



**Trabajo de Tesis**

**Intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$   
miocárdico: su regulación por  
fosforilación. Papel de la ruta  
GMPc/proteína quinasa G**

**Lic. Romina Gisel Díaz**

**Director: Dr. Néstor Gustavo Pérez**

# Agradecimientos

*Que haya sueños es raro, que haya espejos,  
que el usual y gastado repertorio  
de cada día incluya el ilusorio  
orbe profundo que urden los reflejos.*

**Jorge L. Borges**

Tal vez esta haya sido la parte más difícil que me haya tocado escribir, no por falta de personas a quienes dedicar mis agradecimientos sino por lo extenso de la lista.

En primer lugar quisiera agradecer a las personas que directamente han contribuido a que esto sea no un reflejo sino una realidad.

A mi director, Dr. Néstor Gustavo Pérez, por creer en mí, guiarme y aprender a desarrollar una incalculable paciencia, que es mutua, para seguir trabajando juntos. Por amenizar las jornadas con sus chistes, bromas y/o canciones, o soportar las mías y finalmente, por intercambiar ideas y pensamientos sin llegar a sacar los guantes y dejarme crecer laboralmente. Sos groso Gus, gracias!!!

Al Dr. Alejandro Aiello, por permitirme ingresar en este apasionante universo. Sin tu intercesión tal vez otra sería la historia, gracias Alex!!

A los sucesivos directivos del Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Dra. Alicia Mattiazzi y Dr. Martín Vila Petroff, por permitirme ingresar y desarrollar mi trabajo de investigación en el CIC y formar parte de un grupo tan ameno.

Al Dr. Horacio Cingolani, por incluirme dentro de su excelso grupo de trabajo.

A los integrantes de mi grupo de trabajo, Dres. Patricio Morgan, Bernardo Álvarez, Irene Ennis y Celeste Villa Abrille, por dejarme aprender de ustedes. Patri y Ber, gracias por aconsejarme en más de una ocasión, son fantásticos!!!

Y a las Dras. Mariela Nolly y Carolina Graciarena por ayudarme con los primeros geles.

En segundo lugar quisiera agradecer a las personas que hacen de esta realidad una versión en la que a uno le gusta verse. A todos los que han compartido en el laboratorio pedacitos de historia y fuera del laboratorio más, que han tenido que soportar mis “no me sale” más de una vez, me han dado un abrazo o un coscorrón cuando la ocasión lo ameritaba y se han convertido voluntariamente o no en amigos, confidentes, consejeros y compañeros de mates y locuras. De más está decirles cuanto los quiero. Infinitas

gracias a Carito, por tu apoyo y por tu complicidad, a Luishita por quererme y contenerme, a Marie por tu amistad que es invaluable, a Lole por aconsejarme, a Sole por ser la promotora de todas las risotadas, a Mari por estar siempre a un pasito, a Juli por hacerme reír, a Verito por acompañarme, a Ale por compartir horas y horas y a Vero por cobijarme en mis inicios en el laboratorio. A Lean, Omíto y Ema por darme otra perspectiva cuando la necesité, a Luisito y AleO por compartir charlas y más charlas, a Andresito por estar siempre pendiente. A Monique, Marita, Su, Coti, Romi, Mikki, Ceci Alvarez, Male, Eze, Omar, Mariana, Noe, Nacho, Mariano, Nachito, Juancito y Juanma por compartir ratitos de distracción. A Albita, Inés y Ale Mendi, son un sol! A los chicos del bioterio por entretener a las ratas con conversaciones futboleras.

Y ya no en el CIC, a mis compañeros de Farmacología, que son unos genios: Ine, Ali, Ger, Pedro, Vicky y Javi. Gracias por permitirme compartir mucho más que la pasión por la docencia!

Quisiera dedicar un párrafo especial para agradecer a aquellas personitas que me soportaron las ausencias por tesis, que me acompañaron todos estos años y tal vez muchos más sin quejarse y fueron todo oídos y todo brazos si las cosas no iban del todo bien. Fer, Gi, Natu, Ana, Clau, Pao, Evi, Mel y mis farmacéuticos favoritos Chechu, Ine, Martín, Vero y Vale. Soy muy afortunada en contar con amigos como ustedes!!! Millones de gracias!!!

A mis ex compañeros de farmacia cuya amistad trascendió la barrera laboral, Marian, Euge, Mari, Adri, Dani, Ale, Delia y Lola. Y a Roberto por dejarme levantar vuelo y apoyarme desde su lugar. Los quiero!!!

Por último, quisiera agradecer a mi familia, por ser mi pilar, por preocuparse a cada segundo literalmente y apoyarme incondicionalmente.

Gracias Ma, César, Pa y Moni!!

A mis hermanos, Matu y Chris, por su contención, por la manera que tienen de sacarme sonrisas y ser ejemplo de tenacidad y autosuperación. Muchas gracias nenes!!! No saben cuanto los admiro...

A mis cuñadas Mari y Debo, por bancarme. A mis tíos y primos.

*Y muy especialmente a mis hermosas sobrinas que son todo: Marti, Eva, Isa y Cande. A ellas va dedicado el presente trabajo.*

# ÍNDICE



# Introducción

<b>I</b>	<b>Generalidades</b>	
<b>I.a</b>	Regulación de pH intracelular	8
<b>I.b</b>	Buffers intracelulares ¿son o no son suficientes?	8
<b>I.c</b>	Regulación de pH por transporte transmembrana en miocito cardíaco	9
<b>II</b>	<b>Caracterizando al intercambiador <math>\text{Na}^+/\text{H}^+</math></b>	
<b>II.a</b>	Familia NHE	11
<b>II.b</b>	NHE1: actividad y regulación	13
<b>II.c</b>	Regulación de la actividad del NHE1 por inhibición farmacológica: amilorida y benzoilguanidinas	15
<b>II.d</b>	Funcionalidad. Mucho más que una extrusión de $\text{H}^+$	17
<b>III</b>	<b>Hiperactividad del NHE1</b>	
<b>III.a</b>	Un villano oculto	19
<b>III.b</b>	Cáncer	19
<b>III.c</b>	Patologías cerebrales	20
<b>III.d</b>	Patologías cardíacas	20
<b>IV</b>	<b>Del laboratorio al paciente</b>	
<b>IV.a</b>	Cuando no todo es lo que parece	22
<b>V</b>	<b>Inhibición de la fosforilación del NHE1</b>	
<b>V.a</b>	En busca de un nuevo eje terapéutico	25
<b>VI</b>	<b>GMPcíclico y PKG, recorriendo el camino inverso</b>	
<b>VI.a</b>	Sildenafil, un fármaco conocido	27
<b>VI.b</b>	Efectos inesperados y nuevos mecanismos probables de acción	28
<b>VI.c</b>	Ruta cardiovascular, una aplicación posible?	29
	<b>Objetivos</b>	32

## **Materiales y Métodos**

<b>VII</b>	<b>Materiales de trabajo</b>	
<b>VII.a</b>	Generalidades	34
<b>VII.b</b>	Disección	34
<b>VIII</b>	<b>Medición de pH<sub>i</sub></b>	
<b>VIII.a</b>	Descripción de la técnica	36
<b>VIII.b</b>	Calibración	38
<b>VIII.c</b>	Determinación de la actividad del NHE1	39
<b>VIII.d</b>	Determinación de la capacidad buffer ( $\beta$ i)	42
<b>VIII.e</b>	Intervenciones farmacológicas realizadas	43
<b>IX</b>	<b>Determinación del grado de fosforilación de proteínas mediante Western Blot (WB)</b>	
<b>IX.a</b>	Determinación de fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2), la p90 ribosomal S6 quinasa (p90 <sup>RSK</sup> ) y p38	43
<b>IX.b</b>	Determinación de fosforilación de NHE1 en el residuo Ser 703	48
<b>IX.c</b>	Intervenciones en las que se evaluaron proteínas	49
<b>X</b>	<b>Estadística</b>	50
	<b>Resultados</b>	
<b>XI</b>	<b>Perfil de activación del NHE1 ante acidificaciones de distinta duración</b>	
<b>XI.a</b>	Caracterización	52
<b>XI.b</b>	Rol del SIL en el perfil de activación del NHE1	55
<b>XII</b>	<b>Influencia de SIL en la actividad del NHE1 post acidosis de 10 minutos</b>	
<b>XII.a</b>	Características generales	57
<b>XII.b</b>	Rol del SIL en la actividad de quinasas post acidosis sostenida	60

<b>XII.c</b>	Inhibición de la actividad del NHE1 por SIL. Participación de fosfatasa	62
<b>XII.d</b>	Rol del SIL en la fosforilación del NHE1 post acidosis sostenida	65
<b>XIII</b>	<b>Activación de PP2A por PKG</b>	
<b>XIII.a</b>	Posible rol de la quinasa p38	67
<b>XIII.b</b>	La inhibición de p38 no afecta el estado de fosforilación de las quinasas	69
<b>XIII.c</b>	PP2A media el efecto inducido por activación p38 sobre el NHE1 en acidosis sostenida	70
<b>XIII.d</b>	Sildenafil induce activación de p38	73
	<b>Discusión</b>	
<b>XIV</b>	<b>Activación del NHE1 post-acidosis sostenida</b>	76
<b>XV</b>	<b>Perfil de activación del NHE1</b>	78
<b>XVI</b>	<b>Regulación de la actividad del NHE1</b>	
<b>XVI.a</b>	Efecto de la inhibición de la PDE5A con Sildenafil	81
<b>XVI.b</b>	Secuencia de eventos hacia la inhibición del NHE1 por Sildenafil Rol de PP2A	83
<b>XVI.c</b>	Secuencia de eventos hacia la inhibición del NHE1 por Sildenafil Rol de p38	85
	<b>Conclusiones</b>	
	Rol de la inhibición de PDE5A en la actividad del NHE1 post acidosis	90
	Mecanismo de la inhibición de la actividad del NHE1 por inhibición de PDE5A	91
	<b>Limitaciones, virtudes y perspectivas futuras</b>	93
	<b>Bibliografía</b>	96

# **INTRODUCCIÓN**

# I

## Generalidades

### Regulación de pH intracelular

Mantener un medio interno estable es esencial para la vida celular. Son muchos los procesos celulares que pueden generar cambios en el pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ) o ser afectados por los mismos, entre ellos metabolismo, funcionalidad óptima de enzimas, transporte a través de membranas, crecimiento celular, movilidad y, en el caso de células musculares, contractilidad (Malo and Fliegel 2006).

Es de esperar entonces que todas las células, entre ellas el miocito cardíaco, presenten más de un mecanismo de mantenimiento o regulación del  $\text{pH}_i$  (Baartscheer, Schumacher et al. 2003) y/o intraorganelar. Dichos mecanismos pueden clasificarse en dos grandes grupos según su modo de acción para restablecer el  $\text{pH}_i$ : 1) Amortiguadores intracelulares o *buffers intrínsecos* de la célula, es decir moléculas capaces de amortiguar o consumir una carga ácida o básica, 2) Proteínas transportadoras de membrana, capaces de movilizar equivalentes ácidos o alcalinos a través de la membrana plasmática.

### Buffers intracelulares ¿son o no son suficientes?

Por definición, un ácido o base débil en equilibrio con su forma conjugada podría amortiguar las variaciones en la concentración intracelular de  $\text{H}^+$  devenidas del metabolismo, es decir actuaría como un sistema buffer, dada la reversibilidad de su unión a  $\text{H}^+$  u  $\text{OH}^-$ . Cabe preguntarse entonces ¿de qué factores depende que una sustancia pueda cumplir el papel de buffer y cuáles son esos buffers intracelulares?

Cada ácido o base orgánico ó inorgánico presenta una constante de disociación aparente ( $K'_a$ ) particular que determina la factibilidad de la escisión de tal unión. Considerando la ecuación de Henderson-Hasselbach para el caso de un ácido débil:

$$\text{pH} = \text{pK}'_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]}$$

será un potencial buffer intracelular aquel que poseyendo una constante de disociación aparente del mismo orden de magnitud que la concentración intracelular de  $\text{H}^+$ , se encuentre en el citosol en un equilibrio tal que las concentraciones relativas del ácido débil (AH) y su base conjugada ( $\text{A}^-$ ) sean equivalentes. No obstante ello, para “atrapar” una importante cantidad de  $\text{H}^+$  se requiere que ambas estén en una concentración elevada.

En el interior de las células existen moléculas que reúnen estas características, ya sean pequeñas como las que conforman el buffer fosfato ( $\text{PO}_4\text{H}^{2-}/\text{PO}_4\text{H}_2^-$ ) o el sistema bicarbonato/dióxido de carbono ( $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ ) o bien macromoléculas como las proteínas que conforman la arquitectura celular. Aún así, no todas las moléculas que cumplen con esta condición tienen la misma capacidad para amortiguar los cambios de pH producidos por cargas ácidas o alcalinas. Esta capacidad, denominada *capacidad buffer*, que se define como el cociente entre la carga ácida o básica responsable de la alteración del pH y el cambio de pH que efectivamente provoca en el interior celular, depende no sólo de las cualidades que definen al buffer, constante de disociación y concentración de la especie en el citoplasma, sino también de la actividad del  $\text{H}^+$ .

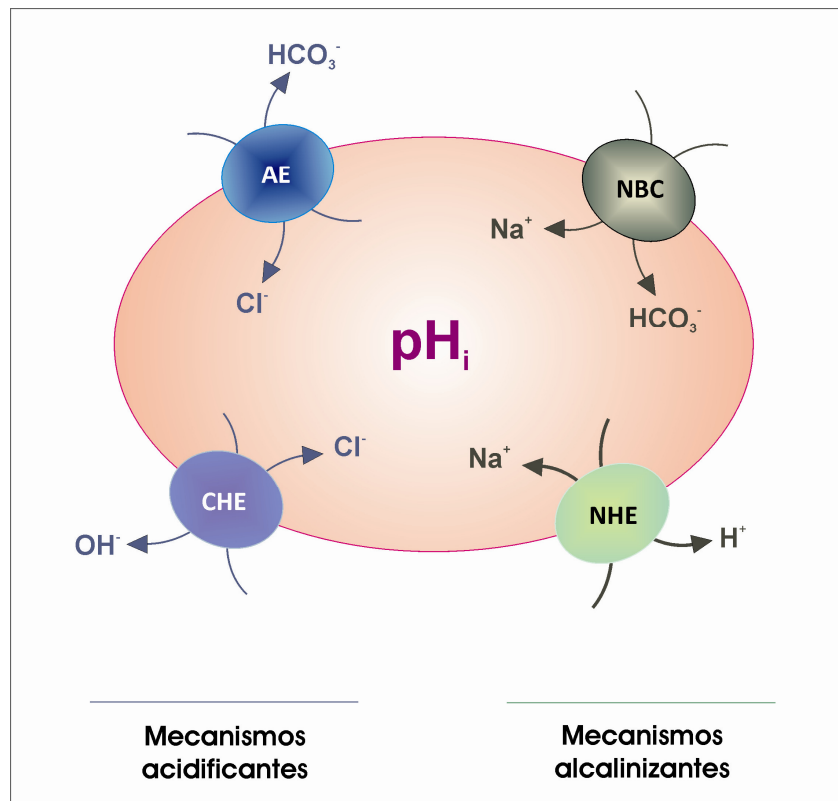
Los buffers intrínsecos intracelulares operan lentamente para reestablecer el  $\text{pH}_i$ , lo cual hace que no resulten eficientes para enfrentar un cambio drástico en el estado ácido/base de la célula. Esta situación no es menor si consideramos que las variaciones en el  $\text{pH}_i$  afectan el estado iónico de los residuos aminoácidos de las proteínas alterando la conformación tridimensional de las mismas y por ende su función. De allí que la corrección de las alteraciones ácido/base de mayor magnitud dependa de otros mecanismos como los transportadores de membrana que mencionábamos en una sección anterior.

## **Regulación de pH por transporte transmembrana en miocito cardíaco**

El  $\text{pH}_i$  normal de un cardiomiocito oscila entre 7.00 y 7.20, es decir aproximadamente una unidad logarítmica por encima del que se esperaría por difusión libre de  $\text{H}^+$  a través

de la membrana (~6.00) (Roos and Boron 1981). Esta situación es posible gracias a la presencia de proteínas transportadoras de membrana capaces de movilizar equivalentes ácidos o alcalinos a través de la membrana plasmática.

Son cuatro los transportadores de membrana que contribuyen a mantener la homeostasis del pH en el miocito cardíaco. Dos de ellos median el eflujo de equivalentes ácidos y su contribución se destaca post acidificación intracelular: el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) (Paris and Pouyssegur 1983) y el cotransporte  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (NBC) (Blatter and McGuigan 1991; Lagadic-Gossmann, Vaughan-Jones et al. 1992). Los dos restantes median el eflujo de equivalentes alcalinos y su contribución principal es tras una alcalinización intracelular: el intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (“AE” del inglés *anion exchanger*) y el  $\text{Cl}^-/\text{OH}^-$  (CHE) (Sun, Leem et al. 1996). En la **Figura 1** se pueden apreciar esquemáticamente estos 4 sistemas.



**Figura 1.** Esquemática de los mecanismos alcalinizantes y acidificantes responsables de la regulación del pH.

El  $\text{pH}_i$  resulta del balance entre estos sistemas de extrusión o influjo de equivalentes ácidos y alcalinos. Dado que el  $\text{pH}_i$  basal es más alcalino que el que se obtendría por libre difusión transmembrana y teniendo en cuenta que experimentos en miocitos de

cobayo mostraron que todos los sistemas tienen algún grado de actividad a pH basal (Leem, Lagadic-Gossmann et al. 1999), una conclusión inmediata sería que los sistemas alcalinizantes (NHE y NBC) prevalecen por sobre los otros.

Como mencionamos en un apartado anterior, estos sistemas cobran mayor relevancia cuando se producen cambios bruscos del equilibrio ácido/base como en isquemia/reperfusión (Yan and Kleber 1992) o en el infarto de miocardio (Opie 1976) cuya magnitud supera la capacidad de respuesta de los buffers intrínsecos.

Aunque la respuesta final sea la recuperación del  $\text{pH}_i$ , la contribución de cada transportador a tal efecto no es la misma. En tal sentido, mientras que el NBC registra una cinética lineal de flujo de  $\text{H}^+$  respecto al  $\text{pH}_i$ , el NHE presenta una actividad mucho mayor cuanto menor es el  $\text{pH}_i$  y alcanza un estado estacionario al llegar a valores de  $\text{pH}_i$  cercanos a 7.2 (Leem, Lagadic-Gossmann et al. 1999). El NHE es por un lado, el mayor extrusor de  $\text{H}^+$ , lo que lo convierte en el principal mecanismo transmembrana de regulación de  $\text{pH}_i$  (Frelin, Vigne et al. 1984; van Borren, Baartscheer et al. 2004) y por el otro una de las mayores rutas de ingreso de  $\text{Na}^+$  a la célula (Blatter and McGuigan 1991; Lagadic-Gossmann, Vaughan-Jones et al. 1992), lo que le otorga un papel fundamental en ciertos procesos patológicos (Karmazyn, Gan et al. 1999).

## II

### Caracterizando al intercambiador $\text{Na}^+/\text{H}^+$

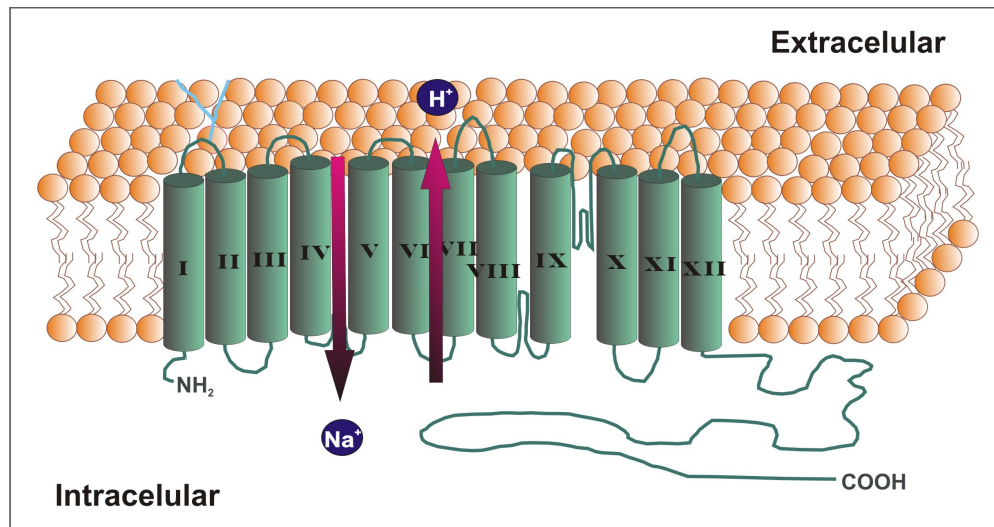
#### Familia NHE

El intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  es una glicoproteína transmembrana que acopla el eflujo de  $\text{H}^+$  al influjo de  $\text{Na}^+$  a favor de su gradiente (Bers, Barry et al. 2003) en una estequiometría electroneutra 1:1 ó 2:2 (Demaurex, Orlowski et al. 1995).

En mamíferos se han encontrado hasta ahora diez isoformas del intercambiador distribuidas tanto en sarcolema como en membranas de compartimentos intracelulares. De ellas, la isoforma 1, que presenta una gran conservación evolutiva y ubicuidad en los diferentes tipos celulares, es conocida como la isoforma *housekeeping* por su participación en la homeostasis celular, y por ser la única presente en el miocardio se la denomina isoforma cardíaca o “NHE1”, habiendo sido objeto de un intenso estudio por



parte de diversos autores en los últimos años. Las restantes isoformas poseen distribuciones tisulares mucho más acotadas: NHE2 y NHE3 en membranas apicales de células epiteliales de riñón e intestino, NHE4 mayormente en estómago y músculo esquelético, NHE5 en cerebro, músculo esquelético, bazo y testis, NHE6 a NHE9 en membranas organelares, particularmente, NHE6 en endosomas de reciclaje temprano, NHE7 y NHE8 en Golgi, NHE9 en endosomas de reciclaje tardío y NHE10 selectivamente en osteoclastos (Slepkov, Rainey et al. 2007; Lee, Kim et al. 2008). Aunque el presente trabajo focalizará en la caracterización del NHE1 que como se mencionó antes tal vez sea la isoforma más estudiada de todas, se sabe que el NHE3 juega también un rol preponderante en el transporte de  $\text{Na}^+$  en ciertos tejidos, principalmente en riñón. Es muy escasa en cambio la información que se tiene acerca de la función de las otras isoformas tisulares (NHE2, NHE4, NHE5, NHE10) y organelares (NHE6 a NHE9) (Brett, Wei et al. 2002).



**Figura 2. Representación esquemática del NHE1.** En ella pueden visualizarse los segmentos transmembrana, los loops intra y extra celulares y, asociado al primer loop, el residuo glicosilado; también el dominio citosólico, el sentido de transporte y los segmentos potencialmente involucrados en el mismo. Adaptado de Wakabayashi y cols (Wakabayashi, Pang et al. 2000).

El NHE1 tiene una masa predictiva de 91 KDa, aunque su masa molecular aparente es de 110 KDa, dado que se encuentra glicosilado. Estructuralmente y como se muestra en la **Figura 2**, tiene una longitud de 815 aminoácidos divididos en dos grandes dominios: un dominio de membrana que abarca los primeros 500 aminoácidos, necesario y suficiente para realizar el transporte iónico, cuya estructura se compone de doce segmentos  $\alpha$ -hélice transmembrana relacionados entre sí por conectores o *loops* extra e

intracelulares, entre los que se cuentan dos *loops* situados en el interior de la bicapa lipídica; y un dominio citosólico que comprende los aminoácidos restantes de la cola C-terminal (del 501 al 815) de función puramente regulatoria (Wakabayashi, Ikeda et al. 1997; Slepko, Rainey et al. 2007).

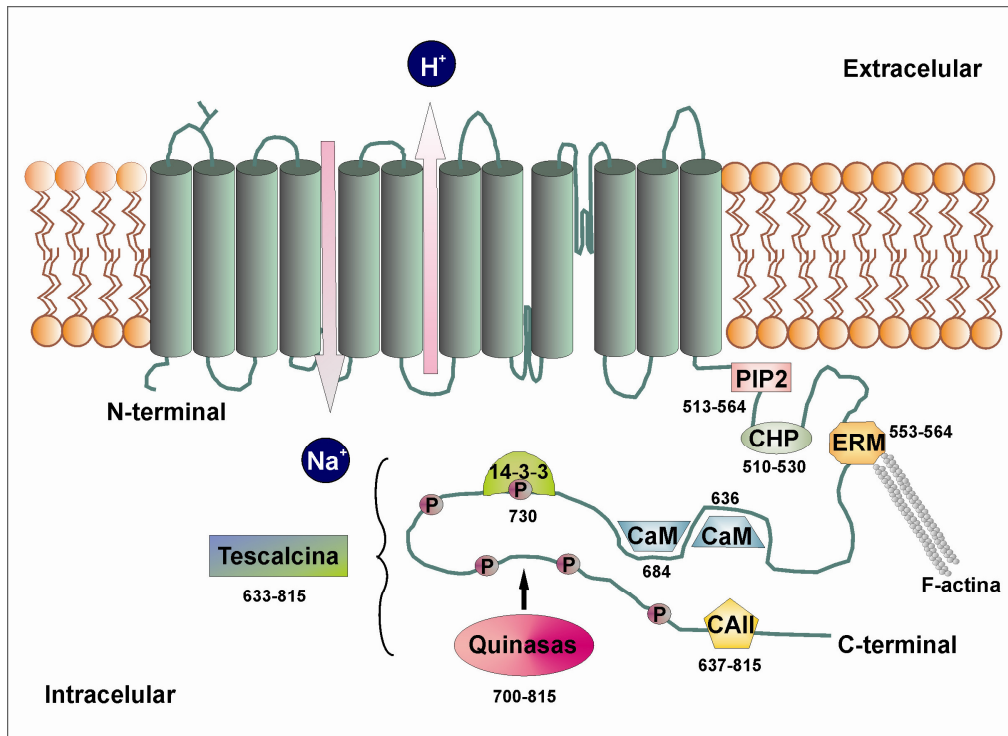
Dependiendo del tipo celular el NHE1 se ha encontrado localizado tanto en la membrana basolateral de células polarizadas epiteliales (Coupaye-Gerard, Bookstein et al. 1996), como también en discos intercalares cerca de la conexina 43 y túbulos transversos de cardiomiocitos (Karmazyn, Gan et al. 1999). Se ha sugerido además, que la ubicación intransarcolemal del intercambiador es en microdominios de membrana ricos en fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato, llamados balsas lipídicas o *lipid rafts* (Fuster, Moe et al. 2004).

## **NHE1: actividad y regulación**

El mayor estímulo para activar al NHE1 es la acidosis intracelular, para ello se vale de la energía proveniente del gradiente de  $\text{Na}^+$ , aunque la cinética respecto a la variación de concentración de los dos iones que transporta es diferente. Mientras que la dependencia de su actividad respecto de la concentración extracelular de  $\text{Na}^+$  persigue una relación hiperbólica y es saturable, la cinética respecto a su contraparte es mucho más compleja, el aumento intracelular de  $\text{H}^+$  no sólo no satura sino que provoca un aumento de su actividad, exhibiendo un coeficiente de Hill mayor a 2, lo que indicaría la existencia de más de un sitio intracelular de unión a  $\text{H}^+$  en el dominio de transmembrana (Putney, Denker et al. 2002; Cha and Noma 2009). De hecho ha sido sugerida la existencia de una región independiente del sitio de transporte, cuya presencia es crucial para la elevación del punto óptimo de funcionamiento del NHE a rango fisiológico y que permitiría una regulación alostérica de su funcionalidad a pHs bajos (Wakabayashi, Bertrand et al. 1994).

Su función principal es proteger a las células de la acidificación intracelular, por lo que no resulta sorprendente que dicha función sea regulada por muchos otros factores. En la región distal C-terminal, que comprende los aminoácidos 700 a 815, el NHE1 presenta numerosos residuos de Serina y Treonina como por ejemplo Ser 703, Thr 717, Ser 722, Ser 725, Ser 728, Ser770 y Ser771 (Fliegel and Karmazyn 2004), potencialmente fosforilables por quinasas en respuesta a acidosis sostenida (Haworth, McCann et al.

2003), estrés osmótico, neurotransmisores endógenos (Avkiran and Haworth 2003), hormonas (Slepkov, Rainey et al. 2007) o factores de crecimiento (Wakabayashi, Bertrand et al. 1994). Entre los mencionados sitios de fosforilación, Ser703, Ser770 y Ser771 han sido los más estudiados (Avkiran and Haworth 2003; Karki, Coccaro et al. 2010).



**Figura 3. Representación esquemática de los distintos tipos de regulación el NHE1 en el miocito cardíaco.** Junto a cada proteína regulatoria se puede observar la región aminoacídica en la que dicha regulación ocurre. Adaptado de Slepkov y col. (Slepkov, Rainey et al. 2007).

Se ha descrito fosforilación del NHE1 por la quinasa dependiente de calcio/Calmodulina II (CaMKII), la que interactúa con Nck (NIK), la que forma un espiral con la proteína Rho (p160ROCK), la proteína quinasa B (PKB) y de las quinasas activadas por mitógenos (denominadas MAPK): la regulada por señales extracelulares (MAPK ERK 1/2), la S6 ribosomal de 90KDa (p90<sup>RSK</sup>) y la activada por mitógenos p38 (p38 MAPK). El aumento del estado de fosforilación en esta región lleva generalmente a un corrimiento en la sensibilidad al pH; del sitio modificador a valores más alcalinos, volviéndolo más activo a estos pHs, aunque las interacciones con p38 (Kusuhara, Takahashi et al. 1998) y PKB (Snabaitis, Cuello et al. 2008) provocan una disminución de su actividad. Contrariamente, las fosfatasas como PP1 y PP2A son señaladas como

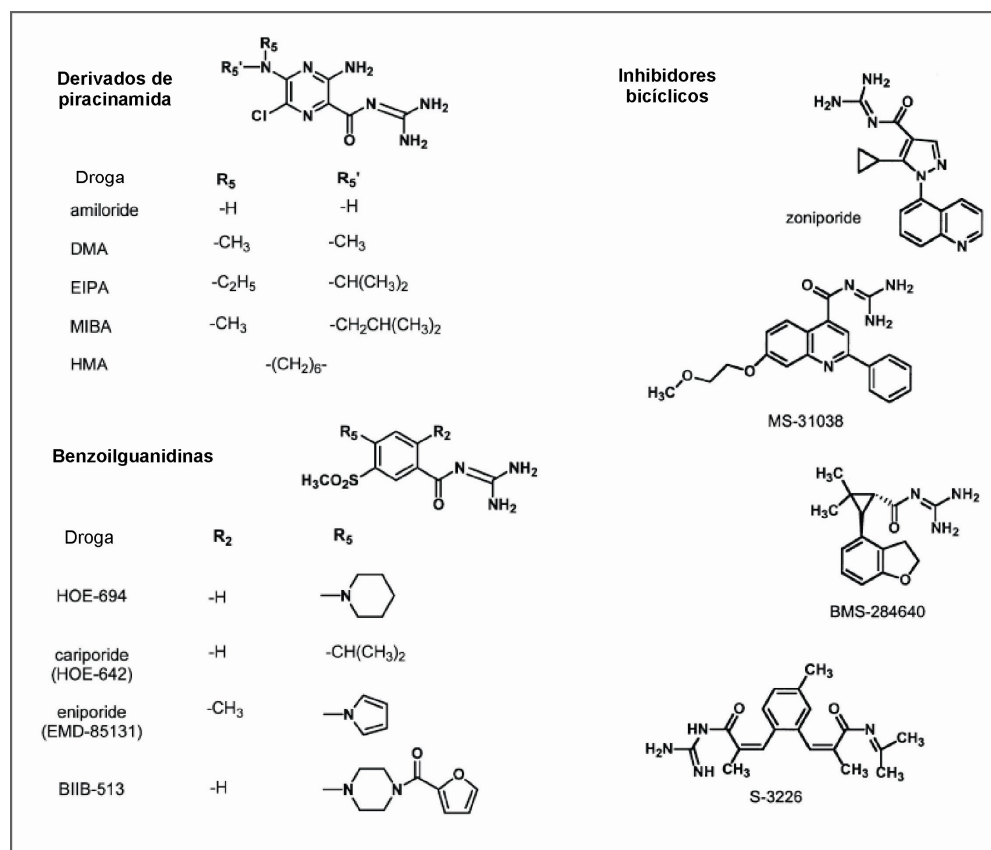
responsables de la desfosforilación de alguno de estos residuos generando obviamente una inhibición de la actividad del NHE1 (Misik, Perreault et al. 2005; Snabaitis, D'Mello et al. 2006).

La regulación de la actividad no involucra solamente reacciones de fosforilación/desfosforilación, sino que también coexisten entre los residuos que conforman la cola citosólica sitios de interacción con otras moléculas señal que al unirse al NHE1 pueden: 1) estimular su actividad como Calmodulina (CaM), proteína 1 homóloga a calcineurina B (CHP), Anhidrasa Carbónica II (CAII); 2) inhibirla, como tescalcina; 3) estabilizar su conformación activa como la proteína adaptadora 14-3-3, fosfoinositol difosfato (PIP2) y la proteína de choque calórico 70 (HSP70); o 4) cumplir funciones de anclaje como las proteínas asociadas a actina (ezrina, radixina y moesina: ERM) (Cingolani and Ennis 2007; Slepko, Rainey et al. 2007). En la **Figura 3** se evidencian justamente estas interacciones junto a los residuos aminoacídicos intervinientes en cada una de ellas.

## **Regulación de la actividad del NHE1 por inhibición farmacológica: amilorida y benzoilguanidinas**

El conocido diurético ahorrador de  $K^+$  amilorida, fue el primer bloqueante de la función del NHE1 en ser descrito, que presenta además efectos similares sobre el intercambiador  $Na^+/Ca^{+2}$  y los canales de  $Na^+$  (Benos 1982). La inhibición a la actividad contratrasportadora del NHE1 ocurre por unión competitiva al dominio de intrusión de  $Na^+$ , el cual se sitúa en parte en el cuarto segmento de transmembrana (TM4) (Counillon, Franchi et al. 1993; Wakabayashi, Pang et al. 2000), aunque también se ha visto que tanto amilorida como sus derivados pueden inhibir no competitivamente la translocación de iones del NHE1 (Paris and Pouyssegur 1983). Actualmente existe todo un grupo de inhibidores derivados de la doble sustitución alquímica en 5' de la estructura amilorida, como por ejemplo EIPA (5'-(N-etil-N-isopropil) amilorida), DMA (5'-N-dimetilamilorida) y MIBA (5'-(N-metil-N-isobutil) amilorida), en éstos se postuló que el potencial farmacóforo dentro de la estructura de amilorida responsable de la inhibición, es la porción aroilguanidina (Zhang, Lei et al. 2007). Todos ellos responden de manera similar respecto a la inhibición de las distintas isoformas de NHE, aunque

bajo las mismas condiciones experimentales NHE1 es ligeramente más sensible a amilorida y a sus derivados que las otras isoformas (Masereel, Pochet et al. 2003).



**Figura 4. Estructura de los principales inhibidores del NHE1.** Los de núcleo de piracinamida y a partir del descubrimiento del efecto de amilorida en la inhibición del transporte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, fueron los primeros en ser sintetizados. Las benzoilguanidinas, más selectivas por el NHE1 aunque menos potentes que las anteriores, fueron protagonistas de varios ensayos clínicos (véase más adelante). Finalmente y buscando más especificidad se sintetizaron las estructuras bicíclicas. Adaptado de Masereel y col (Masereel, Pochet et al. 2003).

Otro grupo de inhibidores lo constituyen las benzoilguanidinas, en las que el anillo de piracina de amilorida es reemplazado por un fenilo, el grupo 6-Cloro del mismo por un radical sulfometil y el grupo 2 amino eliminado o reemplazado por un metilo, perdiendo casi completamente la habilidad para inhibir al intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup> y bloquear canales de Na<sup>+</sup>. Entre ellas se pueden citar: HOE 694 (3-metilsulfonil, 4 piperidino benzoil metanosulfonato de guanidina), HOE 642 o “cariporide” (4-isopropil-3-metilsulfonilbenzoil metanosulfonato de guanidina), sabiporide y eniporide (EMD 96785). Estos inhibidores, mucho más selectivos por la isoforma 1 y por ende con mayores probabilidades de aplicación, presentan menor potencia inhibitoria sobre el NHE1 que los respectivos derivados de amilorida (Scholz, Albus et al. 1993), razón por

la cual se han sintetizado estructuras mucho más complejas conservando el núcleo benzoilguanidina para aumentarla (Xu, Jin et al. 2009).

Últimamente, se han diseñado otras moléculas basadas en una estructura bicíclica, como por ejemplo: zoniporide (CP-597,396), SM-20220, TY12533 y BMS-284640, estos son más selectivos por NHE1 que los derivados de amilorida, aunque el hecho que no resulten tan selectivos respecto a canales de  $\text{Na}^+$  (Liu and Somps 2008) les resta aplicabilidad terapéutica. En la **Figura 4** se muestran los grupos estructurales de los distintos tipos de inhibidores y sus modificaciones.

Más adelante se verá que los resultados obtenidos con el empleo de los inhibidores del NHE1 en variados modelos experimentales de patologías cardíacas en animales derivaron en ensayos clínicos, como base de prueba para futuros tratamientos de patologías cardiovasculares y que, aún los más selectivos, con la suficiente potencia inhibitoria como para anular su función en el tejido buscado y con una excelente biodisponibilidad para permitir concentración adecuada en el mismo, no han podido demostrar ser tan exitosos clínicamente como lo fueron experimentalmente. Es por ello que la caracterización funcional del NHE1 como así también, la ruta para llegar a la modulación de su actividad en condiciones patológicas continúa siendo un desafío de sumo interés en investigación cardiológica.

## **Funcionalidad. Mucho más que una extrusión de $\text{H}^+$**

La mayor y más importante de las funciones del NHE1 es, como se mencionó antes, el mantenimiento del  $\text{pH}_i$ , previniendo a la célula de las consecuencias de una acidificación sostenida. Es importante recordar que el NHE1, es la isoforma de más amplia distribución y a raíz de su ubicuidad se vislumbra su importancia como regulador de la acidez intracelular no sólo en miocitos cardíacos (que son los involucrados en nuestro trabajo) sino también en otros tipos celulares.

Su actividad se relaciona además directa o indirectamente a otras funciones celulares. Se comprobó su participación en la proliferación celular, la cual resulta inhibida en células deficientes en NHE1, en la regulación del volumen celular mediante la regulación del influjo de  $\text{Na}^+$  e indirectamente del flujo osmótico de agua, en el crecimiento y progresión del ciclo celular al promover indirectamente la transición entre las fases G2 y M, en la diferenciación y cambios en el estado funcional como es la

participación en procesos apoptóticos (Malo and Fliegel 2006; Slepko, Rainey et al. 2007). Aunque no está claro el rol que cumple en apoptosis pareciera depender del tipo celular, habiéndose descrito cosas tan disímiles como la activación de vías apoptóticas por inhibición del NHE1 y el aumento de sensibilidad a agentes quimioterápicos como cisplatino y paclitaxel en células de cáncer de mama (Reshkin, Bellizzi et al. 2003), colon (Rebillard, Tekpli et al. 2007) y leucemia (Rich, Worthington-White et al. 2000); así como también la promoción de supervivencia en células del riñón por alcalinización y regulación del volumen celular, acciones derivadas de la actividad del NHE1 (Schelling and Abu Jawdeh 2008); y de manera contrapuesta, inducción de apoptosis en miocitos de arteria pulmonar (Yao, Qian et al. 2002) y en miocardio donde se ha visto que los inhibidores del NHE1 previenen apoptosis y preservan el estado metabólico (Karmazyn, Gan et al. 1999), reduciendo los marcadores de muerte celular y el desbalance en los niveles de  $Ca^{+2}$  intracelular, conocida señal disparadora de apoptosis, tras estrés oxidativo (Teshima, Akao et al. 2003).

Por otra parte, por hallarse relacionado a proteínas de la familia de ezrina, radixina y moesina (proteínas asociadas a actina) está involucrado en el anclaje del citoesqueleto cortical a la membrana plasmática, en la regulación de la organización del mismo y en los procesos de migración y adhesión focal que de esta estructura celular dependen (Putney, Denker et al. 2002).

Por último, es importante mencionar que aunque está probada su relación con la regulación del volumen celular, se ha visto que la relación del NHE1 con la membrana en la que se encuentra inserto va más allá de la simple “contención”; de hecho el intercambiador presenta mecanosensibilidad, de modo que su actividad puede afectarse por deformación de la membrana plasmática, ya sea por cambios en el volumen celular (Pederson, Varming et al. 2002), como por estiramiento (Cingolani, Perez et al. 2005), como también por cambios en la composición lipídica de la misma (Fuster, Moe et al. 2004).

# III

## Hiperactividad del NHE1

### Un villano oculto

Si bien su actividad fundamental denota una función protectora de la célula frente a una disminución de pH que podría alterar la funcionalidad enzimática, la estabilidad proteica y otros procesos celulares, su sobreestimulación puede dar lugar a procesos deletéreos devenidos de la acidificación extracelular, de la sobrecarga intracelular de  $[Na^+]$  o incluso de  $[Ca^{+2}]$  producido a consecuencia de cambios en el modo de funcionalidad del intercambiador  $Na^+/Ca^{+2}$  (Bers, Barry et al. 2003).

Es precisamente su probada participación en diversas patologías cardíacas aunque también en cerebrales e incluso en cáncer, lo que mantiene vigente el interés por describir los caminos que conducen a la sobreactivación del NHE1 y las maneras de inhibirlo sin perjudicar otras funciones celulares. Dicho de otro modo, el desafío pareciera ser desentrañar a partir de qué señales es que esta proteína fisiológicamente benévola muestra una faceta de villano.

En los siguientes apartados haremos un brevísimo resumen de los antecedentes que existen respecto a la hiperactividad del NHE1 en cáncer y las patologías cerebrales, y nos explayaremos un poco más en las patologías del miocardio debido a que el tema está íntimamente ligado al proyecto de investigación que guió el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

### Cáncer

Aunque no es un tema que abordaremos en profundidad, describiremos algunos aspectos salientes del mismo. La inhibición del NHE1 ha sido reconocida como un promisorio blanco terapéutico en el tratamiento antineoplásico dado el rol crítico que dicho intercambiador ocupa en el crecimiento y locomoción celular dirigida (Stock and Schwab 2006), la alcalinización intracelular que diversos tumores sólidos evidencian para evolucionar hacia la malignidad y la acidificación del microambiente extracelular



de las células tumorales que lleva a invasibilidad y consecuentemente a metástasis (Izumi, Torigoe et al. 2003; Stuwe, Muller et al. 2007). En concordancia, se ha demostrado que en cáncer de mama, el receptor CD44, expresado en la mayoría de las células tumorales que regula la adhesión, proliferación y migración de las mismas como así también la angiogénesis del tumor en crecimiento, promueve la activación del NHE1 y a partir de allí genera la acidificación extracelular necesaria para estimular proteasas como catepsina B y promover la invasión tumoral a otros tejidos (Bourguignon, Singleton et al. 2004).

## **Patologías cerebrales**

En el daño por isquemia/reperfusión en cerebro se ha descrito una mayor actividad del NHE1 en astrocitos corticales post isquémicos cultivados, consecuencia de una activación de p90<sup>RSK</sup> (Luo, Kintner et al. 2007) y la subsiguiente fosforilación del NHE1 en el residuo Ser 703 durante la reperfusión temprana (Manhas, Shi et al. 2010). Por otro lado, se ha propuesto la participación del NHE1 en cuadros epilépticos, fundamentada en la modulación de la actividad eléctrica de neuronas corticales ejercida por los protones libres que dicho intercambiador transporta, y evidenciada a través de la protección anticonvulsivante lograda por su inhibición en modelos experimentales (Ali, Ahmad et al. 2004).

## **Patologías cardíacas**

En corazón, el NHE1 es responsable de aproximadamente el 50% del eflujo de H<sup>+</sup> y si bien es vital su importancia en el mantenimiento del pH<sub>i</sub>, se ha descrito también una activa participación en patologías cardíacas como infarto de miocardio, hipertrofia e insuficiencia cardíaca (Malo and Fliegel 2006), en las que la acumulación de Na<sup>+</sup> intracelular que su hiperactividad acarrea sería el principal disparador de los efectos deletéreos. La actividad exacerbada del NHE1 se ha vinculado de manera muy estrecha al desarrollo de patologías que se caracterizan por un anormal crecimiento del tejido, en particular el remodelamiento post-infarto de miocardio y el desarrollo de hipertrofias cardíacas de distinto origen (Fliegel and Karmazyn 2004). Esto ha disparado en los últimos años una intensa investigación dirigida a la caracterización de los mecanismos

de regulación de este intercambiador, en muchos casos como paso previo a la elaboración de estrategias terapéuticas dirigidas a prevenir su hiperactividad y por ende sus consecuencias fisiopatológicas. Actualmente, la activación del intercambiador por fosforilación pareciera ser clave en el desarrollo de estos procesos patológicos (Wakabayashi, Fafournoux et al. 1992; Fliegel and Karmazyn 2004; Misik, Perreault et al. 2005; Snabaitis, D'Mello et al. 2006), por lo que la dilucidación precisa de sus mecanismos podría tener importantes implicancias. Es más, el estudio de las patologías cardíacas haciendo uso de variados modelos experimentales permitió dilucidar no sólo la importancia del NHE1 en las mismas, sino también describir diversas rutas de señalización que llevan a su activación tanto en condiciones normales como patológicas (Karmazyn, Gan et al. 1999; Fliegel and Karmazyn 2004). De todas las quinasas que describimos como punibles de fosforilar a la cola citosólica del intercambiador, las más ampliamente relacionadas a este tipo de eventos han sido las de la familia de ras/MEK/ERK (Kusuhara, Takahashi et al. 1998; Avkiran and Haworth 2003; Haworth, McCann et al. 2003; Karki, Coccaro et al. 2010).

Como ya es conocido, el intercambiador es fosforilado y por ende activado en respuesta a hormonas y factores de crecimiento (Sardet, Counillon et al. 1990; Sardet, Fafournoux et al. 1991; Wakabayashi, Bertrand et al. 1994; Fliegel and Karmazyn 2004), algunos de ellos como angiotensina II (Ang II) o endotelina 1 (ET1) han sido señalados como propagadores de estas rutas de señalización vinculadas a procesos patológicos como el remodelamiento (Berk, Aronow et al. 1987; Fliegel and Karmazyn 2004; Cingolani, Perez et al. 2005). Sin embargo experimentos realizados por Haworth y col. en 2003 (Haworth, McCann et al. 2003) han demostrado que el sostenimiento en el tiempo de la acidosis es por sí mismo causa de fosforilación del NHE1.

El hecho de que muchas patologías del miocardio involucren durante su desarrollo el mantenimiento de acidosis intracelular por largos períodos de tiempo (procesos de isquemia/reperfusión, infarto de miocardio, etc.) hace pensar que la activación por fosforilación del NHE1 sería un proceso mucho más frecuente de lo que se cree, poniendo de manifiesto la necesidad de caracterizar estas rutas de activación de un modo más preciso, tanto en lo que se refiere a los intermediarios que participan de las mismas como al perfil de actividad del intercambiador en función del tiempo de duración de la acidosis. Por otra parte, las fosfatasas, principalmente PP1 y PP2A, contrarrestan el efecto de las quinasas condicionando el nivel final de fosforilación del intercambiador (Misik, Perreault et al. 2005; Snabaitis, D'Mello et al. 2006) y por ende

su función, de modo que la caracterización de su acción es un elemento importantísimo a considerar como reguladores funcionales del NHE1.

Muchos investigadores, en modelos animales completamente distintos (in vivo o ex vivo), han aportado evidencias contundentes que involucran a la activación del NHE1 en los procesos deletéreos que suceden luego de eventos isquémicos, como así del mejoramiento que su inhibición produce en la función contráctil, la contractura post isquemia, el tamaño del infarto, la hipertrofia del tejido vivo remanente y la respiración mitocondrial (Garcia-Dorado, Gonzalez et al. 1997; Miura, Ogawa et al. 1997; Linz, Albus et al. 1998; Javadov, Choi et al. 2008). Por otra parte, la hiperactividad del NHE1 no es un hito que se vincula solamente con isquemia y/o infarto de miocardio. De hecho, como se mencionó antes tanto los efectos deletéreos de su hiperactividad como las ventajas de su inhibición se han descripto en diversas patologías cardíacas que se caracterizan por un anormal crecimiento celular (Camilion de Hurtado, Portiansky et al. 2002; Ennis, Escudero et al. 2003; Aker, Snabaitis et al. 2004; Baartscheer, Schumacher et al. 2005; Nakamura, Iwata et al. 2008), resultados que han permitido pensar en la inhibición del NHE1 como una posible herramienta terapéutica antihipertrófica (Cingolani and Camilion de Hurtado 2002) además de cardioprotectora como veremos la siguiente sección.

## **IV**

### **Del laboratorio al paciente**

#### **Cuando no todo es lo que parece**

Como adelantamos, resultados como los obtenidos en diferentes modelos animales alentaron la realización de ensayos clínicos empleando inhibidores del NHE1. El primero de ellos se denominó GUARDIAN (GUARD During Ischemia Against Necrosis: Protección contra la necrosis durante la isquemia), fue un ensayo randomizado, aleatorizado y doble ciego que empleó como droga tratante cariporide comparando sus efectos contra placebo. El estudio que se diseñó teniendo en cuenta algunos resultados preliminares, en los cuales se administró de manera segura a un

pequeño grupo de pacientes que fueron sometidos a cirugía de válvula aórtica y bypass como también a pacientes sometidos a revascularización tras infarto envolvente anterior, tenía como fin evaluar el potencial de cariporide para prevenir necrosis del tejido cardíaco en 11590 pacientes en situaciones que determinan isquemia miocárdica: angina inestable, infarto de miocardio sin elevación del segmento ST, intervención coronaria percutánea y bypass coronario (Theroux, Chaitman et al. 2000). De las 3 dosis utilizadas, sólo los pacientes que recibieron la dosis más alta (120mg) experimentaron una reducción del 10% en el primer punto final determinado como infarto o muerte a los 36 días, respecto al grupo que recibió placebo, aunque el porcentaje de muertes se mantuvo constante en los 4 grupos y no hubo diferencias significativas en la evaluación final a los 6 meses del evento cardiovascular (Chaitman 2003). Desglosando los resultados por subgrupo de intervención, en el subgrupo angina inestable e infarto de miocardio sin elevación del segmento ST no hubo cambios significativos respecto al placebo con ninguna de las 3 dosis, en el subgrupo intervención coronaria percutánea se obtuvo una reducción de la mortalidad en un 23 % con la dosis más baja (20mg) sin cambios respecto al grupo placebo a dosis superiores, mientras que en el subgrupo de este estudio comprendido por los pacientes sometidos a bypass coronario, la mayor dosis de cariporide produjo una reducción del 25% en el punto final (Theroux, Chaitman et al. 2000). Si bien los resultados no estuvieron a la altura de las expectativas, uno de los cuestionamientos que surgieron tras su análisis fue si tal vez la dosis de cariporide no fue la suficiente teniendo en cuenta el daño tisular que se produce en las intervenciones como bypass coronario.

En otro estudio clínico, esta vez de fase II, denominado ESCAMI (Evaluation of the Safety and Cardioprotective effects of eniporide in Acute Myocardial Infarction: Evaluación de la seguridad y efectos cardioprotectores de eniporide en infarto agudo de miocardio), en el cual se empleó como droga inhibidora del NHE1 a eniporide, en 4 concentraciones diferentes, en pacientes sometidos a terapia trombolítica o angioplastia primaria por infarto agudo de miocardio con elevación de ST (Zeymer, Suryapranata et al. 2001), no se pudieron demostrar diferencias significativas entre los grupos tratados y el grupo placebo respecto a incidencia de muerte, infarto, arritmias, shock cardiogénico o tamaño de infarto medido como liberación de enzimas cardíacas.

Más recientemente y teniendo en cuenta algunas fallas del estudio GUARDIAN, se diseñó y llevó a cabo el estudio EXPEDITON (sodium-hydrogen Exchange inhibition to Prevent coronary Events in acute cardiac conDITIONs: Inhibición del intercambiador

sodio-hidrógeno para prevenir eventos coronarios en condiciones cardíacas agudas) empleando como droga nuevamente a cariporide en una dosis mayor a la máxima empleada en GUARDIAN (esta vez 180 mg) en pacientes sometidos a bypass coronario. En EXPEDITION se obtuvo una reducción satisfactoria del punto final definido como muerte o infarto a los 5 días, aunque paradójicamente mientras la tasa de infarto se vio reducida, la de muerte posterior a los 5 días se vio aumentada en el grupo que recibió cariporide respecto al que recibió placebo y este incremento se debió a una mayor incidencia de accidentes cerebrovasculares (ACVs), motivo por el cual el estudio debió finalizarse tempranamente (Mentzer, Bartels et al. 2008).

La poca trascendencia de los resultados obtenidos respecto a las expectativas que se habían generado a su alrededor motivó que algunos investigadores hayan puesto en tela de juicio los cambios en el  $\text{Na}^+$  intracelular durante los procesos de isquemia y reperfusión y la relevancia relativa del NHE1 en ellos, aunque no es justificable pasar por alto los resultados obtenidos a lo largo de los años en tan diversas condiciones experimentales y en preparados y especies animales distintas (Murphy and Allen 2009). Los beneficios de su inhibición en pacientes sometidos a bypass coronario, son mucho más firmes estadísticamente en cuanto a la reducción de la incidencia de muerte o infarto post intervención pero la falta de cardioprotección consistente en todos los otros grupos de pacientes lleva a cuestionarse si los modelos animales no fueron demasiado simplistas o si el fármaco no debió haber sido administrado previo a la intervención isquémica (Murphy and Allen 2009).

De todas maneras y tal vez pensando en la falla de los estudios clínicos con inhibidores del NHE1 para demostrar efectividad a largo plazo, resulta interesante notar que la administración de inhibidores del NHE1 se realizó por intervalos cortos de tiempo mientras el monitoreo de los pacientes se continuó por 6 meses, tiempo suficiente para inducir en el miocardio una variación en la expresión del NHE1 que empeore las condiciones del paciente en recuperación, pensamiento que se sustenta en el hecho de que la inhibición sostenida del NHE1 empleando cariporide promueve en corazones de ratas una *upregulation* en la expresión del intercambiador (Camilion de Hurtado, Ennis et al. 2002).

Es evidente que la inhibición del NHE1 es plausible de ser considerada una estrategia terapéutica en eventos isquémicos cardíacos, tal vez haya que replantearse si una inhibición total de su función a nivel general es la herramienta más útil. En tal sentido, el hecho de que los compuestos usados eliminen plenamente la función del NHE1, sin

discriminar entre la importantísima función homeostática basal o *housekeeping* y la indeseada hiperfunción detectada en procesos fisiopatológicos podría ser la causa de la disparidad de efectos provocados por estos fármacos en los estudios clínicos. En este marco, se podría especular que la fosforilación del NHE1 e inducción de mayor actividad son mecanismos ligados al disparo de procesos patológicos por liberación de hormonas u otros factores como factor de crecimiento epidérmico (Coaxum, Garnovskaya et al. 2009), Ang II (Berk, Aronow et al. 1987), ET1 (Perez, Villa-Abrille et al. 2003), aldosterona (Ebata, Muto et al. 1999) y/o al sostenimiento de acidosis intracelular por un cierto tiempo crítico para que ello ocurra, en tanto que la función *housekeeping* sería beneficiosa y sólo dependería de la actividad como sensor a los cambios de concentración de  $H^+$  como resultado del normal metabolismo (sin intervención de fosforilación alguna) que presentan ciertas regiones de dicho intercambiador (Wakabayashi, Fafournoux et al. 1992). En este nuevo escenario, pareciera claro que el desafío futuro de los investigadores sería la búsqueda de alternativas terapéuticas que involucren el control de la función exacerbada del NHE1 sin alterar su actividad basal. Para ello, la identificación precisa de sus rutas de fosforilación pareciera jugar un rol fundamental no sólo desde la importancia de conocer acabadamente su función, sino porque dejaría abierta la posibilidad de que la inhibición de los intermediarios de fosforilación sea el nuevo blanco terapéutico como ya se ha sugerido para el caso de la injuria por isquemia/reperfusión (Maekawa, Abe et al. 2006).

## V

### **Inhibición de la fosforilación del NHE1**

#### **En busca de un nuevo eje terapéutico**

Como se dijo en un apartado anterior, las fallas en los ensayos clínicos dadas principalmente por la aparición de efectos adversos de alto riesgo y la falta de beneficios claros en los pacientes tratados con inhibidores específicos del NHE1, nos llevan a pensar que la función basal del intercambiador como regulador del  $pH_i$

resultaría indispensable para las células e insustituible por otro transportador iónico tras la inhibición del mismo y por lo tanto no sería una ruta de elección apropiada. Aquí es donde la modulación de la actividad del NHE1 adquiere relevancia. Una de ellas y la primera en ser ensayada fue la modulación por fosforilación.

Ya hemos mencionado que la actividad del NHE1 se ve sensiblemente alterada cuando su cola citosólica es sometida a fosforilación por alguna de las quinasas intracelulares que lo reconocen como blanco, principalmente ERK 1/2 y p90<sup>RSK</sup>, las que a su vez son activadas por diversos estímulos como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y acidosis sostenida (Sabri, Byron et al. 1998; Wei, Rothstein et al. 2001; Haworth, McCann et al. 2003). En este marco la inhibición de la activación de dichas quinasas sería una posible herramienta terapéutica a considerar como lo demostraron Maekawa y col. en un modelo de injuria por isquemia/reperfusión (Maekawa, Abe et al. 2006). Cabe citar que estas enzimas normalmente son activadas a través de una cascada específica de fosforilaciones entre las quinasas que conforman la familia, puntualmente para el caso de la MAPK ERK y de una manera simplificada, su quinasa activadora se denomina MEK y ésta se activa por fosforilación a través de la acción de Raf-1, a su vez la fosforilación en serina/treonina que ERK produce sobre p90<sup>RSK</sup> es responsable de su activación convirtiendo a esta quinasa en el mediador último de la mayoría de sus acciones intracelulares (Seeger and Krebs 1995). Además, la acción de estas enzimas se halla vinculada estrechamente al estrés oxidativo celular, en muchos tejidos se ha encontrado una activación de la presente vía de señalización desencadenada por las especies reactivas del oxígeno (Gumina, Mizumura et al. 1998) ya sea debido a una sobredimensión patológica de las mismas (Zhang, Shan et al. 2003; de Bernardo, Canals et al. 2004), como en respuesta a un agente extracelular lesivo (Yamakawa, Tanaka et al. 2002; Ruiz-Ramos, Cebrian et al. 2005), como también participando en la normal diferenciación celular (O'Flaherty, de Lamirande et al. 2005). Es más en lo que respecta al NHE1 a nivel cardíaco existen vinculaciones entre los ROS y una aumentada función del intercambiador mediada por ERK1/2 (Snabaitis, Hearse et al. 2002; Caldiz, Garcarena et al. 2007). A partir de esto se abre un gran abanico de posibilidades en lo que respecta a la regulación de la vía que culminaría en la activación del NHE1.

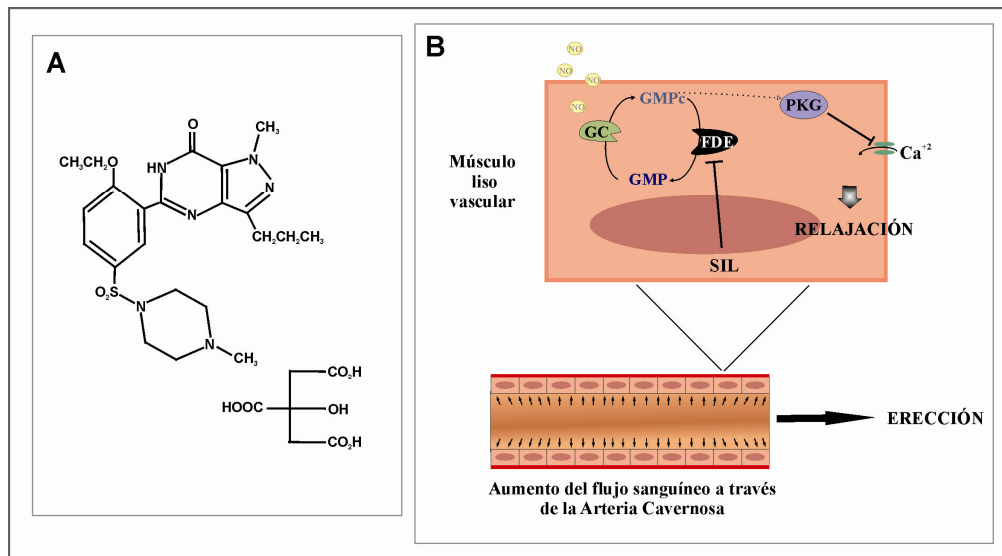
Con estas premisas en consideración, en la siguiente sección introduciremos una ruta de señalización que involucra la activación de proteína quinasa G (PKG) y constituye el eje sobre el cual gira el desarrollo experimental que sustenta el presente trabajo de Tesis Doctoral.

# VI

## GMPcíclico y PKG, recorriendo el camino inverso

### Sildenafil, un fármaco conocido

Sildenafil citrato (SIL) es la denominación que recibe el citrato de 1-[[3-(6,7-dihidro - 1 - metil- 7 - oxo -3 - propil - 1 Hpirazol [ 4 , 3 - d ] pirimidin-5-il)-4-etoxifenil]sulfonyl]-4-metilpiperacina, un fármaco vasodilatador que está actualmente en el mercado empleándose para el tratamiento de la disfunción eréctil, a pesar que su desarrollo original haya sido como terapia antianginosa (Jackson, Montorsi et al. 2006). Es un inhibidor específico y potente de la fosfodiesterasa 5 A (PDE5A), enzima encargada de hidrolizar el enlace éster de Guanina Monofosfato cíclico (GMPc) y por lo tanto disminuir los niveles citoplasmáticos del mismo.



**Figura 5. Estructura y mecanismo de acción de SIL adaptado de la publicación de Rotella (Rotella 2002) en el tratamiento de la disfunción eréctil. A) Estructura de SIL, como sal citrato. B) Representación esquemática del mecanismo en células de músculo liso vascular de la arteria cavernosa y sus ramificaciones. SIL inhibe a la PDE5A, encargada de degradar el GMPc, prolongando su acción intracelular. El GMPc activa a una proteína quinasa (PKG) responsable de sus acciones, entre ellas un menor ingreso de Ca<sup>2+</sup>, el resultante es una relajación del músculo liso. A raíz de ello aumenta el flujo sanguíneo a través de dicha arteria aumentando consecuentemente la presión en el espacio cavernoso y manteniendo la erección.**



En el caso de la disfunción eréctil, y como se muestra en la **Figura 5B**, la inhibición de la PDE5A aumenta el GMPc prolonga su acción como mediador de los efectos del óxido nítrico (NO) en el cuerpo cavernoso del pene, provocando un aumento en la relajación del músculo liso vascular, puntualmente de las arterias cavernosas y sus ramificaciones, con el consecuente aumento del flujo sanguíneo al espacio cavernoso, transmisión de la presión arterial al mismo y prolongación de la erección (Cheitlin, Hutter et al. 1999). Se ha determinado que estas acciones del GMPc son principalmente debidas a la activación de una quinasa dependiente de cGMP, denominada PKG (Kass, Champion et al. 2007).

## **Efectos inesperados y nuevos mecanismos probables de acción**

En pacientes con hipertensión pulmonar, el tratamiento con SIL oral ha demostrado ser de utilidad cuando se adiciona a un tratamiento inhalatorio o endovenoso preestablecido (con iloprost en el primer caso y epoprostenol en el segundo) (Wilkins, Guth et al. 2001; Stiebellehner, Petkov et al. 2003), básicamente debido a su acción vasodilatadora. Aún así tras su aprobación y comercialización surgieron reportes acerca de la incidencia de arritmias, muerte súbita y ACVs, causas que motivaron una investigación más exhaustiva acerca de los efectos fisiológicos a nivel cardíaco que pudiera tener dicho fármaco (Shinlapawittayatorn, Chattipakorn et al. 2005).

A raíz de los casos de arritmias reportados, muchos laboratorios intensificaron el estudio de los efectos del SIL sobre el cardiomiocito arribando a conclusiones disímiles. Mientras Geelen y col. han sugerido que actuaría como inhibidor de la corriente rectificadora de  $K^+$  ( $K_r$ ) (Geelen, Drolet et al. 2000), Chai y col. postularon que sus acciones sobre la corriente de  $K^+$  se deberían a una inhibición de los canales de  $K^+$  dependientes de ATP mediada por PKG (Chai, Zhang et al. 2011). Por su parte, Chiang y col. mostraron un efecto inhibitorio sobre canales de  $Ca^{+2}$  tipo L operados por voltaje, reduciendo el flujo de  $Ca^{+2}$  a través de éstos (Chiang, Luk et al. 2002), mientras que Koitabashi y col. atribuyen el efecto de la vía GMPc/PKG sobre el  $Ca^{+2}$  citosólico a la inhibición de otros canales de  $Ca^{+2}$  denominados TRPC (Koitabashi, Aiba et al. 2009).

## **Ruta cardiovascular, una aplicación posible?**

En el tejido cardíaco, la vinculación del SIL con la inactivación de corrientes de  $\text{Ca}^{+2}$  y la consecuente inhibición de la vía que por acción de Calcio/Calmodulina desencadena la transcripción de factores pro apoptóticos impulsados por NFAT (Fiedler, Lohmann et al. 2002) ha permitido postular la existencia de un posible rol terapéutico de dicho fármaco en injuria por isquemia y reperfusión. En efecto, se ha comprobado cardioprotección impulsada por SIL en experimentos de isquemia y reperfusión en corazones aislados (Das, Maulik et al. 2002), como in vivo en ratas sometidas a infarto (Perez, Piaggio et al. 2007). Además, experimentos recientes han demostrado su efectividad tanto en la restitución de la función normal cardíaca y función microvascular post infarto (Reffellmann and Kloner 2003), como en el manejo del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular post hipertrofia, aún administrado luego de desencadenados los procesos de remodelamiento (Nagayama, Hsu et al. 2009). Puntualmente, experimentos de nuestro laboratorio, han mostrado evidencias que la inhibición de la PDE5A empleando SIL en corazones de rata previamente sometida a infarto, previene el remodelamiento inducido por el mismo, mejora la función cardíaca del corazón infartado y deprime casi por completo la actividad del NHE1 en respuesta a acidosis sostenida sin afectar el pH basal, siendo esta inhibición enteramente dependiente de la actividad de PKG (Perez, Piaggio et al. 2007). Uno de los aspectos más interesantes de este hallazgo y que nos estimuló a profundizar su estudio es que PKG a pesar de de inhibir al NHE1 no parece alterar su función homeostática basal (Perez, Piaggio et al. 2007), por lo que desde el punto de vista de su potencial uso terapéutico reuniría las propiedades ideales para un inhibidor del NHE1. Es importante destacar que la vinculación entre la activación de la ruta GMPc/PKG y el NHE se ha demostrado anteriormente para el NHE3 en distintas líneas celulares (Gill, Saksena et al. 2002; Cha, Kim et al. 2005) y en células mesangiales de rata (Schulte, Hohendahl et al. 1999), en las que los autores postulan que la isoforma afectada sería la isoforma 1, basándose en experimentos de RT-PCR sin estudiar expresión proteica.

En resumen y como se mencionó en un apartado anterior, se sabe desde hace tiempo que el NHE1 juega un papel fundamental en la fisiología y fisiopatología del miocardio, En estos procesos la activación por fosforilación del intercambiador pareciera ser clave. Por otro lado, en los últimos años han aparecido trabajos que muestran que la estimulación

de la ruta GMPc/PKG determina un efecto antihipertrófico tanto en miocardio adulto (Fiedler, Lohmann et al. 2002; Takimoto, Champion et al. 2005; Perez, Piaggio et al. 2007) como en neonato (Calderone, Thaik et al. 1998). Entonces, si GMPc/PKG es capaz de inhibir al NHE1 y además previene el desarrollo de la hipertrofia cardíaca pareciera razonable suponer que estos efectos estén ligados entre sí. En otras palabras, se podría especular que al menos una parte de los efectos antihipertroficiantes de la activación de la ruta GMPc/PKG podrían estar mediados por su acción sobre el NHE1 como hemos sugerido en nuestro trabajo previo (Perez, Piaggio et al. 2007), lo cual podría tener importantes implicancias terapéuticas. Una vez más, la caracterización precisa de las vías de fosforilación del NHE1 y de los efectos que sobre la misma ejerce la activación de la ruta GMPc/PKG será fundamental para conocer más sobre la fisiología del intercambiador y para poder explotar las potencialidades clínicas de los inhibidores de PDE5A. Dado que no existían estudios directos y completos en ningún modelo celular que caractericen esta ruta de señalización, propusimos el estudio de la misma como el objetivo principal del presente trabajo de Tesis Doctoral.

## **OBJETIVOS**

En virtud de lo expuesto anteriormente planteamos la hipótesis de que la activación de la ruta GMP cíclico/PKG inhibe al NHE1 por alteración de su estado de fosforilación. Para probar dicha hipótesis planeamos caracterizar inicialmente la regulación del NHE1 por fosforilación, recurriendo a protocolos de acidosis transitorias y sostenidas, para luego poner especial énfasis en la caracterización de la ruta GMPc/PKG.

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivos específicos:

- Caracterizar la actividad del NHE1 en papilares aislados en función de la duración de la acidosis para poder determinar o no la existencia de un perfil de activación.
- Caracterizar la actividad del NHE1 en presencia del inhibidor de la fosfodiesterasa 5A (Sildenafil) y establecer la relación existente entre el aumento de la actividad de PKG y la actividad del intercambiador.
- Determinar la inferencia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos ERK1/2, p90<sup>RSK</sup> y p38 y las fosfatasas en la vía de señalización que conduce a la activación del NHE1 en acidosis y establecer si fuera posible una vinculación con PKG.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## VII

### Materiales de trabajo

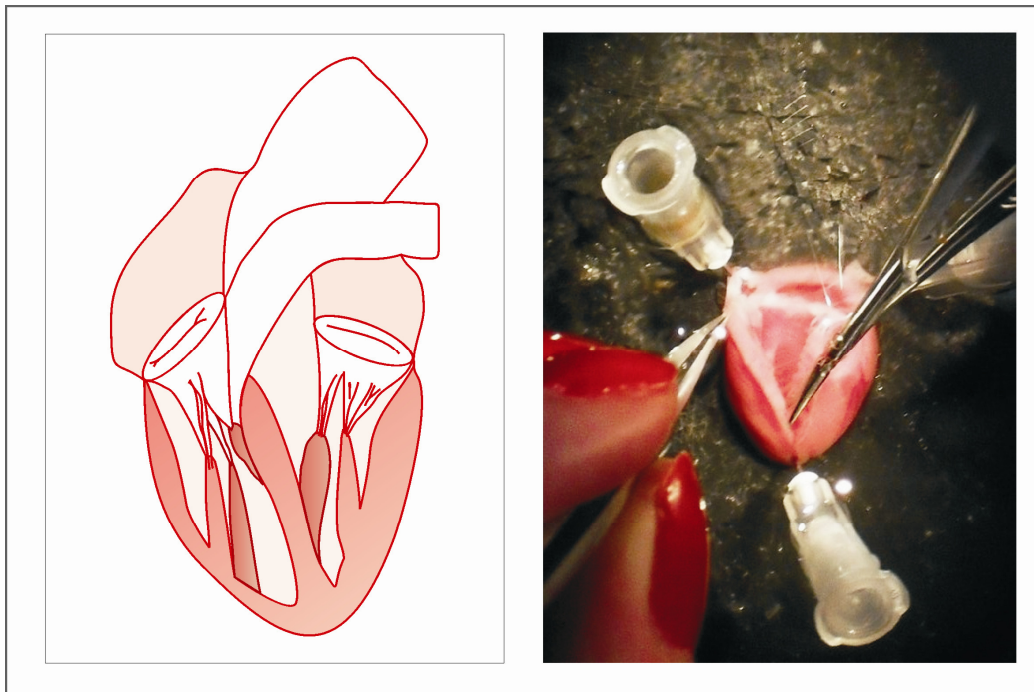
#### Generalidades

Los presentes experimentos fueron desarrollados en músculos papilares aislados de ventrículo izquierdo de ratas Wistar macho de aproximadamente 4 meses de edad. Todos los procedimientos experimentales fueron realizados conforme a la *Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio* publicada por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH Publicación N° 85-23, revisada en 1996).

#### Disección

Para la disección de músculos papilares se empleó una técnica descrita con anterioridad (Camilion de Hurtado, Alvarez et al. 1996; Caldiz, Diaz et al. 2011). Brevemente, las ratas provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas, fueron anestesiadas con pentobarbital sódico en una única aplicación intraperitoneal (35 mg/Kg). Una vez que se encontraban bajo anestesia profunda (constatada por pérdida de reflejo corneal y respiración diafragmática), se abrió la cavidad torácica, se expuso el corazón y finalmente se lo extrajo. Inmediatamente luego de su extracción, cada corazón fue perfundido con buffer  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  (Ringer) cuya composición (en moles/L) era: NaCl 128.3, KCl 4.5,  $\text{CaCl}_2$  1.35,  $\text{NaHCO}_3$  20.23,  $\text{MgSO}_4$  1.05, glucosa 11.0, previamente burbujeado con mezcla gaseosa 5%  $\text{CO}_2/95\%$   $\text{O}_2$  (pH equilibrado a ~7.40) y termostatizado a 30°C, para eliminar la sangre residual y se inició la disección del ventrículo izquierdo para obtener 2 músculos papilares. De manera sintética, primeramente se retiraron las aurículas para exponer la comunicación aurículo-ventricular por la que se ingresó al ventrículo izquierdo. Luego, se realizó un corte en sentido longitudinal hacia el ápex para permitir la visualización de los papilares ubicados uno a cada lado del corte longitudinal efectuado. Se los disecó tomándolos por la válvula mitral y despegándolos de la pared del ventrículo mediante delicados cortes evitando dañar del cuerpo de los papilares. La **Figura 6** muestra a la izquierda un

esquema del corazón donde se visualizan los músculos papilares, y a la derecha un ejemplo real de la disección en un corazón de rata Wistar.



**Figura 6. Izquierda:** Diagrama general del corazón en el que se muestra la ubicación de los músculos papilares diseccionados. Primero se eliminaron los restos de venas y arterias grandes que pudieran haber sido extraídas con el corazón, junto con las aurículas. Finalmente se realizaron cortes siguiendo una misma línea longitudinal para abrir el ventrículo y separar los 2 papilares que en su interior se hallaban y así proceder a su disección final. **Derecha:** Fotografía en la que se muestra el corte longitudinal en la pared del ventrículo izquierdo.

Una vez diseccionados los músculos fueron montados horizontalmente en una cámara de perfusión ubicada sobre la platina de un microscopio invertido, entre un soporte fijo (en forma de gancho) que sirvió de anclaje y un transductor de fuerza como se muestra en la **Figura 7A**. Se los sobreperfundió con solución Ringer (descrita en un párrafo anterior) a 30°C, burbujeada con CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> (5%-95%, pH ~7.4). Se los estimuló eléctricamente, mediante estimulación de campo, a 0.2 Hz con una intensidad de voltaje de 10% sobre el umbral y se determinó fuerza isométrica. A pesar de que el presente trabajo de Tesis no contiene resultados de fuerza contráctil, el protocolo seguido luego de montados los papilares fue el mismo que realizamos cuando se mide fuerza y que detallamos a continuación. Inmediatamente después de montados los músculos, se determinó su longitud inicial (completamente desestirados: *Lslack*), para luego ser estirados progresivamente en pequeños escalones de entre 5 y 10 % de *Lslack* hasta llegar a la longitud a la cual desarrollaban el máximo de fuerza (*Lmáx*). Luego de ello se los



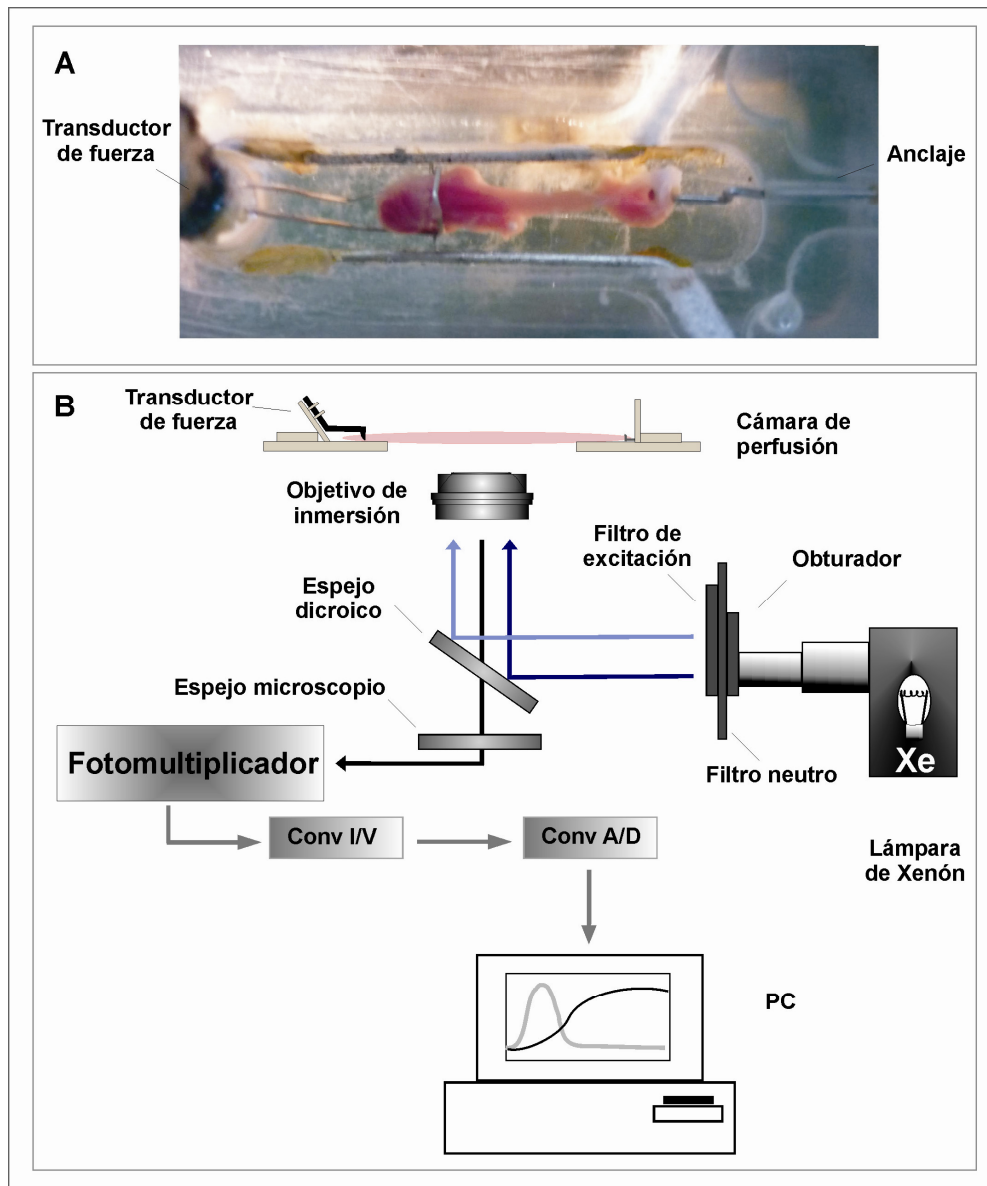
desestiró hasta ~98% de  $L_{máx}$ , longitud a la cual se desarrollaron la totalidad de los experimentos. Esta última maniobra permite una mejor preservación de los músculos ya que a  $L_{máx}$  suelen deteriorarse muy rápidamente. Para prevenir la activación de receptores adrenérgicos por eventuales liberaciones de catecolaminas de las terminales nerviosas y los efectos que dicha activación pudieran tener sobre el NHE1 (Avkiran and Haworth 2003), todos los medios empleados contenían 1  $\mu\text{mol/L}$  de atenolol y 1  $\mu\text{mol/L}$  de prazosin (ambos Sigma Chemical Co). En los casos en los que se usaron intervenciones farmacológicas, las mismas se preincubaron 20 minutos antes de comenzar cualquier tipo de determinación experimental.

## VIII

### Medición de $\text{pH}_i$

#### Descripción de la técnica

El  $\text{pH}_i$  se midió en músculos papilares siguiendo la técnica de epifluorescencia de BCECF (2'-7'-bis(2-carboxietil)-5,6-carboxifluoresceína) (Perez, Alvarez et al. 1995). Medidos inicialmente los niveles de autofluorescencia, los músculos se cargaron con la forma acetoximetiléster del indicador fluorescente sensible al pH BCECF (Invitrogen, Molecular Probes), solubilizado en dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Co) y conteniendo ácido plurónico F-127 [20% (peso/vol), Molecular Probes] para favorecer la penetración. La concentración final de BCECF fue 10  $\mu\text{mol/L}$  en solución buffer. La forma acetoximetiléster del indicador una vez ingresada a las células a través de la membrana, sufrió un clivaje mediante esterasas intracelulares que lo retuvo en el citoplasma, cuando los  $\text{H}^+$  se unieron a esta forma desesterificada se produjo una modificación de la emisión de la misma dependiente de la longitud de onda incidente. Al fin del período de carga, aproximadamente 1 hora, se lavó repetidas veces el espacio extracelular con solución libre de indicador, para eliminar el remanente extracelular del mismo. Los experimentos se realizaron ~30 minutos después de este lavado. A este tiempo la fluorescencia del BCECF se hallaba uniformemente distribuída a través del músculo.



**Figura 7.** A) Fotografía de la cámara de perfusión. Puede observarse un músculo papilar montado en la misma mediante una porción de la válvula mitral disecada junto con el músculo que se inserta en el gancho que oficia de anclaje y una traba metálica que lo atraviesa y permite la tracción del extremo unido al transductor de fuerza. B) Esquema que muestra la disposición general del instrumental utilizado para medir pH por fluorescencia. El haz de luz de excitación, proveído por una lámpara de Xenón, es centrado a la longitud de onda correcta a través de un filtro de excitación, se refleja en un espejo dicróico e incide directamente sobre la muestra. La fluorescencia emitida por la misma es recolectada por el objetivo del microscopio y reflectada y conducida a un fotomultiplicador por una serie de espejos y filtros de recolección y, por medio de un convertidor intensidad/voltaje, la señal luminosa se convierte en eléctrica. Luego viaja hacia un convertidor analógico/digital y finalmente se almacena en una PC, donde se realiza su posterior análisis.

Para medir la fluorescencia de emitida por el BCECF, se hizo incidir luz desde una lámpara de xenón de 75 Watts (Oriol Instruments) filtrada alternativamente a 440 y 495 nm por medio de un obturador manual, que contenía los filtros de excitación correspondientes a esas longitudes de onda y la cual fue transmitida posteriormente a

los músculos en estudio por un espejo dicróico (reflectan a long de onda < 510 nm) localizado bajo el microscopio.

La emisión de fluorescencia, producida tras excitación del indicador, fue colectada por un objetivo 10x especialmente diseñado para esa función y transmitida a través de un filtro de  $535 \pm 5$  nm hacia un fotomultiplicador (modelo R2693, Hamamatsu). La emisión a la salida del fotomultiplicador fue derivada un conversor intensidad/voltaje y de allí a un convertidor analógico/digital (modelo 2801 A, Data Translation) para luego ser almacenada en una computadora para su análisis posterior. En la **Figura 7** panel **B**, se muestra un esquema de la ruta recorrida por los haces de luz, como así también la recolección de datos.

Para limitar el aclaramiento por la luz, se colocó un filtro neutro (1% de transmitancia) en la ruta de incidencia de la luz de excitación.

Para cada dato experimental, se calculó la razón de fluorescencia F495/F440 previa sustracción de los correspondientes valores de autofluorescencias como se indica a continuación:

$$F_{495}/F_{440} = \frac{(\text{fluorescencia a } 495\text{nm} - \text{autofluorescencia a } 495\text{nm})}{(\text{fluorescencia a } 440\text{nm} - \text{autofluorescencia a } 440\text{nm})}$$

## Calibración

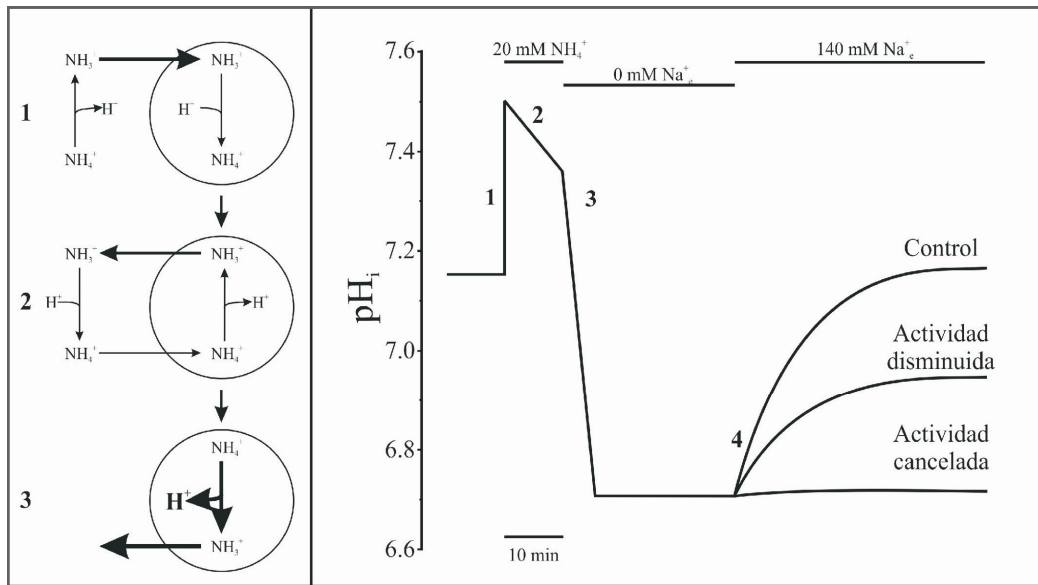
Al final de cada experimento, se calibró la fluorescencia de emisión por exposición de los músculos a una solución de alto KCl a la que se agregó 10  $\mu\text{mol/L}$  de nigericina, ionóforo que puede catalizar el intercambio electroneuro  $\text{H}^+/\text{K}^+$  anulando el gradiente de pH transmembrana (igualando  $[\text{H}^+]_e$  y  $[\text{H}^+]_i$ ). Esta maniobra permite garantizar que el pH de la solución de calibración sea igual al intracelular. La solución de calibración contenía (en mmol/L) KCl 140.0,  $\text{MgCl}_2$  1.0,  $\text{CaCl}_2$  1.35, HEPES 5.0,  $\text{CNNa}$  4 y 2,3 butanediona monoxima (BDM) 20.0 (desacoplante eléctrico que permite prevenir la contractura muscular). El pH del buffer se ajustó con KOH o HCl a cuatro valores diferentes entre 7.5 y 6.5 y se midió fluorescencia para cada una de ellos luego de al menos 15 minutos de haberlas colocado en la cámara. Las razones de fluorescencia y sus respectivos valores de pH fueron representados y ajustados a una recta mediante

regresión lineal. Obtenida la curva de calibración se procedió a interpolar en ella todos los valores de cocientes de fluorescencia recolectados durante el experimento, lo cual permitió transformarlos en valores de pH.

## **Determinación de la actividad del NHE1**

La actividad del NHE-1 se determinó midiendo la recuperación del  $\text{pH}_i$  dependiente de  $\text{Na}^+$  luego de un pulso de amonio (Camilion de Hurtado, Ennis et al. 2002; Perez, Piaggio et al. 2007). Los experimentos fueron realizados en ausencia nominal de bicarbonato, buffer HEPES, cuya composición (en mmol/l) era: HEPES 10, NaCl 148.0, KCl 4.5,  $\text{CaCl}_2$  1.35,  $\text{MgSO}_4$  1.05, glucosa 11.0, pH final 7.4. En estas condiciones es posible afirmar que la recuperación de  $\text{pH}_i$  luego de la carga ácida se debe enteramente a la activación del NHE1, al prescindir del bicarbonato necesario para el funcionamiento de los sistemas dependientes del mismo, como el cotransporte  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ . La **Figura 8** presenta un esquema de la técnica del pre-pulso de cloruro amonio, el cual servirá de guía para entender el método. Cuando se aplica al líquido extracelular una dada concentración de cloruro de amonio (en la **Figura 8** mencionado como “ $\text{NH}_4^+$ ” simplemente para facilitar la explicación), el  $\text{NH}_4^+$  se transforma rápidamente en  $\text{NH}_3$  (amoníaco) el cual es mucho más permeable a la membrana que el primero. El  $\text{NH}_3$  ingresa a la célula donde se combina con los  $\text{H}^+$  intracelulares para formar nuevamente  $\text{NH}_4^+$  lo cual hace que se produzca una marcada alcalinización intracelular dando lugar a la fase “1” de la figura. Seguidamente, el  $\text{NH}_4^+$  empieza a establecer su propio equilibrio con el  $\text{NH}_3$  liberando  $\text{H}^+$  al medio lo cual determina una caída significativa del  $\text{pH}_i$ , reflejado en la fase “2” del esquema de la **Figura 8**. Cuando se lava el cloruro de amonio extracelular, el  $\text{NH}_3$  se escapa rápidamente de la célula por el abrupto gradiente a su favor que se genera entre el intracelular y el extracelular, forzando una mayor transformación de  $\text{NH}_4^+$  en  $\text{NH}_3$  el cual sigue escapando y así acidificando significativamente el líquido intracelular (fase “3” de la **Figura 8**). Cuanto más tiempo se está en fase “2” y por ende más acidificación espontánea se produce, más grande será la acidificación por lavado del cloruro de amonio extracelular. Un detalle importante a destacar es que para una mayor acidificación y por ende un mejor estudio del NHE1 que se activa más cuanto más acidificación hay, la fase “3” se realiza en ausencia de  $\text{Na}^+$  extracelular (reemplazado equimolarmente por N-metil-D-glucamina).

En estas condiciones el NHE1 está detenido porque no hay  $\text{Na}^+$  en el medio y por ende no puede amortiguar con su actividad la caída del  $\text{pH}_i$  pudiéndose llegar así a un máximo de acidificación luego de unos pocos minutos. El súbito agregado de  $\text{Na}^+$  extracelular dispara la actividad del NHE1 el cual promueve la recuperación del  $\text{pH}_i$  como se esquematiza en la fase “4” del esquema.



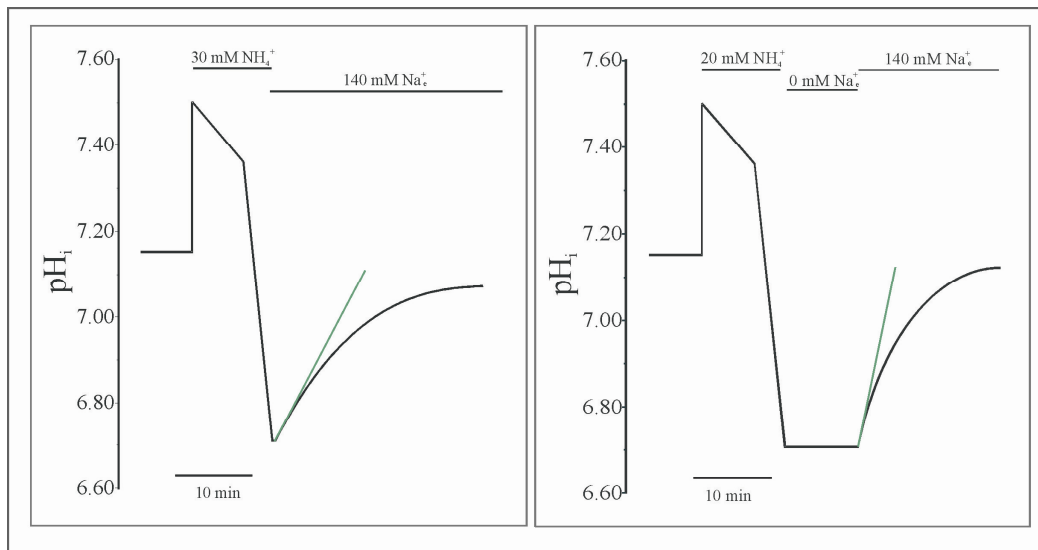
**Figura 8. Técnica de pulso de amonio para determinar actividad del NHE1.** Izquierda: Esquematación de la acidificación por agregado de amonio al medio extracelular. Se muestran sucesivamente el ingreso de  $\text{NH}_3$  al interior celular (1), la formación del equilibrio  $\text{NH}_3 - \text{NH}_4^+$  en citosol y el descenso de  $\text{pH}_i$  causado por lavado del  $\text{NH}_4^+$  extracelular y nueva migración del  $\text{NH}_3$  desde el citosol (3). Derecha: Representación esquemática del registro obtenido en acidosis sostenida, se observan la acidificación por pulso de amonio, la recuperación del  $\text{pH}_i$  (4) y las conclusiones que pueden desprenderse respecto de cualquier fármaco sobre la actividad del NHE1.

Para evaluar la actividad del NHE1 se realizó un ajuste de la curva de recuperación del  $\text{pH}_i$  mediante una asociación exponencial (Camilion de Hurtado, Ennis et al. 2002), la cual se deriva para lograr la velocidad inicial de recuperación ( $\text{dpH}_i/\text{dt}$ ) (Figura 9). En ausencia de cambios en la capacidad buffer intrínseca ( $\beta_i$ ) se podrían utilizar las velocidades iniciales de recuperación para comparar los efectos sobre el NHE1 de distintas intervenciones experimentales, sin embargo, es siempre más conveniente determinar la  $\beta_i$  a partir del cociente  $\Delta\text{base}/\Delta\text{pH}_i$  (Camilion de Hurtado, Ennis et al. 2002) (como se describirá en el siguiente apartado), la cual multiplicada por  $\text{dpH}_i/\text{dt}$  expresa el flujo de  $\text{H}^+$  o  $J_{\text{H}^+}$  en  $\text{mmol/L/min}$  ( $J_{\text{H}^+} = -\text{dpH}_i/\text{dt} * \beta_i$ ), que es lo que constituye específicamente la actividad medida del citado intercambiador.

En el esquema de la **Figura 8** se muestran en fase “4” tres situaciones distintas de recuperación del  $\text{pH}_i$  elegidas arbitrariamente pero que podrán ejemplificar potenciales hallazgos experimentales acerca de la actividad del NHE1: “Control” con una dada velocidad inicial de recuperación que consideramos “normal”; “Actividad disminuida” con una velocidad inicial menor que la control y “Actividad cancelada” cuya velocidad inicial es cero porque el NHE1 está inactivo por bloqueo de su función. Por cuestiones de simplicidad y a manera de ejemplo simplemente, el esquema muestra un único tiempo de acidosis (de ~20-25 minutos de duración) a pesar de que en el desarrollo del trabajo se describe un perfil de activación del NHE1 en función de la duración de la acidosis.

Los tiempos de sostenimiento de acidosis ensayados fueron: 3, 5, 10, 15 y 25 minutos y el estudio del efecto de la ruta GMPc/PKG sobre la actividad del NHE1 se evaluó en 10 minutos de acidosis sostenida.

Para los experimentos en los cuales fueron estudiados los efectos de una acidosis transitoria (no sostenida) en la actividad del NHE1, el lavado del amonio se realizó con buffer HEPES conteniendo  $\text{Na}^+$ , en este caso se usaron 30 mmoles/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para alcanzar un grado similar de acidificación al obtenido durante acidosis sostenida, luego del lavado (**Figura 9**).



**Figura 9. Representación esquemática de los 2 modelos de acidosis ensayados. Izquierda:** Acidosis transitoria, el lavado del  $\text{NH}_4\text{Cl}$  se realizó con HEPES conteniendo  $\text{Na}^+$  140 mmoles/L. **Derecha:** Acidosis sostenida, el lavado del  $\text{NH}_4\text{Cl}$  se realizó con HEPES conteniendo N-metil-D-glucamina, para perdurar el efecto acidótico y al fin de este período se reacidiona el  $\text{Na}^+$  a concentración de 140 mmoles/L.

## Determinación de la capacidad buffer ( $\beta_i$ )

La capacidad buffer se determinó midiendo la variación en  $pH_i$ , en condiciones similares a las de cada protocolo experimental. Se realizaron sucesivos pulsos de amonio de concentraciones determinadas y 10 minutos de duración (se emplearon concentraciones finales de 2, 10, 20 y 30 mmol/L), seguidos de un lavado y sostenimiento por 10 minutos con HEPES sin  $Na^+$  (Camilion de Hurtado, Ennis et al. 2002).

Se registraron los cambios de fluorescencias y fueron transformadas a valores de  $pH_i$ . El análisis se realizó sobre los saltos de pH que ocurrieron con cada lavado.

Para cada pulso de amonio, la variación en la concentración intracelular de  $NH_4Cl$  experimentada efectivamente por el músculo, fue:

$$[NH_4Cl]_i = \frac{[NH_4Cl]_e * 10^{pH_o - pH_i}}{1 + 10^{pH_o - pK}}$$

Donde  $pK_{NH_4Cl} = 9.20$

$pH_o$  (pH en la cámara de perfusión) = 7.4

$pH_i$  (pH intracelular) es el obtenido experimentalmente tras cada pulso de amonio, considerando el punto medio de cada salto de  $pH_i$  medido.

Luego, y como vimos en los primeros apartados, fue posible calcular  $\beta_i$  como el cociente entre la variación de la carga básica instaurada y la variación de pH intracelular que efectivamente experimenta el músculo en presencia de dicha carga.

$$\beta_i = \frac{\Delta NH_4Cl}{\Delta pH_i}$$

Esto se realizó para cada variación en la concentración de  $NH_4Cl$  usada junto con el valor de  $\Delta pH_i$  observado por el músculo en presencia de la concentración efectiva de  $NH_4^+$  determinada para las mismas y se refirió al valor medio de los cambios medidos en el  $pH_i$ . Así, los pares de datos obtenidos fueron correlacionados linealmente y de la recta de regresión lineal  $\beta_i$  vs  $pH_i$  fue posible extrapolar las capacidades buffer en cada experimento individual de acidosis.

## Intervenciones farmacológicas realizadas

En la siguiente tabla resumiremos las intervenciones farmacológicas en las que se evaluó la actividad del NHE1 por recuperación del  $\text{pH}_i$  tras un pulso de amonio y la concentración final de cada una de estas intervenciones usadas. En la sección resultados detallaremos el fundamento de la aplicación de cada intervención.

Primera parte		Segunda parte	
Fármaco	Concentración final	Fármaco	Concentración final
Sildenafil (SIL)	1 $\mu\text{M}$	Sildenafil (SIL)	1 $\mu\text{M}$
U0126	10 $\mu\text{M}$	SB202190	10 $\mu\text{M}$
MPCG	1 mM	Arsenito de sodio (Ars)	5 $\mu\text{M}$
ácido Okadaico (OKA)	1 $\mu\text{M}$ y 1 nM	ácido Okadaico (OKA)	1 nM
Endothall (End)	100 $\mu\text{M}$		

Tabla 1. Intervenciones experimentales realizadas en los músculos papilares.

## IX

### Determinación del grado de fosforilación de proteínas mediante Western Blot (WB)

**Determinación de fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2), la p90 ribosomal S6 quinasa ( $\text{p90}^{\text{RSK}}$ ) y p38.**

Para evaluar la activación de dichas quinasas por acidosis sostenida y el rol que cumple SIL en la misma, se procedió a determinar el grado de fosforilación que estas quinasas presentaron tras las distintas intervenciones (ver apartado *Intervenciones en las que se evaluaron proteínas*). Para ello se empleó la técnica de WB, por la cual igual cantidad de proteína de cada muestra fue sometida a una electroforesis en gel de poliacrilamida siguiendo la técnica de SDS-PAGE. Para realizar la inmunodetección se emplearon



anticuerpos específicos. Se midieron también p38, p90<sup>RSK</sup> y ERK1/2 totales como controles, empleando los anticuerpos respectivos. Se utilizó un sistema de detección electroquimioluminiscente y una cámara CCD del equipo Chemidoc XRS que capturó y digitalizó las imágenes, cuantificadas posteriormente por densitometría utilizando el programa Scion Image. Cada señal obtenida para fosfoproteínas fue normalizada por aquella obtenida con los anticuerpos que reconocen la cantidad total de la proteína en cuestión (no fosforilada). Los valores normalizados se expresaron como porcentajes relativos al control no sometido a acidosis.

### *Procedimiento*

Se determinó la expresión de proteínas específicas en preparados de homogenatos de músculos papilares de ventrículo izquierdo (mpvi) sometidos a los mismos protocolos considerados en las determinaciones de fluorescencia congelados a -80°C inmediatamente después de finalizado el tiempo de sostenimiento de la acidosis.

### *Preparación de homogenatos de mpvi*

Para la determinación de la expresión proteica en homogenatos de mpvi las muestras congeladas se colocaron en 5 volúmenes (5ml/g) de buffer de lisis que contenía (en moles/l): sacarosa 300, DTT 1, EGTA 4, ortovanadato de Na<sup>+</sup> (pH 7.4) 1, Tris-HCl (pH 7.4) 20, NaF 50, EDTA 2, pirofosfato 5, adicionado con cocktail de inhibidores de proteasas (Complete Mini Roche) 1 pastilla/15 ml de buffer y pepstatin 1 ug/ml. Se realizaron 3 pasos de homogeneización en baño de hielo utilizando la velocidad 6 del 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 12000rpm a 4°C durante 15 minutos (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge), para separar los restos de tejido no homogeneizado. El *pellet* fue descartado y el sobrenadante se sonicó 5 segundos y se conservó como homogenato de mpvi, a -80°C.

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

Para la medida de la concentración de proteínas en el homogenato 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 proteínas. Western Blot.*

Mediante la técnica de WB se evaluó la expresión de las proteínas en los distintos grupos experimentales. Para ello se utilizó el sistema de cuba y buffers para electroforesis y transferencia Mini Protean Tetra System (BioRad). A continuación se describe el procedimiento en común para todas las determinaciones.

### *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 preensamblados de poliacrilamida al 7.5 % (Invitrogen) y dilución adecuada del buffer 20X (Invitrogen) de composición (en mmol/L) MOPS 1, Tris base 1, SDS 69.3, EDTA 20.5 y agua bidestilada hasta 500 mL, pH 7.7. Al buffer reconstituido 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 las respectivas calles del gel, más 5 µL de marcador de pesos moleculares (MagicMarc, Invitrogen) en una calle aparte. La corrida electroforética se realizó a temperatura ambiente y a 100 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 90 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 ultra pura 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 segundos 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 sándwich. 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 con rojo Ponceau (0.1% Ponceau en 0.5% de ácido acético) y posteriormente se enjuagó con T-TBS (Tris base 0.05 mol/L, NaCl 0.15 mol/L, 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 (5-10%).

### *Incubación con anticuerpo primario específico*

Luego de un breve enjuague 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. Se utilizaron anticuerpos anti-fosfo ERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology), anti-fosfo p90<sup>RSK</sup> (Cell Signaling) y anti-fosfo p38 (Santa Cruz Biotechnology), en una primera parte y anticuerpos anti ERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology), anti p90<sup>RSK</sup> (Cell Signaling) y anti p38 (Santa Cruz Biotechnology) en una segunda post *stripping*.

### *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. Como anticuerpo secundario se usó IgG peroxidasa conjugada anti-ratón o anti-conejo según correspondiera (Santa Cruz Technology), que está acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) y diseñado así para reconocer la fracción específica de la especie en la que se obtuvo el anticuerpo primario, haciendo de nexo 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 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.

## *Stripping*

Posteriormente a la determinación de las fosfoproteínas por quimioluminiscencia, las membranas de PVDF fueron sometidas a *stripping* para eliminar las uniones de los anticuerpos primarios y secundarios a las proteínas electrotransferidas allí. La solución de *stripping* contenía: Tris base 0.5 mmoles/l, SDS 10% en agua bidestilada. Con esta solución se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente. Posteriormente se enjuagó con T-TBS y se procedió al bloqueo de la membrana para su posterior incubación con el anticuerpo primario anti-proteína total siguiendo los pasos arriba detallados.

## **Determinación de fosforilación de NHE1 en el residuo Ser 703**

Para determinar la fosforilación de NHE1, se realizó el mismo protocolo detallado para la determinación de fosforilación de proteínas quinasas previa inmunoprecipitación del NHE1 de homogenatos de mpvi realizados con buffer IPB.

## *Inmunoprecipitación*

El buffer IPB contenía: Tris 10 mmoles/L, EDTA 5 mmoles/L, NP40 1%, EDTA 5 mmoles/L, NaCl 0.15 moles/L, deoxicolato 0.5% e inhibidor de proteasas adicionado en la misma proporción que el buffer de homogeneización anteriormente descrito. El protocolo de homogeneización y determinación de la concentración proteica fue análogo al descrito previamente.

Empleando 500ug de proteína total de cada homogeneizado se efectuó un *clearance* previo con 50ul de proteína A sepharosa y centrifugación a 9000rpm por 5 min. Al sobrenadante se lo incubó *over-night* con un anticuerpo policlonal antiNHE1 (Chemicon) y proteína A sepharosa, a 4°C con agitación orbital. Luego, se realizó una centrifugación a 9000rpm por 5 minutos, lavando posteriormente con buffer IPB sin deoxicolato ni inhibidores de proteasas. Las muestras finalmente fueron resuspendidas en buffer de muestra siguiendo el protocolo visto en *Preparación de muestras*.

## *Detección de fosforilación del residuo Ser 703 de la cola citosólica del NHE1*

Las muestras inmunoprecipitadas fueron sembradas en geles PAGE, electrotransferidas e incubadas con un anticuerpo anti motivo de unión de proteína 14-3-3 (Cell Signaling). Se mostró en reportes previos que la fracción aminoacídica regulatoria que contiene al residuo Ser703 del NHE1, tiene una secuencia tal que bajo fosforilación crea un motivo de unión para la proteína 14-3-3 (Lehoux, Abe et al. 2001; Cavet, Lehoux et al. 2003; Maekawa, Abe et al. 2006).

De esta manera, el anticuerpo anti-motivo de unión de proteína 14-3-3, cuando es usado con NHE1 inmunoprecipitado, representa una herramienta útil para estimar la fosforilación de NHE1 en dicho residuo (Misik, Perreault et al. 2005; Snabaitis, D'Mello et al. 2006).

Análogamente al caso anterior se midió también NHE1 total como control, empleando los anticuerpos respectivos y normalizando la señal que representa a la proteína fosforilada por aquella obtenida con los anticuerpos que reconocen la cantidad total de proteína.

Como anticuerpo secundario se usó IgG peroxidasa conjugada anti-ratón o anti-conejo (Santa Cruz Technology) y las bandas fueron visualizadas y analizadas de la misma manera que las quinasas explicadas en el apartado anterior y los valores normalizados se expresaron como porcentajes relativos al control no sometido a acidosis.

## **Intervenciones en las que se evaluaron proteínas**

En una primera etapa las intervenciones en las que se evaluaron tanto fosforilación de ERK1/2 y de p90RSK, como deL NHE1, comprendieron los siguientes grupos:

- Control: músculo papilar estirado al 98% de L<sub>máx</sub>.
- Acidosis 10 minutos: músculo papilar estirado al 98% de L<sub>máx</sub>, sometido a un pulso de amonio de 10 minutos, lavado con buffer HEPES “sin” Na<sup>+</sup>, mantenido en ese buffer por 10 minutos (sostenimiento de la acidosis).
- Acidosis 10 minutos + SIL
- Acidosis 10 minutos + U0126
- Acidosis 10 minutos + Endothall + SIL

- Acidosis inmediata: músculo papilar estirado al 98% de  $L_{máx}$ , sometido a un pulso de amonio de 10 minutos, lavado con buffer HEPES con  $Na^+$ .
- Acidosis inmediata + SIL
- Acidosis inmediata + U0126

En una segunda etapa las intervenciones en las que se evaluaron fosforilación de ERK1/2 y de p90RSK, comprendieron los siguientes grupos:

- Control.
- Acidosis 10 minutos.
- Acidosis 10 minutos + SIL
- Acidosis 10 minutos + SB202190
- Acidosis 10 minutos + SIL + SB202190

Mientras que fosforilación de p38 se ensayo en las siguientes 3 condiciones:

- Control.
- Acidosis 10 minutos.
- Acidosis 10 minutos + SIL

## X

### Estadística

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar. El análisis estadístico entre los distintos grupos experimentales se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls como *post-hoc*. Se usó el programa Primer of Biostatistics (McGraw Hill) para realizar estas pruebas estadísticas. Se estableció como límite de significación un valor de  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS**



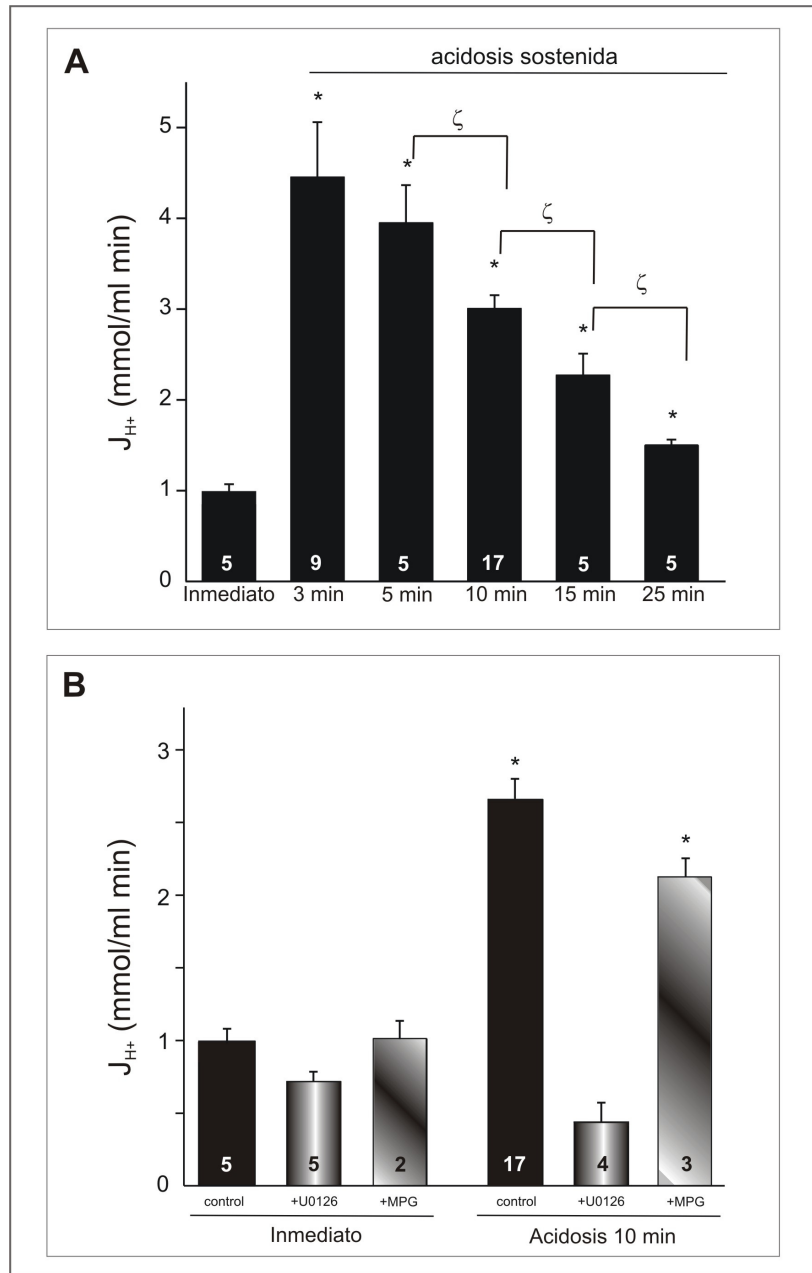
# XI

## Perfil de activación del NHE1 ante acidificaciones de distinta duración

### Caracterización

Como primera aproximación a la caracterización del NHE1 evaluamos su actividad tras acidosis sostenidas de distinta duración. Los resultados que mostraremos a continuación permiten concluir que la actividad del NHE1 se modifica por el sostenimiento del estímulo acidótico. Específicamente, la actividad del NHE1 tras acidosis sostenida es significativamente mayor a la que registra luego de una acidosis con recuperación inmediata como se muestra en el panel A de la **Figura 10**. Es interesante notar que dicho incremento se registra independientemente del tiempo de duración de acidosis, mostrando así que el sostenimiento de la acidosis por sí solo es estímulo suficiente para provocar un incremento en la actividad del intercambiador. Dicho de otro modo, si la acidosis se sostiene en el tiempo, siempre habrá un aumento de la actividad del NHE1 respecto de la recuperación inmediata, independientemente del tiempo de duración de la acidosis (en nuestro caso, tan corta como 3 minutos o tan larga como 25 minutos). Sin embargo, la actividad del NHE1 no es indiferente respecto del tiempo de sostenimiento del estímulo acidótico, ya que se destaca un perfil de activación que alcanza un máximo de actividad cuando el sostenimiento del estímulo llega a tiempos entre 3 y 5 minutos, decayendo progresivamente a tiempos de superiores a 5 minutos, como muestra la **Figura 10A**. Es más, el análisis estadístico permite detectar que a excepción de los efectos observados tras 3 y 5 minutos de acidosis sostenida que no resultaron estadísticamente diferentes entre sí, el flujo de  $H^+$  a cada tiempo superior a 5 minutos es significativamente menor ( $p < 0.05$ ) que aquel sometido a un tiempo más corto. Es importante destacar que a excepción del grupo con acidosis sostenida de 3 minutos donde se registró una acidificación mayor al resto por causas que no hemos podido dilucidar, tanto las máximas acidificaciones luego del pulso de amonio como la capacidad buffer intracelular fueron similares entre los diferentes grupos experimentales (**Tabla 2**). Dado que la magnitud de la acidificación modifica la actividad del NHE1,

todas las velocidades de recuperación del  $pH_i$  (y por ende los flujos de  $H^+$ ) fueron calculadas al mismo  $pH_i$  (6.75), para evitar posibles interpretaciones erróneas. Esto permite inferir que las diferencias observadas en la actividad del NHE1 se deben a la prolongación en el tiempo del estímulo acidótico y no a otros factores.



**Figura 10. Efecto del sostenimiento de la acidosis en la actividad del NHE1.** **A)** Cuando el músculo papilar se somete a acidosis sostenida, la actividad del NHE1 aumenta significativamente alcanzando un máximo a tiempos de exposición cortos (3-5 minutos) y cayendo gradualmente a medida que el tiempo de duración de la acidosis aumenta. \* $p < 0.05$  respecto a acidosis inmediata,  $\zeta p < 0.05$  vs. tiempo inmediato anterior. **B)** Comparación entre acidosis inmediata y acidosis sostenida por 10 minutos. El efecto que genera el sostenimiento de la acidosis sobre la actividad del NHE1 es dependiente de la acción de quinasas de la familia de ERK e independiente de la generación de especies reactivas del oxígeno. \* $p < 0.05$  respecto a acidosis inmediata control.

Para profundizar el mecanismo que genera esta diferencia entre acidosis inmediata y acidosis sostenida, se realizaron diferentes intervenciones tomando como parámetro una acidosis sostenida de 10 minutos. Como existen reportes previos de la estimulación del NHE1 tras acidosis por acción de las quinasas ERK1/2-p90<sup>RSK</sup> (Moor, Gan et al. 2001), evaluamos la acción que la interrupción de la cascada de activación de estas quinasas tiene sobre la actividad del NHE1 en nuestro sistema. En el panel **B** de la **Figura 10** se muestra que el aumento de la actividad del NHE1 por sostenimiento de la acidosis, se anula en presencia de un inhibidor de MEK (quinasa *upstream* ERK1/2-p90<sup>RSK</sup>) como el 1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis[2-aminofeniltio] butadieno, conocido comúnmente como U0126, efecto que no se observa en acidosis transitoria (inmediata). Las diferencias observadas entre acidosis transitoria y sostenida coinciden con resultados previos de otros autores que exploraron condiciones experimentales similares (Haworth, McCann et al. 2003). Como se mencionó antes, MEK es una quinasa *upstream* ERK1/2-p90<sup>RSK</sup>, es decir que su activación precede y determina por fosforilación la activación de ERK1/2, las cuales a su vez fosforilan/activan a la quinasa p90<sup>RSK</sup>, la que finalmente activa al NHE1 por fosforilación, presumiblemente y basándonos en el trabajo de Takahashi y col., en el residuo Ser703 de la cola citosólica (Takahashi, Abe et al. 1999).

Grupos experimentales	pH <sub>i</sub>	β <sub>i</sub> (mmol/L)
Acidosis transitoria (n=5)	6,75 ± 0,02	27,6 ± 0,8
Acidosis 3 min (n=9)	6,55 ± 0,05 *	29,0 ± 0,4
Acidosis 5 min (n=5)	6,70 ± 0,01	29,2 ± 0,7
Acidosis 10 min (n=17)	6,75 ± 0,01	27,8 ± 0,4
Acidosis 15 min (n=5)	6,71 ± 0,03	28,1 ± 1,2
Acidosis 25 min (n=5)	6,74 ± 0,02	28,3 ± 0,8

**Tabla 2.** pH<sub>i</sub> en la máxima acidificación y capacidad buffer en cada condición de acidosis experimental. El asterisco indica una diferencia significativa (p<0.05) en la máxima acidificación alcanzada, tras el sostenimiento de acidosis.

Por otro lado, y como comentamos en la introducción, estas quinasas son conocidas ampliamente por responder a cambios en el estado de oxido-reducción celular, por lo que su acción sobre el NHE1 en acidosis sostenida podría ser entonces consecuencia de una activación mediada por ROS. Como también puede verse en el panel **B** de la **Figura 10**, en presencia de un capturador o *scavenger* de las especies reactivas del oxígeno como es el N-2-mercaptopropionilglicina (MPG), la actividad del NHE1 no

registra variaciones significativas respecto a su correspondiente condición control, descartando que el estrés oxidativo esté participando de la activación del NHE1 por la acidosis sostenida.

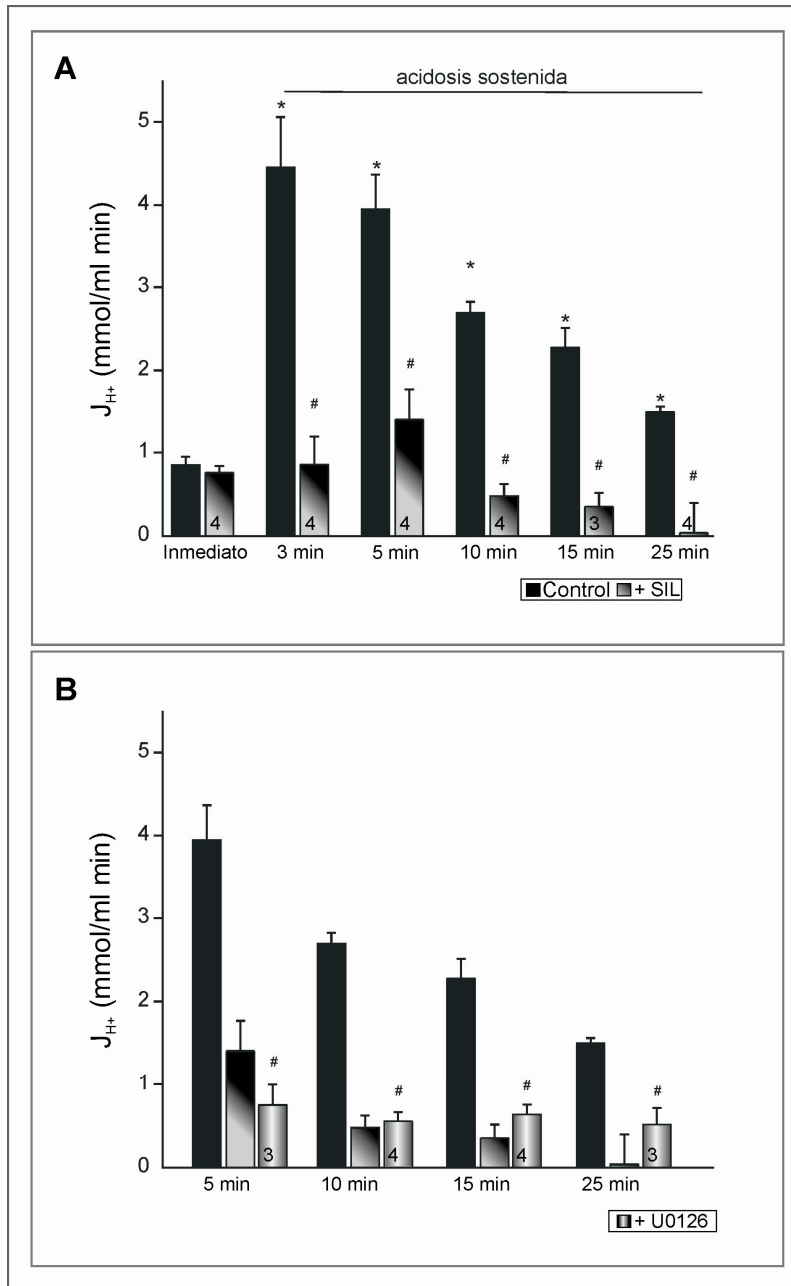
Resumiendo este primer grupo de experimentos, los resultados permiten concluir que la sobreactivación del NHE1 tras acidosis sostenida sería resultado de una fosforilación mediada por quinasas de la familia de ERK, cuya activación parecería no depender de la generación de especies reactivas del oxígeno durante el sostenimiento del estímulo acidótico.

## **Rol del SIL en el perfil de activación del NHE1**

En un trabajo anterior de nuestro grupo se observó un efecto inhibitorio de SIL (inhibidor de la PDE5A) sobre el NHE1 en el miocardio de ratas Wistar (Perez, Piaggio et al. 2007), que solo se detectaba luego de acidosis sostenidas sin afectar la actividad basal del intercambiador. Esta diferencia entre los modos de activación post acidosis inmediata y sostenida podría ser de gran importancia en clínica cardiológica, ya que la actividad del NHE1 que se asocia a los estados patológicos del miocardio es aquella vinculada a la sobreactivación del mismo por variaciones en el estado de fosforilación de su cola citosólica en respuesta a hormonas y/o factores de crecimiento (Berk, Aronow et al. 1987; Fliegel and Karmazyn 2004; Cingolani, Perez et al. 2005) o a acidosis sostenida (Haworth, McCann et al. 2003), y no a la denominada función homeostática basal o *housekeeping*, fundamental para la economía celular, que se caracteriza por una ausencia de fosforilación del NHE1 (Haworth, McCann et al. 2003). Estos resultados sirvieron de base para el desarrollo del presente trabajo de Tesis Doctoral, cuyo objetivo principal fue profundizar la vía de señalización disparada por SIL.

La **Figura 11A** muestra los resultados obtenidos luego de la aplicación de los protocolos de acidosis inmediata y sostenida (durante 3, 5, 10, 15 y 25 minutos) previo tratamiento de 20 minutos con SIL. Como se puede observar, la actividad del NHE1 se vio disminuída respecto a su control a cada uno de los tiempos de acidosis sostenida ensayados, demostrando que el SIL es capaz de abolir el aumento de actividad generado por el sostenimiento de la acidosis independientemente de la duración del estímulo, pero sin anular completamente la actividad de dicho intercambiador. En concordancia con los

resultados previos (Perez, Piaggio et al. 2007), el SIL no afectó a la actividad del NHE1 luego de una acidosis transitoria.



**Figura 11. Efecto de SIL y U0126 en acidosis inmediata y sostenida sobre la actividad del NHE1. A)** El aumento de actividad del NHE1 en respuesta a acidosis sostenida se ve significativamente disminuido en presencia de SIL, aunque no se observa el mismo efecto en acidosis transitoria. **B)** La inhibición de MEK con U0126 en acidosis sostenida no arrojó diferencias significativas con respecto a la acción de SIL sobre la actividad del NHE1. A fines comparativos se intercalaron los valores de actividad control correspondientes a cada tiempo de acidosis y a acidosis transitorias mostrados en la Figura 10. #  $p < 0.05$  respecto a acidosis control al tiempo correspondiente.

Resulta también interesante de destacar que la inhibición de MEK fue capaz de reproducir el efecto de SIL como se muestra en la **Figura 11B**, sugiriendo que ambas intervenciones podrían estar afectando la misma vía de señalización intracelular.

En relación a estos resultados, es necesario mencionar que por razones que al momento desconocemos pero que merecerían ser profundizadas mediante futuros experimentos, tanto SIL como U0126 provocaron un efecto inhibitorio superior al esperado cuando la acidosis se sostuvieron por más tiempo, efecto que se vio exacerbado a tiempos de 10 minutos o más. Se podría especular con la posibilidad que fuera el tiempo de privación de  $\text{Na}^+$  extracelular al que se sometió a esos músculos el responsable de dicho fenómeno, pero como se dijo antes, carecemos de argumentos para emitir algún tipo de conclusión al respecto.

## **XII**

### **Influencia de SIL en la actividad del NHE1 post acidosis de 10 minutos**

#### **Características generales**

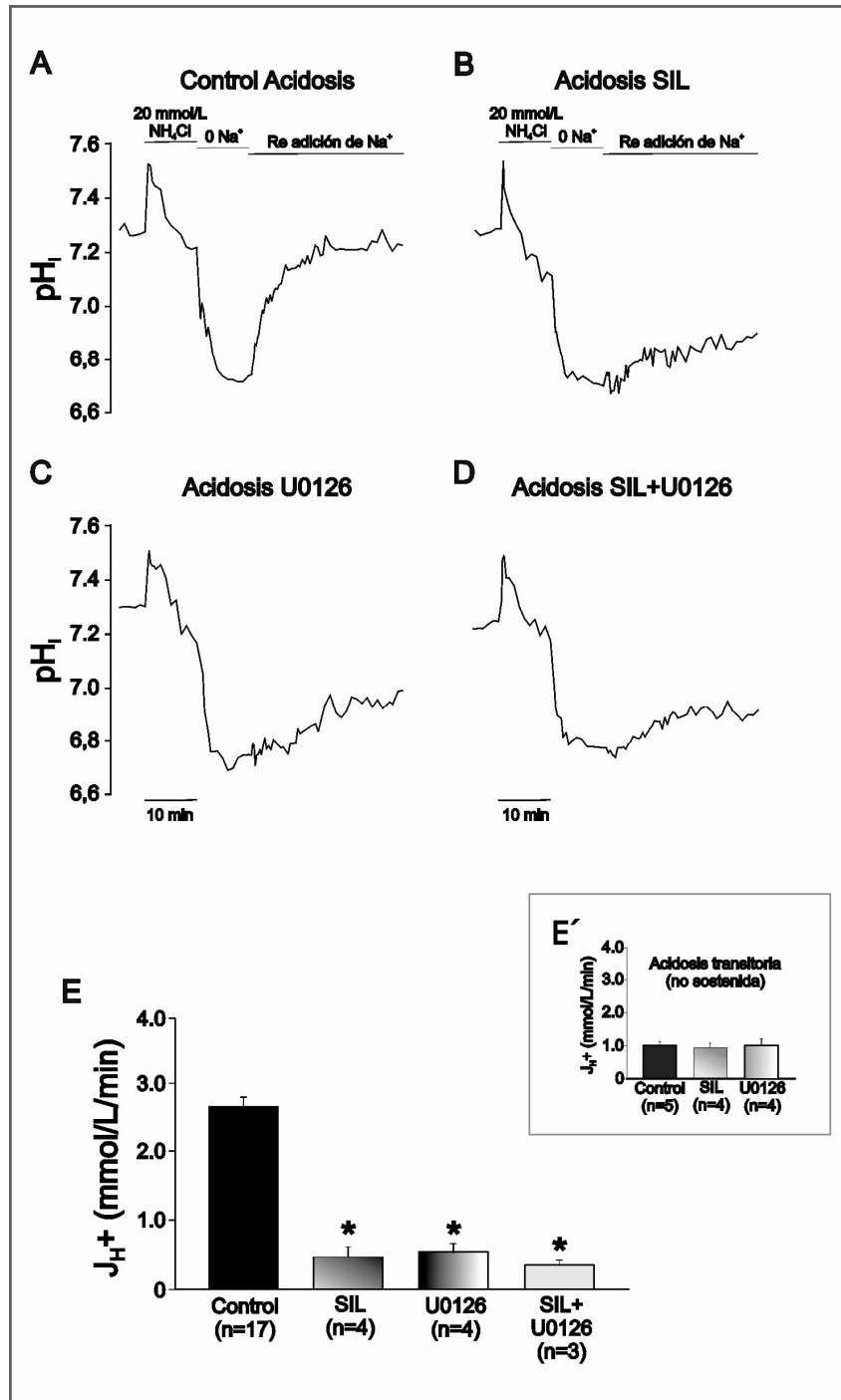
Para profundizar el estudio de los mecanismos por los cuales el SIL promueve la inhibición del NHE1 y de manera similar a lo anticipado en el apartado anterior, concentramos nuestros esfuerzos en la acidosis sostenida a 10 minutos. Como se mencionó antes, la actividad del NHE1 fue ensayada en cada etapa experimental mediante la técnica de prepulso de amonio (ver Materiales y Métodos), y las condiciones de partida al reestablecer el  $\text{Na}^+$  fueron similares en cada una de las intervenciones efectuadas. La **Tabla 3** muestra los valores de  $\text{pH}_i$  en la máxima acidificación y los  $\beta_i$  de cada intervención realizada en esta etapa. En todas ellas el  $\text{pH}_i$  al readicionar el  $\text{Na}^+$  fue aproximadamente 6.75, hecho que nos permitió evaluar comparativamente la actividad del NHE1 entre todos los grupos ensayados sin otras potenciales interferencias.

Grupos experimentales	pH <sub>i</sub>	β <sub>i</sub> (mmol/L)
<b>Acidosis 10 min</b>		
Control (n=17)	6,75 ± 0,01	27,8 ± 0,4
SIL (n=4)	6,77 ± 0,03	27,0 ± 1,0
U0126 (n=4)	6,73 ± 0,01	28,4 ± 0,4
SIL+U0126 (n=4)	6,76 ± 0,01	27,5 ± 0,4
SIL+End 100μM (n=4)	6,72 ± 0,02	29,0 ± 0,7
OKA 1μM (n=4)	6,74 ± 0,02	28,0 ± 0,7
SIL+OKA (1μM) (n=5)	6,72 ± 0,03	29,0 ± 1,0
SIL+OKA (1ηM) (n=4)	6,72 ± 0,02	29,0 ± 0,9
<b>Acidosis transitoria</b>		
Control (n=5)	6,75 ± 0,02	27,6 ± 0,8
SIL (n=4)	6,74 ± 0,04	28,0 ± 1,3
U0126 (n=4)	6,75 ± 0,03	27,6 ± 1,0

**Tabla 3.** pH<sub>i</sub> en la máxima acidificación y capacidad buffer en cada condición experimental ensayada.

Conforme a los resultados citados en una sección previa, la adición de SIL al medio extracelular no alteró el pH<sub>i</sub> basal (control acidosis  $7.28 \pm 0.01$ , n=17 vs. SIL  $7.26 \pm 0.02$ , n=4) ni la actividad del NHE1 en acidosis transitoria (**Figura 12E**). En contraposición, la actividad del NHE1 luego de 10 minutos de acidosis sostenida fue significativamente mayor (**Figura 12A y E**) y fue prácticamente cancelada en presencia de SIL (**Figura 12B y E**).

Por otra parte y a fin de permitir una comparación que lleve a dilucidar el rol de SIL en la activación post-acidosis sostenida mediada por fosforilación, se reitera, en los paneles **C y E de la Figura 12**, esta vez incluyendo experimentos representativos, el efecto negativo que sobre la actividad del NHE1 post acidosis sostenida presenta U0126 mostrado previamente en la **Figura 10B**. Sería interesante resaltar que si bien la prevención de la sobreactivación del NHE1 generada por U0126 es de la misma magnitud que la generada por SIL, el empleo de ambas drogas simultáneamente no provocó un efecto aditivo (**Figura 12D y E**). Esto necesariamente plantea el interrogante de si ambas drogas están o no interfiriendo la misma vía de señalización que lleva a la activación del NHE1. Como ni SIL ni U0126 tienen efecto sobre la actividad del intercambiador tras acidosis transitoria, la acción de dichas drogas no sería inhibir el intercambiador de manera competitiva (como lo haría el tradicional inhibidor Cariporide) sino que podría relacionarse directa o indirectamente con la fosforilación del NHE1 que creemos causante del aumento en su actividad. Dicho de otro modo, el remanente de actividad del NHE1 sería debido a la propia sensibilidad (y por consiguiente activación) del intercambiador ante el estímulo acidótico tal y como ocurre



**Figura 12. Recuperación del  $pH_i$  tras acidosis sostenida 10 minutos. Efecto de SIL y de la inhibición de MEK.** A) Registro original de un prepulso de amonio y la correspondiente recuperación del  $pH_i$  luego del agregado de  $Na^+$  tras 10 minutos de acidosis sostenida. B) Lo mismo que en "A" pero en presencia de SIL, observándose que la recuperación del  $pH_i$  está prácticamente abolida. C) Lo mismo que en "A" pero en presencia de U0126, conocido inhibidor de MEK, quinasa *usptream* ERK1/2-p90RSK, el cual tuvo un efecto inhibitorio sobre la actividad del NHE1 similar al SIL. D) Lo mismo que en "A" pero en presencia de SIL + U0126, apreciándose que la presencia de ambos compuestos no provocó sumación de efectos. E) Promedios generales de  $J_{H^+}$  medidos a  $pH \sim 6.75$ , en las distintas condiciones experimentales mostradas en los paneles A-D. E') Promedios generales de  $J_{H^+}$  medidos a  $pH \sim 6.75$  pero en el protocolo de acidosis transitoria y en condiciones experimentales similares a las mostradas en los paneles A-C, donde se observa que ni la inhibición de PDE5A ni la de MEK tienen efecto significativo en la recuperación del  $pH_i$  en acidosis transitoria. \* $p < 0.05$  vs. acidosis control.



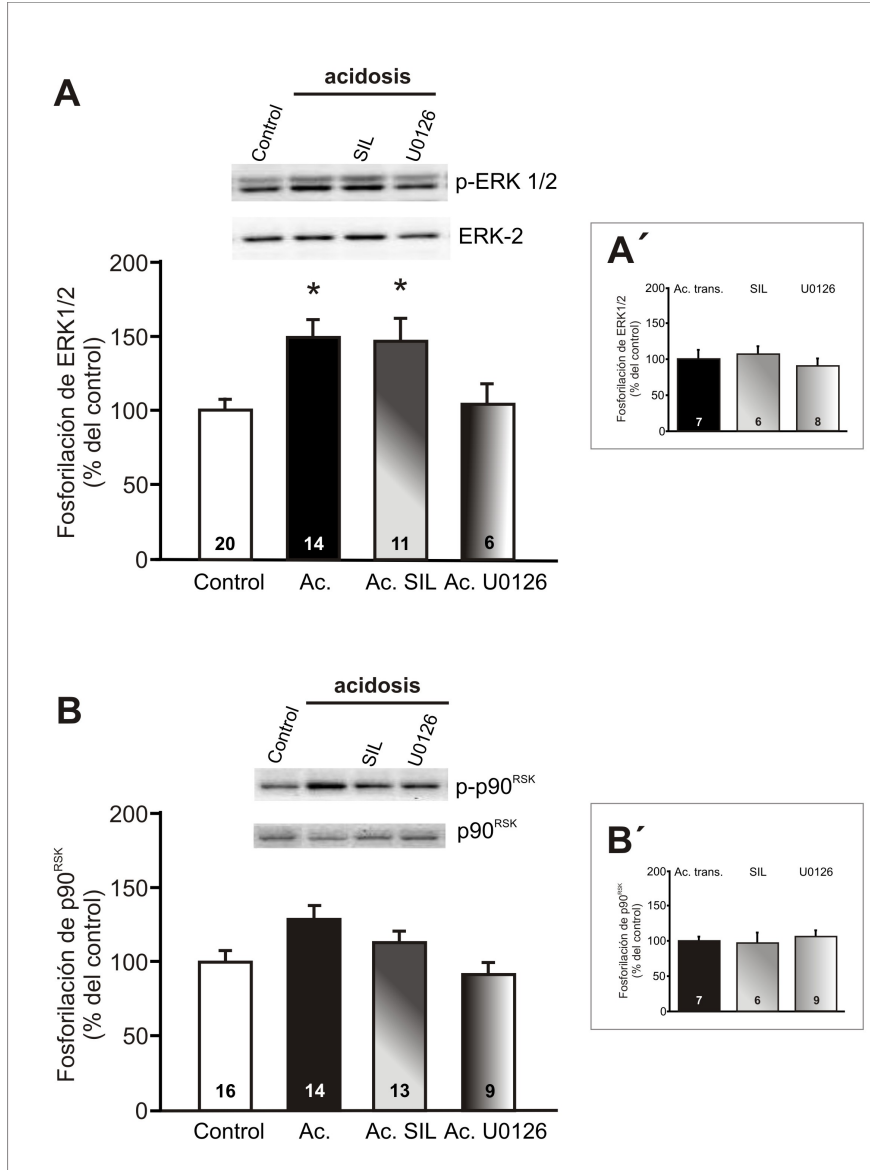
luego de una acidosis transitoria. En concordancia, los valores de  $\text{pH}_i$  medidos al cabo de 30 minutos de readición de  $\text{Na}^+$  fueron  $6.91 \pm 0.03$  para SIL (n=4),  $6.93 \pm 0.03$  para U0126 (n=4) y  $6.89 \pm 0.02$  para SIL+U0126 (n=3), lo que indicaría que si bien la velocidad de recuperación se encuentra enlentecida respecto a la misma condición experimental (acidosis sostenida por 10 minutos) sin inhibidores, en todos los casos se llegaría eventualmente a una recuperación total del  $\text{pH}_i$ .

Hasta aquí, estos resultados parecieran dejar en claro que en el miocardio de rata la fosforilación de ERK1/2-p90<sup>RSK</sup> es responsable de la activación (por fosforilación a su vez) del NHE1 tras una acidosis sostenida. Por otra parte, resultados previos de nuestro grupo (Perez, Piaggio et al. 2007), demuestran que la acción de SIL sobre la actividad del NHE1 es enteramente dependiente de la activación de la vía cGMP/PKG. Es posible especular entonces que PKG podría estar regulando negativamente alguno/s de los intermediarios de la fosforilación del NHE1 (ERK1/2-p90<sup>RSK</sup>) o bien al intercambiador mismo, para lo cual se podría pensar en una activación PKG-dependiente de alguna fosfatasa o en una fosforilación directa de PKG sobre el NHE1 que culmine en la inhibición del mismo tal como se ha descrito para PKB. En las siguientes secciones evaluaremos esta posibilidad.

## **Rol del SIL en la actividad de quinasas post acidosis sostenida**

Para dilucidar los posibles mecanismos que llevarían a la inhibición del NHE1 en presencia de SIL, medimos la fosforilación de ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> como indicador de su grado de actividad en cuatro circunstancias distintas: control sin acidosis, acidosis sostenida, acidosis sostenida + SIL y acidosis sostenida + U0126. Como se puede apreciar en la **Figura 13**, pudimos detectar un aumento en ambas quinasas al cabo de 10 minutos de acidosis sostenida pero que solo alcanzó un nivel estadísticamente significativo en el caso de ERK1/2 (**Figura 13A**). Dado que es un hecho comprobado que tanto p90<sup>RSK</sup> como su quinasa *upstream* ERK1/2 aumentan con acidosis sostenida (Haworth, McCann et al. 2003), no contamos con argumentos sólidos para justificar el resultado de p90<sup>RSK</sup>, excepto la dispersión que suelen tener este tipo de determinaciones que claramente pesa mucho cuando los aumentos son relativamente pequeños (nótese que para un aumento de ERK1/2 de aproximadamente 50% sobre el basal, p90<sup>RSK</sup> sólo llega aproximadamente a la mitad).

Como control y para confirmar que la acidosis sostenida induce la activación en cascada de las quinasas MEK/ERK/p90<sup>RSK</sup>, la inhibición de la quinasa MEK canceló el aumento en la fosforilación de las quinasas (**Figura 13**).



**Figura 13. Efecto de SIL y de la inhibición de MEK sobre el estado de fosforilación de ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup>.** La acidosis sostenida aumentó significativamente la fosforilación de ERK1/2. Respecto de p90<sup>RSK</sup>, sólo se observó una tendencia a aumentar que no alcanzó un nivel estadísticamente significativo (véase el texto por detalles). Como era de esperar, el inhibidor de MEK U0126 canceló el aumento en la fosforilación de las quinasas, pero, en contraposición, SIL no las afectó permitiendo especular que su acción inhibitoria sobre el NHE1 pudiera ser una desfosforilación directa del intercambiador. **A)** Promedio de las fosforilaciones de ERK1/2 (en porcentaje respecto del control no acidótico), observándose un Western Blot típico en la parte superior del panel. **A')** Lo mismo que **A** pero en condiciones de acidosis transitoria. **B)** Lo mismo que **A** pero evaluando p90<sup>RSK</sup>. **B')** lo mismo que **B** pero en condiciones de acidosis transitoria. \*p<0.05 respecto a control no acidótico.

Es importante aclarar que la acidosis transitoria no afectó la fosforilación basal de ERK1/2 o p90<sup>RSK</sup> (**Figura 13A'** y **13B'** respectivamente), la cual tampoco fue modificada significativamente por la inhibición de MEK, coincidiendo con su carencia de efecto sobre la función del NHE1 en idénticas condiciones experimentales (**Figura 12E'**).

Nuestros resultados refuerzan el concepto que el sostenimiento de la acidosis es estímulo suficiente para disparar la activación de MAP quinasas, lo cual posteriormente se traduce en un aumento de actividad del NHE1 como se mostró antes en los experimentos funcionales.

Interesantemente, cuando se ensayó el efecto de SIL sobre las quinasas (cuyo efecto sobre la actividad del NHE1 era similar al obtenido con el inhibidor de MEK como se mostró en la **Figura 12**) se observó que no era capaz de impedir el aumento de su fosforilación (**Figura 13A**). Por otra parte, y de manera similar a lo observado con U0126, SIL tampoco tuvo efecto sobre la fosforilación de las quinasas en acidosis transitoria (**Figuras 13A'** y **13B'**).

Tomados en conjunto, los resultados hasta aquí presentados indicarían que la acción que el SIL ejerce sobre el NHE1 luego de una acidosis sostenida, estaría mediada por una vía de señalización que claramente no involucra una disminución en la fosforilación de las quinasas que actúan como intermediarias de su activación. Esto permitiría especular con la posibilidad de una acción directa del SIL sobre el estado de fosforilación del NHE1, para lo cual debiéramos pensar en la participación de alguna fosfatasa activable por SIL cuya consecuencia fuera la desfosforilación directa del NHE1.

## **Inhibición de la actividad del NHE1 por SIL. Participación de fosfatasas**

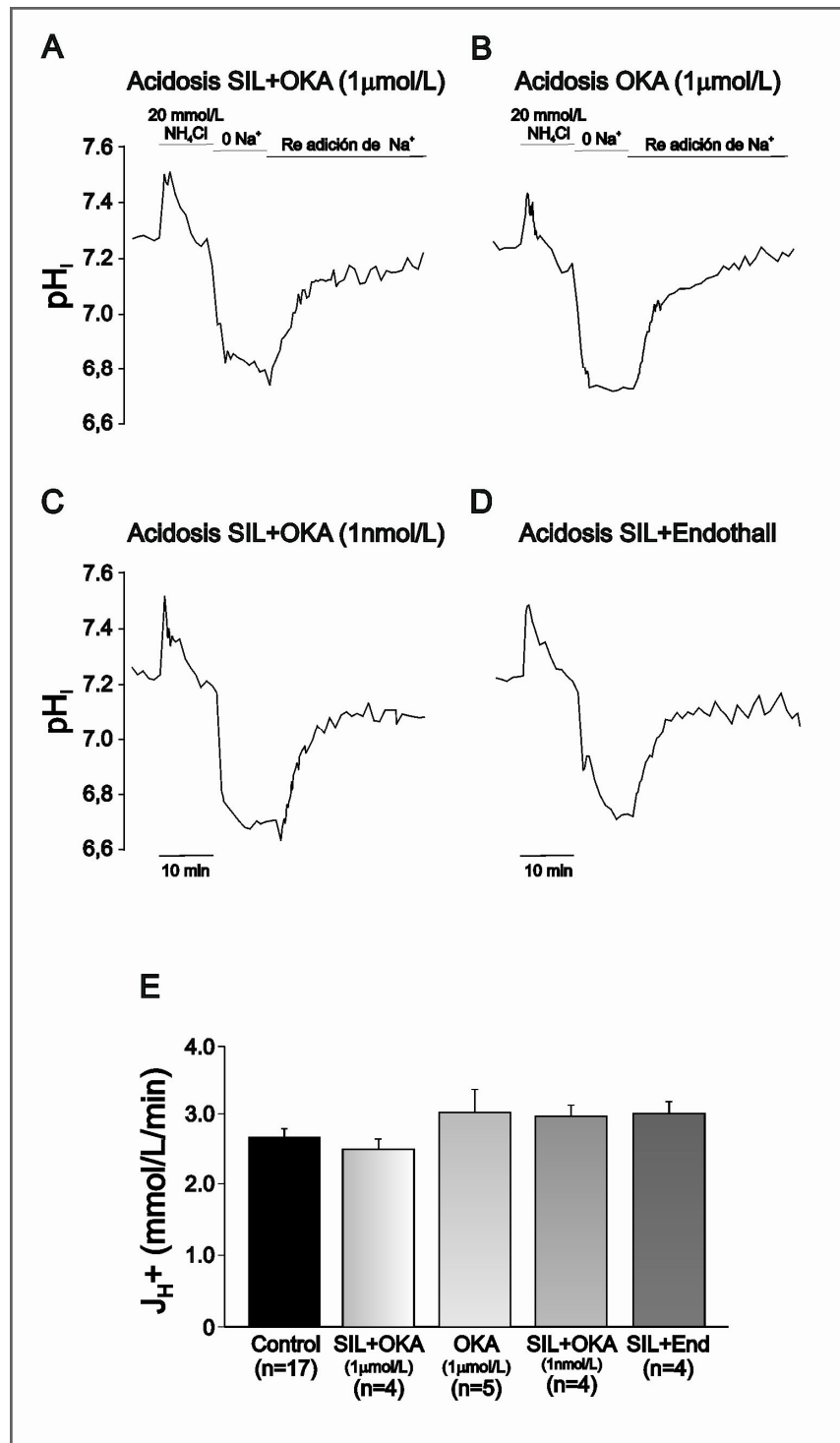
Sobre la base de lo descrito en el apartado anterior, nos abocamos a dilucidar si alguna de las fosfatasas más comúnmente estudiadas en cardíaco (PP1 y/o PP2A) estaba participando en la cascada de eventos disparada por SIL. Como se describió en la introducción, estas fosfatasas han sido documentadas como responsables del contrabalance de la acción de quinasas en el miocardio (Misik, Perreault et al. 2005; Snabaitis, D'Mello et al. 2006).

Como primera aproximación se usó ácido okadaico (OKA) a una concentración elevada (1  $\mu\text{M}$ ) suficiente como para inhibir ambas fosfatasa (Cohen, Holmes et al. 1990). La adición de 1  $\mu\text{M}$  de OKA previo al protocolo de pulso de amonio, canceló el efecto inhibitorio de SIL sobre la actividad del NHE1 (**Figura 14A**). Un análisis simplista de los resultados sería pensar que efectivamente la activación de una fosfatasa por SIL sería la responsable del efecto inhibitorio de este fármaco sobre el NHE1 y que el OKA, previniendo la activación de dicha fosfatasa, estaría revirtiendo su efecto. Sin embargo, otra posible explicación a este resultado podría ser que OKA, en su rol de inhibidor de fosfatasas, pudiera estar aumentando *per se* el nivel basal de fosforilación del NHE1 o tras acidosis sostenida compensando de este modo el efecto inhibitorio de SIL. Esta posibilidad fue desestimada dado que OKA en ausencia de SIL no generó un aumento mayor en la actividad basal del NHE1 que sea capaz de modificar el  $\text{pH}_i$  en estas condiciones ( $\text{pH}_i$  basal:  $7.22 \pm 0.04$  OKA vs.  $7.23 \pm 0.03$  OKA+SIL) ni la recuperación post acidosis sostenida (**Figura 14B**).

En este contexto, se podría concluir que el efecto inhibitorio de SIL sobre la actividad del NHE1 sería a través de la acción de alguna de las fosfatasas inhibibles por OKA, lo cual reduciría el nivel de fosforilación del NHE1 disminuyendo entonces su actividad. Con el objeto de diferenciar cual de las fosfatasas (PP1 o PP2A) estaba involucrada en este mecanismo empleamos un recurso descrito por Cohen (Cohen 1989), mediante el cual al reducir la concentración de OKA a 1  $\eta\text{M}$  se inhibe preferentemente la acción de PP2A sin afectar PP1. Como se observa en la **Figura 14C**, en estas condiciones experimentales se obtiene el mismo resultado que con la concentración alta de OKA, es decir reversión del efecto inhibitorio de SIL. En otras palabras, este resultado sugiere fuertemente que SIL ejercería una acción desfosforilante sobre el NHE1, mediada por PP2A, lo cual resulta en la inhibición de la actividad del intercambiador.

Para confirmar este hallazgo, se utilizó un inhibidor selectivo de PP2A como es el endothall (End, 100 $\mu\text{M}$ ) (Li, Mackintosh et al. 1993; Misik, Perreault et al. 2005; Snabaitis, D'Mello et al. 2006). Como se muestra en **Figura 14D y E**, en presencia de End se obtiene exactamente el mismo resultado que en presencia de OKA 1  $\eta\text{M}$ .

Estos resultados sustentan la idea que SIL provocará una disminución en la actividad del NHE1 post-acidosis sostenida mediante la activación de la fosfatasa PP2A, la cual desfosforilaría algún residuo del NHE1 fosforilable por las quinasas ERK1/2-p90<sup>RSK</sup>, sin afectar la actividad de estas últimas.



**Figura 14. Efecto inhibitorio de SIL sobre el NHE1, rol de las fosfatasas PP1 y PP2A.** La inhibición no selectiva de las fosfatasas PP1 y PP2A con una concentración elevada de OKA (1 $\mu$ M), restaura la recuperación normal del pH<sub>i</sub> luego de una carga ácida en presencia de SIL (A). OKA *per se* no tuvo efecto estimulador alguno sobre la actividad del NHE1 (B). Inhibiendo más selectivamente a PP2A con una menor concentración de OKA (1nM) (C) o con End (D) se observó el mismo resultado. Se muestran registros originales de pH<sub>i</sub> en los paneles A-D y los promedios generales de los J<sub>H+</sub> obtenidos con las presentes intervenciones en E. Para facilitar la comparación se incluye el promedio inicial de J<sub>H+</sub> en acidosis sostenida control presentado en la Figura 12E.

Dicho de otro modo, SIL provocaría un efecto desfosforilante directo sobre el efector final (el NHE1) por activación de la fosfatasa PP2A sin afectar las quinasas *upstream* del mismo.

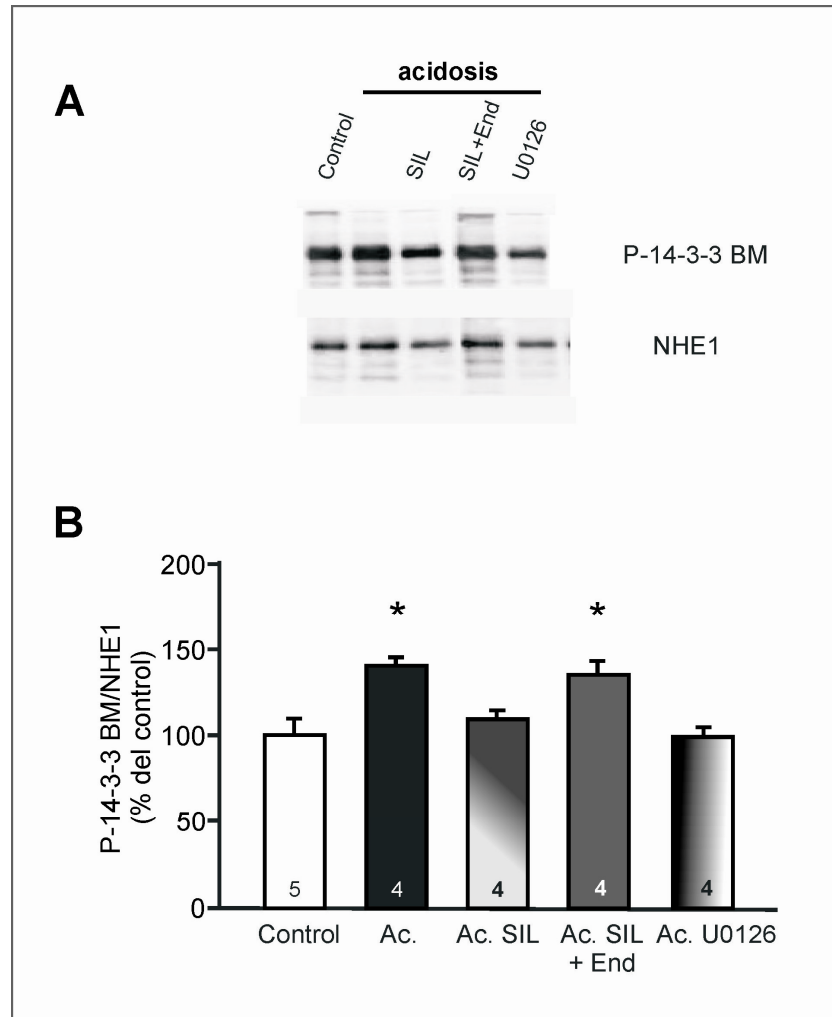
## **Rol del SIL en la fosforilación del NHE1 post acidosis sostenida**

Para comprobar a nivel molecular lo observado en experimentos funcionales decidimos analizar la fosforilación del intercambiador tras acidosis sostenida y como repercute sobre este estado la adición de SIL. Para ello, y como describimos en Materiales y Métodos, empleamos un recurso indirecto que en las condiciones experimentales propuestas evidencia el estado de fosforilación del residuo Serina 703 de la cola citosólica del NHE1. Brevemente, cuando dicho residuo se encuentra fosforilado, la cola citosólica adopta una disposición tal que permite ser reconocido por la proteína adaptadora 14-3-3, la cual se adhiere a ese segmento. Empleando un anticuerpo anti-motivo de unión para la proteína 14-3-3 (anti 14-3-3BM) para revelar una membrana proveniente de muestras a las que se realizó previamente una inmunoprecipitación con anticuerpo anti-NHE1, estamos en condiciones de afirmar que la señal obtenida de 14-3-3BM se debe exclusivamente a la interacción 14-3-3-NHE1 o, lo que es lo mismo, dado que dicha interacción ocurre solamente cuando el residuo Ser703 se encuentra fosforilado, a la fosforilación del NHE1 en ese residuo.

Con estas consideraciones en la **Figura 15** se muestran los resultados de dicho análisis de fosforilación. Como podemos observar, la exposición al estímulo ácido por un tiempo de 10 minutos, provocó un aumento en la fosforilación de Ser 703 del NHE1. Como era esperable, dicho aumento fue bloqueado en presencia de U0126 marcando claramente el rol que cumplen las MAP quinasas en la fosforilación de dicho residuo y en el consecuente impacto sobre la actividad del intercambiador mostrada anteriormente. La exposición a SIL previa acidosis sostenida previno la fosforilación del NHE1 en Ser 703, permitiendo explicar entonces el efecto de disminución del  $J_{H^+}$  observado en los experimentos funcionales como una consecuencia de la disminución del nivel de fosforilación final del mismo.

Interesantemente, la adición de End conjuntamente a la exposición a SIL previno la inhibición ocasionada por el inhibidor de la PDE5A, demostrando claramente que su

acción es a través de la actividad de la fosfatasa PP2A, la que a su vez, como demostramos en un apartado anterior, no tiene efecto sobre la actividad de las quinasas responsables de la fosforilación del NHE1 sino que actúa de manera directa sobre el intercambiador.



**Figura 15. Efecto inhibitorio de SIL sobre la fosforilación del NHE1.** Como se describió en los experimentos funcionales, el estímulo de acidosis sostenida aumenta la actividad del NHE1 y eso se correlaciona con un incremento en la fosforilación en Ser 703, dicho aumento se ve bloqueado en presencia de SIL y, como era de esperar, en presencia de U0126. Interesantemente, la adición de End al medio previene el efecto del SIL sobre la fosforilación del NHE1. Western blot típico (A) y promedios (B). \*  $p < 0.05$  vs. control no acidótico.

## XIII

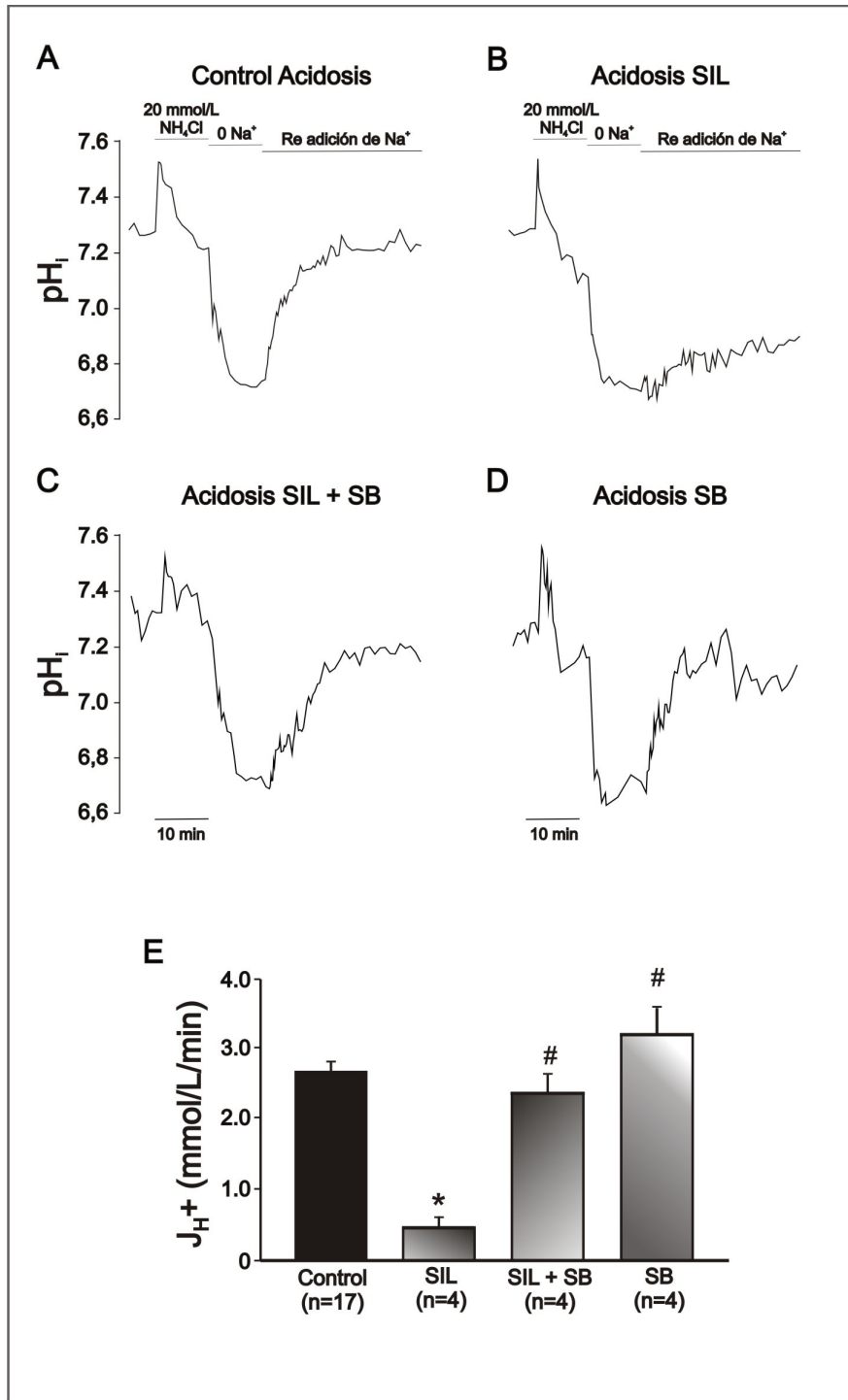
### **Activación de PP2A por PKG. Posible rol de la quinasa p38**

Sobre la base de los resultados anteriores nos propusimos dilucidar el camino que lleva a la activación de PP2A por SIL que resultados previos de nuestro grupo de trabajo nos indican que son enteramente dependientes de PKG (Perez, Piaggio et al. 2007). Para presentar los resultados que siguen creemos prudente hacer una breve introducción. Entre los sustratos conocidos de PKG se encuentra la quinasa p38 (Li, Zhang et al. 2006) que pertenece a la familia de las MAP quinasas y, dentro de éstas, a las consideradas convencionales. La p38 tiene la particularidad de regular negativamente al NHE1 (Kusuhara, Takahashi et al. 1998) oponiendo su acción al efecto estimulador que las quinasas activables por acidosis ERK1/2-p90<sup>RSK</sup> tienen sobre el mismo. Aunque no lo han podido demostrar experimentalmente, Kusuhara y col. (Kusuhara, Takahashi et al. 1998) sugieren que la regulación del NHE1 por p38 se realizaría mediante dos vías, una indirecta modulando la actividad de ERK1/2 y una directa presumiblemente a través de cambios en la fosforilación del intercambiador.

En este marco, nos preguntamos si los efectos de PKG sobre la actividad del NHE1 no serán en realidad el resultado de una activación por fosforilación de PP2A mediada por p38. Dicho de otro modo, nos propusimos probar la posibilidad de que una interacción PKG-p38-PP2A pueda explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral.

Para evaluar si existe participación de p38 en la vía desencadenada por SIL en acidosis sostenida, empleamos inicialmente un inhibidor de dicha quinasa SB202190. Como se muestra en la **Figura 16C** y **E**, la inhibición de p38 previno el efecto sobre la actividad del NHE1 inducido por SIL. Este primer resultado sugiere que p38 y PKG tienen un efecto inhibitorio similar sobre el intercambiador, pero no permite establecer claramente si están involucrados en la misma vía de señalización.





**Figura 16. Efecto de la inhibición de p38 sobre el NHE1.** La inhibición de p38 con SB202190 (10 $\mu\text{M}$ ) conjuntamente al agregado de SIL, restaura la recuperación normal del pH<sub>i</sub> luego de una carga ácida como se observa en el registro original (C) y en el promedio general de las intervenciones realizadas (E). Inhibiendo solamente a la quinasa p38 se observó una tendencia al aumento en la actividad del intercambiador respecto de la condición control como se muestra en el registro original (D) y en el promedio general (E) que no alcanzó un nivel estadísticamente significativo. Para establecer una adecuada comparación repetimos los registros originales y promedios presentados en la **Figura 12** de acidosis sostenida control (A y E), y acidosis en presencia de SIL (B y E). \* p<0.05 vs. Acidosis sostenida 10 minutos; # p<0.05 vs. Acidosis sostenida 10 minutos + SIL.

Cuando estudiamos la inhibición de p38 *per se* sobre la actividad del NHE1 (es decir, sin otros compuestos agregados), se observó una tendencia a aumentar la actividad del intercambiador respecto a la condición control pero que no alcanzó un nivel estadísticamente significativo (**Figura 16 D y E**). A pesar de ello, esto podría estar sugiriendo algún efecto inhibitorio adicional sobre el NHE1 por parte de p38 en acidosis sostenida pero que no impediría pensar que SIL pudiera estar potenciando dicha función inhibitoria. Independientemente de ello, la posibilidad de un efecto inhibitorio *per se* por parte de p38 sobre el NHE1 es una alternativa interesante que merece ser explorada mediante experimentos futuros.

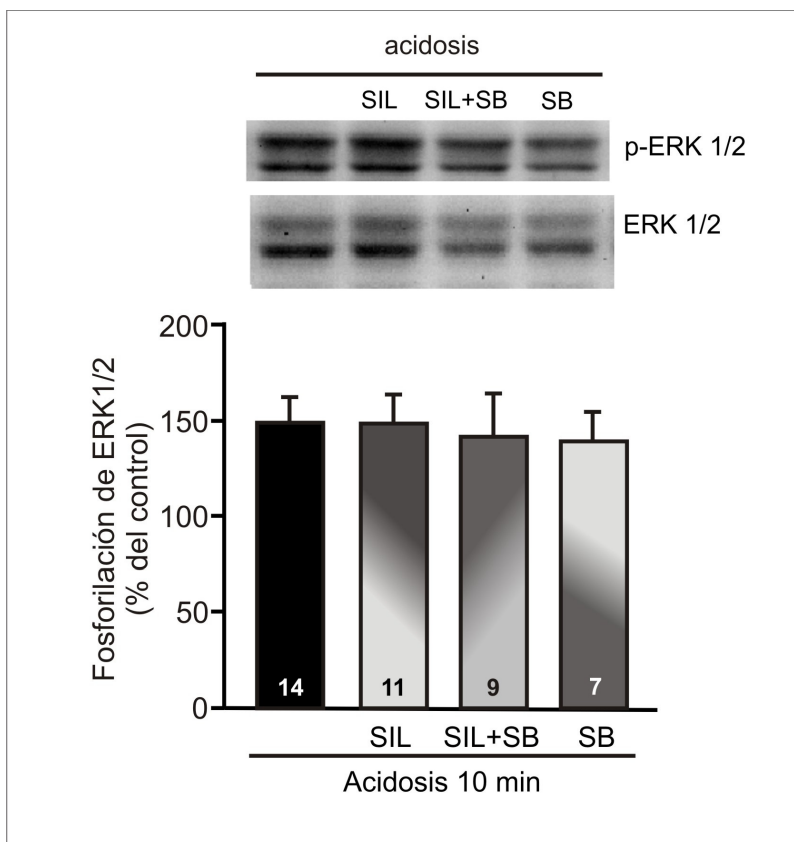
Un detalle importante a destacar es que sea cual fuere la acción puntual de p38 sobre el NHE1, los cambios que produjo sobre su actividad sólo se manifestaron en la recuperación del  $\text{pH}_i$  tras acidosis sostenida, sin alterar el  $\text{pH}_i$  basal (control acidosis:  $7.28 \pm 0.01$ ,  $n=17$  vs. SB202190:  $7.22 \pm 0.03$ ,  $n=4$ ), lo cual coincide con lo observado en presencia de SIL.

Los experimentos presentados en esta sección son muy interesantes pero no permiten establecer si PKG y p38 forman parte o no de una misma vía de señalización, interrogante que intentaremos dilucidar en una sección posterior.

## **La inhibición de p38 no afecta el estado de fosforilación de las quinasas**

Para clarificar un poco más esta posible secuencia de eventos y dado que existen trabajos de otros grupos de investigación en los cuales se postula que p38 es un regulador de la actividad de las quinasas de la familia de MEK/ERK/p90 (Kusuhara, Takahashi et al. 1998), decidimos evaluar si la actividad de p38 está relacionada o no con la fosforilación de estas quinasas en nuestras condiciones experimentales. Dado que como se mostró en la **Figura 13**, sólo hemos podido detectar cambios significativos en la fosforilación de ERK1/2 (pero no de  $\text{p90}^{\text{RSK}}$ ) mostraremos los efectos de la inhibición de p38 solamente sobre estas quinasas. La **Figura 17** muestra que la acidosis sostenida luego de inhibir conjuntamente p38 y PDE5A no modificó significativamente el nivel de fosforilación de ERK1/2 observado tanto en acidosis sostenida sola como luego del agregado de SIL. Este resultado sugiere que el efecto inhibitorio de SB202190 sobre la

cancelación de la actividad del NHE1 por SIL tal vez se deba a que tanto PKG como p38 están formando parte de una misma vía de señalización que no afecta la actividad de las quinasas activables por acidosis sostenida. La inhibición de p38 tampoco afectó *per se* la fosforilación de ERK1/2 (**Figura 17**).



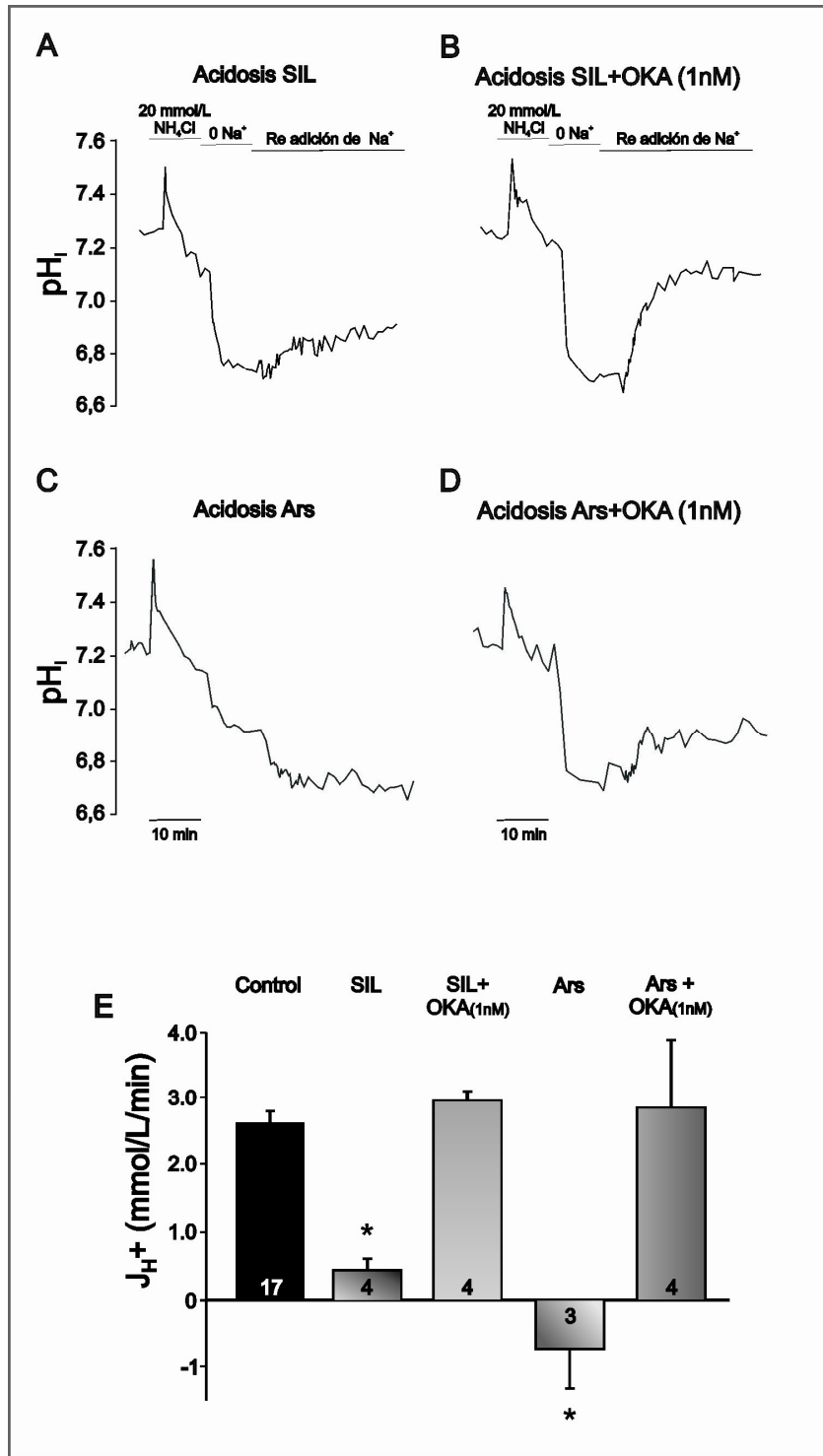
**Figura 17. Efecto de la inhibición de p38 sobre la actividad de las quinasas activables por acidosis sostenida.** El aumento en la fosforilación de ERK1/2 tras acidosis sostenida no fue afectado por la inhibición de p38 con SB202190 (10 $\mu$ M), de PDE5A con SIL (1 $\mu$ M) o de ambas enzimas simultáneamente (para facilitar la comparación se repiten los valores obtenidos para acidosis sostenida y acidosis sostenida más SIL mostrados en la **Figura 13**).

## **PP2A media el efecto inducido por activación de p38 sobre el NHE1 en acidosis sostenida**

Como vimos antes, la inhibición de p38 elimina el efecto de SIL sobre el NHE1. Además ambas intervenciones transcurren sin alterar el estado de fosforilación de las quinasas que normalmente activarían al NHE1 tras acidosis sostenida. Nos preguntamos

entonces si la activación de fosfatasa será el intermediario de los efectos de p38 sobre el NHE1 como demostramos para SIL. En tal sentido, recordemos que la actividad inhibitoria desencadenada por SIL sobre el NHE1 involucra una desfosforilación del residuo citosólico de Ser 703, que se fosforila tras acidosis sostenida (**Figura 15**), y que la responsable de dicha desfosforilación es la fosfatasa PP2A (**Figura 14**). En este apartado testamos los efectos de un conocido activador de p38 como es el Arsenito de Sodio (Duynham, Hulscher et al. 2003; Trouba and Germolec 2004) sobre la actividad del NHE1, empleado en una concentración del orden micromolar para minimizar su acción proapoptótica. Como vemos en el panel C de la **Figura 18**, en presencia de Arsenito, la actividad del NHE1 se ve sensiblemente afectada, mucho más aún de lo que puede deprimirse en presencia de SIL. Pero, interesantemente, esos efectos inhibitorios se previenen cuando se inhibe a la fosfatasa PP2A con OKA 1  $\mu$ M, lo que nos estaría indicando que los efectos derivados de la acción de p38 sobre el NHE1 involucran la participación de la fosfatasa PP2A.

Tomando en conjunto estos resultados, se podría sugerir que en la vía de señalización que va desde la activación de PKG por SIL hasta la inhibición del NHE1 estaría involucrada la quinasa p38, ya que tal regulación negativa se revierte inhibiendo esta última quinasa y se mimetiza con un estimulador de la misma como el Arsenito de sodio. Es importante destacar que en todos estos experimentos se descarta una acción de los compuestos usados sobre la actividad basal del intercambiador, ya que ninguna de las intervenciones realizadas en esta etapa ocasionaron un cambio significativo sobre el  $pH_i$  basal (SB202190+SIL:  $7.27 \pm 0.05$ , n=4; Ars:  $7.09 \pm 0.14$ , n=3; Ars+OKA:  $7.21 \pm 0.06$ , n=4 vs. control acidosis:  $7.28 \pm 0.01$ , n=17). Además, y dado que en todos los procedimientos experimentales se arribó a la misma condición acidótica  $pH \sim 6.70$  y se registraron capacidades buffer similares (**Tabla 4**), podemos aseverar que los cambios medidos en la actividad del NHE1 se deben exclusivamente a acciones directas sobre el intercambiador y no sobre la variación de las concentraciones intracelulares de los iones que intercambia que pudieran modificar su actividad o a cambios en la capacidad buffer de las células. Al igual que lo mostrado en la primera parte, para validar la comparación de las distintas intervenciones sobre la actividad del NHE1, los  $J_{H^+}$  fueron calculados a  $pH 6.75$ .



**Figura 18. Efecto la activación de p38 sobre el NHE1.** La activación de p38 con Arsenito de Sodio (Ars: 5 $\mu\text{M}$ ) deprime significativamente la actividad del NHE1 luego de una acidosis sostenida como se muestra en el registro original (C) y en el promedio general de las intervenciones realizadas (E). Esta inhibición puede prevenirse por inhibición de la fosfatasa PP2A con OKA (1nM), como se muestra en el registro original (D) y en el promedio general (E). Para facilitar la comparación se repiten los registros originales y promedios de acidosis sostenida en presencia de SIL presentados en la Fig. 12A y E, los de acidosis sostenida en presencia de SIL+OKA mostrados en la Fig. 14B y E, y el promedio general correspondiente a acidosis control. \*  $p < 0.05$  vs. Acidosis sostenida 10 minutos.

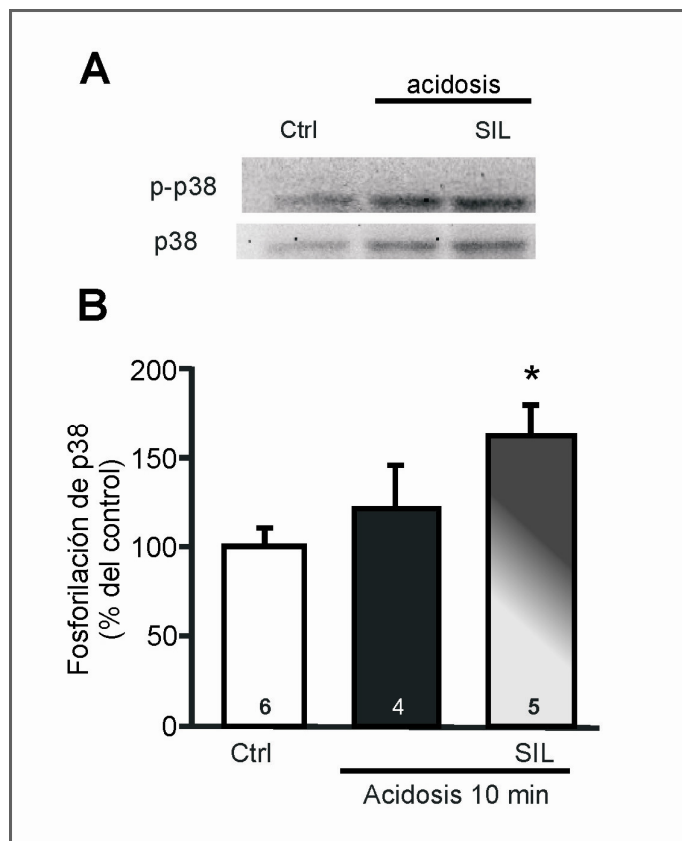
Grupos experimentales	pH <sub>i</sub>	β <sub>i</sub> (mmol/L)
<b>Acidosis 10 min</b>		
Control (n=17)	6,75 ± 0,01 <sup>θ</sup>	27,8 ± 0,4 <sup>θ</sup>
SB202190 (n=4)	6,69 ± 0,04	29,2 ± 0,5
SIL+SB202190 (n=4)	6,68 ± 0,04	28,6 ± 0,5
Ars (n=3)	6,71 ± 0,01	29,5 ± 0,3
Ars+OKA 1ηM (n=4)	6,68 ± 0,01	29,3 ± 0,4

**Tabla 4.** pH<sub>i</sub> en la máxima acidificación y capacidad buffer en cada condición experimental ensayada en esta segunda parte. <sup>θ</sup> condición control presentada en la Tabla 3 (se muestra para facilitar la comparación).

## Sildenafil induce activación de p38

Para comprobar si efectivamente p38 es un intermediario en la vía de señalización desencadenada a partir de la inhibición de la PDE5A por SIL decidimos realizar un último ensayo experimental. Para ello en los mismos preparados de músculos papilares sometidos a acidosis durante 10 minutos medimos activación de p38, de manera análoga a ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> mediante Western Blot. Como vemos en la **Figura 19**, la adición de SIL al buffer 20 minutos antes de practicar el pulso de amonio, promueve un aumento en la fosforilación de p38 (que puede traducirse como un aumento en su actividad) que es significativo respecto al control no sometido a acidosis. Existe un incremento del estado de fosforilación de dicha quinasa por el estímulo de acidosis en sí mismo que a pesar de no ser estadísticamente significativo podría relacionarse con ese posible efecto adicional provocado por el inhibidor de p38 que hemos mostrado y comentado en un apartado anterior (**Figura 16E**) y tal vez también con el contundente efecto inhibitorio del inductor de p38 sobre el NHE1 (**Figura 18E**).

Estos datos sugieren fuertemente la participación de p38 en la vía GMPcíclico/PKG que regula la actividad del NHE1 a través de una desfosforilación por la fosfatasa PP2A. Por otro lado, y aunque nuestros resultados no son estadísticamente significativos, permiten sugerir la posibilidad de sumar una nueva quinasa a la regulación del NHE1 por acidosis sostenida en músculo cardíaco de rata, la p38 MAP quinasa, en línea con lo sugerido antes por Zheng y col. (Zheng, Hou et al. 2004; Zheng, Reynolds et al. 2005).



**Figura 19. Efecto de SIL sobre la activación de p38.** La inhibición de la PDE5A con SIL (1 $\mu$ M) promueve un aumento de la fosforilación de la quinasa p38. La acidosis *per se* provocó un aumento del estado de fosforilación de la quinasa que no alcanzó un nivel estadísticamente significativo. Western Blot típico (A) y promedio de las intervenciones realizadas (B). \*  $p < 0.05$  vs. control no acidótico.

## **DISCUSIÓN**



## XIV

### **Activación del NHE1 post-acidosis sostenida**

La relevancia del estudio de las vías de regulación del NHE1 en el corazón radica en la amplia relación que dicho intercambiador tiene con diversas patologías cardiovasculares (Karmazyn, Gan et al. 1999; Malo and Fliegel 2006; Cingolani and Ennis 2007). Desde que se ha descrito su sobreactivación en diversos procesos que comprometen el rol de bomba del corazón como en el remodelamiento post infarto de miocardio o en la sobrecarga hemodinámica crónica, todos procesos que generalmente conducen al desarrollo de insuficiencia cardíaca, las acciones tendientes a caracterizar las diversas rutas que llevan a su hiperactivación como así también los posibles mecanismos inhibidores de las mismas han cobrado un rol protagónico en la fisiología cardíaca de los últimos 15-20 años. El tema reviste un profundo interés desde las ciencias básicas pero a su vez es observado con especial atención por la cardiología clínica en su afán por encontrar nuevas terapias que permitan reducir la morbimortalidad por causa cardiovascular, hoy en día la principal causa de muerte en las sociedades occidentales.

La isquemia tisular, evento relacionado a diversas patologías del miocardio, genera acidosis intracelular (Ingwall 1982) que se sostiene mientras persiste el episodio isquémico. Como ya hemos mencionado en párrafos anteriores, la acidosis sostenida modifica la actividad del NHE1 por dos mecanismos independientes:

-El primero responde a una regulación alostérica por parte de los iones  $H^+$  cuyo sitio de regulación se halla en el dominio de transmembrana del NHE1 (Wakabayashi, Bertrand et al. 1994)

-El segundo responde a un cambio en el estado de fosforilación de la cola citosólica del intercambiador que puede modificarse por la acción de hormonas y/o factores de crecimiento, pero también por el tiempo de sostenimiento de la acidosis.

El presente trabajo se ha focalizado en el estudio de los mecanismos que subyacen a la fosforilación del NHE1 por acidosis sostenida y como incide en dicho proceso la activación de la ruta GMPc/PKG.

Los resultados han mostrado que el valor de  $J_{H^+}$  medido post acidosis sostenida es mayor al medido post acidosis transitoria, evidenciando en la primera de estas condiciones la presencia del citado mecanismo de fosforilación, que sumado a la estimulación desde el sitio alostérico determina la actividad final del intercambiador.

Esto va de la mano con resultados de grupo de Fliegel (Fliegel and Karmazyn 2004) que muestran que realizando deleciones en sitios potencialmente fosforilables de la cola citosólica se anula aproximadamente el 50% de la actividad del NHE1 promovida por factores de crecimiento, y experimentos del grupo de Maekawa (Maekawa, Abe et al. 2006) que también evidencian una diferencia entre las actividades del NHE1 en estado basal y post estimulación por fosforilación por quinasas.

También hemos mostrado que la sobreactivación del NHE1 post acidosis sostenida se anula en presencia de un inhibidor de MEK, quinasa *upstream* ERK1/2-p90<sup>RSK</sup> (**Figura 13**).

Aunque existen reportes que sostienen que el aumento de la actividad del NHE1 tras acidosis sostenida es solamente debida a la activación de la quinasa ERK1/2 y no a p90<sup>RSK</sup> (Karki, Coccaro et al. 2010), se ha señalado la responsabilidad de ambas en la activación del NHE1 en eventos acidóticos o isquémicos en varios tipos celulares (Manhas, Shi et al.; Wang, Silva et al. 1997; Maekawa, Abe et al. 2006; Luo, Kintner et al. 2007), como así también que el residuo Ser 703 formaría parte de la secuencia descrita como consenso para fosforilación por p90<sup>RSK</sup> (Takahashi, Abe et al. 1999). La potenciación de la actividad del NHE1 por las quinasas ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> no es un mecanismo que se circunscriba solamente al evento de acidosis sostenida, sino que también se ha descrito en activación por estiramiento (Caldiz, Diaz et al. 2011), por elevación de la presión hidrostática (Mandal, Shahidullah et al. 2009), en respuesta a alteraciones extracelulares de iones como el Zinc (Azriel-Tamir, Sharir et al. 2004) y en las vías de señalización disparadas por mitógenos como Ang II, Aldosterona y Fenilefrina (Garnovskaya, Mukhin et al. 2003; Coccaro, Karki et al. 2009; De Giusti, Nolly et al. 2011). Es más, en un trabajo reciente de nuestro grupo, hemos mostrado que la inhibición específica de p90<sup>RSK</sup> cancela eventos post estiramiento del miocardio que tienen a la activación por fosforilación del NHE1 como punto crucial (Vargas, Diaz et al. 2013), remarcando así el rol regulatorio que dicha quinasa tiene en la actividad del intercambiador.

## Perfil de activación del NHE1 y su relación con la inhibición de la PDE5A

Respecto al perfil de actividad del NHE1 en acidosis sostenida, mostramos que la activación dependiente de fosforilación del intercambiador presenta un máximo entre los 3 y 5 minutos de acidosis para luego caer gradualmente a medida que aumenta el tiempo de exposición al estímulo ácido. Por razones metodológicas vinculadas al uso de preparaciones multicelulares no hemos podido efectuar determinaciones a tiempos menores a 3 minutos de acidosis sostenida, lo cual puede interpretarse como una falla en la caracterización del perfil de activación del NHE1. En tal sentido, resultados previos de otros autores (Haworth, McCann et al. 2003) demuestran en miocitos aislados que a tiempos comprendidos entre 1 y 6 minutos, la actividad del NHE1 presenta un patrón *in crescendo* y se corresponde, al igual que en nuestros resultados, con un aumento en la fosforilación de las MAP quinasas. En diversos trabajos con distintos estímulos sostenidos en el tiempo, como Ang II (Kusuhara, Takahashi et al. 1998), inhibición de la síntesis de glutatión (Kusuhara, Takahashi et al. 1998; de Bernardo, Canals et al. 2004; Wang, Liu et al. 2011), se ha visto que la activación de las quinasas que como mostramos estarían implicadas en la regulación de la actividad del NHE1 tras acidosis sostenida (principalmente ERK1/2) presenta un perfil en el tiempo similar al que mostramos para su efector final (**Figura 11**). El hecho que este aumento de actividad del intercambiador no llegue a un estado estacionario sino que disminuya emulando el patrón de las quinasas, podría interpretarse como el resultado de un balance continuo entre la actividad de quinasas y fosfatasa que determinarían cuál será el grado final de activación del NHE1.

Un dato interesante que surge de la comparación con el trabajo de Haworth y col. (Haworth, McCann et al. 2003), realizado en células ventriculares aisladas de rata neonata en el cual, a diferencia de nuestro preparado, se pierden las conexiones intercelulares y el contacto con su matriz extracelular, es la existencia de diferencias en los  $J_{H^+}$  que se obtienen tras la inhibición de MEK. Más allá de las diferencias experimentales los  $J_{H^+}$  en acidosis sostenida en presencia de U0126 son menores a los controles acidóticos pero resultan mayores a los obtenidos en acidosis transitoria. En este último punto nuestros resultados no siguen la misma tendencia. Explorando esta diferencia, mostramos que tanto en presencia de U0126, de SIL, como de ambas

intervenciones farmacológicas, los  $J_{H^+}$  y el grado de fosforilación del NHE1 en el residuo Ser 703, medidos tras acidosis sostenida, alcanzan valores similares entre sí. Esto nos indicaría o bien que ambas drogas operan a través de un nexo común o que a primera vista existiría un máximo de inhibición posible por esta vía y sería el alcanzado en cada una de las intervenciones individuales planteadas. Si especuláramos con la posibilidad que se alcance un máximo de inhibición por modulación del grado de fosforilación de la cola citosólica en el residuo Ser 703, cabría esperar similares valores en la actividad del NHE1 tanto en presencia de los factores que inhiben la fosforilación post acidosis sostenida como cuando no se alcanza el tiempo suficiente como para activar las quinasas responsables de dicha fosforilación, es decir, en acidosis transitoria. Sin embargo, esto no fue así. El mayor descenso de actividad a los 10 minutos respecto a acidosis transitoria invalida la hipótesis de la existencia de un máximo de inhibición. Probablemente estas diferencias se deban a un efecto promovido por los cambios en el gradiente de  $Na^+$  ocurridos tras la readición de este ión al medio, luego de una extensa deprivación de  $Na^+$  en acidosis sostenida, dado que a diferencia de los experimentos de Haworth y col. nuestro modelo experimental de acidosis sostenida implica una prolongada deprivación de  $Na^+$ .

Un tópico a considerar en la activación del NHE1 tras acidosis sostenida es la fosforilación en el residuo Ser 703. En función de los resultados mostrados en el presente Trabajo de Tesis, la acidosis sostenida aumenta claramente los niveles de fosforilación en ese residuo de la cola citosólica del intercambiador y dicha fosforilación es dependiente de las quinasas activadas por MEK. Como describimos en Materiales y Métodos, la determinación es indirecta ya que empleamos un anticuerpo que reconoce el motivo de unión de la proteína 14-3-3 al residuo Ser 703 fosforilado, sobre una muestra con NHE1 inmunoprecipitado, método demostrado como una herramienta muy útil en la determinación de la fosforilación del NHE1 por ERK-p90<sup>RSK</sup> (Takahashi, Abe et al. 1999; Lehoux, Abe et al. 2001). Pero debe tenerse presente que no es el único residuo de la cola citosólica del NHE1 susceptible de ser fosforilado. En tal sentido, un trabajo previo de Karki y colaboradores (Karki, Coccaro et al. 2010) muestran que en acidosis sostenida juegan un papel importante los residuos Ser 770 y 771, potencialmente fosforilados por ERK1/2 pero no por p90<sup>RSK</sup>, mientras que Liu y colaboradores (Liu, Stupak et al. 2004) han considerado entre los sitios putativos de diferentes quinasas a Ser 693, Thr 717, Ser 722, Ser 725, Ser 728; Ser 766, Ser 779 y Ser 785. Además, Snabaitis y colaboradores (Snabaitis, Cuello et al. 2008) postularon

una fosforilación inhibitoria por PKB del NHE1 en el residuo Ser 648. En nuestras condiciones experimentales hemos podido demostrar que acción inhibitoria de PKG sobre el NHE1 es consecuencia de la cancelación de la fosforilación del intercambiador mediada por las quinasas ERK1/2-p90<sup>RSK</sup> en el residuo Ser 703. Sin embargo, nuestros resultados no permiten descartar la posibilidad que PKG estuviera modulando la fosforilación de otro residuo distinto a Ser 703. Como discutiremos más adelante, dado que las acciones de PKG respecto a la actividad del NHE1 resultaron completamente revertidas en presencia de distintos inhibidores de PP2A, no parecería posible *a priori* la existencia de una fosforilación inhibitoria directa de PKG sobre el NHE1.

Otro punto interesante en la señalización involucrada en la activación del NHE1 post acidosis sostenida por las quinasas ERK1/2-p90<sup>RSK</sup> es, como hemos mencionado en la introducción, que la activación de estas quinasas se halla íntimamente relacionada a la formación y liberación de especies reactivas del oxígeno (Yamakawa, Tanaka et al. 2002; O'Flaherty, de Lamirande et al. 2006; Son, Cheong et al. 2011). Sin embargo, en nuestro caso el efecto final resulta insensible un barredor de ROS como es el MPG, lo cual obligaría a hacer una diferenciación en el camino que conduce a la activación de ERK1/2 tras acidosis sostenida, respecto por ejemplo del que se sucede tras estímulos que igualmente culminan en una activación del NHE1 vía ERK1/2 como Ang II, ET1 y estiramiento miocárdico (Sabri, Byron et al. 1998; Caldiz, Garcarena et al. 2007). El hallazgo de la existencia de vías paralelas en la activación de ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> a las consensuadamente descritas para la activación del NHE1 por dichas quinasas se ha visto previamente en la señalización dependiente de Ang II en aorta, en la cual, en concordancia con nuestros resultados, coexisten dos vías de activación paralelas, una dependiente y otra independiente de especies reactivas del oxígeno (Frank, Eguchi et al. 2000; Stouffer, Patterson et al. 2001). Por otra parte, y en línea con nuestros resultados, en el daño isquémico cerebral inducido por acidosis se ha cuestionado la participación de radicales libres al no detectar especies reactivas del oxígeno tras episodios cortos de isquemia cerebral (Lundgren, Zhang et al. 1991). Esto nos llevaría a pensar que tal vez la falta de participación de ROS en la vía que conduce a la activación del NHE1 dependiente de quinasas tras acidosis sostenida, sea un evento común a isquemias en diferentes tejidos.

## XV

# Regulación de la actividad del NHE1

## Dilucidando el mecanismo de la regulación por Sildenafil

El tópico más importante abordado en el presente Trabajo de Tesis es la relación entre el intercambiador NHE1 y la activación de la vía GMPc/PKG promovida por el agregado de SIL. Dado que muchas de las patologías caracterizadas por una exacerbada actividad del NHE1 cursan con acidosis sostenidas cuya duración es variable, la decisión de mostrar el perfil de activación del NHE1 en función de la duración de la acidosis y el efecto que sobre la misma ejerce la activación de PKG permite explicar tanto los mecanismos que se suceden en ellas como la posible regulación de los mismos en presencia de SIL, justificando el rol beneficioso que cumple dicho compuesto en la prevención de disfunciones cardíacas (Perez, Piaggio et al. 2007; Takimoto, Champion et al. 2005; Nagayama, Hsu et al. 2009).

Como hemos visto en trabajos anteriores, la presencia de SIL atenúa la respuesta del NHE1 en acidosis sostenida y esta acción es enteramente dependiente de la activación de la PKG (Perez, Piaggio et al. 2007). Nuestros resultados muestran que dicha inhibición se mantiene independientemente del tiempo que dure el estímulo acidótico pero no puede apreciarse cuando la acidosis es transitoria o en condiciones basales. Este es un hecho interesantísimo, ya que estaría demostrando que SIL solamente promovería la inhibición del NHE1 en estado de sobreactivación, preservando su importantísima actividad basal o “housekeeping”. Este no es un dato menor, sino que representaría una ventaja de este tipo de compuestos con respecto a otros fármacos que anulan completamente la actividad del intercambiador sin discriminar entre su estado basal y su sobreactivación. Por un lado explicaría la falta de resultados positivos concluyentes en los estudios clínicos realizados con conocidos inhibidores del NHE1 (Murphy and Allen 2009), pero por el otro pondría a los inhibidores de PDE5A en una posición expectante desde el punto de vista de su potencial uso clínico. Justamente han sido diseñados y llevados a cabo tanto estudios preclínicos en ratones sometidos a constricción aórtica transversa como modelo hipertrofiante (Nagayama, Hsu et al. 2009), en los que se

demuestra que la terapia oral con SIL inhibe el desarrollo de hipertrofia progresiva, con consecuente dilatación del VI, como así también mejora la contractilidad cardíaca y el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Asimismo se han evaluado los beneficios del uso de SIL en el tratamiento de variadas patologías cardiovasculares como miocardiopatía diabética (Giannetta, Isidori et al. 2012), insuficiencia cardíaca sistólica (Guazzi, Vicenzi et al. 2010) y diastólica (Redfield, Borlaug et al. 2012), donde no sólo se ha pensado en los potenciales beneficios de su acción vasodilatadora sino que también se ha considerado esta novedosa acción antihipertrófica y cardioprotectora. Brevemente en el estudio clínico de Giannetta y col. (Giannetta, Isidori et al. 2012) en pacientes con cardiomiopatía diabética asintomática, caracterizado por hipertrofia concéntrica sin variaciones en la performance, el tratamiento diario con 100mg de SIL vía oral durante 3 meses provocó un mejoramiento en el volumen de fin de diástole y en el índice de concentricidad, como así también en la rotación axial cardíaca durante la contracción del VI (*torsion*) y en el acortamiento entre los ejes largos de VI (*strain*), estos últimos parámetros sistólicos relacionados con el desarrollo progresivo de hipertrofia y disfunción cardíaca. El estudio randomizado llevado a cabo por Guazzi y col. (Guazzi, Vicenzi et al. 2010) implicó la administración de 50mg de SIL en 3 dosis diarias durante un año a pacientes con insuficiencia cardíaca con un marcado descenso de la función diastólica, en ellos SIL se demostró no sólo un mejoramiento de dicha función sostenido en el tiempo, sino que también una disminución de la presión de llenado del VI y disminución del espesor septal. Además en el cuadro de IC se evidenció un descenso significativo de la presión sistólica de la arteria pulmonar y una mejora en la capacidad respiratoria y en la respuesta al test de ejercicio cardiopulmonar. Por último, se está llevando a cabo el estudio denominado RELAX (Redfield, Borlaug et al. 2012), que se propone demostrar el efecto positivo de la administración de SIL en el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca diastólica, o insuficiencia cardíaca con preservación de la fracción de eyección, en la capacidad frente al ejercicio y en el estatus clínico.

Por otra parte y volviendo al concepto que tanto SIL, vía PKG, como U0126, inhibiendo la activación de las quinasas ERK1/2 y p90RSK por MEK, pudieran confluir sus acciones en un punto común, quisimos evaluar si es que SIL estaría actuando a través de la inhibición de estas quinasas impidiendo su fosforilación o propiciando su desfosforilación. Este planteo se basó en la observación de la dependencia que muestra la actividad del NHE1 respecto a la fosforilación propiciada por dichas quinasas, la

anulación de tales efectos en presencia de SIL y la reversión de los mismos con inhibidores de fosfatasas. Respaldando esta hipótesis, resultados de otros investigadores (Taglieri, Monasky et al. 2011) muestran que el desbalance entre las actividades antagónicas de PP2A y ERK1/2 conducen a hipertrofia y ambas proteínas forman parte de una misma vía de señalización afectando la primera la actividad de la última. Sin embargo, en nuestro modelo fue descartada rápidamente al observar que SIL no modifica los niveles de fosforilación de las quinasas tras acidosis sostenida, lo que nos lleva a especular que el nexo común sea directamente la acción sobre el NHE1.

## **Secuencia de eventos hacia la inhibición del NHE1 por Sildenafil. Rol de PP2A**

Profundizando en el mecanismo que subyace a la inhibición del NHE1 tras la estimulación de la vía GMPc/PKG por SIL, hallamos que un eslabón importante de la cadena es la activación de la fosfatasa PP2A, a cuyo cargo estaría la desfosforilación del NHE1. Otros autores, de manera análoga a la nuestra, han demostrado que ciertas acciones de PKG son mediadas por PP2A. Tal es el caso de Li y col. (Li, Martin et al. 2001) quienes postulan que la secreción de mucina de las células goblet es controlada por secretagogos mediante la activación de una vía óxido nítrico dependiente que involucra secuencialmente la activación de PKG y PP2A. En músculo liso se ha descrito la participación de la ruta PKG/PP2A en el proceso de relajación, no sólo por activación de canales de  $K^+$  sino además por activación de la proteína fosfatasa de la cadena liviana de miocina (MLCP) la que directamente desacoplaría el enlace acto-miosínico (Lincoln 2007). Tanto en nuestro trabajo, como en otros de nuestro mismo grupo (Garciaarena, Fantinelli et al. 2011), se ha visto que el uso de SIL inhibe la actividad del NHE1 por afectar su estado de fosforilación en el residuo citosólico Ser 703. La existencia de un efecto modulador directo de la actividad del NHE1 por parte de PP2A también ha sido descrita por otros autores (Snabaitis, D'Mello et al. 2006), quienes además evidenciaron la existencia de una marcada co-localización entre PP2A y NHE1 en miocitos sometidos a estímulo adrenérgico. Sin embargo un trabajo de nuestro mismo laboratorio (Yeves, Garciaarena et al. 2010) muestra que en acidosis sostenida en músculos papilares de gato, la fosfatasa PP1 sería la responsable de mediar los efectos de SIL, hallazgo que concuerda con los resultados de Misik y col. (Misik, Perreault et al.



2005), realizados en células AP1, en los cuales mientras que PP1 desfosforilaría al NHE1, PP2A no lo haría completamente. La inconsistencia respecto a cual es la fosfatasa a cargo de la desfosforilación del NHE1 no ha podido dilucidarse, probablemente ambas desfosforilen distintos residuos de la cola citosólica o haya diferencias en los tejidos y/o especie animal analizada por cada autor.

De todas maneras y, en conexión con nuestros hallazgos, acciones benéficas devenidas de la actividad de PP2A se han descrito en corazones sometidos a sobrecarga hemodinámica, en los que dicha fosfatasa participa en la relocalización de la histona deacetilasa clase II, reprimiendo la transcripción de genes prohipertróficos (Ling, Sun et al. 2012), como también en modelos de sobreestimulación adrenérgica (Taglieri, Monasky et al. 2011). Sin embargo, mientras nuestros resultados sugieren que la activación de PP2A prevendría los efectos deletéreos causados por la sobreactivación del NHE1 en procesos de acidosis sostenida como los que se producirían en infarto de miocardio, su rol en cardioprotección es discutido. En trabajos de nuestro grupo (Garciaarena, Fantinelli et al. 2011), se muestra que acciones cardioprotectoras de SIL como disminución del tamaño de infarto y mejoramiento de la función cardíaca durante la reperfusión se relacionan a la intervención de fosfatasas, pero la actividad de esta misma fosfatasa ha sido relacionada por otros autores justamente con la inhibición de quinasas cardioprotectoras como Akt en injuria por isquemia-reperfusión (Lee, Chanoit et al. 2009) y la inhibición de la misma con ácido okadaico proporciona en cerdos una cardioprotección que emula al preconditionamiento isquémico (Barancik, Htun et al. 1999). Más aún, otros autores sugieren que la sobreexpresión de PP2A tendría un rol negativo ligado a necrosis y descenso de la función cardíaca (Gergs, Boknik et al. 2004).

A pesar de la disparidad de resultados que muestra la literatura, los hallazgos expuestos en nuestro trabajo sugieren que la PP2A forma parte de la ruta inhibitoria del NHE1 por SIL y permite especular que las acciones cardioprotectoras debidas a la inhibición del NHE1 por SIL se deberían a la activación de dicha fosfatasa. Dado que desconocemos si estos inhibidores farmacológicos de PP2A usados en nuestro trabajo tienen efectos colaterales o no deseados que pudieran estar condicionando la interpretación de los resultados, sería de suma utilidad a futuro desarrollar alguna herramienta inhibitoria de PP2A más específica como un RNA de interferencia capaz de silenciar su expresión.

## **Secuencia de eventos hacia la inhibición del NHE1 por Sildenafil. Rol de p38**

La PP2A es una fosfatasa serina/treonina de la que se han descrito numerosas holoenzimas. Esta enzima altamente ubicua presenta una fuerte regulación a nivel traslacional (Baharians and Schonthal 1998) y dado que su acción más característica es el control en los procesos de crecimiento celular, puede sufrir reajustes que confieran especificidad a su actividad. Se han documentado numerosas evidencias de regulación post traslacional que afectan su actividad fosfatasa como así también su compartimentalización intracelular, entre las que pueden citarse metilación (Liu and Hofmann 2002), unión a segundos mensajeros como ceramida, fosforilación o unión a un inhibidor endógeno (como es el caso de  $I^{PP2A}$ ) (Chen, Li et al. 2008). Se ha descrito que su fosforilación puede ocurrir en el sitio catalítico y originar una inactivación de la enzima, como también en las subunidades regulatorias B, en las que según el residuo fosforilado es posible potenciar la actividad de PP2A, que guardarían más relación con nuestros hallazgos experimentales, o provocar la separación de las subunidades (Letourneux, Rocher et al. 2006; Margolis, Perry et al. 2006). Nuestros experimentos sugieren que la actividad de p38 participa de la vía de señalización que estimula PKG, no sólo porque el inhibidor de p38 SB202190 revierte completamente el efecto que la activación de la vía GMPc/PKG tiene sobre el NHE1, sino también porque los efectos del activador de p38, Arsenito de  $Na^+$ , son revertidos por un inhibidor de PP2A. Aunque no hay antecedentes de una activación cruzada de esa naturaleza en cardiomiocitos, evidencias de aumento de actividad de p38 relacionada a una activación por PKG han sido descritas en plaquetas (Li, Zhang et al. 2006) y otros tipos celulares (Browning, McShane et al. 2000; Westermarck, Li et al. 2001; Zhu, Hewlett et al. 2004; Zhu, Carneiro et al. 2005).

Por otro lado, en tejido cardíaco se han hallado varias acciones de PKG que mediadas por la fosfatasa PP2A, como por ejemplo la inactivación de la quinasa cardioprotectora Akt en injuria por isquemia/reperfusión (Lee, Chanoit et al. 2009) que también se encontró en eritrocitos expuestos a peroxinitritos (Guner, Ochoa et al. 2009), la señalización desencadenada por el receptor de adenosina A1 (Liu and Hofmann 2003) y la atenuación de la corriente de  $Ca^{+2}$  (activada normalmente por efecto de PKA) por desfosforilación directa del canal de tipo L (Shen and Pappano 2002). Si bien nuestros

resultados estarían en línea con lo expuesto, el Arsenito es una droga cuya aplicación puede ser cuestionada ya que se ha demostrado que además de tener efectos inductores de la actividad de p38 es capaz de inducir otras quinasas como JNK, p42/p44, y la involucrada en la activación del NHE1 por acidosis, ERK1/2 (Samet, Graves et al. 1998; Trouba and Germolec 2004; Felix, Manna et al. 2005). Aunque no podemos descartar que alguno de estos entrecruzamientos entre señalización por quinasas estén ocurriendo en acidosis sostenida en presencia de inhibidores o activadores de p38, podemos sostener que la inhibición de p38 no afectaría los niveles de fosforilación de ERK1/2 (**Figura 17**) o lo que es equivalente, su actividad tras acidosis sostenida, lo cual no resulta menor ya que existen varios trabajos que vinculan la actividad de p38 con una regulación negativa de dichas quinasas por desfosforilación de las mismas (Kusuhara, Takahashi et al. 1998), por inhibición de la expresión de sus quinasas activadoras (Westermarck, Li et al. 2001) o por desfosforilación de estas últimas mediante la acción de fosfatasas (Junttila, Li et al. 2008).

Si bien la activación de PP2A por PKG ha sido descrita previamente por otros autores en otros tipos celulares (Li, Martin et al. 2001; Lincoln 2007) el hecho que esta vía de señalización sea capaz de inhibir selectivamente la activación del NHE1 en músculo cardíaco es un hallazgo novedoso. Es más, en concordancia con nuestros resultados, se ha descrito en tejido nervioso que PKG, p38 y PP2A modulan la actividad de transportadores presinápticos de serotonina (Zhu, Hewlett et al. 2004; Zhu, Carneiro et al. 2005), existiendo dos vías por las que PKG puede regular la recaptación del neurotransmisor, de las cuales una de ellas, la que provoca un aumento en la actividad intrínseca de estos transportadores, involucra la activación secuencial de p38 y PP2A.

Aunque nuestros datos no permiten determinar como es que ocurre la activación de PP2A por parte de la quinasa p38, basándonos en el trabajo de Shen (Shen and Pappano 2002) se podría especular que tal vez la activación sea por fosforilación directa en el residuo Ser 1928 de la subunidad catalítica como la que se conoce para la activación que promueve PKA, aunque no existe nada demostrado al respecto.

Por último, centrándonos en el eslabón final de la cadena de señalización presentada, la regulación de NHE1 por p38 ha sido sugerida en varios tipos de tejidos distintos como contamos en la introducción, es más, tanto en líneas celulares (Khaled, Moor et al. 2001) como en células de músculo liso vascular (Kusuhara, Takahashi et al. 1998) se ha detectado la fosforilación directa de la cola citosólica del NHE1 por p38, en sitios comprendidos desde Ser 703 hasta Ser 793. Como discutimos anteriormente, no

tenemos la posibilidad de demostrar un efecto adicional de fosforilación en un residuo distinto al Ser 703. De existir esta interacción posiblemente abriría el abanico de explicaciones a la mayor inhibición de la actividad del NHE1 en presencia de Arsenito (**Figura 18**) y la posible potenciación de la actividad del NHE1 en presencia del inhibidor SB 202190 (**Figura 16**).

Como mostramos en los experimentos de Western Blot, el estímulo desencadenado por SIL provoca, en acidosis sostenida, un claro aumento en el nivel de p38 fosforilada respecto a la condición no acidótica. Parecería haber también un aumento de p38 respecto al control por la acidosis *per se*, a pesar que como ya hemos mencionado antes, el valor de fosforilación de la quinasa no fue significativamente distinto del control. Probablemente incrementando el número de determinaciones esta tendencia se transforme en un valor estadísticamente significativo respecto a dicho control lo cual podría permitir especular con un mecanismo intrínseco de adaptación para atenuar los efectos deletéreos de la hiperactividad del NHE1 (Nakamura, Iwata et al. 2008). A favor de esta hipótesis deberíamos citar que ambas quinasas (ERK1/2 y p38) se activan paralelamente en diversos procesos ya sea en los que llevan a la estimulación del NHE1 como es el caso de shock osmótico (Gillis, Shrode et al. 2001), como así también en cardioprotección diferida devenida de la acción de opioides (Fryer, Hsu et al. 2001). En línea más directa, trabajos de Zheng y col. (Zheng, Hou et al. 2004; Zheng, Reynolds et al. 2005) muestran que la acidosis es estímulo suficiente para la activación de p38 y que dicha activación es directamente proporcional al tiempo de sostenimiento del estímulo que origina dicha condición acidótica. Es más, en experimentos de isquemia simulada, Jacquet y col. (Jacquet, Zarrinpashneh et al. 2007) observaron que la activación de p38 por fosforilación es independiente de la activación de otras quinasas vinculadas históricamente al sensado de isquemia como la quinasa activada por AMP (AMPK), lo que nos permitiría especular con la posibilidad que dicha independencia también sea manifiesta respecto de ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> en el contexto de la regulación de la actividad del NHE1 post acidosis sostenida. En procesos patológicos que culminan en acidosis intracelular como es la isquemia, se ha demostrado una activación de p38 (Fryer, Patel et al. 2001) consistentemente con el concepto de quinasa ordinariamente vinculada a la propagación de la vía apoptótica cuya inhibición se postula como target terapéutico para atenuar la injuria por isquemia y reperfusión (Ma, Kumar et al. 1999).

Aún así, recientes trabajos han dilucidado una función cardioprotectora de p38 tras su activación post isquemia u otro agente proapoptótico como estimulación adrenérgica

(Tsang and Rabkin 2009) que sustentaría los resultados presentados en el presente Trabajo de Tesis Doctoral.

Es probable entonces que el estímulo de acidosis sostenida desencadene la activación simultánea de dos vías independientes entre sí: la primera que involucra a las quinasas *downstream* MEK, y la segunda a la quinasa p38. En este marco, la actividad final del NHE1 sería el resultado del balance entre los efectos estimulatorios de las quinasas antes mencionadas e inhibitorio de la fosfatasa PP2A activada por p38. En presencia de SIL en tanto y por una activación GMPC/PKG-mediada de p38, ocurriría un desbalance entre las actividades relativas de ERK1/2 y p38, favoreciendo la acción de la segunda sobre las primeras, lo cual resultaría en una inhibición del NHE1 por predominio de una acción desfosforilante sobre el residuo Ser703 del intercambiador por parte de la fosfatasa PP2A.

**CONCLUSIONES**

# Rol de la inhibición de PDE5A en la actividad del NHE1 post acidosis

En una primera etapa hemos caracterizado el perfil de activación del NHE1 en respuesta a la duración del estímulo ácido y la acción de la inhibición de PDE5A con el consiguiente aumento de PKG sobre dicha activación.

- Hemos podido describir diferencias en los modos de activación del NHE1 dependiendo de que el estímulo sea una acidosis inmediata o una acidosis sostenida. La principal diferencia radica en los mecanismos que median una y otra activación. Mientras que luego de una acidosis transitoria el principal estímulo para la activación del NHE1 pareciera ser la regulación por la carga ácida (concentración de  $H^+$ ), la activación del mismo post acidosis sostenida resultaría de una sumatoria entre el factor descripto para acidosis transitoria y la fosforilación de su cola citosólica por quinasas específicas lo que redundaría en una actividad muy superior respecto a una acidosis transitoria, como se muestra en la **Figura 20**. Es interesante destacar además que el estrés oxidativo, importante factor activador de estas quinasas ante diversos estímulos, no participaría de la activación de las mismas en nuestras condiciones experimentales.
- Hemos encontrado asimismo que el aumento de PKG por inhibición de PDE5A afecta de manera diferencial al NHE1 según el tipo de estímulo acidótico que se dispare: mientras que en acidosis transitoria carece de efecto inhibitor sobre el NHE1, en acidosis sostenida su efecto inhibitor es muy potente.

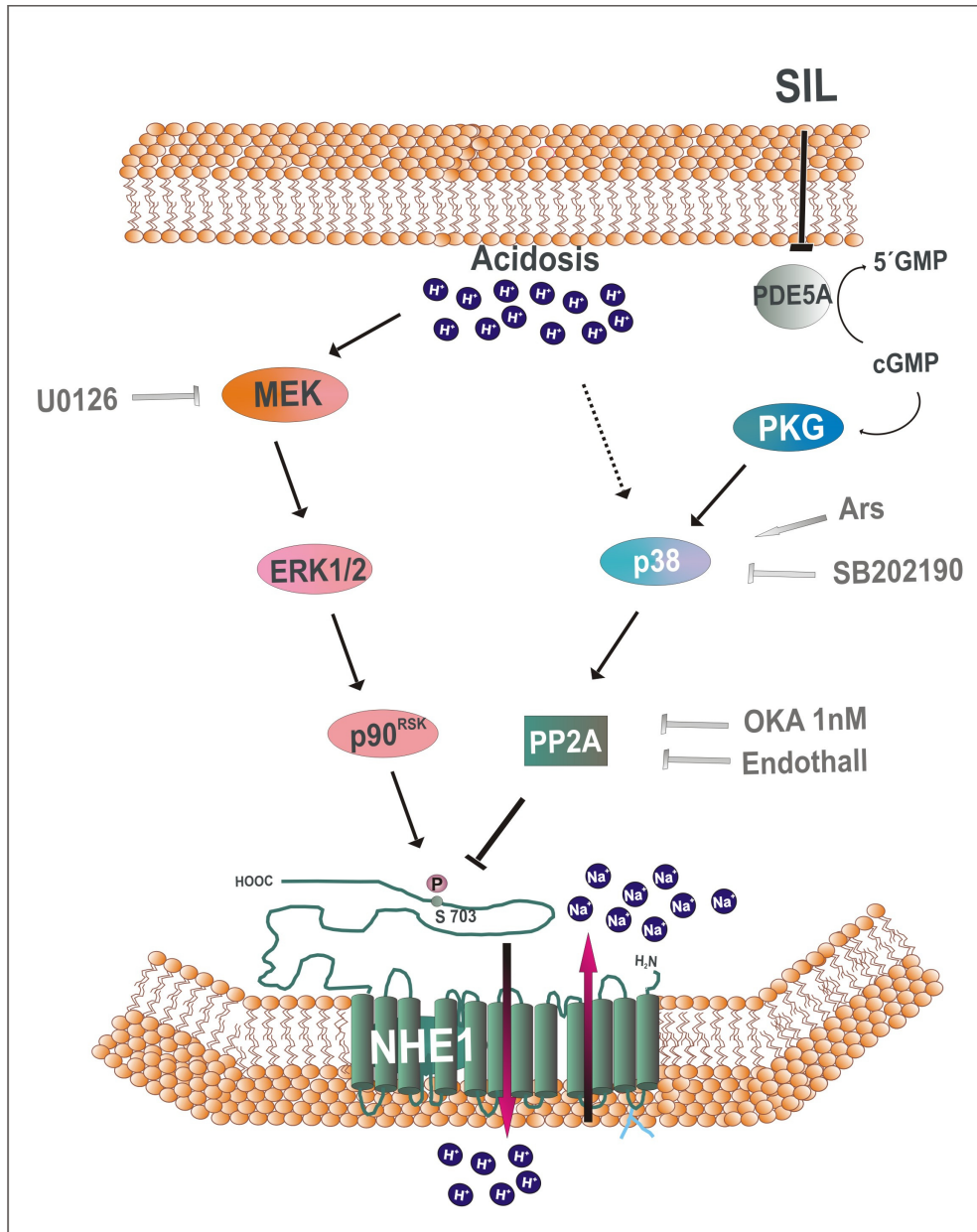
# Mecanismo de la inhibición de la actividad del NHE1 por inhibición de PDE5A

En una segunda etapa apuntamos a dilucidar los mecanismos subyacentes a la inhibición del NHE1 por PKG. Como mencionamos antes, hemos podido demostrar que la inhibición de PDE5A por SIL provoca desfosforilación del residuo Ser 703 de la cola citosólica del intercambiador.

Específicamente y como se puede observar en el esquema de la **Figura 20**, hemos podido demostrar que:

- SIL no modifica el grado de actividad de las quinasas activables por acidosis sostenida afectando solamente a su efector final, el NHE1.
- Esta acción es llevada a cabo por la fosfatasa PP2A que directamente a partir del estímulo iniciado por SIL desfosforila al intercambiador en el mismo sitio donde es fosforilado por las quinasas antes mencionadas, anulando la reacción desencadenada por ellas tras el estímulo acidótico.
- La activación de PP2A es consecuencia de una activación PKG-dependiente de la MAP quinasa p38.





**Figura 20. Vía de señalización propuesta para la activación del NHE1 por acidosis sostenida y efecto de SIL sobre la misma.** El estímulo acidótico provocaría una activación en turnos de las quinasas MEK/ERK/p90RSK, la última de ellas fosforilaría al NHE1 en el residuo citosólico Ser 703 provocando un aumento en su actividad que se suma al provocado por la acidosis *per se*. Además aumentaría la actividad de la quinasa p38 la que inhibiría en parte esta sobreactivación del NHE1 desencadenada por fosforilación mediante la activación de la fosfatasa PP2A y la consiguiente desfosforilación del NHE1 en Ser 703. SIL por su parte, al inhibir a la PDE5A promovería aumento de GMPc y consiguientemente de PKG, quinasa que potenciaría el efecto inhibitorio de p38 sobre el intercambiador.

## **Virtudes, limitaciones y perspectivas futuras del presente trabajo**

Nuestro trabajo contiene aportes novedosos acerca de la regulación de NHE1 por fosforilación, siendo los primeros en demostrar que la inhibición de PDE5A tiene un efecto inhibitorio sobre el intercambiador. En tal sentido, y como valor agregado de nuestro hallazgo, creemos necesario remarcar que la inhibición de la PDE5A y su consecuente estimulación de la vía cGMP/PKG no alteró el  $pH_i$  basal lo cual sugiere que sólo actuaría cuando el intercambiador está hiperactivo manteniendo su importantísima función basal inalterada. Este aspecto no es menor, ya que como se mencionó en párrafos anteriores, permite especular que la cancelación plena de la función del NHE1 (incluyendo la mencionada homeostática basal) podría ser el disparador de los efectos no deseados responsables del fracaso del conocido inhibidor del NHE1 “cariporide” en los estudios clínicos en los que se lo probó: GUARDIAN (Chaitman 2003) y ESCAMI (Zeymer, Suryapranata et al. 2001). En sintonía, se podría a su vez especular que los inhibidores de PDE5A serían más ventajosos en el tratamiento de patologías cardiovasculares.

Como se dijo en párrafos anteriores, nuestros resultados contrastan con otros obtenidos en otra especie por nuestro mismo grupo de trabajo donde se sugiere que la activación de la fosfatasa PP1 sería la responsable del efecto inhibitorio del SIL sobre el NHE1 (Yeves, Garcíarena et al. 2010). Si bien esto podría deberse simplemente a diferencias interespecíficas, es importante recordar que no hay coincidencia plena en la bibliografía acerca de la capacidad de las fosfatasas PP1 y PP2A para desfosforilar al NHE1 (Misik, Perreault et al. 2005; Snabaitis, D'Mello et al. 2006). Esto, sumado al hecho que muchos de los trabajos (incluidos los de nuestro grupo) basan sus conclusiones en intervenciones farmacológicas que como tales poseen un cierto grado de inespecificidad, pone de manifiesto la necesidad de profundizar el estudio de esta vía de regulación del NHE1 con métodos de biología molecular más directos. En tal sentido, proyectamos a futuro como continuidad del presente tema de investigación la identificación precisa de los sitios de fosforilación del NHE1 y el modo que los mismos son afectados por estimulación de la vía cGMP/PKG, para lo cual generaremos mutantes del NHE1 haciendo uso de la ‘*site-directed* mutagenesis’, metodología que permite introducir

modificaciones de interés en la proteína mediante el uso de plásmidos y técnicas de corte y empalme con enzimas de restricción, para obtener mutantes del NHE1 con regiones de la cola C-terminal truncada a distintas distancias o con mutaciones puntuales que eliminen de a uno los sitios conocidos de fosforilación del NHE1. Esto sin duda será una poderosa herramienta que permitirá profundizar la caracterización funcional del NHE1, proteína clave tanto en fisiología como en fisiopatología celular.

## **REFERENCIAS**

- Aker, S., A. K. Snabaitis, et al. (2004). "Inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger attenuates the deterioration of ventricular function during pacing-induced heart failure in rabbits." Cardiovasc Res **63**(2): 273-82.
- Ali, A., F. J. Ahmad, et al. (2004). "Evidence of the antiepileptic potential of amiloride with neuropharmacological benefits in rodent models of epilepsy and behavior." Epilepsy Behav **5**(3): 322-8.
- Avkiran, M. and R. S. Haworth (2003). "Regulatory effects of G protein-coupled receptors on cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity: signalling and significance." Cardiovasc Res **57**(4): 942-52.
- Azriel-Tamir, H., H. Sharir, et al. (2004). "Extracellular zinc triggers ERK-dependent activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in colonocytes mediated by the zinc-sensing receptor." J Biol Chem **279**(50): 51804-16.
- Baartscheer, A., C. A. Schumacher, et al. (2005). "Chronic inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger attenuates cardiac hypertrophy and prevents cellular remodeling in heart failure." Cardiovasc Res **65**(1): 83-92.
- Baharians, Z. and A. H. Schonthal (1998). "Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression." J Biol Chem **273**(30): 19019-24.
- Barancik, M., P. Htun, et al. (1999). "Okadaic acid and anisomycin are protective and stimulate the SAPK/JNK pathway." J Cardiovasc Pharmacol **34**(2): 182-90.
- Benos, D. J. (1982). "Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells." Am J Physiol **242**(3): C131-45.
- Berk, B. C., M. S. Aronow, et al. (1987). "Angiotensin II-stimulated Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in cultured vascular smooth muscle cells. Evidence for protein kinase C-dependent and -independent pathways." J Biol Chem **262**(11): 5057-64.
- Bers, D. M., W. H. Barry, et al. (2003). "Intracellular Na<sup>+</sup> regulation in cardiac myocytes." Cardiovasc Res **57**(4): 897-912.
- Blatter, L. A. and J. A. McGuigan (1991). "Intracellular pH regulation in ferret ventricular muscle. The role of Na-H exchange and the influence of metabolic substrates." Circ Res **68**(1): 150-61.
- Bourguignon, L. Y., P. A. Singleton, et al. (2004). "CD44 interaction with Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion." J Biol Chem **279**(26): 26991-7007.
- Brett, C. L., Y. Wei, et al. (2002). "Human Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger isoform 6 is found in recycling endosomes of cells, not in mitochondria." Am J Physiol Cell Physiol **282**(5): C1031-41.
- Browning, D. D., M. P. McShane, et al. (2000). "Nitric oxide activation of p38 mitogen-activated protein kinase in 293T fibroblasts requires cGMP-dependent protein kinase." J Biol Chem **275**(4): 2811-6.
- Calderone, A., C. M. Thaik, et al. (1998). "Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts." J Clin Invest **101**(4): 812-8.
- Caldiz, C. I., R. G. Diaz, et al. (2011). "Mineralocorticoid receptor activation is crucial in the signalling pathway leading to the Anrep effect." J Physiol **589**(Pt 24): 6051-61.
- Caldiz, C. I., C. D. Garcarena, et al. (2007). "Mitochondrial reactive oxygen species activate the slow force response to stretch in feline myocardium." J Physiol **584**(Pt 3): 895-905.

- Camilion de Hurtado, M. C., B. V. Alvarez, et al. (1996). "Role of an electrogenic Na(+)-HCO<sub>3</sub>- cotransport in determining myocardial pHi after an increase in heart rate." Circ Res **79**(4): 698-704.
- Camilion de Hurtado, M. C., I. L. Ennis, et al. (2002). "Upregulation of myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger induced by chronic treatment with a selective inhibitor." J Mol Cell Cardiol **34**(11): 1539-47.
- Camilion de Hurtado, M. C., E. L. Portiansky, et al. (2002). "Regression of cardiomyocyte hypertrophy in SHR following chronic inhibition of the Na(+)/H(+) exchanger." Cardiovasc Res **53**(4): 862-8.
- Cavet, M. E., S. Lehoux, et al. (2003). "14-3-3beta is a p90 ribosomal S6 kinase (RSK) isoform 1-binding protein that negatively regulates RSK kinase activity." J Biol Chem **278**(20): 18376-83.
- Cingolani, H. E. and M. C. Camilion de Hurtado (2002). "Na(+)-H(+) exchanger inhibition: a new antihypertrophic tool." Circ Res **90**(7): 751-3.
- Cingolani, H. E. and I. L. Ennis (2007). "Sodium-hydrogen exchanger, cardiac overload, and myocardial hypertrophy." Circulation **115**(9): 1090-100.
- Cingolani, H. E., N. G. Perez, et al. (2005). "Intracellular signaling following myocardial stretch: an autocrine/paracrine loop." Regul Pept **128**(3): 211-20.
- Coaxum, S. D., M. N. Garnovskaya, et al. (2009). "Epidermal growth factor activates Na(+)/H(+) exchanger in podocytes through a mechanism that involves Janus kinase and calmodulin." Biochim Biophys Acta **1793**(7): 1174-81.
- Coccaro, E., P. Karki, et al. (2009). "Phenylephrine and sustained acidosis activate the neonatal rat cardiomyocyte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger through phosphorylation of amino acids Ser770 and Ser771." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(2): H846-58.
- Cohen, P. (1989). "The structure and regulation of protein phosphatases." Annu Rev Biochem **58**: 453-508.
- Cohen, P., C. F. Holmes, et al. (1990). "Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation." Trends Biochem Sci **15**(3): 98-102.
- Counillon, L., A. Franchi, et al. (1993). "A point mutation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger gene (NHE1) and amplification of the mutated allele confer amiloride resistance upon chronic acidosis." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(10): 4508-12.
- Coupaye-Gerard, B., C. Bookstein, et al. (1996). "Biosynthesis and cell surface delivery of the NHE1 isoform of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in A6 cells." Am J Physiol **271**(5 Pt 1): C1639-45.
- Cha, B., J. H. Kim, et al. (2005). "cGMP inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter 3 (NHE3) requires PDZ domain adapter NHERF2, a broad specificity protein kinase G-anchoring protein." J Biol Chem **280**(17): 16642-50.
- Cha, C. Y. and A. Noma (2009). "Modeling the cardiac Na(+)/H (+) exchanger based on major experimental findings." Mol Cells **28**(2): 81-5.
- Chai, Y., D. M. Zhang, et al. (2011). "Activation of cGMP-dependent protein kinase stimulates cardiac ATP-sensitive potassium channels via a ROS/calmodulin/CaMKII signaling cascade." PLoS One **6**(3): e18191.
- Chaitman, B. R. (2003). "A review of the GUARDIAN trial results: clinical implications and the significance of elevated perioperative CK-MB on 6-month survival." J Card Surg **18 Suppl 1**: 13-20.
- Cheitlin, M. D., A. M. Hutter, Jr., et al. (1999). "Use of sildenafil (Viagra) in patients with cardiovascular disease. Technology and Practice Executive Committee." Circulation **99**(1): 168-77.

- Chen, S., B. Li, et al. (2008). "I1PP2A affects tau phosphorylation via association with the catalytic subunit of protein phosphatase 2A." J Biol Chem **283**(16): 10513-21.
- Chiang, C. E., H. N. Luk, et al. (2002). "Effects of sildenafil on cardiac repolarization." Cardiovasc Res **55**(2): 290-9.
- Das, S., N. Maulik, et al. (2002). "Cardioprotection with sildenafil, a selective inhibitor of cyclic 3',5'-monophosphate-specific phosphodiesterase 5." Drugs Exp Clin Res **28**(6): 213-9.
- de Bernardo, S., S. Canals, et al. (2004). "Role of extracellular signal-regulated protein kinase in neuronal cell death induced by glutathione depletion in neuron/glia mesencephalic cultures." J Neurochem **91**(3): 667-82.
- De Giusti, V. C., M. B. Nolly, et al. (2011). "Aldosterone stimulates the cardiac Na(+)/H(+) exchanger via transactivation of the epidermal growth factor receptor." Hypertension **58**(5): 912-9.
- Demaurex, N., J. Orłowski, et al. (1995). "The mammalian Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters NHE-1, NHE-2, and NHE-3 are electroneutral and voltage independent, but can couple to an H<sup>+</sup> conductance." J Gen Physiol **106**(1): 85-111.
- Duyndam, M. C., S. T. Hulscher, et al. (2003). "Evidence for a role of p38 kinase in hypoxia-inducible factor 1-independent induction of vascular endothelial growth factor expression by sodium arsenite." J Biol Chem **278**(9): 6885-95.
- Ebata, S., S. Muto, et al. (1999). "Aldosterone activates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in vascular smooth muscle cells by nongenomic and genomic mechanisms." Kidney Int **56**(4): 1400-12.
- Ennis, I. L., E. M. Escudero, et al. (2003). "Regression of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibition." Hypertension **41**(6): 1324-9.
- Felix, K., S. K. Manna, et al. (2005). "Low levels of arsenite activates nuclear factor-kappaB and activator protein-1 in immortalized mesencephalic cells." J Biochem Mol Toxicol **19**(2): 67-77.
- Fiedler, B., S. M. Lohmann, et al. (2002). "Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11363-8.
- Fliegel, L. and M. Karmazyn (2004). "The cardiac Na-H exchanger: a key downstream mediator for the cellular hypertrophic effects of paracrine, autocrine and hormonal factors." Biochem Cell Biol **82**(6): 626-35.
- Frank, G. D., S. Eguchi, et al. (2000). "Involvement of reactive oxygen species in the activation of tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase by angiotensin II." Endocrinology **141**(9): 3120-6.
- Frelin, C., P. Vigne, et al. (1984). "The role of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange system in cardiac cells in relation to the control of the internal Na<sup>+</sup> concentration. A molecular basis for the antagonistic effect of ouabain and amiloride on the heart." J Biol Chem **259**(14): 8880-5.
- Fryer, R. M., A. K. Hsu, et al. (2001). "ERK and p38 MAP kinase activation are components of opioid-induced delayed cardioprotection." Basic Res Cardiol **96**(2): 136-42.
- Fryer, R. M., H. H. Patel, et al. (2001). "Stress-activated protein kinase phosphorylation during cardioprotection in the ischemic myocardium." Am J Physiol Heart Circ Physiol **281**(3): H1184-92.
- Fuster, D., O. W. Moe, et al. (2004). "Lipid- and mechanosensitivities of sodium/hydrogen exchangers analyzed by electrical methods." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(28): 10482-7.

- Garcia-Dorado, D., M. A. Gonzalez, et al. (1997). "Prevention of ischemic rigor contracture during coronary occlusion by inhibition of Na(+)-H+ exchange." Cardiovasc Res **35**(1): 80-9.
- Garciarena, C. D., J. C. Fantinelli, et al. (2011). "Myocardial reperfusion injury: reactive oxygen species vs. NHE-1 reactivation." Cell Physiol Biochem **27**(1): 13-22.
- Garnovskaya, M. N., Y. V. Mukhin, et al. (2003). "Mitogen-induced activation of Na+/H+ exchange in vascular smooth muscle cells involves janus kinase 2 and Ca2+/calmodulin." Biochemistry **42**(23): 7178-87.
- Geelen, P., B. Drolet, et al. (2000). "Sildenafil (Viagra) prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current." Circulation **102**(3): 275-7.
- Gergs, U., P. Boknik, et al. (2004). "Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function." J Biol Chem **279**(39): 40827-34.
- Giannetta, E., A. M. Isidori, et al. (2012). "Chronic Inhibition of cGMP phosphodiesterase 5A improves diabetic cardiomyopathy: a randomized, controlled clinical trial using magnetic resonance imaging with myocardial tagging." Circulation **125**(19): 2323-33.
- Gill, R. K., S. Saksena, et al. (2002). "Regulation of NHE3 by nitric oxide in Caco-2 cells." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **283**(3): G747-56.
- Gillis, D., L. D. Shrode, et al. (2001). "Osmotic stimulation of the Na+/H+ exchanger NHE1: relationship to the activation of three MAPK pathways." J Membr Biol **181**(3): 205-14.
- Guazzi, M., M. Vicenzi, et al. (2010). "PDE5 inhibition with sildenafil improves left ventricular diastolic function, cardiac geometry, and clinical status in patients with stable systolic heart failure: results of a 1-year, prospective, randomized, placebo-controlled study." Circ Heart Fail **4**(1): 8-17.
- Gumina, R. J., T. Mizumura, et al. (1998). "A new sodium/hydrogen exchange inhibitor, EMD 85131, limits infarct size in dogs when administered before or after coronary artery occlusion." J Pharmacol Exp Ther **286**(1): 175-83.
- Guner, Y. S., C. J. Ochoa, et al. (2009). "Peroxyntirite-induced p38 MAPK proapoptotic signaling in enterocytes." Biochem Biophys Res Commun **384**(2): 221-5.
- Haworth, R. S., C. McCann, et al. (2003). "Stimulation of the plasma membrane Na+/H+ exchanger NHE1 by sustained intracellular acidosis. Evidence for a novel mechanism mediated by the ERK pathway." J Biol Chem **278**(34): 31676-84.
- Ingwall, J. S. (1982). "Phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy of cardiac and skeletal muscles." Am J Physiol **242**(5): H729-44.
- Izumi, H., T. Torigoe, et al. (2003). "Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy." Cancer Treat Rev **29**(6): 541-9.
- Jackson, G., P. Montorsi, et al. (2006). "Cardiovascular safety of sildenafil citrate (Viagra): an updated perspective." Urology **68**(3 Suppl): 47-60.
- Jacquet, S., E. Zarrinpashneh, et al. (2007). "The relationship between p38 mitogen-activated protein kinase and AMP-activated protein kinase during myocardial ischemia." Cardiovasc Res **76**(3): 465-72.
- Javadov, S., A. Choi, et al. (2008). "NHE-1 inhibition-induced cardioprotection against ischaemia/reperfusion is associated with attenuation of the mitochondrial permeability transition." Cardiovasc Res **77**(2): 416-24.
- Junttila, M. R., S. P. Li, et al. (2008). "Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival." Faseb J **22**(4): 954-65.



- Karki, P., E. Coccaro, et al. (2010). "Sustained intracellular acidosis activates the myocardial Na(+)/H(+) exchanger independent of amino acid Ser(703) and p90(rsk)." *Biochim Biophys Acta* **1798**(8): 1565-76.
- Karmazyn, M., X. T. Gan, et al. (1999). "The myocardial Na(+)-H(+) exchange: structure, regulation, and its role in heart disease." *Circ Res* **85**(9): 777-86.
- Kass, D. A., H. C. Champion, et al. (2007). "Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation." *Circ Res* **101**(11): 1084-95.
- Khaled, A. R., A. N. Moor, et al. (2001). "Trophic factor withdrawal: p38 mitogen-activated protein kinase activates NHE1, which induces intracellular alkalinization." *Mol Cell Biol* **21**(22): 7545-57.
- Koitabashi, N., T. Aiba, et al. (2009). "Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation Novel mechanism of cardiac stress modulation by PDE5 inhibition." *J Mol Cell Cardiol* **48**(4): 713-24.
- Kusuhara, M., E. Takahashi, et al. (1998). "p38 Kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: effects on Na+/H+ exchange and ERK1/2." *Circ Res* **83**(8): 824-31.
- Lagadic-Gossmann, D., R. D. Vaughan-Jones, et al. (1992). "Adrenaline and extracellular ATP switch between two modes of acid extrusion in the guinea-pig ventricular myocyte." *J Physiol* **458**: 385-407.
- Lee, S., G. Chanoit, et al. (2009). "Molecular mechanism underlying Akt activation in zinc-induced cardioprotection." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**(2): H569-75.
- Lee, S. H., T. Kim, et al. (2008). "NHE10, an osteoclast-specific member of the Na+/H+ exchanger family, regulates osteoclast differentiation and survival [corrected]." *Biochem Biophys Res Commun* **369**(2): 320-6.
- Leem, C. H., D. Lagadic-Gossmann, et al. (1999). "Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte." *J Physiol* **517** ( Pt 1): 159-80.
- Lehoux, S., J. Abe, et al. (2001). "14-3-3 Binding to Na+/H+ exchanger isoform-1 is associated with serum-dependent activation of Na+/H+ exchange." *J Biol Chem* **276**(19): 15794-800.
- Letourneux, C., G. Rocher, et al. (2006). "B56-containing PP2A dephosphorylate ERK and their activity is controlled by the early gene IEX-1 and ERK." *Embo J* **25**(4): 727-38.
- Li, Y., L. D. Martin, et al. (2001). "MARCKS protein is a key molecule regulating mucin secretion by human airway epithelial cells in vitro." *J Biol Chem* **276**(44): 40982-90.
- Li, Y. M., C. Mackintosh, et al. (1993). "Protein phosphatase 2A and its [3H]cantharidin/[3H]endothall thioanhydride binding site. Inhibitor specificity of cantharidin and ATP analogues." *Biochem Pharmacol* **46**(8): 1435-43.
- Li, Z., G. Zhang, et al. (2006). "Sequential activation of p38 and ERK pathways by cGMP-dependent protein kinase leading to activation of the platelet integrin alphaIIb beta3." *Blood* **107**(3): 965-72.
- Lincoln, T. M. (2007). "Myosin phosphatase regulatory pathways: different functions or redundant functions?" *Circ Res* **100**(1): 10-2.
- Ling, S., Q. Sun, et al. (2012). "CKIP-1 inhibits cardiac hypertrophy by regulating class II histone deacetylase phosphorylation through recruiting PP2A." *Circulation* **126**(25): 3028-40.

- Linz, W., U. Albus, et al. (1998). "Dose-dependent reduction of myocardial infarct mass in rabbits by the NHE-1 inhibitor cariporide (HOE 642)." Clin Exp Hypertens **20**(7): 733-49.
- Liu, C. N. and C. J. Somps (2008). "Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1 inhibitors reduce neuronal excitability and alter na<sup>+</sup> channel inactivation properties in rat primary sensory neurons." Toxicol Sci **103**(2): 346-53.
- Liu, H., J. Stupak, et al. (2004). "Open tubular immobilized metal ion affinity chromatography combined with MALDI MS and MS/MS for identification of protein phosphorylation sites." Anal Chem **76**(14): 4223-32.
- Liu, Q. and P. A. Hofmann (2002). "Antiadrenergic effects of adenosine A(1) receptor-mediated protein phosphatase 2a activation in the heart." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(4): H1314-21.
- Liu, Q. and P. A. Hofmann (2003). "Modulation of protein phosphatase 2a by adenosine A1 receptors in cardiomyocytes: role for p38 MAPK." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(1): H97-103.
- Lundgren, J., H. Zhang, et al. (1991). "Acidosis-induced ischemic brain damage: are free radicals involved?" J Cereb Blood Flow Metab **11**(4): 587-96.
- Luo, J., D. B. Kintner, et al. (2007). "ERK1/2-p90RSK-mediated phosphorylation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1. A role in ischemic neuronal death." J Biol Chem **282**(38): 28274-84.
- Ma, X. L., S. Kumar, et al. (1999). "Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion." Circulation **99**(13): 1685-91.
- Maekawa, N., J. Abe, et al. (2006). "Inhibiting p90 ribosomal S6 kinase prevents (Na<sup>+</sup>)-H<sup>+</sup> exchanger-mediated cardiac ischemia-reperfusion injury." Circulation **113**(21): 2516-23.
- Malo, M. E. and L. Fliegel (2006). "Physiological role and regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger." Can J Physiol Pharmacol **84**(11): 1081-95.
- Mandal, A., M. Shahidullah, et al. (2009). "Elevated hydrostatic pressure activates sodium/hydrogen exchanger-1 in rat optic nerve head astrocytes." Am J Physiol Cell Physiol **297**(1): C111-20.
- Manhas, N., Y. Shi, et al. "p90 activation contributes to cerebral ischemic damage via phosphorylation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1." J Neurochem **114**(5): 1476-86.
- Manhas, N., Y. Shi, et al. (2010). "p90 activation contributes to cerebral ischemic damage via phosphorylation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1." J Neurochem **114**(5): 1476-86.
- Margolis, S. S., J. A. Perry, et al. (2006). "Role for the PP2A/B56delta phosphatase in regulating 14-3-3 release from Cdc25 to control mitosis." Cell **127**(4): 759-73.
- Masereel, B., L. Pochet, et al. (2003). "An overview of inhibitors of Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger." Eur J Med Chem **38**(6): 547-54.
- Mentzer, R. M., Jr., C. Bartels, et al. (2008). "Sodium-hydrogen exchange inhibition by cariporide to reduce the risk of ischemic cardiac events in patients undergoing coronary artery bypass grafting: results of the EXPEDITION study." Ann Thorac Surg **85**(4): 1261-70.
- Misik, A. J., K. Perreault, et al. (2005). "Protein phosphatase regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform I." Biochemistry **44**(15): 5842-52.
- Miura, T., T. Ogawa, et al. (1997). "Infarct size limitation by a new Na<sup>(+)</sup>-H<sup>+</sup> exchange inhibitor, Hoe 642: difference from preconditioning in the role of protein kinase C." J Am Coll Cardiol **29**(3): 693-701.

- Moor, A. N., X. T. Gan, et al. (2001). "Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-directed protein kinases in the ischemic and ischemic-reperfused rat myocardium." J Biol Chem **276**(19): 16113-22.
- Murphy, E. and D. G. Allen (2009). "Why did the NHE inhibitor clinical trials fail?" J Mol Cell Cardiol **46**(2): 137-41.
- Nagayama, T., S. Hsu, et al. (2009). "Sildenafil stops progressive chamber, cellular, and molecular remodeling and improves calcium handling and function in hearts with pre-existing advanced hypertrophy caused by pressure overload." J Am Coll Cardiol **53**(2): 207-15.
- Nakamura, T. Y., Y. Iwata, et al. (2008). "Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 is sufficient to generate Ca<sup>2+</sup> signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure." Circ Res **103**(8): 891-9.
- O'Flaherty, C., E. de Lamirande, et al. (2005). "Reactive oxygen species and protein kinases modulate the level of phospho-MEK-like proteins during human sperm capacitation." Biol Reprod **73**(1): 94-105.
- O'Flaherty, C., E. de Lamirande, et al. (2006). "Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation." Free Radic Biol Med **40**(6): 1045-55.
- Opie, L. H. (1976). "Effects of regional ischemia on metabolism of glucose and fatty acids. Relative rates of aerobic and anaerobic energy production during myocardial infarction and comparison with effects of anoxia." Circ Res **38**(5 Suppl 1): 152-74.
- Paris, S. and J. Pouyssegur (1983). "Biochemical characterization of the amiloride-sensitive Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in Chinese hamster lung fibroblasts." J Biol Chem **258**(6): 3503-8.
- Pederson, S. F., C. Varming, et al. (2002). "Mechanisms of activation of NHE by cell shrinkage and by calyculin A in Ehrlich ascites tumor cells." J Membr Biol **189**(1): 67-81.
- Perez, N. G., B. V. Alvarez, et al. (1995). "pHi regulation in myocardium of the spontaneously hypertensive rat. Compensated enhanced activity of the Na<sup>(+)</sup>-H<sup>+</sup> exchanger." Circ Res **77**(6): 1192-200.
- Perez, N. G., M. R. Piaggio, et al. (2007). "Phosphodiesterase 5A inhibition induces Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger blockade and protection against myocardial infarction." Hypertension **49**(5): 1095-103.
- Perez, N. G., M. C. Villa-Abrille, et al. (2003). "A low dose of angiotensin II increases inotropism through activation of reverse Na<sup>(+)</sup>/Ca<sup>(2+)</sup> exchange by endothelin release." Cardiovasc Res **60**(3): 589-97.
- Putney, L. K., S. P. Denker, et al. (2002). "The changing face of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions." Annu Rev Pharmacol Toxicol **42**: 527-52.
- Rebillard, A., X. Tekpli, et al. (2007). "Cisplatin-induced apoptosis involves membrane fluidification via inhibition of NHE1 in human colon cancer cells." Cancer Res **67**(16): 7865-74.
- Redfield, M. M., B. A. Borlaug, et al. (2012). "Phosphodiesterase-5 Inhibition to Improve CLinical Status and EXercise Capacity in Diastolic Heart Failure (RELAX) trial: rationale and design." Circ Heart Fail **5**(5): 653-9.
- Reffelmann, T. and R. A. Kloner (2003). "Effects of sildenafil on myocardial infarct size, microvascular function, and acute ischemic left ventricular dilation." Cardiovasc Res **59**(2): 441-9.

- Reshkin, S. J., A. Bellizzi, et al. (2003). "Paclitaxel induces apoptosis via protein kinase A- and p38 mitogen-activated protein-dependent inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE) NHE isoform 1 in human breast cancer cells." Clin Cancer Res **9**(6): 2366-73.
- Rich, I. N., D. Worthington-White, et al. (2000). "Apoptosis of leukemic cells accompanies reduction in intracellular pH after targeted inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger." Blood **95**(4): 1427-34.
- Roos, A. and W. F. Boron (1981). "Intracellular pH." Physiol Rev **61**(2): 296-434.
- Rotella, D. P. (2002). "Phosphodiesterase 5 inhibitors: current status and potential applications." Nat Rev Drug Discov **1**(9): 674-82.
- Ruiz-Ramos, R., M. E. Cebrian, et al. (2005). "Benzoquinone activates the ERK/MAPK signaling pathway via ROS production in HL-60 cells." Toxicology **209**(3): 279-87.
- Sabri, A., K. L. Byron, et al. (1998). "Hydrogen peroxide activates mitogen-activated protein kinases and Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in neonatal rat cardiac myocytes." Circ Res **82**(10): 1053-62.
- Samet, J. M., L. M. Graves, et al. (1998). "Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals." Am J Physiol **275**(3 Pt 1): L551-8.
- Sardet, C., L. Counillon, et al. (1990). "Growth factors induce phosphorylation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, glycoprotein of 110 kD." Science **247**(4943): 723-6.
- Sardet, C., P. Fafournoux, et al. (1991). "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 **266**(29): 19166-71.
- Schelling, J. R. and B. G. Abu Jawdeh (2008). "Regulation of cell survival by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1." Am J Physiol Renal Physiol **295**(3): F625-32.
- Scholz, W., U. Albus, et al. (1993). "Hoe 694, a new Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitor and its effects in cardiac ischaemia." Br J Pharmacol **109**(2): 562-8.
- Schulte, E. A., A. Hohendahl, et al. (1999). "Natriuretic peptides and diadenosine polyphosphates modulate pH regulation of rat mesangial cells." Cell Physiol Biochem **9**(6): 310-22.
- Seger, R. and E. G. Krebs (1995). "The MAPK signaling cascade." Faseb J **9**(9): 726-35.
- Shen, J. B. and A. J. Pappano (2002). "On the role of phosphatase in regulation of cardiac L-type calcium current by cyclic GMP." J Pharmacol Exp Ther **301**(2): 501-6.
- Shinlapawittayatorn, K., S. Chattipakorn, et al. (2005). "Effect of sildenafil citrate on the cardiovascular system." Braz J Med Biol Res **38**(9): 1303-11.
- Slepkov, E. R., J. K. Rainey, et al. (2007). "Structural and functional analysis of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger." Biochem J **401**(3): 623-33.
- Snabaitis, A. K., F. Cuello, et al. (2008). "Protein kinase B/Akt phosphorylates and inhibits the cardiac Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1." Circ Res **103**(8): 881-90.
- Snabaitis, A. K., R. D'Mello, et al. (2006). "A novel role for protein phosphatase 2A in receptor-mediated regulation of the cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1." J Biol Chem **281**(29): 20252-62.
- Snabaitis, A. K., D. J. Hearse, et al. (2002). "Regulation of sarcolemmal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange by hydrogen peroxide in adult rat ventricular myocytes." Cardiovasc Res **53**(2): 470-80.
- Son, Y., Y. K. Cheong, et al. (2011). "Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways?" J Signal Transduct **792639**.

- Stiebellehner, L., V. Petkov, et al. (2003). "Long-term treatment with oral sildenafil in addition to continuous IV epoprostenol in patients with pulmonary arterial hypertension." Chest **123**(4): 1293-5.
- Stock, C. and A. Schwab (2006). "Role of the Na/H exchanger NHE1 in cell migration." Acta Physiol (Oxf) **187**(1-2): 149-57.
- Stouffer, G. A., C. Patterson, et al. (2001). "Role of reactive oxygen species in angiotensin ii signaling : the plot thickens." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(4): 471-2.
- Stuwe, L., M. Muller, et al. (2007). "pH dependence of melanoma cell migration: protons extruded by NHE1 dominate protons of the bulk solution." J Physiol **585**(Pt 2): 351-60.
- Sun, B., C. H. Leem, et al. (1996). "Novel chloride-dependent acid loader in the guinea-pig ventricular myocyte: part of a dual acid-loading mechanism." J Physiol **495** ( Pt 1): 65-82.
- Taglieri, D. M., M. M. Monasky, et al. (2011). "Ablation of p21-activated kinase-1 in mice promotes isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in association with activation of Erk1/2 and inhibition of protein phosphatase 2A." J Mol Cell Cardiol **51**(6): 988-96.
- Takahashi, E., J. Abe, et al. (1999). "p90(RSK) is a serum-stimulated Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform-1 kinase. Regulatory phosphorylation of serine 703 of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform-1." J Biol Chem **274**(29): 20206-14.
- Takimoto, E., H. C. Champion, et al. (2005). "Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy." Nat Med **11**(2): 214-22.
- Teshima, Y., M. Akao, et al. (2003). "Cariporide (HOE642), a selective Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange inhibitor, inhibits the mitochondrial death pathway." Circulation **108**(18): 2275-81.
- Theroux, P., B. R. Chaitman, 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. Guard during ischemia against necrosis (GUARDIAN) Investigators." Circulation **102**(25): 3032-8.
- Theroux, P., B. R. Chaitman, et al. (2000). "Design of a trial evaluating myocardial cell protection with cariporide, an inhibitor of the transmembrane sodium-hydrogen exchanger: the Guard During Ischemia Against Necrosis (GUARDIAN) trial." Curr Control Trials Cardiovasc Med **1**(1): 59-67.
- Trouba, K. J. and D. R. Germolec (2004). "Micromolar concentrations of sodium arsenite induce cyclooxygenase-2 expression and stimulate p42/44 mitogen-activated protein kinase phosphorylation in normal human epidermal keratinocytes." Toxicol Sci **79**(2): 248-57.
- Tsang, M. Y. and S. W. Rabkin (2009). "p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) is activated by noradrenaline and serves a cardioprotective role, whereas adrenaline induces p38 MAPK dephosphorylation." Clin Exp Pharmacol Physiol **36**(8): e12-9.
- van Borren, M. M., A. Baartscheer, et al. (2004). "NHE-1 and NBC during pseudo-ischemia/reperfusion in rabbit ventricular myocytes." J Mol Cell Cardiol **37**(2): 567-77.
- Vargas, L. A., R. G. Diaz, et al. (2013). "Inhibition of Carbonic Anhydrase Prevents the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger 1-dependent Slow Force Response to Rat Myocardial Stretch." Am J Physiol Heart Circ Physiol **305**(2): H228-37.

- Wakabayashi, S., B. Bertrand, et al. (1994). "Growth factor activation and "H(+)-sensing" of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 (NHE1). Evidence for an additional mechanism not requiring direct phosphorylation." J Biol Chem **269**(8): 5583-8.
- Wakabayashi, S., P. Fafournoux, et al. (1992). "The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H(+)-sensing"." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(6): 2424-8.
- Wakabayashi, S., T. Ikeda, et al. (1997). "Calmodulin-binding autoinhibitory domain controls "pH-sensing" in the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1 through sequence-specific interaction." Biochemistry **36**(42): 12854-61.
- Wakabayashi, S., T. Pang, et al. (2000). "A novel topology model of the human Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger isoform 1." J Biol Chem **275**(11): 7942-9.
- Wang, H., N. L. Silva, et al. (1997). "Phosphorylation and regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger through mitogen-activated protein kinase." Biochemistry **36**(30): 9151-8.
- Wang, X., J. Z. Liu, et al. (2011). "ROS-activated p38 MAPK/ERK-Akt cascade plays a central role in palmitic acid-stimulated hepatocyte proliferation." Free Radic Biol Med **51**(2): 539-51.
- Wei, S., E. C. Rothstein, et al. (2001). "Differential MAP kinase activation and Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger phosphorylation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rat cardiac myocytes." Am J Physiol Cell Physiol **281**(5): C1542-50.
- Westermarck, J., S. P. Li, et al. (2001). "p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression." Mol Cell Biol **21**(7): 2373-83.
- Wilkens, H., A. Guth, et al. (2001). "Effect of inhaled iloprost plus oral sildenafil in patients with primary pulmonary hypertension." Circulation **104**(11): 1218-22.
- Xu, W. T., N. Jin, et al. (2009). "Design, synthesis and biological evaluation of novel substituted benzoylguanidine derivatives as potent Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitors." Bioorg Med Chem Lett **19**(12): 3283-7.
- Yamakawa, T., S. Tanaka, et al. (2002). "Lysophosphatidylcholine activates extracellular signal-regulated kinases 1/2 through reactive oxygen species in rat vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(5): 752-8.
- Yan, G. X. and A. G. Kleber (1992). "Changes in extracellular and intracellular pH in ischemic rabbit papillary muscle." Circ Res **71**(2): 460-70.
- Yao, W., G. Qian, et al. (2002). "Roles of NHE-1 in the proliferation and apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells in rats." Chin Med J (Engl) **115**(1): 107-9.
- Yeves, A. M., C. D. Garciarena, et al. (2010). "Decreased activity of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger by phosphodiesterase 5A inhibition is attributed to an increase in protein phosphatase activity." Hypertension **56**(4): 690-5.
- Zeymer, U., H. Suryapranata, et al. (2001). "The Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial." J Am Coll Cardiol **38**(6): 1644-50.
- Zhang, R., L. Lei, et al. (2007). "Benzimidazol-2-yl or benzimidazol-2-ylthiomethyl benzoylguanidines as novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitors, synthesis and protection against ischemic-reperfusion injury." Bioorg Med Chem Lett **17**(9): 2430-3.

- Zhang, X., P. Shan, et al. (2003). "Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium." Am J Respir Cell Mol Biol **28**(3): 305-15.
- Zheng, M., R. Hou, et al. (2004). "Acidosis-induced p38 MAPK activation and its implication in regulation of cardiac contractility." Acta Pharmacol Sin **25**(10): 1299-305.
- Zheng, M., C. Reynolds, et al. (2005). "Intracellular acidosis-activated p38 MAPK signaling and its essential role in cardiomyocyte hypoxic injury." Faseb J **19**(1): 109-11.
- Zhu, C. B., A. M. Carneiro, et al. (2005). "p38 MAPK activation elevates serotonin transport activity via a trafficking-independent, protein phosphatase 2A-dependent process." J Biol Chem **280**(16): 15649-58.
- Zhu, C. B., W. A. Hewlett, et al. (2004). "Adenosine receptor, protein kinase G, and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent up-regulation of serotonin transporters involves both transporter trafficking and activation." Mol Pharmacol **65**(6): 1462-74.