



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL COTRANSPORTADOR SODIO-
POTASIO-CLORURO EN TEJIDO CARDÍACO DE RATAS SPRAGUE DAWLEY
EN ESTADOS DE HIPERMINERALOCORTICISMO Y DIETA ALTA EN SODIO.

FRANCISCO RAFAEL ROJAS DÍAZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales

PROFESOR GUÍA: DR. RAMÓN MARTÍNEZ P.
SANTIAGO, CHILE

2006

INDICE

INDICE	1
RESUMEN	3
SUMMARY	5
I. INTRODUCCIÓN.....	7
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	8
Mineralocorticoides.	8
Mecanismos de acción.	8
Principales mineralocorticoides.	9
Aldosterona.	10
Modelo clásico de acción de aldosterona.....	11
Mecanismos celulares del modelo clásico.	12
Mecanismo de especificidad en epitelio.	13
Proteínas reguladas por aldosterona de la fase temprana.....	16
Desafíos al modelo corriente de acción de aldosterona.	17
Acciones no genómicas.....	17
Señales de traducción de la actividad no genómica.....	19
Efectores finales de la acción no genómica.	20
Nuevos tejidos blanco de aldosterona.	21
Mineralocorticoides y alteraciones cardiovasculares.....	22
Tejido cardiovascular como blanco de mineralocorticoides.....	25
Homeostasis iónica, sistemas transportadores y mineralocorticoides.	26
Cotransportador $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ (NKCC).	29
Enfermedades cardiovasculares y NKCC1.	31
III. OBJETIVOS.	35
Objetivo general.....	35
Objetivo específico.	35
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
Animales.	36
Registro de presión sistólica.	37
Obtención de tejidos.	38

Procesamiento de las muestras.....	39
Medición de contractilidad de anillos aórticos.	39
Procesamiento de tejido cardíaco.....	40
Extracción de RNA.	40
Electroforesis de RNA.	41
RT-PCR semicuantitativo.	42
Electroforesis de DNA.	45
Preparación de membranas.	45
Detección de NKCC1 mediante Western blot.	46
Análisis estadístico.....	48
V. RESULTADOS.....	49
5.1 Efecto del tratamiento DOCA sal sobre la presión sistólica de las ratas a los 4 y 32 días.	49
5.2 Efectos del tratamiento DOCA sal sobre la hipertrofia cardiaca a los 4, 14 y 32 días.	51
5.3 Valores de contractilidad de anillos aórticos.	52
5.4 Efecto del tratamiento DOCA-sal sobre la abundancia del mRNA NKCC1 en ventrículo izquierdo a los 4 y 32 días.	53
5.5 Efecto del tratamiento DOCA-sal sobre la abundancia de la proteína NKCC1 en ventrículo.	54
VI. DISCUSIÓN.....	55
VII. CONCLUSIONES.....	61
VIII. BIBLIOGRAFÍA	62

RESUMEN

Se sabe que la función principal de los mineralocorticoides es la regulación de los niveles de electrolitos en los líquidos extracelulares. Los órganos blanco clásicos para los mineralocorticoides son los tejidos epiteliales como riñón, colon, glándulas salivales y sudoríparas, donde modulan la actividad de los transportadores iónicos. Sin embargo, estudios recientes han revelado que los mineralocorticoides también actúan directamente sobre células del sistema cardiovascular y están implicados en aumentos de la reactividad, modulación del tono y variaciones en la composición electrolítica de la pared arterial. Aumentos de los niveles plasmáticos de mineralocorticoides, particularmente cuando se combinan con una dieta rica en sodio, producen efectos nocivos en el sistema cardiovascular, hipertensión arterial e insuficiencia cardíaca. La regulación de la expresión de transportadores iónicos podría ser parte del mecanismo implicado en las acciones de los mineralocorticoides en el sistema cardiovascular.

El cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC) media el influjo electroneutro de iones, modulando el volumen, los gradientes iónicos y el potencial de membrana. Se han clonado dos isoformas de NKCC. La isoforma NKCC1 es expresada en forma constitutiva tanto en tejidos epiteliales como no epiteliales. A la fecha, los mecanismos de regulación hormonal de este sistema de transporte en los tejidos cardíaco y vascular son desconocidos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la expresión génica del cotransportador NKCC1 en ventrículo izquierdo de ratas sometidas a una dieta alta en sodio y altos niveles de mineralocorticoides circulantes, y medir cómo esta condición altera parámetros como la presión sistólica y la contractilidad arterial. Para ello se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley separadas en 3 grupos, todos ellos sometidos a una dieta alta en sodio y altos niveles de mineralocorticoides. Para ello se suministró a los grupos experimentales una solución de NaCl al 0,9% adicionada de KCl al 0,3% como bebida, más la administración del mineralocorticoide desoxicorticosterona acetato (DOCA), en dosis de 20 mg totales una vez a la semana por vía subcutánea. Con el objeto de estudiar los efectos del tratamiento en el tiempo, se establecieron grupos de 5 animales diferenciados en 4, 14 y 32 días tras el inicio del experimento. La presión

sistólica se midió utilizando el método del manguito en la cola, con transductor piezoeléctrico. La expresión del RNA mensajero de NKCC1 de ventrículo izquierdo se determinó por RT-PCR semicuantitativo, y la abundancia proteica por *Western Blot*. La contractilidad arterial se evaluó en anillos aórticos, mediante registros de tensión isométrica estimulando con dosis crecientes de fenilefrina. Se evaluó la hipertrofia cardíaca comparando el peso de los ventrículos izquierdos provenientes de los animales de los diversos grupos y sus respectivos controles. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento DOCA sal aumenta significativamente la presión sistólica, la contractilidad arterial y el tamaño del ventrículo izquierdo. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de RNA mensajero de NKCC1 a los 4, 14 y 32 días, sin embargo, se observó un significativo aumento en la abundancia de la proteína NKCC1, la que se manifiesta como un incremento por sobre sus controles a los 4 y 14 días, mientras que a los 32 días vuelve a sus valores normales con respecto a su control de igual número de días.

El presente trabajo aporta nueva evidencia que muestra la regulación positiva en la expresión de NKCC1 cardíaco en respuesta a una dieta rica en sodio y niveles elevados de mineralocorticoides plasmáticos.

SUMMARY

It is known that the main function of the mineralocorticoides is the regulation of the levels of electrolyte in liquid extracellular fluid. The classical target organs for the mineralocorticoids are the non-epithelial as kidney, colon, salivary glands and sweat glands, where they modulate the activity of the ionic turnovers. Nevertheless, recent studies have revealed that the mineralocorticoids also act directly on cells of the cardiovascular system and they are implied in increases of the reactivity, modulation of the tone and variations in the electrolytic composition of the arterial wall. Increases of the plasma mineralocorticoid levels, particularly when they are combined with a rich diet in salt, they produce harmful effects in the cardiovascular system, arterial hypertension and heart failure. The regulation of the expression of ionic conveyors could be part of the mechanism implied in the actions of the mineralocorticoids in the cardiovascular system.

The $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC) cotransporter average the influence electroneutral of ions, modulating the volume, the ionic gradients and the potential of membrane. Two isoforms of NKCC have been cloned. The isoforma NKCC1 is always expressed in epithelial as non-epithelial tissues. Up the date, the mechanisms of hormonal regulation of this system of transportation in the heart tissues and vascular are unknown. The objective of this work was to characterize the gene expression of the cotransportador NKCC1 in left ventricle of rats submitted to a high diet in salt and high levels of circulating mineralocorticoids, and to measure how this condition alters parameters as the systolic pressure and the arterial contractility. Male rats of the Sprague Dawley stump were utilized separated in 3 groups, all they submitted to a high diet in salt and high levels of mineralocorticoids. The experimental groups were supplied with a solution of NaCl 0,9% and KCl 0,3% as beverage, plus the administration of desoxycorticosterone acetate (DOCA), in dose total of 20 mg once a week by subcutaneous injection. With the purpose to study the effects of this condition in time, groups of 5 animals differentiated in 4, 14 and 32 days after the start of the experiment were established. The systolic pressure was measured utilizing the method of the cuff in the tail, with piezoelectric transducer. The expression of the RNA messenger of NKCC1 of left ventricle was determined by semi-quantitative RT-PCR, and the protein abundance by Western Blot. The arterial

contractility was evaluated in aortic rings, by registration of isometric tension stimulating with increasing dose of phenylephrine. The heart hypertrophy was evaluated comparing the weight of the left ventricles originating from the animals of the diverse models and their respective controls. The results obtained show that the DOCA salt treatment enlarges significantly the systolic pressure, the arterial contractility and the size of the left ventricle. There were not found significant differences in the expression of RNA messenger of NKCC1 in the 4, 14 and 32 days groups, nevertheless, a significant increase in the abundance of the NKCC1 protein was observed. This increment was found to the 4 and 14 days groups, while a the 32 days returns to its normal values with regard to the controls of equal number of days.

The present work contributes new evidence that shows the positive regulation in the cardiac expression of NKCC1 as answer to a diet rich in salt and high levels of serum mineralocorticoids.

I. INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades cardiovasculares han sido desde hace mucho tiempo un problema importante en medicina humana, representando la mayor causa de muerte en el mundo occidental. Muchos han sido los factores que se han responsabilizado de generar o favorecer la presentación de estos procesos, entre los que destacan la hipertensión arterial, que es la enfermedad de mayor prevalencia en occidente, la hipertrofia cardíaca, que a su vez es la mayor causa de muerte súbita en jóvenes y niños. Además se menciona la fibrosis e insuficiencia cardíaca, la dieta, la vida sedentaria, el estrés, etc.

Desde la pasada década se sospecha que los mineralocorticoides están relacionados con las enfermedades cardiovasculares, ya que se asoció la hipertensión arterial con la secreción exagerada de aldosterona u otros mineralocorticoides desde la corteza adrenal. Apoyaba esta teoría el hecho de que a aquellos pacientes con insuficiencia cardíaca, a los que se les administraba espironolactona en bajas dosis (diurético y antagonista mineralocorticoideo) dentro del tratamiento convencional, mejoran su sobrevida en 30%. Se sospechó que este efecto benéfico se relacionaba más con el bloqueo del receptor de mineralocorticoides cardiovascular, ya que a las dosis utilizadas no se observa efecto diurético. Comenzaba a quedar claro el rol de los mineralocorticoides al respecto, pero el mecanismo específico aún quedaba sin solución.

Los transportadores iónicos modulan el equilibrio electrolítico intracelular. Aumentos del influjo de sodio causan aumentos de la contractilidad y la respuesta ante agonistas vasoactivos, representando además un estímulo trófico para diversos tipos celulares. Este hecho favorece significativamente el desarrollo de hipertensión, posterior hipertrofia y fibrosis cardíaca. Uno de los transportadores iónicos que sería relevante a este respecto es el cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ (NKCC1). NKCC1 podría verse afectado por mineralocorticoides y ser, en parte, responsable de los cambios observados en las células musculares lisas vasculares y en los cardiomiocitos ante los excesos de mineralocorticoides.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Mineralocorticoides.

Se estima que hace unos 350 millones de años, cuando la Tierra comenzó a cambiar dramáticamente sus condiciones ambientales, muchos organismos desaparecieron. Las aguas se concentraron formando mares y océanos, dejando vastas extensiones de terreno seco. Un grupo de organismos se adaptó a estas nuevas condiciones, desarrollando un sistema que permite evitar las pérdidas de sodio, electrolito que al mantenerse dentro del organismo retiene agua junto a él. De esta manera los mineralocorticoides, mensajeros químicos esteroidales producidos en la corteza suprarrenal y encargados de mantener el sodio en niveles compatibles con una vida fuera del agua, se hicieron imprescindibles para la permanencia en tierra firme.

La pérdida total de la secreción corticosuprarrenal suele producir la muerte al cabo de 3 días a 2 semanas, a menos que se reciba un tratamiento con sal o la inyección de mineralocorticoides. Sin éstos, la concentración de iones potasio en el líquido extracelular se eleva de forma marcada, las concentraciones de sodio y de cloruro disminuyen, y el volumen total de líquido extracelular y el volumen sanguíneo se reducen significativamente, con la aparición de una disminución del gasto cardíaco que conduce a una situación de shock seguida de muerte. Toda esta secuencia se puede evitar con la administración de algún mineralocorticoide. (Guyton y Hall, 1997).

Mecanismos de acción.

Aunque los efectos globales de los mineralocorticoides se conocen desde hace muchos años, la acción específica sobre las células epiteliales para aumentar el transporte de sodio se conoce sólo en parte. Sin embargo, la secuencia celular

de acontecimientos que dan lugar al aumento de la reabsorción de sodio parece ser el siguiente (Guyton y Hall, 1997):

Primero, debido a su liposolubilidad en las membranas celulares, los mineralocorticoides difunden rápidamente al interior de las células epiteliales.

Segundo, en el citoplasma de las células, los mineralocorticoides se combinan con una proteína receptora citoplásmica (MR), proteína que posee una configuración estereomolecular que tan sólo permitirá la combinación con compuestos extremadamente similares.

Tercero, el complejo ligando receptor, viaja al núcleo celular, donde actúa como un factor de transcripción e induce la expresión de diversos genes. Las nuevas proteínas formadas son enzimas y proteínas de transporte de membrana, cuya acción conjunta es necesaria para el transporte de sodio, de potasio e hidrogeniones a través de la membrana celular (Guyton y Hall, 1997).

Principales mineralocorticoides.

Hasta la fecha se han aislado más de 30 estructuras químicas secretadas por la corteza adrenal. Las hormonas que produce la corteza adrenal, es decir, mineralocorticoides, glucocorticoides y hormonas sexuales, derivan de la estructura básica del colesterol. La membrana de la célula de la corteza adrenal posee receptores específicos para las lipoproteínas de baja densidad que contienen elevadas concentraciones de colesterol, y la unión de estas proteínas a la membrana induce el proceso endocitótico. También se sintetizan pequeñas cantidades de colesterol en el interior de las células corticales a partir de la acetilcoenzima A, la cual también se puede utilizar para formar las hormonas corticoadrenales (Guyton y Hall, 1997). Esto hace que sean muy parecidas estereoquímicamente todas ellas y que posean actividad tanto glucocorticoídea como mineralocorticoídea. En los mamíferos, los mineralocorticoides más importantes son la aldosterona y la desoxicorticosterona, aunque esta última sólo ostenta un 1/50 de la potencia de la primera (Guyton y Hall, 1997). En algunos síndromes donde existe secreción excesiva de cortisol (el más potente

glucocorticoide en el humano) se pueden producir marcados efectos mineralocorticoídeos junto a los evidentes efectos glucocorticoídeos de la hormona (Guyton y Hall, 1997). Ello se debe a que la afinidad del MR por glucocorticoides y aldosterona es muy similar. El mecanismo fisiológico que confiere el carácter de especificidad a los mineralocorticoides por sus respectivos receptores en los órganos blanco es la presencia en estos órganos de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 β -HSD2), que metaboliza los glucocorticoides a formas inactivas. De esta manera, los receptores para mineralocorticoides (MR) se protegen del cortisol, que circula en el plasma en concentraciones 100 a 1000 veces superiores al mineralocorticoide más abundante, la aldosterona (Alzamora *et al.*, 2000; Hatakeyama *et al.*, 1999).

Aldosterona.

La aldosterona, hormona esteroideal con función mineralocorticoídea, se sintetiza en la zona glomerulosa de la corteza adrenal. Constituye la señal endocrina final del sistema renina-angiotensina-aldosterona, cuyo blanco son los tejidos epiteliales de riñón y colon, en los que regula la reabsorción de Na⁺ y la secreción de K⁺. El agua sigue los movimientos del Na⁺ vía osmosis, estableciendo de esta forma un rol fundamental sobre el balance electrolítico y de fluidos del organismo, alcanzando esta regulación a los parámetros de volumen y presión sanguínea (Booth *et al.*, 2002). Aldosterona también actúa sobre otros tejidos epiteliales ubicados en las glándulas parótidas y sudoríparas, y tal como lo demuestra evidencia reciente, ejerce su actividad en tejidos no epiteliales como hipocampo, célula muscular lisa vascular y corazón (Young *et al.*, 1995).

La presencia de angiotensina II en la sangre o un aumento en los niveles de K⁺ circulantes promueven la secreción de aldosterona. La presión sanguínea altera los niveles de angiotensina II de un modo recíproco: disminución de la presión sanguínea incrementa la producción de angiotensina. La secreción de aldosterona y su actividad fisiológica están, por lo tanto, bajo control tipo retroalimentación negativa, ya que responde positivamente ante disminuciones de

la presión sanguínea e incrementos de niveles de K^+ circulantes, mientras que su respuesta es negativa ante aumentos de la presión de la sangre y decrementos de la kalemia (Funder, 1997(a); Funder, 1997(b); Lifton *et al.*, 2001).

Modelo clásico de acción de aldosterona.

La aldosterona permite la regulación de la función de transporte sobre algunos tejidos epiteliales, como las células principales del túbulo colector renal. El transporte transcelular a través de estas células es electrogénico y dependiente de la bomba Na^+/K^+ ATPasa, la que establece la fuerza electroquímica necesaria para la entrada y salida luminal de Na^+ y K^+ , respectivamente. El paso limitante en la reabsorción de Na^+ es la actividad del canal epitelial amilorida-sensitivo luminal de Na^+ (ENaC), mientras que el paso limitante en el caso del K^+ corresponde a la actividad del canal epitelial luminal de K^+ . El agua sigue los movimientos transcelulares y paracelulares del Na^+ y Cl^- , respectivamente, a través de la monocapa de las células epiteliales del tejido blanco donde aldosterona tenga actividad (Booth *et al.*, 2002).

Los efectores finales de aldosterona en tejidos epiteliales que han sido tradicionalmente considerados son el canal epitelial de Na^+ luminal (ENaC), el canal epitelial luminal de K^+ , y la bomba Na^+/K^+ ATPasa serosal. Sin embargo, otras proteínas intrínsecas de membrana localizadas en la membrana apical del epitelio de intestino y riñón son ahora también reconocidos como efectores finales en la acción de aldosterona (Cho *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998).

Aldosterona incrementa la actividad del intercambiador luminal Na^+/H^+ (NHE3) en la porción proximal del colon, así como la actividad del cotransportador luminal sensible a tiazida Na^+/Cl^- (NCC) en el túbulo distal renal. Incrementos en la traslación de NCC y NHE3 generan un aumento sostenido de la reabsorción electroneutra de Na^+ en respuesta a disminuciones de volumen en colon y riñón (Booth *et al.*, 2002).

Debido a que la actividad del canal apical de sodio limita el movimiento iónico transcelular, sólo hay dos vías por las cuales la aldosterona puede aumentar el transporte:

1. Por incrementos en la probabilidad de canales iónicos apicales abiertos, y
2. Promoviendo la inserción de canales para aumentar el número de canales funcionales.

Existe considerable, y a menudo conflictiva, evidencia que sustenta ambos mecanismos de acción (Helman *et al.*, 1998; Kemendy *et al.*, 1992). Aldosterona también aumenta la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa para estabilizar la capacidad de transporte (Booth *et al.*, 2002).

En los tejidos epiteliales, aldosterona inicialmente afecta el transporte electrolítico transcelular previo a afectar los niveles de expresión de canales y proteínas de transporte (Verrey, 1995). Esto condujo a que se separara las acciones de aldosterona según su curso temporal en fases temprana (1-6 hrs.) y tardía (>6 hrs.). La acción temprana de la aldosterona sobre tejidos epiteliales clásicos es mediada principalmente por proteínas ya presentes en la célula (efectores primarios). En contraste, la fase tardía de actividad resulta de los efectores primarios y efectos secundarios sobre la expresión génica (Booth *et al.*, 2002).

Mecanismos celulares del modelo clásico.

Las acciones clásicas de la aldosterona son mediadas por un receptor intracelular que se traslada al núcleo una vez formado el complejo receptor-ligando. La activación del receptor esteroide modula la expresión génica al funcionar como factor de transcripción. Dos distintos mecanismos moleculares, descritos en la figura 1, definen la acción del receptor nuclear sobre la expresión génica. El mecanismo clásico involucra activación y represión vía directa interactuando con sitios de unión sobre el DNA (denominados elementos de respuesta a esteroides [SREs] y elementos de respuesta negativa a esteroides [nSREs]) (Booth *et al.*, 2002). Estudios más recientes acerca de la función del

receptor para glucocorticoides han establecido nuevos mecanismos complementarios por los cuales estos esteroides afectan la transcripción. En este proceso, la interferencia o la sinergia sobre la transcripción es modulada por interacciones proteína-proteína entre receptores esteroides activados y otros factores. En este segundo mecanismo, el receptor esteroide no está físicamente unido al DNA, aunque esto afecte la expresión génica (Karin, 1998; Reichardt *et al.*, 1998).

Muchos genes inducidos por aldosterona han sido descritos. Existe evidencia de que la represión génica es, en parte, necesaria para la acción de la aldosterona. Sin embargo, ha sido difícil de demostrar, principalmente porque aquellos genes negativamente influenciados por aldosterona no han sido bien descritos y porque los nSREs sensibles a aldosterona involucrados en represión génica tampoco han sido identificados. Aparentemente aldosterona reprime tantos genes como los que induce (Robert-Nicaud *et al.*, 2001; Spindler *et al.*, 1997).

Mecanismo de especificidad en epitelio.

La especificidad de la acción de aldosterona puede ser regulada a través de varias vías de respuesta y a lo largo de varios sitios, incluyendo expresión del receptor en el tejido, ligando unido al receptor, sitios de unión a DNA, o factores afectos a transcripción (Johnson, 1992). Estudios sobre especificidad demostraron la presencia de receptores con alta afinidad por aldosterona localizados en reconocidos tejidos blanco para aldosterona, como colon, glándulas parótidas y nefrona distal en riñón. Aquellos fueron llamados tipo 1, o receptor para mineralocorticoide (MR), para distinguirlo de aquellos receptores esteroidales con alta afinidad por glucocorticoides, llamados tipo 2 o receptores para glucocorticoides (GR). La especificidad en la acción de las hormonas esteroidales fue entonces función de la localización tisular y de la especificidad innata del receptor por su ligando determinado. En apoyo de este paradigma, los MR fueron

encontrados confinados en tejidos blanco para aldosterona mientras que los GR fueron universales (Booth *et al.*, 2002).

Dificultades con este paradigma surgieron a partir de estudios en fisiología animal. En la mayoría de los animales, los niveles de glucocorticoides plasmáticos están aumentados en 100 e incluso más veces que los niveles de aldosterona. Esto representa una diferencia más importante que aquella descrita de mayor afinidad por parte de aldosterona y glucocorticoides por los MR. Se encontró además que existe una homología de un 94% en el dominio de unión del DNA y de un 57% en el dominio de unión al ligando entre MR y GR. Además, MR clonados desde células que expresan una alta afinidad por aldosterona demostraron una baja selectividad intrínseca por distintos esteroides (Booth *et al.*, 2002). Parte de la respuesta a este nuevo acertijo surgió de manera casual: investigadores que estudiaban el síndrome clínico de exceso aparente de mineralocorticoides asociado a alta ingesta de regaliz descubrieron que el componente activo del regaliz era capaz de inhibir a la enzima 11- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 β -HSD2). Así mismo se descubrió que el exceso aparente de mineralocorticoides congénito resultaba del defecto en el gen de la 11 β -HSD2. Tras comprobarse el rol de la 11 β -HSD2 en la protección del MR hacia otros esteroides, se concluyó que existen 2 componentes de especificidad para la acción de aldosterona: la localización tisular de los receptores y la protección por parte de la 11 β -HSD2 (Booth *et al.*, 2002).

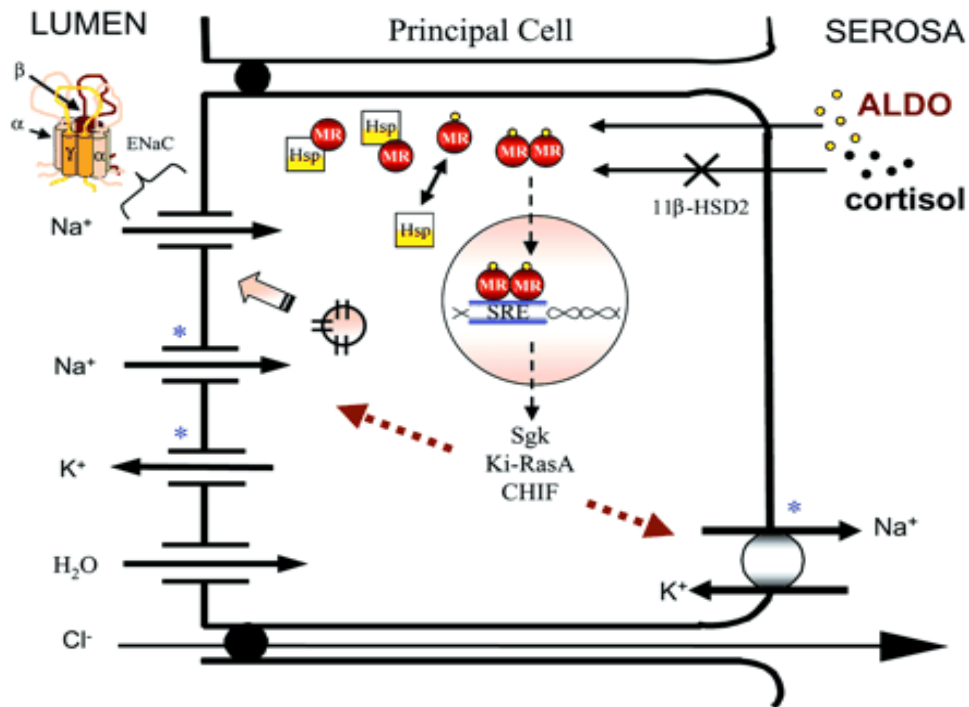


Fig. 1: Modelo de la actividad genómica de aldosterona en células epiteliales. Los asteriscos destacan efectores finales de la aldosterona involucrados en reabsorción y secreción de Na^+ y K^+ , respectivamente. La aldosterona induce proteínas séricas como la quinasa sérica inducible por glucocorticoides (Sgk), factor inducido por hormona corticosteroidea (CHIF) y la proteína de unión Kirsten Ras (Ki-Ras) que actúan sobre proteínas de transporte en la fase temprana de activación. Durante la fase tardía se produce un incremento en los niveles de expresión sobre estas proteínas transportadoras. ENaC: Canal epitelial de Na^+ . Hsp: proteínas de shock térmico. MR: Receptor para Mineralocorticoides. GR: Receptor para Glucocorticoides. SRE: Elemento de Respuesta a Esteroides. $11\beta\text{-HSD2}$: 11β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2. (Booth *et al.*, 2002).

Proteínas reguladas por aldosterona de la fase temprana.

Una distinción entre las fases temprana y tardía de acción de aldosterona es que durante la primera, aldosterona induce proteínas de señal, las cuales permiten la activación de canales iónicos y otras proteínas involucradas en transporte. Se describe además que estos factores de señal de la fase temprana potencialmente promoverían un segundo proceso de expresión génica. Recientes investigaciones han permitido identificar cada factor de señal y su asociación con una cascada de traducción específica. Es así como destaca la participación de la quinasa sérica inducible por glucocorticoides (Sgk) y la proteína de unión a GTP monomérico Kirsten Ras (Ki-Ras). Los mecanismos de acción mediante los cuales estos factores de señal y su efecto cascada finalmente influyen proteínas de transporte comienzan a aclararse (Booth *et al.*, 2002).

De los recientes genes identificados inducidos por aldosterona, Sgk ha recibido la mayor atención (Naray-Fejes-Toth y Fejes-Toth, 2000; Pearce, 2001). Sgk es una proteína de inducción primaria por parte de la aldosterona en el epitelio renal. La aldosterona incrementa los niveles de sgk en un lapso de 15 a 30 minutos, alcanzando un máximo al cabo de 1 a 2 hrs. Evidencia experimental sobre oocitos de *Xenopus laevis* ha revelado la relación entre Sgk y la posterior activación de ENaC (Naray-Fejes-Toth y Fejes-Toth, 2000; Pearce, 2001), aunque se reconoce que la situación *in vivo* podría ser diferente, y que esta activación de ENaC podría reflejar actividad no específica por parte de aldosterona sobre este canal. En adición a la regulación de canales iónicos, evidencia preliminar de trabajos con oocitos sugiere que Sgk también activaría la bomba Na^+K^+ ATPasa y el cotransportador $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$ (Zecevic *et al.*, 2001).

Con respecto a Ki-Ras, estudios realizados en oocitos de *Xenopus laevis* han demostrado que la actividad de este factor de señal sobre ENaC incrementa la probabilidad de apertura del canal (Mastroberardino *et al.*, 1998). Se demostró que la inducción de Ki-Ras durante la fase temprana es necesaria y suficiente sobre parte de la acción de aldosterona sobre el transporte de Na^+ en células polarizadas y de epitelio renal (Stockand *et al.*, 1999). En el citado estudio se

demonstró la importancia de Ki-Ras en la estabilización del estado de apertura de ENaC. El mecanismo molecular de esta acción permanece inconcluso.

Otros factores de señal importantes en la acción de la aldosterona es la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que es una lípido quinasa importante tanto para aldosterona como para insulina en la actividad de éstas sobre los epitelios (Blazer-Yost *et al.*, 1999; Edinger *et al.*, 1999), y el denominado factor inducido por hormona corticosteroídea (CHIF), que se expresa en colon distal y nefrona (Attali *et al.*, 1995; Capurro *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 2001).

Desafíos al modelo corriente de acción de aldosterona.

Recientes hallazgos han motivado interés en el estudio del modelo clásico de acción de aldosterona, principalmente en dos áreas: el mecanismo molecular de acción y los tejidos blanco. Sin duda, el hallazgo más llamativo ha sido el descubrimiento de un mecanismo no genómico de acción y sistemas locales sobre tejidos blanco nuevos (Falkenstein *et al.*, 2000(a); Ngarmukos y Grekin, 2001).

Acciones no genómicas.

Las acciones genómicas de aldosterona comandan cambios en la expresión génica, los cuales tienen un período de latencia previo a la actividad de 0.5 a 1.0 h. Inhibidores de la transcripción, translación y la translocación del receptor esteroídeo junto a antagonistas de receptores esteroídeos son capaces de invalidar la actividad genómica de aldosterona. Recientes estudios, la mayoría de ellos sobre células no epiteliales, identificaron efectos tempranos de aldosterona (menos de 15 min.) que son insensibles a estos inhibidores (Falkenstein *et al.*, 2000(b); Harvey *et al.*, 2001). Esas rápidas respuestas son descritas como actividad no genómica de aldosterona y son consideradas independientes de los efectos directos sobre la expresión génica.

Un estudio en humanos mostró recientemente que la administración de aldosterona alteraba significativamente la resistencia vascular sistémica y el débito cardíaco en 3 minutos. La respuesta cardiovascular se disipaba en 10 minutos (Schmidt *et al.*, 1999). Este tiempo de curso es considerado demasiado rápido para ser producto de acción genómica. La significativa capacidad de producir respuestas rápidas mediadas por acciones no genómicas requieren reconocer el incremento de sistemas locales de actividad de la aldosterona.

Las acciones no genómicas de la aldosterona identificadas por primera vez se descubrieron en células reconocidamente anucleadas: los eritrocitos (Spach y Streeten, 1964). Subsecuentemente algunos laboratorios han confirmado esta observación inicial, y recientemente mejores avances han permitido el entendimiento de este mecanismo (Falkestein *et al.*, 2000(a); Harvey *et al.*, 2001; Ngarmukos y Grekin, 2001). Los estudios sobre la actividad no genómica de la aldosterona se han enfocado en tres áreas:

1. Descripción del receptor putativo.
2. Identificación del sistema de segundos mensajeros envueltos en esta acción.
3. Identificación de efectores finales.

Las acciones no genómicas resultan de la interacción con un receptor citosólico y/o de membrana plasmática que es claramente distinto del receptor esteroideo clásico. Sin embargo, la identificación definitiva de este receptor no genómico aún se mantiene inconclusa. Actualmente la actividad no genómica podría verse afectada por la actividad de receptores diferentes a los clásicamente conocidos y/o respuestas cascada de señales que difieren de las establecidas. La figura 2 muestra una comparación entre actividad genómica y no genómica.

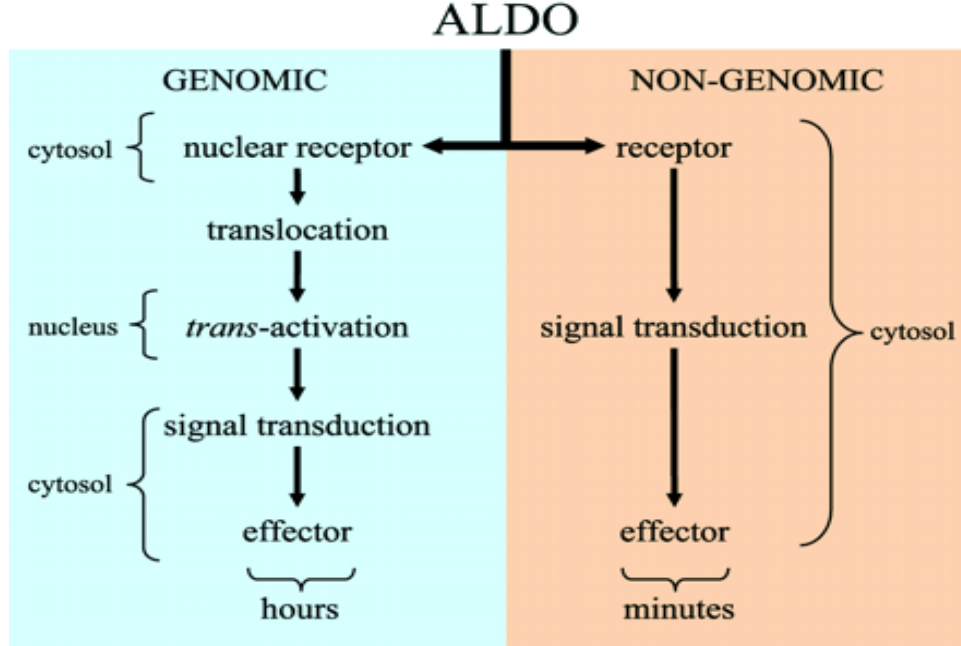


Figura 2: Comparación de la actividad genómica (izquierda) y no genómica (derecha) de la aldosterona y su diferencia temporal (Booth *et al.*, 2002).

Señales de traducción de la actividad no genómica.

La actividad no genómica de la aldosterona está comandada y dirigida por sistemas de segundos mensajeros. En el músculo liso vascular, la aldosterona aumenta rápidamente la hidrólisis sobre fosfolípidos para elevar los niveles de diacilglicerol (DAG) y de inositol trifosfato (IP3) (Christ *et al.*, 1995). También en estas células la aldosterona promueve rápidamente la translocación de la proteína quinasa C (PKC), la cual es sensible tanto a DAG como a IP3, señales dependientes de Ca^{+2} , desde el citosol hacia la membrana mostrando activación por parte de estos segundos mensajeros. Además, inhibidores de la PKC bloquean rápidamente la activación del transportador Na^+/H^+ llevada a cabo por aldosterona (Ebata *et al.*, 1999). Otras investigaciones han mostrado que, en contraste con estos hallazgos, la aldosterona inhibe a la PKC en miocitos (Sato *et al.*, 1997). Sin embargo, la señal PKC es fundamental en la actividad no genómica. Doolan *et al.*, (1998) reportaron que en las células colónicas la aldosterona activaba directamente a PKC independiente de segundos mensajeros, sugiriendo que PKC podría ser actualmente el receptor no genómico en este tipo de células.

En adición a las señales Ca^{+2} y PKC, la aldosterona podría rápidamente incrementar los niveles de AMPc en el músculo liso. Normalmente Ca^{+2} y PKC están asociados con contracción, mientras que AMPc se relaciona con relajación del músculo liso. Por lo tanto el aparente conflicto derivado de los posibles mecanismos de activación de la aldosterona podría explicarse, para estas células, por estos rápidamente variables estados de contracción-relajación. Efectivamente, una hipótesis similar se ha presentado para explicar el aparentemente paradójico hallazgo sobre epitelio colónico, donde aldosterona rápidamente activa canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}) pero a la vez inhibe canales de K^+ activados por Ca^{+2} (Maguire *et al.*, 1999).

Efectores finales de la acción no genómica.

Los efectores finales de la actividad no genómica de aldosterona incluyen la activación de: NHE1-3, canales de K^+ , Na/K ATPasa y otras proteínas involucradas en el balance de fluidos y electrolitos y en el metabolismo del Ca^{+2} (Alzamora *et al.*, 2000; Falkestein *et al.*, 2000(b); Harvey *et al.*, 2001; Alzamora *et al.*, 2003; Michea *et al.*, 2005). Las consecuencias fisiológicas de estos efectos son claras a nivel celular, principalmente referidas a cambios transitorios del pH celular y sobre los niveles de Na^+ , K^+ y Ca^{+2} . Sin embargo, a nivel sistémico, las consecuencias de cada activación transitoria no están tan claras. Esto permite la especulación de que la rápida acción no genómica de la aldosterona sobre el epitelio permite capacitar adecuadamente la maquinaria celular para la respuesta de transporte posterior requerido por la acción genómica. Esta posibilidad, sin embargo, permanece sin fundamentación sustancial.

Reciente evidencia sugiere que la actividad no genómica de la aldosterona puede ser importante para respuestas agudas de producción local de aldosterona. Sistemas para la producción local de aldosterona y las consecuencias de esta producción serán descritas en el futuro (Ngarmukos y Grekin, 2001). Nueva evidencia que sugiere que aldosterona es sintetizada en el corazón, además de afectar otros tejidos extrarrenales hacen redefinir la percepción que se tiene acerca

de este importante esteroide. Aldosterona es ahora reconocida como ligando de diversos tipos de células, como leucocitos, neuronas y sus células de soporte, miocitos y fibroblastos cardiacos, endotelio y músculo liso vascular, así como tejido adiposo. Efectivamente, la acción directa de la aldosterona sobre células cardiacas juega un rol en la remodelación patológica del corazón (Young y Funder, 2000). Entonces los clásicos tejidos blanco de la aldosterona como colon distal, nefrona renal, glándulas salivales y sudoríparas ya no definen plenamente los sistemas afectados por aldosterona.

Nuevos tejidos blanco de aldosterona.

El mayor rol fisiológico de los mineralocorticoides ha sido la regulación del transporte iónico. Esto debido a que los MR, o receptores de tipo I, se encuentran en tejidos epiteliales donde efectivamente el transporte de Na^+ es regulado. Consistente con esta noción es que el receptor de tipo I y su enzima protectora, la 11β -HSD2, se localizan en la nefrona distal del riñón, colon distal, glándulas sudoríparas y glándulas salivales (Funder, 1997(a); Farman y Rafestin-Oblin, 2001). En todos estos casos, el rol de la aldosterona claramente se ha relacionado con la regulación del transporte transepitelial de Na^+ .

A comienzos de la década de los ochenta, numerosos investigadores habían comenzado a describir una alta afinidad de unión de la aldosterona por los receptores de tipo I de tejidos no epiteliales. Esos tejidos incluían a la glándula hipófisis, el hipocampo, cultivos de células aórticas y miocitos (Arriza *et al.*, 1987; Funder, 1997(b); Farman y Rafestin-Oblin, 2001). Además de que estos tejidos mostraran la esperada alta afinidad de unión por aldosterona, también mostraban ser consistentemente afines por glucocorticoides en circunstancias en que se pensaba que una afinidad menor se observaría de parte de MR para este tipo de esteroides. Cuando MR fue clonado, RNAm homólogos para esta proteína fueron efectivamente hallados en cerebro, hipófisis y corazón (Arriza *et al.*, 1987), confirmando que esta alta afinidad por sitios de unión era efectivamente sobre MR. Estudios en tejidos blanco no clásicos acerca de la distribución de la

enzima 11-HSD explicaban parcialmente esta falta de selectividad de los MR no epiteliales. Existen dos isoformas diferentes de la 11-HSD: la 11-HSD1, que se localiza predominantemente en hígado y tejidos no epiteliales como el adiposo y cerebro, es primordialmente una reductasa reversible capaz de amplificar la actividad glucocorticoidea (Seckl y Walker, 2001). La 11 β -HSD2 es una deshidrogenasa que inactiva glucocorticoides y protege a MR de la ocupación por éstos (Funder *et al.*, 1988). Más evidencia sugiere que 11 β -HSD2 es tempranamente expresada en cerebro adulto restringiendo áreas relacionadas con acciones centrales de aldosterona sobre presión sanguínea y apetito salino (Robson *et al.*, 1998). La 11 β -HSD2 ha sido demostrada también en cardiomiocitos (Lombes *et al.*, 1995) y células vasculares (Takeda *et al.*, 1994), lo que sugiere que la actividad sobre MR en esos tejidos puede ser aún más específica que en cerebro.

Mineralocorticoides y alteraciones cardiovasculares.

Es largamente conocido que aldosterona y otros mineralocorticoides están relacionados con hipertensión o se encuentran elevados en condiciones de falla cardíaca (Fardella y Miller, 1996; Weber, 2000). La sobreproducción de aldosterona que se produce en el síndrome de Conn (hiperaldosteronismo primario) tiene como consecuencia una sostenida hipertensión y daño cardiovascular. Condiciones de insuficiencia cardíaca son conocidas causas de estimulación adrenal que se traduce en mayor síntesis de aldosterona a través de la activación del eje renina-angiotensina. Se pensó que estos efectos estaban mediados por los MR localizados en los clásicos tejidos blanco y que eran resultado finalmente de la mayor retención de Na⁺ renal. El descubrimiento de MR en cardiomiocitos y fibroblastos, en células de endotelio y músculo liso vascular y en neuronas del núcleo paraventricular, sumado a la presencia en estos tejidos de la enzima protectora 11 β -HSD2, añadieron a la aldosterona un protagonismo impensado hasta el momento en la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares. Nuevas complicaciones surgieron con el

descubrimiento de síntesis local de aldosterona en células cardíacas y vasculares (Hatakeyama *et al.*, 1994; Takeda *et al.*, 2000). Esta línea de investigación fue seguida con mucho ímpetu por el "*Randomized Aldactone Evaluation Study*" (RALES), que demostró que el antagonista mineralocorticoideo espironolactona produce una asombrosa reducción de la morbilidad y mortalidad en pacientes con severa falla cardíaca congestiva (Pitt *et al.*, 1999). Este efecto cardioprotector fue proporcionalmente más importante que el efecto diurético que ostentaba este fármaco, y sugirió a la vez una actividad de MR sobre tejidos cardiovasculares que resultó ser, en efecto, patológica. Esta actividad podía ser producto de un fenómeno tanto autocrino como paracrino, dada la potencial producción local de la hormona. Una de las paradojas enfrentadas por investigadores se debe a que los efectos fisiológicos de los MR en esos tejidos eran completamente desconocidos comparado con el detallado conocimiento que se manejaba acerca de los efectos fisiológicos de MR en los tejidos blanco clásicos. Esto motivó un intenso estudio sobre los efectos fisiopatológicos de MR sobre tejidos no clásicos.

Consecutivas investigaciones sugirieron que los MR localizados en núcleo paraventricular y amígdala del cerebro estaban asociados con la ingesta de sal y la generación de hipertensión secundaria o sensible a la sal (Sakai *et al.*, 2000). Estudios de inyección de otros antagonistas de MR u oligonucleótidos antisentido para MR dentro del cerebro de ratas hechas hipertensas por la administración diaria de mineralocorticoides, como la desoxicorticosterona, sugirieron un rol directo de los MR cerebrales en la patogénesis de la hipertensión con este modelo. El bloqueo de los MR en la amígdala resultaba en una disminución en la ingesta de sal y en una sustancial reducción de la hipertensión en animales afectados (Sakai *et al.*, 2000). Alternativamente se demostró que la inyección intraventricular de aldosterona puede inducir hipertensión en ratas con sobreingesta de sal (Funder, 1997(a)), y que estos efectos pueden ser antagonizados por la infusión de otros glucocorticoides o antagonistas de MR, sugiriendo respuestas diferenciales por parte de los MR del sistema nervioso central (SNC) hacia glucocorticoides y aldosterona (Gómez-Sánchez *et al.*, 1990).

Considerando éstos y otros estudios se podría concluir que MR mediarían cambios sustanciales en la presión sanguínea al regular funciones del SNC que incluyen la ingesta de sal (Sakai *et al.*, 2000). Otra interesante conclusión derivada de estos estudios se refiere al hecho que los efectos cardíacos y vasculares de la aldosterona y otros mineralocorticoides vía MR dependen de la ingesta de sal; Takeda y otros investigadores (2000) demostraron un efecto producido por la alta ingestión de sodio sobre la síntesis local de aldosterona en corazón y tejidos vasculares, que se ve aumentada, mientras que los niveles circulantes de la hormona están disminuidos o suprimidos. Otra investigación demostró, en ratas previamente hipertensas e infartadas cerebrales, que se producía una reducción en el tamaño del infarto al tratarse con antagonistas de aldosterona, posiblemente al bloquearse los MR que mediarían la remodelación vascular (Dorrance *et al.*, 2001).

Gran número de estudios han demostrado que aldosterona y otros mineralocorticoides inducen fibrosis cardíaca en la insuficiencia cardíaca congestiva (Brilla *et al.*, 1993; Weber, 2000), y que es capaz de alterar la remodelación después del infarto al miocardio (Delcayre *et al.*, 2000). Estos efectos parecen ser mediados por MR y parecen ser regulados, en parte, por la síntesis local de aldosterona, la cual se ve aumentada en la falla cardíaca (Young *et al.*, 2001). La fibrosis cardíaca intersticial se ve aumentada por la aldosterona y a la vez bloqueada por antagonistas de los MR y es resultado, en parte, del incremento en la síntesis y depósito de colágeno y procolágeno. Las proteínas exactas inducidas por MR bajo estas condiciones no han sido identificadas.

Tejido cardiovascular como blanco de mineralocorticoides.

La mayoría de los efectos conocidos de aldosterona son mediados por la unión a su receptor intracelular, MR, que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares (Zennaro, 1998). Las acciones conocidas de la aldosterona a largo plazo sobre la vasculatura incluyen aumentos de la reactividad, modulación del tono y variaciones en la composición electrolítica de la pared arterial (Lombes *et al.*, 2000). La aldosterona, además, aumentaría la expresión de receptores para angiotensina II y catecolaminas, potenciando las respuestas presoras frente a estos agonistas. La relevancia de estos efectos es sugerida por diversas condiciones clínicas que implican a la aldosterona en el desarrollo y/o mantención de aumentos de la resistencia periférica total (RPT). Existe una población de pacientes con hipertensión arterial esencial (HTAe), además de la población de pacientes con HTA por exceso de mineralocorticoides, que responde bien a la terapia dirigida contra el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). Estos pacientes presentan una baja actividad de renina plasmática acompañada, sin embargo, de niveles de aldosterona plasmática normales. Se ha postulado que este grupo sufre alteraciones moderadas en la secreción y/o acción de aldosterona en los tejidos blanco, incluyendo la pared arterial (Mantero y Lucarelli, 2000). La inhibición del sistema RAAS también ha demostrado ser beneficiosa en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca, a través de la disminución de la poscarga, la resistencia periférica total y probablemente afectando la remodelación cardiaca y vascular (Schrier *et al.*, 2000). Como se comentó anteriormente, el bloqueo del MR con espironolactona, ha probado importantes efectos beneficiosos en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca (Pitt *et al.*, 1999) y en el mejoramiento de la función vascular en estos pacientes (Farquharson y Struthers, 2000). Los estudios experimentales también demuestran que los niveles aumentados de mineralocorticoides afectan la remodelación vascular al inducir hipertrofia ventricular izquierda, fibrosis cardiaca y fibrosis perivascular (Brilla *et al.*, 1990; Young *et al.*, 1994; Robert *et al.*, 1995), y que la administración de espironolactona previene la fibrosis experimental (Brilla *et al.*,

1993). Los efectos en la remodelación cardiovascular se han relacionado con el aumento en la síntesis de colágeno que ocurre con el cambio fenotípico celular al estado proliferativo-sintético asociado a altos niveles de aldosterona (Lombes *et al.*, 2000) y otros mineralocorticoides como la desoxicorticosterona (Young *et al.*, 1995). Podría estar involucrado también un sistema RAAS local, actuando de forma autocrina o paracrina en o sobre la célula muscular lisa vascular (VSMC) (Weir y Dzau, 1999; Fukuda *et al.*, 1999) y/o alteraciones de la actividad de la 11 β -HSD2 que induciría sobreestimulación del MR (Hatakeyama *et al.*, 1999).

Es importante señalar que dentro de los efectos agudos de los mineralocorticoides sobre el sistema cardiovascular se destaca el aumento en la resistencia periférica y la modificación del gasto e índice cardiaco que se produce tras la inyección endovenosa de una dosis farmacológica endovenosa de aldosterona (Wehling *et al.*, 1998). Más recientemente se ha demostrado que la aldosterona estimula la actividad del intercambiador Na⁺/H⁺ rápidamente en VSMC tanto en cultivo (Falkestein *et al.*, 2000(a)) como en tejido vascular intacto (Alzamora *et al.*, 2000). Considerando que el efecto clásico y específico de los mineralocorticoides en los tejidos blanco es la regulación de los transportadores iónicos capaces de producir cambios en la homeostasis iónica del músculo liso vascular que se traducen en aumentos de la reactividad, modulación del tono y variaciones en la composición electrolítica de la pared arterial, se podría sugerir que estos fenómenos no genómicos de los mineralocorticoides sobre tejido cardiovascular se deba a una acción sobre MR relacionados con transportadores y otras proteínas relacionadas con intercambio iónico.

Homeostasis iónica, sistemas transportadores y mineralocorticoides.

Además de canales iónicos, las células musculares lisas de la pared vascular (VSMC) poseen diversos transportadores iónicos, cuya actividad es regulada por sustancias vasoactivas, hormonas y factores de crecimiento. Hasta ahora, la atención en este campo se ha centrado principalmente en los

transportadores de Na^+ . Esto se explica por la relevancia del Na^+ en la mantención del potencial de membrana y secundariamente en la concentración del Ca^{+2} intracelular. La mantención del gradiente electroquímico y el potencial de membrana dependen de la actividad de la bomba de sodio (Na^+K^+ ATPasa), que se enfrenta a la entrada de Na^+ por otras vías. En condiciones basales las vías de entrada de Na^+ en la VSMC estarían representadas mayoritariamente por el intercambiador Na^+H^+ y por el cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ (Haas y Forbush, 1998; Hannan y Little, 1998). Sin embargo, la relevancia fisiológica de estos transportadores también radica en la regulación del pH, el volumen y la concentración de Cl^- intracelular (Russel, 2000). Normalmente, el cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ media influjo iónico, y se sabe que es activado por reducciones del volumen intracelular, factores de crecimiento y hormonas que inducen proliferación celular. Éste se encontraría recíprocamente balanceado por la actividad del cotransportador $\text{K}^+\text{-Cl}^-$, que media el eflujo de iones y es activado por el aumento del volumen intracelular (Haas y Forbush, 1998).

Junto con la relevancia de la bomba de sodio determinando los gradientes electroquímicos de Na^+ y K^+ , la hipótesis de la participación de los transportadores de iones monovalentes sobre la regulación del tono vascular se basó inicialmente en la conversación cruzada entre el intercambiador Na^+H^+ y el intercambiador $\text{Na}^+\text{Ca}^{+2}$, actuando sobre la concentración intracelular de éste. En forma resumida, la activación del intercambiador Na^+H^+ inducía aumentos de la concentración intracelular de Na^+ , que secundariamente activarían el cotransportador $\text{Na}^+\text{Ca}^{+2}$. De esta forma se establece una relación funcional entre la bomba de Na^+ y este intercambiador en compartimentos de la membrana celular en proximidad al retículo sarcoplásmico. Dada esta interacción, la disminución de la actividad de la bomba de sodio aumentaría la liberación de Ca^{+2} desde el retículo sarcoplásmico (Juhazova y Blaunstein, 1997; Orlov *et al.*, 1999). El otro factor importante es la regulación de la concentración de Cl^- intracelular. Las células musculares lisas poseen canales de cloruro regulados por Ca^{+2} y por cambios de volumen (Jackson, 2000). Al activarse estos canales, median el eflujo de Cl^- . La pérdida de cargas negativas despolariza la membrana plasmática y

activa canales de Ca^{+2} regulados por potencial. La acumulación y recaptación de cloruro dependen de la contribución relativa de los cotransportadores $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Cl}^{-}$ y $\text{K}^{+}\text{-Cl}^{-}$, y aumentos en la concentración intracelular de cloruro causan el desplazamiento del potencial de equilibrio del Cl^{-} a valores más positivos. La activación de los canales de cloruro en esta nueva situación de equilibrio produciría una mayor despolarización de la membrana y mayores aumentos del calcio intracelular. Por lo tanto, la regulación de la actividad de estos transportadores también tendría un papel relevante en el tono vascular (Lamb y Barna, 1998; Orlov *et al.*, 1999).

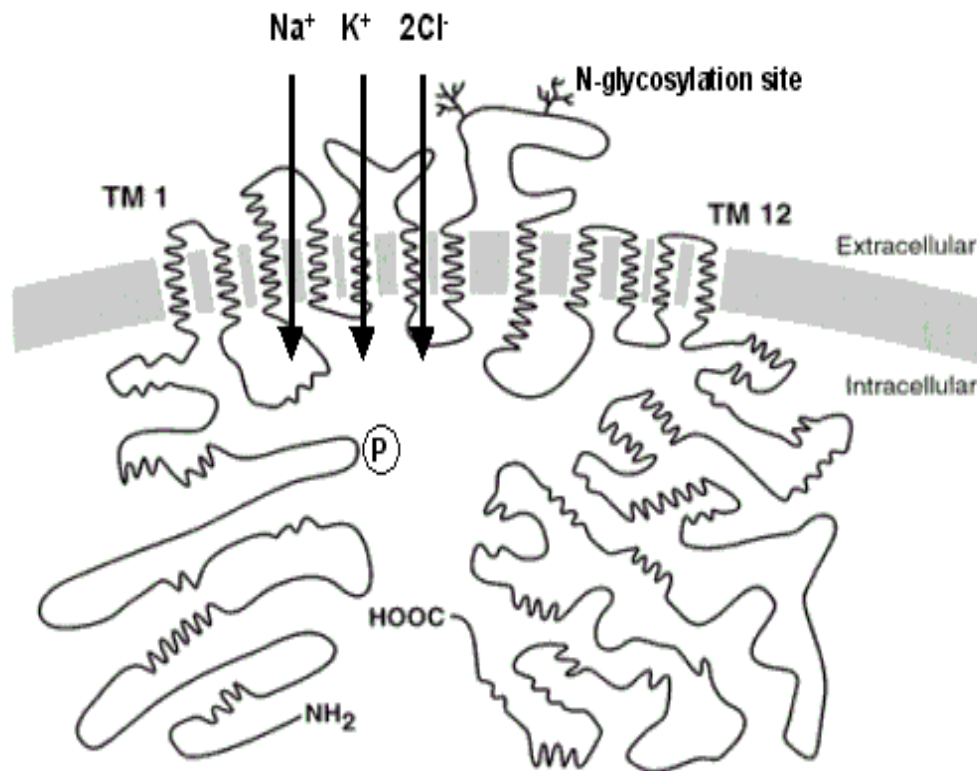


Figura 3: Esquema de la estructura primaria y secundaria del cotransportador $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Cl}^{-}$. Se observa su dominio amino proximal junto al gran dominio carboxilo terminal, intracelulares. Se aprecian también sus 12 dominios transmembrana con sus 6 dominios extracelulares. Nótese sus 2 sitios de N-glicosilación insertos en el mayor de los dominios extracelulares (Isenring *et al.*, 1998).

Cotransportador Na⁺-K⁺-Cl⁻ (NKCC).

El cotransportador NKCC, que pertenece a la familia de cotransportadores catión-cloruro, media el flujo electroneutro de iones modulando el volumen, los gradientes iónicos y el potencial de membrana (Haas y Forbush, 1998; Haas y Forbush, 2000; Russel, 2000). La estequiometría eléctricamente neutra (1:1:2) media la entrada obligatoria de agua (por presión osmótica) a la célula. Se han clonado 2 isoformas del cotransportador NKCC: NKCC1, isoforma expresada en forma constitutiva tanto en tejidos epiteliales como no epiteliales, y NKCC2 cuya expresión está restringida a la membrana apical del segmento grueso del asa de Henle (Russell, 2000). *In vitro*, ambas formas son inhibidas específicamente por diuréticos de asa (bumetanida, furosemida), sin embargo *in vivo* prácticamente sólo inhiben a NKCC2, mostrando un bajo efecto en NKCC1 puesto que estos diuréticos viajan preferentemente unidos a albúmina sérica restringiendo su acceso a muchos tejidos (Shankar y Brater, 2003).

Análisis de la secuencia aminoacídica predicen que NKCC1 forma 12 regiones transmembrana con dominios amino- y carboxilo- terminal hidrofílicos de gran tamaño. Experimentos de entrecruzamiento mostraron que la proteína forma homodímeros en la membrana (Moore-Hoon y Tuner, 2000). NKCC1 y NKCC2 muestran un 72,3% de identidad encontrándose las grandes diferencias en el N-terminal, lo que señala a esta región como un punto de regulación de la actividad (Hebert *et al.*, 1996; Mount *et al.*, 1998). La fosforilación del amino-terminal en distintos residuos de treonina activa NKCC1 frente a variados estímulos, entre los más importantes están la disminución de la concentración intracelular de cloruro y/o una reducción del volumen celular. Un gran número de quinasas han sido propuestas para activar NKCC1, no obstante sólo se ha demostrado que la quinasa relacionada con STE20 rica en Prolina Alanina (PASK) se asocia directamente con el cotransportador. Otra región dentro del N-terminal ha sido identificada como un sitio de unión para proteínas fosfatasa tipo

1 (PP1), y mutaciones en este sitio alteran el perfil de activación de NKCC1 (Dowd y Forbush, 2003).

Hasta la fecha los mecanismos de regulación hormonal de este sistema de transporte en el músculo liso vascular son desconocidos (Garay *et al.*, 1998). La existencia funcional de NKCC1 en tejido vascular fue sugerida por la captación de rubidio (^{86}Rb), un análogo del potasio, en estudios de sensibilidad a furosemida en aorta de conejo. La furosemida inhibe la contracción inducida por fenilefrina y los aumentos del calcio intracelular en arterias aisladas (Akar *et al.*, 1999(a)), resultados consistentes con una actividad pro vasoconstricción de NKCC1 en el tejido vascular. Posteriormente, la disponibilidad de un inhibidor más específico (bumetanida) permitió confirmar la presencia funcional del cotransportador en tejido vascular y su alteración en la hipertensión arterial (HTA). Estudios posteriores demostraron que la actividad del transportador se encuentra dramáticamente aumentada en la aorta de ratas hipertensas *Goldblatt 2* riñones (Goecke *et al.*, 1998). También se reportaron aumentos de actividad del cotransportador en animales hipertensos por desoxicorticosterona acetato (DOCA), un mineralocorticoide sintético, y NaCl dietario (Davis *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1999), sugiriendo además que la aldosterona y otros mineralocorticoides podrían modular la actividad y probablemente la expresión de NKCC1.

Nueva evidencia sugiere la relevancia funcional de NKCC1 en el tejido vascular: ratones mutantes homocigotos deficientes en el gen NKCC1 presentan una disminución significativa de la presión arterial media (Flagella *et al.*, 1999). Otras investigaciones demostraron que NKCC1 es activado por vasoconstrictores (Ang II, fenilefrina, endotelina, KCl) y es recíprocamente inhibido por NO y nitroprusiato. Estos cambios se acompañaron de aumentos y disminuciones en la fosforilación por los vasoconstrictores y nitroprusiato, respectivamente, de acuerdo a lo esperado según estudios de fosforilación y activación de NKCC1 en otros sistemas celulares (Akar *et al.*, 1999(b)). En condiciones basales NKCC1 operaría mediando el influjo iónico, por lo que aumentos de su actividad podrían tener al menos dos efectos importantes en la homeostasis iónica: aumentos del

Na^+ y del Cl^- intracelular. La concentración de Cl^- intracelular sería relevante *in vivo*, ya que el aumento de la conductancia y el eflujo de cloruro participan en la despolarización de la membrana durante el desarrollo de contracción estimulada por agonistas (Lamb y Barna, 1998; Brown *et al.*, 1999). En general el potencial de membrana de las VSMC fluctúa entre -45 y -65 mV y el potencial de equilibrio del Cl^- es aproximadamente 15 a 30 mV más positivo. En tejido vascular se ha demostrado la activación de corrientes de cloruro activadas por Ca^{+2} liberado del retículo sarcoplásmico en respuesta a agonistas, resultados apoyados por estudios de eflujo con trazadores radiactivos (Lamb y Barna, 1998). Cambios relativamente pequeños en la concentración intracelular de Cl^- producirían cambios importantes en el potencial de equilibrio del cloruro (E_{Cl}). Se demostró experimentalmente que el cloruro intracelular aumenta desde 34 a 52 mM bajo estas condiciones. Si se asume que la concentración extracelular de cloruro tiene un valor de 100 mM, el E_{Cl} cambia de -29 a -18 mV. Esto produciría más despolarización cuando la conductancia al cloruro aumenta (en el inicio de la contracción) y el E_{Cl} es más dominante en el V_m , lo que contribuiría a los aumentos de sensibilidad a agonistas vasoconstrictores observados en arterias de ratas con tratamientos de mineralocorticoides y NaCl dietario.

Enfermedades cardiovasculares y NKCC1.

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo, sin embargo la patogénesis que hay detrás de éstas es multifactorial y desconocida (Nabel, 2003). La HTA es la enfermedad de mayor prevalencia en el mundo occidental y uno de los factores de riesgo más importantes en la generación de anomalías cardiovasculares (Rossier, 2003), mientras que la hipertrofia cardíaca es la principal causa de muerte súbita en niños y adolescentes (Nabel, 2003).

La HTA se caracteriza por el aumento del gasto cardíaco y de la resistencia periférica total (RPT). La RPT está determinada por el diámetro del

lumen vascular, que depende del estado de contracción VSMC (Johnson, 1998) y el engrosamiento derivado de la proliferación y crecimiento de estas células (Chrisant, 1998). El aumento crónico de la presión sanguínea produce una sobrecarga hemodinámica en el corazón que activa diferentes respuestas adaptativas como la hipertrofia y la fibrosis las que, de ser sostenidas, llevan al desarrollo de insuficiencia cardiaca (Weber, 2001).

Existen otros factores de riesgo que inducen efectos hipertróficos sobre el corazón. La sal es un factor de riesgo epidemiológico independiente para el desarrollo de hipertrofia e insuficiencia cardiaca. Intervenciones en la dieta para reducir la ingesta de sodio producen una disminución de la masa ventricular izquierda, sin variaciones significativas de la presión sanguínea (Messerli, 1997). Recientes observaciones indican que además de los efectos estructurales sobre el corazón, la sal podría tener acciones directas sobre la función cardíaca (Langenfeld *et al.*, 1996). Tobian y Hanlon (1990) demostraron experimentalmente que una dieta rica en sal daña el tejido arterial. Por otra parte, estudios epidemiológicos han indicado que el nivel de sodio en la dieta puede influir en el grado de distensión arterial independientemente de la edad, presión sanguínea y colesterol plasmático (Messerli *et al.*, 1997). Poblaciones que mantienen una alta ingesta de sal muestran un incremento en la prevalencia de hipertensión (Weinberger, 1997).

Uno de los principales reguladores de la presión sanguínea es la aldosterona. La disminución del volumen sanguíneo eleva la secreción de aldosterona a través del sistema renina-angiotensina (Booth *et al.*, 2002). En los últimos años se ha establecido que el aumento en los niveles de aldosterona, desoxicorticosterona y en la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona participan en el desarrollo y mantención de diversos tipos de HTA (Fardella y Miller, 1996; Rocha y Stier, 2001; Stowasser, 2001; Stier *et al.*, 2002). En la génesis de la HTA hiporreninémica se ha postulado la existencia de una excesiva cantidad de mineralocorticoides circulantes. Avala esta hipótesis la elevación de desoxicorticosterona detectada en muchos de los pacientes que cursan con esta afección (Fardella y Miller, 1996).

Evidencias de estudios clínicos sugieren que los niveles excesivos de aldosterona, desoxicorticosterona y otros mineralocorticoides provocan fibrosis vascular y miocárdica, y una disminución de la función sistólica y diastólica (Stowasser, 2001). Pese a esto, en experimentos con ratas con una dieta restringida en sal a las cuales se les administró aldosterona o desoxicorticosterona, no revelaron aumento de la presión sanguínea ni fibrosis cardiaca, demostrando que los efectos deletéreos de la aldosterona o la desoxicorticosterona dependen de manera crucial del balance de sodio del animal (Young *et al.*, 1995).

La identidad de los genes regulados por mineralocorticoides en tejido cardiaco y vascular en su mayoría es desconocida, pero es probable que entre ellos se encuentren transportadores iónicos, como lo sugiere gran cantidad de evidencia experimental y el hecho de que son éstos blancos clásicos de la acción mineralocorticoídea.

En diversos estudios se ha observado un aumento del Na^+ intracelular en células de corazón con hipertrofia e insuficiencia cardiaca compensada (Verdonck *et al.*, 2003) y en vasos sanguíneos de animales sometidos a estados de hipermineralocorticismo (Worcel y Moura, 1987). La concentración de Na^+ intracelular depende del balance entre la salida activa de sodio a través de la Na^+-K^+ ATPasa y la entrada por otras vías, por lo que alteraciones en estos sistemas de transporte explicarían el aumento del sodio intracelular. Investigaciones previas en cardiomiocitos *in vivo* e *in vitro*, han llegado a resultados contradictorios sobre la regulación de la bomba de sodio por aldosterona, manteniéndose como un tema controversial hasta hoy (Ikeda *et al.*, 1991; Robert *et al.*, 1995; Ramírez-Gil *et al.*, 1998). Por otra parte, estudios en VSMC y en aorta de animales adrenalectomizados con terapia de reposición hormonal (Oguchi *et al.*, 1993; Muto *et al.*, 1996; Michea *et al.*, 1998) muestran regulación génica positiva de la bomba de sodio por aldosterona. En resumen, la bomba de sodio aunque puede ser regulada por aldosterona en tejido vascular, no sería responsable de los trastornos en la concentración intracelular de sodio observado en estados de hiperaldosteronemia. Estos datos hacen posible pensar

que aldosterona podría estar afectando las vías de influjo de sodio del sistema cardiovascular.

Una de las vías de acumulación de sodio más importantes en VSMC y cardiomiocitos es a través del cotransportador NKCC1. La función de este cotransportador en VSMC y cardiomiocitos está relacionada con la regulación del volumen celular a través de la regulación de la concentración de Cl^- intracelular, la cual es mayor a lo esperado en un modelo de distribución pasiva (Chipperfield y Harper, 2000). NKCC1 también tendría un rol fundamental en la proliferación e hipertrofia celular (Panet *et al.*, 2000). La sobreexpresión del gen NKCC1 induce una proliferación celular descontrolada, y la inhibición de NKCC1 no permite la salida de la fase G0/G1 a S1 estimulada por factores de crecimiento en cultivos sincronizados de fibroblastos humanos y células del endotelio vascular de bovino.

NKCC1 es rápidamente activado por hormonas implicadas en diferentes modelos de hipertrofia, como Angiotensina II (Andersen *et al.*, 2000), agonistas α -1 adrenérgicos (Andersen *et al.*, 1998) y aldosterona (Mihailidou, 1998). Además, se ha reconocido que la actividad de NKCC1 aumenta y media parte de la acción vasoconstrictora de los agonistas α -1 adrenérgicos (Akar *et al.*, 2001). Todas estas observaciones sugieren que NKCC1 podría participar como un mediador de la hipertrofia cardíaca.

Exposiciones agudas de miocitos cardíacos *in vitro* a aldosterona aumentan la entrada de Na^+ a través de la activación de NKCC1, demostrando una rápida regulación no genómica en la actividad NKCC1 en el corazón (Mihailidou, 1998). Experimentos con células del músculo liso vascular de ratas espontáneamente hipertensas muestran una actividad NKCC1 alterada, sin embargo, los datos de este último modelo son contradictorios, reportándose aumento o disminución de la actividad, sin estudios de expresión génica (Tokushige *et al.*, 1986; Canessa *et al.*, 1994; Orlov *et al.*, 1995).

III. OBJETIVOS.

Objetivo general.

Estudiar el efecto del hipermineralocorticismo y la dieta rica en sal sobre el cotransportador NKCC1 en tejido arterial y ventricular en relación con los cambios en la reactividad vascular y la hipertrofia ventricular izquierda.

Objetivo específico.

Estudiar la regulación de la expresión génica del cotransportador NKCC1 en tejido cardiaco de ratas uninefrectomizadas tratadas con desoxicorticosterona y dieta rica en sal.

Determinar los niveles relativos de la proteína NKCC1 en tejido cardiaco de ratas uninefrectomizadas tratadas con desoxicorticosterona y dieta rica en sal.

Estudiar los efectos de la uninefrectomía-desoxicorticosterona- dieta rica en sal sobre la contractilidad de la aorta de la rata.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

Animales.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 140 a 180 g de peso. Durante el desarrollo de los experimentos, las ratas fueron mantenidas en el vivero de la Facultad de Medicina de la universidad de Los Andes, que cuenta con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h y temperatura constante de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, con una humedad controlada de 30-40%.

Para el estudio de la regulación de NKCC1 en la hipertensión y en la insuficiencia cardíaca se utilizó el modelo de ratas “DOCA sal”. Este modelo emplea el tratamiento de ratas uninefrectomizadas con el mineralocorticoide desoxicorticosterona acetato (DOCA) y dieta alta en sal. La DOCA produce en ratas un grado similar de hipertensión e hipertrofia cardíaca que el observado con aldosterona. Este modelo experimental es considerado clásico y ha sido ampliamente utilizado para la caracterización de los efectos deletéreos de aldosterona en el tejido cardíaco y arterial, ya que permite el desarrollo de hipertensión arterial e insuficiencia cardíaca en pocas semanas al contar el animal con un sólo riñón. El mismo tratamiento en individuos con 2 riñones llega a requerir para igual daño 3 a 5 meses.

Las ratas fueron separadas aleatoriamente en grupos control y tratamiento, los cuales fueron subdivididos a su vez en grupos de 4, 14 y 32 días. Se utilizaron al menos 5 individuos en cada uno de los grupos estudiados.

El set experimental se elaboró de la siguiente manera:

- Ratas DOCA sal: Para la implementación de este modelo, las ratas fueron anestesiadas utilizando 8 mg de Ketamina (Drag Pharma Invetec ®) y 0,2 mg de Xilazina (Agroland-Alfasan ®) por cada 100 g de peso corporal, por vía intraperitoneal. A continuación se procedió a la extracción total del riñón izquierdo a través de una incisión abdominal ventro-medial. Estos individuos uninefrectomizados se sometieron a una dieta alta en sal a través del agua de bebida, que consistía en una solución de NaCl al 0,9%, adicionada con KCl al 0,3%. La inclusión de KCl tiene por objeto compensar las pérdidas renales de potasio (K^+) que ocurren al administrar un mineralocorticoide. Las ratas DOCA sal recibieron en forma subcutánea, 20 mg/kg de desoxicorticosterona acetato (DOCA) semanalmente, donde a los grupos de 14 y 32 días llegó a administrárseles una 2ª y 3ª dosis para los estudios de los efectos prolongados.

- Ratas Control: Se obtuvieron mediante operación ficticia, anestesiando los ejemplares de la misma forma que con los grupos DOCA sal y practicando una incisión abdominal ventro-medial.

Una vez iniciado los tratamientos, los animales fueron alimentados con dieta estándar y con agua potable (en el caso de los grupos Control) y mantenidos según las recomendaciones para manejo y cuidado de animales de experimentación, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NRC (1996).

Registro de presión sistólica.

Se registró la presión sistólica en ambos grupos de animales, DOCA sal y Control. Para tal procedimiento se utilizó un polígrafo, un manguito de presión adaptado y un micrófono transductor. Las ratas fueron anestesiadas superficialmente con éter, vía

inhalatoria. Posteriormente se colocó en la cola el manguito de presión junto a un micrófono. Previamente el polígrafo había sido calibrado de tal forma que el 100% del volumen contenido en una bomba de goma era equivalente a 200 mm Hg. Se aplicó presión sobre el manguito a través de la bomba hasta alcanzar los 200 mm Hg para de esta forma ocluir el flujo de la arteria caudal de la rata. Acto seguido se abrió la válvula de escape del volumen contenido en el manguito para que gradualmente disminuyera la presión sobre la cola. Una vez que la presión de flujo del vaso superó la del manguito se restableció el pulso arterial, que quedó registrado en el papel milimetrado del polígrafo y que corresponde a la presión sistólica de la rata.

Obtención de tejidos.

Una vez que finalizaron los experimentos, al completarse los días de tratamiento previamente asignados a cada grupo, se procedió a la obtención de los tejidos que serían analizados. Para tal procedimiento se anestesió a los animales de la misma forma como se hizo al inicio de los experimentos y se utilizaron los siguientes tejidos:

- Arteria aorta torácica: Se tomó un anillo de la aorta torácica para ser sometido a estudios de tensión utilizando un polígrafo. El procedimiento se efectuó con máximo cuidado para no dañar ninguna de las capas que conforman el vaso, ya sea a través de sobreestiramiento u otro daño mecánico o químico. Los anillos obtenidos, de entre 4 a 8 mm, se limpiaron lo más posible de todo el tejido adyacente sobre una placa de Petri que contenía una solución tampón de Krebs Ringer (KRB) fría.

- Corazón: Se extrajo la totalidad del tejido cardíaco y se manejó sobre una placa de Petri que contenía KRB, sobre hielo. Se practicó limpieza de tejidos adyacentes y luego se

registró el peso de la masa cardíaca total y del ventrículo izquierdo. Inmediatamente después se le practicaron cortes de diversos pesos que originaron las muestras para extracción de RNA y Proteínas.

Procesamiento de las muestras.

Medición de contractilidad de anillos aórticos.

Una vez obtenidos los anillos aórticos y despojados de todo tejido que no fuera vascular, se dispusieron dentro de unas cámaras de cristal de 30 ml de volumen que contenían solución KRB y con administración constante de una mezcla de gas al 95% oxígeno y 95% CO₂. La temperatura se mantuvo invariable a 37°C gracias al flujo constante de agua desde un contenedor termorregulado impulsado por una bomba peristáltica. Para la sujeción de los anillos aórticos dentro de las cámaras se utilizaron finos ganchos metálicos de acero cromado que discurrían por el lumen del anillo, el cual al ser estirado dentro de la cámara, producía una tensión de un gramo. Este valor había demostrado ser el óptimo aplicable a este tipo de tejido por cuanto con esta tensión se obtiene la contracción máxima con KCl 40 mM. En estas condiciones los tejidos aórticos fueron equilibrados por el lapso de una hora, dentro de la cual se aplicaron lavados que consistían en el recambio de la solución fisiológica de la cámara. La tensión del anillo se iba ajustando hasta que la línea dibujada por el sistema de registro no se movía de la línea base fijada de antemano. La fuerza isométrica ejercida por el músculo liso vascular de la aorta torácica de rata fue registrada en un polígrafo Grass, el cual estaba conectado a un transductor (Biocom TRD 1010 ®). Para estandarizar la técnica, cada anillo se contraía

dos veces con KCl, 40 mM, hasta conseguir una contracción máxima reproducible; después se determinaba la tensión isométrica en presencia de fenilefrina y se calculaba su valor referido a la concentración máxima de KCl.

Procesamiento de tejido cardíaco.

El corazón, una vez extraído y sometido a limpieza de tejidos adyacentes, era desangrado a través de cortes transversales hechos con bisturí e inmediatamente era pesado. Posteriormente se obtenía ventrículo izquierdo para registrar su peso y para obtener muestras que eran usadas para extraer RNA o proteínas

Extracción de RNA.

El proceso de obtención de RNA desde las muestras de ventrículo izquierdo se realizó inmediatamente después de su extracción. 50 a 70 mg de tejido se homogeneizaron 4 veces por 20 segundos en 1 ml de TRIzol (Gibco BRL-Life Technologies ®) a 0°C en homogenizador Pro 200 (PRO Scientific inc ®). El lisado obtenido se traspasó a un tubo de 1,5 ml y se agregó 0,2 ml de cloroformo, se mezcló 20 veces por inversión y 20 veces en vortex, se dejó a temperatura ambiente por 3 minutos y luego se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C en microcentrífuga (Eppendorf ® 5403). Después de centrifugar se forman dos fases. La fase superior acuosa fue traspasada a un nuevo tubo de 1,5 ml y se agregó 0,5 ml de isopropanol 100%, frío. La muestra se guardó a -80°C por media hora y luego se centrifugó a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C con lo que el RNA precipitó y formó un pellet blanco. El sobrenadante fue removido y se lavó el pellet con 1 ml de etanol 75% enfriado en hielo, se agitó en vortex

y se centrifugó a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C, el sobrenadante se removió y se dejó secar el RNA a temperatura ambiente por 5 minutos, luego de lo cual se resuspendió el pellet en 30 µl de agua bidestilada tratada con 0.09% de Dietilpirocarbonato, DEPC (Sigma Chem. ®); Se incubó 5 minutos a 65°C y se alicuotó para luego almacenarlo a -80°C.

Electroforesis de RNA.

Para verificar la integridad del RNA total obtenido, se utilizó el método de electroforesis horizontal desnaturante en gel de agarosa 1,2% (p/v)-formaldehído 6% (v/v) en tampón MOPS (ácido 3-(N-morpholino) propanosulfónico 20 mM, acetato de sodio 8 mM, EDTA 1 mM, pH 7,2). Las muestras se cargaron en el gel con la solución tampón de carga (formamida 50% (v/v), glicerol 25% (v/v), azul de bromofenol 0,12% (p/v), bromuro de etidio 0,1% µg/µl, formaldehído 20%) y la electroforesis se realizó a 90 volt utilizando una fuente de poder (PS 3002 GibcoBRL-Life Technologies). Para la visualización de las bandas, el gel fue expuesto a la luz ultravioleta y se obtuvo la imagen digital con el sistema de captura de imágenes Kodak DS 120. La imagen se analizó en el programa Adobe Photoshop 6.0. Para determinar la abundancia relativa de las bandas de RNA de 28's y 18's, se calculó la integral de la fluorescencia de cada banda. Se aceptaron las muestras cuya razón fue superior a 1,8. Para determinar la concentración del RNA se realizó un análisis densitométrico utilizando como estándar un RNA de ventrículo de rata de concentración conocida.

RT-PCR semicuantitativo.

La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo con el kit de InProm-II Transcription System (Promega ®). Se utilizó 0,5 µg de RNA total junto a 0,4 µg de *random primer* para el RNA extraído desde los ventrículos. La mezcla se llevó a un volumen de 5 µl con agua libre de nucleasas y se incubó a 70°C por 5 min y luego a 4°C por 5 min. Se preparó una mezcla de reacción con tampón para RT, MgCl₂ 3,75 mM, dNTP 0,375 mM, 20 unidades del inhibidor de ribonucleasa *Recombinant RNasin* y 1 µl de la enzima transcriptasa reversa InProm-II. Se le agregaron 15 µl de la mezcla a cada tubo. Se incubaron a 25°C por 5 min, luego a 42°C por 60 min, y finalmente a 70°C por 15 min. Luego se enfría en hielo al menos por 5 min. El cDNA obtenido fue inmediatamente almacenado a -20°C hasta su uso en reacciones de PCR.

La doble hebra de cDNA fue sintetizada y amplificada mediante PCR utilizando 1 µl de cDNA de ventrículo, más el siguiente medio de reacción: Solución tampón (Tris-HCl 75 mM, pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, Tween 20 0,01%), dNTP 0,2 mM, partidor sentido y antisentido NKCC1 0,1 µM cada uno, MgCl₂ 1,5 mM, Taq DNA polimerasa (Fermentas ®) 1 unidad. Se realizaron 30 ciclos de amplificación para el cDNA de ventrículo en el termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf ®). Para corregir cargas, al término del ciclo 16 se bajó la temperatura a 25°C, se detuvo momentáneamente la reacción, y se agregó medio de reacción más partidor sentido y antisentido 18s 1 µM. Los partidores NKCC1 fueron diseñados ocupando el programa computacional Primer3 disponible en Internet (www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) para amplificar un fragmento de 220 pares de bases a partir de la secuencia de mRNA NKCC1 de rata obtenida en el GenBank: partidor sentido

(5'-ATG GAG TTG TGG TCA TTC GCC TA-3) partidor antisentido (5'-GGC TGA GTT GAA GTC TTG CCA TC -3'). Los partidores 18s amplifican un fragmento de 312 pares de bases de la subunidad 18s del RNA ribosomal de rata, las secuencias fueron obtenidas de Su, *et al* (2002): partidor sentido (5'-CGA CGA CCC ATT CGA ACG TCT -3') partidor antisentido (5'-GCT ATT GGA GCA TGG AAT TAC CG -3'). Las reacciones se llevaron a cabo utilizando el siguiente programa: denaturación inicial: 3 min a 95°C; denaturación: 30 seg a 94°C; apareamiento: 30 seg a 66°C; extensión: 30 seg a 72°C; extensión final: 7 min a 72°C.

Experimentos preliminares fueron realizados para determinar las condiciones óptimas del RT-PCR, en las cuales la cantidad de producto de PCR generada era proporcional a la cantidad de RNA total utilizada como templado en la reacción de transcripción reversa. Se construyó una curva de RNA total v/s producto de PCR utilizando diferentes cantidades de RNA de ventrículo (0,2 a 1 µg). Basados en estos resultados se trabajó con 0,5 µg de RNA total como templado en la transcripción reversa (figura 4). Luego se determinó el número de ciclos de PCR en los que la reacción de amplificación se encontraba en la fase exponencial para los productos NKCC1 y 18s en el tejido (figura 5). La ausencia de contaminación genómica se confirmó utilizando muestras de RNA total, no sometidos a transcripción reversa, como templado en reacciones de PCR. Además, en cada grupo de experimentos de PCR, se incluyó un control negativo, en el cual el cDNA fue reemplazado por agua. Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentaje respecto del control (100%) y corresponden a la razón entre NKCC1/18s.

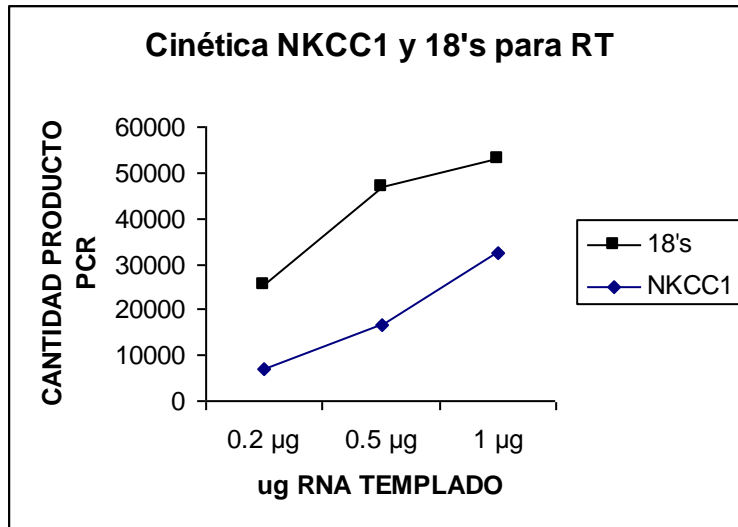


Figura 4: Estandarización de la cantidad de RNA total para la determinación semicuantitativa de mRNA NKCC1 en el RT.

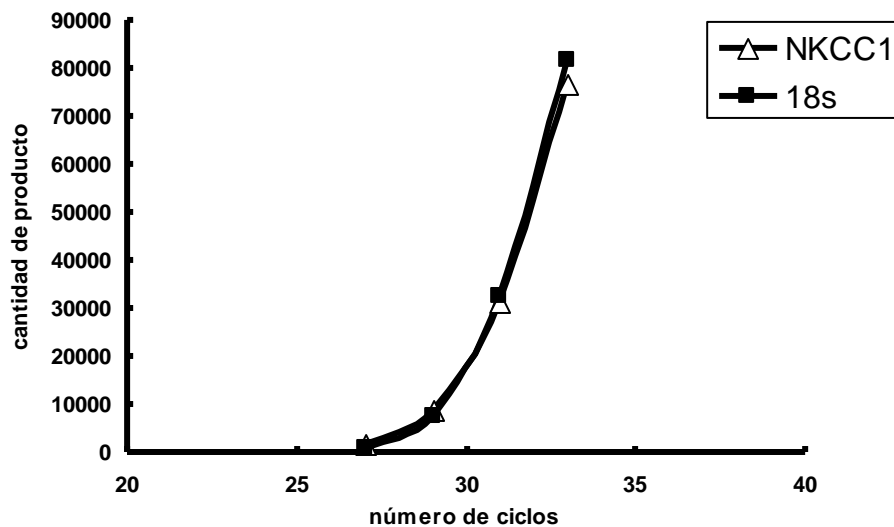


Figura 5: Optimización de las condiciones del PCR para una amplificación exponencial de NKCC1. El número de ciclos corresponden a la amplificación de NKCC1 (al término del ciclo 16 se agregaron los partidores para 18's).

Electroforesis de DNA.

Para la separación de fragmentos de DNA obtenidos en la reacción de PCR, se utilizó el método de electroforesis horizontal en gel de agarosa 1,5% (v/v), con el colorante Gelstar 1× (FMC), en tampón TBE (Tris-borato 0,045 M, pH 8,0, EDTA 0,001 M). Como marcador de peso molecular se utilizó el estándar 100 bp DNA Ladder (Fermentas ®). Las muestras fueron cargadas en el gel con tampón de carga (Ficoll 400 2,5%, azul de bromofenol 0,005%, xilencianol 0,005%), y separadas utilizando la fuente de poder (PS 3002 GibcoBRL-Life Technologies) a 90 volt. La exposición del gel a la luz ultravioleta permitió observar los fragmentos de DNA y obtener la imagen digital que fue analizada con el programa Adobe Photoshop 6.0 para determinar la abundancia relativa de NKCC1 y la subunidad ribosomal 18's.

Preparación de membranas.

Los fragmentos de ventrículo izquierdo seleccionados para extracción de proteínas fueron lavados en solución fisiológica Krebs-Ringer fría y homogeneizados (4 veces por 12 seg a máxima velocidad en un Polytron, Luzern, Suiza) en 3 ml de tampón de extracción frío que contenía EGTA 1,2 mM, MgCl₂•6H₂O 2,5 mM, sacarosa 250 mM, Tris•HCl 50 mM; pH 7,4 y una tableta de inhibidores de proteasas (Roche) cada 15 ml de tampón. El homogeneizado fue centrifugado a 3.000 \times g por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante fue centrifugado a 150.000 \times g por 90 minutos a 4°C. Las membranas se resuspendieron en 70 a 200 μ l de tampón de resuspensión (EGTA 1,2 mM, MgCl₂•6H₂O 2,5 mM, KCl 120 mM y Tris•HCl 50 mM; pH 7,4) y se almacenaron a -80°C.

Detección de NKCC1 mediante Western blot.

Las muestras de proteínas de la fracción cruda de membrana fueron solubilizadas al incubarlas a 37°C con deoxicolato de sodio 0,1 M y SDS 3%. Su concentración fue determinada utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA, Pierce). La curva de calibración se realizó con cantidades crecientes de albúmina sérica bovina comercial (1mg/ml) para cada set de muestras, éstas se midieron por triplicado en una microplaca de 96 pocillos de fondo plano a 570 nm en el espectrofotómetro (BIO TEK EL311).

Para la electroforesis de proteínas, se utilizaron geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) al 7,5% gel resolutivo (4 ml H₂O bidestilada, 2,5 ml acrilamida-bisacrilamida 30%, 2,5 ml Tris 1,5 M pH 8,8, 100 µl SDS 10%, 100 µl persulfato de amonio 10% (APS) y 5 µl N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)). Previo a agregar APS y TEMED, la mezcla se desgasificó en el sonicador (Branson, modelo B200) por 10 min a temperatura ambiente. Los geles se armaron en la unidad *Mini-Protean II* (Bio-Rad) con un espesor de 0,75 mm. Las muestras se mezclaron 1:1 con tampón de carga 4X (Tris-HCl pH 6,8 0,25M, glicerol 50%, SDS 10%, β-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,5%) y calentaron a 37°C por 15 min. Se ocupó estándar de proteína preteñido (Invitrogen ®) para calcular el peso aproximado de NKCC1. Para la migración de las proteínas, se ocupó una fuente de poder (EX 250 GibcoBRL-Life Technologies) a 200 volts y por 45 min en tampón de corrida (Tris 1,5%, glicina 7,2%, SDS 0,5%).

En la electrotransferencia se usaron membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Immobilon-P, Millipore) en una cámara de transferencia semiseca (Trans-Blot-SD, Bio-Rad). La técnica requirió la preparación de 3 tampones: cátodo (Tris 25 mM pH

9,4, glicina 40 mM, metanol 10% (v/v)); ánodo I (Tris 0,3 M pH 10,4, metanol 10% (v/v)); ánodo II (Tris 25 mM pH 10,4, metanol 10% (v/v)). Luego de la electroforesis, se sumergió el gel resolutivo en tampón cátodo por 15 minutos a temperatura ambiente, 2 papeles filtro en tampón ánodo I, 1 min en ánodo II y 3 min en tampón cátodo. La membrana fue hidratada sumergiéndola por 15 seg en metanol, 2 minutos en agua bidestilada, y 5 min en ánodo II. El sistema de transferencia se armó colocando desde el ánodo de la cámara al cátodo: 2 papeles filtro ánodo I, 1 papel filtro ánodo II, membrana, gel, 3 papeles filtro cátodo. Se transfirió a 110 mA por 1 a 1:30 h. La membrana se bloqueó toda la noche a 4°C con agitación constante usando 5% leche descremada en solución salina Tris (Tris 20 mM pH 7,6, 0,8% NaCl) más 0,1% Tween 20 (TTBS). Luego fue lavada 2 veces por 5 min con TTBS para eliminar la leche. Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo policlonal de conejo anti-NKCC1 (α -wCT, diseñado contra el segmento 750 -1203 de la proteína NKCC1 de rata) diluido 1/4.000 en TTBS 0,1% azida. La membrana fue lavada nuevamente 3 veces por 5 min y 2 veces por 10 min con TTBS 0,1% leche. La incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa de rabanito (Pierce) diluido 1/20.000 TTBS 1% leche, fue por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana fue lavada 4 veces por 5 min y 2 veces por 10 min con TTBS, luego fue incubada por 1 min con el reactivo quimioluminiscente (ECL, Amersham). La membrana fue puesta en contacto con la película (BioMAX, Kodak) en cassette que contenía pantallas intensificadoras. Las películas obtenidas se escanearon utilizando el programa de captación y análisis de imágenes Adobe Photoshop y se guardaron en formato Tiff. La señal fue cuantificada por análisis densitométrico utilizando el programa Phoretix 1D Advanced Version 3.0. La corrección de cargas se

hizo utilizando geles sin transferir teñidos con azul de Coomassie. Los cálculos de las intensidades de las bandas obtenidas en Phoretix se realizaron a través de una hoja de cálculo Excel.

Para la inmunodetección de NKCC1 se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón T4 (DSHB, Universidad de Iowa, dirigido contra la región 902 - 1212 de la proteína NKCC1 humana) 1/500 siguiendo el mismo protocolo antes descrito, sin embargo en la incubación con el anticuerpo secundario, se usó un anti-ratón conjugado a peroxidasa de rabanita (Kpl) 1/20.000.

Análisis estadístico.

Los resultados se expresan como promedio \pm error estándar. Las comparaciones estadísticas entre dos grupos se efectuaron mediante la prueba de T de Student, y entre tres grupos mediante la prueba ANOVA, para muestras pareadas. Los promedios se consideraron con una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $P < 0,05$.

V. RESULTADOS.

5.1 Efecto del tratamiento DOCA sal sobre la presión sistólica de las ratas a los 4 y 32 días.

La presión sistólica de ratas DOCA-sal de 4 días no mostró diferencias significativas con respecto a las controles. El valor promedio de la presión sistólica en las ratas DOCA sal, en mm Hg, fue de $95 \pm 12,9$; mientras que el promedio en el grupo control fue de $98,75 \pm 2,5$ mm Hg. Ver figura 6.

La presión sistólica de las ratas DOCA sal a los 32 días de tratamiento reveló diferencias significativas en comparación a su grupo control ($P < 0.01$). El valor promedio en el grupo DOCA sal fue de $136,25 \pm 6,29$ mm Hg. El valor promedio en el grupo control fue de $106,25 \pm 11,81$ mm Hg. Ver figura 7.

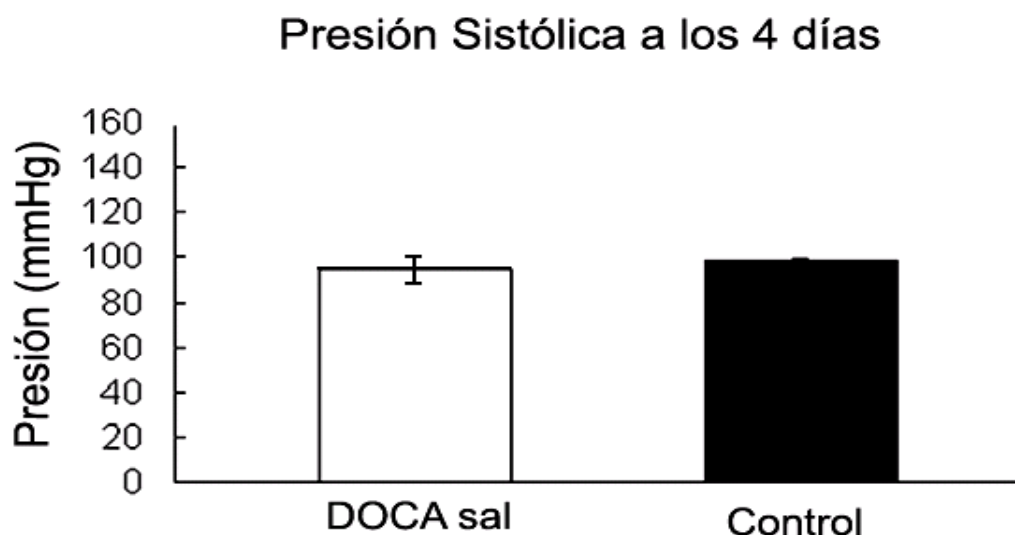


Figura 6: Valores promedio de presión sistólica en ratas DOCA-sal y control a los 4 días de tratamiento (n=4).

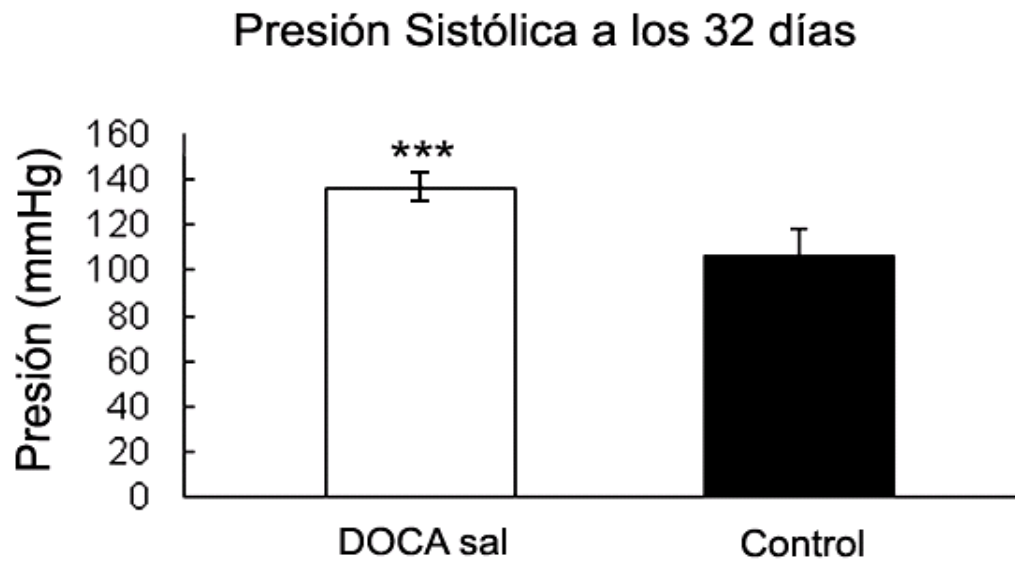


Figura 7: Valores promedio de presión sistólica en ratas DOCA-sal y control a los 32 días de tratamiento (n=4, *** $P < 0,01$).

5.2 Efectos del tratamiento DOCA sal sobre la hipertrofia cardíaca a los 4, 14 y 32 días.

El tratamiento DOCA sal indujo un aumento progresivo del peso del ventrículo izquierdo con respecto al peso corporal que fue imperceptible a los 4 días pero que se hizo notorio a los 14. Finalmente esta diferencia fue significativa estadísticamente a los 32 días, con un $p < 0,05$.

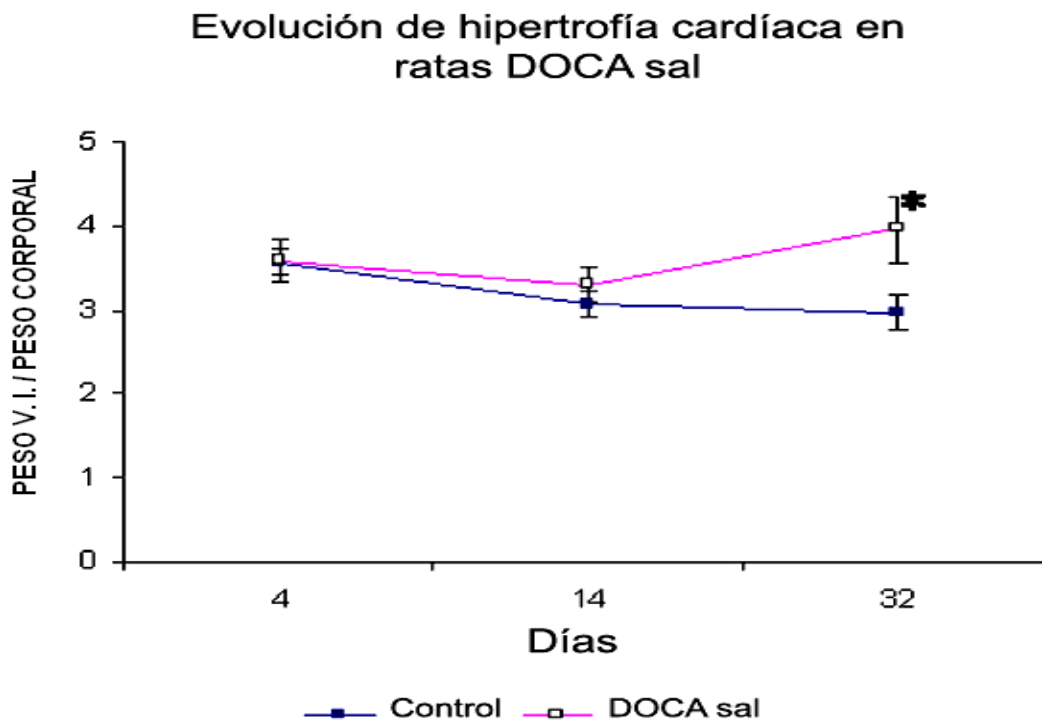


Figura 8: Curva de evolución de la razón peso corazón (V.I.) v/s peso corporal. El tratamiento DOCA sal produjo un aumento progresivo del ventrículo izquierdo (V.I.), medido en mg, desde los 4 días, que se hizo estadísticamente significativo a los 32. El peso corporal se midió en g.

5.3 Valores de contractilidad de anillos aórticos.

Los resultados de la serie experimental con ratas DOCA sal y control demostraron que el músculo liso vascular de los anillos aórticos de las ratas con tratamiento presenta una mayor reactividad a la fenilefrina que aquellos provenientes del grupo control, considerando el peso del anillo. Esta diferencia es significativa con un $P < 0,05$ y $n=4$. Ver figura 9.

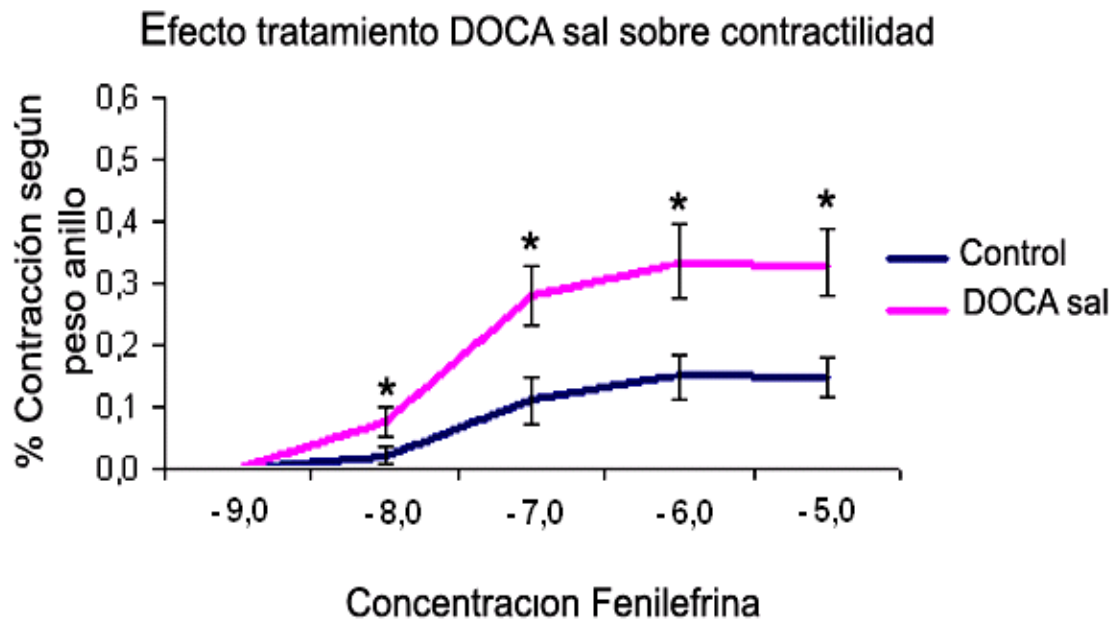


Figura 9: Curva de contractilidad de anillos aórticos de ratas DOCA sal y control a dosis crecientes de fenilefrina considerando el peso del anillo aórtico. ($n= 4$, $P < 0,05$)

5.4 Efecto del tratamiento DOCA-sal sobre la abundancia del mRNA NKCC1 en ventrículo izquierdo a los 4 y 32 días.

La abundancia del mRNA NKCC1 en ratas DOCA sal y control se determinó por RT-PCR semicuantitativo en ventrículo izquierdo de ratas de 4 y 32 días.

Como se puede apreciar en la figura 10A, utilizando partidores específicos para NKCC1 se obtuvo un producto amplificado de 220pb. Las cargas fueron corregidas amplificando un segmento de 312pb de la subunidad ribosomal 18s.

No se observó contaminación genómica en las muestras de RNA, al usar éstas como templado en reacciones de PCR. Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentaje respecto del control (figura 10B).

No se observaron diferencias significativas en la expresión del mRNA de NKCC1 en ventrículo izquierdo de ratas DOCA sal y control.

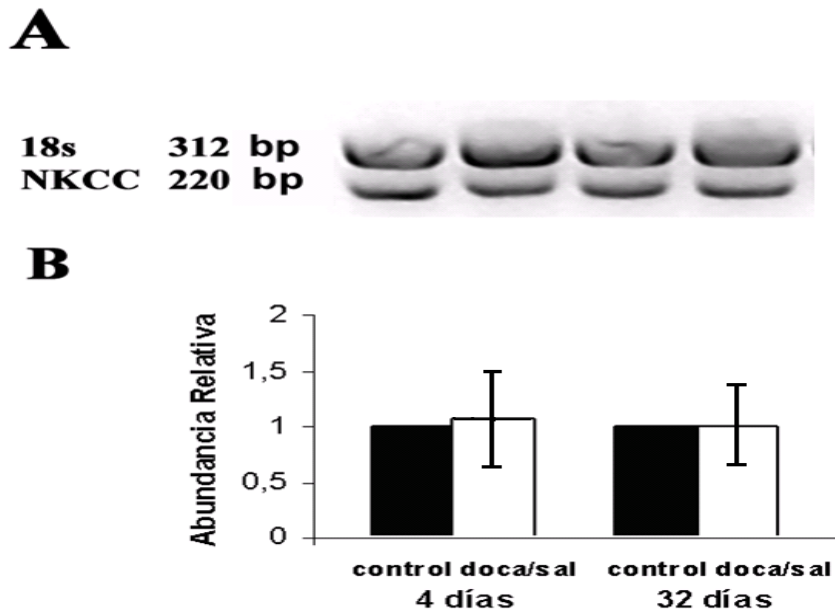


Figura 10A: Negativo de las bandas representativas del producto de PCR. Se indica bandas correspondientes a 18s y NKCC1 y sus respectivos pesos. **Figura 10B:** Abundancia relativa de mRNA NKCC1 en ventrículo izquierdo de ratas DOCA sal y control. No se observan diferencias significativas entre los grupos (n=4).

5.5 Efecto del tratamiento DOCA-sal sobre la abundancia de la proteína NKCC1 en ventrículo.

La abundancia de la proteína NKCC1 en ventrículo izquierdo de ratas DOCA-sal y control a los 4, 14 y 32 días se determinó por Western Blot. Como se muestra en la figura 4.4A, existe un aumento significativo de la proteína en ratas DOCA-sal de 4 y 14 días. Se observa también una restitución a valores similares al control en la abundancia de la proteína a los 32 días.

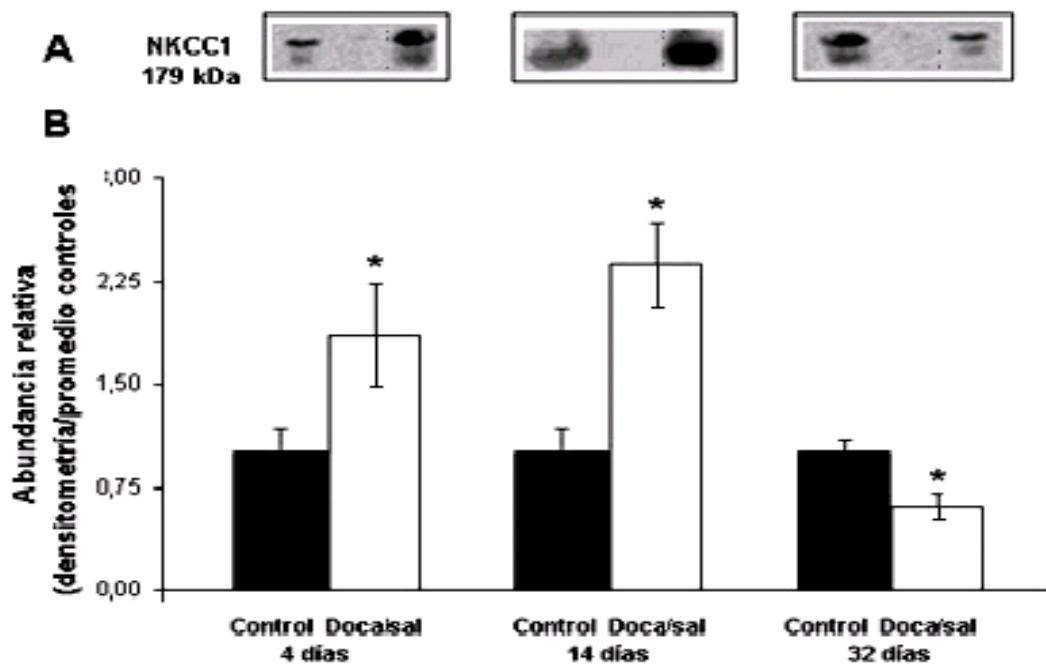


Figura 11A: Análisis del Western Blot de NKCC1 en ventrículo izquierdo de ratas DOCA-sal y control a los 4, 14 y 32 días. Se indica banda correspondiente a NKCC1 de control y DOCA sal, y su peso. **Figura 11B:** Cuantificación de la abundancia proteica de NKCC1. Se observa un aumento de NKCC1 a los 4 y 14 días con respecto a sus controles, y una disminución de la proteína a los 32 días con respecto a su control.

VI. DISCUSIÓN.

Los efectos deletéreos de los mineralocorticoides sobre el sistema cardiovascular dependen de manera crucial del balance de sodio del animal (Young *et al.*, 1995). Los dos mineralocorticoides más potentes son la aldosterona y la desoxicorticosterona, esta última es a la vez un precursor biosintético de aldosterona, ambas hormonas tienen su origen en las glándulas suprarrenales. Es sabido que una dieta con alto contenido de sodio es un factor de riesgo para el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda en humanos, y un aumento del consumo de NaCl en ratas induce hipertrofia cardíaca sin aumento de la presión sanguínea (Messerli *et al.*, 1997). Los mecanismos moleculares implicados en los efectos putativos de la sal son controversiales, en parte porque el aumento de la presión sanguínea es un factor importante en la generación de hipertrofia cardíaca, y la mayoría de las investigaciones, incluyendo la presente investigación, han combinado una dieta rica en NaCl con la administración de desoxicorticosterona.

Como se mencionó, niveles excesivos de aldosterona provocan fibrosis vascular y miocárdica (Stowasser, 2001). En diversos estudios se ha visto que existe un aumento del Na⁺ intracelular en células de corazón con hipertrofia cardíaca compensada. En el corazón existen diversos transportadores de sodio que han sido ampliamente estudiados, pero poco se sabe del cotransportador sodio-potasio-cloruro (NKCC) en dicho tejido, lo que motivó el presente estudio. NKCC1 ha sido relacionado en otros tejidos con la proliferación e hipertrofia celular (Panet, 2000).

El análisis de los resultados demuestra que un incremento en los niveles de mineralocorticoides circulantes en el contexto de un alto nivel de NaCl en la dieta, genera

un aumento en la abundancia del cotransportador NKCC1 en ventrículo izquierdo a los pocos días y un aumento en la respuesta contráctil de la arteria aorta. Ambos efectos favorecen el desarrollo de HTA e hipertrofia cardíaca. El aumento de la abundancia de la proteína NKCC1 sugiere que es probable que la actividad del cotransportador se encuentre aumentada en el ventrículo izquierdo de las ratas DOCA sal. Un fenómeno similar podría estar involucrado en el aumento de la contractilidad de los anillos aórticos, al favorecer una mayor respuesta contráctil frente a agonistas vasoconstrictores, como se demuestra en el presente estudio. Este cambio observado podría deberse a la capacidad de NKCC1 de modular el potencial de membrana al producir aumentos sobre el Na^+ (Pogwizd *et al.*, 2003) y el Cl^- intracelulares (Lamb y Barna, 1998). El aumento en la concentración de sodio intracelular podría inducir aumentos en la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Por esta vía, la mayor entrada de calcio implicaría un aumento en el nivel de repleción de los depósitos de calcio intracelulares, y por ende un aumento en la liberación de calcio desde los depósitos inducida por agonistas o estímulos tónicos (Juhazova y Blaunstein, 1997). Además, esta nueva condición se traduciría en un cambio en el potencial de membrana, que se ajusta a un nivel cercano al de depolarización, haciendo más sensible el tejido frente a agonistas vasoconstrictores (Lamb y Barna, 1998; Brown *et al.*, 1999). Por su parte, el aumento del cloruro intracelular, mediado por NKCC1, implicaría una mayor concentración de cloruro intracelular. Al ocurrir la depolarización, por ejemplo después del estímulo con fenilefrina, se abren canales de cloruro activados por calcio. Debido a que el cloruro está acumulado por sobre su concentración de equilibrio, sale de la célula, depolarizando la membrana. Se estabiliza así la depolarización y apertura de canales de calcio tipo L, sensibles a potencial (Brown

et al., 1999). Es probable que algún tipo de regulación por parte de los mineralocorticoides sobre NKCC1 en el tejido muscular liso vascular permita o favorezca la presentación de la HTA afectando la RPT. Es importante señalar al respecto que experimentos hechos con ratones mutantes homocigotos deficientes del gen NKCC1 (*nkcc1*^{-/-}) presentan una disminución significativa de la presión arterial media (Flagella *et al.*, 1999). No cabe duda que esta materia genera controversias y que se requiere de futuros estudios al respecto.

Por otra parte, estudios hechos con ratas adrenalectomizadas demuestran que los mineralocorticoides presentan regulación positiva sobre la actividad y expresión de NKCC1 en tejido arterial (Dünner, 2003; Jiang, 2003).

En relación a las acciones cardíacas de aldosterona, existe numerosa evidencia que confirma que la HTA que se observa en el modelo experimental DOCA sal no es el único responsable de los cambios estructurales que ocurren en el corazón (Young *et al.*, 1995; Stowasser, 2001). Como ya se ha mencionado, el presente trabajo ha demostrado un aumento significativo de la abundancia de la proteína NKCC1 en ventrículo izquierdo de ratas en tratamiento DOCA sal (Fig. 11A y B). Este aumento, no obstante, no fue observado a nivel del mRNA. Esto es indicativo que el incremento visto no es un efecto a nivel de la abundancia del transcrito NKCC1. Efectos similares son importantes para la función de otras proteínas transportadoras, como ENaC. Para esta última, la abundancia de los canales de sodio en la membrana depende de modo fundamental de la regulación de la velocidad de degradación, dependiente de la ubiquitinización, que es regulada negativamente por aldosterona. La existencia de un mecanismo similar para NKCC1 en los cardiomiocitos es una alternativa atractiva, que

requerirá futuras investigaciones. Hasta hace poco la localización subcelular de NKCC1 en cardiomiocitos era desconocida; en experimentos realizados por Dünner (2003), utilizando anticuerpos específicos y microscopía confocal, se observó la presencia de NKCC1 en las membranas del sarcolema de los cardiomiocitos de ventrículo izquierdo de la rata, y sólo en menor medida intracelularmente. Estos resultados indican que NKCC1 no se encuentra en la red de túbulos T, la cual tiene una organización reticular compleja en este tejido. NKCC1 se ubica principalmente paralelo al eje de marcaje de los sarcómeros, sugiriendo una distribución a lo largo del eje de generación de fuerza en los cardiomiocitos. Esta distribución es similar a la descrita para otros transportadores de cloruro en el corazón (Britton *et al.*, 2000), e indica que la proporción de NKCC1 almacenado en los *pooles* intracelulares no es mayoritaria.

Aumentos en la expresión de NKCC1 en el corazón podrían implicar una potenciación de las acciones no-genómicas de aldosterona en el cardiomiocito. La actividad NKCC1 aumenta rápidamente a los 15 minutos, luego de la estimulación con aldosterona de cardiomiocitos aislados. Esta activación implicaría aumentos de la concentración de sodio intracelular, ya que se asocia a la activación secundaria de la bomba de sodio (Mihailidou *et al.*, 1998; Mihailidou *et al.*, 2004). Esta activación dependería de la proteína quinasa C, de modo similar a lo reportado para otros efectos no-genómicos de aldosterona en células excitables del sistema cardiovascular (Michea *et al.*, 2005). Por ello, es probable que en el contexto de un aumento en la expresión de NKCC1 en el corazón de animales DOCA sal, las acciones cardíacas no genómicas de aldosterona se vean potenciadas.

El aumento de la expresión de NKCC1 en el corazón también tiene implicancias en los mecanismos de acción de agonistas adrenérgicos en el corazón. Se ha demostrado que la activación por este ligando del receptor alfa1 adrenérgico induce un aumento de la actividad NKCC1, dependiente de fosforilación por la MAP-quinasa ERK y proteína quinasa C, que es necesario para producir una respuesta contráctil a fenilefrina (Andersen *et al.*, 2004).

Junto con los potenciales efectos sobre la contractilidad, la sobreexpresión de NKCC1 podría tener importantes efectos tróficos. Se ha demostrado en células de cultivo que el bloqueo del cotransportador NKCC1 inhibe la proliferación celular frente a estímulos con diversos factores tróficos (Panet, 2000). Además, NKCC1 es activado por hormonas implicadas en diferentes modelos de hipertrofia, como Angiotensina II (Andersen *et al.*, 2000), agonistas α -1 adrenérgicos (Andersen *et al.*, 1998) y aldosterona (Mihailidou *et al.*, 1998). Esto sugiere que la inducción temprana de NKCC1 en ventrículo izquierdo de ratas DOCA sal sería uno de los factores que podría estar involucrado en la hipertrofia y remodelación cardiaca observada. Como ha sido sugerido, el efecto trófico sería dependiente de la activación génica en respuesta al aumento del flujo de sodio y/o la concentración de sodio intracelular, que aumentan el volumen celular.

En resumen, en el presente trabajo se describe por primera vez el aumento de la expresión del cotransportador NKCC1 en tejido cardíaco de animales sometidos a dieta rica en NaCl y exceso de mineralocorticoides. Este nuevo mecanismo puede tener importantes implicancias para la homeostasis del sodio intracelular en la respuesta rápida

a aldosterona y catecolaminas, afectando la contractilidad y el crecimiento del cardiomiocito.

VII. CONCLUSIONES

1. El tratamiento DOCA sal produjo un aumento significativo sobre la abundancia del cotransportador NKCC1 en ventrículo izquierdo de ratas macho de la cepa Sprague Dawley a los 4 y 14 días de tratamiento en comparación con ratas control de igual número de días.
2. La expresión génica del cotransportador NKCC1 no se ve alterada con el tratamiento DOCA sal al no detectarse cambios en la expresión del RNA mensajero desde las muestras provenientes de ratas sometidas a tratamiento.
3. Anillos aórticos aislados de ratas DOCA sal presentaron una mayor reactividad vascular frente al estímulo del agonista vasoconstrictor fenilefrina.
4. Se observa una evidente y progresiva hipertrofia ventricular izquierda en las ratas DOCA sal, la que se hace significativa al cabo de 32 días.
5. Es probable que la vía mediante la cual los mineralocorticoides, en el contexto de una dieta rica en sodio, provocan los conocidos trastornos hipertensivos, hipertróficos y de aumento de reactividad vascular se deba, en parte, a un mayor protagonismo del cotransportador NKCC1, que demuestra un aumento en su abundancia bajo la condición DOCA sal.
6. Estos resultados permiten postular una activa participación del cotransportador NKCC1 en los cambios cardiovasculares que se observan frente a una ingesta alta en sal y niveles altos de mineralocorticoides. Se espera que en el futuro se esclarezca la magnitud de la participación de este cotransportador en patologías como la hipertensión y la insuficiencia cardíaca, para que se establezcan medidas terapéuticas que contribuyan a la recuperación de la salud a través de los datos específicos que éste y otros estudios aporten, como el bloqueo de la actividad de NKCC1, la disminución de la ingesta de sodio dietario y/o la determinación de los niveles circulantes de aldosterona, desoxicorticosterona y otros mineralocorticoides biológicamente activos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

AKAR, F., JIANG, G., PAUL, R., O'NEILL, C. (1999a). Contractile regulation of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 281: 579-584.

AKAR, F., JIANG, G., PAUL, R., O'NEILL, C. (1999b). Vasoconstrictors and nitrovasodilators reciprocally regulate the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter in rat aorta. *Am. J. Physiol.* 276: 1383-1390.

AKAR, F., JIANG, G., PAUL, R., O'NEILL, C. (2001). Contractile regulation of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol Cell. Physiol.* 281: 579-584.

ALZAMORA, R., MICHEA, L., MARUSIC, E.T. (2000). Role of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase in non-genomic aldosterone effects in human arteries. *Hypertension* 35: 1099-1105.

ALZAMORA R, MARUSIC E.T., GONZALEZ M, MICHEA L. (2003) Nongenomic effect of aldosterone on $\text{Na}^+\text{,K}^+$ -adenosine triphosphatase in arterial vessels. *Endocrinology.* 144(4): 1266-1272.

ANDERSEN, G.O., ENGER, M., SKOMEDAL, T., OSNES, J.B. (2000). Angiotensin II activates a bumetanide sensitive increase in $^{86}\text{RB}^+$ efflux in the rat heart. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 107: 89-104.

ANDERSEN, G.O., ENGER, M., THORESEN, G.H., SKOMEDAL, T., OSNES, J.B. (1998). Alpha1-adrenergic activation of myocardial Na-K-2Cl cotransport involving mitogen-activated protein kinase. *Am. J. Physiol.* 275: H641-H652.

ANDERSEN, G.O., SKOMEDAL, T., ENGER, M., FIDJELAND, A., BRATTELID, T., LEVY, F.O., OSNES, J.B. (2004). Alpha1-AR-mediated activation of NKCC in rat cardiomyocytes involves ERK-dependent phosphorylation of the cotransporter. *Heart Circ. Physiol.* 286(4): H1354-1360.

ARRIZA, J.L., WEINBERGER, C., CERELLI, G., GLASER, T.M., HANDELIN, B.L., HOUSMAN, D.E., EVANS, R.M. (1987). Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science.* 237: 268-275.

ATTALI, B., LATTER, H., RACHAMIN, N., GARTY, H. (1995). A corticosteroid-induced gene expressing an "IsK-like" K⁺ channel activity in *xenopus* oocytes. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6092-6096.

BLAZER-YOST B.L., PAUNESCU, T.G., HELMAN, S.I., LEE, K.D., VLAHOS, C.J. (1999). Phosphoinositide 3-kinase is required for aldosterone-regulated sodium reabsorption. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 277: 531-536.

BOOTH, R.E., JOHNSON, J.P., STOCKAND, J.D. (2002). Aldosterone. *Advan. Physiol. Educ.* 26: 8-20.

BRILLA, C.G., MATSUBARA, L.S., WEBER, K.T. (1993). Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 25: 563-575.

BRILLA, C.G., PICK, R., TAN, L.B., JANICKI, J.S., WEBER, K.T. (1990). Remodeling of the rat right and left ventricle in experimental hypertension. *Circ. Res.* 67: 1355.

BRITTON, F., HATTON, W., ROSSOW, C., DUAN, D., HUME, J., HOROWITZ, B. (2000). Molecular distribution of volume-regulated chloride channels (CIC-2 and CIC-3) in cardiac tissues. *Am. J. Physiol.* 279: 2225-2233.

BROWN, R., CHIPPERFIELD, A.R., DAVIS, J.P., HARPER, A.A. (1999). Increased ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$) cotransport in rat arterial smooth muscle in DOCA/salt-induced hypertension. *J. Vasc. Res.* 36: 492-501.

CANESSA, M., SALAZAR, G., WERNER, E., VALLEGA, G., GONZALEZ, A. (1994). Cell growth and Na-K-Cl cotransport responses of vascular smooth muscle cells of Milan rats. *Hypertension* 23: 1022-1026.

CAPURRO, C., COUNTRY, N., BONVALET, J.P., ESCOUBET, B., GARTY, H., FARMAN, N. (1996). Cellular localization and regulation of CHIF in kidney and colon. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 271: 753-762.

CHIPPERFIELD, A.R., HARPER, A.A. (2000). Chloride in smooth muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 74: 175-221.

CHO, J.H., MUSH, M.W., BOOKSTEIN, C.M., MCSWINE, R.L., RABENAU, K., CHANG, E.B. (1998). Aldosterone stimulates intestinal Na^+ absorption in rats by increasing NHE3 expression of the proximal colon. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 274: 586-594.

CHRISANT S.T. (1998). Vascular remodeling: the role of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Am. Heart J.* 135: 21-30.

CHRIST, M., MEYER, C., SIPPEL, K., WEHLING, M. (1995). Rapid aldosterone signaling in vascular smooth muscle cells: involvement of phospholipase C, diacylglycerol and protein kinase C alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213: 123-129.

DAVIS, J.P., CHIPPERFIELD, A.R., HARPER, A.A. (1993). Accumulation of intracellular chloride by (Na⁺-K⁺-Cl⁻) co-transport in rat arterial smooth muscle is enhanced in deoxycorticosterone acetate (DOCA)/salt hypertension. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 25: 233-237.

DELCAIRE, C., SILVESTRE, J.S., GARNIER, A., OUBENAISA, A., CAILMAIL, S., TATARA, E., SWYNGHEDAUW, B., ROBERT, V. (2000). Cardiac aldosterone production and ventricular remodeling. *Kidney Int.* 57: 1346-1351.

DOOLAN, C.M., O'SULLIVAN G.C., HARVEY B.J. (1998). Rapid effects of corticosteroids on cytosolic protein kinase C and intracellular calcium concentration in human distal colon. *Mol. Cell. Endocrinol.* 138: 71-79.

DORRANCE, A.M., OSBORNE H.L., GREKIN, R., WEBB, R.C. (2001). Spironolactone reduces cerebral infarct size and EGF-receptor mRNA in stroke-prone rats. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 281: 944-950.

DOWD, B.F., FORBUSH, B. (2003). PASK: a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *J. Biol. Chem.* 278: 27347-27353

DÜNNER, N. 2003. Regulación de la expresión del cotransportador NKCC1 por aldosterona en tejido cardiovascular. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile. Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. 51 p.

EBATA, S., MUTO, S., OKADA, K., NEMOTO, J., AMEMIYA, M., SAITO, T., ASANO, Y. (1999). Aldosterone activates Na^+/H^+ exchange in vascular smooth muscle cells by nongenomic and genomic mechanisms. *Kidney Int* 56: 1400-1412.

EDINGER, R.S., ROKAW, M.D., JOHNSON, J.P. (1999). Vasopressin stimulates sodium transport in A6 cells via a phosphatidylinositide 3-kinase-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 277: F575-F579.

EISEN, C., MEYER, C., CHRIST, M., THEISEN, K., WEHLING, M. (1994). Novel membrane receptors for aldosterone in human lymphocytes: a 50 kDa protein on SDS-PAGE. *Cell. Mol. Biol.* 40: 351-358.

FALKENSTEIN, E., CHRIST, M., FEURING, M., WEHLING, M. (2000a). Specific nongenomic actions of aldosterone. *Kidney Int.* 57: 1390-1394.

FALKENSTEIN, E., TILLMANN, H.C., CHRIST, M., FEURING, M., WEHLING, M. (2000b). Multiple actions of steroid hormones-a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol. Rev.* 52: 513-556.

FARDELLA, C.E., MILLER, W.L., (1996). Molecular biology of mineralocorticoid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 16: 443-470.

FARMAN, N., RAFESTIN-OBLIN, M.E. (2001). Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280: F181-F192.

FARQUHARSON, C.A.J., STRUTHERS, A.D. (2000). Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure. *Circulation* 101: 594-597.

FLAGELLA, M., CLARKE, L.L., MILLER, M.L., ERWAY, L.C., GIANELLA, R.A., ANDRINGA, A., GAWENIS, L.R., KRAMER, J., DUFFY, J.J., DOETSCHMAN, T., LORENZ, J.N., YAMOAHA, E.N., CARDELL, E.L., SHULL, G.E. (1999). Mice lacking the basolateral $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf. *J. Biol. Chem.* 274: 26946-26955.

FUNDER, J.W. (1997a). Aldosterone, salt and cardiac fibrosis. *Clin. Exp. Hypertension* 19: 885-889.

FUNDER, J.W. (1997b). Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: biology and clinical relevance. *Annu. Rev. Med.* 48: 231-240.

FUNDER, J.W., PEARCE, P.T., SMITH, R., SMITH, A.I. (1988). Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 242: 583-585.

FUKUDA, N., SATOH, C., HU, W.Y., SOMA, M., KUBO, A., KISHIOKA, H., WATANABE, Y., IZUMI, T., KANMATSUSE, K. (1999). Production of angiotensin II by homogeneous cultures of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.* 19: 1210-1217.

GARAY, R.P., ALVAREZ-GUERRA, M., ALDA, J.O., NAZARET, C., SOLER, A., VARGAS, F. (1998). Regulation of renal $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{/Cl}^-$ cotransporter NKCC2 by humoral natriuretic factors: relevance in hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* 20: 675-682.

GOECKE, A., KUSANOVIC, J.P., SERRANO, M., CHARLIN, T., ZÚÑIGA, A., MARUSIC, E.T. (1998). Increased Na, K, Cl cotransporter and Na^+ , K^+ -

ATPase activity of vascular tissue in two-kidney Goldblatt hypertension. *Biol. Res.* 31: 263-271.

GOMEZ-SANCHEZ, E.P., VENKATARAMAN, M.T., THWAITES, D., FORT, C. (1990). ICV infusion of corticosterone antagonizes ICV-aldosterone hypertension. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 258: 649-653.

GUYTON, A., HALL, J. (1997). Mineralocorticoides. **In:** Tratado de Fisiología Médica. 9º ed. México D. F., México. pp: 1094-1214.

HANNAN, K.M., LITTLE, P.J. (1998). Mechanism regulating the vascular smooth muscle Na^+/H^+ exchanger (NHE1) in diabetes. *Biochem. Cell. Biol.* 76: 751-759.

HARVEY, B.J., CONDLIFFE, S., DOOLAN, C.M. (2001). Sex and salt hormones: rapid effects in epithelia. *News Physiol. Sci.* 16: 174-177.

HAAS, M., FORBUSH, B. (1998). The Na-K-Cl cotransporters. *J. Bioenergetics Biomemb.* 30: 161-172.

HAAS, M., FORBUSH, B. (2000). The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu. Rev. Physiol.* 62: 515-534.

HATAKEYAMA, H., INABA, S., MIYAMORI, I. (1999). 11β -hydroxysteroid dehydrogenase in cultured human vascular cells. *Hypertension* 33: 1179-1184.

HATAKEYAMA, H., MIYAMORI, I., FUJITA, T., TAKEDA, I., TAKEDA, R., YAMAMOTO, H. (1994). Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 269: 24316-24320.

HEBERT, S.C., GAMBA, G., KAPLAN, M. (1996). The electroneutral $\text{Na}^+(\text{K}^+)-\text{Cl}^-$ cotransport family. *Kidney Int.* 49: 1638-1641.

HELMAN, S.I., LIU, X., BALDWIN, K., BLAZER-YOST, B.L., ELS, W.J. (1998). Time-dependent stimulation by aldosterone of blocker-sensitive EnaCs in A6 epithelia. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 274: C947-C957.

IKEDA, U., HYMAN, R., SMITH, T.W., MEDFORD, R.M. (1991). Aldosterone-mediated regulation of Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase gene expression in adult and neonatal rat cardiocytes. *J. Biol. Chem.* 266: 12058-12066.

INSERING, P., JACOBY, S.C., PAYNE, J.A., FORBUSH, B. (1998). Comparison of Na-K-Cl cotransporters. NKCC1, NKCC2, and the HEK cell Na-L-Cl cotransporter. *J. Biol. Chem.* 273(18): 11295-11301.

JACKSON, W.F. (2000). Ion channels in vascular tone. *Hypertension.* 35: 173-178.

JIANG, G., COBBS, S., KLEIN, J., O'NEILL, W. (2003). Aldosterone regulates the Na-K-2Cl cotransporter in vascular smooth muscle. *Hypertension* 41: 1131-1135.

JOHNSON, J.P. (1992). Cellular mechanisms of action of mineralocorticoid hormones. *Pharmacol. Ther.* 53: 1-29.

JOHNSON, L.R. (1998). Control of vascular resistance. **In:** Essential Medical Physiology. 2nd Edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York, USA. pp: 180-186.

JUHAZOVA, M., BLAUNSTEIN, M.P. (1997). Na⁺ pump low and high ouabain affinity a subunit isoforms are differentially distributed in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 1800-1805.

KARIN, M., (1998). New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable?. *Cell* 93: 487-490.

KEMENDY, A.E., KLEYMAN, T.R., EATON, D.C. (1992). Aldosterone alters the open probability of amiloride-blockable sodium channels in A6 epithelia. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 263: 825-837.

KIM, G.H., MASILAMANI, S., TURNER, R., MITCHELL, C., WADE, J.B., KNEPPER, M.A. (1998). The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14552-14557.

LAMB, F., BARNA, T. (1998). Chloride ion currents contribute functionally to norepinephrine-induced vascular contraction. *Am. J. Physiol.* 275: 151-160.

LANGENFELD, M., SCHMIEDER, R., SCHOBER, H., FRIEDRICH, A. (1996). Dietary salt intake and left ventricular diastolic function in early essential hypertension. Presentado en la Sociedad Internacional de Hipertensión. Glasgow, Escocia.

LIFTON, R.P., GHARAVI, A.G., GELLER, D.S. (2001). Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104: 545-556.

LOMBES, M., ALFAIDY, N., EUGENE, E., LESSANA, A., FARMAN, N., BONVALET, J.P. (1995). Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation* 92: 175-182.

LOMBES, M., FARMAN, N., BONVALET, J.P., ZENNARO, M.C. (2000). Identification and role of aldosterone receptors in the cardiovascular system. *Ann. Endocrinol.* 61: 41-46.

MAGUIRE, D., MACNAMARA, B., CUFFE, J.E., WINTER, D., DOOLAN, C.M., URBACH, V., O'SULIVAN, G.C., HARVEY, B.J. (1999). Rapid responses to aldosterone in human distal colon. *Steroids* 64: 51-63.

MANTERO, F., LUCARELLI, G. (2000). *Ann. Endocrinol.* 61: 52-60.

MASTROBERARDINO, L., SPINDLER, B., FORSTER, I., LOFFING, J., ASSANDRI, R., MAY, A., VERREY, F. (1998). Ras pathway activates epithelial Na channel and decreases its surface expression in *Xenopus* oocytes. *Mol. Biol. Cell* 9: 3417-3427.

MESSERLI, H.F., SCHMIEDER, R.E., WEIR, M.R. (1997). Salt: A Perpetrator of Hypertensive Target Organ Disease?. *Arch Intern Med.* 157(21): 2449-2452.

MICHEA L., DELPIANO A.M., HITSCHFELD C., LOBOS L., LAVANDERO S., MARUSIC E.T. (2005). Eplerenone blocks nongenomic effects of aldosterona on the Na⁺/H⁺ exchanger, intracellular Ca²⁺ levels and vasoconstriction in mesenteric resistance vessels. *Endocrinology* 146(3): 973-980.

MICHEA L., VALENZUELA V., BRAVO I., SCHUSTER A., MARUSIC ET. (1998). Adrenal-dependent modulation of the catalytic subunit isoforms of the Na⁺-K⁺-ATPase in aorta. *Am. J. Physiol.* 275: 1072-1081.

MIHAILIDOU, A.S., BUHAGIAR, K.A., RASMUSSEN, H.H. (1998). Na⁺ influx and Na⁺-K⁺ pump activation during short-term exposure of cardiac myocytes to aldosterona. *Am. J. Physiol.* 274: 175-181.

MIHAILIDOU, A.S., MARDINI, M., FUNDER, J.W. (2004). Rapid, nongenomic effects of aldosterona in the heart mediated by epsilon protein kinase C. *Endocrinology* 145(2): 773-780.

MOORE-HOON, M.L., TURNER, R.J. (2000). The structural unit of the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC1) is a homodimer. *Biochemistry* 39: 3718-3724.

MOUNT, D.B., DELPIRE, E., GAMBA, G., HALL, A.E., POCH, E., HOOVER,R.S., HEBERT, S.C. (1998). The electroneutral cation-chloride cotransporters. *J. Exp. Biol.* 201: 2091-2102.

MUTO, S., J. NEMOTO, A., OHTAKA, Y., WATANABE, M., YAMAKI, K., KAWAKAMI, K., NAGANO, ASANO, Y. (1996). Differential regulation of Na⁺-K⁺-ATPase gene expression by corticosteroids in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 270 (39): 731-739.

NABEL, E.G. (2003). Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* 349(1): 60-72.

NARAY-FEJES-TOTH A., FEJES-TOTH g. (2000). The sgk, an aldosterone-induced gene in mineralocorticoid target cells, regulates the epithelial sodium channel. *Kidney Int.* 57: 1290-1294.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). 1996. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academy of Science. Washington DC, USA. 140 p.

NGARMUKOS, C., GREKIN, R.J. (2001). Nontraditional aspects of aldosterone physiology. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281: 1122-1127.

OGUCHI, A., IKEDA, U., KANBE, T., TSURUYA, Y., YAMAMOTO, K., KAWAKAMI, K., MEDFORD, R., SHIMADA, K. (1993). Regulation of Na⁺-K⁺-ATPase gene expression by aldosterone in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 265 (34): 1167-1168.

ORLOV, S.N., ADRAGNA, N.C., ADARICHEN, V.A., HAMET, P. (1999). Genetic and biochemical determinants of abnormal monovalent ion transport in primary hypertension. *Am. J. Physiol.* 276: 511-536.

ORLOV, S.N., TREMBAY, J., HAMET, P. (1995). Altered β -adrenergic regulation of Na-K-Cl cotransport in cultured smooth muscle cells from the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 8: 739-747.

PANET, R., MARCUS, M., ATLAN, H. (2000). Overexpression of the Na/K/Cl cotransporter gene induces cell proliferation and phenotypic transformation in mouse fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 182(1): 109-118.

PEARCE, D. (2001). The role of SGK1 in hormone-regulated sodium transport. *Trends. Endocrinol. Metab.* 12: 341-347.

PITT, B., ZANNAD, F., REMME, W.J., CODY, R., CASTAIGNE, A., PEREZ, A., PALENSKY, J., WITTES, J. (1999). The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N. Eng. J. Med.* 341: 709-717.

POGWIZD, S.M., SIPIDO, K.R., VERDONCK, F., BERS, D.M. (2003). Intracellular Na in animal models of hypertrophy and heart failure: contractile function and arrhythmogenesis. *Cardiov. Res.* 57: 887-896.

RAMIREZ-GIL, J.F., DELCAYRE, C., ROBERT, V., WASSEF, M., TROUVE, P., MOUGENOT, N., CHARLEMAGNE, D., LECHAT, P. (1998). Modifications of myocardial Na^+ , K^+ -ATPase isoforms and Na^+ / Ca^{2+} exchanger in aldosterone/salt induced hypertension in guinea pigs. *Cardiovasc. Res.* 57: 451-462.

REICHARDT, H.M., KAESTNER, K.H., TUCKERMANN, J., KRETZ, O., WESSELY, O., BOCK, R., GASS, P., SCHMID, W., HERRLICH, P., ANGEL, P., SCHUTZ, G. (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93: 531-541.

ROBERT, V., SILVESTRE, J.S., CHARLEMAGNE, D., SABRI, A., TROUVE, P., WASSEF, M., SWYNGHEDAUN, B., DELCAYRE, C. (1995). Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats. *Hipertension* 26: 971-978.

ROBERT-NICOUD, M., FLAHAUT, M., ELALOUF, J.M., NICOD, M., SALINAS, M., BENS, M., DOUCET, A., WINCKER, P., ARTIGUENAVE, F., HORISBERGER, J.D., VANDEWALLE, A., ROSSIER, B.C., FIRSOV, D. (2001). Transcriptome of a mouse kidney cortical collecting duct cell line: effects of aldosterone and vasopressin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2712-2716.

ROBSON, A.C., LECKIE, C.M., SECKL, J.R., HOLMES, M.C. (1998). 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the postnatal and adult rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 61: 1-10.

ROCHA, R., STIER, C.T. (2001). Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues. *Trends Endocrinol. Metab.* 12(7): 308-314.

ROSSIER, B.C. (2003). Negative regulators of sodium transport in the kidney: Key factors in understanding salt-sensitive hypertension?. *J. Clin. Invest.* 111: 947-950.

RUSSEL, J.M. (2000). Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev.* 80: 211-276.

SAKAI, R.R., M^CEWEN, B.S., FLUHARTY, S.J., MA, L.Y. (2000). The amygdala: site of genomic and nongenomic arousal of aldosterone-induced sodium intake. *Kidney Int.* 57: 1337-1345.

SATO, A., LIU, J.P., FUNDER, J.W. (1997). Aldosterone rapidly represses protein kinase C activity in neonatal rat cardiomyocytes in vitro. *Endocrinology* 138: 3410-3416.

SEIDMAN, C.E., SEIDMAN, J.G. (2001). Hypertrophic cardiomyopathy. **In:** Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Eds.). *The metabolic & molecular bases of inherited disease.* 8th ed. Vol. 4. New York. McGraw-Hill. pp: 5433-5450.

SHANKAR, S.S., BRATER, C. (2003). Loops diuretics: from the N-K-2Cl transporter to clinical use. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 284: F11-F21.

SCHMIDT, B.M., MONTEALEGRE, A., JANSON, C.P., MARTIN, N., STEIN-KEMMESIES, C., SCHERHAG, A., FEURING, M., CHRIST, M., WEHLING, M. (1999). Short term cardiovascular effects of aldosterone in healthy male volunteers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 3528-3533.

SCHRIER, R.W., ABDALLAH, J.G., WEINBERGER, H.H., ABRAHAM, N.T. (2000). Therapy of heart failure. *Kidney Int.* 57: 1418-1425.

SECKL, J.R., WALKER, B.R. (2001). Minireview: 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* 142: 1371-1376.

SHI, H., LEVY-HOLZMAN, R., CLUZZEAUD, F., FARMAN, N., GARTY, H. (2001). Membrane topology and immunolocalization of CHIF in kidney and intestine. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280: F505-F512.

SPACH, C., STREETEN, D.H. (1964). Retardation of sodium exchange in dog erythrocytes by physiological concentrations of aldosterone, in vitro. *J. Clin. Invest.* 43: 217-227.

SPINDLER, B., MASTROBERARDINO, L., CUSTER, M., VERREY, F. (1997). Characterization of early aldosterone-induced RNA's identified in A6 kidney epithelia. *Pflügers Arch.* 434: 323-331.

STIER, C.T., CHANDER, P.N., ROCHA, R. (2002). Aldosterone as a mediator in cardiovascular injury. *Cardiol. Rev.* 10: 97-107.

STOCKAND, J.D., SPIER, B.J., WORRELL, R.T., YUE, G., AL-BALDAWI, N., EATON, D.C. (1999). Regulation of Na reabsorption by the aldosterone-induced, small G protein K-Ras2A. *J. Biol. Chem.* 274: 35449-35454.

STOWASSER, M. (2001). New perspectives on the role of aldosterone excess in cardiovascular disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28: 783-791.

TAKEDA, Y., MIYAMORI, I., YONEDA, T., ITO, Y., TAKEDA, R. (1994). Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA in rat vascular smooth muscle cells. *Life Sci.* 54: 281-285.

TAKEDA, Y., YONEDA, T., DEMURA, M., MIYAMORI, I., MABUCHI, H. (2000). Cardiac aldosterone production in genetically hypertensive rats. *Hypertension* 36: 495-500.

TOBIAN, L., HANLON, S. (1990). High sodium chloride diets injure arteries and raise mortality without changing blood pressure. *Hypertension* 15: 900-903.

TOKUSHIGE, A., KINO, M., TAMURA, H., HOPP, L., SEARLE, B., AVIV, A. (1986). Bumetanide-sensitive sodium-22 transport in vascular smooth muscle cell of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 8(5): 379-385.

VERDONCK, F., VOLDERS, P.G., VOS, M.A., SIPIDO, K.R. (2003). Intracellular Na(+) and altered Na (+) transport mechanisms in cardiac hypertrophy and failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35: 5-25.

VERREY, F. (1995). Transcriptional control of sodium transport in tight epithelial by adrenal steroids. *J. Membr. Biol.* 144: 93-110.

WEBER, K.T. (2001). Aldosterone in Congestive Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* 345(23): 1689-1697.

WEBER, K.T. (2000). Heart-hitting tales of salt and destruction. *J. Lab. Clin. Med.* 136: 7-13.

WEHLING, M., SPES, C.H., WIN, N., JANSON, C.P., SCHMIDT, B.M., THEISEN, K., CHRIST, M. (1998). Rapid cardiovascular actions of aldosterone in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83(10): 3517-3522.

WEINBERGER, M.H. (1997). More Spice on the Salt debate. *Arch Intern Med.* 157(21): 2407-2408.

WEIR, M.R., DZAU, V.J. (1999). The Renin-Angiotensin-Aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am. J. Hypertension.* 12: 205-213.

WORCEL, M., MOURA, A. (1987). Arterial effects of aldosterone and antimineralocorticoid compounds mechanism of action. *J. Steroid. Biochem.* 27(4-6): 865-9.

YOUNG, M.J., CLYNE, C.D., COLE, T.J., FUNDER, J.W. (2001). Cardiac steroidogenesis in the normal and failing heart. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 5121-5126.

YOUNG, M., FULLERTON, M., DILLEY, R., FUNDER, J. (1994). Mineralocorticoids, hypertension and cardiac fibrosis. *J. Clin. Invest.* 93: 2578-2583.

YOUNG, M., FUNDER, J.W. (2000). Aldosterone and the heart. *Trends. Endocrinol. Metab.* 11: 224-226.

YOUNG, M., HEAD, G., FUNDER, J. (1995). Determinants of cardiac fibrosis in experimental hypermineralocorticoid states. *Am. J. Physiol.* 269: 657-662.

ZECEVIC, M., SUMMA, V., BENS, M., VANDEWALLE, A., PEARCE, D., VERREY, F. (2001). Does SGK mediate aldosterone action on both apical (ENaC) and basolateral (Na, K ATPase) Na transport proteins (Abstract)?. *JASN* 12: 45A.

ZENNARO, M. (1998). Syndromes of glucocorticoid and mineralocorticoid resistance. *Eur. J. Endocrinol.* 139: 127