



**Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas**

**“REGRESIÓN DE LA HIPERTROFIA CARDÍACA POR INHIBICIÓN  
DEL INTERCAMBIADOR  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ : PAPEL DE LA CALCINEURINA”**

**Carolina Denís Garcarena**

**Director**

**Dr. Horacio E. Cingolani**

**Codirector**

**Dra. Irene L. Ennis**

**Asesor Académico**

**Dr. Alejandro Rebolledo**

**Tesis Doctoral**

**-2007-**

**Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP**

*A mi mamá*

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
Hipertrofia cardíaca	3
Estiramiento miocárdico: señales que inician la HC	6
Vías de señalización intracelular que conducen a la HC	13
HC, $Ca^{2+}$ y calcineurina	20
El intercambiador $Na^+/H^+$	25
Intercambiador $Na^+/H^+$ y HC	30
Inhibición del intercambiador $Na^+/H^+$ y regresión de la HC	32
<b>OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>MÉTODOS</b>	<b>39</b>
Animales de experimentación	40
Protocolo de tratamiento farmacológico	41
Determinación de agua ingerida, diuresis y natriuresis	43
Evaluación ecocardiográfica	43
Determinación de la rigidez miocárdica	45

Determinaciones moleculares	47
Análisis estadístico	60
<b>RESULTADOS</b>	<b>61</b>
Investigación del posible efecto extracardíaco de los inhibidores del NHE-1: cariporide y BIIIB723	62
Caracterización de la regresión de HC producida por inhibición crónica del NHE-1 con cariporide y BIIIB723	69
Efecto de la inhibición del NHE-1 sobre la vía de señalización intracelular calcineurina/NFAT	73
Análisis ecocardiográfico de la función sistólica	78
Rigidez miocárdica	85
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>87</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>95</b>

# **INTRODUCCIÓN**

### HIPERTROFIA CARDÍACA

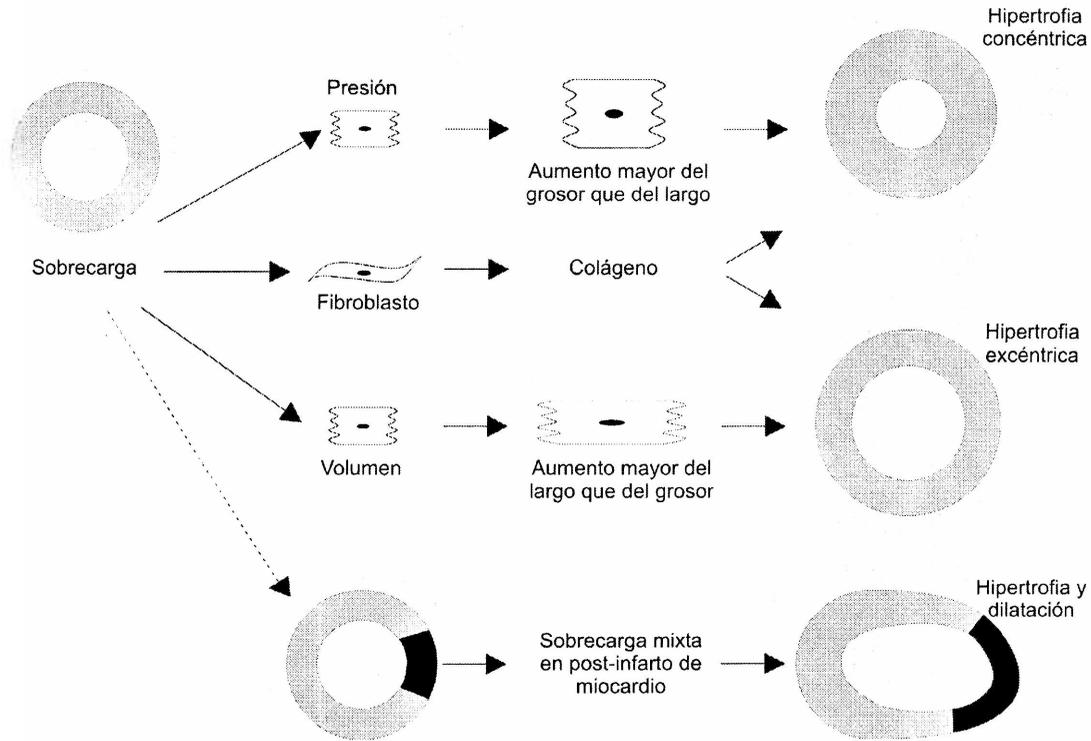
La hipertrofia cardíaca (HC) es una condición presente en numerosas enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial, valvulopatías y siguiendo al infarto de miocardio. Surge como una respuesta del miocardio frente a una variedad de estímulos: péptidos vasoactivos, estimulación  $\beta$ -adrenérgica, factores inductores de crecimiento, y principalmente el aumento del estrés mecánico debido a sobrecarga hemodinámica. La HC que ocurre en los pacientes con patologías cardiovasculares es un fenómeno maladaptativo (HC patológica), ya que se acompaña de deterioro de la función contráctil y habitualmente evoluciona a insuficiencia cardíaca. Constituye por si misma un factor de riesgo independiente de morbimortalidad cardiovascular (1,2) y su regresión implica una reducción de dicho riesgo, independientemente del tratamiento por el que se logre.(3,4) A diferencia de ésta, la HC que se desarrolla en los atletas sometidos a ejercicio físico intenso, hipertrofia adaptativa o fisiológica, no compromete la función miocárdica.

Por tratarse de un órgano diferenciado, el crecimiento del miocardio se produce por un aumento del tamaño, y no del número, de los miocitos determinado por una mayor síntesis proteica que sólo en la HC patológica va acompañado de un aumento de la fibrosis y la apoptosis, disminución de la densidad vascular y reprogramación de la expresión génica con inducción de genes fetales y represión de los genes que codifican las respectivas isoformas del adulto.(5-10) Esta reprogramación incluye a los genes de los péptidos natriuréticos atrial (ANP) y cerebral (BNP), así como las isoformas fetales de las proteínas contráctiles.(4,11,12)

El corazón modifica su morfología en respuesta a los requerimientos hemodinámicos y el tipo de sobrecarga determina el patrón de HC. La sobrecarga de presión produce un aumento del espesor de la pared ventricular, con poco o ningún grado de dilatación de la cavidad. La adición de los sarcómeros es en paralelo originando hipertrofia concéntrica. La sobrecarga de volumen, en cambio, está caracterizada por un incremento modesto en el espesor de la pared ventricular y un gran aumento en el volumen de la cavidad, debido a la adición de nuevos sarcómeros en serie. Este tipo de hipertrofia es llamada hipertrofia excéntrica. En el post-infarto de miocardio la situación es más compleja y se

## Introducción

produce una combinación de sobrecarga de volumen y de presión que desencadenan tanto hipertrofia como dilatación. (13,14) (Figura 1)



**Figura 1** Se esquematizan los tres patrones principales de HC según el tipo de sobrecarga hemodinámica que las origina. En la sobrecarga de presión el tamaño de los miocitos aumenta predominantemente en el grosor, dando lugar a la hipertrofia concéntrica. Se observa en un corte transversal que el crecimiento de la pared del miocardio es predominantemente hacia el centro de la cavidad. En la sobrecarga de volumen el tamaño de los miocitos aumenta predominantemente en largo, originando la hipertrofia excéntrica. En el post-infarto de miocardio existe sobrecarga de presión y de volumen sobre las zonas no infartadas y el resultado es una combinación de hipertrofia concéntrica y excéntrica. La fibrosis contribuye a los tres patrones.

La HC podría interpretarse, según la Ley de Laplace, como una respuesta adaptativa del miocardio frente a una situación de sobrecarga hemodinámica. De acuerdo a ella, la tensión o estrés (T) a la que está sometido el ventrículo, si este se considera aproximadamente esférico, con un radio r y espesor de pared h, y soportando una presión intraventricular P, es:

$$T = \frac{P \times r}{2h}$$

## Introducción

Al aumentar el espesor de la pared ventricular, como consecuencia de la HC, se provoca una normalización del estrés al que está sometido el órgano frente a un aumento de presión o del radio determinado por un aumento del volumen. Sin embargo, en el caso de la HC patológica son numerosas las evidencias que sustentan que la HC en sí no es necesaria para la compensación funcional frente a una situación de sobrecarga hemodinámica a pesar de prevenir el aumento del estrés. La inhibición del desarrollo de HC patológica no produce deterioro en la función cardíaca.(15-17)

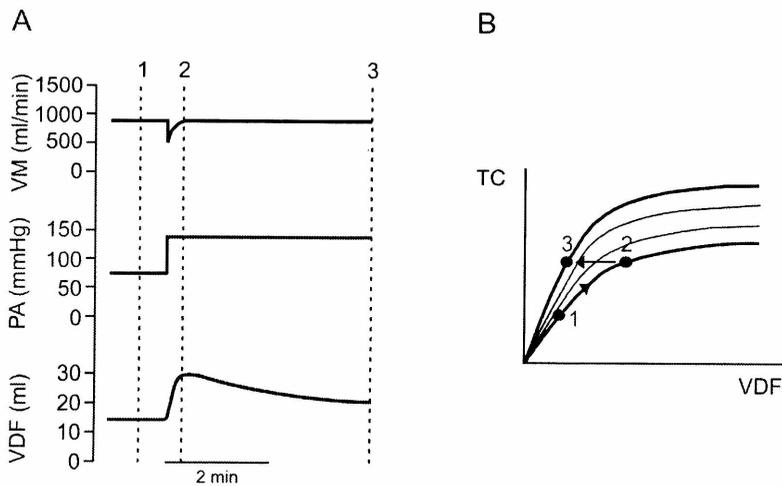
### **ESTIRAMIENTO MIOCARDICO: SEÑALES QUE INICIAN LA HC**

La sobrecarga hemodinámica por aumentos de presión y/o de volumen se traduce en estiramiento del miocardio. Este estiramiento es la señal mecánica que dispara la activación de cascadas de señalización intracelular que llegarán al núcleo celular promoviendo un aumento de la transcripción génica y consiguientemente de la síntesis proteica; provocando de este modo el desarrollo de HC. Es por ello que resulta necesario el estudio del estiramiento miocárdico como mecanismo inicial de la HC.

A pesar de que la actividad contráctil del miocardio se encuentra bajo influencia nerviosa, hormonal y electrofisiológica continua, el corazón posee mecanismos intrínsecos mediante los cuales es posible adaptar el volumen minuto cardíaco a las variaciones en las condiciones hemodinámicas. Un incremento en el volumen diastólico final (VDF) inducido por aumento de la resistencia aórtica a la eyección o del retorno venoso lleva inmediatamente a una contracción ventricular más poderosa. Esto fue reconocido por primera vez por von Anrep (18) en 1912 que mostró que la dilatación del corazón inducida por interrupción del flujo de salida era seguida por una disminución en el volumen cardíaco hacia el volumen inicial. Esto constituye el mecanismo bien conocido de Frank-Starling que permite que el corazón incremente el volumen minuto (VM) luego de un aumento en el retorno venoso o para eyectar el mismo volumen latido contra una mayor poscarga cuando se presenta un aumento de la presión arterial (PA). Durante los 10 ó 15 minutos que siguen al estiramiento repentino, continúa aumentando la performance miocárdica y el VDF retorna a su valor original (**Figura 2**).

En 1973, Parmley y Chuck (19) reprodujeron por primera vez en tiritas aisladas de miocardio ventricular el efecto contráctil del estiramiento. Los autores mostraron que cuando se incrementa la longitud del músculo se produce un incremento rápido seguido de otro más lento de la fuerza desarrollada, llamado segunda fase de fuerza (SFF) o efecto Anrep. Estos autores descartaron la posibilidad de una liberación de catecolaminas por las terminales nerviosas como un mecanismo que jugase un papel en el desarrollo de la SFF, dado que también ocurría en músculos aislados de animales reserpinizados.

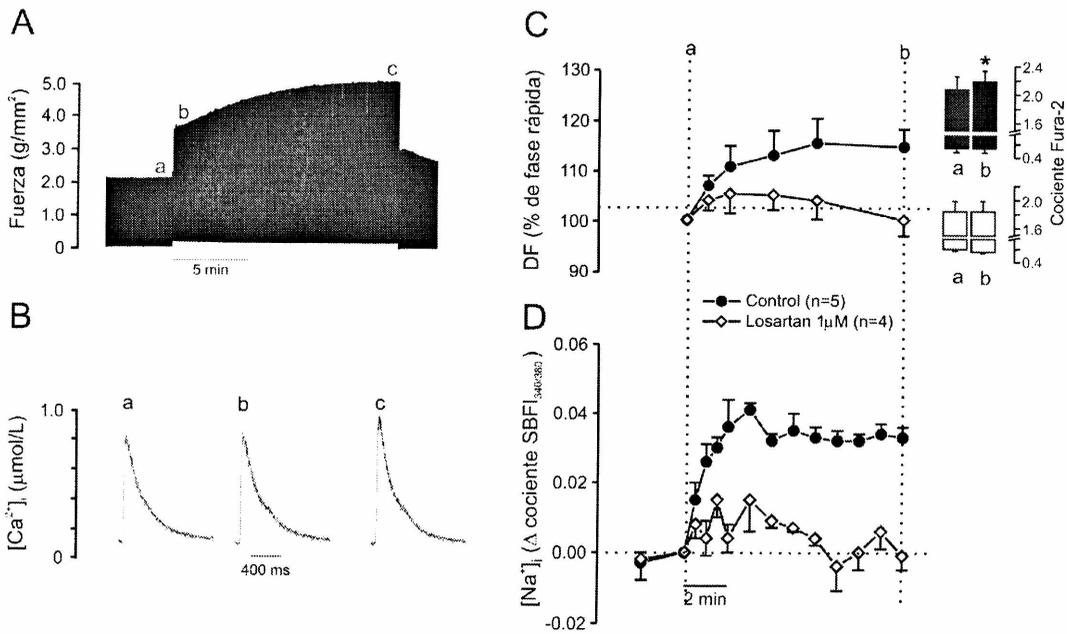
## Introducción



**Figura 2:** Representación esquemática de un incremento repentino en la presión aórtica. El panel A muestra, de arriba hacia abajo, los cambios en VM, PA y VDF que ocurren luego de un incremento repentino de la PA. Unos pocos latidos luego del incremento de la PA, un incremento en la sensibilidad de los miofilamentos al  $\text{Ca}^{2+}$ , permite al corazón eyectar el mismo volumen latido (VL) a pesar de la PA aumentada (mecanismo de Frank-Starling o "regulación heterométrica", desde el punto 1 al 2). El incremento del VDF es seguido por un retorno progresivo hacia el volumen inicial que se desarrolla durante los siguientes 10 minutos. Dado que durante este tiempo ni la PA ni el VL cambian, la disminución del VDF (desde los puntos 2 a 3) refleja un incremento en la contractilidad. Un cambio desde los puntos 1 a 2 ocurre en la curva control (mecanismo de Frank-Starling) si el fenómeno es examinado en las curvas de función ventricular (panel B), inmediatamente luego del incremento en el VDF. Luego de esto, el desplazamiento al punto 3 indica un desplazamiento hacia una curva con un mayor estado contráctil debido a que un mismo VL es eyectado a un menor VDF. Las curvas intermedias indican el desplazamiento (desde los puntos 1 a 3) a través de una familia de curvas con un progresivo incremento del inotropismo. TC: Trabajo cardíaco. Modificado de *News Physiol Sci* 16:88-91, 2001.

Las bases celulares y moleculares del mecanismo de Frank-Starling (o "autoregulación heterométrica") son bien conocidas e involucran un incremento en la respuesta de los miofilamentos al  $\text{Ca}^{2+}$ ,<sup>(20)</sup> sin embargo el mecanismo de la SFF (autoregulación homeométrica) es menos comprendido. Es conocido que el incremento en la contractilidad miocárdica que tiene lugar durante los 10-15 minutos que siguen al estiramiento del músculo no involucra cambios en la sensibilidad de los miofilamentos al  $\text{Ca}^{2+}$  y podría ser explicado cuantitativamente por un progresivo incremento en los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figura 3**).

## Introducción



**Figura 3** Luego de estirar un músculo papilar desde el 92 al 98% de  $L_{máx}$  (longitud a la que desarrolla la fuerza máxima), aumenta inmediatamente la fuerza (de a a b, panel A), debido a un incremento de la sensibilidad de los miofilamentos al  $Ca^{2+}$ . Posteriormente se desarrolla un incremento progresivo en la fuerza, la SFF, que es debida un incremento en los transitorios de  $Ca^{2+}$  (panel B), secundario al incremento de la  $[Na^+]_i$  (panel D "control"). La SFF, el incremento en la  $[Na^+]_i$  y el incremento de los transitorios de  $Ca^{2+}$  son abolidos al bloquear los receptores  $AT_1$  de angiotensina II (Ang II) con losartán (paneles C y D). Modificado de *News Physiol Sci* 16:88-91, 2001.

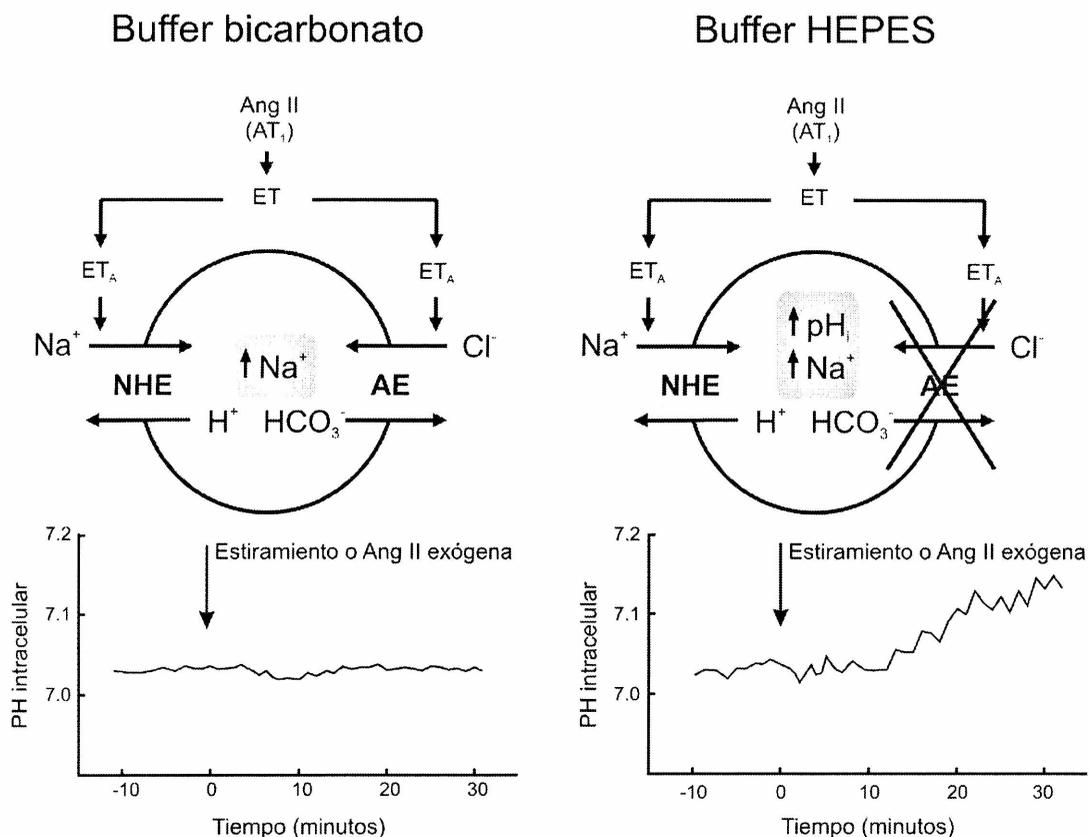
El incremento en el transitorio de  $Ca^{2+}$  que subyace a la SFF no se debe a un incremento en la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico (21) ni a un incremento en la corriente de  $Ca^{2+}$  del tipo L.(22)

En 1998 se detectó en músculos papilares de gato la producción de alcalinización miocárdica inducida por estiramiento debida a la activación del intercambiador  $Na^+/H^+$  (NHE) en solución libre de bicarbonato y se caracterizó la cascada de eventos autocrinos/paracrinos desencadenada por el estiramiento que conducen a dicha activación.(23) Se mostró que el estiramiento del miocardio provocaba la liberación de Ang II, y que esta última, a través de la endotelina (ET) era responsable de la activación del NHE. Estos hallazgos permitieron postular un nexo entre la activación del NHE y el influjo de  $Ca^{2+}$  mediado por el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX) en su modo inverso; es decir, ingresando un ion  $Ca^{2+}$  por cada

## Introducción

tres  $\text{Na}^+$  que extruye de la célula.(23-29) La liberación de Ang II preformada así como la de ET por cardiomiocitos de ratas neonatas sometidos a estiramiento, ya había sido descrita.(30,31) Dado que existen diferencias significativas entre los cardiomiocitos de animales neonatos y adultos en lo referido a los receptores de membrana y a las vías de señalización intracelular, la mayor contribución del trabajo citado fue la de detectar en preparaciones multicelulares de corazones de animales adultos la existencia de un mecanismo autocrino/paracrino inducido por el estiramiento.(23) Ese descubrimiento podría tener importantes implicaciones acerca de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la HC.

El NHE representa uno de los principales mecanismos regulatorios del pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ) al intercambiar un  $\text{H}^+$  intracelular por un  $\text{Na}^+$  extracelular. La estimulación del NHE inducida por estiramiento podría incrementar la fuerza al menos por dos mecanismos: a) el incremento en el  $\text{pH}_i$  que a su vez aumenta la sensibilidad de los miofilamentos por el  $\text{Ca}^{2+}$  (32,33) y b) el incremento de la  $[\text{Na}^+]_i$  que aumenta la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a través del NCX actuando en su modo inverso. Sin embargo, cuando los experimentos de estiramiento se realizan en presencia de bicarbonato no se observan cambios significativos en el  $\text{pH}_i$ ,(23,25) mientras que aun se mantiene el aumento en la fuerza. La explicación para la ausencia de cambios en el  $\text{pH}_i$  luego de la activación del NHE se puede encontrar en el hecho de que tanto la Ang II como la ET activan simultáneamente al menos dos mecanismos reguladores del  $\text{pH}_i$  antagónicos: el alcalinizante NHE y el acidificante intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$   $\text{Na}^+$ -independiente (AE);(31,34) compensando uno la activación del otro. La **Figura 4** ilustra el hecho de que la Ang II, a través de la liberación/formación de ET, estimula simultáneamente al NHE y al AE, minimizando entonces los cambios en el  $\text{pH}_i$ . Sin embargo el AE no puede compensar el incremento de la  $[\text{Na}^+]_i$  provocado por la mayor actividad del NHE. Por lo tanto, la activación del NHE puede ser detectada por un incremento en el  $\text{pH}_i$  sólo si el bicarbonato está ausente del medio, pero el incremento en la  $[\text{Na}^+]_i$  siempre es evidente.

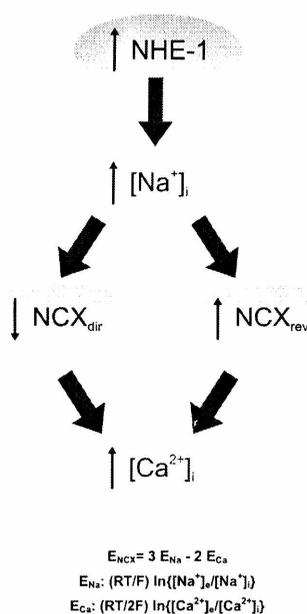


**Figura 4** Mecanismo propuesto para el efecto del estiramiento sobre los mecanismos reguladores del pH<sub>i</sub>. El estiramiento induce la liberación de Ang II preformada, la cual, de una manera autocrina/paracrina induce la liberación/formación de ET. La ET activa al NHE y al AE. Dado que el AE no transporta Na<sup>+</sup>, la activación simultánea de ambos mecanismos previene el incremento en el pH<sub>i</sub> pero no el incremento de la [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>. Sin embargo, un incremento en pH<sub>i</sub> luego del estiramiento puede tener lugar en ausencia de bicarbonato (buffer HEPES). Dado que el primer paso del mecanismo autocrino/paracrino es la liberación de Ang II endógena, similares efectos pueden obtenerse con la adición exógena del péptido.

El incremento en la [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> puede inducir un aumento en los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup> a través del NCX ya sea como resultado de una disminución del eflujo de Ca<sup>2+</sup> (modo directo disminuido) o a un incremento de la entrada de Ca<sup>2+</sup> (modo inverso aumentado) (**Figura 5**). El incremento en la [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> desplaza el potencial de inversión del NCX (E<sub>NCX</sub>) hacia valores más negativos otorgando más tiempo para que el NCX actúe en su modo inverso durante el potencial de acción promoviendo el influjo de Ca<sup>2+</sup> a la célula y determinando el incremento de fuerza. En las condiciones experimentales citadas, la [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> basal determinada fue de aproximadamente 5.5 mM.(35) Teniendo en cuenta este valor de [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> y considerando que la [Na<sup>+</sup>] y la [Ca<sup>2+</sup>] extracelulares fueron 140 y 1.35 mM,

## Introducción

respectivamente, y que la  $[Ca^{2+}]_i$  puede ser estimada en 200 nM, el cálculo de  $E_{NCX}$  ( $E_{NCX}=3E_{Na}-2E_{Ca}$ ) da un valor de aproximadamente +20 mV. Valores de potencial de membrana positivos al  $E_{NCX}$  generan la operación del modo inverso de este transportador. Debido a que la célula cardíaca normalmente alcanza el valor de  $E_{NCX}$  solamente por unos pocos milisegundos durante la fase rápida de la despolarización del potencial de acción, el modo inverso del NCX participaría muy poco o nada de la contractilidad basal en condiciones normales.



**Figura 5.** Mecanismos por los que el NHE influye en la actividad del NCX.

Consistentemente, no se observó contribución del NCX en modo inverso a la contractilidad basal de músculos papilares de gato; Sin embargo, el incremento en la  $[Na^+]_i$  de aproximadamente 2.5 mM detectado en los experimentos de estiramiento y de Ang II y de ET-1 exógenas (24,35,36) llevan al  $E_{NCX}$  a un valor de -5 mV, permitiendo de esta manera el funcionamiento del modo inverso del NCX durante la mayor parte de la meseta del potencial de acción cardíaco. La SFF se cancela en presencia de un inhibidor del modo inverso del NCX.(35)

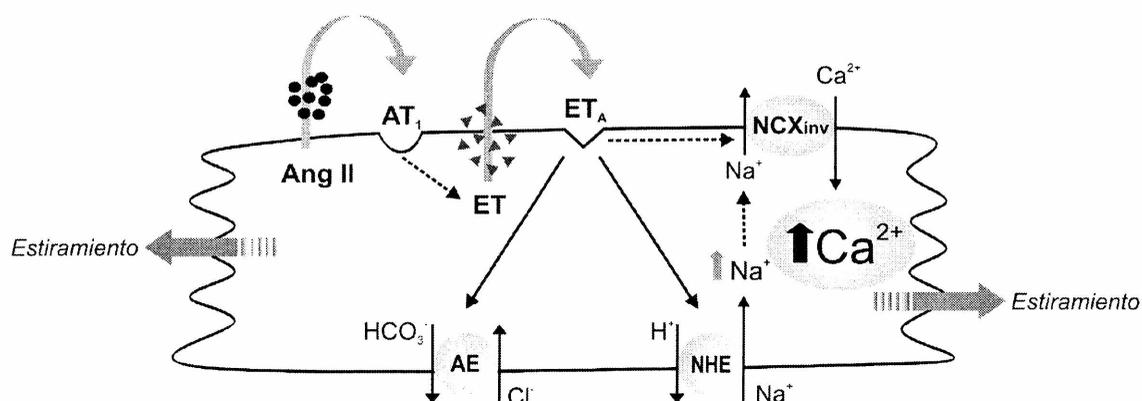
Factores adicionales al aumento de la  $[Na^+]_i$  y al consecuente desplazamiento negativo del  $E_{NCX}$  afectan también el modo inverso del NCX y podrían participar del incremento de fuerza producido durante la SFF. Se ha mostrado por ejemplo, que la ET-1 en adición al desplazamiento negativo del  $E_{NCX}$ , también produce una

## Introducción

estimulación directa del NCX, posiblemente por fosforilación del NCX por un mecanismo dependiente de la proteína quinasa C (PKC).(35)

En resumen, los resultados experimentales disponibles a la fecha sugieren que el modo inverso del NCX es modulado por el estiramiento miocárdico mediante las siguientes vías: a) Una dependiente de la  $[Na^+]_i$ , consistente con un desplazamiento negativo del  $E_{NCX}$  luego de un incremento de la  $[Na^+]_i$  debido a la activación del NHE;(24,25,35,36) b) una estimulación del NCX  $[Na^+]_i$ -independiente y PKC-dependiente;(35) y c) prolongación de la duración del potencial de acción.(37) Con respecto a los dos primeros mecanismos, ambos parecen participar de la SFF. Sin embargo, el segundo contribuiría a la SFF luego de la participación primaria del primero, que parece ser un paso obligatorio.

La **Figura 6** resume en un esquema la secuencia propuesta de eventos desencadenados por el estiramiento miocárdico, que provocan el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ .



**Figura 6** Representación esquemática de la cascada de eventos propuesta luego del estiramiento miocárdico. La Ang II endógena es liberada desde los miocitos activando de manera autocrina los receptores AT<sub>1</sub>. La estimulación de los receptores AT<sub>1</sub> induce la liberación/formación de ET, la cual activará simultáneamente al NHE y al AE a través de los receptores de ET. La estimulación del AE previene el incremento en el pH<sub>i</sub> mediado por el NHE, pero no previene el incremento en la  $[Na^+]_i$ . El incremento en la  $[Na^+]_i$  llevará al intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX) a operar en su modo inverso durante un período de tiempo más prolongado, determinando el incremento en el transitorio de Ca<sup>2+</sup>. Como se describió en el texto, una estimulación directa  $[Na^+]_i$ -independiente del NCX también puede contribuir al incremento de fuerza. Nótese que aunque en este esquema se identifica al mecanismo inducido por estiramiento como autocrino, no se puede descartar la posibilidad de que las células endoteliales o los fibroblastos contribuyan de un modo paracrino.

### VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR QUE CONDUCEN A LA HIPERTROFIA MIOCARDICA

La HC, como ya fuera mencionado, surge como resultado de un número de estímulos diferentes tales como el estiramiento del miocardio, la activación neurohumoral, factores de crecimiento y citoquinas. Cada uno de ellos actúa mediante la activación de receptores de membrana asociado a un grupo particular de proteínas (iniciadores) que activan vías de señalización intracelular que regulan una cascada de moléculas (ejecutoras) responsables del desarrollo de la respuesta hipertrófica. Entre los receptores involucrados se encuentran los acoplados a proteína G (GPCR), receptores con actividad de tirosina quinasa intrínseca (RTyrK), receptores de citoquinas y las integrinas, por mencionar sólo a los más conocidos. Si bien la unión de los ligandos específicos a estos receptores activa en cada caso caminos de señalización intracelular distintos, existe un alto grado de entrecruzamiento e interdependencia entre ellos. De lo anteriormente desarrollado se desprende que ninguna cascada de señalización intracelular regula la hipertrofia de los cardiomiocitos de manera aislada. Por el contrario, daría la impresión de que cada vía intracelular opera como un componente integrado de una respuesta orquestada.

A continuación se describen sintéticamente las cascadas de señalización intracelular mejor conocidas involucradas en la respuesta hipertrófica y su conexión con el estiramiento y la vía Ang II/ET/NHE.

**Activación de receptores acoplados a proteína G:** los receptores de siete dominios transmembrana se acoplan a proteínas G heterotriméricas del tipo Gq, Gs y Gi. Las proteínas G están formadas por una subunidad G $\alpha$  y otra G $\beta\gamma$ . La ocupación del receptor por su agonista promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad G $\alpha$  y esto provoca la disociación de ambas subunidades del receptor, permitiendo a cada una de ellas activar distintas vías de señalización intracelular. Algunos de los agentes inductores de HC más estudiados, como la Ang II, la ET y los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, se unen a sus respectivos receptores acoplados a la proteína Gq desencadenando la respuesta hipertrofiante del miocardio.(30,38,39) **(Figura 7)** El estímulo hipertrófico, al inducir la disociación de la subunidad  $\alpha$  permite que esta reclute a la PLC $\beta$  a la membrana, que

## Introducción

hidroliza al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>), dando inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El DAG formado facilita la activación de PKC que a su vez activa MAPKs a través de Raf. La activación de las MAPKs se produce además por una vía independiente de Gαq que involucra a Src/Grb2/Ras/Raf. La MAPK ERK1/2 fosforila a la quinasa p90RSK, y esta última activa por fosforilación al NHE.(40) De esta manera se promueve la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de la ruta NHE/NCX. El IP<sub>3</sub>, por otro lado, podría ser la señal que determine la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo sarcoplásmico (RS). El aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> sería el responsable de la activación de fosfatasas y/o quinasas que determinan el aumento de la transcripción y de la síntesis proteica y por ende el desarrollo de HC.(41) De las cascadas intracelulares prohipertróficas dependientes de Ca<sup>2+</sup>, la de la calcineurina/NFAT (factor de transcripción nuclear de las células T activadas) parece jugar un papel determinante en el desarrollo de HC patológica.(42) Por otro lado, recientemente se describió en cardiomiocitos aislados de corazones de ratón y de conejo que el IP<sub>3</sub>, mediante su unión a receptores nucleares, produce liberación de Ca<sup>2+</sup> de la envoltura nuclear y activación de la isoforma δ de la quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup> y calmodulina (CaMKIIδ), que induce la transcripción por inhibir a las desacetilasas de histona (HDAC).(43) Finalmente, estas cascadas convergen en la activación de factores de transcripción nuclear, como el NFAT, GATA4 y MEF2, que interactuando sinérgicamente inducen la transcripción de genes de respuesta hipertrófica.(44)



calcineurina,(45) de PKC (46) y de la vía de la PI3K.(47) En el caso de los receptores acoplados a proteína Gi, la acción hipertrofiante estaría mediada principalmente por vías activadas por la subunidad  $\beta\gamma$ .

### **Activación de receptores con actividad intrínseca de tirosina quinasa**

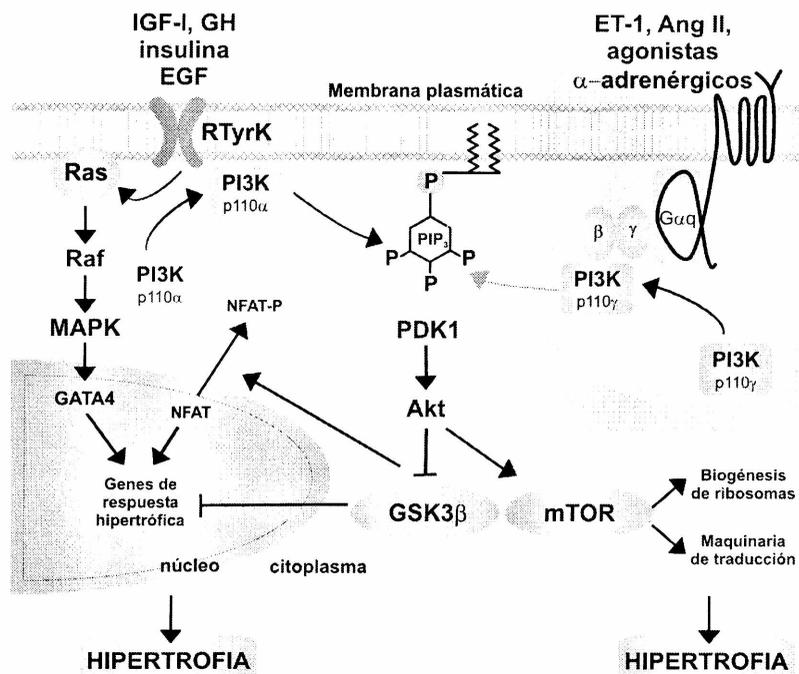
**(RTyrK)**: esta vía es la activada por factores de crecimiento como la insulina, la GH (hormona de crecimiento), el IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina), el EGF (factor de crecimiento epidérmico) así como por transactivación a través de algunos GPCR (por ejemplo AT<sub>1</sub>). (48) Cuando estos receptores son activados por sus ligandos específicos, se inducen al menos dos vías de señalización intracelular distintas: la vía PI3K/Akt y la vía Ras/MAPKs. Con respecto a la primer vía, su principal efector es la isoforma  $\alpha$  de la quinasa de lípidos PI3K (p110 $\alpha$ ) y su efector principal la quinasa Akt (PKB), que una vez activa promueve la síntesis proteica mediante fosforilación del activador de la traducción, mTOR (blanco de rapamicina en mamíferos), y la transcripción génica mediante fosforilación e inactivación de la GSK3 $\beta$ . (49) **(Figura 8)**. La GSK3 $\beta$  en su estado activo fosforila e inhibe a varias moléculas vinculadas con el desarrollo de HC, por ejemplo los miembros de la familia NFAT. La vía hasta aquí descrita se ha vinculado fundamentalmente al desarrollo de HC fisiológica o adaptativa dado que su activación se caracteriza por una HC con función contráctil preservada, ausencia de fibrosis intersticial, ausencia de inducción de genes fetales y es completamente reversible. (50,51) Es importante destacar además que la vía PI3K/Akt promueve la supervivencia celular al inhibir en múltiples sitios al proceso de apoptosis y se considera que evita la activación de los mecanismos que desencadenan la insuficiencia cardíaca.

Sin embargo, como ya se ha mencionado, la inducción de la vía de los RTyrK puede producirse además por transactivación. Evidencias recientes sugieren que todos o gran parte de los efectos prohipertrofiantes de los agonistas de los GPCRs, se deben a la transactivación de RTyrK como el del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La transactivación estaría mediada por varios mecanismos que no son mutuamente excluyentes y que incluyen la participación de moléculas intermediarias de señalización intracelular como el Ca<sup>2+</sup>; la asociación física de ambos tipos de receptores en balsas lipídicas y la activación de metaloproteasas

## Introducción

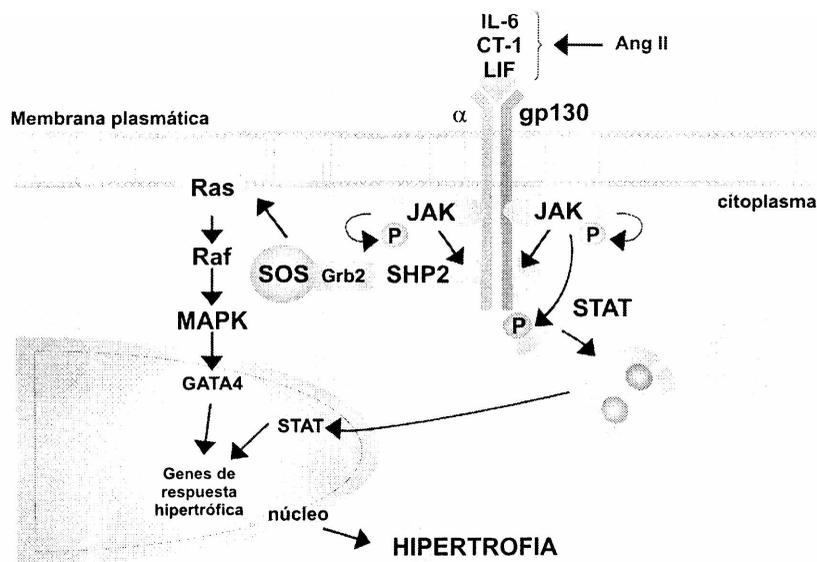
que clivan y liberan de la membrana celular un factor similar al EGF, el HB-EGF, que actúa como agonista de estos receptores. (48)

Además, los agonistas de los GPCRs, mediante la subunidad  $G\beta\gamma$ , activan a la isoforma  $p110\gamma$  de la PI3K, (**Figura 8**) y consecuentemente a la Akt y sus efectores. La aparente contradicción que se presenta debido a que una misma vía (la de la PI3K/Akt) está involucrada tanto en la HC adaptativa como en la maladaptativa, se resolvería considerando que es diferente la intensidad y/o duración de la señal provocada por  $p110\alpha$  y  $p110\gamma$  (52) y que en la HC maladaptativa se reclutan además otras vías de señalización ( $Gq/PLC\beta/Ca^{2+}$ ).



**Figura 8** Principales mediadores de las vía activadas por RTyrK. La unión de factores de crecimiento, como IGF-1, insulina y GH a su receptor produce por un lado la traslocación de la isoforma  $p110\alpha$  de la PI3K y la fosforilación por esta quinasa de fosfatidilinosoles de la membrana en la posición 3' del anillo inositol. Los lípidos fosforilados de esta manera, junto con PDK1, activan a la quinasa Akt (PKB). La Akt entonces es capaz de activar a mTOR, un regulador central de la síntesis proteica, a partir de sus efectos tanto sobre la biogénesis de ribosomas como sobre la maquinaria de traducción proteica. La Akt también fosforila e inhibe la GSK3 $\beta$  (quinasa 3 $\beta$  de la glucógeno sintasa). Dado que la GSK3 $\beta$  es un inhibidor clave del proceso de traducción, gran número de factores de transcripción relacionados con la inducción del programa hipertrófico, la inhibición de la GSK3 $\beta$  promueve tanto la síntesis de proteínas como la transcripción génica. En el recuadro sombreado de la esquina superior derecha se muestra como esta vía puede ser activada mediante la estimulación de los GPCRs, en este caso participa la isoforma  $p110\gamma$  de la PI3K y las subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína G para promover la activación de Akt. Por otro lado, la activación de los RTyrK también puede activar la vía Ras/Raf/MAPK.

**Activación de la vía de la glicoproteína (gp130):** la gp130 es una proteína de membrana que actúa como co-receptor en respuesta a los miembros de la familia de la interleuquina 6 (IL-6) de las citoquinas: la IL-6, la cardiotrofina-1 (CT-1) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF), capaces de promover el desarrollo de HC.(53) La IL-6 no se encuentra elevada en HC fisiológica y sí en la patológica (54) y se ha descrito para todos los miembros de la familia de la IL-6 que tanto su producción como su efecto sobre la HC es inducido por Ang II. (55,56) La unión de estas citoquinas a su receptor específico  $\alpha$  induce la dimerización con gp130 y ello activa a las quinasas Janus (JAKs), que activadas fosforilan al receptor, generando un sitio de anclaje para la SHP2 (tirosina fosfatasa con dominio SH2), que es a su vez fosforilada por JAK, permitiendo la unión del complejo Grb2/SOS. El reclutamiento de SOS al complejo, promueve la activación de Ras e induce la vía de señalización Ras-Raf-MAPK, de forma similar a lo que sucede en la activación de GPCRs. Las JAK activadas también fosforilan y activan a miembros de la familia STAT (transductor de señales y activador de la transcripción) que se traslocan al núcleo y activan la transcripción de genes directamente vinculados al desarrollo de HC. Existe evidencia que sustenta un papel citoprotector para la vía gp130/JAKs/STAT, además de su función facilitadora en el desarrollo de HC.(57-59). (Figura 9)



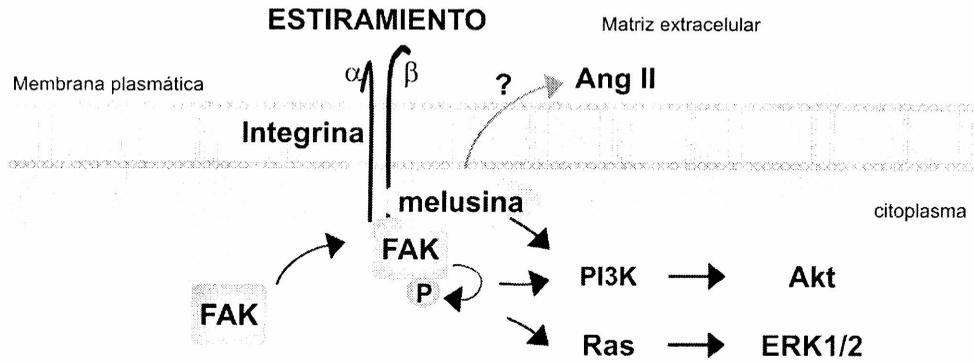
**Figura 9.** Activación de la vía gp130. La vía de señalización se inicia cuando la citoquina se une a su receptor  $\alpha$ , de baja afinidad, promoviendo así la dimerización con gp130 y la fosforilación de las

## Introducción

tirosina quinasa JAK asociada. A su turno, la JAK activada fosforila al receptor, acción que proporciona un sitio de anclaje para SHP2 y para los STAT. Una vez unidas a gp130, los STAT son fosforilados y subsecuentemente liberados del receptor, dimerizándose. En su forma de dímeros, los STAT se traslocan al núcleo y participan de la inducción de la transcripción génica. La fosforilación del receptor por las JAK también provee un sitio de anclaje para la SHP2 (tirosina fosfatasa con dominio SH2), que es a su vez fosforilada por JAK, permitiendo la unión del complejo Grb2/SOS. El reclutamiento de SOS al complejo, promueve la activación de Ras e induce la vía de señalización Ras-Raf-MAPK.

**Activación de sensores de estiramiento-integrinas:** las integrinas conforman una clase de receptores que conectan el aparato contráctil de los miocitos a las proteínas de la matriz extracelular, y juegan un papel fundamental en la conversión de la fuerza mecánica (sobrecarga hemodinámica) en respuesta hipertrófica.(60) Consisten en subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que se extienden a través de la membrana plasmática y se caracterizan por poseer un dominio extracelular extenso mediante el cual se unen a laminina, fibronectina y demás proteínas de la matriz; y una cola citoplasmática corta que permite la interacción indirecta con los filamentos de actina a través de proteínas accesorias, entre las que se encuentran talina, vinculina,  $\alpha$ -actinina, ILK (quinasa unida a integrina), parvina, paxilina, filamina y VASP.(61,62) Aunque la función de estas proteínas aun no se conoce detalladamente, se sabe que además de actuar como nexo entre las integrinas y la actina, muchas de ellas poseen acción enzimática o actúan como activadores de vías de señalización intracelular. La ILK es capaz de fosforilar tanto a Akt como a la GSK3 $\beta$ .(63) La complejidad de esta maquinaria molecular aumenta debido a la presencia de un número de proteínas de señalización que se reclutan en respuesta al estiramiento, como las quinasas SRC, FAK, PIPK1 $\gamma$  y las proteínas adaptadoras p130CAS, melusina, migfilina y zyxina. El complejo talina/vinculina en su conformación extendida/activa es capaz de interactuar con las quinasas mencionadas y activarlas.(64) La quinasa de adhesión focal (FAK) es capaz de activar a la PI3K y a la MAPK ERK1/2.(65) **(Figura 10)** La melusina también controla la fosforilación de Akt y GSK3 $\beta$  en respuesta al estiramiento.(66) Ratones transgénicos que carecen del gen que expresa la melusina poseen función cardíaca basal normal pero fracasan en el desarrollo normal del crecimiento de los miocitos cuando se incrementa la presión arterial por constricción de la aorta.(66)

## Introducción



**Figura 10.** En respuesta al estiramiento la quinasa FAK es reclutada por las integrinas. Esto conduce a la autofosforilación y activación de FAK. La FAK activada es capaz de inducir las vías de hipertrofia PI3K/Akt y Ras/ERK1/2, descritas anteriormente. La melusina es una proteína moduladora que interactúa con las integrinas y en respuesta al estiramiento activa la vía hipertrofiante PI3K/Akt. Con fines de claridad, no se muestran las proteínas estructurales-moduladoras accesorias que participan en el anclaje integrina-actina.

Las integrinas probablemente constituyan una ruta de señalización alternativa o paralela a la ya descrita para el estiramiento, aunque no se descarta la posibilidad de activación del lazo Ang II/ET mediante esta vía.

Recientemente se ha descrito a las glicoproteínas Wnt como inductores de HC de emergente interés.(67,67) Estas glicoproteínas actúan a través de sus receptores Frizzled (Fz) de dos maneras distintas: la "clásica", que involucra la interacción de los receptores Fz con una proteína similar al receptor de LDL y conduce a la activación del Dvl y consecuentemente a la inactivación de la GSK3 $\beta$  y activación de  $\beta$ -catenina que activa la transcripción,(69) en la "no clásica" se involucran vías intracelulares ya conocidas debido a que los Fz se comportan como GPCRs.(70)

## HC, Ca<sup>2+</sup> Y CALCINEURINA

La mayoría de los estímulos que inducen HC maladaptativa en respuesta a una sobrecarga hemodinámica activan la vía de Gq y confluyen en el aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> activando las vías de señalización intracelular dependientes de este ion. El aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> es uno de los fenómenos más importantes en el desarrollo de la respuesta hipertrófica y esto se ha confirmado provocando el aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> por medio de agonistas cálcicos,(71) de ionóforos de Ca<sup>2+</sup>,(72) o mediante la elevación del Ca<sup>2+</sup> extracelular,(73) induciéndose en todos estos casos hipertrofia en cardiomiocitos in vitro.

### **Activación de calcineurina:**

Tradicionalmente, el análisis de la señalización intracelular ha estado principalmente asociado a la acción de quinasas, como las MAPKs y la PI3K, entre otras. Sin embargo, las fosfatasa son también importantes factores de transducción de señales que regulan el crecimiento y las respuestas al estrés en una amplia variedad de tipos celulares. Una de estas fosfatasas es la fosfatasa de proteínas 2B (PP2B), calcineurina. La calcineurina es una fosfatasa específica de serina/treonina que se activa de modo singular por elevación sostenida del [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> e interacción con calmodulina.(74-76)

### **Estructura e isoformas**

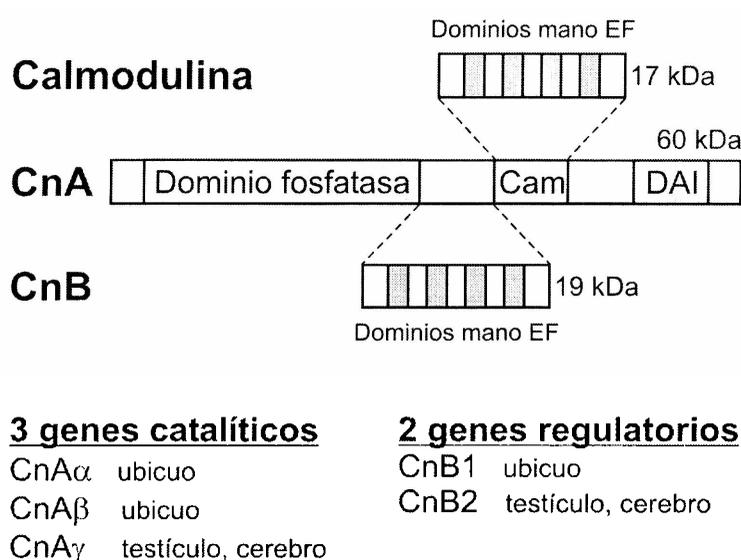
Cualquiera sea su origen, la holoenzima calcineurina activa se presenta siempre como un heterotrímero formado por una subunidad catalítica de 59-63 kDa, denominada calcineurina A, una subunidad regulatoria de 19 kDa, denominada calcineurina B, y la proteína fijadora de Ca<sup>2+</sup> calmodulina.(42) La calcineurina A posee además del dominio fosfatasa, un dominio de unión a calmodulina y en su extremo C-terminal un dominio autoinhibitorio. Un esquema de dicha estructura se presenta en la **Figura 11**.

Existen tres isoformas de calcineurina A identificadas en mamíferos: α, β y γ, que son producto de tres genes distintos (77) y comparten un 81% de identidad de secuencia a lo largo de los 350 aminoácidos de extensión que constituyen el dominio catalítico. Las isoformas Aα y Aβ se expresan de acuerdo a un patrón

## Introducción

relativamente ubicuo y superpuesto en todo el organismo,(78) mientras que la isoforma  $A\gamma$  se expresa en un patrón más restringido que incluye al testículo.(79) En los cardiomiocitos están presentes calcineurina  $A\alpha$  y  $A\beta$ , pero no calcineurina  $A\gamma$ .

Calcineurina B es una proteína altamente conservada, identificada originalmente en base a su secuencia primaria como una proteína ligante de  $Ca^{2+}$  con manos EF.(80) Como puede predecirse en base a su secuencia, une 4 iones  $Ca^{2+}$ , uno con alta afinidad ( $k_d < 10^{-7}$  M) y los tres restantes con afinidad en el rango micromolar.(81) En mamíferos existen dos isoformas de calcineurina B: CNB1, asociada con calcineurina  $A\alpha$  y  $A\beta$ ; y CNB2, que se expresa sólo en testículo.(82)



**Figura 11** Representación esquemática de la subunidad catalítica de calcineurina (CnA), la subunidad reguladora de calcineurina (CnB) y calmodulina; y un resumen de la expresión de los 3 genes que codifican para calcineurina A y los 2 genes que codifican para calcineurina B. Cam: dominio de unión a calmodulina; DAI: dominio autoinhibitorio.

### Regulación por calcio

La dependencia de  $Ca^{2+}$  de la actividad fosfatasa de calcineurina está controlada por las proteínas ligantes de  $Ca^{2+}$  calmodulina y calcineurina B.(83) Cuando la  $[Ca^{2+}]$  no supera los  $10^{-7}$  M, la calcineurina B con su sitio de alta afinidad ocupado se encuentra estrechamente unida a calcineurina A. En este estado la enzima es inactiva. La ocupación de los sitios de baja afinidad ( $k_d$  entre 0.5 y 1  $\mu$ M) ocasiona una activación débil. La interacción con calcineurina B cumple un papel estructural y es necesaria para la actividad basal. Esta actividad basal se incrementa más de

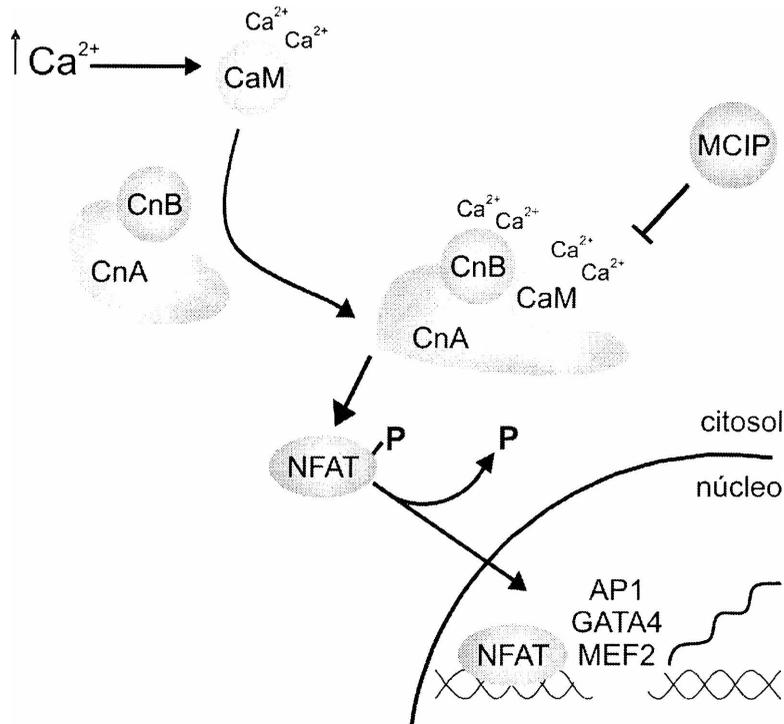
## Introducción

20 veces con la adición de cantidades equimolares de calmodulina y es estrictamente el resultado de un aumento de  $V_{m\acute{a}x}$ . La concentración de  $Ca^{2+}$  necesaria para la activación de la enzima es menor cuanto mayor es la concentración de calmodulina, y viceversa.(84) Esto es consistente con el hecho de que la activación es el resultado de la unión de calmodulina a calcineurina A, mediada por  $Ca^{2+}$ . Del mismo modo que ocurre con la mayoría de las enzimas reguladas por calmodulina, el mecanismo de activación involucra la unión a un dominio específico, resultando en un desplazamiento de un dominio autoinhibitorio.(85,86) Una representación esquemática de la activación por  $Ca^{2+}$  de calcineurina puede observarse en la **Figura 12**. Se incluye asimismo a la proteína moduladora que interactúa con calcineurina (MCIP), también conocida como calcipresina. La MCIP inhibe la actividad de calcineurina mediante interacción directa proteína-proteína.(87)

### Efectores

El blanco mejor caracterizado de calcineurina lo constituye la familia de factores de transcripción NFAT (factor nuclear de células T activadas). Ante aumentos sostenidos en la  $[Ca^{2+}]_i$ , la calcineurina se activa por el complejo  $Ca^{2+}$ /calmodulina y desfosforila a miembros de la familia NFAT en el citosol, permitiendo que éstos se trasloquen al núcleo y estimulen la transcripción génica. Esto lo hacen interactuando cooperativamente con otros factores de transcripción nuclear como AP-1, GATA-4 y MEF-2,(88) como se esquematiza en la **Figura 12**. NFAT y GATA-4 activan sinérgicamente el promotor BNP e inducen de esta manera la síntesis de su ARNm.(42) Entre los genes cuya expresión es regulada positivamente por NFAT se encuentra el gen de  $CnA\beta$ .(89)

## Introducción



**Figura 12.** La calcineurina heterodimérica es activada mediante la unión de calcio y calmodulina (CaM). La subunidad catalítica (CnA) contiene un dominio N-terminal catalítico y regiones de unión tanto para la subunidad reguladora B (CnB) como para CaM. El extremo C-terminal contiene un dominio autoinhibitorio que se pliega para ocluir el sitio activo cuando CaM no está unida. El aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  promueve la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a CnB y la del complejo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  a CnA y desplaza el dominio autoinhibitorio. La desfosforilación de NFAT promueve su traslocación al núcleo, donde se une al DNA cooperativamente con otros factores de transcripción, entre los que se encuentran AP1, GATA4, MEF2. La proteína moduladora que interactúa con calcineurina (MCIP), por unión directa a la calcineurina inhibe su actividad.

La activación de la calcineurina es una señal suficiente para inducir HC aunque posiblemente no estrictamente necesaria.(90,91) Su participación en el desarrollo de HC fue confirmado por las siguientes evidencias: a) ratones transgénicos que expresan una forma de calcineurina activa o de NFAT activo desarrollan HC;(92) b) el tratamiento con inhibidores de la calcineurina como el FK506 y la ciclosporina (aunque con algunos resultados contradictorios en este último caso), induce la regresión o previene el desarrollo de HC en distintos modelos experimentales;(93-95) c) la sobreexpresión del inhibidor endógeno de la calcineurina, la MCIP1, también inhibe la respuesta hipertrófica del miocardio.(96,97)

### EL INTERCAMBIADOR SODIO-HIDROGENO

En los miocitos cardíacos, como en otros tipos celulares, numerosos procesos son sensibles a los cambios de  $pH_i$ . En particular, casi todos los pasos del proceso excitación-contracción en los cardiomiocitos son inhibidos por acidosis intracelular,(33) resaltando la importancia de los mecanismos reguladores del  $pH_i$  que han evolucionado para prevenir o corregir esta condición. Uno de los principales mecanismos lo constituye el NHE, una glicoproteína integral de membrana de distribución ubicua que, como ya se ha mencionado, posibilita el intercambio electroneutro de un  $H^+$  intracelular por un  $Na^+$  extracelular (1:1) Hasta el momento se han descrito nueve isoformas del intercambiador (**Tabla 1**), las cuales difieren en su expresión tisular, distribución celular y sensibilidad a inhibidores. El NHE-1 fue la primer isoforma clonada,(98) identificada como un transportador sensible a amiloride involucrado en la regulación del  $pH_i$ . La identidad de secuencia primaria de las distintas isoformas varía en un rango entre 25 a 70%, aunque se ha predicho que comparten una estructura secundaria similar.(99) Con respecto al NHE-1, no sólo se ha demostrado que su distribución es ubicua en la membrana plasmática de todos los tipos celulares, sino que ha sido identificada como la isoforma predominante en el miocardio,(100) y por lo tanto es considerada la isoforma específica del tejido cardíaco.

Las isoformas NHE-2 a NHE-5 también se localizan en la membrana plasmática de las células, pero a diferencia del NHE-1 su patrón de expresión es más restringido. NHE-2 y NHE-3 presentan un nivel de expresión alto en riñón e intestino, localizados en la membrana apical de epitelios e involucrados en la reabsorción de  $Na^+$  y agua.(101) NHE-4, junto con NHE-1, está ubicado en la membrana basolateral de las células de epitelio tubular renal, y se ha mostrado que posee una baja afinidad por el  $H^+$ .(102) sugiriendo que el NHE-4 está involucrado en un papel fisiológico distinto al del NHE-1. La expresión de NHE-5 está restringida al cerebro, donde se ha sugerido que participa en la regulación del  $pH_i$  neuronal.(103) Las isoformas NHE-6 a NHE-9 no están ubicadas en la membrana plasmática, sino que se las encuentra en la membrana de distintas organelas de la célula. NHE-6 se localiza en los endosomas recién reciclados (104) mientras que NHE-7 se encuentra en el Golgi distal (105) y se sugiere que ambos participan manteniendo el  $pH_i$  de la organela. Las isoformas NHE-8

## Introducción

(106,107) y NHE-9 (107) se han identificado recientemente y se las ha localizado en el Golgi medio a distal y en los endosomas de reciclado tardío, respectivamente. La localización intracelular de las isoformas NHE-6 a NHE-9 sugiere un papel en la regulación de la homeostasis iónica de las organelas y constituye un mecanismo para el mantenimiento del pH<sub>i</sub> específico desde los endosomas de reciclaje temprano hasta el Golgi distal.(107)

NHE-1 es la única isoforma expresada ubicuamente, y la única expresada en la membrana plasmática de las células miocárdicas.

Isoforma	Localización	Caracterización
NHE-1	Todas las células. Isoforma predominante en el corazón	Mayor sensibilidad al amiloride y al cariporide (HOE642)
NHE-2	Tracto gastrointestinal y riñón	Membrana apical de epitelios
NHE-3	Tracto gastrointestinal y riñón	Membrana apical de epitelios
NHE-4	Riñón	Membrana basolateral de epitelios
NHE-5	Cerebro	
NHE-6	Todo tipo de células	Intracelular. Membrana mitocondrial, endosomas recién reciclados
NHE-7	Todo tipo de células	Intracelular. Golgi distal
NHE-8	Todo tipo de células	Intracelular. Golgi medio a distal
NHE-9	Todo tipo de células	Intracelular. Golgi medio a distal

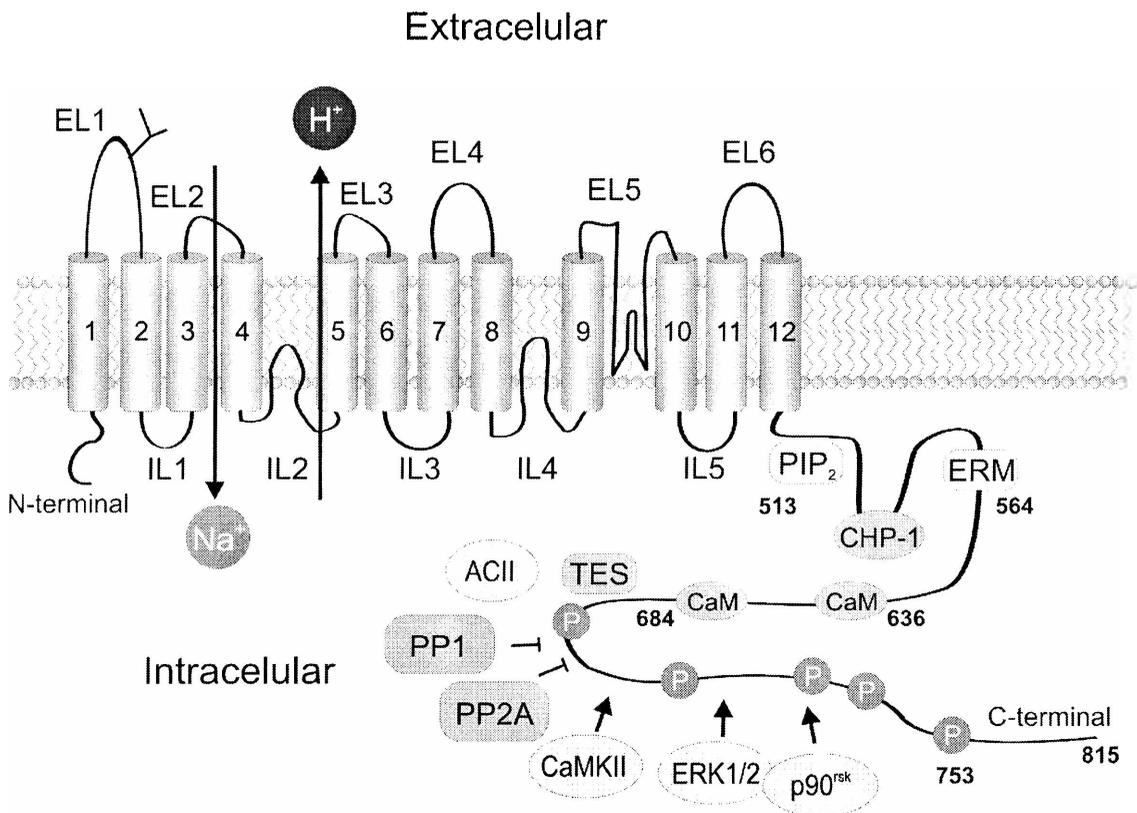
**Tabla 1.** Caracterización y distribución de las distintas isoformas descriptas del NHE.

### Estructura del NHE-1

El NHE-1 (**Figura 13**) es una proteína de 815 aminoácidos, con una masa molecular estimada a partir de su estructura primaria de 85 kDa, en la que se distinguen un dominio N-terminal asociado a la membrana (~ 500 aminoácidos de longitud) y una larga cola citoplasmática en su extremo C-terminal. El dominio de membrana, compuesto por 12 regiones transmembrana, está asociado al transporte iónico y contiene el sensor alostérico al H<sup>+</sup>, que determina la exquisita

## Introducción

sensibilidad del intercambiador al  $H^+$  intracelular. El dominio citoplasmático (~ 300 aminoácidos de longitud) está involucrado en la regulación del intercambiador mediante varios mecanismos. La remoción de la región distal de la cola citosólica ocasiona un corrimiento de la sensibilidad al  $pH_i$  hacia zonas más ácidas, además de una importante inhibición de la estimulación del NHE-1 por factores de crecimiento.(108)



**Figura 13.** Estructura y regulación del NHE-1. Se encuentran representados los 12 dominios transmembrana, los lazos intra y extracelulares (ILs y ELs); y la cola citosólica en el extremo C-terminal. En la cola citosólica se destacan los principales activadores (en color gris claro) e inhibidores (en color gris oscuro).

El NHE-1 presenta un grado de fosforilación basal, y un aumento en la fosforilación ocasiona un aumento de actividad.(109) Los sitios de fosforilación son blanco de ERK1/2, p90<sup>sk</sup> y otras como la quinasa Rho y la quinasa relacionada con Nck.(108,110) Se ha demostrado que la CaMKII puede fosforilar el dominio C-terminal del NHE-1 *in vitro*. Otras quinasas, como PKC y PKD son capaces de

## Introducción

influir en la actividad del NHE-1, activándolo en respuesta a la estimulación neurohormonal, aunque no sería por fosforilar directamente al intercambiador. Está descrita además la inhibición del NHE-1 por PKG,(111,112) aunque aun se desconoce el mecanismo por el cual esto ocurre. El NHE-1 es también susceptible a la acción de fosfatasas, como PP1 (113) y PP2A.(114) Otros mecanismos de regulación de la actividad del NHE-1 involucran fosforilación y/o desfosforilación de proteínas regulatorias e interacción con cofactores. Las proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  calmodulina (CaM), proteína 1 homóloga a calcineurina B (CHP-1) y tescalina, ejercen un efecto inhibitorio sobre la actividad del intercambiador que se libera cuando unen  $\text{Ca}^{2+}$ . La sobreexpresión de CHP-1 previene la activación del NHE-1 y este efecto es abolido mediante estimulación con factores de crecimiento. Células transfectadas con tescalina exhiben una marcada inhibición de la actividad del NHE-1 luego de una carga ácida. En la región proximal a la membrana de la cola citosólica existen dos posibles sitios de unión a inositol 4,5 bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ), involucrados en la regulación del NHE-1 por ATP. Aunque el intercambiador no utiliza ATP en forma directa, la depleción de ATP produce una disminución significativa de la actividad transportadora.(108,110)

Otra enzima de la que se ha conocido recientemente su influencia sobre la actividad del NHE-1 es la anhidrasa carbónica II (ACII).(113) La ACII cataliza la hidratación de  $\text{CO}_2$ , que luego de disociarse produce  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{H}^+$ . La enzima se une al dominio citosólico, siendo esta unión función del grado de fosforilación del NHE-1. Al inhibir la ACII disminuye la actividad del NHE-1.(113)

Las proteínas ligantes de actina, miembros de la familia de ezrina, radixina y moesina (ERM) forman enlaces entre el citoesqueleto y las proteínas integrales de la membrana plasmática e interactúan con la cola citosólica del NHE-1.(110)

En resumen, el NHE-1 funciona como un reclutador de complejos de vías de señalización.

La estimulación de los receptores acoplados a proteína G $\alpha_q$  mediante Ang II, ET y agonistas  $\alpha_1$  adrenérgicos, así como las especies reactivas del oxígeno (ROS) y la acidosis intracelular, son activadores bien establecidos del NHE-1, al menos en parte, a través de activación de las MAPKs.(114) Otros factores autocrinos, paracrinos y hormonales, como EGF, aldosterona, adenosina, trombina y la osmolaridad; también modulan la actividad del intercambiador.(114) Aunque la hiperactividad del NHE-1 se asocia generalmente con un incremento en el  $\text{pH}_i$ ,

## Introducción

esto no es necesariamente correcto. En presencia de bicarbonato, y como se mencionara anteriormente, la estimulación del NHE-1 por Ang II o ET-1 no induce alcalosis intracelular, o ella es mínima, dado que se activa simultáneamente el intercambiador AE por una vía dependiente de PKC.(114) Se enfatiza este punto dado que no está enteramente aceptada la observación de la ausencia de cambios en el  $\text{pH}_i$  en medios con bicarbonato luego de la estimulación del NHE-1 con factores de crecimiento; aunque fue publicado por Ganz y colaboradores (116) en 1988 en células mesangiales y fue motivo de revisión en una carta de Thomas a Nature un año después.(117)

En condiciones fisiológicas estacionarias, la actividad del NHE-1 es baja,(118,119) sin embargo el aumento de actividad del mismo como resultado de una acidosis intracelular o debido tanto a mecanismos traduccionales como post-traduccionales, puede ocasionar un efecto perjudicial. Existe sólida evidencia de que el efecto perjudicial resultante de la hiperactividad del NHE-1 se debe a que el aumento de  $[\text{Na}^+]_i$  desencadena una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del NCX, disfunción miocárdica, hipertrofia, apoptosis e insuficiencia cardíaca.(35,120-123)

En consecuencia, surge la inhibición de esta hiperactividad como una estrategia terapéutica para prevenir las consecuencias perjudiciales del aumento de la  $[\text{Na}^+]_i$  y de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , la activación de varias vías de señalización intracelulares y sus consecuencias: hipertrofia, necrosis y apoptosis.

## INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+/\text{H}^+$ E HIPERTROFIA CARDIACA

Aunque la relación entre estiramiento miocárdico y desarrollo de HC había sido extensamente estudiada, así como las bases celulares y moleculares que subyacen a la SFF, la conexión entre estas dos respuestas al estiramiento no había sido propuesta hasta la descripción del fenómeno autocrino/paracrino desencadenado por el estiramiento que involucra la activación secuencial de receptores  $\text{AT}_1$  y de ET y finalmente del NHE-1.(124) En la **Figura 6** se mostró una representación esquemática de la cascada de eventos propuesta, basada principalmente en resultados obtenidos en preparaciones multicelulares cardíacas sometidas a estiramiento.

El nexo entre la SFF y la hipertrofia miocárdica es reforzado por el hecho de que el bloqueo específico del NHE-1 en forma similar a su efecto sobre la SFF revierte la HC en diversos modelos experimentales.(120-122,125-130) Se hace énfasis en que el esquema ilustrado en la **Figura 6** no es el único mecanismo que podría conducir al desarrollo de HC. Como se describió anteriormente, vías intracelulares diferentes a la que involucra al NHE-1, pueden conducir al aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y al desarrollo de HC.(131,132) O aun la HC puede ocurrir sin aumentos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  citosólico (43). Sin embargo, la pretensión es focalizar en la activación del NHE-1 como un mecanismo emergente en la producción de HC y su inhibición como una herramienta terapéutica con la cual la regresión de la HC podría ser alcanzada independientemente de las condiciones de carga.

Se ha descrito que la hiperactividad del NHE-1 en el miocardio de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) ocurre sin provocar cambios en el  $\text{pH}_i$  en condiciones fisiológicas.(133) El hecho de que una actividad elevada del NHE-1 no se acompañe de un incremento en el  $\text{pH}_i$  puede resultar a priori difícil de interpretar ya que la actividad de este intercambiador ha sido tradicionalmente ligada más a la regulación del  $\text{pH}_i$  que a otros eventos celulares. Más aún, el estudio seminal realizado en huevos de erizo de mar demostrando que la fertilización se acompañaba de un incremento en el  $\text{pH}_i$  y que la prevención de la alcalinización cancelaba el crecimiento celular (134) otorgó sustento para unir ambos procesos. Sin embargo, otros investigadores destacaron el hecho de que el  $\text{pH}_i$  puede incrementar o disminuir con factores de crecimiento dependiendo de la ausencia o presencia de bicarbonato en el medio.(135,136) como fue demostrado en la **Figura 4**. Claramente, el hecho de que los cambios en la  $[\text{Na}^+]_i$  vayan o no

acompañados por cambios en el  $\text{pH}_i$ ; dependerá del interjuego entre el incremento en la actividad del NHE-1 y de los mecanismos dependientes de bicarbonato. Asimismo, el hecho de que se produzca un aumento de la  $[\text{Na}^+]_i$  dependerá de cuán eficientemente la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa compense la hiperactividad del NHE-1. Sin embargo, pareciera que pequeños incrementos en la  $[\text{Na}^+]_i$  no detectados por la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa son suficientes para influenciar la actividad del NCX.(137)

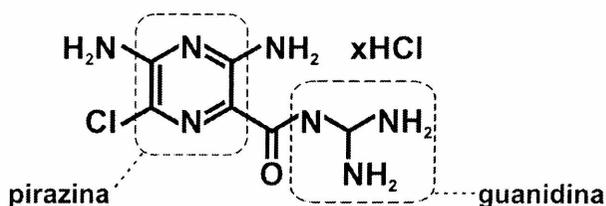
En resumen, se ha descrito: 1) Una actividad incrementada del NHE-1 sin cambios en el  $\text{pH}_i$  en el miocardio de ratas SHR.(133,138) 2) Un incremento en la  $[\text{Na}^+]_i$  pero no en el  $\text{pH}_i$  luego de la estimulación por Ang II o ET-1;(31,34) 3) La participación de la ET-1 endógena en la estimulación del NHE-1 (19) y del AE (31) y 4) La cancelación del efecto inotrópico positivo del estiramiento miocárdico (SFF o efecto Anrep) al prevenir el incremento de la  $[\text{Na}^+]_i$ .(24,25)

Todas estas contribuciones sugerirían que el incremento del  $\text{pH}_i$  no está necesariamente ligado al crecimiento celular y muestran que factores de crecimiento pueden actuar a través de cambios en la  $[\text{Na}^+]_i$  aún si el  $\text{pH}_i$  permanece inalterado. Sin embargo, un trabajo reciente de Putney y Barber (139) mostró que un aumento del  $\text{pH}_i$  en ausencia de hiperactividad del NHE-1 promueve la transición de la fase S hacia el estado  $\text{G}_2/\text{M}$  siendo por lo tanto una señal de crecimiento. Pareciera ser entonces, que existe la posibilidad de que un incremento en el  $\text{pH}_i$  pueda inducir incremento en la síntesis de proteínas independientemente de aumentar de la  $[\text{Na}^+]_i$  y la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . No obstante, esto no indica que la alcalinización intracelular sea un requisito necesario y suficiente para la producción de HC.

## INHIBICION DEL INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+/\text{H}^+$ Y REGRESION DE LA HIPERTROFIA CARDIACA

### Inhibición del NHE-1

Se han desarrollado numerosos inhibidores del NHE-1 con el objetivo de producir cardioprotección luego de la activación del intercambiador, previniendo los aumentos de  $[\text{Na}^+]_i$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . El amiloride (**Figura 14**), un diurético ahorrador de  $\text{K}^+$ , fue el primer inhibidor del NHE descrito. NHE-1 y NHE-2 son las isoformas más sensibles a esta droga, que también inhibe canales de  $\text{Na}^+$  y al NCX. Con el objetivo de mejorar la potencia y la selectividad sobre la isoforma NHE-1, se obtuvieron derivados sintéticos del amiloride, modificando los sustituyentes pero conservando el heterociclo de pirazina considerado esencial para su bioactividad. Realizando una sustitución doble sobre el nitrógeno del grupo amino 5, se ha obtenido una serie de compuestos, entre los que se han distinguido los derivados del amiloride N-alquilados DMA (dimetilamiloride), HMA (hexametilenamiloride) y EIPA (etilisopropilamiloride); de los cuales el EIPA ha sido uno de los más utilizados. Su  $\text{IC}_{50}$  es aproximadamente 100 veces menor que la del amiloride, y posee menos acción sobre los canales de  $\text{Na}^+$  y el NCX.

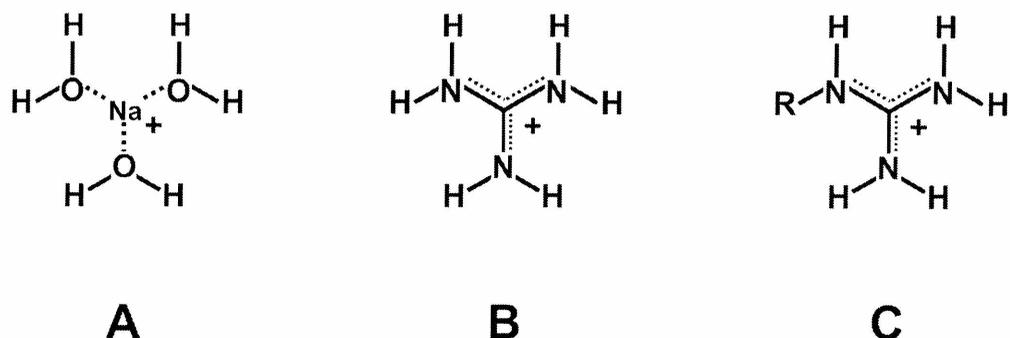


### Amiloride

**Figura 14.** Estructura molecular del amiloride, se muestran los grupos pirazina y guanidina.

Investigaciones posteriores llevaron al empleo de un nuevo enfoque de síntesis, basándose en la hipótesis de Paolini (140) de que la porción fundamental de la molécula de amiloride era el grupo guanidina y no el heterociclo de pirazina; ya que el primero es prácticamente idéntico en carga, forma y tamaño al ion  $\text{Na}^+$  tal como se lo encuentra hidratado en solución acuosa rodeado trigonalmente por 3 moléculas de agua. (**Figura 15**)

Se han sintetizado aproximadamente más de 100 derivados de guanidina y se los puede clasificar según la naturaleza del grupo R.



**Figura 15.** Estructuras moleculares en las que se observa la similitud entre: **A** el ion  $\text{Na}^+$  trihidratado, **B** el ion guanidinio nativo y **C** ion guanidinio sustituido con el grupo genérico R.

Entre los mejor caracterizados, el amiloride y sus derivados mencionados anteriormente pertenecen al grupo de las heteroarilguanidinas con ciclo de 6 átomos, el SM-20550 y el zoniporide (CP-597396) pertenecen al grupo de heteroarilguanidinas con ciclo de 5 átomos, mientras que el HOE694; el HOE642 (cariporide); el EMD96785 (eniporide); el BIIB513; el BIIB723 y el EMD87580 pertenecen al grupo de las arilguanidinas. La mayoría de los nuevos compuestos desarrollados posee un  $\text{IC}_{50}$  del mismo orden de magnitud que el EIPA, pero mucha mayor selectividad por el NHE-1 que por las demás isoformas. Estos compuestos difieren en su solubilidad, las posibles rutas de administración y la persistencia del efecto luego del lavado de la droga.(141) El desafío para la síntesis lo ha constituido tanto la selectividad sobre la isoforma del NHE como su acción diferencial con respecto a otros transportadores de  $\text{Na}^+$  como los canales de  $\text{Na}^+$  y el NCX. Si bien se ha progresado en la caracterización *in vitro* de estas drogas desde el amiloride a esta parte, poco se conoce sobre el accionar *in vivo* de los compuestos más recientemente sintetizados.

### **Regresión de la HC por inhibición del NHE-1**

Dado que la actividad del NHE-1 se encuentra incrementada en el miocardio hipertrófico de las ratas SHR,(133,138) se hipotetizó que la inhibición del intercambiador podría revertir o prevenir el desarrollo de HC. La HC hipertensiva es un modelo de HC inducido por sobrecarga de presión caracterizado por hipertrofia concéntrica, fibrosis y expresión de marcadores genéticos fetales. Camilión de Hurtado y colaboradores (125) demostraron que la HC de las ratas SHR se revierte con el tratamiento con cariporide. La relación entre la normalización de la actividad del NHE y la regresión de la HC también había sido demostrada luego del tratamiento crónico con otros fármacos con efecto antihipertrófico conocido, como losartán, enalapril o nifedipina.(142) El último estudio también demostró el hecho interesante de que la regresión de la HC puede ser independiente de la magnitud de la disminución de la PA, según la intervención farmacológica utilizada.

El nexo entre la actividad del NHE-1 y la HC ha sido establecido también para diversos modelos neurohumorales de HC distintos de la cardiopatía hipertensiva. La hipertrofia del miocito y la fibrosis de la hipertrofia miocárdica inducida por la estimulación  $\beta$ -adrenérgica fue prevenida por la inhibición del NHE-1.(126,127) De modo similar, Ennis y colaboradores (127) demostraron que la HC inducida por isoproterenol fue prevenida mediante la co-administración de un inhibidor del NHE-1. Kusumoto y colaboradores (131) demostraron que la inhibición específica del NHE-1 con cariporide disminuyó la HC y el remodelamiento que se desarrolla luego del infarto del miocardio como consecuencia de la sobrecarga hemodinámica de los miocitos sobrevivientes. En los años subsiguientes se destacó la participación del NHE-1 en varios otros modelos de HC. Corazones hipertiroideos hipertróficos poseen actividad del NHE-1 incrementada (120) y es interesante destacar que ratones con alteración genética específica de la ET de miocitos son resistentes a la hipertrofia hipertiroidea.(143) Una relación entre la hipertrofia ventricular izquierda y la actividad de la parathormona ha sido descrita en pacientes con enfermedad renal terminal e hiperparatiroidismo secundario.(144) Dado que la actividad del NHE-1 puede ser modulada por la parathormona (145) es tentador especular acerca de la posible participación del NHE-1 en este tipo de hipertrofia cardíaca. La aldosterona induce HC y activación de la cascada de las MAPKs acompañada por un aumento de la expresión del

## Introducción

NHE-1 en cardiomiocitos de ratas neonatas.(128) En estos experimentos el tratamiento con inhibidores del NHE-1 abolió el aumento de expresión del NHE-1 y la hipertrofia de los cardiomiocitos pero la actividad de las MAPKs se mantuvo elevada.(128) En un trabajo muy interesante recientemente publicado en Nature, el desarrollo de HC inducido por constricción aórtica fue prevenido y revertido mediante un aumento de la actividad de PKG.(146) Por un lado es posible que este aumento de PKG induzca inhibición del NHE-1,(111,112) y por otro lado ha sido descrito que la PKG es capaz de revertir la hipertrofia producida por calcineurina constitutivamente activa,(147) pudiendo ser la conjunción de ambas evidencias la causa del efecto antihipertrófico observado.

En cuanto a la especulación acerca de si la inhibición de la actividad del NHE-1 cambia el  $[Na^+]_i$  y/o el  $pH_i$ , cabe mencionar que el bloqueo del NHE-1 es una importante herramienta farmacológica para reducir la  $[Na^+]_i$ . El incremento en la  $[Na^+]_i$  induce diversas señales intracelulares como la activación del PKC, del NCX y aumento del estrés oxidativo.(35,148,149)

Hallazgos experimentales demostraron que la hiperactividad del NHE-1 juega un papel importante en el desarrollo de la injuria por isquemia/reperfusión, en el remodelamiento post-infarto de miocardio, así como que su inhibición farmacológica disminuye la sobrecarga de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  intracelular en estas condiciones experimentales mejorando la función cardíaca.(150-154) La evidencia farmacológica para el efecto beneficioso de la inhibición del NHE-1 en la injuria por isquemia/reperfusión fue confirmada en corazones de ratón con ablación del NHE-1 (Nhe1<sup>-/-</sup>) que exhiben resistencia incrementada a la injuria por isquemia/reperfusión.(155) Más aun, una comunicación reciente muestra que la hiperactividad del NHE-1 puede ser abolida disminuyendo su nivel de fosforilación en el aminoácido serina 703 del extremo C-terminal mediante la generación de un ratón transgénico dominante negativo de RSK. Este ratón transgénico posee menor grado de apoptosis de los cardiomiocitos y presenta una mayor tolerancia a la isquemia/reperfusión.(156)

Todas estas evidencias motivaron el análisis de la inhibición del NHE-1 en seres humanos mediante la realización de ensayos clínicos programados.(157-159) Los resultados aun no son concluyentes dado que en el ensayo clínico más reciente (EXPEDITION), si bien se obtuvo una reducción altamente significativa del riesgo relativo de infarto y de mortalidad de origen cardíaco, desafortunada e

## Introducción

inesperadamente los efectos beneficiosos del cariporide en la isquemia miocárdica fueron oscurecidos por una alta incidencia de accidentes cerebro-vasculares (ACV), lo que condujo a la interrupción prematura del ensayo clínico.(157) No se ha establecido si el retiro abrupto del bloqueo crónico del NHE-1 juega algún papel en la alta incidencia de ACV pero se sabe que con el tratamiento crónico con cariporide ocurre un aumento en la expresión del NHE-1.(160) Se desconoce hasta el momento si este aumento en la expresión del NHE-1 es compartido por otros inhibidores del intercambiador.

# **OBJETIVOS**

## Objetivos

El objetivo general del presente trabajo consistió en estudiar los mecanismos celulares involucrados en la regresión de la HC hipertensiva cuando se inhibe el NHE-1, y los efectos que produce dicha inhibición en la función miocárdica. El trabajo se realizó administrando crónicamente dos inhibidores distintos del NHE-1: cariporide y BIIB723 a ratas SHR, que desarrollan HC secundariamente a la hipertensión arterial que está genéticamente determinada en estos animales. Además se aplicó el mismo tratamiento a ratas normotensas de la cepa Wistar.

Los experimentos fueron diseñados para responder los siguientes interrogantes:

- 1) ¿La administración crónica y sistémica de los inhibidores del NHE-1 produce algún efecto extracardíaco? ¿Es posible que las drogas utilizadas actuando sobre el NHE-1 en riñón produzcan un aumento de la diuresis y/o natriuresis? Para responder esta pregunta se realizó el monitoreo durante el tratamiento con cariporide y BIIB723 de la diuresis, la natriuresis y del volumen de agua ingerida.
- 2) ¿Cómo está caracterizada la regresión de HC por inhibición del NHE-1 en el modelo de ratas SHR? Para cuantificar la magnitud de la regresión de la HC se evaluaron los siguientes índices: el cociente peso biventricular/peso corporal (PBV/PC) y la expresión del marcador molecular de HC, BNP.
- 3) ¿Está involucrada la vía intracelular calcineurina/NFAT en la HC con hiperactividad del NHE-1 presente en las ratas SHR? Para determinarlo se evaluó la actividad de esta vía en ratas SHR no tratadas y se contrastó con los resultados obtenidos en ratas SHR sometidas a inhibición crónica del NHE-1.
- 4) ¿Cómo está caracterizada ecocardiográficamente la regresión de HC inducida por inhibición crónica del NHE-1? Para responder esta pregunta se determinaron los diámetros ventriculares de fin de sístole y de fin de diástole, así como el cociente  $h/r$ , un estimador del grado de concetricidad del ventrículo izquierdo (VI), antes y después de realizar el tratamiento farmacológico con los dos inhibidores del NHE-1
- 5) ¿Qué consecuencias funcionales tiene la regresión de la HC conseguida mediante inhibición del NHE-1? Para saberlo, se determinaron por ecocardiografía antes y luego de finalizar el tratamiento crónico con cariporide y BIIB, el acortamiento endocárdico (AEnd) y el acortamiento medio ventricular (AMV) y se contrastaron con los valores de estrés sistólico pico (ESP).

# MÉTODOS

### **ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Se utilizaron ratas macho de 4 meses de edad de la cepa Wistar y SHR. Los animales fueron criados en el Bioterio del Centro de Investigaciones Cardiovasculares, mantenidos en un macroambiente ventilado, con temperaturas entre 18 y 22 °C y ciclos de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Luego del destete a los 21 días se los colocó en cajas de acero inoxidable con lecho de viruta esterilizada y tapa tipo tolva para permitir el acceso ilimitado a alimento balanceado para rata y agua de la canilla que se administró en mamaderas.

#### **Wistar**

Las ratas Wistar constituyen una cepa de ratas albinas exocriadas pertenecientes a la especie *Rattus norvegicus*. Esta cepa fue desarrollada en 1906 en el Instituto Wistar de Filadelfia para su utilización en investigación biológica y médica por el fisiólogo Henry Donaldson. Las cepas de la mayoría de los laboratorios descienden de la colonia establecida en el Instituto Wistar, y actualmente es una de las cepas más populares en investigación. En el presente trabajo se utilizaron ratas Wistar como control normotenso y normotrófico.

#### **SHR**

Introducidas originalmente en el año 1963 por Okamoto y Aoki (161) mediante seis generaciones de endocria a partir de una pareja de ratas de la cepa Wistar que presentaba presión arterial persistentemente elevada, constituyen un modelo para el estudio longitudinal de la progresión natural de hipertrofia ventricular izquierda producida por un aumento de la poscarga. Normalmente, el crecimiento postnatal del tejido cardíaco implica una hipertrofia de las miofibrillas e hiperplasia del tejido conectivo con un aumento en masa del órgano en proporción al aumento de masa corporal. En un corazón sometido a una mayor poscarga el crecimiento ocurre de una manera similar, sin embargo la respuesta, principalmente del ventrículo izquierdo, es desproporcional con respecto al peso corporal. (162) En este modelo el estiramiento mecánico y la HC ocurren de manera crónica y secundaria a un aumento de la presión arterial genéticamente determinado.

**PROTOCOLO DE TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO**

Para analizar los efectos de la inhibición crónica del NHE-1 los animales de 4 meses de edad fueron distribuidos al azar en los siguientes grupos experimentales:

**Grupos control**

**Grupo Wistar.** Ratas Wistar: Control normotenso y normotrófico.

**Grupo SHR.** Ratas SHR: Control hipertenso e hipertrófico.

**Grupos con tratamiento farmacológico**

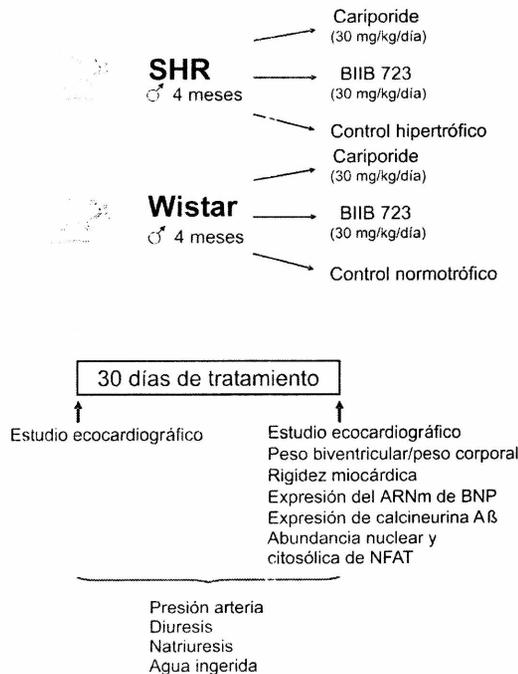
**Grupo SHR+cariporide.** Ratas SHR tratadas con el inhibidor específico del NHE-1: cariporide (HOE 642).

**Grupo SHR+BIIB.** Ratas SHR tratadas con el inhibidor específico del NHE-1: BIIB 723 (Boehringer-Ingelheim).

**Grupo Wistar+cariporide.** Ratas Wistar tratadas con cariporide.

**Grupo Wistar+BIIB.** Ratas Wistar tratadas con BIIB 723.

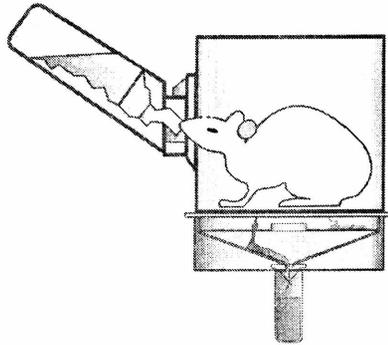
En la **Figura 16** se presenta un esquema de los grupos experimentales empleados, junto con un resumen de las determinaciones realizadas, que se detallan a continuación.



**Figura 16.** Resumen de los grupos experimentales utilizados y las determinaciones realizadas.

## Métodos

Los animales fueron colocados en jaulas metabólicas individuales una semana antes de comenzar el protocolo experimental para permitir la aclimatación al nuevo microambiente y disminuir el estrés. Como se observa en la **Figura 17**, cada una de dichas jaulas posee una mamadera individual mediante la cual es posible ajustar el volumen de agua a los valores diarios de consumo y un sistema de embudo que permite colectar diariamente la orina para determinación de la diuresis y natriuresis.



**Figura 17** Esquema de una jaula metabólica. Posibilita efectuar registros de volumen de agua ingerida, colectar la orina total y medir la diuresis.

Los tratamientos consistieron en la administración por vía oral de una dosis de 30 mg/kg/día de la droga respectiva, suministrada en el agua de bebida. Dicha administración se realizó diariamente por el período de un mes, corrigiendo la dosis de acuerdo a registros diarios de agua ingerida y semanal de peso corporal. Durante el período de tratamiento se midió diariamente la diuresis y se efectuaron medidas semanales de la presión arterial, registrada utilizando el método indirecto de medición en la cola del animal. A partir de las muestras de orina recogidas se midió la concentración de el ion  $\text{Na}^+$  por absorción atómica, empleando un espectrómetro de llama. De esta manera se pudo seguir el curso diario de los parámetros: agua ingerida, diuresis y natriuresis.

Una vez finalizado el período de tratamiento y realizado el segundo estudio ecocardiográfico, los animales fueron eutanizados bajo anestesia profunda con éter. Se extrajeron rápidamente los corazones, que luego de ser desprovistos del tejido conectivo adyacente, las aurículas y los grandes vasos se secaron en papel de filtro y se pesaron para la determinación del índice de hipertrofia cardíaca según el cociente peso biventricular/peso corporal (PBV/PC).

Inmediatamente se procedió a conservar el material proveniente del ventrículo izquierdo de manera apropiada para las determinaciones moleculares a realizar.

## Métodos

Para determinar por western blot el nivel de expresión de calcineurina total, calcineurina A $\beta$  y NFAT nuclear y citosólico; se congeló el tejido en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta el momento de su utilización. Para las determinaciones del ARNm del BNP mediante transcripción reversa (RT) y posterior cuantificación relativa mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real time RT-PCR), se preservó el tejido en RNAlater (Qiagen) cortado en pequeños trocitos para permitir el rápido acceso del estabilizador, y se conservó a -80°C hasta el momento de ser utilizado.

### **DETERMINACIÓN DE AGUA INGERIDA, DIURESIS Y NATRIURESIS**

El agua ingerida se determinó diariamente por diferencia de volumen en las mamaderas con el día previo, como ml/24 horas. De modo similar, la diuresis se determinó mediante la medida de volumen de orina colectada de cada jaula metabólica individual cada 24 horas. Para determinar la natriuresis se tomó de cada animal una muestra diaria de 1 ml de orina. Estas muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 400xg (marca) para separar el sedimento. La concentración de Na<sup>+</sup> en la orina se determinó en diluciones 1/5000 del sobrenadante, mediante lecturas a 589 nm en un espectrofotómetro de absorción atómica (Shimadzu, AA-630-12) y una curva de calibración realizada con 0M, 10<sup>-5</sup>M, 2.5x10<sup>-5</sup>M, 5x10<sup>-5</sup>M y 10<sup>-4</sup>M de NaCl Pro analysi (Merck). La natriuresis fue calculada como el producto de la diuresis por la concentración de Na<sup>+</sup> en la orina, en mg Na<sup>+</sup>/24 horas.

### **EVALUACIÓN ECOCARDIOGRÁFICA**

Se realizaron registros ecocardiográficos a los animales de todos los grupos, al inicio y a los 30 días del protocolo, es decir, un estudio antes y otro en el último día de recibir el tratamiento. Para ello, se anestesiaron los animales con 35mg/kg de pentobarbital sódico intraperitoneal, se depiló la zona torácica y se aplicó gel ultrasónico. El ecocardiograma transtorácico se obtuvo utilizando un transductor de 7.5 mHz (ATL 3500). Las vistas fueron tomadas en planos equivalentes al eje corto paraesternal en humanos. El modo M fue derivado de la vista de eje corto a nivel de los músculos papilares, una vez obtenidas imágenes bidimensionales de buena calidad del ventrículo izquierdo. El flujo de la válvula aórtica se registró con Doppler pulsado desde la vista apical de 4 cámaras. Las imágenes congeladas en

## Métodos

modo M y la señal Doppler se digitalizaron para realizar las determinaciones off-line. Las mediciones para el análisis de la estructura y función del ventrículo izquierdo fueron efectuadas en 3 latidos consecutivos, de acuerdo a las recomendaciones de la American Society of Echocardiography.(163) El período de eyección del ventrículo izquierdo se midió en el registro de flujo de la válvula aórtica.

De cada registro se tomaron los siguientes parámetros de la forma en que se puede apreciar en la **Figura 18**:

**DDVI** diámetro diastólico del VI

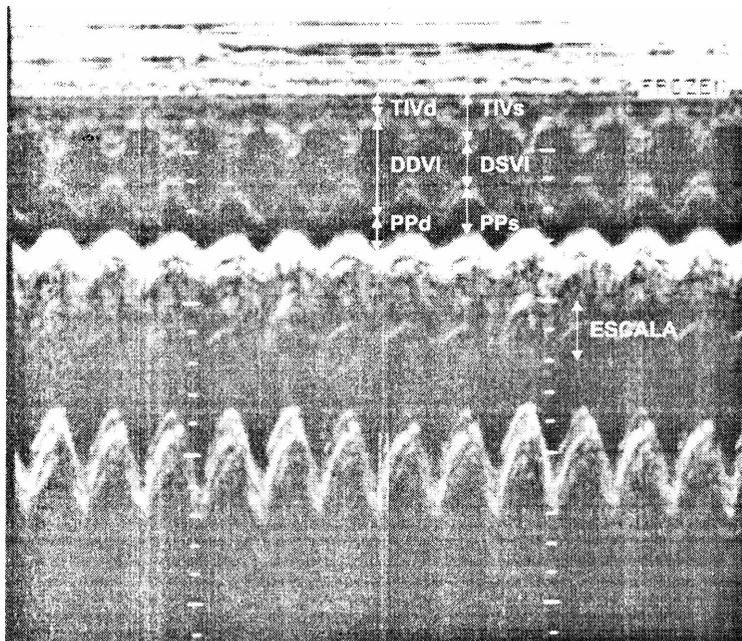
**DSVI** diámetro sistólico del VI

**TIVd** espesor diastólico del tabique interventricular

**TIVs** espesor sistólico del tabique interventricular

**PPd** espesor en diástole de la pared posterior del VI

**PPs** espesor sistólico de la pared posterior del VI



**Figura 18** Ecocardiograma típico de rata. Modo M, Transductor 7.5 mHz. Se muestra la forma de efectuar las lecturas de espesor diastólico y sistólico del tabique interventricular (TIVd y TIVs), diámetro diastólico y sistólico del VI (DDVI y DSVI) y espesor en diástole y en sístole de la pared posterior del VI (PPd y PPs).

## Métodos

El espesor parietal relativo (h/r), el acortamiento endocárdico (AEnd) y el acortamiento medio ventricular (AMV) se calcularon según lo previamente descrito (163-165) y que se detalla a continuación:

Espesor parietal relativo

$$h/r = \left( \frac{TIVd+PPd}{DDVI} \right)$$

Acortamiento endocárdico

$$AEnd (\%) = \left( \frac{DDVI-DSVI}{DDVI} \right) \times 100$$

Acortamiento medio ventricular

$$AMV (\%) = \left( \frac{[DDVI+(TIVd+PPd)/2] - [DSVI+(TIVs+PPs)/2]}{DDVI+(TIVd+PPd)/2} \right) \times 100$$

El índice de estrés circunferencial no invasivo fue calculado como estrés sistólico pico (ESP) a partir de los datos ecocardiográficos de diámetro y espesor del ventrículo izquierdo y de presión arterial sistólica (PAS), aplicando la fórmula propuesta por Quiñones y colaboradores.(166)

Estrés sistólico pico

$$ESP (kdinas/cm^2) = \left( \frac{PAS \times DDVI \times 0.334}{PPd \times (1+PPd/DDVI)} \right)$$

### DETERMINACIÓN DE LA RIGIDEZ MIOCÁRDICA

Para evaluar la rigidez miocárdica, se aislaron músculos papilares del ventrículo izquierdo y se montaron en una cámara de perfusión horizontal, entre un transductor de fuerza (AEM801 SensorOne) y un soporte fijo para realizar los registros isométricos. Los músculos se bañaron a una velocidad constante de 5 ml/min con una solución amortiguada con CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de composición (mmol/l): NaCl 128.3, KCl 4.5, CaCl<sub>2</sub> 1.35, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.35, NaHCO<sub>3</sub> 20.23, MgSO<sub>4</sub> 1.05,

## Métodos

glucosa 11.0; equilibrada con 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub> (pH ~7.4). Las preparaciones fueron estimuladas con pulsos cuadrados de 5 msec de duración y con un voltaje ~20% mayor que el umbral. Luego del montaje, y con el músculo en estado laxo, se realizó la determinación de la longitud ( $L_0$ ), espesor y ancho mediante lectura en una cuadrícula impresa en la lente de un estereomicroscopio SZ30 Olympus Zoom fijado en una magnificación 30x. Posteriormente se estiraron los músculos de forma progresiva en escalones de 10% de  $L_0$  hasta la longitud en la que desarrollaron la fuerza máxima de contracción ( $L_{m\acute{a}x}$ ). La fuerza se normalizó con respecto al área de sección transversal de cada músculo, calculada mediante el producto del espesor y el ancho y corregida por un factor de 0.75 asumiendo que los músculos papilares poseen forma elipsoidal. La relación tensión-longitud para cada músculo se ajustó a una ecuación exponencial de la que se extrajeron valores fijos de tensión ( $\Delta L/L_{m\acute{a}x}$ ) mediante interpolación en cada experimento.(167)

## DETERMINACIONES MOLECULARES

### A- Determinación de proteínas

Se realizaron determinaciones de la expresión de proteínas específicas en tres tipos de preparados:

- \* Homogenatos de ventrículo izquierdo
- \* Fracción nuclear de ventrículo izquierdo
- \* Fracción citosólica de ventrículo izquierdo

A continuación se detalla el procedimiento seguido para la obtención de cada preparado

### Preparación de homogenatos de ventrículo izquierdo

Para la determinación de la expresión proteica en homogenatos de ventrículo izquierdo las muestras congeladas se colocaron en 5 volúmenes (5ml/g) de buffer de lisis (sacarosa 300 mmol/l; DTT 1 mmol/L; EGTA 4 mmol/L, cocktail de inhibidores de proteasas (Complete Mini Roche) 1 pastilla/15 ml de buffer; Tris-HCl 20 mmol/L, pH 7.4), y se realizaron 3 pasos de homogeneización en baño de hielo utilizando la velocidad 6 de un homogeneizador de tejidos Polytron (Brinkmann modelo PCU11), de 10 segundos cada uno, separados por 30 segundos. Luego de la homogeneización las muestras se mantuvieron en baño de hielo durante 30 minutos para completar la acción del buffer de lisis. A continuación se realizó una centrifugación a baja velocidad: 5000xg a 4°C durante 15 minutos (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge); para separar los restos de tejido no homogeneizado. Se descartó el pellet y el sobrenadante se centrifugó a alta velocidad: 50000xg a 4°C durante 60 minutos en ultracentrifuga (Beckman Optimma TLX, rotor TLA 100.4); para separar las fracciones de membrana remanentes. El pellet fue descartado y el sobrenadante se sonicó 5 segundos y se conservó como homogenato de ventrículo izquierdo, a -80°C.

### Preparación de fracciones nuclear y citosólica del ventrículo izquierdo

Se utilizó el procedimiento descrito por Bare y colaboradores.(168) para el fraccionamiento subcelular de tejido cardíaco. Se homogeneizaron los corazones congelados de rata en 10 volúmenes (10 ml/g) de Buffer A (HEPES 10 mmol/litro, pH 7.2, sacarosa 320 mmol/litro, MgCl<sub>2</sub> 3 mmol/litro, pirofosfato de sodio 25

## Métodos

mmol/litro, ditioneitol (DTT) 1 mmol/litro, EGTA 5 mmol/litro, fenilmetanosulfonilfluoruro (PMSF) 1.0 mmol/litro, leupeptina y pepstatina 1  $\mu$ mol/litro) utilizando el homogeneizador de tejidos Polytron (Brinkmann modelo PCU11) en velocidad 6 durante 15 segundos. El homogenato resultante fue filtrado secuencialmente por filtro de gasa doble y filtros de polipropileno de 0.84 y 0.30  $\mu$ m de tamaño de poro. El filtrado fue centrifugado a 3800xg durante 20 minutos a 4°C (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge). Se conservó el sobrenadante como fracción citosólica de ventrículo izquierdo. El pellet fue resuspendido en el mismo volumen de Buffer A1 (igual que buffer A, pero con sacarosa 2.4 mmol/litro y sin pirofosfato de sodio). Los núcleos de los miocitos del ventrículo izquierdo fueron sedimentados a 50000xg y 4°C durante 90 minutos en ultracentrífuga (Beckman Optimma TLX, rotor TLA 100.4). El pellet fue lavado por resuspensión en 1 ml de Buffer A, centrifugado a 3800xg y 4°C durante 20 minutos y nuevamente resuspendido en 500  $\mu$ l de Buffer A. Finalmente se sonicó (Cole Parmer ultrasonic homogenizer) y se conservó a -80°C como fracción nuclear de ventrículo izquierdo.

### **Determinación de la concentración de proteínas**

Para la medida de la concentración de proteínas en las distintas fracciones se empleó el método espectrofotométrico de Bradford (BioRad Protein Assay) siguiendo las instrucciones del fabricante. Partiendo de diluciones apropiadas de las muestras se realizaron las determinaciones por triplicado, leyendo la absorbancia a 595 nm, con sustracción del blanco de reactivos, en un espectrofotómetro UV/visible (SmartSpec 3000, Bio-Rad). La cuantificación se realizó a partir de una curva de calibración realizada con 4 diluciones de seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich).

### **Determinación de la expresión de calcineurina total, calcineurina A $\beta$ y NFAT**

Mediante la técnica de western-blot se evaluó la expresión de las proteínas citadas en los distintos grupos experimentales utilizando en casa caso la fracción apropiada. Para ello se utilizó el sistema de cuba y buffers para electroforesis y transferencia Novex (Invitrogen). A continuación se describe el procedimiento en común para todas las determinaciones y más adelante se detallan las condiciones específicas para cada proteína.

## Métodos

*Preparación de las muestras:* las muestras se descongelaron en baño de hielo. Se tomó el volumen adecuado según la proteína a analizar y se procedió a la desnaturalización y preparación para la electroforesis utilizando buffer de muestra y 10% de agente reductor (ambos de Invitrogen). Se completó con agua bidestilada para alcanzar el volumen a sembrar en el gel en cada caso. Todo este procedimiento se realizó en baño de hielo. Las muestras se desnaturalizaron en baño termostático (PRECISION) a 70°C durante 10 minutos.

*Electroforesis:* para la separación electroforética de las proteínas se utilizaron geles preensablados de poliacrilamida en gradiente 4-12% Bis-Tris (Invitrogen) y dilución adecuada del buffer 20X (Invitrogen) de composición 1.00 mol/litro MOPS, 1.00 mol/litro Tris base, 69.3 mM SDS, 20.5 mM EDTA y agua bi-destilada hasta 500 mL, pH 7.7. Al buffer reconstituído utilizado para la cámara interna se le agregó agente reductor (Invitrogen) en una concentración final de 0.1%. Se sembró un volumen apropiado de las muestras en el gel, más 1  $\mu$ L de marcador de pesos moleculares (MagicMarc, Invitrogen). La corrida electroforética se realizó a temperatura ambiente y a 200 V, suministrados por una fuente de poder PS 251-2 (Sigma-Aldrich). La corrida se prolongó durante el tiempo necesario para que el frente de solvente alcanzara el extremo del gel (aproximadamente 45-60 minutos).

*Transferencia:* las proteínas separadas por su peso molecular fueron transferidas a membranas de PVDF (Millipore). Se empleó una dilución adecuada del buffer de transferencia 20X (Invitrogen) de composición 500mM bicina, 500mM Bis-Tris, 20.5 mM EDTA, 1 mM clorobutanol y agua ultrapura hasta 600 mL. Al reconstituir el buffer se le adicionó metanol (Carlo Erba) y agente reductor (Invitrogen) en una concentración final de 10 y 0.1%, respectivamente. Las membranas se activaron sumergiéndolas durante 30 segundo en metanol, luego se las enjuagó con agua bidestilada y se las dejó equilibrar en el buffer de transferencia varios minutos, al igual que los papeles de filtro y las esponjas utilizadas en el sandwich. La transferencia se llevó a cabo con la cuba en baño de hielo, utilizando el voltaje y el tiempo apropiados en cada caso. Una vez finalizada, se retiraron las membranas y se corroboró la presencia de proteínas en la misma mediante tinción reversible

## Métodos

con Ponceau (0.1% Ponceau en 0.5% de ácido acético) y posteriormente se enjuagó con T-TBS (tris base 0.05M, NaCl 0.15M, Tween 20 0.1%).

*Bloqueo:* las membranas se bloquearon durante 60 minutos en agitador orbital (Decalab) a temperatura ambiente con solución en T-TBS de leche en polvo descremada (Molico) o de BSA en concentración apropiada.

*Incubación con anticuerpo primario específico:* luego de un breve enjuage con T-TBS de la solución de bloqueo, se incubaron las membranas con 10 mL de la dilución correspondiente de anticuerpo primario contra la proteína de interés, en T-TBS adicionado con 1% de BSA. Este procedimiento se realizó "over-night", a 4°C y con agitación orbital.

*Lavado del anticuerpo primario:* para eliminar el anticuerpo primario que se hubiere adherido inespecíficamente a la membrana, luego de retirar el anticuerpo primario se realizaron 4 lavados con T-TBS a temperatura ambiente en agitador orbital. El primero de 5 minutos y los tres siguientes de 10 minutos.

*Incubación con anticuerpo secundario:* las membranas se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente y con agitación, con 10 mL de la dilución apropiada del anticuerpo secundario correspondiente en T-TBS adicionado con 1% de BSA. El anticuerpo secundario está acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) y está diseñado para reconocer la fracción Fc específica de la especie en la que se obtuvo el anticuerpo primario, haciendo de nexo de esta manera entre la proteína de interés y el sistema posterior de detección.

*Lavado del anticuerpo secundario:* se realizó de la misma manera que el lavado del anticuerpo primario.

*Revelado:* se utilizó el sistema de detección ECL Plus (Amersham) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La reacción se basa en la generación de éster de acridinio a partir de un sustrato, agua oxigenada y la HRP, en las condiciones alcalinas del medio esta sustancia se oxida generando un producto excitado que emite señal quimioluminiscente que puede ser detectada y cuantificada. La

## Métodos

detección se realizó mediante la cámara CCD de un equipo Chemidoc XRS (Bio-Rad), que captura y digitaliza las imágenes.

*Cuantificación:* se cuantificó la intensidad de las bandas por densitometría utilizando el programa Scion Image.

### Condiciones específicas

	CnA total	CnA $\beta$	NFATn	NFATc
Proteína sembrada por calle	40 $\mu$ g	110 $\mu$ g	10 $\mu$ g	40 $\mu$ g
Voltaje y tiempo de transferencia	30 V 3 hs	35 V 2.5 hs	30 V 4 hs	30 V 4 hs
Bloqueo	Leche 5%	Leche 5%	Leche 5%	Leche 5%
Anticuerpo primario	1:500 556350 (BD Pharmingen™)	1:500 sc-6124 (Santa Cruz Biotechnology)	1:500 sc-8321 (Santa Cruz Biotechnology)	1:500 sc-8321 (Santa Cruz Biotechnology)
Anticuerpo secundario	1:5000 anti-mouse NA931VS (Amersham)	1:10000 anti-goat sc-2354 (Santa Cruz Biotechnology)	1:5000 anti-rabbit NA934VS (Amersham)	1:5000 anti-rabbit NA934VS (Amersham)

### B- Determinación de ARNm

Se realizó la determinación del ARNm del BNP a partir de ARN total aislado de ventrículo izquierdo, utilizando la técnica de real time RT-PCR. Se utilizó como estándar interno el ARNm de GAPDH (ver más adelante).

### Aislamiento de ARN total

A partir de 20-30 mg de tejido conservado en RNAlater (Qiagen) a  $-80^{\circ}\text{C}$  se realizó el aislamiento de ARN total utilizando el kit RNeasy (Qiagen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de tejido, una vez descongeladas, se homogeneizaron durante 40 segundos en el buffer de lisis provisto por el kit, conteniendo isotiocianato de guanidina y  $\beta$ -mercaptoetanol para proveer condiciones desnaturizantes y permitir la inmediata inactivación de ribonucleasas, empleando un homogeneizador Glas-Col Model K-41 TRI-R STIR-R y vástago de teflón. A continuación se sometió el tejido homogeneizado a 10 minutos de digestión proteica a  $55^{\circ}\text{C}$  empleando proteinasa K (Invitrogen) y se cargaron las columnas del kit, previa adición de etanol para ajustar las condiciones

## Métodos

de unión del ARN a la fase sólida. Se llevaron a cabo 3 pasos de lavado, digestión con desoxirribonucleasa (Qiagen) durante 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar interferencias de ADN y finalmente se eluyó el ARN con 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas (Qiagen). Toda la manipulación de las muestras y preparación de soluciones a partir de la elución del ARN purificado se realizó con puntas de pipeta con filtro y agua libre de nucleasas.

### **Determinación de la concentración de ARN**

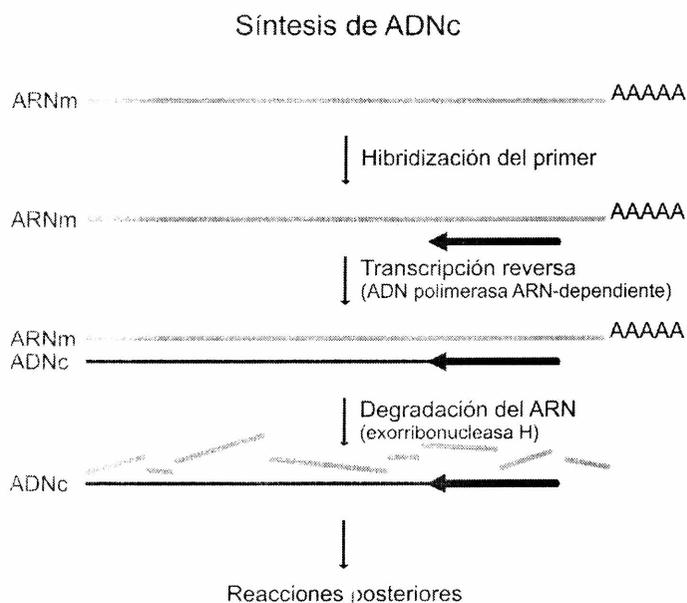
La concentración de ARN se determinó mediante la lectura de absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) en espectrofotómetro (SmartSpec 3000, Bio-Rad). Para ello se realizó una dilución apropiada en agua del ARN purificado, usualmente 1/10, para asegurar lecturas mayores de 0.15 unidades de absorbancia, y se midió la  $A_{260}$  utilizando cubetas de 50  $\mu$ L transparentes a la luz UV y llevando la absorbancia a cero con agua.

Para la cuantificación se consideró que la absorbancia de 1 unidad a 260 nm corresponde a una concentración de ARN de 40  $\mu$ g/mL.

### **Transcripción reversa**

Este paso tiene como objetivo la obtención de una cadena de ADN copia (ADNc) del ARNm de BNP, para poder ser utilizada como molde en la reacción de PCR. Se realizó utilizando transcriptasa reversa Omniscript (Qiagen). La enzima posee actividad de ADN-polimerasa dependiente de molde de ARN y actividad de exorribonucleasa dependiente de una doble cadena híbrida ARN:ADN. Los pasos de la reacción incluyen: a) hibridización de cebadores o "primers", necesarios como punto de partida para el inicio de la actividad de polimerización de la enzima; b) RT propiamente dicha, consistente en la síntesis de una cadena de ADN partiendo del primer y utilizando un molde de ARN; y c) degradación del ARN presente en cadenas híbridas ARN:ADN, esta actividad de exorribonucleasa solo actúa sobre el ARN hibridizado al ADNc sintetizado, y no afecta al ARN de cadena simple. Un esquema de los pasos mencionados se muestra en la **Figura 19**.

## Métodos



**Figura 19** Esquema de la transcripción reversa. La hibridización del primer con la secuencia complementaria del ARNm posibilita la acción enzimática de ADN polimerasa utilizando como molde el ARNm. La doble hebra híbrida formada es susceptible a la acción de ribonucleasa de la enzima, garantizando la formación de una única copia de ADNc por cada cadena de ARNm presente.

Como cebadores de la reacción se utilizaron los primers antisentido diseñados a partir de la secuencia del gen de BNP y de GAPDH de rata:

Primer antisentido para BNP: 5'-TTCTGCATCGTGGATTGTTC-3'.

Primer antisentido para GAPDH: 5'-CCACAGTCTTCTGAGTGGCA-3'.

Para cada muestra experimental de ARN purificado se preparó la siguiente mezcla de reacción en tubos de PCR de 200  $\mu$ L libres de ribonucleasas y manipulando todos los reactivos en baño de hielo:

- Mezcla de desoxinucleótidos trifostato (dNTPs): 0.5 mM de cada uno (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
- Primer antisentido 1  $\mu$ M de cada uno (BNP y GAPDH).
- Inhibidor de ribonucleasas (Invitrogen): 10 Unidades.
- Transcriptasa reversa Omniscript (Qiagen): 4 Unidades.
- 1.6  $\mu$ g de ARN.
- Buffer de reacción (Qiagen): hasta completar 20  $\mu$ L.

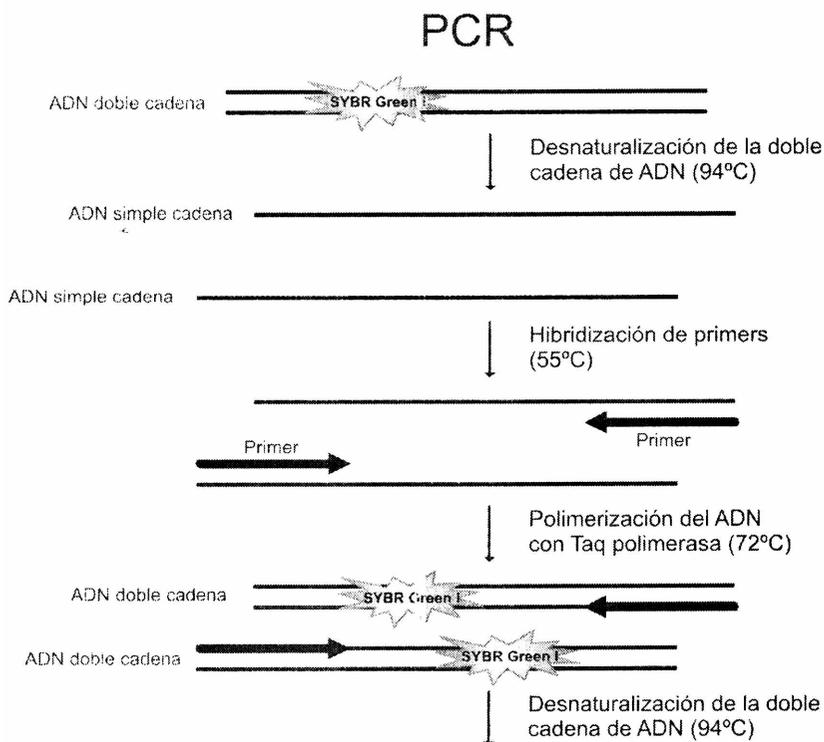
La reacción se llevó a cabo durante 60 minutos a 37°C, seguidos de 5 minutos de inactivación de la enzima a 95°C y enfriado a 4°C, en un ciclador térmico (PTC-

150 Mini Cycler). Se conservó el ADNc obtenido a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización como molde en la real time PCR.

## Real time PCR

### Fundamentos

Este método conserva el fundamento de una PCR estándar, más la posibilidad adicional de seguir en tiempo real el curso de la reacción y calcular así parámetros mediante los cuales se puede estimar la cantidad inicial de ADNc utilizado como molde. Como en cualquier PCR, la real time PCR consiste en ciclos sucesivos de desnaturalización de la doble hebra de ADN, hibridización de los primers al ADN molde, síntesis de la cadena complementaria mediante una polimerasa resistente al calor (Taq polimerasa) y nuevamente desnaturalización del ADN doble cadena para recomenzar el ciclo (**Figura 20**).



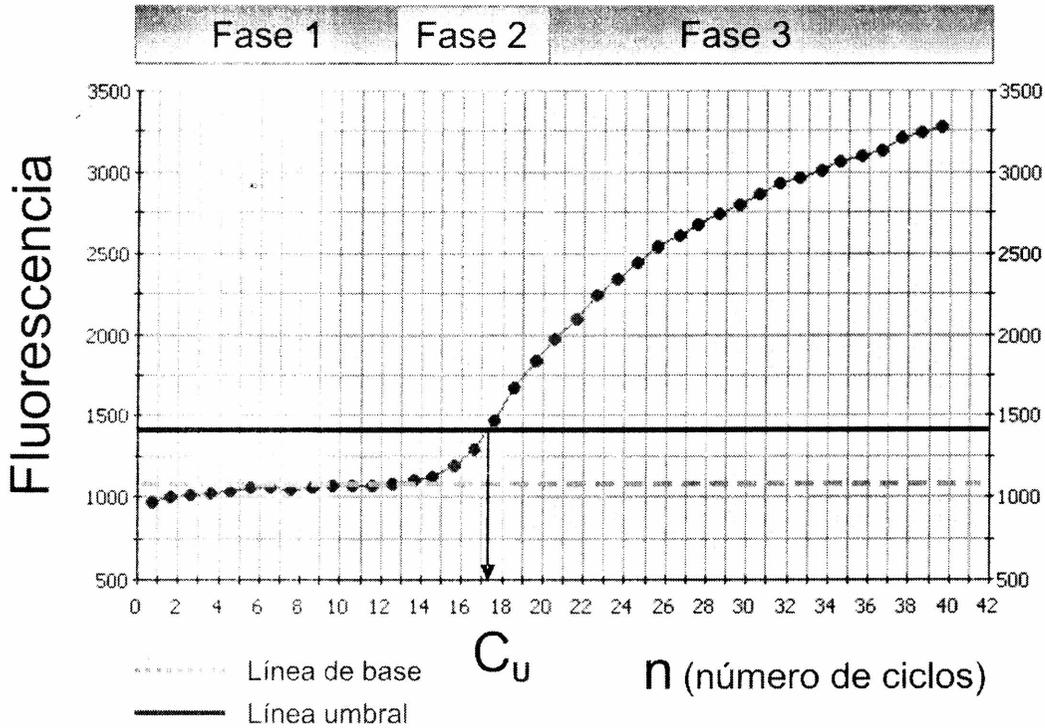
**Figura 20** Se esquematizan los pasos de una PCR: desnaturalización del ADN doble cadena, hibridización de primers y polimerización. El indicador SYBR Green I fluoresce a  $490\text{ nm}$  sólo cuando se une a ADN doble cadena.

En cada ciclo la cantidad de ADN se duplica y, en condiciones ideales, en un ciclo dado ( $n$ ), el número de copias de ADN ( $N_n$ ) podría calcularse según la ecuación

## Métodos

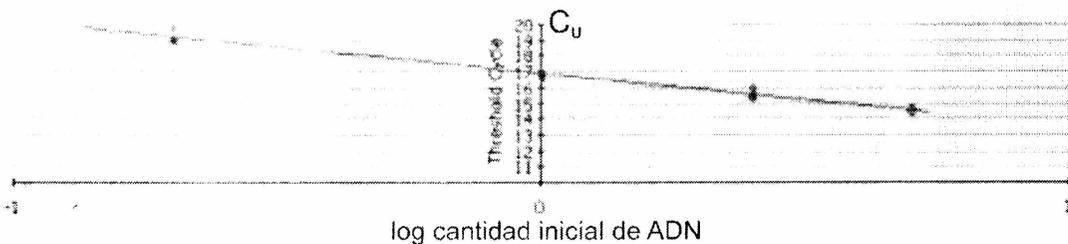
$N_n = N_0 \times 2^n$ , donde  $N_0$  es el número de copias inicial. El crecimiento exponencial del número de copias de ADN ocurre hasta que los reactivos se agotan y/o se produce inhibición por producto. La real time PCR se lleva a cabo en un ciclador térmico que tiene acoplado un detector óptico que mide la fluorescencia en cada ciclo y en cada reacción individual. En la técnica de empleada en este trabajo, se utilizó el indicador SYBR Green I que emite fluorescencia a 490 nm al unirse al surco menor del ADN doble cadena (**Figura 20**). El equipo ciclador permite programar las condiciones para obtener una lectura de fluorescencia en cada ciclo al finalizar la etapa de polimerización y antes de la etapa de desnaturalización de la doble hebra. De esta manera, se obtiene para cada reacción individual una curva de amplificación, que se define como la curva de fluorescencia en función del número de ciclos, similar a la que se muestra en la **Figura 21**. En ella se distinguen tres fases: 1) una fase inicial en la que debido a una cantidad aun baja de ADN los cambios de fluorescencia no son detectados por el equipo y por lo tanto la señal es aproximadamente constante; 2) una fase exponencial donde se observa el mayor crecimiento de fluorescencia con el número de ciclos; y 3) una fase de meseta o declinación, en la que la fluorescencia es constante o crece más lentamente.

Intuitivamente es posible deducir que cuanto mayor sea la cantidad de ADN inicial, más pronto se observará un aumento significativo de fluorescencia en el curso de la reacción. La fase inicial de la curva de amplificación define una línea de base por encima de la cual se detecta la acumulación del producto de PCR. Al establecer arbitrariamente una línea umbral por encima de esta línea de base, se define el parámetro  $C_U$  (ciclo umbral) como el número fraccional de ciclos en el que la fluorescencia interseca la línea umbral (**Figura 21**).



**Figura 21** Curva de amplificación: fluorescencia en función del número de ciclos de PCR. En la fase 1 no se detectan cambios de fluorescencia, en la Fase 2 la fluorescencia aumenta de manera exponencial y este aumento se hace más lento o desaparece en la Fase 3. El  $C_U$  se mide en la intersección de la curva con la línea umbral, que se fija en la zona exponencial y por encima de la línea de base.

Si se realizan varias reacciones partiendo de distintas cantidades de ADN, el gráfico del logaritmo de la cantidad de ADN inicial en función del  $C_U$  de cada una de ellas, es una línea recta (siempre que los  $C_U$  se obtengan a partir de una línea umbral establecida en la fase exponencial de la curva de amplificación). Esta recta constituye una curva de calibración o curva de eficiencia (**Figura 22**).



**Figura 22** Curva de calibración o de eficiencia:  $C_U$  en función del logaritmo de la cantidad inicial de ADN. Se construye amplificando diluciones conocidas del ADNc.

## Métodos

Si en la fase exponencial el rendimiento de la reacción fuese ideal, sería posible calcular la cantidad inicial de ADN en una muestra desconocida a partir de un reordenamiento de la fórmula antes mencionada:

$$N_0 = N_n / 2^n \quad (1)$$

Como en la práctica no ocurre de esta manera, es necesario reemplazar el factor "2" por la eficiencia real de amplificación, y el cálculo entonces sería:

$$N_0 = N_n / E^n \quad (2)$$

donde E es la eficiencia que se obtiene a partir de la pendiente de la curva de calibración o eficiencia:

$$E = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

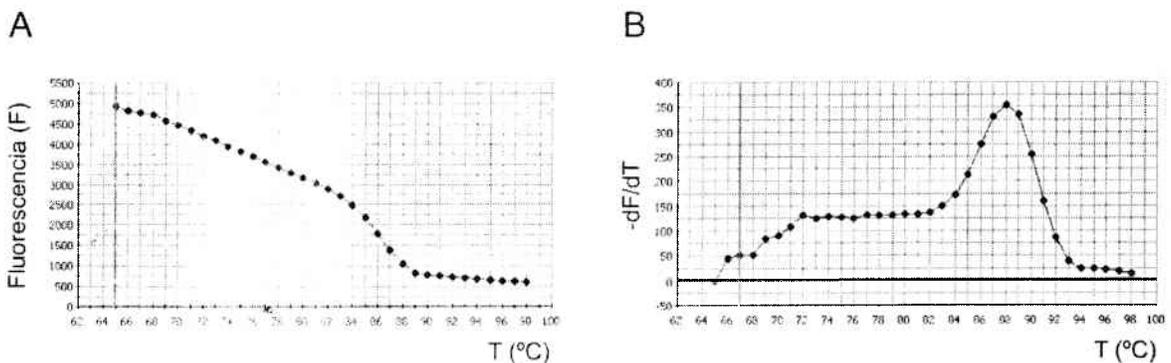
Si bien el modo más directo y sencillo de calcular la cantidad inicial de ADN, e inferir por lo tanto la cantidad de ARNm de partida, es el presentado en la ecuación (2), se han desarrollado modelos matemáticos más complejos para el cálculo, y entre ellos el presentado por Pfaffl (169) se ajusta a las condiciones experimentales del presente trabajo. El modelo mencionado está diseñado para ser aplicado a la cuantificación relativa del ARNm de un gen dado en una determinada condición experimental con respecto a una condición control, y al mismo tiempo corrige las posibles fluctuaciones de las reacciones de PCR, normalizando el valor encontrado con respecto a un gen de referencia o estándar interno, que no modifica su nivel de expresión en las condiciones experimentales empleadas. La fórmula utilizada para el cálculo es:

$$R = \frac{(E_{\text{BNP}})^{\Delta C_U \text{ BNP (Control-Exp)}}}{(E_{\text{GAPDH}})^{\Delta C_U \text{ GAPDH (Control-Exp)}}$$

Donde R es la relación de expresión relativa del gen de interés, BNP, entre una condición experimental (SHR, SHR+cariporide o SHR+BIIB) y la situación control (ratas Wistar); normalizada por la expresión del estándar interno, GAPDH en las mismas situaciones. El parámetro E es la eficiencia de amplificación de cada gen, determinado a partir de la curva de eficiencia correspondiente, y  $\Delta C_U$  se obtiene restando el  $C_U$  en la condición experimental del  $C_U$  en la situación control.

## Métodos

Para verificar la ausencia de formación de productos no deseados se realizan curvas de desnaturalización o “melting” una vez finalizada la PCR. Esta curva se obtiene midiendo la fluorescencia en función de la temperatura en un rango habitual entre 98-65°C. La fluorescencia depende de la proporción de ADN doble cadena y desnaturalizado, y esto último de la temperatura y de el contenido de guanina + citosina, o sea de la secuencia del ADN analizado. Si existe un único producto, la derivada de la fluorescencia en función del número de ciclos dará una curva con un solo pico, como en la **Figura 23**.



**Figura 23** Curvas de melting. Fluorescencia en función de la temperatura (A) y  $(-dF/dT)$  en función de la temperatura. La presencia de un solo pico indica que sólo un producto ha sido amplificado.

### Procedimiento

Cada PCR se realizó por triplicado, tanto para BNP como para GAPDH, partiendo de una dilución 1/10 del producto obtenido en la RT. Los primers utilizados fueron:

#### GAPDH

primer sentido 5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3' y

primer antisentido 5'-CCACAGTCTTCTGAGTGGCA-3';

#### BNP

primer sentido 5'-CCCAGATGATTCTGCTCCTG-3'

primer antisentido 5'-TTCTGCATCGTGGATTGTTC-3'.

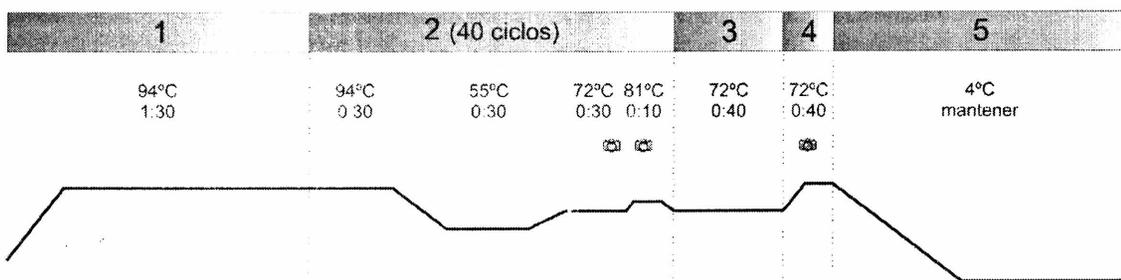
Las reacciones se prepararon en placa de 96 pocillos, con la siguiente composición

- dNTPs (Amersham) 0.2 mM de cada uno.
- $MgCl_2$  (Invitrogen) 1.5 mM.
- Fluoresceína (Bio-Rad) 10 nM.
- SYBR Green I (Molecular Probes) dilución 1/1000: 0.8  $\mu$ L/reacción.

## Métodos

- Primers (Operon) 0.5  $\mu$ M de primer sentido y 0.5  $\mu$ M de primer antisentido.
- Taq ADN polimerasa (Invitrogen) 1.25 Unidades/reacción.
- ADNc molde: dilución 1/10 de la RT.
- Buffer de PCR (Invitrogen): hasta un volumen de 25  $\mu$ L/reacción.

Además se realizó una curva de eficiencia para cada gen con diluciones 1/2, 1/10 y 1/100 de una mezcla constituida por todos los productos de RT obtenidos (pool), cada punto de la curva se realizó también por triplicado. Como control negativo se prepararon mezclas de reacción que en lugar de contener ANDc molde, se cargaron con agua bidestilada. Una vez armadas todas las mezclas de reacción se cubrió la placa con una pieza de film óptico (Bio-Rad) y se llevó a cabo la reacción en un equipo para PCR en tiempo real (iCycler, Bio-Rad). El protocolo de temperaturas utilizado se esquematiza en la **Figura 24**.



**Figura 24** Protocolo de temperatura utilizado. El software del equipo inserta el paso 1 con la finalidad de ajustar posibles diferencias de volumen entre los distintos pocillos. En el paso 2 se permite desnaturalización del ADN doble cadena (94°C), hibridación de primers con el ADN molde (55°C) y polimerización (72°C). Se toman lecturas de fluorescencia en los últimos 10 segundos de polimerización y en 10 segundos adicionales (81°C). El paso completo se repite 40 veces. El paso 3 tiene como finalidad completar la polimerización. El paso 4 consiste en una rampa de incremento de 1°C cada 10 segundos, se toma una lectura de fluorescencia cada 10 segundos para construir las curvas de melting. En el paso 5 la temperatura desciende hasta 4°C.

Todos los parámetros derivados de esta reacción fueron calculados utilizando el programa Real-Time Detection System Software, versión 3.0 (Bio-Rad).

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos se presentan como media  $\pm$  Error Standard (ES). El análisis estadístico utilizado dependió del protocolo experimental. Las comparaciones fueron hechas por test de t de Student para muestras apareadas, cuando se comparó el efecto de un tratamiento con respecto al control, o independientes, cuando se compararon dos grupos diferentes.

Para comparar 2 o más intervenciones diferentes se usó ANOVA de una vía para muestras apareadas seguido de un test de Student-Newman-Keuls.

Se usó el programa Primer of biostatistics (McGraw Hill) para realizar estas pruebas estadísticas.

Un valor de  $p < 0.05$  se consideró como estadísticamente significativo.

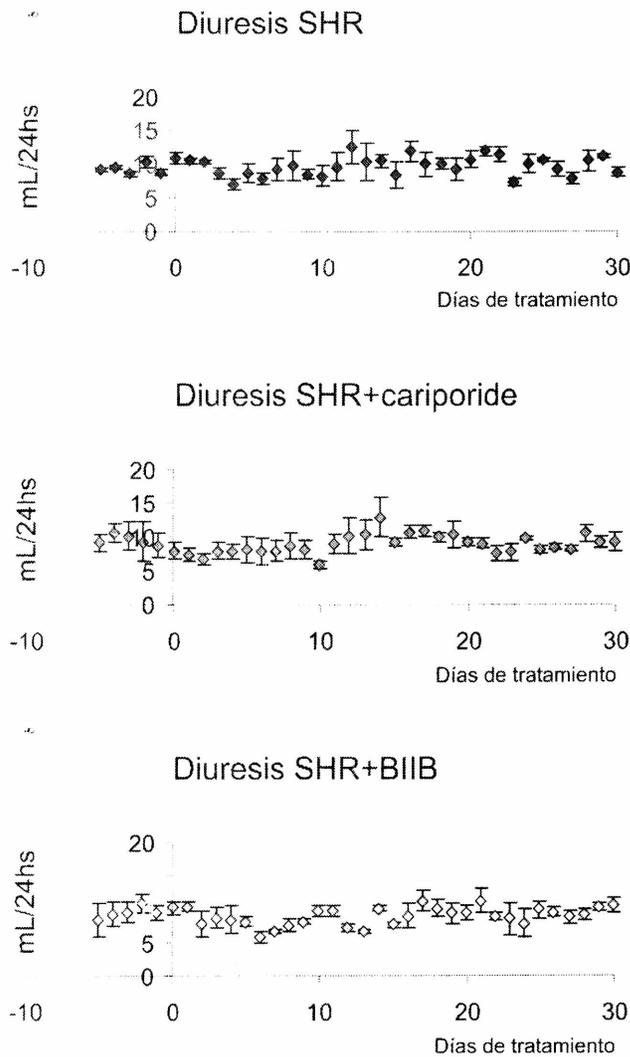
# **RESULTADOS**

## INVESTIGACIÓN DEL POSIBLE EFECTO EXTRACARDÍACO DE LOS INHIBIDORES DEL NHE-1 CARIPORIDE Y BIIB723

Dado que el NHE-1 se encuentra presente en la membrana plasmática de todas las células de los mamíferos, y que es conocido que las primeras drogas utilizadas para inhibir el NHE-1, como el amiloride, poseen acción diurética y pueden disminuir la pre y postcarga, se evaluó la posible presencia de una acción extracardíaca del cariporide y del BIIB723. Cabe la posibilidad de que ambos inhibidores, actuando sobre el NHE-1 de las células tubulares renales, pudieran afectar la excreción de  $\text{Na}^+$  por vía urinaria afectando concomitantemente los valores de diuresis, y que ambos efectos combinados influyeran en la PA. Es por esto que para profundizar en el estudio del mecanismo involucrado en la regresión de la HC inducida por inhibición del NHE-1, en primer lugar fue necesario descartar la posibilidad de una acción extracardíaca de los inhibidores que impactase indirectamente sobre el miocardio. Para ello se alojaron los animales en jaulas metabólicas durante el tratamiento, lo que posibilitó la recolección diaria del volumen de orina excretada y lectura de la diuresis. Además, se tomaron muestras diarias de orina para realizar mediciones por absorción atómica de la concentración de  $\text{Na}^+$  y, junto con el dato de diuresis, calcular la cantidad de  $\text{Na}^+$  excretado por día en la orina, o natriuresis. Asimismo se midió la ingesta diaria de agua de los animales, parámetro que debiera correlacionarse con el volumen de orina excretado.

En la **Figura 25** se muestran los resultados diarios de diuresis, expresados como mL/24 horas, comenzando 6 días antes del tratamiento con los inhibidores, hasta la finalización del mismo. A pesar de haber fluctuaciones diarias, la inhibición crónica del NHE-1 con cariporide y BIIB723 no mostró variaciones significativas de la diuresis durante el tiempo evaluado.

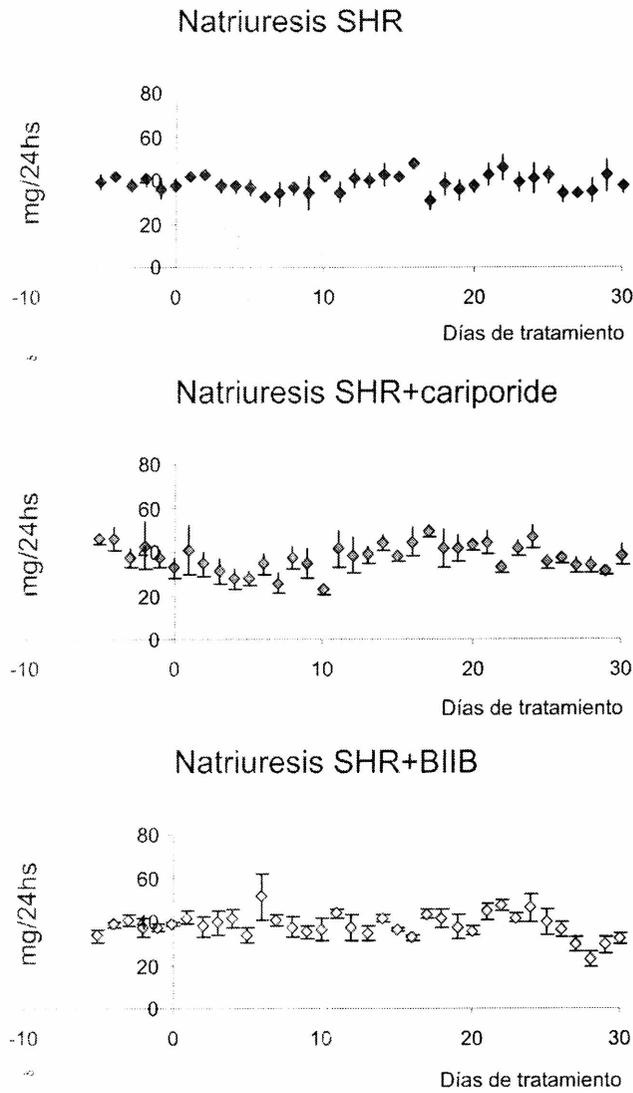
## Resultados



**Figura 25** Diuresis, expresada en ml de orina/24 horas, en función de los días de tratamiento. No se produjeron cambios significativos detectables en ninguno de los dos grupos de tratamiento, ni en el grupo control.

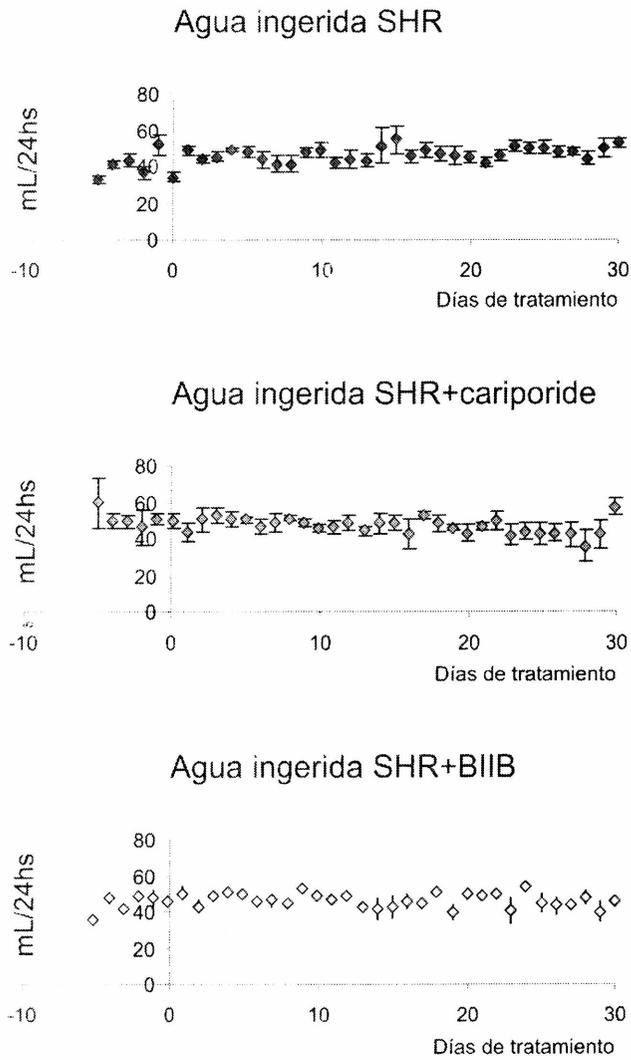
El tratamiento con los inhibidores del NHE-1 tampoco modificó los valores de natriuresis (**Figura 26**) ni el volumen de agua ingerida (**Figura 27**).

## Resultados



**Figura 26** Natriuresis, expresada como mg de  $\text{Na}^+$  excretados por orina en 24 horas, en función de los días de tratamiento. No se observaron aumentos en la excreción de sodio por haber inhibido crónicamente el NHE-1 con ninguna de las dos drogas utilizadas.

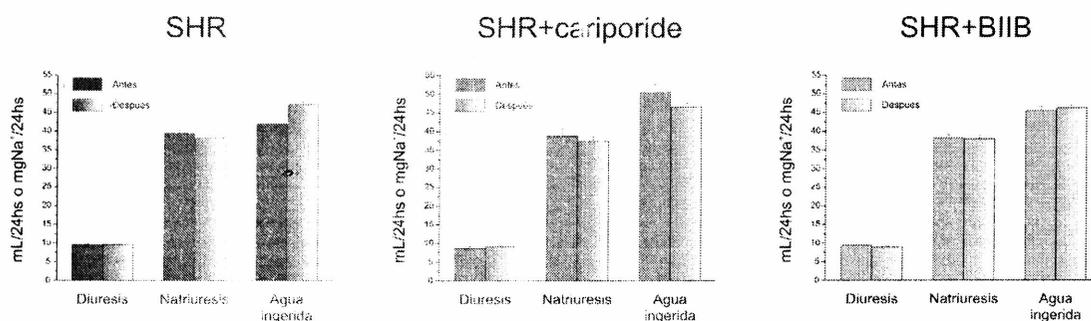
## Resultados



**Figura 27** Agua ingerida, expresada en mL, en función de los días de tratamiento. Al igual que lo ocurrido con la diuresis y la natriuresis, la inhibición crónica del NHE-1 con cariporide y BIIB723 no modificó los valores de este parámetro.

En la **Figura 28** se presentan los resultados globales de diuresis, natriuresis y volumen de agua ingerida para cada grupo de tratamiento. Los valores se obtuvieron realizando el promedio de cada parámetro en los días previos al tratamiento para comparar con el promedio obtenido en cada determinación después del tratamiento. Se observa claramente que ni el cariporide ni el BIIB723 produjeron un aumento en la diuresis y en la natriuresis. Este resultado permite descartar la presencia de una efecto a nivel renal en las ratas SHR durante los 30 días de tratamiento con los fármacos mencionados.

## Resultados

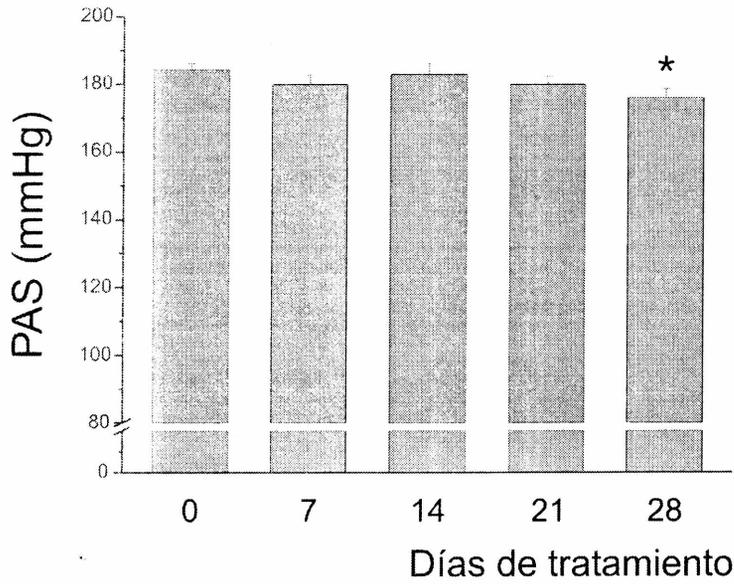


**Figura 28** Resultados promedio de diuresis, natriuresis y volumen de agua ingerida para los grupos control, tratado con cariporide y tratado con BIIB723. Ninguno de los parámetros analizados fue modificado por el tratamiento.

Paralelamente, se realizó un monitoreo de la PAS en todos los grupos experimentales. Al comparar en cada grupo de tratamiento los valores de PAS en el día 0 con respecto a los valores obtenidos en el día 28 se observó que el tratamiento con cariporide indujo una ligera disminución de la PAS de ~8 mmHg ( $p < 0.05$  Test de t por apareados,  $n=8$ ) en el grupo de ratas SHR (**Figura 29**). Mientras que en el grupo tratado con BIIB723, no se observaron cambios significativos en la PAS (**Figura 30**). Un grupo de ratas SHR que no recibió tratamiento farmacológico (grupo control) fue monitoreado durante el mismo período de tiempo, y no se observó ningún cambio significativo en la PAS al finalizar la cuarta semana (**Figura 31**).

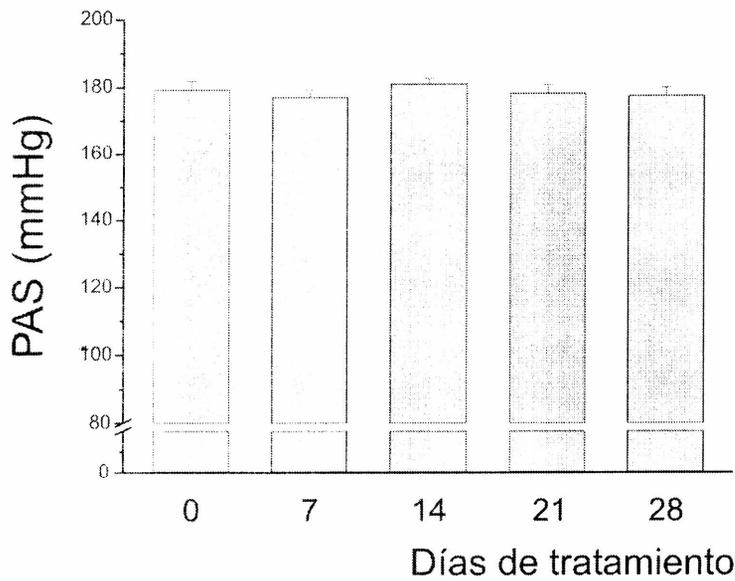
## Resultados

### SHR+cariporide



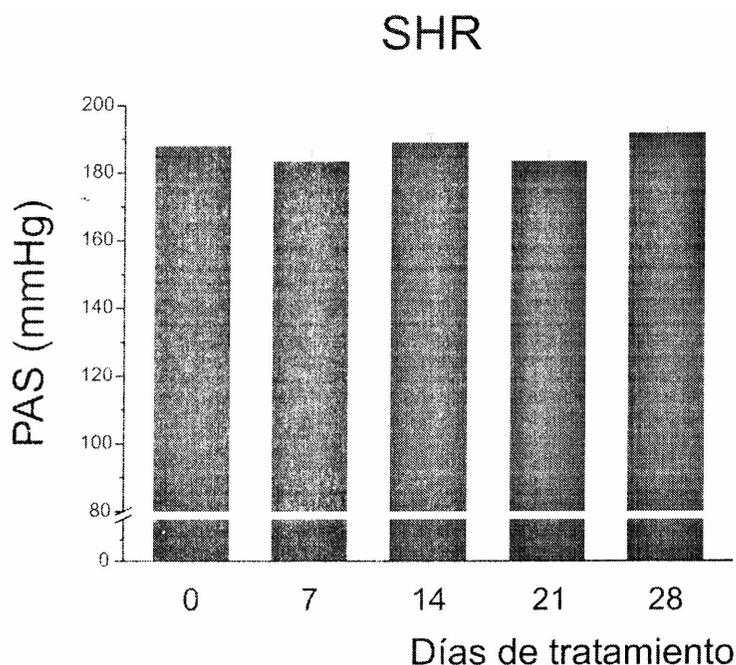
**Figura 29** Presión arterial sistólica (PAS) de ratas SHR a lo largo del tratamiento con cariporide. Este tratamiento produjo una pequeña pero significativa disminución de la PAS. (\* indica significativamente diferente con respecto al día 0)

### SHR+BIIB



**Figura 30** Presión arterial sistólica (PAS) de ratas SHR a lo largo del tratamiento con BIIB723. No se observaron diferencias significativas durante el tratamiento.

## Resultados



**Figura 31** Presión arterial sistólica (PAS) de ratas SHR no tratadas. No se observaron variaciones significativas durante el periodo evaluado.

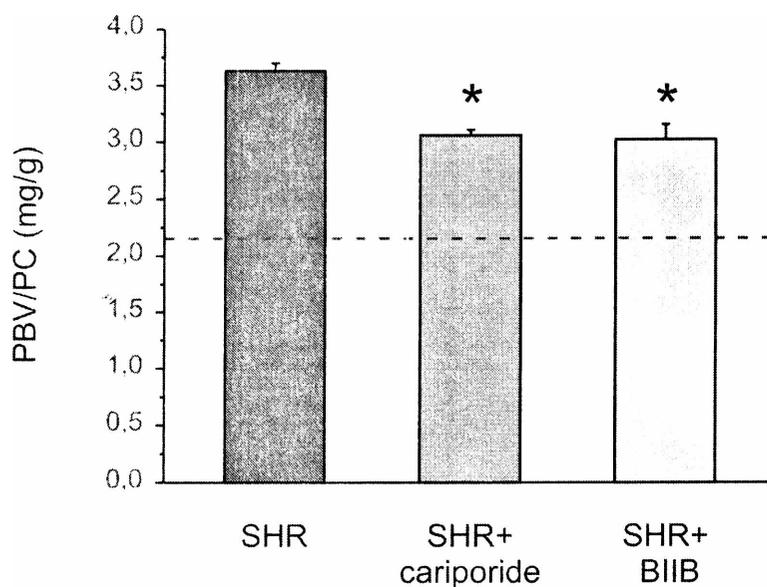
Las razones del pequeño descenso de PAS observado únicamente en el grupo de ratas SHR tratadas con cariporide no pueden ser atribuidas a una mayor diuresis o natriuresis, como se evidencia en los resultados presentados en las **Figuras 25 y 26**

De esta forma, queda contestada la primera de las preguntas planteadas en los objetivos del trabajo: los fármacos empleados para inhibir el NHE-1 con el objetivo de inducir regresión de la HC no poseen efectos sobre la diuresis ni la natriuresis que puedan influir sobre la PAS ni superponerse a su efecto específico sobre el miocardio.

## CARACTERIZACIÓN DE LA REGRESIÓN DE HIPERTROFIA CARDIACA PRODUCIDA POR INHIBICIÓN CRÓNICA DEL NHE-1 CON CARIPORIDE Y BIIB723

Con el objeto de profundizar en el conocimiento de las vías intracelulares involucradas en el desarrollo de la HC, y de su regresión inducida mediante el tratamiento crónico con inhibidores específicos del NHE-1 en el modelo de ratas SHR, se procedió en segundo lugar a caracterizar la magnitud de la HC y a analizar en qué condiciones se produce dicha disminución. Para ello se registraron el PBV y el PC al finalizar el período de 30 días de tratamiento con cariporide y BIIB723.

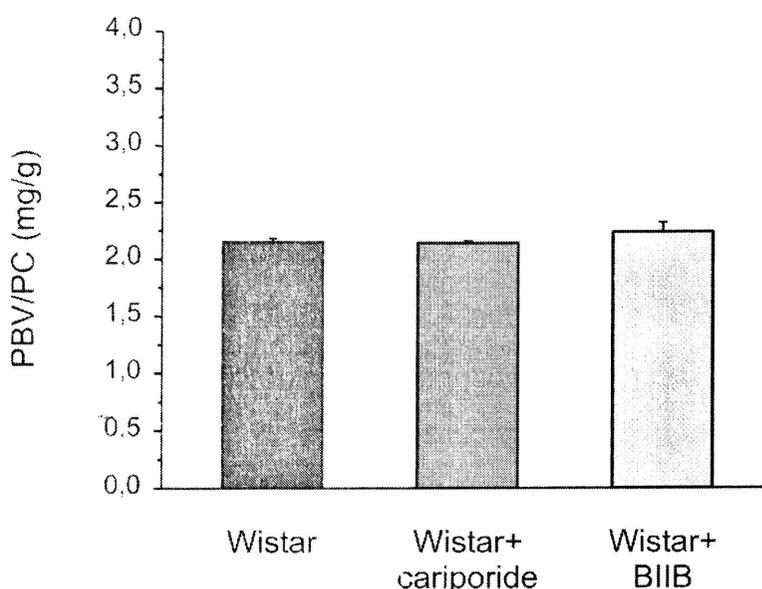
Como se observa en la **Figura 32**, y en concordancia con un trabajo previo,(170) la inhibición crónica del NHE-1 revirtió la HC sin afectar el PC, provocando una disminución significativa del cociente PBV/PC en los animales tratados ( $3.63 \pm 0.07$  mg/g para ratas SHR sin tratamiento vs.  $3.06 \pm 0.05$  mg/g y  $3.02 \pm 0.13$  mg/g para las ratas SHR tratadas con cariporide y BIIB723, respectivamente;  $n=4$ ;  $P<0.05$ ).



**Figura 32** HC evaluada según el cociente PBV/PC. Al tratar crónicamente las ratas SHR durante un mes con cariporide y BIIB723 en dosis de 30 mg/kg/día se produjo una disminución significativa de este parámetro en comparación con el mismo índice de las ratas SHR no tratada. Con el fin de evidenciar la magnitud de la disminución del PBV/PC se ha incluido en la figura una línea de puntos que señala el valor de este parámetro obtenido en ratas Wistar del mismo sexo y edad.  $n=4$  para cada grupo;  $P<0.05$ .

## Resultados

El mismo tratamiento de inhibición crónica del NHE-1 no produjo variaciones en el cociente PBV/PC en las ratas normotensas ( $2.15 \pm 0.03$ ,  $2.14 \pm 0.01$  y  $2.24 \pm 0.08$  mg/g para los grupos Wistar, Wistar+cariporide y Wistar+BIIB, respectivamente;  $n=4$ ; NS) (**Figura 33**), sugiriendo que el tratamiento farmacológico actúa sobre algún mecanismo que se encuentra exacerbado en los animales con HC pero que no está presente en los animales normotróficos.



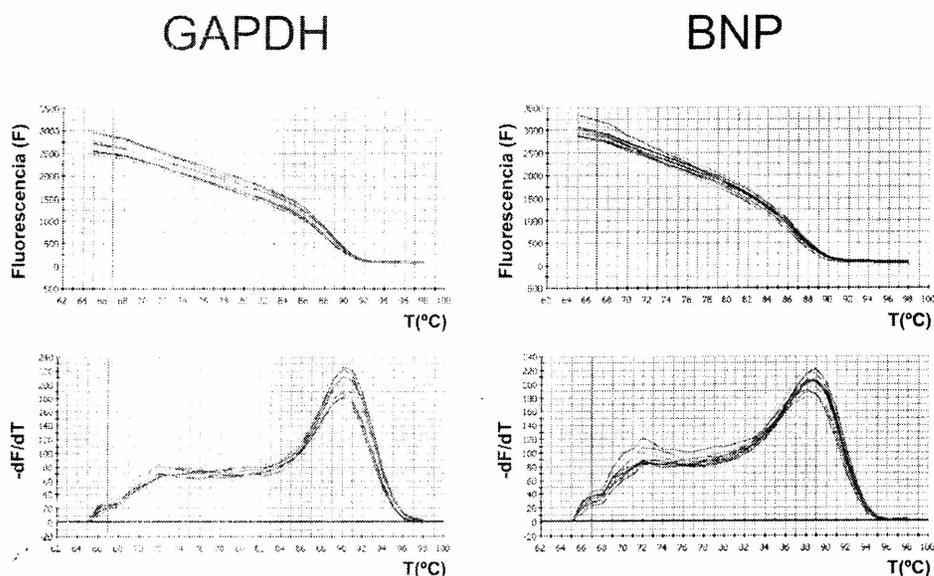
**Figura 33** Cociente PBV/PC evaluado en los grupos de ratas normotensas. La inhibición del NHE-1 durante 30 días no produjo variaciones en dicho parámetro.

Para caracterizar la hipertrofia a nivel molecular se evaluó el grado de expresión del ARNm del BNP mediante real time RT-PCR utilizando la técnica de SYBRGreen. Se empleó GAPDH como estándar interno, ya que su ARNm no presenta variaciones en las condiciones experimentales que se pretendían evaluar. En primer lugar se verificó que los fragmentos detectados por fluorescencia correspondieran a un único producto de amplificación. Para ello se construyeron las curvas de “melting” del producto amplificado. Como en todo ADN de doble cadena, al aumentar la temperatura de la reacción, se produce disociación de las mismas y por lo tanto disminuye la fluorescencia del indicador SYBRGreen, que fluoresce a 490 nm únicamente cuando se encuentra intercalado en la doble hebra de ADN. La curva presenta una pendiente máxima en la disminución dependiendo del contenido de guanina y citosina del ADN evaluado, y

## Resultados

ese parámetro es característico de la secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado.

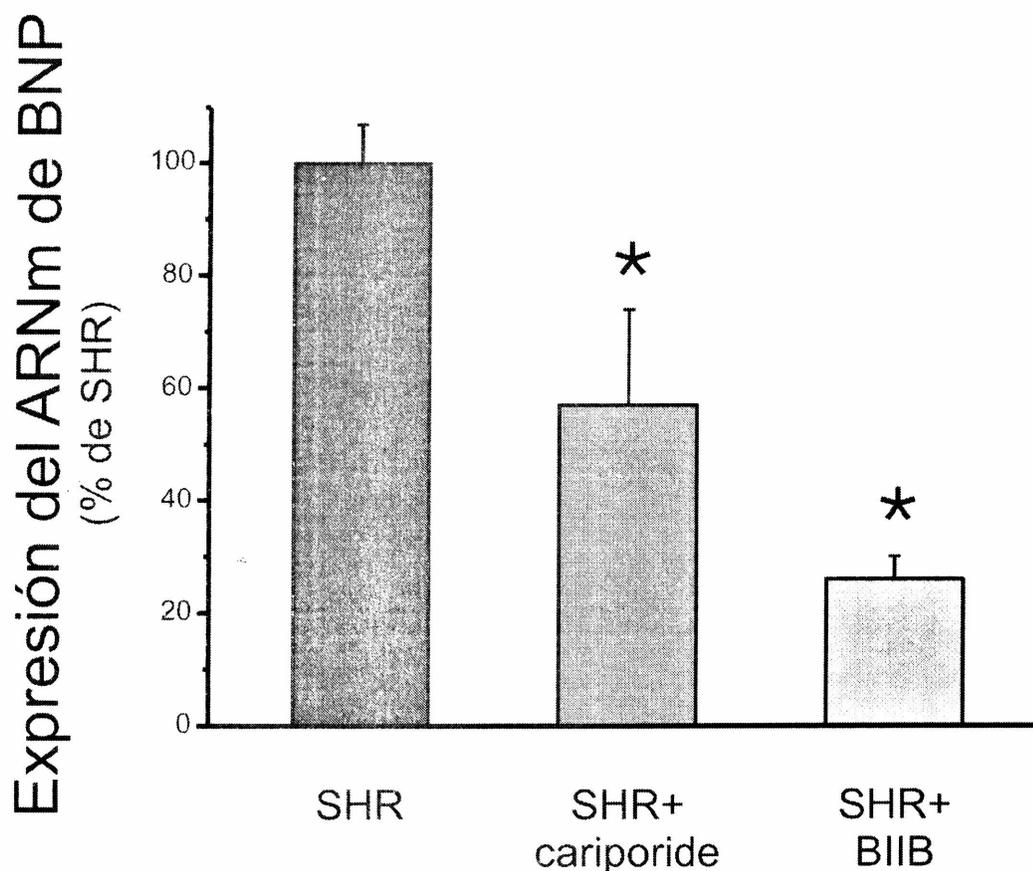
Como se observa en la **Figura 34**, la amplificación realizada con cebadores específicos resultó en la obtención de un único pico en las curvas de melting, indicando la presencia de sólo un producto amplificado en cada reacción y sustentando por lo tanto el empleo de la técnica para la cuantificación relativa de este marcador molecular de HC.



**Figura 34** Curvas de melting de GAPDH y BNP. En los paneles superiores se grafica la fluorescencia en función de la temperatura y en los paneles inferiores se grafica la primera derivada de la curva de melting, en cada caso se observa un solo pico, indicando la presencia de sólo un producto de amplificación.

Posteriormente se evaluó la cantidad relativa del ARNm de BNP en los dos grupos de ratas SHR tratadas, con respecto al control SHR no tratado. En la **Figura 35** se muestra que ambos tratamientos indujeron una disminución significativa de la expresión miocárdica del ARNm de BNP: cariporide y BIIB723 disminuyeron la abundancia de BNP al 57% (n=8) y 26% (n=5), respectivamente, de los valores observados en el miocardio hipertrófico de las ratas SHR no tratadas (n=12;  $P<0.05$ ).

## Resultados



**Figura 35** Expresión relativa de ARNm de BNP con respecto al grupo SHR sin tratamiento. (\* indica significativamente diferente con respecto a SHR)

Los resultados presentados hasta aquí permiten cumplir con el segundo objetivo planteado, consistente en la caracterización de la regresión de la HC inducida mediante la administración sistémica de dos inhibidores distintos del NHE-1 a ratas SHR. Tanto el indicador macroscópico PBV/PC como el parámetro molecular que representa la abundancia del ARNm del BNP evidencian la regresión de la HC, que en las ratas SHR se produce sin observarse cambios en el estímulo hemodinámico que le dio origen. Es decir, la inhibición farmacológica del NHE-1 con las dosis indicadas de cariporide y BIIB723 durante un período de 30 días indujo regresión de la HC que no estuvo determinada por cambios en la diuresis/natriuresis que pudieran afectar la PA.

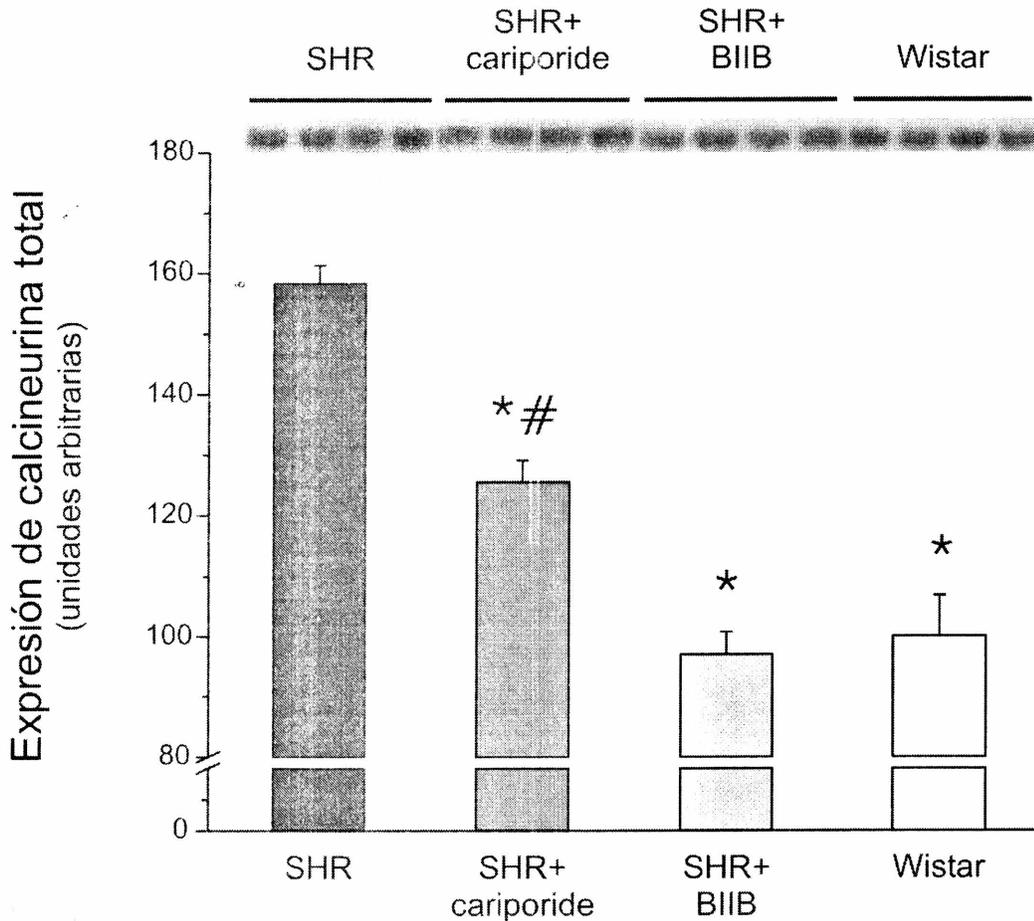
### EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL NHE-1 SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR CALCINEURINA/NFAT

Debido a la evidencia existente sobre un papel fundamental de la calcineurina en varios modelos patológicos de HC,(92,170-175) se investigó su participación en la vía de señalización involucrada en la regresión de HC por inhibición del NHE-1. Se evaluó la expresión de calcineurina total, y como indicador de la actividad de calcineurina se analizó la expresión de CnA $\beta$ . Se eligió esta forma de evaluar el grado de actividad de calcineurina por dos motivos distintos: 1) el ensayo enzimático de la actividad de fosfatasa en homogenatos de tejido es problemática. Esto es debido a múltiples factores. Por un lado en los extractos tisulares existen diversas fosfatasas y es necesario realizar ensayos en paralelo inhibiendo a las que no son de interés, y calcular la actividad como diferencia entre los ensayos sin y con dichos inhibidores. El ácido ocadaico, que es uno de los inhibidores necesarios, posee un efecto parcial sobre la actividad de calcineurina. Otra consideración radica en la labilidad de la fosfatasa debida a la oxidación del Fe-Zn en el centro activo, se ha observado que la enzima es entre 10 y 20 veces más activa *in situ* que en extractos proteicos purificados. Dejando de lado los aspectos metodológicos del ensayo enzimático, un punto primordial a tener en cuenta aunque el ensayo se lleve a cabo apropiadamente es que constituye sólo una medida indirecta de la actividad y por lo tanto es inadecuada para evaluar la actividad de calcineurina *in vivo*. Los ensayos tradicionales miden el pico de actividad en presencia de niveles saturantes de calmodulina, y de esta manera probablemente sólo reflejen el contenido de la enzima disponible para activación y no la fracción activada *in vivo*; 2) la expresión de la isoforma  $\beta$  de la subunidad catalítica de calcineurina, se correlaciona con la actividad enzimática de la fosfatasa, debido a que el promotor del gen de CnA $\beta$  posee sitios de consenso para el NFAT; es decir que el gen CnA $\beta$  es uno de los genes regulados positivamente por el efector de la calcineurina activa, NFAT.(89) Este método de evaluar la actividad de calcineurina ha sido previamente validado.(171,172)

Se encontró que la expresión de calcineurina total medida por Western blot estaba aumentada aproximadamente un 60% en el VI de los corazones de ratas SHR si se los comparaba con las ratas Wistar. Como se muestra en la **Figura 36**, la

## Resultados

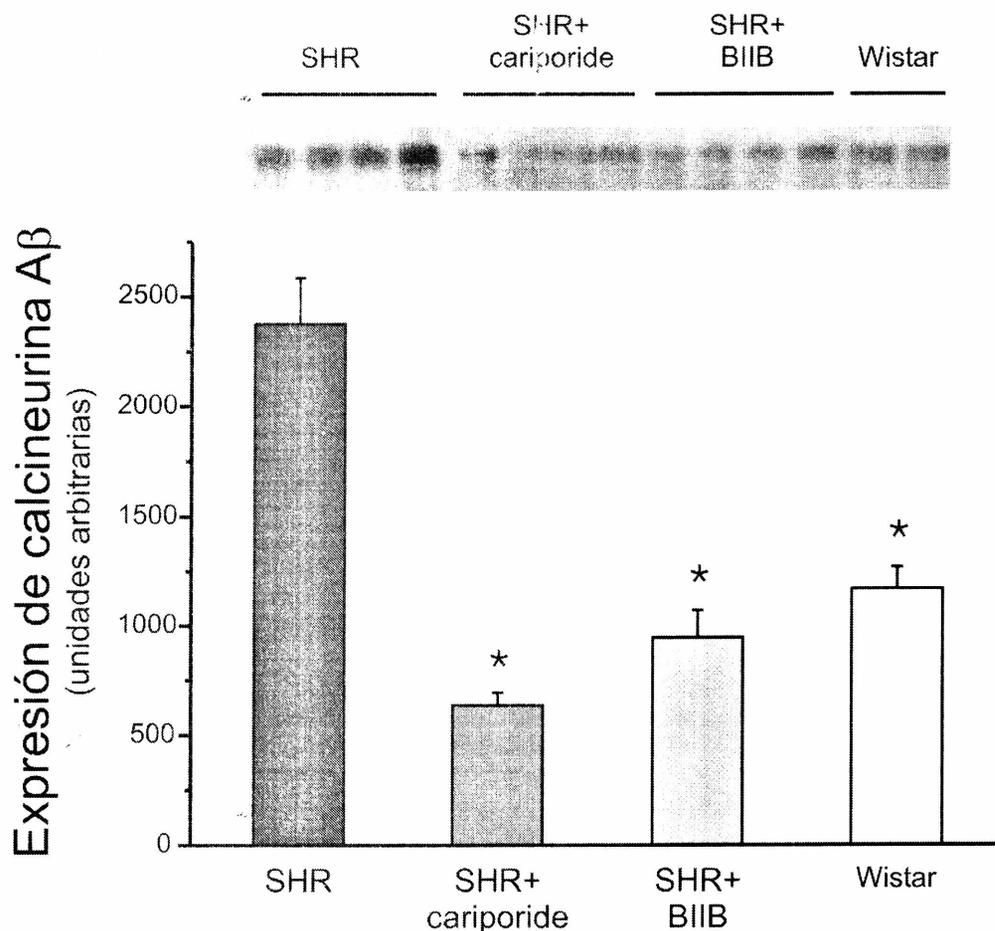
inhibición crónica del NHE-1 con cariporide revierte parcialmente este aumento, mientras que el tratamiento con BIIB723 provoca una reversión total ( $100\pm 6.8$ ;  $158\pm 3$ ;  $125.5\pm 3.6$  y  $97\pm 3.7$  % para Wistar, SHR, SHR+cariporide y SHR+BIIB,  $n=7, 4, 4$  y  $4$ , respectivamente;  $P<0.05$ , ANOVA).



**Figura 36** Expresión de calcineurina total. La expresión de la fosfatasa calcineurina es mayor en el miocardio hipertrófico de las ratas SHR que en el miocardio normotrófico de las ratas Wistar. El tratamiento crónico de los animales con inhibidores del NHE-1 provoca una disminución significativa de la expresión de calcineurina. (\* indica significativamente diferente con respecto a SHR, # indica significativamente diferente con respecto a Wistar y SHR+BIIB).

Al evaluar el nivel de expresión de CnA $\beta$ , se encontró que en el miocardio de ratas SHR sin tratamiento es mayor que en el de ratas Wistar, y que por la administración crónica de los inhibidores del NHE-1 se ve significativamente disminuido (**Figura 37**).

## Resultados



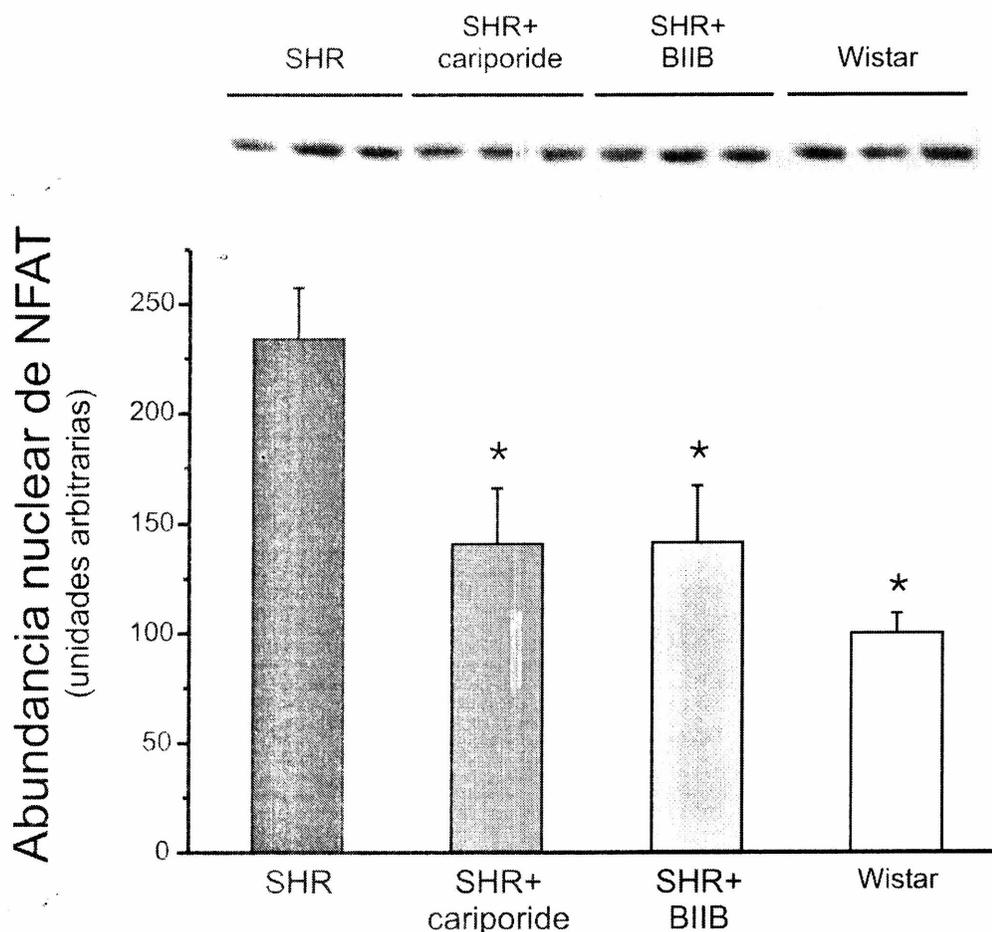
**Figura 37** Expresión de calcineurina A $\beta$ . En la parte superior de la figura se muestran los blots representativos. El gráfico de barras corresponde a los resultados promedio para los distintos grupos experimentales. (\* indica significativamente diferente con respecto a SHR,  $P < 0.05$ )

Una vez activa, la calcineurina desfosforila sus moléculas blanco, entre ellas NFAT. Esta desfosforilación de NFAT posibilita que se trasloque al núcleo donde promueve la transcripción genética. Por lo tanto, la abundancia de NFAT en el núcleo constituye otro índice del grado de activación de la vía de calcineurina. Para corroborar los resultados obtenidos de expresión de CnA $\beta$ , se separó la fracción nuclear de la fracción citosólica de VI y se midió la abundancia de NFAT en ambos preparádos, dado que este método ya ha sido validado anteriormente.(176,177)

En la **Figura 38** se muestran los resultados obtenidos en la fracción nuclear. Consistentemente con los datos anteriores, la abundancia nuclear de NFAT se encuentra aumentada en el miocardio hipertrófico de las ratas SHR sin

## Resultados

tratamiento, mientras que se ve significativamente disminuída a causa del tratamiento con inhibidores del NHE-1.



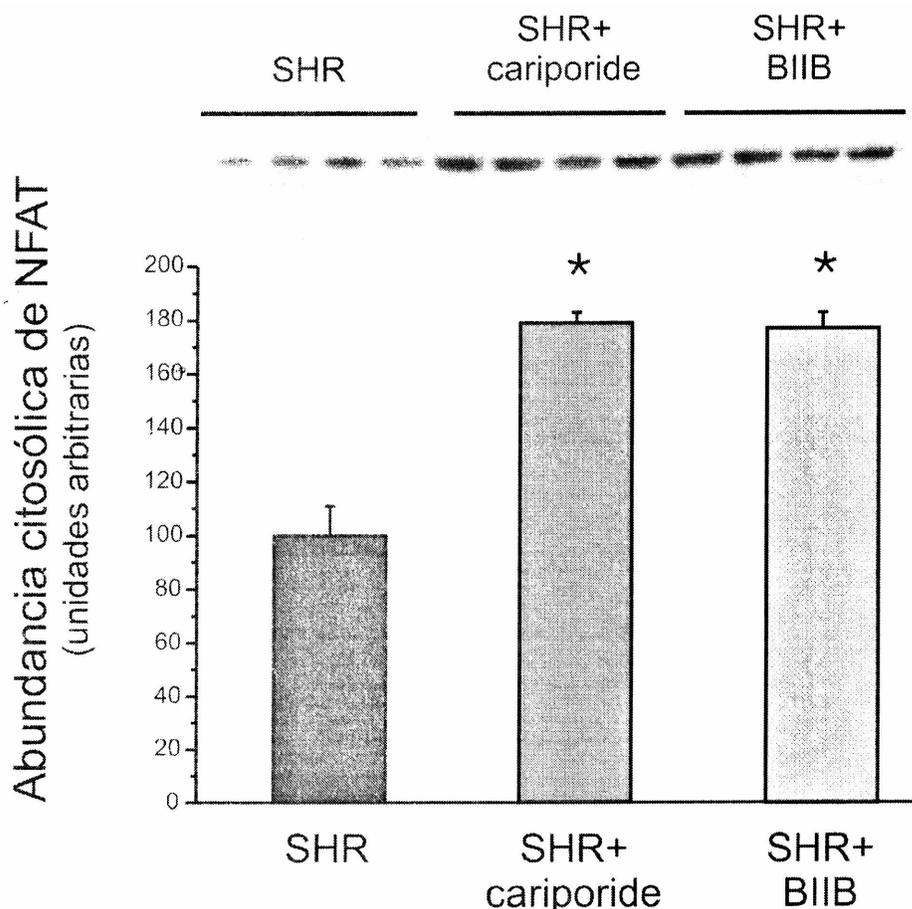
**Figura 38** Abundancia nuclear de NFAT. (\* indica significativamente distinto de SHR no tratadas).

Al analizar la abundancia de NFAT en la fracción citosólica, (**Figura 39**) se observaron resultados opuestos a los hallados en la fracción nuclear. Es decir, la abundancia citosólica en los grupos de ratas SHR tratados con inhibidores del NHE-1 fue mayor que la de las ratas SHR no tratadas, como cabría esperar dado que ante una menor actividad de calcineurina, NFAT se halla más fosforilado y restringido al citosol.

Este hallazgo de la activación de la vía calcineurina/NFAT en el miocardio hipertrófico, puede atribuirse a cambios de la  $[Ca^{2+}]_i$ , el activador de calcineurina. En experimentos realizados en cultivos de miocitos ventriculares de ratas recién nacidas se mostró que la estimulación con ET-1, un agente inductor de hipertrofia bien conocido, induce un incremento significativo de la  $[Ca^{2+}]_i$  diastólica sin

## Resultados

cambios significativos en los niveles  $\text{Ca}^{2+}$  sistólico y que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico es completamente abolido por la inhibición del NHE-1 con cariporide.(178)

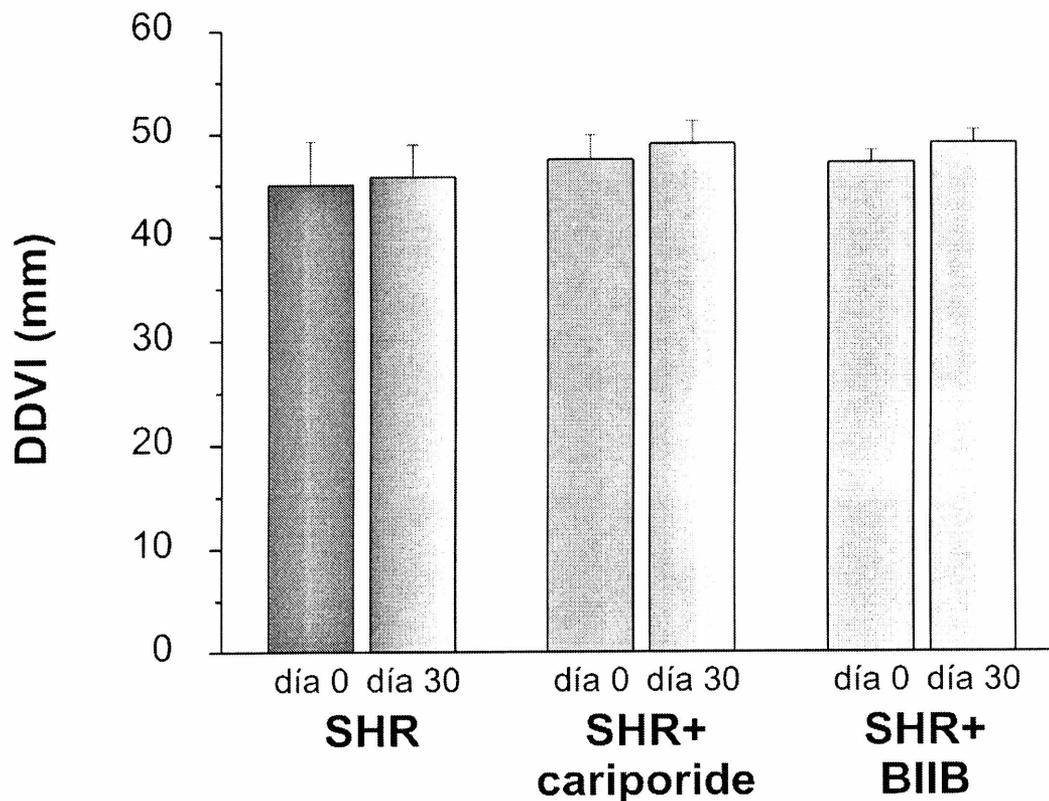


**Figura 39** Abundancia de NFAT en la fracción citosólica. (\*indica significativamente distinto de SHR no tratadas).

En respuesta al tercer objetivo planteado, los resultados presentados aquí muestran que tanto la expresión de calcinerurina total, como la expresión de  $\text{CnA}\beta$  se encuentran aumentados en el miocardio hipertrófico de ratas SHR no tratadas, en comparación con las ratas NT; y que la regresión de HC inducida por inhibición del NHE-1 normaliza esos valores. La regulación negativa de la expresión de  $\text{CnA}\beta$  inducida por ambos inhibidores del NHE-1 se acompañó de normalización de la abundancia nuclear de NFAT.

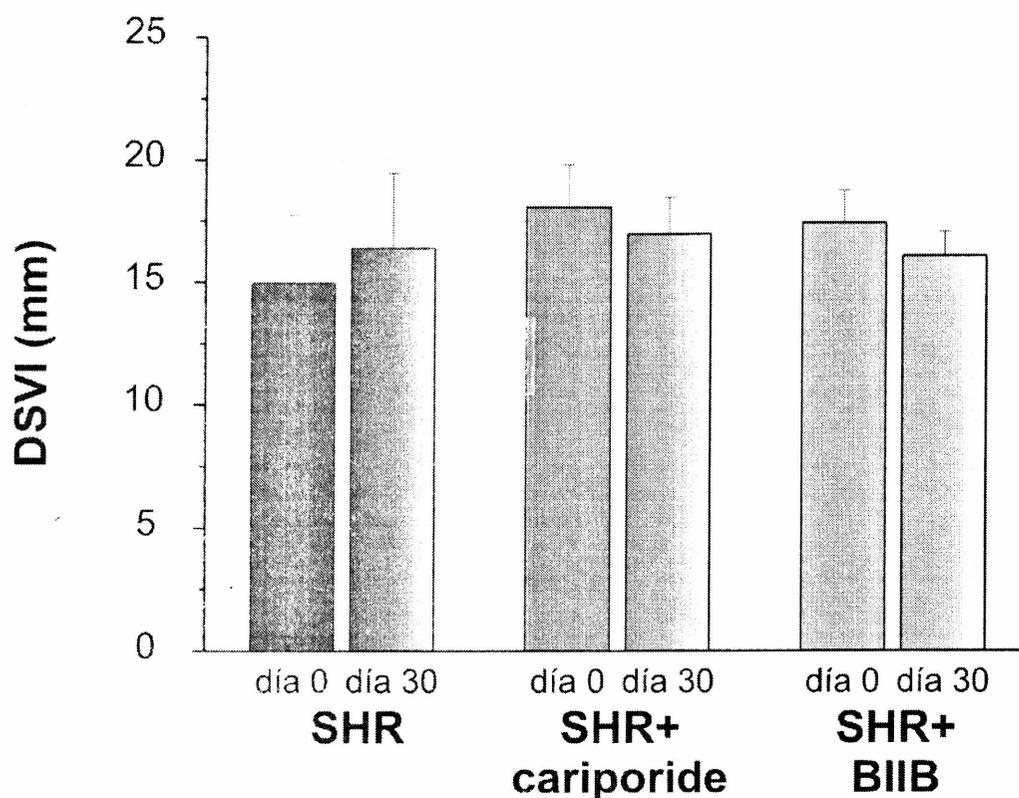
**ANÁLISIS ECOCARDIOGRÁFICO DE LA FUNCIÓN SISTÓLICA**

La evaluación ecocardiográfica de los animales de cada grupo experimental reveló una disminución en el espesor de la pared del VI (h), sin registrarse cambios significativos en el DDVI (**Figura 40**) ni en el DSVI (**Figura 41**), al finalizar el tratamiento con ambos inhibidores del NHE-1.



**Figura 40** Diámetro diastólico del ventrículo izquierdo (DDVI), antes y después del tratamiento con los inhibidores del NHE-1, y del grupo SHR control. La inhibición del NHE-1 no produjo cambios estadísticamente significativos en este parámetro.

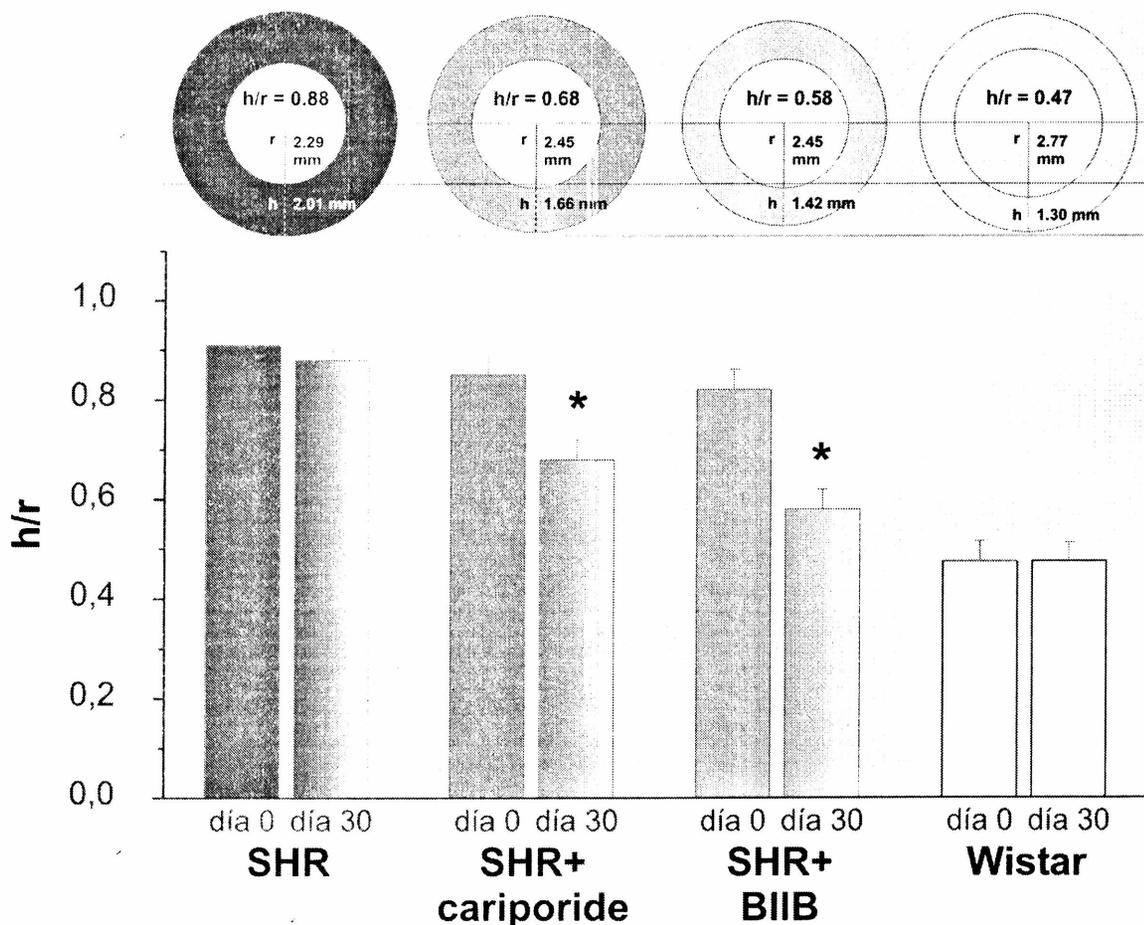
## Resultados



**Figura 41** Diámetro sistólico del ventrículo izquierdo (DSVI), antes y después del tratamiento con los inhibidores del NHE-1, y del grupo SHR control. La inhibición del NHE-1 no produjo cambios significativos en este parámetro. Se observa sin embargo una tendencia a la disminución del DSVI luego del tratamiento durante un mes con los inhibidores del NHE-1.

Estos datos indican una disminución en la concetricidad de la cavidad del VI, como se refleja en los valores del cociente h/r (**Figura 42**); que sufrió una disminución de aproximadamente 20% y 29% luego del tratamiento con cariporide y BIIB723, respectivamente ( $P < 0.05$ ;  $n = 8$  en cada grupo).

## Resultados

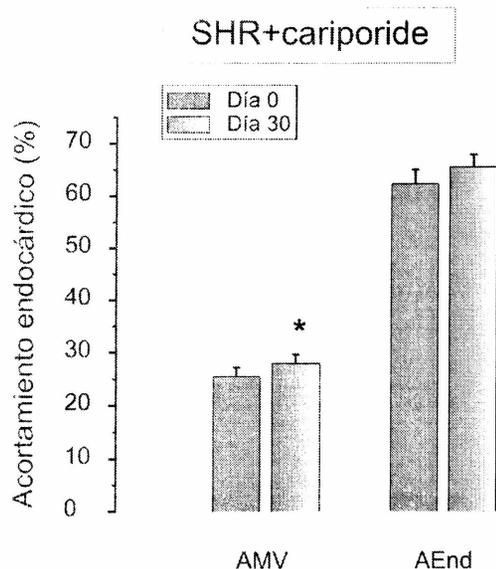


**Figura 42** Cociente h/r. El tratamiento de las ratas SHR con cariporide provoca una disminución de un 22% del cociente h/r, mientras que el tratamiento con BIIB723 lo hace en un 29%. Con fines de comparación se incluyen en la figura los datos correspondientes a ratas Wistar de la misma edad y a las que se les realizó un monitoreo ecocardiográfico simultáneamente a los tres grupos de ratas SHR. En el panel superior puede apreciarse un esquema del corte transversal del VI realizado con los valores promedio de h y r para cada grupo. (\* indica significativamente distinto al valor correspondiente al día 0).

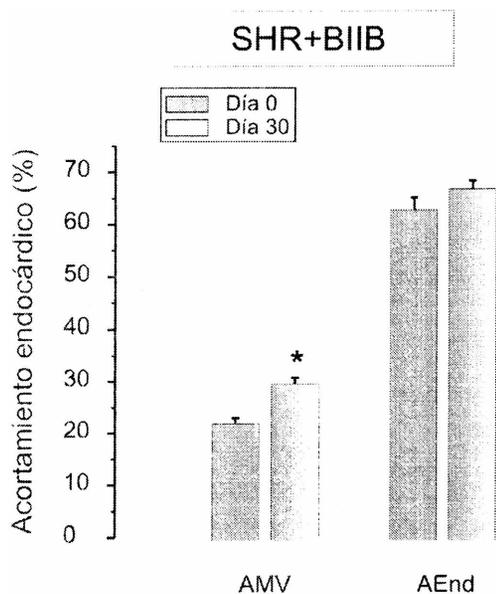
Luego del tratamiento con los inhibidores del NHE-1, se calcularon el AEnd y el AMV. Los resultados se muestran en la **Figura 43** en el caso del grupo tratado con cariporide, y en la **Figura 44** para el grupo tratado con BIIB723. A pesar del aumento esperado en la tensión parietal, (**Figura 45**) debido a la disminución del espesor de la pared del VI inducida por la inhibición del NHE-1 sin un descenso significativo en la PAS ni en las dimensiones del VI, la regresión de la HC no afectó negativamente al AEnd ni al AMV. Más aun, ambos inhibidores del NHE-1 indujeron un ligero pero significativo incremento del AMV ( $25.5 \pm 1.68$  vs.  $27.9 \pm$

## Resultados

1.74 y  $22.2 \pm 0.63$  vs.  $30 \pm 1.78$  antes y después del tratamiento con cariporide y BIIB723, respectivamente;  $P < 0.05$ ;  $n = 8$  en cada grupo).

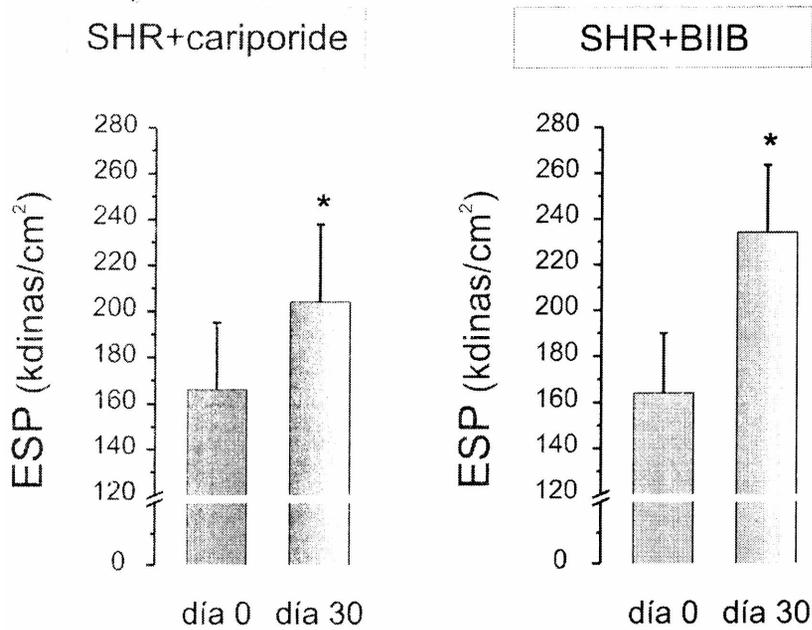


**Figura 43** Acortamiento medio ventricular (AMV) y acortamiento endocárdico (AEnd) en los corazones de ratas SHR, antes y después del tratamiento con cariporide. El AEnd no sufrió modificaciones por el tratamiento, mientras que el AMV aumento significativamente. (\* indica significativamente distinto al valor correspondiente al día 0).



**Figura 44** Acortamiento medio ventricular (AMV) y acortamiento endocárdico (AEnd) en los corazones de ratas SHR, antes y después del tratamiento con BIIB723. De la misma manera que lo ocurrido con cariporide, la inhibición del NHE-1 con el BIIB723 no provocó modificaciones en el AEnd, pero sí indujo un aumento significativo en el AMV. (\* indica significativamente distinto al valor correspondiente al día 0).

## Resultados

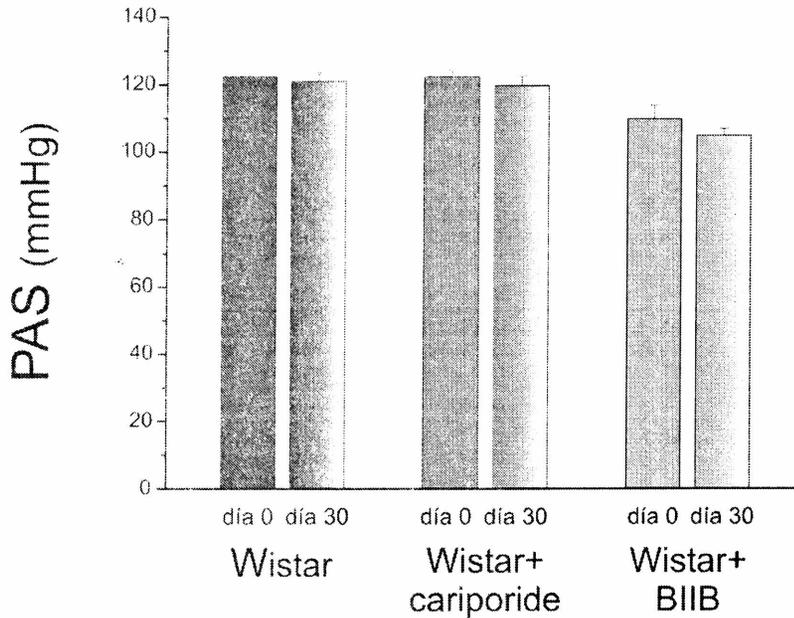


**Figura 45** Efecto de la inhibición crónica del NHE-1 sobre el estrés pico sistólico. En ambos casos el ESP aumentó luego del tratamiento, n=4. (\* indica significativamente distinto con respecto al valor previo al tratamiento)

La ausencia de un efecto deletéreo en el AEnd a pesar del aumento del ESP puede explicarse mediante dos hipótesis alternativas: la HC hipertensiva de las ratas SHR podría estar acompañada de un efecto inotrópico negativo y por lo tanto su regresión significaría una restauración del inotropismo; o bien las intervenciones farmacológicas utilizadas para revertir la HC producen por sí mismas un efecto inotrópico positivo. Aunque estas dos posibilidades no pueden discriminarse fácilmente, se intentó esclarecer el mecanismo involucrado en la mejoría de la función contráctil tratando ratas Wistar con ambos inhibidores del NHE-1.

En las ratas Wistar, ni el cariporide ni el BIIB723 indujeron cambios significativos en la PAS si se comparan las lecturas de PAS antes y después del tratamiento (**Figura 46**).

## Resultados

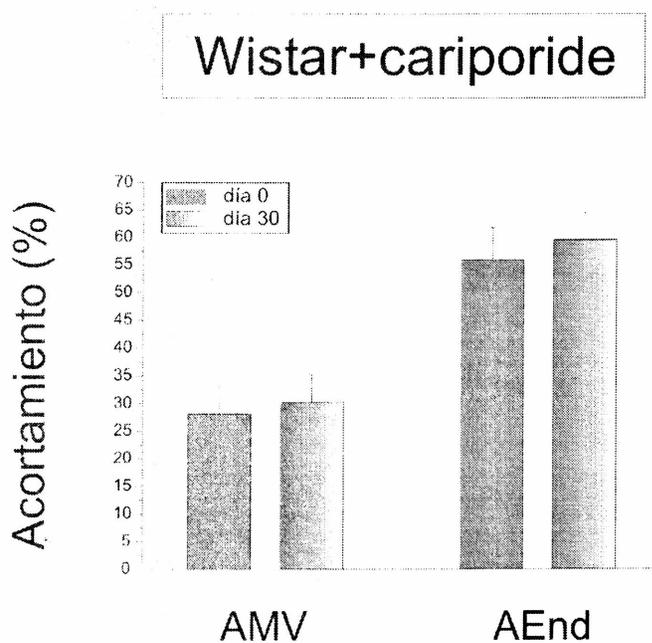


**Figura 47** Presión arterial sistólica (PAS) medida en ratas Wistar control, tratadas con cariporide y tratadas con BIIB723, tomadas antes y después de los respectivos tratamientos. En ninguno de los grupos se observaron diferencias significativas luego del tratamiento.

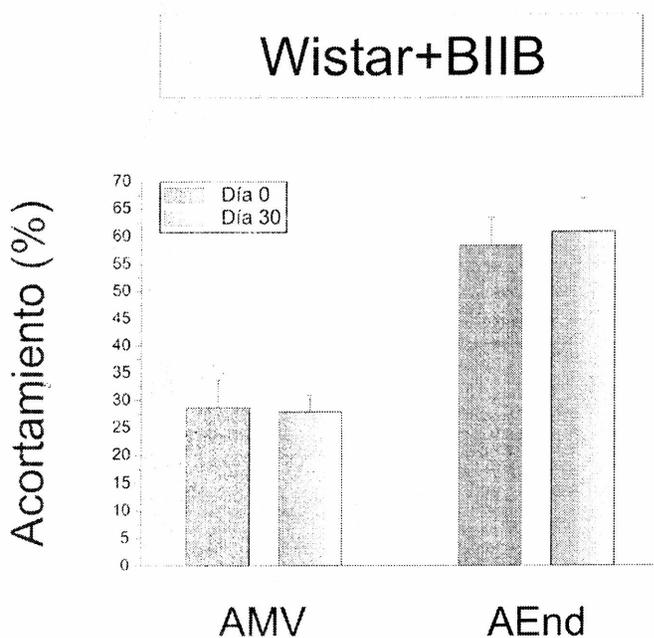
La inhibición crónica del NHE-1 en ratas Wistar tampoco provocó variaciones de la masa cardíaca, como se mostró en los datos de PBV/PC representados en la **Figura 32**.

Los estudios ecocardiográficos luego de finalizado el tratamiento no mostraron efecto del bloqueo del NHE-1 sobre el AEnd ( $55.9 \pm 6$  vs.  $59.6 \pm 5$  y  $58.4 \pm 5$  vs.  $60.9 \pm 6$  antes vs. después del tratamiento con cariporide y BIIB723, respectivamente;  $n=4$  en cada grupo) (**Figura 47**) ni en el AMV ( $28.1 \pm 5$  vs.  $30.2 \pm 5$  y  $28.7 \pm 5$  vs.  $27.9 \pm 3$  antes vs. después del tratamiento con cariporide y BIIB723, respectivamente;  $n=4$  en cada grupo). (**Figura 48**) La ausencia de cambios en los parámetros funcionales determinados por ecocardiografía sugiere que las intervenciones farmacológicas utilizadas no producen un efecto inotrópico positivo por sí mismas.

## Resultados



**Figura 47** Acortamiento medio ventricular (AMV) y acortamiento endocárdico (AEnd) en los corazones de ratas Wistar, antes y después del tratamiento con cariporide. No se observaron cambios significativos de estos parámetros. (n=4)

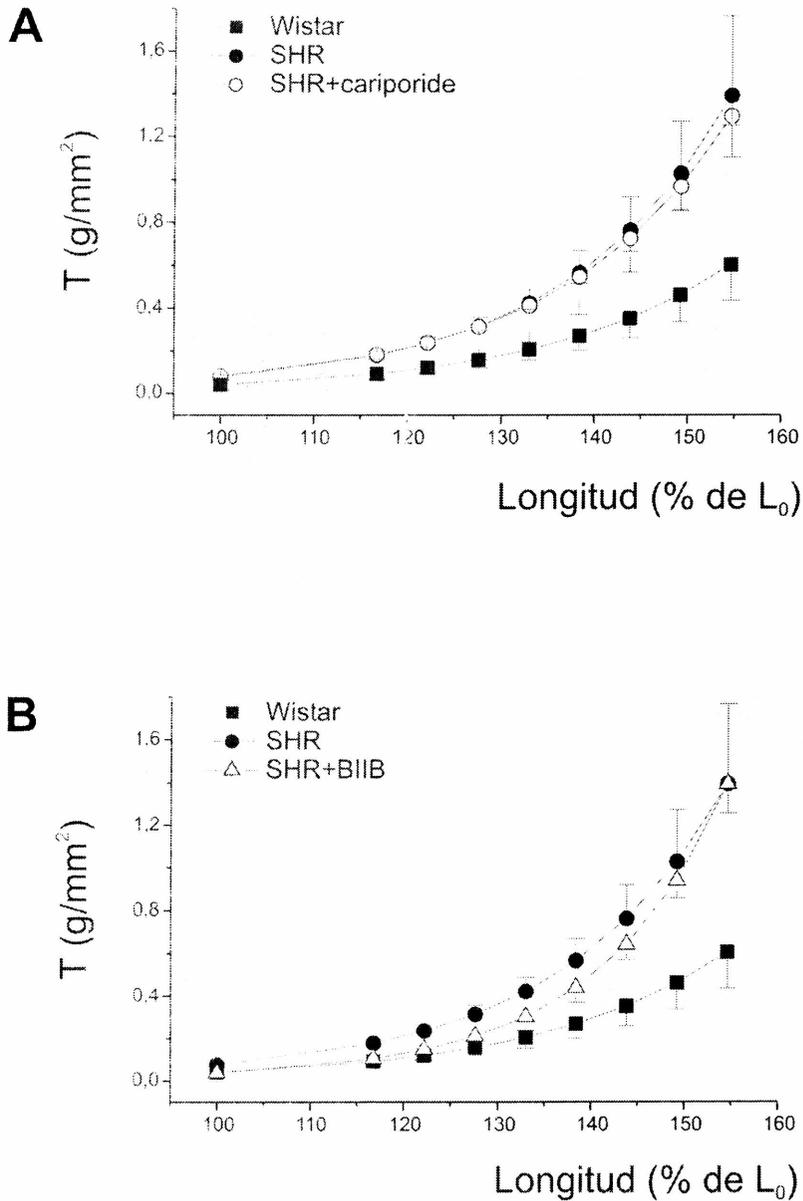


**Figura 48** Acortamiento medio ventricular (AMV) y acortamiento endocárdico (AE) en los corazones de ratas Wistar, antes y después del tratamiento con BIIB723. No se observaron cambios significativos de estos parámetros (n=4)

## Resultados

Por otro lado, dado que la regresión de la HC inducida por la inhibición del NHE-1 puede acompañarse de una disminución de la fibrosis (126,127,167) y normalización de la rigidez miocárdica (**Figura 49**) (167) se podría argumentar que la ausencia de un efecto perjudicial en la función cardíaca a pesar del aumento de la tensión parietal observada luego de la inhibición crónica del NHE-1 fue debida a una mejora en la función diastólica. A fin de evaluar el efecto del tratamiento con ambos inhibidores sobre la rigidez miocárdica, se registró el comportamiento de la fuerza en función de la longitud en mp aislados del VI. Como se aprecia en la **figura 49** los mp de las ratas SHR son más rígidos que su correspondiente control normotenso, y el tratamiento con los inhibidores del NHE-1 no fue capaz de modificar esta mayor rigidez. Estos datos concuerdan con el trabajo de Cingolani y colaboradores.(167) que muestra que el tratamiento de ratas SHR con cariporide durante 30 días no disminuye los depósitos de colágeno intersticial, la rigidez, ni los valores plasmáticos del propéptido carboxiterminal del colágeno tipo I (PIP), marcador de la síntesis del colágeno tipo I.

## Resultados



**Figura 49** Rigidez de los mp evaluados según la relación tensión-longitud. En todos los casos es necesario ejercer mayor tensión para estirar el mp, a medida que la longitud aumenta. Este es el comportamiento normal del músculo. Sin embargo, como se observa en el **Panel A** la curva correspondiente a los mp de corazones de ratas SHR posee mayor pendiente que la curva correspondiente a mp de corazones de ratas Wistar. Esto significa que los mp de ratas SHR son más rígidos que los mp de las ratas Wistar. También se muestra que el tratamiento con cariporide durante 30 días no produjo disminución de la rigidez en los mp de las ratas SHR. **En el Panel B** se observan resultados similares, comparando las curvas tensión-longitud de los grupos Wistar, SHR y SHR+BIIB. El tratamiento con BIIB723 durante un mes no provocó disminución de la rigidez de los mp.

# **DISCUSIÓN**

## Discusión

Este trabajo de Tesis Doctoral presenta y analiza los resultados obtenidos luego del tratamiento crónico de ratas SHR con dos inhibidores farmacológicos distintos del NHE-1 en lo que respecta a su efecto sobre la HC. Los mismos pueden ser resumidos en los siguientes ítems:

- 1) La inhibición farmacológica crónica del NHE-1 en las ratas SHR produce una disminución del cociente PBV/PC y de la expresión del ARNm del BNP, y es por lo tanto eficaz para inducir regresión de la HC patológica en este modelo.
- 2) Dicha regresión es independiente de una disminución de la PAS y de un efecto sobre la diuresis/natriuresis; descartándose la presencia de un efecto extracardíaco de las drogas utilizadas, lo que permite entonces indagar sobre algún posible mediador cardíaco de este efecto.
- 3) La inhibición del NHE-1 en las ratas SHR se acompaña de una disminución de la expresión miocárdica de calcineurina A $\beta$  y de la abundancia nuclear de su blanco principal, el NFAT. Estas evidencias implican que la inhibición crónica del NHE-1 produce una disminución de la actividad de la vía de señalización intracelular prohipertrófica calcineurina/NFAT.
- 4) Los corazones de las ratas en los que se indujo regresión de la HC mediante inhibición del NHE-1 mostraron un aumento del AMV a pesar del mayor estrés parietal al que estuvieron sometidos debido a la reducción del cociente h/r sin cambios simultáneos en la PA. La relevancia de esta observación radica en que el efecto antihipertrófico del tratamiento con los inhibidores del NHE-1 implica una mejoría en la función contráctil, que no es detectada en los corazones de los animales normotensos.

Aumentos sostenidos de la PA dan lugar al desarrollo de HC. A pesar de que esto podría interpretarse inicialmente como un fenómeno adaptativo del

## Discusión

corazón, hay evidencias claras de que estos cambios “compensadores” implican desde el inicio un pronóstico desfavorable aumentando el riesgo de morbimortalidad de causa cardiovascular; a diferencia de lo que ocurre con la HC desencadenada por el ejercicio físico intenso.(15-17,179)

En el miocardio hipertrófico de las ratas SHR, un modelo experimental de HC patológica que reproduce el desarrollo de HC por hipertensión arterial esencial en humanos, se encuentra hiperactivo el NHE-1, revistiendo este dato gran importancia para la comprensión de los mecanismos que a nivel celular y molecular desencadenan y ejecutan la respuesta hipertrófica. El aumento de actividad del NHE-1 puede ser el resultado de un aumento intrínseco de la actividad de las unidades funcionales, una regulación positiva de su expresión o bien una combinación de ambos mecanismos. En el miocardio de las ratas SHR, la hiperactividad se debe a un aumento de la actividad intrínseca de las unidades funcionales preexistentes producido por modificaciones post-traduccionales de la proteína (fosforilación), sin cambios en los niveles de expresión.(138,180) Sin embargo, en otros modelos de HC se ha detectado un aumento en la expresión del intercambiador y su normalización mediante el tratamiento con inhibidores del NHE-1.(126,127,181) De todas maneras, el incremento de actividad del NHE-1 ya sea por aumento de la actividad intrínseca o de la expresión del intercambiador, se ha ligado con el desarrollo de HC, mientras que su inhibición se correlaciona con la normalización de la masa cardíaca.(126,127,180,181)

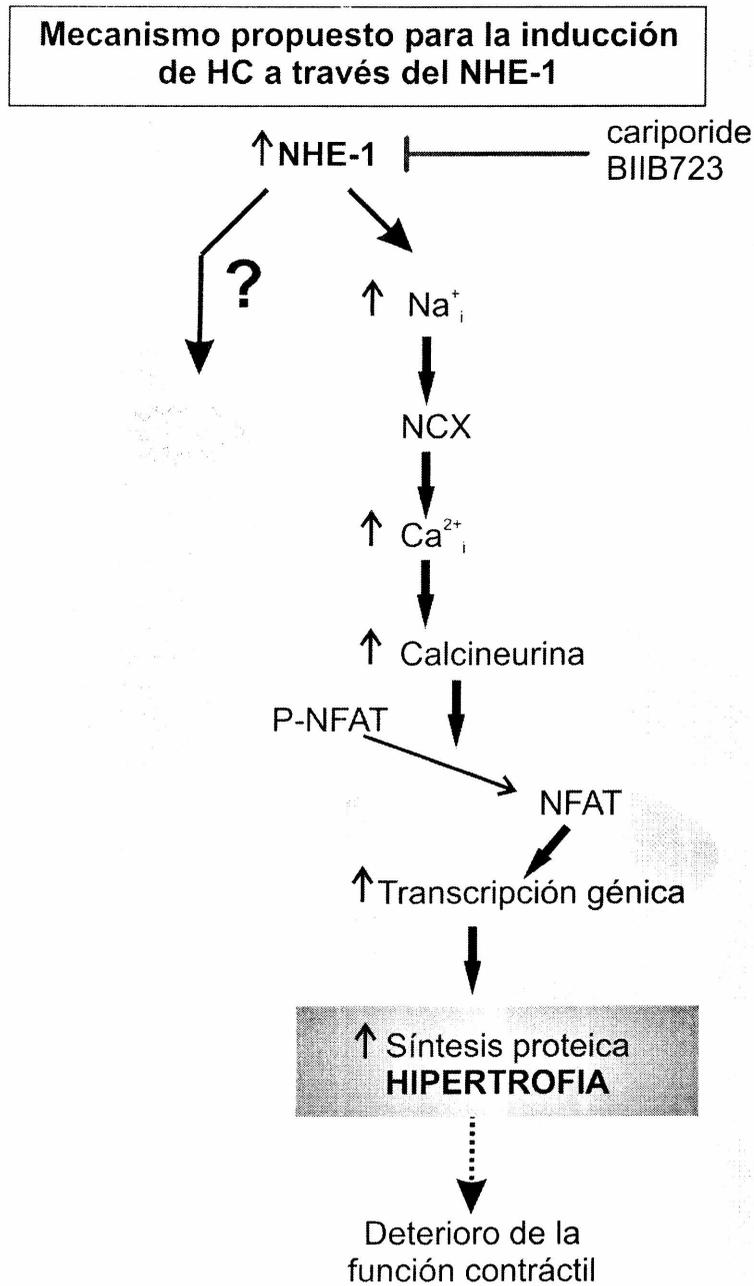
En este modelo de HC, Ennis y colaboradores.(182) demostraron que la regresión de la HC que se lograba por el tratamiento con inhibidores de la ECA se acompaña de normalización de la actividad del NHE-1. Más aun, en el año 2000 fue publicado un trabajo seminal en este campo de investigación en el que se describió que la inhibición farmacológica del NHE-1 atenuaba la respuesta hipertrófica en el tejido cardíaco viable luego de un infarto de miocardio.(181) Posteriormente Camilión de Hurtado y colaboradores.(125) comunicaron un efecto similar sobre la HC de las ratas SHR. Es importante recalcar que la regresión de la HC inducida por inhibición farmacológica *in vivo* del NHE-1 en este modelo experimental ocurre, como fuera descripto en los

## Discusión

resultados del presente trabajo, en ausencia de un descenso de la PAS. En concordancia con estos hallazgos, el trabajo de Álvarez y colaboradores.(142) mostró que distintos tratamientos farmacológicos (inhibición de la ECA, bloqueo de los receptores  $AT_1$  y bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$ ), indujeron regresión de la HC en ratas SHR, en una magnitud que no tuvo una relación proporcional con los niveles de PAS alcanzados. Es necesario recordar que en todos estos casos la regresión de la HC se acompañó de normalización de la actividad del NHE-1 en el miocardio. El efecto antihipertrófico del bloqueo del NHE-1 fue descrito posteriormente en una variedad de modelos experimentales diferentes de HC, tales como el inducido por aldosterona,(128) por hipertiroidismo,(120) por infusión de monocrotalina,(129) por sobrecarga combinada de presión y volumen,(121) en ratones deficientes en el receptor de ANP,(130) y en la cardiomiopatía hereditaria en hamsters.(122) Si bien actualmente este efecto se encuentra sólidamente demostrado, aun no se conoce con precisión el mecanismo por el cual ocurre. Se ha propuesto a la disminución del influjo de  $Na^+$  como un partícipe potencial.(124,183) Por un lado, este ión podría favorecer el desarrollo de HC a través de la activación de ciertas isoformas de PKC.(149) Los resultados obtenidos en el modelo de cardiomiopatía hereditaria en hamsters y en el modelo de HC por sobrecarga combinada de presión y volumen ya mencionados, también apoyan la hipótesis de que el NHE-1 participa en la HC modulando los niveles de  $[Na^+]_i$ . Como fuera desarrollado en la Introducción de esta Tesis, un incremento de la  $[Na^+]_i$ , combinado con un aumento en la duración del potencial de acción del NCX en el miocardio hipertrófico permitiría un mayor influjo de  $Ca^{2+}$  a través del NCX actuando en su modo inverso. Este incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  jugaría un papel clave favoreciendo el crecimiento cardíaco al estimular las cascadas de señalización dependientes de  $Ca^{2+}$ , como la de la vía calcineurina/NFAT.

A pesar de la existencia antecedentes que permitían hipotetizar que el efecto antihipertrófico producido por la inhibición del NHE-1 se debía a la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$ , hasta el momento no se había hallado un nexo posible entre ambos parámetros que sustentara esta hipótesis. Es decir, cómo se traducía esa disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  en regresión de la HC en este modelo

experimental. La **Figura 50** muestra un esquema de la vía de señalización propuesta para el desarrollo de HC provocado por la hiperactividad del NHE-1.



**Figura 50** Mecanismo intracelular propuesto para el desarrollo de HC a través de la vía iniciada por la estimulación del NHE-1. La inhibición de esta vía provoca una disminución del  $\text{Na}^+_i$  y una subsecuente disminución del  $\text{Ca}^{2+}_i$ , en estas condiciones es menor la activación de la vía calcineurina/NFAT y por lo tanto menor la transcripción y la síntesis proteica.

## Discusión

En el miocardio de las ratas SHR había sido demostrado que la actividad de calcineurina se encuentra aumentada, y que este aumento se suprime con bloqueantes de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .(142) De forma similar, en el miocardio hipertrófico de ratas con hipertensión sensible a sal, se ha comunicado un aumento de actividad de calcineurina conjuntamente con una regulación positiva de la expresión de  $\text{CnA}\beta$ , y su prevención mediante tratamiento de bloqueantes del receptor  $\text{AT}_1$ .(170) En concordancia con estos hallazgos, otros autores mostraron que un modelo de ratón deficiente en  $\text{CnA}\beta$  era incapaz de desarrollar una respuesta hipertrófica ante sobrecarga de presión, Ang II o infusión de isoproterenol.(173)

Por otro lado, se ha descrito un efecto antiapoptótico de la inhibición del NHE-1,(184) lo cual descartaría que un aumento de la apoptosis pudiera ser la causa de la reducción de la masa cardíaca.

Los resultados presentados en este trabajo son los primeros en mostrar que la regresión de HC causada por inhibición del NHE-1, que es un efecto independiente de la carga, involucra la normalización de la vía calcineurina/NFAT evidenciado por la disminución de la expresión de  $\text{CnA}\beta$  y de la abundancia nuclear de NFAT. Experimentos realizados por Dulce y colaboradores.(178) en miocitos de ratas neonatas dan apoyo adicional a la propuesta de desactivación de la vía calcineurina/NFAT inducida por inhibición del NHE-1. En ellos se describe que la ET-1, al tiempo que induce un aumento en el tamaño de los cardiomiocitos, provoca un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  diastólica, y que ambos sucesos son abolidos por cariporide. Además se ha mostrado recientemente que en miocitos cardíacos de conejo con HC e insuficiencia cardíaca, el tratamiento crónico con cariporide disminuye los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico.(121) No obstante no es posible excluir la posibilidad de que efectos adicionales de la intervención farmacológica empleada estén contribuyendo a la regresión de la HC. Se ha propuesto que el cariporide podría ejercer efectos a nivel mitocondrial (184-187) y que ciertos inhibidores del NHE-1 podrían tener la capacidad de inactivar algunas ROS,(188) por lo tanto no se puede excluir que alguna de estas acciones de los inhibidores del NHE-1 esté involucrado en su efecto antihipertrófico, ya que una disminución en la producción de ROS

## Discusión

causa atenuación de la HC.(126,189-194) En este sentido se ha descrito que la atenuación del remodelamiento que ocurre en el post-infarto de miocardio, inducida mediante inhibición del NHE-1, ocurre a través de una mejora de la función mitocondrial.(195) Por otro lado, y como ya fue mencionado, un aumento del  $pH_i$  provocado por la hiperactividad del NHE-1 ha sido propuesto como una causa del crecimiento cardíaco. Sin embargo es improbable que ocurra esta alcalinización intracelular en condiciones fisiológicas, es decir en presencia de bicarbonato en el medio.(133,136,181,196)

Se hace énfasis en que el mecanismo propuesto en este trabajo, y esquematizado en la **Figura 50**, es sólo una de las vías posibles que conducen al desarrollo de HC y que otras rutas intracelulares distintas a las que involucran al NHE-1 también pueden producir un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  y por lo tanto desencadenar HC;(131,132) Incluso sin un aumento del  $Ca^{2+}$  citosólico, dado que en un trabajo donde se estimulan cardiomiocitos con ET se muestra que ocurre un aumento de los niveles de  $Ca^{2+}$  únicamente de localización perinuclear responsable de la activación de CaMKII. No obstante en este trabajo no se investigó la vía de señalización calcineurina/NFAT.(43) Del mismo modo, aun en la cascada propuesta el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  provocado indirectamente por hiperactividad del NHE-1, podría activar vías distintas a la de calcineurina/NFAT. En este sentido, el trabajo de Kilic y colaboradores.(130) muestra que en un modelo de HC inducido por sobrecarga hemodinámica están aumentadas la actividad del NHE-1 y la  $[Ca^{2+}]_i$  así como las cuatro vías prohipertróficas examinadas: MAPKs, Akt, calcineurina y CaMKII; sin embargo la regresión de HC inducida por el tratamiento con cariporide normaliza solo dos de las vías evaluadas: la de CaMKII y la de Akt. Hasta el momento se desconocen los motivos de las discrepancias y aunque es posible la presencia de variables no previstas debidas al modelo transgénico de HC utilizado y al distinto tiempo de tratamiento, es un tema que merece seguir siendo estudiado.

Con respecto a los resultados obtenidos del análisis de la función cardíaca en el desarrollo de esta Tesis, no es posible establecer una relación causa-efecto inequívoca entre la actividad de la vía calcineurina/NFAT y la preservación de la función cardíaca. Sin embargo estas dos variables parecen

## Discusión

estar asociadas. En conexión con esto, y a pesar de que existen resultados contradictorios,(197) se ha publicado recientemente que en el desarrollo de la HC fisiológica inducida por entrenamiento físico, un modelo de HC que no está asociado al deterioro de la función sistólica, no participa la calcineurina;(175) Más aun, ha sido descrito que la calcineurina provoca un efecto inotrópico negativo a través de distintos mecanismos;(198,199) por lo cual cabría esperar que la inactivación de la vía de la calcineurina produjera un efecto inotrópico positivo. No obstante es difícil explicar cómo una disminución del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula, inducida por inhibición del NHE-1, puede mejorar la contractilidad miocárdica. Sin embargo el hecho de que se preserve la función cardíaca luego de la regresión de HC no es un hallazgo único de la regresión de HC por inhibición del NHE-1.(15-17,200) Se podría especular que la disminución de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  diastólico pudiera ser sensada por la vía calmodulina-calcineurina, y no por la maquinaria  $\text{Ca}^{2+}$  contráctil, que sensa especialmente el  $\text{Ca}^{2+}$  sistólico. La calcineurina se activa preferentemente por elevación sostenida de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e incluso se ha sugerido que lo hace por el  $\text{Ca}^{2+}$  contenido en reservorios subcelulares específicos.(201)

# REFERENCIAS

## Referencias

1. Levy D, Garrison RJ, Savage DD. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham heart study. *N Engl J Med.* 1990;322:1561-1566.
2. Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *J Am Coll Cardiol.* 1998 Nov;32(5):1454-9.
3. Mathew J, Sleight P, Lonn E, Johnstone D, Pogue J, Yi Q, Bosch J, Sussex B, Probstfield J, Yusuf S; Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Investigators. Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril. *Circulation.* 104:1615-1621, 2001.
4. Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Gattobigio R, Zampi I, Reboldi G, Porcellati C. Prognostic significance of serial changes in left ventricular mass in essential hypertension. *Circulation.* 97:48-54, 1998.
5. McKinsey TA and Olson EN. Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr Opin Genet Dev.* 1999;9 267-274.
6. Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:551-571.
7. Chien KR. Stress pathways and heart failure. *Cell.* 1999;98:555-558.
8. MacLellan WR and Schneider MD. Success in failure: modeling cardiac decompensation in transgenic mice. *Circulation.* 1998;97:1433-1435.
9. Hunter JJ, Chien KR. Signaling Pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med.* 1999;341:1276-1283.
10. van Empel VP, De Windt LJ. Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act. *Cardiovasc Res.* 2004 Aug 15;63(3):487-99.
11. Chien KR, Zhu H, Knowlton KU, Miller-Hance W, van-Bilsen M, O'Brien TX, Evans SM. Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Annu Rev Physiol.* 1993;55:77-95.
12. Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation.* 2000 Jul 25;102(4):470-9.
13. Frohlich ED, Apstein C, Chobanian AV, Devereux RB, Dustan HP, Dzau V, Fauad-Tarazi F, Horan MJ, Marcus M, Massie B, Pfeffer MA, Re RN, Roccella EJ, Savage D, Shub C. The heart in hypertension. *N Engl J Med.* 1992;327:998-1008.

## Referencias

14. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* 2006;367:356-367.
15. Akhter SA, Luttrell LM, Rockman HA, Iaccarino G, Lefkowitz RJ, Koch WJ. Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science*. 1998 Apr 24;280(5363):574-7.
16. Esposito G, Rapacciuolo A, Naga Prasad SV, Takaoka H, Thomas SA, Koch WJ, Rockman HA. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation*. 2002 Jan 1;105(1):85-92.
17. Wettschureck N, Rutten H, Zywiets A, Gehring D, Wilkie TM, Chen J, Chien KR, Offermanns S. Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of  $\alpha$ 1q/ $\alpha$ 11 in cardiomyocytes. *Nat Med*. 2001 Nov;7(11):1236-40.
18. Von Anrep G. On the part played by the suprarenals in the normal vascular reactions on the body. *J Physiol (Lond)*. 1912;45:307-317.
19. Parmley WW, Chuck L. Length-dependent changes in myocardial contractile state. *Am J Physiol*. 1973;224:1195-1199.
20. Solaro J. Mechanism regulating cardiac myofilament response to calcium. In: *Heart Physiology and Pathophysiology*. Fourth Edition. Eds. Speralakis, Kurachi, Terzic, Cohen. Academic Press, San Diego, California. Pages 519-526; 2001.
21. Kentish JC, Wrzosek A. Changes in force and cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration after length changes in isolated rat ventricular trabeculae. *J Physiol (Lond)*. 1998; 506:431-444.
22. Hongo K, White E, Le Guennec J-Y, Orchard CH. Changes in  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $[Na^+]_i$  and  $Ca^{2+}$  current in isolated rat ventricular myocytes following an increase in cell length. *J Physiol (Lond)*. 1996;491:609-619.
23. Cingolani HE, Alvarez BV, Ennis IL, Camili3n de Hurtado MC. Stretch-induced alkalinization of feline papillary muscle. An autocrine-paracrine system. *Circ Res*. 1998;83:775-780.
24. P3rez NG, Camili3n de Hurtado MC, Cingolani HE. Reverse mode of the  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange following myocardial stretch. Underlying mechanism of the slow force response. *Circ Res*. 2001;88:376-382.

## Referencias

25. Alvarez BV, Pérez NG, Ennis IL, Camilión de Hurtado MC, Cingolani HE. Mechanisms underlying the increase in force and calcium transient that follows stretch of cardiac muscle: A possible explanation of the Anrep effect. *Circ Res.* 1999;85:716-722.
26. Calaghan SC, White E. Contribution of angiotensin II, endothelin 1 and the endothelium to the slow inotropic response to stretch in ferret papillary muscle. *Pflügers Arch.* 2001;441:514-520.
27. Calaghan S, White E. Activation of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange and stretch-activated channels underlies the slow inotropic response to stretch in myocytes and muscle from the rat heart. *J Physiol.* 2004;559:205-214.
28. von Lewinski D, Stumme B, Fialka F, Luers C, Pieske B. Functional relevance of the stretch-dependent slow force response in failing human myocardium. *Circ Res.* 2004;94:1392-1398.
29. von Lewinski D, Stumme B, Maier LS, Luers C, Bers DM, Pieske B. Stretch-dependent slow force response in isolated rabbit myocardium is Na<sup>+</sup> dependent. *Cardiovasc Res.* 2003;57:1052-1061.
30. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell.* 1993;75:977-984.
31. Camilión de Hurtado MC, Alvarez BV, Ennis IL, Cingolani HE. Stimulation of myocardial Na<sup>+</sup>-independent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger by angiotensin II is mediated by endogenous endothelin. *Circ Res.* 2000;86:622-627.
32. Fabiato A, Fabiato F. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J Physiol.* 276:233-55, 1978.
33. Orchard C and Kentish JC. (1990) Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. *Am J Physiol.* 258, C967-C981.
34. Camilión de Hurtado MC, Alvarez BV, Pérez NG, Ennis IL, Cingolani HE. Angiotensin II activates Na<sup>+</sup>-independent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange in ventricular myocardium. *Circ Res.* 1998;82:473-481.
35. Aiello EA, Villa-Abrille MC, Dulce RA, Cingolani HE, Pérez NG. Endothelin-1 stimulates the reverse mode of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger through Na<sup>+</sup>-dependent and Na<sup>+</sup>-independent pathways. *Hypertension.* 2005;45:1-7.

## Referencias

36. Pérez NG, Villa-Abrille MC, Aiello EA, Dulce RA, Cingolani HE, Camilión de Hurtado MC. A low dose of angiotensin II increases inotropism through activation of reverse  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange by endothelin release. *Cardiovasc Res.* 2003;60:589-597.
37. Eigel BN, Gursahani H, Hadley RW. ROS are required for rapid reactivation of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in hypoxic reoxygenated guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:955-963.
38. Shubeita HE, McDonough PM, Harris AN, Knowlton KU, Glembotski CC, Brown JH, Chien KR. Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem.* 265:20555-20562, 1990.
39. Maruyama Y, Nishida M, Sugimoto Y, Tanabe S, Turner JH, Kozasa T, Wada T, Nagao T, Kurose H.  $\text{G}\alpha(12/13)$  mediates  $\alpha(1)$ -adrenergic receptor-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 91:961-969, 2002.
40. Malo ME, Fliegel L. Physiological role and regulation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006 Nov;84(11):1081-95.
41. Frey N, McKinsey TA, Olson TN. Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med.* 2000;6:1221-1227.
42. Wilkins BJ, Molkentin JD. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;322:1178-1191.
43. Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH, Bers DM. Local  $\text{InsP}_3$ -dependent perinuclear  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest.* 2006 Mar;116(3):675-82.
44. Akazawa H, Komuro I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2003 May 30;92(10):1079-88.
45. Zou Y, Yao A, Zhu W, Kudoh S, Hiroi Y, Shimoyama M, Uozumi H, Kohmoto O, Takahashi T, Shibasaki F, Nagai R, Yazaki Y, Komuro I. Isoproterenol activates extracellular signal-regulated protein kinases in cardiomyocytes through calcineurin. *Circulation.* 104:102-108, 2001.
46. Braun M, Simonis G, Birkner K, Pauke B, Strasser RH. Regulation of protein kinase C isozyme and calcineurin expression in isoproterenol induced cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 41:946-954, 2003.

## Referencias

47. Oudit GY, Crackower MA, Eriksson U, Sarao R, Kozieradzki I, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Gidrewicz D, Rybin VO, Wada T, Steinberg SF, Backx PH, Penninger JM. Phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice are protected from isoproterenol-induced heart failure. *Circulation*. 108:2147-2152, 2003.
48. Zhai P, Galeotti J, Liu J, Holle E, Yu X, Wagner T, Sadoshima J. An angiotensin II type 1 receptor mutant lacking epidermal growth factor receptor transactivation does not induce angiotensin II-mediated cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2006 Sep 1;99(5):528-36.
49. Dorn GW, Force T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*. 2005 Mar;(115(3):527-537.
50. Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofer S, Ito M, Liao R, Colucci WS, Walsh K. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest*. 2005 Aug;115(8):2108-18.
51. Tanaka N, Ryoke T, Hongo M, Mao L, Rockman HA, Clark RG, Ross J Jr. Effects of growth hormone and IGF-I on cardiac hypertrophy and gene expression in mice. *Am J Physiol*. 1998 Aug;275(2 Pt 2):H393-9.
52. Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E. PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell*. 2004 Aug 6;118(3):375-87.
53. Terrell AM, Crisostomo PR, Wairiuko GM, Wang M, Morrell ED, Meldrum DR. Jak/STAT/SOCS signaling circuits and associated cytokine-mediated inflammation and hypertrophy in the heart. *Shock*. 2006 Sep;26(3):226-34.
54. Iemitsu M, Maeda S, Miyauchi T, Matsuda M, Tanaka H: Gene expression profiling of exercise-induced cardiac hypertrophy in rats. *Acta Physiol Scand* 185:259Y270, 2005.
55. Sano M, Fukuda K, Kodama H, Pan J, Saito M, Matsuzaki J, Takahashi T, Makino S, Kato T, Ogawa S: Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes. *J Biol Chem* 275:29717Y29723, 2000.
56. Sano M, Fukuda K, Sato T, Kawaguchi H, Suematsu M, Matsuda S, Koyasu S, Matsui H, Yamauchi-Takahara K, Harada M, Saito Y, Ogawa S: ERK

## Referencias

- and p38 MAPK, but not NF-kappaB, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. *Circ Res* 89:661-669, 2001.
57. Yoshida K, Taga T, Saito M, Suematsu S, Kumanogoh A, Tanaka T, Fujiwara H, Hirata M, Yamagami T, Nakahata T, Hirabayashi T, Yoneda Y, Tanaka K, Wang WZ, Mori C, Shiota K, Yoshida N, Kishimoto T. Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:407-411, 1996.
58. Kunisada K, Negoro S, Tone E, Funamoto M, Osugi T, Yamada S, Okabe M, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:315-319, 2000.
59. Jacoby JJ, Kalinowski A, Liu MG, Zhang SS, Gao Q, Chai GX, Ji L, Iwamoto Y, Li E, Schneider M, Russell KS, Fu XY. Cardiomyocyte-restricted knockout of STAT3 results in higher sensitivity to inflammation, cardiac fibrosis, and heart failure with advanced age. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:12929-12934, 2003.
60. Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, Selvetella G, Lembo G, Tarone G. Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2006 Jun 1;70(3):422-33
61. Miranti CK, Brugge JS. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol*. 2002 Apr;4(4):E83-90.
62. Giancotti FG, Tarone G. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:173-206.
63. Wu C, Dedhar S. Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J Cell Biol*. 2001 Nov 12;155(4):505-10.
64. Critchley DR. Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol*. 2000 Feb;12(1):133-9.
65. Franchini KG, Torsoni AS, Soares PH, Saad MJ. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase

## Referencias

- induced by pressure overload in the rat heart. *Circ Res.* 2000 Sep 29;87(7):558-65.
66. Brancaccio M, Fratta L, Notte A, Hirsch E, Poulet R, Guazzone S, De Acetis M, Vecchione C, Marino G, Altruda F, Silengo L, Tarone G, Lembo G. Melusin, a muscle specific- integrin b1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload. *Nature Medicine.* 2003;9:68-75.
67. Oscar H. Cingolani. Cardiac Hypertrophy and the Wnt/Frizzled Pathway. *Hypertension*, Jan 2007. Epub;
68. Brade T, Manner J, Kuhl M. The role of Wnt signalling in cardiac development and tissue remodelling in the mature heart. *Cardiovasc Res.* 2006 Nov 1;72(2):198-209.
69. Veerle A.M. van de Schans, Susanne W.M. van den Borne, Agnieszka E. Strzelecka, Ben J.A. Janssen, Jos L.J. van der Velden, Ramon C.J. Langen, Antony Wynshaw-Boris, Jos F.M. Smits, and W. Matthijs Blankesteyn. Interruption of Wnt Signaling Attenuates the Onset of Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy. *Hypertension.* 2007;49:1-8.
70. Wang HY, Malbon CC. Wnt signaling, Ca<sup>2+</sup>, and cyclic GMP: visualizing Frizzled functions. *Science.* 2003 Jun 6;300(5625):1529-30)
71. Sei CA, Irons CE, Sprenkle AB, McDonough PM, Brown JH, Glembotski CC. The alpha-adrenergic stimulation of atrial natriuretic factor expression in cardiac myocytes requires calcium influx, protein kinase C, and calmodulin-regulated pathways. *J Biol Chem.* 1991;266:15910-15916.
72. Sonnenberg H. Mechanism of release and renal tubular action of atrial natriuretic factor. *Fed Proc.* 1986;45:2106-2110.
73. LaPointe MC, Deschepper CF, Wu JP, Gardner DG. Extracellular calcium regulates expression of the gene for atrial natriuretic factor. *Hypertension.* 1990;15:20-28.
74. Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin and NF-AT. *Cell.* 1999;96:611-614.
75. Klee CB, Ren H, Wang X. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem.* 1998;273:13367-13370.

## Referencias

76. Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature*. 1997;386:855-858.
77. Cohen PT, Chen MX and Armstrong CG. Novel protein phosphatases that may participate in cell signaling. *Adv Pharmacol*. 1996;36:67-89
78. Jiang H, Xiong F, Kong S, Ogawa T, Kobayashi M, Liu JO. Distinct tissue and cellular distribution of two major isoforms of calcineurin. *Mol Immunol*. 1997;34:663-669.
79. Muramatsu T, Giri PR, Higuchi S, Kincaid RL. Molecular cloning of a calmodulin-dependent phosphatase from murine testis: identification of a developmentally expressed nonneural isoenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:529-533.
80. Aitken A, Klee CB and Cohen P. The structure of the B subunit of calcineurin. *Eur J Biochem*. 1984;139:663-671.
81. Kakalis LT, Kennedy M, Sikkink R, Rusnak F and Armitage IM. Characterization of the calcium-binding sites of calcineurin B. *FEBS Lett*. 1995;362:55-58.
82. Kincaid RL. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. Calmodulin-dependent protein phosphatases from microorganisms to man. A study in structural conservatism and biological diversity. 1993;27:1-23.
83. Klee CB, Draetta GF, Hubbard MJ. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1988;61:149-200.
84. Stemmer PM, Klee CB. Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry*. 1994;33:6859-6866.
85. Stewart AA, Ingebritsen TS, Manalan A, Klee CB, Cohen P. Discovery of a Ca<sup>2+</sup>- and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with calcineurin (CaM-BP80). *FEBS Lett*. 1982 Jan 11;137(1):80-4.
86. Crivici A Ikura M. Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1995;24:85-116.
87. Aramburu J, Heitman J, Crabtree GR. Calcineurin: a central controller of signalling in eucaryotes. *EMBO Rep*. 2004;5:343-348.
88. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev*. 2003;17:2205-2232.

## Referencias

89. Oka T, Dai YS, Molkenin JD. Regulation of calcineurin through transcriptional induction of the calcineurin A beta promoter in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol.* 2005 Aug;25(15):6649-59.
90. Zhang W, Kowal RC, Rusnak F, Sikkink RA, Olson EN, Victor RG. Failure of calcineurin inhibitors to prevent pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circ Res.* 84:722-728, 1999.
91. Ding B, Price RL, Borg TK, Weinberg EO, Halloran PF, Lorell BH. Pressure overload induces severe hypertrophy in mice treated with cyclosporine, an inhibitor of calcineurin. *Circ Res.* 84:729-734, 1999.
92. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* 93:215-228, 1998.
93. Sakata Y, Masuyama T, Yamamoto K, Nishikawa N, Yamamoto H, Kondo H, Ono K, Otsu K, Kuzuya T, Miwa T, Takeda H, Miyamoto E, Hori M. Calcineurin inhibitor attenuates left ventricular hypertrophy, leading to prevention of heart failure in hypertensive rats. *Circulation.* 102:2269-2275, 2000.
94. Meguro T, Hong C, Asai K, Takagi G, McKinsey TA, Olson EN, Vatner SF. Cyclosporine attenuates pressure-overload hypertrophy in mice while enhancing susceptibility to decompensation and heart failure. *Circ Res.* 84:735-740, 1999.
95. Oie E, Bjornerheim R, Clausen OP, Attramadal H. Cyclosporin A inhibits cardiac hypertrophy and enhances cardiac dysfunction during postinfarction failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278:H2115-H2123, 2000.
96. Rothermel BA, McKinsey TA, Vega RB, Nicol RL, Mammen P, Yang J, Antos CL, Shelton JM, Bassel-Duby R, Olson EN, Williams RS. Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:3328-3333, 2001
97. Hill JA, Rothermel B, Yoo KD, Cabuay B, Demetroulis E, Weiss RM, Kutschke W, Bassel-Duby R, Williams RS. Targeted inhibition of calcineurin in pressure-overload cardiac hypertrophy. Preservation of systolic function. *J Biol Chem.* 277:10251-10255, 2002.

## Referencias

98. Sardet C, Franchi A, Pouyssegur J. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. 1989 *Cell* 56,271-280.
99. Orłowski and Grindstein 2003 p17-34, en "The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger, From Molecular to Its role in disease, edited by M. Karmazyn.
100. Fliegel L, Sardet C, Pouyssegur J, Barr A. Identification of the protein and cDNA of the cardiac Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. 1991 *FEBS Lett* 1991 279,25-29.
101. Cavet ME, Akhter S, Murtazina R, Sanchez de Medina F, Tse CM and Donowitz M. Half-lives of plasma membrane Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchangers NHE1-3: plasma membrane NHE2 has a rapid rate of degradation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281:C2039-C2048.
102. Chambrey R, Achard JM, Warnock DG. Heterologous expression of rat NHE4: a highly amiloride-resistant Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform. 1997 *Am J Physiol Cell Physiol*. 272,C90-98.
103. Baird NR, Orłowski J, Szabo EZ, Zaun HC, Schultheis PJ, Menon AG, Shull GE. Molecular cloning, genomic organization, and functional expression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 5 (NHE5) from human brain. 1999. *J Biol Chem*. 274,4377-4382.
104. Brett CL, Wei Y, Donowitz M, Rao R. Human Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger isoform 6 is found in recycling endosomes of cells, not in mitochondria. 2002. *Am J Physiol Cell Physiol*. 282, C1031-1041.
105. Numata M, Orłowski J. Molecular cloning and characterization of a novel (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchanger localized to the trans-Golgi network. 2001. *J Biol Chem*. 276,17387-17394.
106. Goyal S, Vanden Heuvel G, Aronson PS. Renal expression of novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform NHE8. 2003. *Am J Physiol Renal Physiol*. 284,F467-473.
107. Nakamura N, Tanaka S, Teko Y, Mitsui K, Kanazawa H. Four Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. 2004. *J Biol Chem*.
108. Fliegel L, Karmazyn M. The cardiac Na-H exchanger: a key downstream mediator for the cellular hypertrophic effects of paracrine, autocrine and hormonal factors. *Biochem Cell Biol*. 2004;82:626-635.

## Referencias

109. Sardet C, Fafournoux P, Pouyssegur J. Alpha-thrombin, epidermal growth factor, and okadaic acid activate the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, NHE-1, by phosphorylating a set of common sites. *J Biol Chem.* 1991 Oct 15;266(29):19166-71.
110. Slepko E, Fliegel L. Structure and function of the NHE1 isoform of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Biochem Cell Biol.* 2002;80:499-508.
111. Schulte EA, Hohendahl A, Stegemann H, Hirsch JR, Saleh H, Schlatter E. Natriuretic peptides and diadenosine polyphosphates modulate pH regulation of rat mesangial cells. *Cell Physiol Biochem.* 1999;9(6):310-22.
112. Touyz RM, Picard S, Schiffrin EL, Deschepper CF. Cyclic GMP inhibits a pharmacologically distinct Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger variant in cultured rat astrocytes via an extracellular site of action. *J Neurochem.* 1997 Apr;68(4):1451-61.
113. Li X, Alvarez B, Casey JR, Reithmeier RA, Fliegel L. Carbonic anhydrase II binds to and enhances activity of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J Biol Chem.* 2002;277:36085-36091.
114. Avkiran M, Haworth RS. Regulatory effects of G protein-coupled receptors on cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity: signalling and significance. *Cardiovasc Res.* 2003;57:942-952.
115. Alvarez BV, Fujinaga J, Casey JR. Molecular basis for angiotensin II-induced increase of chloride/bicarbonate exchange in the myocardium. *Circ Res.* 2001;89:1246-1253.
116. Ganz MB, Boyarsky G, Boron WF, Sterzel RB. Effects of angiotensin II and vasopressin on intracellular pH of glomerular mesangial cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 1988;254:F787-F794.
117. Thomas RC. Cell growth factors. Bicarbonate and pHi response. *Nature.* 1989;337:601.
118. Cingolani HE, Koretsune Y, Marban E. Recovery of contractility and pHi during respiratory acidosis in ferret hearts: role of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1990;259:H843-H848.
119. Avkiran M, Haworth RS. Regulation of cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity by endogenous ligands. Relevance to ischemia. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;874:335-345.

## Referencias

120. Bak MI, Ingwall JS. Contribution of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange to Na<sup>+</sup> overload in the ischemic hypertrophied hyperthyroid rat heart. *Cardiovasc Res.* 2003;57:1004-1014.
121. Baartscheer A, Schumacher CA, van Borren MM, Belterman CN, Coronel R, Opthof T, Fiolet JW. Chronic inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger attenuates cardiac hypertrophy and prevents cellular remodeling in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2005;65:83-92.
122. Chahine M, Bkaily G, Nader M, Al-Khoury J, Jacques D, Beier N, Scholz W. NHE-1-dependent intracellular sodium overload in hypertrophic hereditary cardiomyopathy: prevention by NHE-1 inhibitor. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;38:571-582.
123. Cingolani HE, Perez NG, Aiello EA, de Hurtado MC. Intracellular signaling following myocardial stretch: an autocrine/paracrine loop. *Regul Pept.* 2005;128:211-220.
124. Cingolani HE. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange hyperactivity and myocardial hypertrophy: are they linked phenomena? *Cardiovasc Res.* 1999;44:462-467.
125. Camilion de Hurtado MC, Portiansky EL, Perez NG, Rebolledo OR, Cingolani HE. Regression of cardiomyocyte hypertrophy in SHR following chronic inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Cardiovasc Res.* 2002;53:862-868.
126. Engelhardt S, Hein L, Keller U, Klambt K, Lohse MJ. Inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in beta 1-adrenergic receptor transgenic mice. *Circ Res.* 2002;90:814-819.
127. Ennis IL, Escudero EM, Console GM, Camihort G, Dumm CG, Seidler RW, Camilion de Hurtado MC, Cingolani HE. Regression of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibition. *Hypertension.* 2003;41:1324-1329.
128. Karmazyn M, Liu Q, Gan XT, Brix BJ, Fliegel L. Aldosterone increases NHE-1 expression and induces NHE-1-dependent hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Hypertension.* 2003;42:1171-1176.
129. Chen L, Gan XT, Haist JV, Feng Q, Lu X, Chakrabarti S, Karmazyn M. Attenuation of compensatory right ventricular hypertrophy and heart failure following monocrotaline-induced pulmonary vascular injury by the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange inhibitor cariporide. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;298:469-476.

## Referencias

130. Kilic A, Velic A, De Windt LJ, Fabritz L, Voss M, Mitko D, Zwiener M, Baba HA, van Eickels M, Schlatter E, Kuhn M. Enhanced activity of the myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE-1 contributes to cardiac remodeling in atrial natriuretic peptide receptor-deficient mice. *Circulation*. 2005;112:2307-2317.
131. Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM, Schaub MC. Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:2873-2892
132. Schluter RD, Piper HM. Regulation of growth in the adult cardiomyocytes. *FASEB J*. 1999;13:S17-S22.
133. Pérez NG, Alvarez BV, Camilión de Hurtado MC, Cingolani HE. pH<sub>i</sub> regulation in myocardium of the spontaneously hypertensive rat. Compensated enhanced activity of the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger. *Circ Res*. 1995;77:1192-1200.
134. EpeI D. The role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and intracellular pH changes in fertilization. In: Grinstein S, editor. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. Florida: CRC Press, pages 209-223, 1998.
135. Boron WF, Boyarski G, Ganz M. Regulation of intracellular pH in renal mesangial cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1989;574:321-332.
136. Thomas RC. Bicarbonate and pH<sub>i</sub> response. *Nature*. 1989;337:601.
137. Bluhm WF, Lew WY, Garfinkel A, McCulloch AD. Mechanism of length history-dependent tension in an ionic model of the cardiac myocyte. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1998;274:H1032-H1040.
138. Schussheim AE, Radda GK. Altered Na<sup>(+)</sup>-H<sup>(+)</sup>- exchange activity in the spontaneously hypertensive perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27:1475-1481.
139. Putney LK, Barber DL. Na-H exchange-dependent increase in intracellular pH times G2/M entry and transition. *J Biol Chem*. 2003;278:44645-44649.
140. Paolini L. en *Molecular Biology: Elementary Process of nerve conduction and muscle contraction*. Ed. Nachmansohn Q, p. 173, Academic Press 1960 (New York).
141. Masereel b, Pochet L, Laeckmann D. An overview of inhibitors of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Eur J Med Chem*. 2003;38:547-554.
142. Alvarez BV, Ennis IL, Camilión de Hurtado MC, Cingolani HE. Effects of antihypertensive therapy on cardiac sodium/hydrogen ion exchanger activity

## Referencias

- and hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Can J Cardiol.* 2002;18:667-672.
143. Shohet RV, Kisanuki YY, Zhao XS, Siddiquee Z, Franco F, Yanagisawa M. Mice with cardiomyocyte-specific disruption of the endothelin-1 gene are resistant to hyperthyroid cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:2088-2093.
144. Saleh FN, Schirmer H, Sundsfjord J, Jorde R. Parathyroid hormone and left ventricular hypertrophy. *Eur Heart J.* 2003;24:2054-2060.
145. Helmle-Kolb C, Counillon L, Roux D, Pouyssegur J, Mrkic B, Murer H. Na/H exchange activities in NHE1-transfected OK-cells: cell polarity and regulation. *Pflugers Arch*1993;425:34-40.
146. Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 2005 Feb;11(2):214-22.
147. Fiedler B, Lohmann SM, Smolenski A, Linnemuller S, Pieske B, Schroder F, Molkentin JD, Drexler H, Wollert KC. Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 20;99(17):11363-8.
148. Pastukh VM, Wu S, Ricci C, Mozaffari M, Schaffer SW. Reversal of Hyperglycemic preconditioning by Angiotensin II: role of calcium transport. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Apr;288(4):H1965-75.
149. Hayasaki-Kajiwara Y, Kitano Y, Iwasaki T, Shimamura T, Naya N, Iwaki K, Nakajima M. Na(+)influx via Na(+)/H(+)exchange activates protein kinase C isozymes delta and epsilon in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1999 Aug;31(8):1559-72.
150. An J, Varadarajan SG, Camara A, Chen Q, Novalija E, Gross GJ, Stowe DF (2001) Blocking Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange reduces [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> load after ischemia and improves function in intact hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281:H2398-H2409.
151. Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, Yoshida H, Kusumoto K. The myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. *Circ Res* 1999;85(9):777-86.

## Referencias

152. Avkiran M and Marber M.S. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:747-53.
153. Karmazyn M, Sostaric JV, and Gan XT. The myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger: a potential therapeutic target for the prevention of myocardial ischaemic and reperfusion injury and attenuation of postinfarction heart failure. *Drugs* 2001;61:375-89.
154. Chen L, Chen CX, Gan XT, Beier N, Scholz W, Karmazyn M. Inhibition and reversal of myocardial infarction-induced hypertrophy and heart failure by NHE-1 inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286(1):H381-7.
155. Wang Y, Meyer JW, Ashraf M, Shull GE. Mice with a null mutation in the NHE1 Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger are resistant to cardiac ischemia-reperfusion injury. *Circ Res.* 2003;93:776-782.
156. Maekawa N, Abe J, Shishido T, Itoh S, Ding B, Sharma VK, Sheu SS, Blaxall BC, Berk BC. Inhibiting p90 ribosomal S6 kinase prevents Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger-mediated cardiac ischemia-reperfusion injury. *Circulation.* 2006;113:2516-2523.
157. Mentzer, R.M., Jr., and the EXPEDITION Study Investigators. 2003. Effects of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibition by cariporide on death and nonfatal myocardial infarction in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: The EXPEDITION study. *Circulation.* 108: 3M.
158. Rupprecht, H.J., vom Dahl, J., Terres, W., Seyfarth, K.M., Richardt, G., Schultheisbeta. H.P., Buerke, M. et al. 2000. Cardioprotective effects of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA. *Circulation*, 101: 2902-2908.
159. Théroux, P., Chaitman, B.R., Danchin, N., Erhardt, L., Meinertz, T., Schroeder et al. 2000. Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. *Circulation*, 102: 3032-3038.
160. Camilión de Hurtado MC, Ennis IL, Pérez NG, Chiappe de Cingolani GE, Morgan P, Cingolani HE. Upregulation of myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger induced by chronic treatment with a selective inhibitor. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34:1539-1547.

## Referencias

161. Okamoto K, AK. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* 1963;27:282-293.
162. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fishbein MC, Frohlich ED. Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol.* 1979;237(4):H461-H468.
163. Sahn DJ, De Maria A, Kisslo J, Weymann A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiographic measurements. *Circulation* 1978; 58:1072-83.
164. De Simone G, Wallerson DC, Volpe M, Devereux RB: Echocardiographic measurement of left ventricular mass and volume in normotensive and hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1990; 3: 688-696.
165. Pascual M, Pascual DA, Soria F, et al: Effects of isolated obesity on systolic and diastolic left ventricular function. *Heart.* 2003; 89: 1152-1156.
166. Quiñones MA, Mokotoff DM, Nouri S, Winters WL Jr, Miller RR: Non invasive quantification of left ventricular wall stress. Validation of method and application to assessment of chronic pressure overload. *Am J Cardiol.* 1980; 45: 782-790.
167. Cingolani HE, Rebolledo OR, Portiansky EL, Pérez NG, Camilión de Hurtado MC. Regression of hypertensive myocardial fibrosis by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibition. *Hypertension.* 2003;41:373-377.
168. Dan J. Bare, Claudia S. Kettlun, Mei Liang, Donald M. Bers, and Gregory A. Mignery. *J. Biol. Chem.*, Vol. 280, Issue 16, 15912-15920, April 22, 2005.
169. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):2002-2007.
170. Nagata K, Somura F, Obata K, Odashima M, Izawa H, Ichihara S, Nagasaka T, Iwase M, Yamada Y, Nakashima N, Yokota M. AT1 receptor blockade reduces cardiac calcineurin activity in hypertensive rats. *Hypertension.* 2002;40:168-174.
171. Taigen T, De Windt LJ, Lim HW, Molkenin JD. Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:1196-1201.
172. Haq S, Choukroun G, Lim H, Tymitz KM, del Monte F, Gwathmey J, Grazette L, Michael A, Hajjar R, Force T, Molkenin JD. Differential activation of

## Referencias

- signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation*. 2001;103:670-677.
173. Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM, Glascock BJ, Kimball TF, Lorenz JN, Molkentin JD. Impaired cardiac hypertrophic response in calcineurin A $\beta$ -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:4586-4591.
174. Zou Y, Yamazaki T, Nakagawa K, Yamada H, Iriguchi N, Toko H, Takano H, Akazawa H, Nagai R, Komuro I. Continuous blockade of L-type Ca $^{2+}$  channels suppresses activation of calcineurin and development of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2002;25:117-124.
175. Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, Jones F, Kimball TR, Molkentin JD. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2004;94:110-118.
176. Lipskaia L, Pourci ML, Delomenie C, Combettes L, Goudouneche D, Paul JL, Capiod T, Lompre AM. Phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-activated transcription pathways are required for VLDL-induced smooth muscle cell proliferation. *Circ Res*. 2003;92:1115-1122.
177. Diedrichs H, Mei C, Frank KF, Boelck B, Schwinger RH. Calcineurin independent development of myocardial hypertrophy in transgenic rats overexpressing the mouse renin gene, TGR(mREN2)27. *J Mol Med*. 2004;82:688-695.
178. Dulce RA, Hurtado C, Ennis IL, Garcarena CD, Alvarez MC, Caldiz C, Pierce GN, Portiansky EL, Chiappe de Cingolani GE, Camili3n de Hurtado MC. Endothelin-1 induced hypertrophic effect in neonatal rat cardiomyocytes: Involvement of Na(+)/H(+) and Na(+)-Ca(2+) exchangers. *J Mol Cell Cardiol*. 2006 Jul 19(41):807-815.
179. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:45-79.
180. Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest*. 1998;101:1326-1342.

## Referencias

181. Yoshida H, Karmazyn M. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibition attenuates hypertrophy and heart failure in 1-wk postinfarction rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H300–H304.
182. Ennis IL, Álvarez BV, Camilión de Hurtado MC, Cingolani HE. Enalapril induces regression of cardiac hypertrophy and normalization of pHi regulatory mechanisms. *Hypertension.* 1998;31:961-967.
183. Ganz M.B., Boyarsky G., Sterzel R.B., Boron W.F., 1989. Arginine vasopressin enhances pHi regulation in the presence of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> by stimulating three acid-base transport systems. *Nature* 1989;337:648-651.
184. Teshima Y, Akao M, Jones SP, Marbán E. Cariporide (HOE 642), a selective Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> Exchange inhibitor, inhibits the mitochondrial death pathway. *Circulation.* 2003;108: 2275-2281.
185. Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Pina P, Inserte J, Agullo L, Soler-Soler J. Cariporide preserves mitochondrial proton gradient and delays ATP depletion in cardiomyocytes during ischemic conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H999-H1006.
186. Javadov S, Huang C, Kirshenbaum L, Karmazyn M. NHE-1 inhibition improves impaired mitochondrial permeability transition and respiratory function during postinfarction remodelling in the rat. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;38:135-143.
187. Hotta Y, Nishimaki H, Takeo T, Itoh G, Yajima M, Otsuka-Murakami H, Ishikawa N, Kawai N, Huang L, Yamada K, Yamamoto S, Matsui K, Ohashi N. Differences in the effects of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange inhibitors on cardiac function and apoptosis in guinea-pig ischemia-reperfused hearts. *Eur J Pharmacol.* 2004;503:109-122.
188. Aikawa R, Nagai T, Tanaka M, Zou Y, Ishihara T, Takano H, Hasegawa H, Akazawa H, Mizukami M, Nagai R, Komuro I. Reactive oxygen species in mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289:901-907.
189. Amin JK, Xiao L, Pimental DR, Pagano PJ, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. Reactive oxygen species mediate alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:131-139.

## Referencias

190. Tanaka K, Honda M, Takabatake T. Redox regulation of MAPK pathways and cardiac hypertrophy in adult rat cardiac myocyte. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:676-685.
191. Date MO, Morita T, Yamashita N, Nishida K, Yamaguchi O, Higuchi Y, Hirotani S, Matsumura Y, Hori M, Tada M, Otsu K. The antioxidant N-2-mercaptopropionyl glycine attenuates left ventricular hypertrophy in in vivo murine pressure-overload model. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:907-912.
192. Higuchi Y, Otsu K, Nishida K, Hirotani S, Nakayama H, Yamaguchi O, Matsumura Y, Ueno H, Tada M, Hori M. Involvement of reactive oxygen species-mediated NF-kappa B activation in TNF-alpha-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34:233-240.
193. Takimoto E, Champion HC, Li M, Ren S, Rodriguez ER, Tavazzi B, Lazzarino G, Paolucci N, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA. Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. *J Clin Invest.* 2005;115:1221-1231.
194. Sah R, Oudit GY, Nguyen TT, Lim HW, Wickenden AD, Wilson GJ, Molkenin JD, Backx PH. Inhibition of calcineurin and sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> influx protects cardiac morphology and ventricular function in K(v)4.2N transgenic mice. *Circulation.* 2002;105:1850-1856.
195. Javadov S, Purdham DM, Zeidan A, Karmazyn M. NHE-1 inhibition improves cardiac mitochondrial function through regulation of mitochondrial biogenesis during postinfarction remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Oct;291(4):H1722-30.
196. Miura T, Liu Y, Goto M, Tsuchida A, Miki T, Nakano A, Nishino Y, Ohnuma Y, Shimamoto K. Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels play a role in cardioprotection by Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange inhibition against ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:957-963.
197. Eto Y, Yonekura K, Sonoda M, Arai N, Sata M, Sugiura S, Takenaka K, Gualberto A, Hixon ML, Wagner MW, Aoyagi T. Calcineurin is activated in rat hearts with physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training. *Circulation.* 2000 May 9;101(18):2134-7)
198. Li J, Yatani A, Kim SJ, Takagi G, Irie K, Zhang Q, Karoor V, Hong C, Yang G, Sadoshima J, Depre C, Vatner DE, West MJ, Vatner SF. Neurally-

## Referencias

- mediated increase in calcineurin activity regulates cardiac contractile function in absence of hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2003;59:649-657.
199. Esposito G, Rapacciuolo A, Naja Prasad SV, Takaoka H, Thomas SA, Koch WJ, Rockman HA. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation.* 2002 Jan 1;105(1):85-92.
200. Frey N, Barrientos T, Shelton JM, Frank D, Rutten H, Gehring D, Kuhn C, Lutz M, Rothermel B, Bassel-Duby R, Richardson JA, Katus HA, Hill JA, Olson EN. Mice lacking calcineurin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress. *Nat Med.* 2004;10:1336-1343.
201. Rosen BD, Edvardson T, Lai S, Castillo E, Pan L, Jerosch-Herold M, Sinha S, Kronmal R, Arnett D, Crouse JR 3rd, Heckbert SR, Bluemke DA, Lima JA. Left ventricular concentric remodeling is associated with decreased global and regional systolic function: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circulation.* 2005;112:984-991.