

Cambios en la función ventricular sistólica y diastólica en un modelo de sobreexpresión cardíaca del receptor AT-1 de angiotensina

Changes in Systolic and Diastolic Function in a Mouse Model Overexpressing Cardiac Angiotensin II AT-1 Receptor

LUIS F. MATORRA¹, ANA CLARA REY DEUTSCH^{1,*}, MARÍA AILÍN GOYENCHE^{1,#}, CRISTIAN GARMENDIA¹, MARIEL RANDO¹, CARLA CELAYA¹, VERÓNICA CASANOVA², ELIANA CICALÉ², NIDIA BASSO^{1,&}

Recibido: 11/09/2013

Aceptado: 22/10/2013

Dirección para separatas:

Dra. Nidia Basso
Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires
J. E. Uriburu 950 - 2° Piso (C1114AAD) CABA, Argentina
Tel./Fax 54 11 4962-4945
e-mail: nidiabasso@yahoo.com

RESUMEN

La angiotensina II (Ang II) está involucrada en diferentes procesos fisiopatológicos, particularmente actuando sobre los receptores AT-1 de Ang II (AT1R). El objetivo de este trabajo fue evaluar la función ventricular sistólica y diastólica *in vivo* e *in vitro* en ratones con sobreexpresión cardíaca específica del receptor AT-1 de Ang II (AT1R). Un segundo objetivo fue determinar si el bloqueo agudo y crónico del AT1R revierte los cambios en la función ventricular. Se estudiaron ratones divididos en cuatro grupos experimentales. El primer grupo incluyó animales no transgénicos (NTG, n = 10), el segundo grupo ratones transgénicos (TG, n = 7) que sobreexpresan el AT1R solo a nivel cardíaco y el tercero y el cuarto grupos, animales TG tratados con losartán (L) durante 7 días (TG L7, n = 9) y 30 días (TG L30, n = 7), respectivamente. Los ratones TG presentaron hipertrofia ventricular izquierda (HVI). El tratamiento con losartán por 7 días no revirtió la HVI, lo que sí sucede cuando se extiende por 30 días. Los animales TG presentan una disminución significativa de la fracción de acortamiento, desde un valor de $47,1\% \pm 2,3\%$ hasta $32,3\% \pm 1,3\%$ ($p < 0,05$), y de la $+dP/dt_{\text{máx}}$, que se reduce desde un valor de 7.073 ± 674 mm Hg hasta $3.897,5 \pm 209,7$ mm Hg/seg ($p < 0,05$). El tratamiento con losartán por 7 y 30 días revierte esta disfunción sistólica.

El tiempo de relajación isovolúmica y el $t_{1/2}$ fueron de $24,1 \pm 1,3$ mseg y de $5,1 \pm 0,5$ mseg, respectivamente, en los NTG. Estos índices se incrementaron a $33,1 \pm 2,2$ mseg y a $8,4 \pm 0,4$ mseg, respectivamente, en los ratones TG ($p < 0,05$). Esta alteración de la función diastólica fue revertida por completo con el tratamiento con losartán por 7 y 30 días. El análisis de la función ventricular *in vitro* con control de variables corroboró los hallazgos realizados *in vivo*. La sobreexpresión cardíaca de los AT1R induce una disfunción ventricular sistólica y diastólica que es revertida completamente por el bloqueo del AT1R. Este efecto beneficioso es independiente de modificaciones en la masa ventricular izquierda.

REV ARGENT CARDIOL 2013;81;473-479. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v81.i6.3325>

Palabras clave >

Angiotensina II - Función ventricular - Receptor AT-1

Abreviaturas >

Ang II	Angiotensina II	NTG	No transgénico
AT1R	Receptor AT1 de angiotensina	PFDVI	Presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo
CPK	Proteínasa C	PDVI	Presión desarrollada por el ventrículo izquierdo
ECA	Enzima convertidora de la angiotensina	PPC	Presión de perfusión coronaria
EPPVid	Espesor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole	PSVI	Presión sistólica del ventrículo izquierdo
FEy	Fracción de eyección	PVD	Peso del ventrículo derecho
HVI	Hipertrofia ventricular izquierda	PVI	Peso del ventrículo izquierdo
LT	Longitud de la tibia	SRA	Sistema renina-angiotensina
		TG	Transgénico
		TRI	Tiempo de relajación isovolúmica

¹ Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina

² Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires

* Becaria Estímulo de la Universidad de Buenos Aires

Becaria del Consejo Interuniversitario Nacional (CIN)

& Miembro de la Carrera del Investigador Científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

INTRODUCCIÓN

El sistema renina-angiotensina (SRA) tiene una participación importante en diferentes procesos fisiológicos. Sin embargo, en ciertas condiciones patológicas, su actividad se incrementa provocando efectos perjudiciales. En este sentido, en respuesta a una sobrecarga de presión, la angiotensina II (Ang II) promueve el desarrollo de hipertrofia cardíaca, fibrosis y apoptosis, (1) y tanto estudios experimentales realizados en animales (2) como en pacientes (3) mostraron que la Ang II tiene un papel importante en la progresión a la insuficiencia cardíaca. Este conocimiento fue confirmado y ampliado por estudios realizados en animales transgénicos, en los que se demostró que la progresión a la insuficiencia cardíaca depende de las acciones de la Ang II más que de la presencia de hipertrofia cardíaca *per se*. (4, 5) En consecuencia, los efectos de la Ang II sobre la función ventricular son relevantes y quizás más importantes que sus propiedades para estimular el desarrollo de hipertrofia. De esta manera, diferentes trabajos han investigado los efectos de la Ang II sobre la función ventricular con resultados divergentes, ya que algunos autores (6) encontraron una respuesta inotrópica negativa frente a la infusión aguda de Ang II, mientras que otros hallaron efectos inotrópicos positivos en preparaciones de órgano aislado. (7-10) Llamativamente, Liang y colaboradores (11) mostraron que la Ang II tiene efectos inotrópicos tanto positivos como negativos en corazones aislados de ratón.

Con el objetivo de aclarar estos resultados se han utilizado modelos transgénicos que sobreexpresan diferentes componentes del SRA. En este sentido, Rivard y colaboradores (12) mostraron que la contractilidad está reducida en ratones que tienen sobreexpresión cardíaca del receptor AT1 de angiotensina (AT1R). Además, estos ratones presentan hipertrofia cardíaca, arritmias, disfunción ventricular, insuficiencia cardíaca y una mortalidad mayor. (1, 13, 14) Sin embargo, no es claro si los cambios en la función diastólica observados por estos investigadores son consecuencia directa de la sobreexpresión de los AT1R o si es secundaria a la presencia de hipertrofia cardíaca.

El objetivo de este estudio fue evaluar la función ventricular sistólica y diastólica *in vivo* en ratones con sobreexpresión cardíaca específica del AT1R. Dado que la contractilidad en los modelos *in vivo* puede ser modificada por diferentes variables (frecuencia cardíaca, condiciones de carga, etc.), también se evaluó la función ventricular *in vitro* en un modelo de corazón aislado. Un segundo objetivo fue determinar si el bloqueo agudo y crónico del receptor AT1R revierte los cambios en la función ventricular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (CICUAL Res CD #959/12).

Se utilizaron ratones machos de 60 días de vida que pesaron $24,7 \pm 0,9$ g. El modelo transgénico, con sobreexpresión cardíaca específica del AT1R fue generado en una cepa de ratones FVB. Estos ratones fueron diseñados utilizando como promotor la cadena pesada de α -miosina, con el objetivo de alcanzar una expresión cardíaca específica como se ha descrito previamente. (14) Los ratones fueron mantenidos en condiciones de luz/oscuridad (12 h:12 h) y temperatura constante (20-22 °C). La comida y el agua estuvieron disponibles *ad libitum*.

Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales. El primer grupo incluyó animales no transgénicos (NTG, n = 10), el segundo grupo ratones transgénicos (TG, n = 7), en el tercero y el cuarto grupos los animales transgénicos fueron tratados con losartán (L) 50 mg/kg/día durante 7 días (TG L7, n = 9) y durante 30 días (TG L30, n = 7), respectivamente.

Función ventricular *in vivo*

El análisis de la función ventricular *in vivo* se realizó con dos métodos: ecocardiografía y cateterismo cardíaco.

Ecocardiografía

Los ratones fueron anestesiados con 290 mg/kg de una solución al 2,5% de Avertin (Sigma-Aldrich) y la ecocardiografía se realizó con un equipo Acuson Sequoia C512, equipado con un transductor de ultrasonido lineal de 14 MHz. Se tomaron del diámetro de fin de diástole y de sístole del ventrículo izquierdo en modo 2D. Se calcularon la fracción de eyección (FEy) y la fracción de acortamiento, y ambos índices eyeectivos se emplearon para evaluar la función sistólica.

La función diastólica se evaluó a partir de la onda E, la onda A, la relación E/A y el tiempo de relajación isovolumétrica (TRI).

Cateterización cardíaca

Los animales fueron anestesiados con 290 mg/kg de una solución al 2,5% de Avertin (Sigma-Aldrich). Se disecó la vena yugular y se introdujo en ella un catéter de Silastic (1 French) para la administración de drogas. Posteriormente se disecó la arteria carótida derecha y se introdujo en ella un segundo catéter (Millar® 1.4 French). Este catéter se avanzó hacia el ventrículo izquierdo con el objeto de medir la presión sistólica del ventrículo izquierdo (PSVI, mm Hg) y la presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo (PFDVI, mm Hg). También se calcularon la $+dP/dt_{\text{máx}}$ (mm Hg/seg) y el $t_{1/2}$ (tiempo requerido por la presión ventricular izquierda para alcanzar el 50% de su valor al momento de la $-dP/dt_{\text{máx}}$).

Función ventricular *in vitro*

Se incluyeron en este estudio animales de los grupos NTG, TG y TG tratados con losartán durante 7 días (TG 7L), los cuales fueron sacrificados con pentobarbital (150 mg/kg). Luego del sacrificio, cada corazón se extirpó rápidamente y se montó por la raíz de la aorta en un sistema de perfusión para órgano aislado según la técnica de Langendorff. Los corazones se perfundieron con *buffer* Krebs-Henseleit que contiene: NaCl 118,5 mM, KCl 4,7 mM, NaHCO₃ 24,8 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM y glucosa 10 mM, a un pH de 7,2-7,4. La temperatura se mantuvo en 37 °C y, además, el *buffer* fue burbujeado con gas carbógeno (95% O₂ - 5% CO₂). Se colocaron dos electrodos que se conectaron a un marcapasos para mantener una frecuencia cardíaca constante de 450 latidos por minuto.

Se introdujo en el ventrículo izquierdo, a través de la aurícula izquierda, un balón de látex conectado a un tubo cuyo extremo distal se une a un transductor de presión (Deltram II, Utah Medical System). El volumen del balón se ajustó para alcanzar una presión de fin de diástole de entre 8 y 10 mm Hg. La presión de perfusión coronaria (PPC) también se registró con un transductor de presión conectado a la línea de perfusión. El

flujo coronario, que se mantuvo constante durante todo el experimento, se ajustó para obtener una PPC de $70,5 \pm 4,2$ mm Hg.

Finalmente, se calculó la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) como la diferencia entre la presión sistólica pico y la presión de fin de diástole.

Administración de la droga

Se administró losartán en el agua de bebida durante 7 y 30 días, desde el día 30 de vida (50 mg/kg/día).

Morfología

Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital (150 mg/kg). Se extrajo el bloque cardiopulmonar y se disecaron y pesaron las aurículas y los ventrículos derechos e izquierdos (PVD y PVI). Además, se registraron el peso del animal (PA), la longitud de la tibia (LT) y los correspondientes cocientes: PVI/PA, PVI/LT, PVD/PA y PVD/LT.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm error estándar de la media. Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA de una vía) seguido por la prueba *t* de Student, con el valor de *p* ajustado para múltiples comparaciones utilizando la prueba de Bonferroni. Las comparaciones de datos no se consideraron significativas a menos que el valor de *p* correspondiente fuera inferior a 0,05 / *k*, donde *k* representa el número de comparaciones.

RESULTADOS

Hubo un incremento significativo del cociente PVI/PA y PVI/LT en el grupo TG, indicando la presencia de hipertrofia ventricular izquierda (HVI) (Tabla 1). El tratamiento con losartán durante 7 días (TG 7L) no

revierte la HVI, lo que sí sucede cuando el tratamiento se extiende por 30 días (TG L30). Los mismos resultados se observaron al evaluar el espesor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole (EPPVId) a través del estudio ecocardiográfico (Tabla 2). Un punto importante para destacar es que los animales TG presentaron valores de frecuencia cardíaca menores que los NTG, un hecho que no fue revertido con el tratamiento con losartán. Además, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en el peso de los pulmones (datos no mostrados).

Función ventricular *in vivo*

La evaluación de la función ventricular *in vivo* se representa en la Figura 1. La sobreexpresión del AT1R produce una disfunción sistólica evidenciada por una disminución significativa de la fracción de acortamiento desde un valor de $47,1\% \pm 2,3\%$ hasta $32,3\% \pm 1,3\%$ ($p < 0,05$) y de la $+dP/dt_{\text{máx}}$ desde 7.073 ± 674 hasta $3.897,5 \pm 209,7$ mm Hg/seg ($p < 0,05$) (Figura 1, Paneles A y B). Los ratones que recibieron el tratamiento con losartán por 7 días tuvieron una tendencia a incrementar la fracción de acortamiento, que no fue estadísticamente significativa. Este índice se recuperó luego de 30 días de tratamiento, alcanzando un valor de $42,2\% \pm 2,4\%$. La $+dP/dt_{\text{máx}}$ tuvo un comportamiento similar y se recuperó con el tratamiento con losartán (7 días) alcanzando un valor de 5.623 ± 154 mm Hg/seg ($p < 0,05$) y de 6.554 ± 619 mm Hg/seg a los 30 días.

La función diastólica se evaluó por Doppler (TRI) y utilizando el $t_{1/2}$, calculado desde la curva de presión ventricular izquierda (Figura 2, Paneles A y B). El

Tabla 1. Variables morfométricas

	NTG	TG	TG L7	TG L30
PA, g	23,0 \pm 1,6	23,6 \pm 0,8	26 \pm 1,3	25,3 \pm 0,3
PC, mg	103,8 \pm 4,2	124,2 \pm 3,6*	136,3 \pm 5,2*	110,8 \pm 1,8**
PVI, mg	74,9 \pm 5,1	90,1 \pm 5,6*	96,6 \pm 2,8*	83,8 \pm 0,6**
LT, mm	16,4 \pm 0,5	16,4 \pm 0,4	16,6 \pm 0,5	17,6 \pm 0,1
PVI/PA, mg/g	3,3 \pm 0,1	4,0 \pm 0,2*	3,7 \pm 0,0*	3,1 \pm 0,5**
PVI/LT, mg/mm	4,6 \pm 0,1	5,2 \pm 0,1*	5,8 \pm 0,1*	3,8 \pm 0,0**
PVD/PA, mg/g	0,9 \pm 0,0	1,3 \pm 0,1*	1,2 \pm 0,0*	1,0 \pm 0,0**
PVD/LT, mg/mm	1,3 \pm 0,0	1,6 \pm 0,0*	1,9 \pm 0,0*	1,6 \pm 0,1

NTG: No transgénicos. TG: Transgénicos. TG L7: Transgénicos tratados con losartán por 7 días. TG L30: Transgénicos tratados con losartán por 30 días. PA: Peso del animal. PC: Peso del corazón. PVI: Peso del ventrículo izquierdo. PVD: Peso del ventrículo derecho. LT: Longitud de la tibia. * $p < 0,05$ vs. NTG; ** $p < 0,05$ vs. TG yTG L7.

Tabla 2. Índices ecocardiográficos

	NTG	TG	TG L7	TG L30
EPPVId, mm	0,78 \pm 0,04	1,20 \pm 0,07*	1,13 \pm 0,05*	0,90 \pm 0,09**
DFDVI, mm	3,62 \pm 0,19	3,72 \pm 0,13	3,78 \pm 0,23	3,91 \pm 0,18
DFSVI, mm	1,90 \pm 0,09	2,45 \pm 0,11	2,36 \pm 0,22	2,27 \pm 0,17
FC, lpm	379 \pm 19	292 \pm 15*	260 \pm 9*	270 \pm 24*

NTG: No transgénicos. TG: Transgénicos. TG L7: Transgénicos tratados con losartán por 7 días. TG L30: Transgénicos tratados con losartán por 30 días. EPPVId: Espesor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole. DFDVI: Diámetro de fin de diástole del ventrículo izquierdo. DFSVI: Diámetro de fin de sístole del ventrículo izquierdo. FC: Frecuencia cardíaca. * $p < 0,05$ vs. NTG; ** $p < 0,05$ vs. TG.

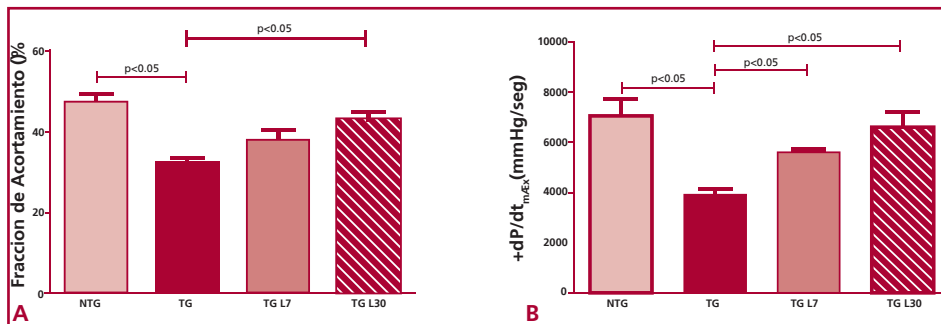


Fig. 1. Cambios en la fracción de acortamiento (Panel A) y en la +dP/dt_{max} en los cuatro grupos estudiados. El tratamiento con losartán revierte la disfunción sistólica observada en los animales TG.

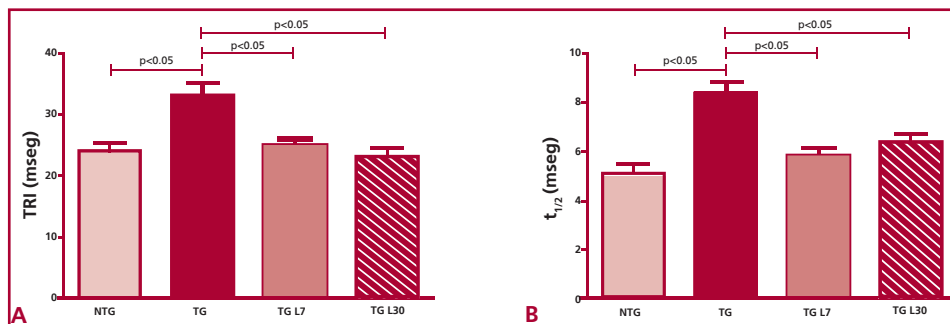


Fig. 2. Cambios en el tiempo de relajación isovolumétrica (TRI) y en el t_{1/2} en los cuatro grupos estudiados. El tratamiento con losartán, ya sea por 7 o por 30 días revierte la alteración en la relajación isovolumétrica.

TRI fue de 24,1 ± 1,3 mseg en los ratones NTG y se incrementó a 33,1 ± 2,2 mseg en los TG (p < 0,05). El mismo comportamiento se observó al analizar el t_{1/2}, el cual fue de 5,1 ± 0,5 mseg en el grupo NTG y se incrementó a un valor de 8,4 ± 0,4 mseg en los animales TG (p < 0,05). Esta alteración de la función diastólica se revirtió por completo con el tratamiento con losartán por 7 y 30 días, respectivamente.

En la Figura 3 se muestra el comportamiento de la PFDVI, que fue de 3,1 ± 0,2 mm Hg en los ratones NTG y se incrementó en los TG (6,3 ± 0,7 mm Hg; p < 0,05). Este aumento se revirtió completamente con el tratamiento con losartán, ya sea por 7 o por 30 días.

Función ventricular in vitro

La Figura 4 corresponde a un análisis del comportamiento de la función ventricular sistólica (PDVI, mm Hg) y diastólica (t_{1/2}, mseg) en un modelo de corazón aislado y con frecuencia cardíaca constante. Tal como se observó en el modelo *in vivo*, existe una disfunción sistólica en los animales TG que es independiente de los cambios en la frecuencia cardíaca (Panel A). Interesantemente, el tratamiento con losartán por 7 días revirtió esta alteración del estado contráctil sin modificar la masa ventricular. La evaluación del componente diastólico muestra un comportamiento similar. En los animales TG se observa un incremento significativo del t_{1/2} que es revertido por completo con el tratamiento con losartán por 7 días (Panel B).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se ha demostrado que la sobreexpresión del AT1R se asocia con la presencia de HVI y con un deterioro de la función sistólica y diastólica. El

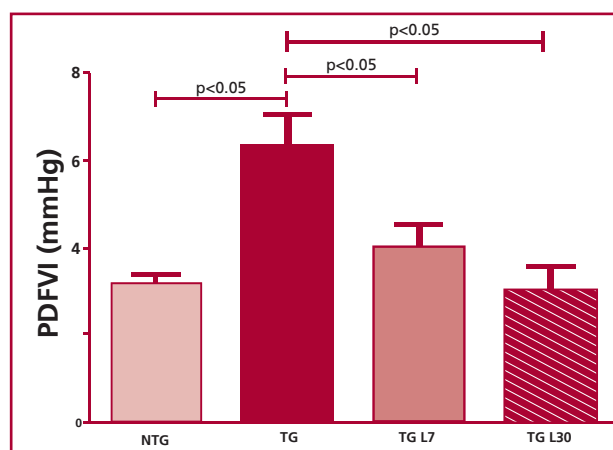
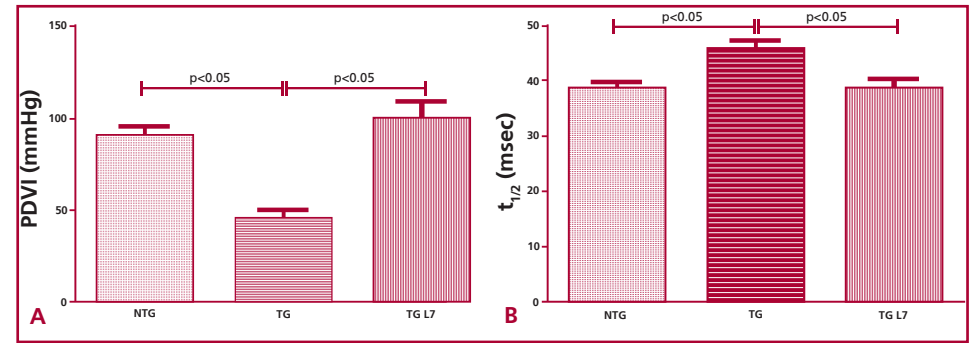


Fig. 3. Cambios en la presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo (PFDVI). Los animales TG presentan un incremento significativo de la PFDVI que es revertido completamente por el tratamiento con losartán.

tratamiento con un bloqueante del AT1R (losartán) mejora la función ventricular independientemente de la presencia de hipertrofia ventricular.

Diferentes autores (13-15) han demostrado que la sobreexpresión cardíaca del AT1R es responsable de la presencia de disfunción ventricular sistólica y muerte súbita. En este sentido, Hein y colaboradores (13) y Zhai y colaboradores (14) han mostrado que la sobreexpresión de los AT1R en ratones favorece un fenotipo de hipertrofia ventricular, presencia de arritmias y disminución de la frecuencia cardíaca. En un modelo similar, Paradis y colaboradores (1) demostraron la presencia de un patrón morfológico similar, con presencia de hi-

Fig. 4. Cambios en la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) y en el $t_{1/2}$ en los corazones de animales estudiados *in vitro*. Los corazones de animales TG presentan un estado contráctil menor y una prolongación de la relajación ventricular. Estas alteraciones son revertidas por el tratamiento con losartán por 7 días.



pertrofia ventricular y signos de insuficiencia cardíaca. En el presente estudio, los ratones con sobreexpresión cardíaca de los AT1R presentaron hipertrofia cardíaca, disminución significativa de la frecuencia cardíaca y ausencia de signos de insuficiencia cardíaca.

Es conocido que el SRA tiene la capacidad de modular la función ventricular. (13) En relación con esto, Xiao y colaboradores, (16) en un modelo murino con sobreexpresión de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y niveles elevados de Ang II, demostraron la presencia de hipertrofia cardíaca con función ventricular preservada. En contraposición, en nuestro estudio, en los ratones TG se evidenció la presencia de hipertrofia cardíaca asociada con disfunción sistólica y diastólica. La discrepancia entre estos hallazgos podría deberse a la utilización de distintos modelos experimentales. Además, es importante mencionar que los modelos con sobreexpresión de la ECA o del AT1R tienen diferencias importantes, dado que el incremento de la Ang II cardíaca podría activar los AT2R, cuyo papel no está del todo dilucidado. En el mismo sentido, el incremento en la expresión de la ECA en los animales TG podría regular la concentración de otros péptidos, tales como la bradicinina y la N-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina (AcSDKP), y producir efectos diferentes. Nuestros hallazgos concuerdan con los de Rivard y colaboradores, (12) quienes demostraron que la sobreexpresión de los AT1R, con niveles plasmáticos normales de Ang II, tiene un efecto perjudicial sobre la contractilidad. Además, nuestro trabajo extiende este concepto al demostrar que la sobreexpresión de AT1R en ratones presenta una alteración de la relajación ventricular e incremento de las presiones diastólicas. Esto es interesante, ya que la función diastólica en general y la relajación ventricular en particular, en modelos con estimulación crónica de los AT1R, no se ha estudiado en forma extensa. En este sentido, algunos autores (18) han demostrado que el bloqueo del AT1R previene la disfunción diastólica que acompaña a la insuficiencia cardíaca en un modelo de hipertensión arterial. Particularmente, el bloqueo del AT1R disminuyó la síntesis de colágeno, reduciendo la rigidez ventricular, sin cambios significativos en la presión arterial.

En nuestro estudio, los ratones TG presentaron una disfunción diastólica caracterizada por una prolonga-

ción del tiempo de relajación ventricular, observada tanto *in vivo* como *in vitro*, y un incremento de las presiones de llenado ventricular (PFDVI). Esto último ocurre sin cambios en el diámetro del ventrículo izquierdo, lo que pone en evidencia un aumento de la rigidez ventricular. Todas estas alteraciones diastólicas fueron revertidas por el tratamiento con losartán. Un hecho importante es que el bloqueo del AT1R por 30 días reduce la hipertrofia ventricular, lo cual podría explicar la mejoría de la función ventricular. Por este motivo, y para discriminar si el beneficio sobre la función ventricular es debido a la regresión de la hipertrofia, incluimos un grupo con tratamiento por 7 días. Los resultados mostraron claramente que aun en presencia de hipertrofia ventricular el bloqueo del AT1R mejora la función sistólica y diastólica.

El mecanismo por el cual el bloqueo de los receptores AT1R mejora la función ventricular sistólica y diastólica, aún en presencia de HVI, se desconoce. Varias proteínas intracelulares están involucradas en la regulación del estado contráctil en estas condiciones. En este sentido, es sabido que la proteincinasa C (CPK) interviene en el mecanismo por el cual la Ang II ejerce su efecto inotrópico. Así, en corazones aislados, el efecto inotrópico de la Ang II fue abolido tras la administración de inhibidores de la CPK. (19, 20) Además, Palomeque y colaboradores (21) demostraron que la ANG II promueve una serie de señales intracelulares que involucran a la CPK, tirosina cinasas y activación de la p38 MAPK, culminando estos eventos en una disminución de la respuesta de los miofilamentos al Ca^{++} y caída del estado contráctil.

Finalmente, la alteración en la relajación ventricular, aunque también los cambios en el inotropismo, podrían estar vinculados con una expresión y/o fosforilación menores de fosfolamban, lo que alteraría la recaptación de Ca^{++} por parte de la SERCA2, enlenteciendo la relajación. En este sentido, se ha mostrado (20) que el bloqueo dual con inhibidores de la ECA y bloqueantes AT1 mejora la función diastólica en un modelo de ratas hipertensas que sobreexpresan renina. La inhibición crónica de la síntesis de Ang II combinada con el bloqueo de las acciones de Ang II en el receptor AT1 impidió el desarrollo de HVI y las alteraciones funcionales de la relajación del ventrículo izquierdo.

Estos hallazgos se asociaron con disminución de la relación fosfolamban/SERCA2.

CONCLUSIONES

La sobreexpresión cardíaca de los AT1R induce una disfunción ventricular sistólica y diastólica que es revertida completamente por el bloqueo del AT1R. Este efecto beneficioso es independiente de modificaciones en la masa ventricular izquierda. En consecuencia, se necesitan más estudios para describir el mecanismo por el cual estos fármacos mejoran directamente la función ventricular, dada la importante participación del SRA en el mecanismo fisiopatológico de la hipertrofia y la insuficiencia cardíaca.

ABSTRACT

Changes in Systolic and Diastolic Function in a Mouse Model Overexpressing Cardiac Angiotensin II AT-1 Receptor

Angiotensin II (Ang II) is involved in various pathophysiological processes through the activation of Ang II AT-1 receptors. The purpose of this study was to assess *in vivo* and *in vitro* systolic and diastolic ventricular function in mice overexpressing the cardiac-specific AT-1 receptor (AT1R). A second objective was to determine whether acute and chronic AT1R blockade revert the changes in ventricular function.

Mice were divided into four experimental groups. The first group included non-transgenic animals (NTG, n=10), the second group consisted of transgenic mice (TG, n=7) with cardiac-specific AT1R overexpression and the third and fourth groups were TG animals treated with losartan (L) for 7 (TG L7, n=9) and 30 days (TG L30, n=7), respectively. Transgenic animals exhibited left ventricular hypertrophy (LVH) which was only regressed with losartan treatment for 30 days. They also presented a significant decrease in shortening fraction from $47.1 \pm 2.3\%$ to $32.3 \pm 1.3\%$ ($p < 0.05$) and in dP/dt_{max} from 7073 ± 674 to 3897.5 ± 209.7 mm Hg/sec ($p < 0.05$). Systolic dysfunction recovered with losartan treatment for 7 and 30 days.

Isovolumic relaxation time and $t_{1/2}$ were 24.1 ± 1.3 and 5.1 ± 0.5 ms, respectively, in the NTG group. These indexes increased to 33.1 ± 2.2 and 8.4 ± 0.4 ms, respectively, in TG mice ($p < 0.05$). Diastolic dysfunction was completely reversed by losartan treatment for 7 and 30 days. The analysis of *in vitro* ventricular function with controlled variables confirmed *in vivo* findings.

In conclusion, cardiac-specific AT1R overexpression induces systolic and diastolic ventricular dysfunction which is completely reversed by AT1R blockade. This beneficial effect is independent of left ventricular mass changes.

Key words > Angiotensin II - Ventricular Function - AT-1 Receptor

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que no poseen conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Junichi Sadoshima (Department of Biology and Molecular Medicine, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, USA), quien gentilmente donó los ratones transgénicos que se utilizaron en el presente estudio y a la Asociación de Fomento a la Investigación Científica (AFIC) por su apoyo a la realización del presente estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:931-6. <http://doi.org/bv84hx>
2. Pfeffer JM, Pfeffer MA. Angiotensin converting enzyme inhibition and ventricular remodeling in heart failure. Am J Med 1988;84:37A-44A. <http://doi.org/bgck3j>
3. The SOLVD Investigators. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. N Engl J Med 1991;325:293-302. <http://doi.org/bb9zg5>
4. Hamawaki M, Coffman TM, Lashus A, Koide M, Zile MR, Oliverio MI, et al. Pressure-overload hypertrophy is unabated in mice devoid of AT1A receptors. Am J Physiol 1998;274:H868-73.
5. Harada K, Komuro I, Shiojima I, Hayashi D, Kudoh S, Mizuno T, et al. Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1A receptor knockout mice. Circulation 1998;97:1952-9. <http://doi.org/pdv>
6. Sakurai K, Norota I, Tanaka H, Kubota I, Tomoike H, Endo M. Negative inotropic effects of angiotensin II, endothelin-1 and phenylephrine in indo-1 loaded adult mouse ventricular myocytes. Life Sci 2002;70:1173-84. <http://doi.org/bm3wz4>
7. Kobayashi M, Furukawa Y, Chiba S. Positive chronotropic and inotropic effects of angiotensin II in the dog heart. Eur J Pharmacol 1978;50:17-25. <http://doi.org/fgrqvr>
8. Cingolani HE, Villa-Abrille MC, Cornelli M, Nolly A, Ennis IL, Garciaarena C, et al. The positive inotropic effect of angiotensin II: role of endothelin-1 and reactive oxygen species. Hypertension 2006;47:727-34. <http://doi.org/dnnhgw>
9. Kass RS, Blair ML. Effects of angiotensin II on membrane current in cardiac Purkinje fibers. J Mol Cell Cardiol 1981;13:797-809. <http://doi.org/dxwc7z>
10. Scott AL, Chang RS, Lotti VJ, Siegl PK. Cardiac angiotensin receptors: effects of selective angiotensin II receptor antagonists, DUP 753 and PD 121981, in rabbit heart. J Pharmacol Exp Ther 1992;261:931-5.
11. Liang W, Oudit GY, Patel MM, Shah AM, Woodgett JR, Tsushima RG, et al. Role of phosphoinositide 3-kinase {alpha}, protein kinase C, and L-type Ca2+ channels in mediating the complex actions of angiotensin II on mouse cardiac contractility. Hypertension 2010;56:422-9. <http://doi.org/bctjb8>
12. Rivard K, Grandy SA, Douillette A, Paradis P, Nemer M, Allen BG, et al. Overexpression of type 1 angiotensin II receptors impairs excitation-contraction coupling in the mouse heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011;301:H2018-27. <http://doi.org/dd986c>
13. Hein L, Stevens ME, Barsh GS, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ. Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:6391-6. <http://doi.org/dw544p>
14. Zhai P, Yamamoto M, Galeotti J, Liu J, Masurekar M, Thaisz J, et al. Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking G alpha q/G alpha i coupling causes hypertrophy and bradycardia

in transgenic mice. *J Clin Invest* 2005;115:3045-56. <http://doi.org/cg9rwm>

15. Zhai P, Galeotti J, Liu J, Holle E, Yu X, Wagner T, et al. An angiotensin II type 1 receptor mutant lacking epidermal growth factor receptor transactivation does not induce angiotensin II-mediated cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2006;99:528-36. <http://doi.org/fsfc25>

16. Xiao HD, Fuchs S, Campbell DJ, Lewis W, Dudley SC Jr, Kasi VS, et al. Mice with cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme (ACE) have atrial enlargement, cardiac arrhythmia, and sudden death. *Am J Pathol* 2004;165:1019-32.

17. Xiao HD, Fuchs S, Bernstein EA, Li P, Campbell DJ, Bernstein KE. Mice expressing ACE only in the heart show that increased cardiac angiotensin II is not associated with cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294: H659-H667. <http://doi.org/bs7pwq>

18. Sakata Y, Yamamoto K, Mano T, Nishikawa N, Yoshida J, Nakayama H, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade prevents

diastolic heart failure through modulation of Ca²⁺ regulatory proteins and extracellular matrix. *J Hypertens* 2003;21:1737-45. <http://doi.org/fc56zd>

19. Salas MA, Vila-Petroff MG, Palomeque J, Aiello EA, Mattiazzi A. Positive inotropic and negative lusitropic effect of angiotensin II: intracellular mechanisms and second messengers. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1957-71. <http://doi.org/cmrmnh>

20. Jessup JA, Westwood BM, Chappell MC, Groban L. Dual ACE-inhibition and AT1 receptor antagonism improves ventricular lusitropy without affecting cardiac fibrosis in the congenic mRen2 Lewis Rat. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2009;3:245-57. <http://doi.org/fkwpd8>

21. Palomeque J, Sapia L, Hajjar RJ, Mattiazzi A, Vila Petroff M. Angiotensin II-induced negative inotropy in rat ventricular myocytes: role of reactive oxygen species and p38 MAPK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H96-106. <http://doi.org/bh8dgr>