CONFERENCIA TAQUINI

¿DE QUÉ ES CULPABLE EL INTERCAMBIADOR NA+/H+ EN CARDIOLOGÍA?

HORACIO E. CINGOLANI*, NÉSTOR G. PÉREZ* y MARÍA C. CAMILIÓN DE HURTADO*

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 60 y 120 S/N, 1900 La Plata, Argentina

El pH intracelular (pH) miocárdico, en condiciones extracelulares normales, es de aproximadamente 7,2. Si calculamos cual debería ser el pH, estando la concentración de H+ ([H+]]) a ambos lados de la membrana celular en equilibrio electroquímico, obtendríamos un valor de aproximadamente 6,2. Es decir que la [H+], debería ser aproximadamente 10 veces mayor que la determinada. El pH no alcanza estos valores tan bajos debido a que existen mecanismos en el sarcolema que expulsan H⁺ desde el interior celular hacia el espacio extracelular. El principal de estos mecanismos es el intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE) que intercambia un ión Na⁺ extracelular por un ión H+ intracelular. Este transportador usa la energía del gradiente de Na⁺ entre los compartimentos extra e intracelular, gradiente que está determinado principalmente por la actividad de la bomba Na⁺/K⁺ ATP dependiente. La alteración de dicho gradiente modifica la función del NHE, por ejemplo, pasar de una relación normal de concentraciones extra e intracelulares de Na⁺ a una disminución de este gradiente como consecuencia de un aumento de Na⁺ intracelular, determinará una disminución de la actividad del NHE. Por el contrario un aumento del gradiente por aumentar el Na⁺ extracelular o disminuir el Na⁺ intracelular aumentará su actividad. Pero ya veremos que hay otros mecanismos, además del gradiente de Na⁺, que alteran su actividad.

En ausencia de bicarbonato en el medio, el NHE es el único mecanismo que regula el pH_i. Pareciera que esta observación no debiera hacerse porque en condiciones fisiológicas siempre está presente el sistema CO₂/HCO₃⁻, sin embargo, la bibliografía experimental abunda en publicaciones en las cuales se utilizan buffers orgánicos como el HEPES. Las causas del reemplazo del CO_2/HCO_3^- pueden encontrarse en las dificultades en obtener mezclas gaseosas exactas, la necesidad de burbujear los medios y la gran permeabilidad del CO_2 , que se escapa frecuentemente a través de plásticos, especialmente las gomas siliconadas, tal como fuera expresado por R.C.Thomas en una carta a Nature en el año 1989¹. Por esto y por otras cosas que abordaremos después es necesaria esta observación.

En condiciones fisiológicas entonces, existen en la membrana celular por lo menos tres mecanismos reguladores del pH miocárdico, dos alcalinizantes y uno acidificante del medio intracelular. Los dos alcalinizantes son el NHE y el cotransporte Na⁺/HCO₃⁻ (NBC) y el acidificante es el intercambiador aniónico Cl⁻/HCO₂⁻ Na⁺ independiente (AE). La Figura 1 ilustra los tres mecanismos. Aunque no se ilustra en este dibujo, recientemente se ha descripto un intercambiador Cl⁻/OH⁻ que expulsa OH⁻ intracelular en intercambio con Cl⁻ extracelular². Como es evidente, solo el que nos interesa, el NHE, es independiente de la presencia de bicarbonato y por lo tanto es el único que opera en ausencia de éste. El pH miocárdico no es sin embargo muy diferente en ausencia y en presencia de bicarbonato. Las causas serían: 1) que el NHE toma a su cargo el transporte que haría el NBC y 2) que el AE sólo ejerce un papel importante como regulador en alcalosis intracelular.

El NHE, se activa dramáticamente con la acidosis intracelular, en tanto que su actividad es mínima en condiciones normales (pH_i ~7,2). Se ha dicho erróneamente que su actividad es nula en condiciones basales, sin embargo, existe una mínima actividad basal destinada a eliminar el exceso de protones que se generan como producto del metabolismo celular más aquellos que ingresan a través de la membrana celular. La permeabilidad de la membrana celular al H⁺ no es baja, pero dado el escaso gradiente existente, más las condiciones de potencial de membrana en reposo, pH intra y extracelular y capacidad buffer (β), el flujo de H⁺ por esta vía es escaso (~0.02-0.03 unidades de pH / hora)³.

^{*}Miembros de la Carrera del Investigador Científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

Dirección postal: Dr. Horacio E. Cingolani, Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 60 y 120, 1900 La Plata, Argentina.

FAX: (54-221) 425-5861 e-mail:cicme@atlas.med.unlp.edu.ar



Fig. 1.– Esquema ilustrativo de los tres principales mecanismos reguladores del pH_i que existen en el miocárdico. Dos de ellos son alcalinizantes, el NHE y el NBC y el tercero es acidificante, el AE. Aunque no se ilustra en este dibujo, recientemente se ha descripto un intercambiador Cl/OH que expulsa OH⁻ en intercambio con Cl⁻. Solo el NHE es independiente de bicarbonato y por lo tanto es el único que opera en ausencia de este. (Modificado de *Fisiología Humana de Houssay*, de Cingolani y Houssay, Ed. El Ateneo, pág. 488, edición año 2000)

La hiperactividad del NHE ha sido estudiada en diferentes patologías cardiovasculares, siendo menos conocida las causas motivadas por su hipofunción. Esto es lógico si pensamos que en condiciones basales su actividad es muy limitada. La hiperactividad del NHE puede ser detectada (como pareciera obvio), por dos alteraciones intracelulares que es capaz de generar: 1) el aumento de la concentración intracelular de Na⁺ ([Na⁺]_i) y 2) por la disminución de la [H⁺]_i. Sin embargo, estas dos consecuencias de la hiperactividad del NHE pueden estar amortiguadas, en el caso del Na⁺, por la actividad de la bomba Na⁺/K⁺ ATP dependiente y en el caso del pH por la capacidad buffer (β) del tejido.

La manera más adecuada de evaluar la función del NHE es medir el flujo de H⁺ a través del sarcolema luego de una carga ácida (para activarlo). Conociendo la β del tejido se puede demostrar que la velocidad con la que se recupera el pH_i (dpH_i/dt), y que constituye un índice de su actividad, es igual al flujo de H⁺ (J_H) por la β

$$dpH_i/dt = J_H \cdot \beta$$

y por lo tanto

$$J_{\rm H} = (dpH_{\rm i} / dt) \ . \ \beta$$

Tras la carga ácida, la recuperación del pH_i se hará solo a través del NHE si no existe bicarbonato en el medio, o por intermedio de éste y el NBC en el caso de existir bicarbonato. Lo interesante es que no existiendo bicarbonato en el medio, el NHE será capaz de tomar la función de ambos y que ambos sistemas son Na⁺ dependientes. Lo que es también interesante es que esa hiperactividad de uno o los dos sistemas alcalinizantes que es compensada por el AE (acidificante), amortiguará el aumento del pH_i pero, dado que el AE no transporta Na⁺, no evitará el aumento intracelular de este ión.

La Figura 2, panel A sirve de ejemplo para ilustrar los cambios que se producen cuando se exponen las células miocárdicas a una solución que contenga CO₂ y HCO₃: el CO₂ difunde rápidamente al citoplasma (a), donde se hidrata y se disocia para formar HCO3 Y H+ (b), el HCO3 sale de la célula de acuerdo a su gradiente electroquímico (c) y vuelve a combinarse con H⁺ para cerrar el ciclo (d). La adición de H⁺ al citoplasma provoca acidificación intracelular, esto activa los mecanismos de recuperación de la acidosis (e) y así, la expulsión activa de H⁺ hace retornar el pH a sus valores iniciales, aún cuando se mantenga la presencia de CO₂. El panel B de la Figura 2 muestra datos experimentales de pH, obtenidos luego de una carga ácida en el miocardio de ratas normotensas Wistar Kyoto. Obsérvese la acidificación inicial y la recuperación total al cabo de 30 minutos. El panel C de la Figura 2 muestra otro ejemplo en el cual un trozo de miocardio fue sometido a cargas ácidas pero en este caso los datos se expresaron como J_H en función del pH_i, observándose claramente que el J_H es muy grande a valores de pH, muy ácidos, debido a la intensa actividad de los mecanismos alcalinizantes, disminuyendo su magnitud paulatinamente hasta hacerse casi despreciable alrededor del pH 7,10. Es interesante remarcar que la acidificación intracelular y la fuerza contráctil caen y se recuperan con un curso temporal sorprendentemente similares como se ejemplifica en la Figura 3. Esto también ocurre al aumentar la pCO, manteniendo el pH extracelular constante. Es por esto que si cambiamos el medio que irriga al miocardio con dos soluciones de igual pH (7,4) pero distinta pCO₂ (la primera con pCO₂ baja y la segunda con pCO₂ alta), veremos que la contractilidad micárdica sensa el cambio de pH como se observa en la Figura 4⁴. El pasaje de HEPES a bicarbonato de la figura 2 B representa otro ejemplo de acidificación intracelular a pH extracelular constante.

Volviendo al panel C de la Figura 2, se puede observar que la intersección del J_H con las abscisas nos da el valor de pH_i al cual el NHE está detenido (recordemos que en realidad siempre algo trabaja). Este punto se denomina "set point". El "set point" es el pH_i basal o en "steady-state" (equilibrio dinámico en el cual la producción de equivalentes ácidos está exactamente compensada con la expulsión de los mismos) y no difiere mucho según CONFERENCIA



Fig. 2.– Panel A: ejemplo de los cambios que se producen al exponer a las células miocárdicas a una solución que contenga CO₂ y HCO₃⁻. El CO₂ difunde rápidamente al citoplasma (a), donde se hidrata y se disocia para formar HCO₃⁻ y H⁺ (b), el HCO₃⁻ sale de la célula de acuerdo a su gradiente electroquímico (c) y vuelve a combinarse con H⁺ para cerrar el ciclo (d). La adición de H⁺ al citoplasma provoca acidificación intracelular, esto activa los mecanismos de recuperación de la acidosis (e) y así, la expulsión activa de H⁺ hace retornar el pH_i a sus valores iniciales, aún cuando se mantenga la presencia de CO₂. Panel B: datos experimentales de pH_i obtenidos luego de una carga ácida en el miocardio de ratas normotensas Wistar Kyoto. Obsérvese la acidificación inicial y la recuperación total al cabo de 30 minutos. Panel C: J_H en función del pH_i en un trozo de miocardio en el que se generó una carga ácida mediante aumentos de la pCO₂ y se le estudió la recuperación de la acidosis. La intersección del J_H con las abscisas da el valor de pH_i al cual el NHE está detenido (en realidad funcionando mínimamente), este punto se denomina "set point" que es el pH_i basal o en "steady-state", que es un equilibrio dinámico en el cual la producción de equivalentes ácidos y la expulsión de los mismos está compensada. (Paneles B y C: Modificado de Pérez y col. *Circ. Res.* 1995;77:1192-1200)



Fig. 3.– Efecto de la hipercapnia (aumento de pCO₂) sobre el pH₁ y la contractilidad miocárdica. Como es conocido, el CO₂ atraviesa fácilmente la membrana celular y modifica el pH₁, el cual cae abruptamente y luego se recupera. La fuerza contráctil (DP= presión desarrollada) también cae y se recupera con un curso temporal sorprendentemente similar al del pH₁. (Modificado de Cingolani y col. *Am. J. Physiol.* 1990;259: H843-848)



Fig. 4.– Efectos similares a los mostrados en la Figura 3 se pueden lograr mediante aumentos de la pCO₂ manteniendo el pH extracelular constante. Es así que si cambiamos el medio que irriga al miocardio con dos soluciones de igual pH (7,4) pero la segunda con mayor pCO₂, la contractilidad micárdica igualmente cae evidenciando que está sensando el cambio de pH₁ que inevitablemente ocurre (Modificado de Cingolani y col. *Circ. Res.*1970;26:269-278)



Fig. 5.– pH_i basal en ausencia (HEPES) y en presencia de bicarbonato en el miocardio de rata. Se puede observar que no existen diferencias significativas entre los valores de pHi en ambas condiciones, lo cual demuestra que el miocardio es capaz de mantener un pH_i basal estable aún en ausencia de los mecanismos bicarbonato dependientes activos (Modificado de Pérez y col. *Circ. Res.*1995; 7:1192-1200)



Fig. 6.- Esta figura demuestra que el estudio del pH basal puede aportar evidencias de hiperactividad del NHE. El panel A muestra los valores promedio de pH, en ausencia (HEPES) y en presencia de bicarbonato en el miocardio hipertrófico (ratas SHR) y en el normal (ratas WKY). En HEPES, el pH, es significativamente superior en el miocardio hipertrófico que en el normal. Si tenemos en cuenta que en estas condiciones solo el NHE se encuentra activo, este simple resultado se puede tomar como indicativo de una hiperactividad del NHE. El gráfico también muestra que esta diferencia desaparece en buffer bicarbonato. Esto se debe a que el miocardio hipertrófico también tiene hiperactivo al AE, mecanismo acidificante que compensa la hiperactividad del NHE, obteniéndose como balance final un pH, normal o casi normal. En el panel B se muestra un gráfico de Ju en función de pH, calculado durante la recuperación de una carga ácida en el miocardio normal y en el hipertrófico. La distinta intersección de las líneas que representan el Ju con la abscisa indican que el "set point" del NHE está corrido hacia valores más alcalinos en el miocardio hipertrófico (Modificado de Pérez y col. Circ. Res. 1995;77:1192-1200)

exista o no bicarbonato en el medio como se puede observar en la Figura 5. Ya volveremos a hablar sobre el tema.

La hiperactividad del NHE puede ser fácilmente detectada luego de una carga ácida, como mostramos, sin embargo, también es factible de detectarse mediante el pH_i en "steady-state" bajo ciertas condiciones (ausencia de bicarbonato).

En ausencia de bicarbonato el único mecanismo activo es el NHE. La Figura 6, panel A, muestra valores



Cuadro 1. Posibles causas de hiperactividad del NHE.

promedio de pH_i en ausencia (HEPES) y en presencia de buffer bicarbonato en el miocardio hipertrófico (ratas SHR) y en el normal (ratas WKY). Cuando el bicarbonato no está presente en el medio, el pH_i es significativamente superior en el miocardio hipertrófico que en el normal, evidenciando que el "set point" del NHE está corrido hacia valores más alcalinos como se observa en el panel B de la Figura 6⁵. La diferencia en pH_i desaparece en buffer bicarbonato (en sentido estricto, el pH_i continúa siendo algo superior, pero sólo en el orden de las centésimas de unidad de pH). Esto se explica porque el miocardio hipertrófico tiene hiperactivo al AE, mecanismo acidificante que genera como balance final un pH_i normal o casi normal.

La hiperactividad del NHE puede resultar de una mayor expresión de la proteína transportadora y/o por una mayor tasa de intercambio por cada transportador (Cuadro 1). Aunque se ha descripto un mayor contenido de RNA mensajero (RNAm) para el NHE durante el desarrollo de hipertrofia cardíaca en conejos sometidos a estenosis aórtica⁶, existen evidencias firmes que indicarían que algún mecanismo posterior a la síntesis de la proteína, como por ejemplo aumento de la fosforilación, estaría jugando el rol principal⁷. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio apoyan esta última alternativa, dado que el elevado pH_i que en ausencia de bicarbonato caracteriza al miocardio hipertrófico, es normalizado inhibiendo la proteína quinasa C (PKC)⁸.

La figura 7 esquematiza al NHE con sus sitios de regulación. El NHE tiene un sitio que sensa [H⁺]_i, de manera tal que el aumento de este ion activa al intercambiador⁹. El esquema también muestra los sitios probables de fosforilación por PKC¹⁰ o por Ca²⁺-cal-modulina quinasa II¹¹, así como la posibilidad de



Fig. 7.– Esquema del NHE y sus sitios de regulación. El NHE tiene un sitio que sensa [H⁺], de manera tal que el aumento de este ión activa al intercambiador; también puede ser activado por fosforilación, y para ello cuenta con algunos sitios probables de fosforilación por PKC o por Ca²⁺calmodulina quinasa II; puede activarse por pegado directo de Ca²⁺-calmodulina a un sitio específico y también podría hacerlo mediante alguna proteína regulatoria. (Modificado de *Fisiología Humana de Houssay*, de Cingolani y Houssay, Ed. El Ateneo, pág. 488, edición año 2000)

activación por pegado directo de Ca²⁺-calmodulina a un sitio específico¹² y por la acción de alguna proteína reguladora que pudiera mediar la fosforilación¹³. Respecto a esta última, estudios hechos con mutantes del NHE han permitido establecer que es posible encontrar alcalinización en respuesta a factores de crecimiento, luego de eliminar la secuencia aminoacídica 636-815, donde se sitúan la mayor cantidad de sitios probables de fosforilación directa del NHE¹³. Esto ha



Fig. 8.– Efecto de la Ang II sobre el pH, en el miocardio de gato en ausencia (HEPES) y en presencia de bicarbonato. Pese a que la Ang II activa al NHE sólo es capaz de aumentar el pH, en ausencia de bicarbonato, es decir cuando el NHE es el único mecanismo regulador de pH, funcional. Esto se debe a que Ang II también estimula al AE, por lo tanto, si se agrega Ang II en presencia de bicarbonato, la activación simultánea de dos mecanismos de acción opuesta (el NHE y el AE) hace que el pH, no se modifique. (Modificado de Camilión de Hurtado y col. *Circ. Res.* 1998;82:473-481)

hecho pensar en la existencia de una proteína reguladora que se la ha llamado "R" (aún no identificada) que actuaría como intermediario de una vía indirecta de fosforilación del NHE¹³. En tal sentido, también por mutagénesis se ha postulado que "R" se pegaría a la región situada entre los aminoácidos 567-635¹³.

El NHE también se encuentra sujeto a regulación por estímulos α y β adrenérgicos. En tal sentido, se ha descripto que la estimulación α_1 -adrenérgica activa al NHE, mientras que la β lo deprime¹⁴. Sin embargo, es posible establecer ciertas diferencias. Por ejemplo, mientras que la estimulación α_1 y la adrenalina son capaces de estimular al NHE, la noradrenalina no tiene efectos significativos¹⁴. Esto permitiría postular que tal vez la aplicación de noradrenalina activase de modo igual y opuesto a los receptores α_1 y β y, por ende, no exista un efecto neto de la noradrenalina sobre el NHE, mientras que, en la misma línea de pensamiento, se podría postular que la adrenalina tiene un efecto α_1 sobre el NHE mayor que el efecto β .

Luego de esta primera introducción sobre el NHE, abordaremos el comportamiento de este mecanismo en condiciones patológicas.

Efectos de angiotensina II (Ang II) y endotelina (ET) sobre el NHE

El NHE es activado tanto por Ang II¹⁵ como por ET^{16,17}. Respecto a Ang II, la mayoría de sus acciones en el sistema cardiovascular, incluyendo la activación del NHE¹⁵, están mediadas por los receptores tipo 1 de Ang II (AT₁). Los AT₁ pertenecen a una clase de receptores que se caracterizan por poseer siete dominios transmembrana y están acoplados a proteína G. Su activación produce una cascada de eventos que incluyen la estimulación de fosfolipasa C, hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, formación de inositol 1,4,5trifosfato y diacilglicerol y activación de PKC. Es importante destacar que pese a que el NHE tiene un sitio de consenso para la fosforilación por PKC en la posición serina 64818, experimentos de biología molecular han demostrado que el reemplazo de este aminoácido por alanina no reduce significativamente la alcalinización en respuesta a trombina y ésteres de forbol13, lo cual indicaría que PKC no estaría fosforilando de manera directa al NHE, sino probablemente a través de otras quinasas^{13,19}. De cualquier manera, sea cual fuere la vía de activación, es indudable que la Ang II activa al NHE por una vía PKC dependiente, dado que la inhibición de PKC por celeritrina suprime el aumento del pH, que produce la Ang II en un medio sin bicarbonato²⁰.

Es interesante destacar que el aumento de pH_i por Ang Il solo se detecta en ausencia de bicarbonato (Fig. 8), es decir cuando el NHE es el único mecanismo regulador de pH_i funcional. Esto se debe a que Ang II también estimula al AE, por lo tanto, si se agrega Ang II en presencia de buffer bicarbonato, la activación simultánea de un mecanismo alcalinizante (el NHE) y uno acidificante (el AE) hace que el pH_i no se modifique significativamente (Fig. 8)²¹.

En relación a los receptores tipo 2 de Ang II (AT_2) , no está claro el papel que juegan en la regulación de la actividad del NHE, sin embargo, se ha sugerido que

podrían tener un efecto opuesto al de los AT²², es decir inhibitorio del NHE.

Respecto a ET, activa al NHE a través de sus receptores tipo A (ET_A) y parece utilizar la misma ruta post-receptor que la Ang II^{16,17}, es decir mediante activación de PKC. Es interesante destacar por otra parte, que algunos de los efectos cardiovasculares atribuidos a Ang II (entre ellos la estimulación del NHE) podrían estar mediados por la liberación endógena de ET^{23,24,25,26}. En tal sentido, se ha probado que la Ang II estimula la expresión de un precursor de ET llamado pre-pro-ET en diversos tipos celulares incluyendo cardiomiocitos²⁷⁻³⁰; que la hipertrofia de cardiomiocitos de neonatos de rata inducida por Ang II involucra la liberación autocrina/paracrina de ET³⁰⁻³²; y que el bloqueo de los receptores tipo A de ET (ET_A) suprime la respuesta hipertensora al tratamiento crónico con Ang II³³. Por otra parte, experimentos hechos recientemente en nuestro laboratorio, han demostrado que el efecto estimulatorio de Ang II sobre el NHE luego del estiramiento del músculo cardíaco, se debe en realidad a ET endógena liberada de manera autocrina/paracrina, actuando a través de sus receptores ET, (23,24). Más adelante volveremos sobre este último punto. También hemos demostrado que la estimulación del AE por Ang II es mediada por la liberación endógena de ET²⁵.

Hipertensión arterial y NHE

El hecho de que el NHE pueda, además de intercambiar Na⁺ por H⁺, intercambiar Na⁺ por Na⁺ y Na⁺ por Li⁺ hizo técnicamente posible medir en células sanguíneas, previamente cargadas con Li⁺, el intercambio de este ion por Na⁺ extracelular. A pesar de existir opiniones contrarias a aceptar que el NHE es el mismo intercambiador que el que intercambia Na⁺ por Li⁺, existe un dato experimental que apoya que es así. Cuando en ovocitos de rana se obtiene la expresión mediante ingeniería genética de la proteína humana responsable del NHE aparece el intercambio Na⁺/Li⁺ normalmente ausente en estas células³⁴.

El NHE se ha encontrado hiperactivo en diferentes células sanguíneas circulantes (eritrocitos, leucocitos, plaquetas) de seres humanos y animales hipertensos. Pareciera que esta hiperactividad es un fenómeno postraduccional y relacionado con la fosforilación del NHE o de proteínas regulatorias de su actividad. Un experimento sencillo, consistente en observar el efecto de inhibir la actividad de la PKC, apoya esta conclusión ya que luego de la inhibición de esta enzima se suprime la mayor actividad del NHE en plaquetas de pacientes hipertensos así como también la hiperactividad del NHE en las plaquetas y el miocardio de ratas hipertensas espontáneas^{35,36,8}.



Fig. 9.– Valores de pH, en plaquetas de una población de estudiantes jóvenes. Los estudiantes (edad promedio 21 años) se agruparon por los valores de presión arterial en grupos de presión arterial óptima (PAO); presión arterial normal alta (PANA) e hipertensos (HT) de acuerdo a las especificaciones del JNC-V. Las determinaciones se realizaron en ausencia de bicarbonato por lo que el valor del pH, refleja el grado de actividad del NHE. Los jóvenes hipertensos mostraron valores de pH, significativamente más elevados (modificado de De Lena y colab., Medicina 1996;56:161-168.)

Investigadores alemanes demostraron que linfocitos inmortalizados en cultivo mantienen la hiperactividad del NHE sugiriendo que esta alteración sería resultado de un defecto genético primario que llevaría al aumento de actividad y no secundario a la elevación de la presión arterial, habiéndose hallado que tiene aumentada la actividad de las proteínas G sensibles a toxina pertussis³⁷. Es interesante que señalar que midiendo el pH plaquetario en ausencia de bicarbonato en estudiantes de nuestra Facultad de Medicina encontramos que aquellos estudiantes³⁸ cuya presión arterial los ubicaba en el grupo de hipertensos presentaron valores de pH, significativamente más altos que los estudiantes con valores de presión óptima (Fig. 9). Recordemos que otro grupo de investigadores argentinos demostró que el tratamiento con enalapril normalizaba la actividad del NHE de los eritrocitos de pacientes hipertensos esenciales³⁹. En conexión con esto, nosotros comprobamos la normalización de la hiperactividad del NHE en el miocardio hipertrófico de ratas hipertensas luego del tratamiento con enalapril8.

Es atractiva aunque quizás simplista, la teoría de que el aumento de la resistencia periférica que caracteriza a la hipertensión arterial resulte de la contracción del músculo liso vascular de los vasos de resistencia. Es



Fig. 10.– Efecto del estiramiento del músculo cardíaco sobre el pH_i en ausencia de bicarbonato en el medio. El estiramiento dispara un mecanismo autocrino/paracrino de liberación de Ang II y ET, provocando esta última la activación del NHE y el consecuente aumento del pH_i (Control). Es interesante remarcar que el bloqueo del NHE (EIPA) y de los receptores AT₁ para la Ang II (Losartan) y ET_A para ET (BQ 123) no sólo anula el aumento del pH_i en respuesta al estiramiento, confirmando el mecanismo subyacente, sino que convierte el aumento de pH_i en un descenso, lo cual deja planteada la posibilidad de que esto sea mediado a través de los receptores AT₂. (Modificado de Cingolani y col. *Circ Res* 1998;83:775-780)

conocido que el Ca²⁺ intracelular, el complejo Ca²⁺calmodulina y la quinasa de cabeza liviana de la miosina (MLCK) son los factores que determinan la contracción del músculo liso. Una actividad aumentada del NHE podría conducir al aumento intracelular de Na⁺ que secundariamente llevase a un aumento del Ca²⁺ a través del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (NCX). Sin embargo existe la posibilidad que un aumento del Ca²⁺ intracelular active una PKC-Ca²⁺ dependiente y ésto causase el aumento de la actividad del NHE⁴⁰.

Se ha encontrado que la actividad del NHE está también aumentada en los túbulos renales proximales de ratas hipertensas por lo cual se podría explicar el aumento de la reabsorción renal de Na⁺⁴¹ que podría estar participando en la génesis o mantenimiento de la hipertensión.

El estiramiento del músculo cardíaco promueve la liberación de Ang II y ET al intersticio, lo cual provoca un aumento del pH_i (Fig. 10, Control) y un aumento de [Na⁺]_i en ausencia de bicarbonato o sólo un aumento del [Na⁺]_i

en presencia de bicarbonato, debido a la activación del NHE^{23,24}. En ausencia de bicarbonato, el bloqueo del NHE (EIPA 5 μ mol/L) y de los receptores AT₁ para la Ang II (losartan 1 μ mol/L) y ET_Apara ET (BQ 123 300 nmol/L)) convierte el aumento de pH₁ en un descenso (Figura 10, EIPA, Losartan y BQ 123). Existe la posibilidad (aunque no está aún demostrado) que esto sea mediado a través de los receptores AT₂ que no están bloqueados.

En la diabetes mellitus, se han encontrado diferencias en lo que respecta a la actividad del NHE, según se trate del tipo I (insulino-dependiente) o tipo II (insulinoresistente). Se ha descripto que en la diabetes tipo I hay una disminución de la actividad del NHE^{42,43}. La mayor concentración intracelular de Na⁺ encontrada en el miocardio de ratas diabéticas ^{44,45}, podría ser un factor a considerarse, ya que disminuiría el gradiente extraintracelular para ión y por ende, disminuiría la fuerza impulsora para el transporte. Sin embargo, existen evidencias que la menor [Ca²⁺]_i que caracteriza a la cardiomiopatía diabética^{46,47}, sería el factor principal de

716

la disfunción, ya que podría alterar cualquiera de las vías de activación del NHE dependientes de Ca2+ (es decir por pegado directo de Ca2+-calmodulina al NHE o por fosforilación por Ca2+-calmodulina guinasa II). En favor de lo anterior, se ha demostrado que el quelado del Ca2+ intracelular elimina las diferencias de actividad del NHE entre miocitos de ratas diabéticas y normales⁴⁸.

La diabetes de tipo II es una patología que se caracteriza por la resistencia de los tejidos blanco a la insulina y su evolución está íntimamente ligada al desarrollo de obesidad e hipertensión. Se ha demostrado que en células sanguíneas de pacientes con hipertensión y con diabetes tipo II está elevado el Ca2+ citosólico y está aumentada la actividad de PKC y la del NHE⁴⁹. Sin embargo, dada la relación de dependencia mutua entre [Ca2+],, actividad de PKC y actividad del NHE se hace difícil definir si la elevación del [Ca2+], determina la activación de PKC y ésta la activación del NHE o es que el NHE hiperactivo lleva al aumento de [Na+], y secundariamente al aumento de la [Ca2+] a través del NCX y esto activa PKC. Lo cierto es que cualquiera sea el caso, un NHE hiperactivo en conjunto con aumento de [Ca²⁺], y una mayor actividad de la PKC serían los responsables de los efectos tróficos que conducen a la disminución de la luz de los vasos y a la hipertrofia cardíaca en esta patología.

Hipertrofia cardíaca y NHE

La hipertrofia ventricular izquierda (HVI), uno de los factores más importantes de riesgo de morbilidad y mortalidad en pacientes con enfermedad cardiovascular, puede ser consecuencia de la sobrecarga mecánica. Sin embargo, el grado de HVI en pacientes con hipertensión arterial no es uniforme. Por otra parte, se ha observado HVI en sujetos con presión arterial (PA) normal y también que la HVI puede preceder a la elevación de la PA^{50,51}. Estas discordancias entre HVI y niveles de PA, han hecho pensar que otros factores distintos a la elevación de la PA podrían ser los causantes del desarrollo de HVI. En conexión con lo anterior, en 1993 de la Sierra y col. hallaron que el NHE se encontraba hiperactivo en eritrocitos de pacientes hipertensos con HVI⁵² y que la hiperactividad se correlacionaba muy bien con el grado de HVI y no con los niveles de PA. En 1995 experimentos hechos en nuestro laboratorio⁵ y por otros autores⁵³ demostraron la hiperactividad del NHE en corazones hipertróficos de ratas hipertensas espontáneas (SHR). Esta hiperactividad se detecta por el elevado pH, de estos corazones en ausencia de bicarbonato⁵ (véase Fig. 6, panel A). Es interesante destacar que en presencia de bicarbonato, el pH del miocardio hipertrófico es normal debido a que también el AE está hiperactivo. Este mecanismo acidificante compensa la hiperactividad del 717

NHE (véase Fig. 6, panel A) respecto al pH, aunque no lo hace respecto al aumento de [Na⁺]. Si bien nuestros resultados no permiten definir si la hiperactividad del NHE es una característica del animal hipertenso o lo es del miocardio hipertrófico en sí mismo, se puede concluir que un NHE más activo conducirá a un aumento del Na+,. Este aumento de Na⁺, podrá conducir a un aumento del Cat, a través del intercambiador NCX y el incremento de Ca2+, podría actuar como señal de crecimiento celular por activación de PKC y/o protooncogenes⁵⁴.

Antes se dijo que la sobrecarga mecánica podía conducir a la hipertrofia. Resulta tentador establecer vínculos entre hiperactividad del NHE e hipertrofia cardíaca. Por otra parte, se ha demostrado que existe estrecha relación entre estiramiento miocárdico y activación del NHE. En tal sentido, Takewaki y col. demostraron que el estiramiento de miocitos cardíacos conduce a una elevación de los niveles de RNAm del NHE⁶. Experimentos recientes de nuestro laboratorio nos han permitido demostrar que el NHE es activado por esti-



Fig. 11.- Diagrama hipotético de las rutas seguidas por las señales intracelulares que se disparan luego del estiramiento miocárdico. El estiramiento miocárdico induce la liberación de angiotensina II (Ang II), la cual a través de sus receptores AT, activará a la proteína quinasa C (PKC) y esta promoverá la liberación de endotelina (ET). ET, a través de sus receptores ETA, provocará una nueva activación de PKC. PKC fosforila y activa quinasas, alguna de las cuales activará al NHE. Alguna de esas quinasas se translocará al núcleo y allí probablemante fosforilará factores de crecimiento. Dado que las evidencias en favor de este modelo hipotético provienen de preparaciones multicelulares, no se descarta que la ET puede provenir de otros tipos celulares distintos a los cardiomiocitos como las células endoteliales. Este mecanismo constituye un sistema autocrino-paracrino en el cual Ang II y ET son eslabones dentro de la cadena de eventos que dispara el estiramiento miocárdico. (Modificado de Cingolani HE. Cardiov. Res. 1990;44:462-467)



Fig. 12.– Rutas de entrada y salida de Ca²⁺ a la célula. Durante el potencial de acción, la ruta principal de entrada son los canales de Ca²⁺ tipo L, en tanto que una menor cantidad puede ingresar por el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (NCX) operando en modo inverso. El Ca²⁺ sale de la célula por la Ca-ATPasa del sarcolema y por el NCX operando en modo directo. Es interesante destacar que el NCX opera mayoritariamente en modo directo (expulsando Ca²⁺) y que por ende la cantidad de Ca²⁺ que ingresa la célula por el este mecanismo operando en modo inverso es relativamente pequeña en condiciones fisiológicas, sin embargo, el modo inverso puede verse muy favorecido al aumentar la [Na⁺]_i como ocurre durante la isquemia y la reperfusión.

ramiento en el miocardio de gato²³ y en el de rata²⁴ debido a la activación de un mecanismo autocrino/paracrino que involucra la liberación de Ang II, estimulación de receptores AT₁, liberación/aumento de la formación de ET y estimulación de receptores ET_A. Toda esta cadena de eventos conducen a la elevación del Na⁺₁ y consecuentemente del Ca²⁺_i que, como ya se dijo, podría actuar como señal de crecimiento celular⁵⁴. La Figura 11 esquematiza el camino hipotético que seguirían las señales intracelulares que se disparan luego de estirar el miocardio.

Isquemia-Reperfusión y NHE

La interrupción del flujo coronario induce en el miocardio una serie de modificaciones intra y extracelulares que de persistir conducen a lesiones irreversibles. El grado de lesión se relaciona íntimamente con la acumulación de Na⁺ intracelular, alteración constantemente hallada en la isquemia. Durante la isquemia, la célula es forzada a realizar un metabolismo anaeróbico y esto lleva a un aumento de la [H⁺], es decir una disminución del pH_i. Esto activa a los transportadores que regulan el pH_i en especial el NHE, que expulsará H⁺ pero también



Fig. 13.- Efecto de la inhibición del NHE (panel A) y del NCX (Panel B) sobre la función miocárdica luego de un evento isquémico. El tratamiento con bloqueantes del NHE (HOE 642 y EIPA) administrados ya sea antes de la isquemia o en los primeros minutos de la reperfusión, protegen la función miocárdica (panel A). La inhibición del modo inverso del NCX mediante el bloqueante selectivo KB-R7943 también protege al miocardio de la injuria por isquemiareperfusión (Panel B). Este último hallazgo, además de confirmar la participación del NCX en la sobrecarga de Ca2+, prueba que es el modo inverso del NCX el responsable de la misma. +dP/dt_{max}= máxima velocidad de desarrollo de presión ventricular izquierda. D= droga, Is= isquemia, Rep= reperfusión. (Panel A: modificado de Mosca y col. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2000;362:7-13. Panel B: modificado de Mosca y col. enviado a publicar a Medicina)

acumulará Na⁺ en el citosol. Sin embargo, la ausencia de flujo coronario hace que los H⁺ expulsados por el NHE se acumulen en el espacio extracelular, pudiendo esto inhibir al transportador que estaba hiperactivo debido a la acidosis intracelular⁵⁵. Entonces, la actividad del NHE durante la isquemia y por ende la cantidad de Na⁺ intracelular que se acumule, será el resultado del balance entre cuanto lo active la acidosis intracelular y cuanto lo inhiba la acidosis extracelular. Cuando el miocardio se reperfunde, la acidosis extracelular disminuye rápidamente y con ello desaparece la inhibición que pesa sobre el NHE. Dado que la acidosis intracelular persiste, el NHE se hiperactiva generando un mayor aumento de Na⁺ intracelular lo cual conduce a una sobrecarga de Ca2+, a través del NCX. El incremento de Ca2+, a través del NCX puede deberse a una disminución del eflujo de Ca²⁺ debido a un enlentecimiento del modo directo del NCX o por aumento de la entrada de Ca2+ por activación del modo inverso del NCX (Fig.12). Cualquiera sea la causa del aumento de Ca2+, (volveremos sobre este punto más adelante) la sobrecarga de Ca2+ puede llevar a la disfunción contráctil debido a la activación de proteasas dependientes de Ca2+, enzimas capaces de degradar la maquinaria contráctil. En tal sentido se ha demostrado que una de ellas, la calpaína I, es capaz de degradar parcialmente a la proteína contráctil troponina I, durante la reperfusión de corazones de rata que han sido sometidos a un período de isquemia corto pero severo (20 minutos de duración)56.

De lo expuesto, surge que el NHE parece tener una participación fundamental en la injuria por isquemiareperfusión. Esta presunción, ha sido avalada experimentalmente por nosotros mismos y por otros investigadores⁵⁷⁻⁶¹, dado que el tratamiento con bloqueantes del NHE administrados ya sea antes de la isquemia o en los primeros minutos de la reperfusión, son capaces de proteger la función miocárdica (Fig. 13, panel A). El bloqueo del NHE conduciría a una menor acumulación de Na⁺, durante la isquemia y también durante la reperfusión, ya que una recuperación más lenta de la acidosis intracelular al reanudar el flujo coronario, llevaría a una considerable disminución de la sobrecarga de Ca2+. Recientemente se ha demostrado que inhibiendo del modo inverso del NCX mediante el bloqueante selectivo KB-R7943 también se protege al miocardio de la injuria por isquemia-reperfusión (Fig. 13, panel B)62,63, hallazgo que, además de confirmar la participación del NCX en la sobrecarga de Ca2+, prueba que es el modo inverso del NCX el responsable de la misma.

Resulta interesante destacar que los corazones de diabéticos tipo I están dotados de una cierta resistencia a la injuria por isquemia-reperfusión^{43,45,64,65} y esta protección estaría vinculada con la hipofunción del NHE que caracteriza al miocardio diabético.

References

- 1. Thomas RC. Bicarbonate and pH_i response. Nature 1989; 337: 601.
- Sun B, Hun Leem C, Vaughan-Jones RD. Novel chloridedependent acid loader in the guinea-pig ventricular myocyte: part of a dual acid-loading mechanism. J Physiol 1996; 495: 65-82.
- Putnam RW. Basic principles of pH regulation. En: Na⁺/ H⁺ exchange, Editor: Sergio Grinstein, Editorial CRC Press, capítulo 9, pág. 145, año 1987.

- Cingolani HE, Mattiazzi AR, Blesa ES, Gonzalez NC. Contractility in isolated mammalian heart muscle afterr acid-base changes. Circ Res 1970; 26: 269-278.
- Pérez NG, Alvarez BV, Camilión de Hurtado MC, Cingolani HE. pHi regulation in myocardium of the spontaneously hypertensive rat. Compensated enhanced activity of the Na⁺/H⁺ exchanger. Circ Res 1995; 77: 1192-1200.
- Takewaki S, Kuro-o M, Hiroi Y, Yamazaki T, Noguchi T, Miyagishi A, Nakahara K, Aikawa M, Manabe I, Yazaki Y, Nagai R. Activation of Na⁺-H⁺ antiporter (NHE-1) gene expression during growth, hypertrophy and proliferation off the rabbit cardiovascular system. J Mol Cell Cardiol 1995; 27: 729-742.
- Siczkowski M, Davies JE, Ng LL. Sodium-hydrogen antiporter protein in normotensive Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. J Hypertens 1994; 12: 775-781.
- Ennis IL, Alvarez BV, Camilión de Hurtado MC, Cingolani HE. Enalapril induces regression of cardiac hypertrophy and normalization of pH_i regulatory mechanisms. Hypertension 1998; 31: 961-967.
- Paris S, Pouyssegur J. Growth factors activate the Na⁺/ H⁺ antiporter in quiescent fibroblasts by increasing its affinity for intracellular H⁺. J Biol Chem 1984; 259: 10989-10994.
- Sardet C, Counillon L, Franchi A, Pouyssegur J. Growth factors induce phosphorylation of the Na⁺/H⁺ antiporter, glycoprotein of 110 KD. Science 1990; 247: 723-725.
- Fliegel L, Walsh MP, Singh D, Wong C, Barr A. Phosphorylation of the C-terminal of the Na⁺/H⁺ exchanger by Ca²⁺/ calmodulin-dependent protein kinase II. Biochem J 1992; 282: 139-145.
- Huang CL, Cogan MG, Cragoe EJ, Ives HE.Thrombin activation of the Na+/H+ exchanger in vascular smooth muscle cells. Evidence for a kinase C-independent pathway which is Ca²⁺-dependent and pertusis toxinsensitive. J Biol Chem 1987; 262: 14134-14140.
- Wakabayashi S, Bertrand B, Shigekawa M, Fafournoux P, Pouyssegur J. Growth factor activation and "H⁺ sensing" of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1). Evidence for an additional mechanism not requiring direct phosphorylation. J Biol Chem 1994; 269: 5583-5588.
- Lagadic-Gossman D, Vaughan-Jones RD. Coupling of dual acid extrusion in the guinea-pig isolated ventricula myocytes to a1 and β-adrenoceptors. J Physiol 1993; 464: 49-73
- Grace AA, Metcalfe JC, Weissberg PL, Bethell HWL, Vandenberg JI. Angiotensin II stimulates sodium dependent proton extrusion in perfused ferret heart. Am J Physiol 1996; 270: C1687-C1694.
- Kramer BK, Smith TW, Kelly RA. Endothelin and increased contractility in adult rat myocytes. Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase Cdependent Na⁺/H⁺ exchanger. Circ Res 1991; 68: 269-279.
- Ito N, Kagaya Y, Weinberg EO, Barry WH, Lorell BH. Endothelin and angiotensin II stimulation of Na⁺/H⁺ exchange is impaired in cardiac hypertrophy. J Clin Invest 1997; 99: 125-135.
- Sardet C, Franchi A, Pouysségur J. Molecular cloning, primary structure and expression of the human growth factor activatable Na⁺/H⁺ antiporter. Cell 1989; 56: 271-280.
- Moor AN, Fliegel L. Protein kinase-mediated regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger in the rat myocardium by mitogenactivated protein kinase-dependent pathways. J Biol Chem 1999; 274: 22985-22992.
- Camilión de Hurtado MC, Mattiazzi AR, Alvarez BV, Pérez NG, Vila-Petroff, MG, Cingolani HE. Angiotensin II stimulation of Na⁺/H⁺ exchange activity in myocardium is

mediated by protein kinase C. The Physiologist 1996; 39: 135. (abstract).

- Camilión de Hurtado MC, Alvarez BV, Pérez NG, Ennis IL, Cingolani HE. Angiotensin II activates Na⁺-independent Cl⁻-HCO₃⁻ exchange in ventricular myocardium. Circ Res 1998; 82: 473-481.
- Gunasegaram S, Avkiran M. Regulation of sarcolemmal Na⁺/H⁺ exchanger activity by angiotensin II: opposing effects via AT₁ vs AT₂ receptors. Circulation (Suppl) 1997; 96: I-359. (abstract).
- Cingolani HE, Alvarez BV, Ennis IL, Camilión de Hurtado MC. Stretch-induced alkalinization of feline papillary muscle. An autocrine-paracrine system. Circ Res 1998; 83: 775-780.
- Alvarez BV, Pérez NG, Ennis IL, Camilión 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: 716-722.
- Camilión de Hurtado, M.C., B.V. Alvarez, I.L. Ennis and H.E. Cingolani. Stimulation of myiocardial Na⁺-independent Cl⁻HCO₃⁻ exchanger by angiotensin II is mediated by endogenous endothelin. Circ Res 2000; 86: 622-627.
- Rajagopalan S, Laursen JB, Borthayre A, Kurz S, Keiser J, Haleen S, Giaid A, Harrison DG. Role for endothelin-1 in angiotensin II-induced mediated hypertension. Hypertension 1997; 30: 29-34.
- Sung CP, Arleth AJ, Storer BL, Ohlstein EH. Angiotensin type 1 receptors mediate smooth muscle proliferation and endothelin biosynthesis in rat vascular smooth muscle. J Pharmacol Exp Ther 1994; 271: 429-437.
- Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. Hypertension 1992;19: 753-757.
- 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: 398-403.
- Ito H, Hirata Y, Adechi S, Tanaka M, Tsujino M, Kolke A, Nogami A, Maramu F, Hiroe M. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. J Clin Invest 1993; 92: 398-403.
- Yamasaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y. Endothelin-1 is involved in mechanical stressinduced cardiomyocyte hypertrophy. J Biol Chem 1996; 271: 3221-3228.
- Gray MO, Long CS, Li HT, Karliner JS. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta I and endothelin-1 from fibroblasts. Cardiovasc Res 1998; 40: 352-363.
- Pucéat M, Clément O, Vassort G. Extracellular MgATP activates the Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in single rat cardiac cells. J Physiol (Lond) 1996; 495: 65-82.
- Busch S; Burckhardt BC; Siffert W. Expression of the human sodium/proton exchanger NHE-1 in Xenopus laevis oocytes enhances sodium/proton exchange activity and establishes sodium/lithium countertransport. Pflugers Arch 1995; 429(6): 859-69.
- Livne AA, Aharonvitz O, Paran E. Higher Na⁺/H⁺ exchange rate and more alkaline intracellular pH-set point in essential hypertension: effects of protein kinase modulation in platelets. J Hypertens 1991; 9: 1013-1019.
- Gende OA. Chelerythrine inhibits Na/H exchange in platelets from spontaneously hypertensive rats. Hypertension 1996; 28: 1013-1017.

- Rosskopf D, Schröder K-J, Siffert W. Hypertensive sodium-proton exchanger phenotype persists in immortalized lymphoblasts from essential hypertensive patients. a cell culture model for human hypertension. J Clin Invest 1995; 92: 2553-2559.
- De Lena S, Echeverría RF, Escudero E, Gende OA, Cingolani HE. Niveles de presión arterial en jóvenes estudiantes: Corrrelacion con la masa corporal, factores metabólicos y hemodinámicos. Medicina 1996; 56: 161-168.
- Sánchez RA, Gimenez MI, Migliorini M, Giannone C, Ramirez AJ, Weder AB. Erythrocyte sodium-lithium countertransport in nonmodulating offspring and essential hypertensive individuals: response to enalapril. Hypertension 1997; 30: 99-105.
- Rosskopf D, Dusing R, Siffert W. Membrane sodium-proton exchange and primary hypertension. Hypertension 1993; 21: 607-617.
- Kelly MP; Quinn PA; Davies JE; Ng LL. Activity and expression of Na⁺-H⁺ exchanger isoforms 1 and 3 in kidney proximal tubules of hypertensive rats. Circ Res 1997; 80: 853-60.
- Pierce GN, Ramjiawan B, Dhalla NS, Ferrari R. Na⁺-H⁺ exchange in cardiac sarcolemal vesicles isolated from diabetic rats. Am J Physiol 1990; 258: H255-H261.
- Lagadic-Gossman D, Chesnais JM, Feuvray D. Intracellular pH regulation in papillary muscle cells from streptozotocin diabetic rats: anion-sensitive microelectrode study. Pflugers Arch 1988; 412: 613-617.
- Lagadic-Gossman D, Feuvray D. Intracellular sodium activity in papillary muscle from diabetic rat hearts. Exp Physiol 1991; 76: 147-149.
- Imahashi K, Hashimoto K, Yamaguchi H, Nishimura T, Kusuoka H. Alteration of intracellular Na+ during ischemia in diabetic rat hearts: the role of reduced activity in Na⁺/ H⁺ exchange against stunning. J Mol Cell Cardiol 1998; 30: 509-517.
- Noda N, Hayashi H, Suzuki S, Kobayashi K, Yamazaki N. Cytosolic Ca²⁺ concentration and pH of diabetic rat myocytes during metabolic inhibition. J Mol Cell Cardiol 1992; 24: 435-446.
- Lagadic-Gossman D, Buckler KJ, Le Prignet K, Feuvray D. Alteres Ca²⁺ handling in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. Am J Physiol 1996; 270: H1529-H1537.
- Le Prignet K, Lagadic-Gossman D, Feuvray D. Modulation by pH_o and intracellular Ca²⁺ of Na⁺-H⁺ exchange in diabetic rat isolated ventricular myocytes. Circ Res 1997; 80: 253-260.
- Aviv A. The roles of cell Ca²⁺, protein kinase C and the Na⁺-H⁺ antiport in the development of hypertension and insulin resistance. J Am Soc Nephrol 1992; 3: 1049-1063.
- Schunkert H, Hense HW, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keli U, Lorell BH, Riegger GAJ. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy. N Engl J Med 1994; 330: 1634-1638.
- Post WS, Larson MG, Levy D. Impact of left ventricular structure on the incidence of hypertension: the Framingham Heart Study. Circulation 1994; 90: 179-185.
- de la Sierra A, Coca A, Pare JC, Sanchez M, Valls V, Urbano-Marquez A. Erythrocyte ion fluxes in essential hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. Circulation 1993; 88: 1628-1633.
- Schussheim AE, Radda GK. Altered Na⁺/H⁺ exchange activity in the spontaneously hypertensive perfused rat heart. J Mol Cell Cardiol 1995; 27: 1475-1481.
- 54. Marban E, Koretsune Y. Cell calcium, oncogenes and hypertrophy. Hypertension 1990; 15: 652-658.
- 55. Lazdunski M, Frelin C, Vigne P. The sodium/hydrogen

exchange system in cardiac cells: Its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. J Mol Cell Cardiol 1985; 17: 1029-1042

- Gao WD, Atar D, Liu Y, Pérez NG, Murphy AM, Marban E. Role of Troponin I proteolisys in the pathogenesis of stunned myocardium. Circ Res 1997; 80: 393-399.
- Bugge E, Munch-Ellingsen J, Ytrehus K. Reduced infarct size in the rabbit heart in vivo by ethylisopropyl-amiloride. A role for Na⁺/H⁺ exchange. Basic Res Cardiol 1196; 91: 203-209.
- Hendrikx M, Mubagwa K, Verdonck F, Overloop K, Van Hecke P, Vanstapel F, Van Lommel A, Verbeken E, Lauweryns J, Flameng W. New Na⁺-H⁺ exchange inhibitor HOE 694 improves postischemic function and high-energy phosphate resynthesis and reduces Ca²⁺ overload in isolated perfused rabbit heart. Circulation 1994; 89: 2787-2798.
- Scholz W, Albus U, Counillon L, Gogelein H, Lang HJ, Linz W, Weichert A, Scholkens BA. Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. Cardiovasc Res 1995; 29: 260-268.
- 60. Koike A, Akita T, Hotta Y, Takeya K, Kodama I, Murase

M, Abe T, Toyama J. Protective effects of dimethyl amiloride against postischemic myocardial dysfunction in rabbit hearts: phosphorus 31-nuclear magnetic resonance measurements of intracellular pH and cellular energy. J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 112: 765-75.

- Mosca SM, Cingolani HE. Comparison of the protective effects of ischemic precoditioning and Na⁺/H⁺ exchanger blockade. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2000; 362: 7-13.
- Ladilov Y, Haffner S, Balser-Schafer C, Maxeiner H, Piper HM. Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger. Am J Physiol 1999; 276: H1868-H1876.
- Imahashi K, Kusuoka H, Hashimoto K, Yoshioka J, Yamaguchi H, Nishimura T. Intracellular sodium accumulation during ischemia as the substrate for reperfusion injury. Circ Res 1999; 84: 1401-1406.
- 64. Khandoui N, Berbar M, Cozzone P, Feuvray D. Intracellular pH and role of Na⁺/H⁺ exchange during ischemia and reperfusion of normal and diabetic rat hearts. Cardiovasc Res 1990; 24: 873-878.
- Kusama Y, Hearse DJ, Avkiran M. Diabetes and susceptibility to reperfusion-induced arrhytmias. J Mol Cell Cardiol 1992; 24: 411-421.