19, 20-22}, estudiamos los efectos del secuestrador de EROs, MPG (1 mM) sobre el EIP inducido por ambas dosis de Ang II. En el panel A de la Fig. 7 se observa el efecto de la Ang II (1 nM) sobre el acortamiento de los sarcómeros en presencia de MPG. Como puede observarse, el EIP producido por la Ang II (1 nM) fue totalmente cancelado por el pre-tratamiento de los miocitos con este secuestrador de EROs. En el panel B de la Fig. 7 se observa que en presencia de MPG la Ang II (100 nM) produce un EIP pero de menor magnitud que el observado sin este secuestrador, ya que cuando está presente el MPG la Ang II incrementa el acortamiento de los sarcómeros un $30.1 \pm 7.1\%$. Estos resultados indican que las EROs participan de la señalización intracelular de la vía autocrina Ang II/ET, pero no del incremento contráctil inducido por los otros mecanismos presentes a dosis altas de Ang II.

Discusión

En conjunto, nuestros datos muestran que en el cardiomiocito aislado la Ang II, 1 nM, actuando sobre los receptores AT1, produce un EIP a través de la acción autocrina de la ET-1 endógena liberada y/o formada por la Ang II. La estimulación del NHE por la ET-1 es un hecho previamente descrito²³. Esta activación del NHE, al

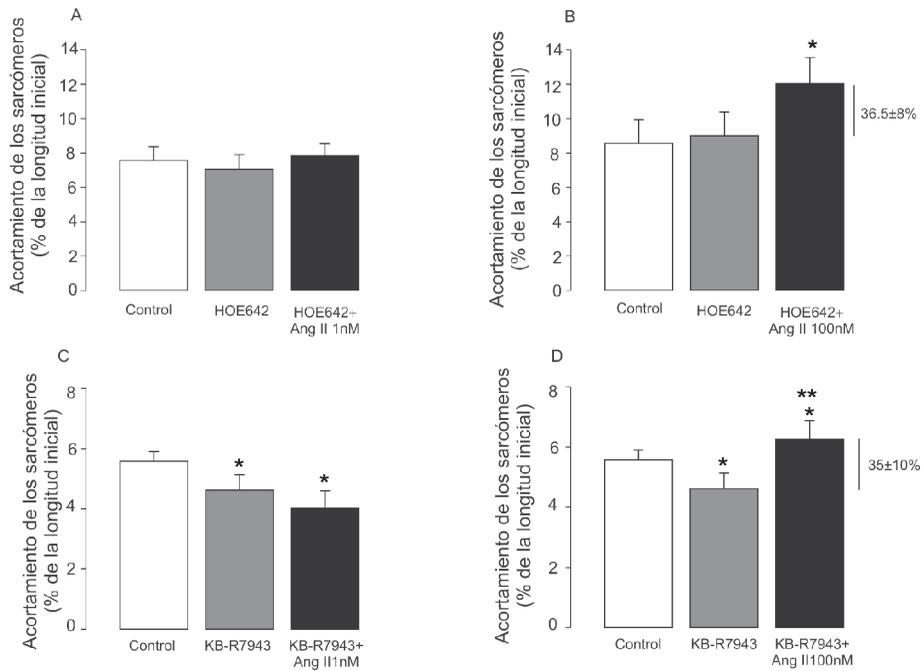


Fig. 6.– Panel A: Promedio del AS (n=5) expresado como %Li en condiciones control y luego de agregar a la solución extracelular sucesivamente HOE642 10 μ M y Ang II 1 nM + HOE642. El bloqueo del NHE previno totalmente el EIP inducido por la Ang II 1 nM. Panel B: Promedio del AS (n=6) expresado como %Li en condiciones control y luego de agregar a la solución extracelular sucesivamente HOE642 10 μ M y Ang II 100 nM + HOE642. El bloqueo del NHE previno parcialmente el EIP inducido por la Ang II 100 nM. El efecto promedio se muestra a la derecha de la barra correspondiente a la Ang II 100 nM. Panel C: Promedio del AS (n=6) expresado como %Li en condiciones control y luego de agregar a la solución extracelular sucesivamente KB-R7943 1 μ M y Ang II 1 nM + KB-R7943. El bloqueo del modo inverso del NCX anuló totalmente el EIP inducido por la Ang II 1 nM. Panel D: Promedio del AS (n=7) expresado como %Li en condiciones control y luego de agregar a la solución extracelular sucesivamente KB-R7943 1 mM y Ang II 100 nM + KB-R7943. En presencia de KB-R7943 la Ang II 100 nM indujo un EIP de 35 \pm 10 % (p<0.05, n=7). * y ** indican diferencia significativa respecto al control y al KB-R7943, respectivamente, por ANOVA para muestras apareadas.

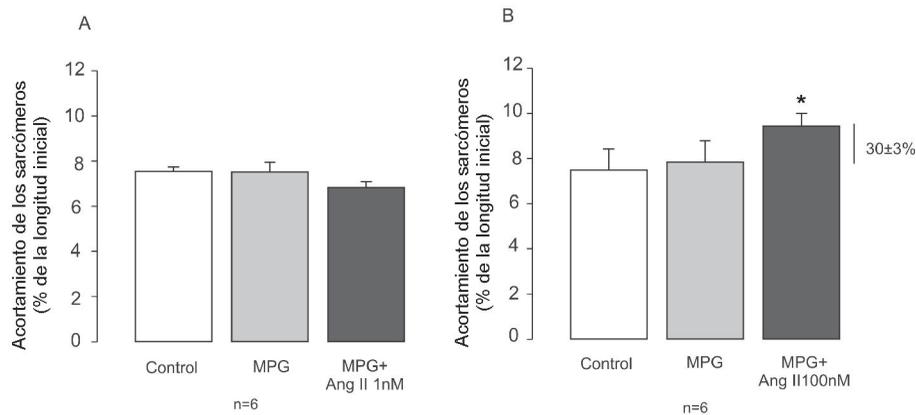


Fig. 7.– Panel A: Promedio del AS (n=6) expresado como %Li en condiciones control y luego de agregar a la solución extracelular sucesivamente MPG 1 μ M y Ang II 1 nM + MPG. El MPG canceló totalmente el EIP inducido por la Ang II 1 nM. Panel B: Promedio del AS (n=6) expresado como %Li en condiciones control y luego de agregar a la solución extracelular sucesivamente MPG 1 mM y Ang II 100 nM + MPG. En presencia del secuestrador de EROs la Ang II 100 nM produjo un EIP de 30.14 \pm 7.14 % (p<0.05, n=6). *indica diferencia significativa respecto al control por ANOVA para muestras apareadas.

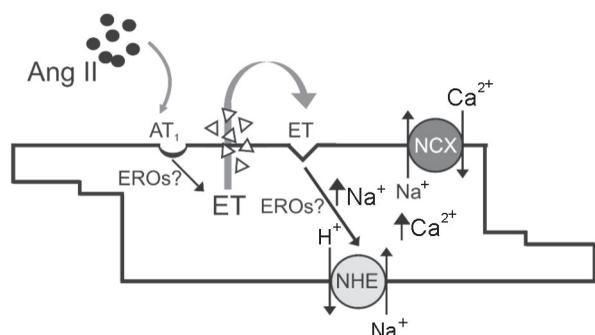


Fig. 8.— Esquema del mecanismo propuesto. La Ang II induce la producción de ET-1 endógena, que actuando de manera autocrina estimula la actividad del NHE, aumentando el Na_i^+ y favoreciendo el modo inverso del NCX con el consecuente aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} y de la contractilidad. Las EROs intervienen en esta cadena de eventos.

aumentar el sodio intracelular (Na_i^+), induce el influjo de Ca^{2+} a la célula a través del NCX actuando en el modo inverso. En la Fig. 8 se esquematiza el mencionado mecanismo. En esta cadena de eventos estarían involucrados también las EROs. Por otro lado, cuando trabajamos con una dosis más alta de Ang II (Ang II 100 nM) encontramos que existe un efecto adicional. El hecho de que el bloqueo de los receptores de ET, del NHE o del modo inverso del NCX disminuyen de manera similar el EIP de la Ang II (100 nM) sugiere que el componente de este EIP disparado por la ET endógena es enteramente debido a la activación del NHE y del modo inverso del NCX. En el presente trabajo no se pretendió evaluar el mecanismo responsable de la fracción del EIP inducido por Ang II (100 nM) no mediada por la activación de la vía Ang II/ET/NHE/modo inverso del NCX. Sin embargo, evidencias previas, sugieren que la activación de la corriente de calcio tipo $\text{L}^{12, 24}$ por Ang II podría ser el mecanismo responsable de la fracción del EIP independiente de ET. Es importante remarcar que las concentraciones de Ang II utilizadas se encuentran dentro del rango utilizado por distintos autores para obtener la respuesta presora lenta de la Ang II²⁵⁻²⁸ y similar al nivel encontrado en el intersticio renal²⁸.

Los experimentos realizados mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real muestran que cuando los miocitos son pre-tratados con 1 nM de Ang II se produce un incremento en el nivel del ARNm de la preproET-1. Estos resultados sugieren que la Ang II aumenta la expresión de ET-1 con el posible fin de restaurar el *pool* intracelular de este péptido que estaría siendo liberado desde el miocito por acción de la Ang II.

La generación de EROs por Ang II y/o ET ha sido involucrada tanto en señales fisiológicas^{19, 29, 30} como patológicas^{4, 27}. Nuestros resultados nos permiten proponer que las EROs están involucrados en el EIP inducido por

la ET-1 endógena liberada por la Ang II, ya que cuando usamos el MPG bloqueamos totalmente el EIP inducido por la Ang II 1 nM y parcialmente el EIP inducido por 100 nM de Ang II hasta un nivel similar a la inhibición producida por TAK044. De acuerdo a nuestras observaciones, no podemos discriminar dónde se ubica la producción de EROs dentro de la cadena de eventos que proponemos. Es decir, no sabemos si las EROs están antes o después de la activación de los receptores de ET. Un estudio reciente realizado por Hong y col.³⁰ en miocitos de músculo liso vascular, sugirió que la Ang II induce la formación de ET-1 a través de la producción de EROs y de la fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK). Por otro lado, Sand y col.¹⁹ demostraron en aurícula de rata que el efecto inotrópico positivo (EIP) de la ET-1 es en parte mediado por EROs. Adicionalmente ha sido descrita la activación del NHE-1 por el peróxido de hidrógeno^{31, 32}. Experimentos adicionales son necesarios para evaluar en qué parte de la cadena de eventos se ubican las EROs.

En músculos papilares de gato ha sido demostrado que la Ang II produce aumento de Na_i^+ y alcalinización secundarias a la activación del NHE, sólo si se trabaja con el *buffer* HEPES (en ausencia de bicarbonato (HCO_3^-))⁵. Por el contrario, cuando se trabaja en presencia del *buffer* fisiológico HCO_3^- , sólo se observa el incremento de Na_i^+ , pues el mecanismo acidificante dependiente de HCO_3^- (intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) también se activa por Ang II y evita el cambio de pH_i ^{6, 33}. Debido a que los experimentos fueron realizados en presencia del *buffer* fisiológico, proponemos que la activación del NHE produce un aumento del Na_i^+ en ausencia de cambios en el pH_i , que consecuentemente favorece el modo inverso del NCX, el influjo de Ca^{2+} y el aumento de la contractilidad.

Los resultados del presente estudio están sustentados por evidencias previas. Se ha descrito, en miocitos cardíacos de conejo, que la estimulación del modo inverso del NCX por Ang II³⁴ produce un EIP. Por otro lado ha sido demostrado que el EIP inducido por Ang II (1 nM) en músculos papilares de gato es totalmente cancelado por inhibición de los receptores de ET o del NCX¹⁴.

En resumen, hemos demostrado que una parte significativa del EIP de la Ang II es mediado a través de la liberación de ET-1 del miocito, la cual actuando en forma autocrina estimula el NHE-1 y al modo inverso del NCX, induciendo el EIP. Las EROs por mecanismos aún no aclarados intervienen en esta cadena de eventos, dado que su neutralización cancela este efecto.

Bibliografía

1. Ito H, Hirata Y, Adachi S, et al. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1993; 92: 398-403.

2. Liang F, Gardner DG. Autocrine/paracrine determinants of strain-activated brain natriuretic peptide gene expression in cultured cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1998; 273(23): 14612-9.
3. Rajagopalan S, Laursen JB, Borthayre A, et al. Role for endothelin-1 in Angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 1997; 30: 29-34.
4. Ortiz MC, Sanabria E, Manriquez MC, Romero JC, Juncos LA. Role of endothelin and isoprostanes in slow pressor responses to angiotensin II. *Hypertension* 2001; 37: 505-510.
5. Cingolani HE, Alvarez BV, Ennis IL, Camili6n de Hurtado MC. Stretch-induced alkalization of feline papillary muscle. An autocrine-paracrine system. *Circ Res* 1998; 83: 775-80.
6. Camili6n de Hurtado MC, Alvarez BV, Ennis IL, Cingolani HE. Stimulation of myocardial Na⁺-independent Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger by angiotensin II is mediated by endogenous endothelin. *Circ Res* 2000; 86: 622-62.
7. Chua BH, Chua CC, Diglio CA, Siu BB. Regulation of endothelin-1 mRNA by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1178: 201-6.
8. P6rez NG, Camili6n de Hurtado MC, Cingolani HE. Reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchange after myocardial stretch. Underlying mechanism of the slow force response. *Circ Res* 2001; 88: 376-82.
9. Fujisaki H, Ito H, Hirata Y, et al. Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J Clin Invest* 1995; 96: 1059-65.
10. Muller DN, Mullally A, Dechend R, et al. Endothelin-converting enzyme inhibition ameliorates angiotensin II-induced cardiac damage. *Hypertension* 2002; 40: 840-6.
11. Seccia TM, Belloni AS, Kreutz R, et al. Cardiac fibrosis occurs early and involves endothelin and AT-1 receptors in hypertension due to endogenous angiotensin II. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 666-73.
12. Aiello EA, Cingolani HE. Angiotensin II stimulates cardiac L-type Ca²⁺ current by a Ca²⁺- and protein kinase C-dependent mechanism. *Am J Physiol* 2001; 280: H1528-36.
13. Ennis IL, Garciarena CD, Perez NG, Dulce RA, Camili6n de Hurtado MC, Cingolani HE. Endothelin isoforms and the response to myocardial stretch. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H2925-30.
14. P6rez NG, Villa-Abri1le MC, Aiello EA, Dulce RA, Cingolani HE, Camili6n de Hurtado MC. A low dose of angiotensin II increases inotropism through activation of reverse Na⁺/Ca²⁺ exchange by endothelin release. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 589-97.
15. Vila Petroff MG, Palomeque J, Mattiazzi AR. Na(+)-Ca2+ exchange function underlying contraction frequency inotropy in the cat myocardium. *J Physiol* 2003; 550 (Pt 3): 801-17.
16. Satoh H, Ginsburg KS, Qing K, Terada H, Hayashi H, Bers DM. KB-R7943 block of Ca²⁺ influx via Na⁺/Ca²⁺ exchange does not alter twitches or glycoside inotropy but prevents Ca²⁺ overload in rat ventricular myocytes. *Circulation* 2000; 101: 1441-6.
17. Hobai IA, O'Rourke B. The potential of Na⁺/Ca²⁺ exchange blockers in the treatment of cardiac disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2004; 13: 653-64.
18. Watano T, Kimura J, Morita T, Nakanishi H. A novel antagonist, No. 7943, of the Na⁺/Ca²⁺ exchange current in guinea-pig cardiac ventricular cells. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 555-63.
19. Sand C, Peters SL, Pfaffendorf M, van Zwieten PA. The influence of endogenously generated reactive oxygen species on the inotropic and chronotropic effects of adrenoceptor and ET-receptor stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003; 367: 635-9.
20. Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, et al. Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide. *Hypertension* 2005; 45: 438-44.
21. Xu FP, Chen MS, Wang YZ, et al. Leptin induces hypertrophy via endothelin-1-reactive oxygen species pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation* 2004; 110:1269-75.
22. Chen SC, Cheng JJ, Hsieh MH, et al. Molecular mechanism of the inhibitory effect of trilinolein on endothelin-1-induced hypertrophy of cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Planta Med* 2005; 71: 525-9.
23. Kramer BK, Smith TW, Kelly RA. Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes. Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent Na(+)-H+ exchanger. *Circ Res* 1991; 68: 269-79.
24. Vila Petroff MG, Aiello EA, Palomeque J, Salas M, Mattiazzi A. Subcellular mechanisms of the positive inotropic effect of angiotensin II in cat myocardium. *J Physiol* 2000; 529.1: 189-203.
25. Romero JC, Reckelhoff JF. State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension* 1999; 34(4 Pt 2): 943-9.
26. Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K, Roberts LJ 2nd, Morrow JD, Romero JC. Suppressor doses of angiotensin II increase plasma F(2)-isoprostanes in rats. *Hypertension* 2000; 35(1 Pt 2): 476-9.
27. Ortiz MC, Manriquez MC, Romero JC, Juncos LA. Antioxidants block angiotensin II-induced increases in blood pressure and endothelin. *Hypertension* 2001; 38 (3 Pt 2): 655-9.
28. Reckelhoff JF, Romero JC. Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: R893-912.
29. de Groot AA, van Zwieten PA, Peters SL. Involvement of reactive oxygen species in angiotensin II-induced vasoconstriction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43: 154-9.
30. Hong HJ, Chan P, Liu JC, et al. Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 159-68.
31. Snabaitis AK, Hearse DJ, Avkiran M. Regulation of sarcolemmal Na⁺/H⁺ exchange by hydrogen peroxide in adult rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 470-80.
32. Wei S, Rothstein EC, Fliegel L, Dell'Italia LJ, Lucchesi PA. Differential MAP kinase activation and Na⁺/H⁺ exchanger phosphorylation by H₂O₂ in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 2001; 281: C1542-50.
33. Alvarez BV, P6rez NG, Ennis IL, Camili6n de Hurtado MC, Cingolani HE. Mechanisms underlying the increase in force and calcium transient that follows stretch of cardiac muscle: A possible explanation of the Anrep effect. *Circ Res* 1999; 85: 716-22.
34. Fujita S, Endoh M. Influence of a Na⁺-H⁺ exchange inhibitor ethylisopropylamiloride, a Na⁺-Ca²⁺ exchange inhibitor KB-R7943 and their combination on the increases in contractility and Ca²⁺ transient induced by angiotensin II in isolated adult rabbit ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 360: 575-84.