

---

**ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ERO)**  
**EN TEJIDO CARDÍACO:**  
**ACCIÓN DE ANGIOTENSINA II Y ENDOTELINA-1**

---

---

---

*Tesis Doctoral*  
*Alejandra Yeves*  
*Directora:*  
*Gladys Chiappe de Cingolani*

---



Facultad de Ciencias Médicas  
Universidad Nacional de La Plata

2010

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Gladys Chiappe de Cingolani por guiarme en la realización de la presente tesis, por su paciencia y tolerancia, y al Dr. Horacio Cingolani, Gracias! porque sin conocerme me permitió trabajar en su grupo, por trasmitirme sus conocimientos y su gran vocación, que es hacer ciencia.

A la Directora del Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Dra. Alicia Mattiazzi por permitirme trabajar en él.

A mis compañeros del laboratorio, que desde que llegué de Mar del Plata, me hicieron sentir cómoda y parte del grupo.

A la Dra. Irene Ennis, Dr. Alejandro Aiello, Dr. Gustavo Pérez y Dra. Susana Mosca por estar siempre!, por su buena disposición, aunque estén súper ocupados estuvieron y están ayudandome, por responder mis dudas y por las charlas y buenos consejos: Muchas Gracias!.

A la Dra. Claudia Caldiz, por soportarme diariamente en el laboratorio, gracias por los consejos mate de por medio, Gracias!. A los becarios: Verito, no hace mucho que nos conocemos pero en estos pocos años hemos sembrado una linda amistad, Gracias!. A Alejandro Orłowski, Romi, Miriam, Gisel, Ceci, Vero, Omin, Luciana, Mariela, Carolina, Juliana, Mónica y Julieta, Gracias por compartir tantos lindos momentos !.

A mis amigos marplatenses....que aunque ya no estemos juntos nos unen miles de recuerdos hermosos, Muchas gracias. Por saber escuchar y por compartir conmigo momentos alegres, tristes, aventuras, por las guitarreadas, campamentos...en fin... Gracias ! A Diego Ruiz, Victoria Ordoñez, Leda Orfei,

Emo, Fernando Mappelli, Cecilia Grierson, Marina Sammarone, Ayelén Blanco, Valeria Turowski, Maqui, Guadalupe Degreff y Pablo Denuncio.

Esta tesis está dedicada a mi MAMÁ, por enseñarme que nada es imposible si tenés fé y perseverancia, te quiero con todo mi corazón y a pesar de la distancia seguís siendo mi guía. A mi hermana Yasmina, gracias por los sobrinos hermosos que me diste, Estefi y Joaquin, Los Amo mucho. A David, mi hermano, gracias por estar. A mi papá, aunque la vida nos haya separado, sabes que te quiero, y gracias por tus consejos y por trasmitirme tus vivencias. Saben todos que los tengo en el corazón.

A mi esposo, GUSTAVO, Gracias por tu apoyo incondicional, por escucharme, por tus consejos y sobre todo por el hijo hermoso que me diste: MATEO. Los Amo, son mi vida!.

En esta tesis se presentan resultados sobre el mecanismo por el cual la angiotensina II y endotelina 1 aumentan la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) en tejido cardíaco. A través de las ERO, dichas hormonas producen señales intracelulares que pueden conducir a la insuficiencia e hipertrofia cardíaca debido al aumento de calcio intracelular por activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE-1). Entre las estrategias estudiadas para prevenir/revertir la hipertrofia cardíaca se encuentra la inhibición de la actividad del NHE-1 con sildenafil, un inhibidor de la fosfodiesterasa 5 A (PDE5A). Debido a esto, como ya se adelantó en el último informe de avance de la tesis, se consideró importante incluir el estudio del mecanismo por el cual el sildenafil inhibe la actividad del NHE-1.

## 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Hipertrofia cardíaca.....	1
1.2. Angiotensina II (Ang II) y Endotelina -1 (ET-1).....	2
1.2.1. Formación de Ang II.....	2
1.2.2. Formación de ET-1.....	3
1.2.3. Receptores de Ang II y ET-1	
1.2.3.1. Receptores de Ang II: AT1 y AT2.....	5
1.2.3.2. Receptores de ET-1: ET <sub>A</sub> y ET <sub>B</sub> .....	5
1.3. Relación entre Ang II y ET-1: Efectos de Ang II mediados por ET-1.....	6
1.4. Vía de señalización intracelular activada por Ang II/ ET-1.....	7
1.5. Especies reactivas del oxígeno (ERO).....	10
1.5.1. Fuentes de ERO.....	10
1.5.1.1. NAD(P)H oxidasa.....	10
1.5.1.2. Xantino oxidasa.....	11
1.5.1.3. Óxido nítrico sintasa.....	12
1.5.1.4. Mitocondria.....	13
1.5.1.4.1. Bioenergética mitocondrial.....	13
1.5.1.4.2. Mitocondria como fuente de ERO.....	15
1.5.2. Sistemas antioxidantes.....	16
1.6. Mecanismo de “liberación de ERO inducida por ERO”.....	17

---

1.7. ERO como segundos mensajeros en Hipertrofia cardíaca.....	19
1.8. Importancia de la regulación del pH intracelular en el miocardio.....	21
1.9. Regulación del pH <sub>i</sub> por transportadores iónicos sarcolemales.....	21
1.10. Características estructurales y funcionales del NHE-1.....	22
1.11. Rol fisiológico y patológico del NHE-1.....	24
1.11.1. Rol fisiológico.....	24
1.11.2. Rol patológico.....	24
1.12. Factores que regulan la actividad del NHE-1.....	24
1.13. Inhibición del NHE-1 y su relación con PKG	
1.13.1. Cardioprotección por inhibición específica del NHE-1. ....	26
1.13.2. Acción de sildenafil y su efecto sobre el corazón.....	27
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	
2.1. Objetivo I.....	29
2.2. Objetivo II.....	30
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.1. Animales.....	31

---

3.2. Cortes de tejido ventricular .....	31
3.3. Aislamiento de miocitos ventriculares.....	31
3.4. Viabilidad celular.....	32
3.5. Producción de $O_2^{\cdot-}$ .....	33
3.6. Protocolo_experimental.....	33
3.7. Medición del pH intracelular.....	34
3.8. Calibración de pH.....	34
3.9. Actividad del NHE-1.....	35
3.10. Protocolo experimental.....	36
3.11. Capacidad intrínseca buffer.....	37
3.12. Determinación de la fosforilación de ERK1/2 y p90 <sup>RSK</sup> .....	38
3.13. Determinación de la fosforilación del NHE-1.....	40
3.14. Análisis estadístico.....	41

## 4. RESULTADOS

4.1. Producción de $O_2^{\cdot-}$ por acción de la Ang II en tejido cardíaco.....	42
---	----

---

4.2. Producción de $O_2^{\cdot-}$ por Ang II en tejido cardíaco: rol autócrino de ET-1.....	43
4.3. Producción de $O_2^{\cdot-}$ por ET-1 en tejido cardíaco.....	44
4.4. Participación de la mitocondria en la producción de $O_2^{\cdot-}$ inducida por ET-1.....	45
4.5. Producción de $O_2^{\cdot-}$ por ET-1 en miocitos cardíacos.....	46
4.6. Fosforilación de ERK1/2 y p90 <sup>RSK</sup> inducida por Ang II.....	47
4.7. Actividad del NHE-1 cuando se inhibe la PDE5A.....	49
4.7.1. Efecto de sildenafil sobre la actividad del NHE-1 en acidosis sostenida.....	49
4.7.2. Efecto de sildenafil sobre el pH <sub>i</sub> basal.....	50
4.8. Fosforilación del NHE-1: acción de sildenafil.....	51
4.9. Fosforilación de las quinasas ERK1/2 y p90 <sup>RSK</sup> cuando se inhibe a la PDE5A.....	52
4.10. Inhibición de fosfatasas sobre la actividad del NHE-1 cuando se inhibe a la PDE5A.....	53
4.11. Inhibición de fosfatasas sobre la fosforilación del NHE-1 cuando se inhibe a la PDE5A.....	55



<b>5. CONCLUSIONES Y DISCUSION.....</b>	<b>57</b>
<b>6. APENDICE.....</b>	<b>64</b>
<b>7. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....</b>	<b>65</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>67</b>

---

Ang II.....	Angiotensina II
BCECF-AM.....	Tetra-acetoximetil 2-7 bis(carboxietil)-5(6) carboxifluoresceína
BCECF.....	Acetoximetil ester de BCECF
CTE.....	Cadena de transporte de electrones
DAG.....	Diacilglicerol
ET-1.....	Endotelina 1
ERO.....	Especies reactivas del oxígeno
IP <sub>3</sub> .....	Inositol trifosfato
MIM	Membrana interna mitocondrial
MPG.....	Mercaptopropionilglicina
Nox.....	NADP(H) oxidasa
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	Anión superóxido
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Peróxido de hidrógeno
OH <sup>•</sup> .....	Radical hidroxilo
PDE5A.....	Fosfodiesterasa 5A
PLC.....	Fosfolipasa C
PKC.....	Proteína quinasa C
PKG.....	Proteína quinasa G
PP1.....	Proteína Fosfatasa 1
PP2A.....	Proteína Fosfatasa 2A
RAPGq.....	Receptores acoplados a Proteína Gq
5-HD.....	Ácido 5-hidroxidecanoico
XO.....	Xantina oxidasa

---



# ***INTRODUCCIÓN***

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Hipertrofia cardiaca

La hipertrofia cardiaca consiste en el aumento del peso del corazón, determinado principalmente por aumento del tamaño de los miocitos a expensas de la formación o agregado de sarcómeros, de modo que crecen en largo y/o en ancho.

La hipertrofia cardiaca que se desarrolla con el ejercicio físico intenso, en embarazadas y durante el crecimiento postnatal es fisiológica y no está relacionada con la progresión a insuficiencia cardiaca. La respuesta a la sobrecarga hemodinámica se caracteriza por aumento del tamaño de los miocitos con incremento proporcional de los elementos estructurales del miocardio, cumpliendo una función de adaptación, ya que se preserva la función contráctil, no se desarrolla fibrosis intersticial, ni se induce la expresión de genes fetales y es completamente reversible [1, 2]. A este tipo de respuesta se la denomina **Hipertrofia cardíaca fisiológica**.

En la **Hipertrofia cardíaca patológica** hay un aumento de la fibrosis intersticial, mayor incidencia de apoptosis, disminución de la densidad capilar y reprogramación de la expresión génica, que involucra la inducción de genes fetales que codifican las siguientes isoformas proteicas: el factor natriurético auricular y de cerebro (ANP y BNP respectivamente), la cadena  $\beta$  pesada de la miosina ( $\beta$ -MHC) y la  $\alpha$ -actina esquelética, y represión de los genes que codifican las respectivas isoformas del adulto ( $\alpha$ -MHC y  $\beta$ -actina) [3-9]. Estas alteraciones en la estructura del miocardio están asociadas con deterioro de la función ventricular evolucionando habitualmente a insuficiencia cardíaca.

Para revertir la HC patológica se han desarrollado distintas estrategias terapéuticas que regulan las señales intracelulares que están involucradas en este proceso complejo.

## 1.2. Angiotensina II (Ang II) y Endotelina-1 (ET-1)

### 1.2.1. Formación de Ang II

En la forma clásica de secreción de Ang II, las células yuxtaglomerulares renales liberan renina al plasma en respuesta a la disminución de la presión arterial o a la disminución de  $\text{Na}^+$  extracelular a nivel sistémico [10].

El angiotensinógeno es un glucopéptido circulante de 14 aminoácidos sintetizado en el hígado, el cual es degradado por la proteasa renina, dando como producto un péptido de 10 aminoácidos, la angiotensina I (Ang I). La enzima convertidora de angiotensina (ECA) degrada la Ang I produciendo angiotensina II (Ang II). Ésta tiene una vida media breve (~ una hora), y es degradada por peptidasas presentes en diferentes tejidos, dando como producto angiotensina III (Ang III), que posee menor actividad (**Figura 1A**) [11, 12].

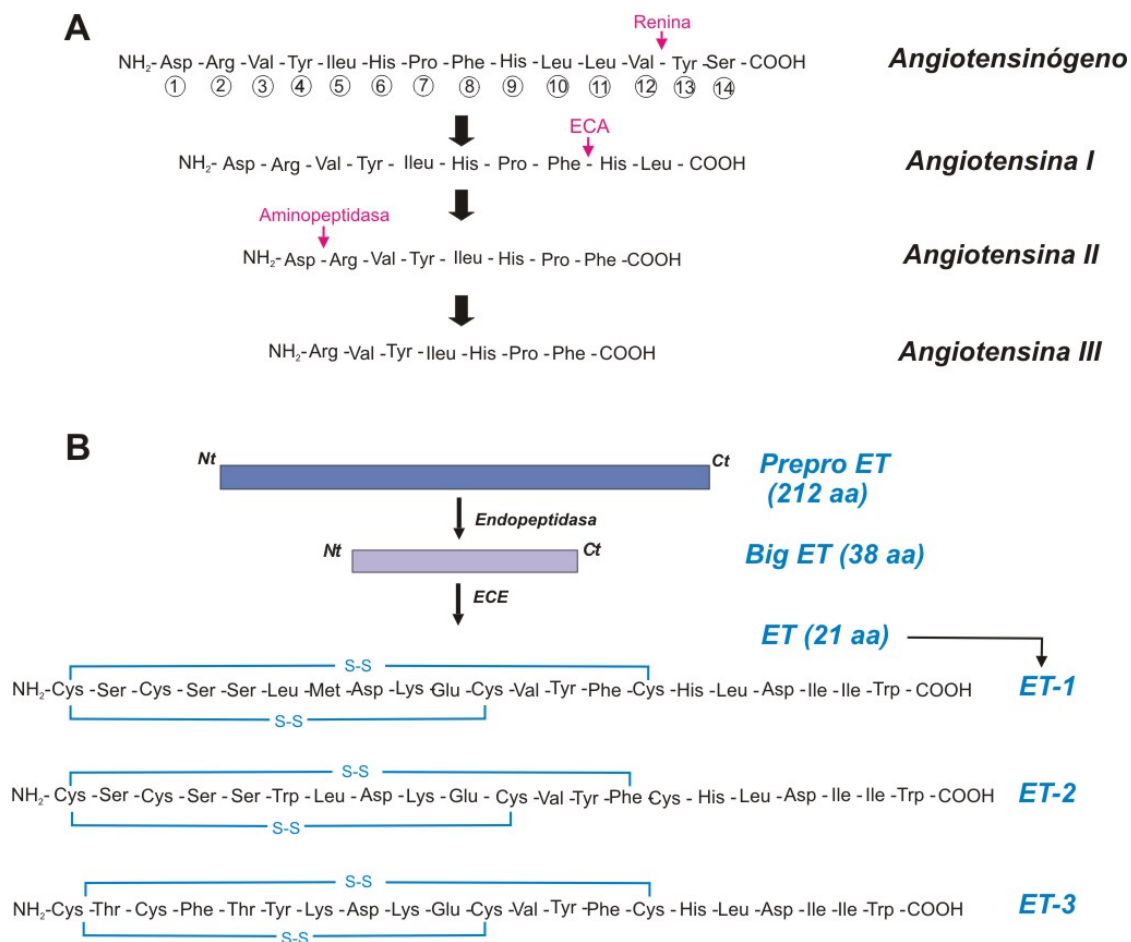
Si bien originalmente el sistema renina-angiotensina (SRA) se describió como un sistema hormonal general [13], actualmente se conoce la existencia del SRA local, capaz de modular la fisiología de diversos tejidos, incluyendo el miocardio [14, 15]. Al respecto, varios componentes del SRA se encontraron en diferentes tejidos y la síntesis local de Ang II se encontró en órganos aislados, como el cerebro, riñón, glándula adrenal y corazón [14-16]. En el miocardio se comprobó la expresión del ARN mensajero ( $\text{ARN}_m$ ) del angiotensinógeno, de la ECA y de receptores de angiotensina II [16, 17]. Además, se ha demostrado que las concentraciones de Ang I y II que se hallan en el espacio intersticial del miocardio son del orden nanomolar [18]. Otros estudios también demostraron la existencia del SRA en el miocardio luego de su estiramiento [19-22].

La angiotensina II es un octapéptido que además de su efecto vasoconstrictor ejerce numerosos efectos en otros tejidos. En el miocardio, produce aumento del inotropismo y de la frecuencia de contracción,

estimulación de la síntesis proteica e hipertrofia de los cardiomiocitos, estimulación de la proliferación de fibroblastos y producción de colágeno [14].

### 1.2.2. Formación de ET-1

La endotelina es un potente péptido vasoconstrictor, aislado inicialmente de cultivo de células endoteliales de aorta porcina [23]. Se conocen tres isoformas derivadas de genes diferentes, cuyo producto son péptidos de 21 aminoácidos denominados ET-1, ET-2 y ET-3 [24]. Los precursores de las endotelinas son las pre-pro-endotelinas (de aproximadamente 212 aminoácidos), que por acción de una proteasa dan lugar a las ET- grandes ("big-ETs") de 38 aminoácidos. Éstas son nuevamente clivadas por la metaloproteasa llamada enzima convertidora de la endotelina (ECE), para dar los polipéptidos de 21 aminoácidos mencionados en la **Figura 1B**. Las distintas isoformas de ET se expresan en una gran variedad de tejidos. ET-1 se expresa en células endoteliales, miocardio, riñón, en el sistema nervioso central y en músculo liso vascular [24, 25]. ET-2 es sintetizada en riñón, placenta, intestino, corazón y células endoteliales [26]. Finalmente, la ET-3 es producida en grandes cantidades en el cerebro, se la encuentra también en miocardio y en tracto gastrointestinal [26]. En preparaciones multicelulares de miocardio, las tres isoformas tienen efectos inotrópicos positivos de potencias similares [25]. Sin embargo, la eficacia y potencia de ET-1 es mayor en cultivo de células cardíacas [27].



**Figura 1.** Formación de los péptidos vasoactivos: Ang II y ET-1. **A.** Esquema que representa el SRA. El angiotensinógeno es clivado por la renina a Ang I, éste deca péptido mediante la ECA produce Ang II, la cual por acción de amino peptidasas es clivado a Ang III. **B.** Esquema que representa la formación de endotelinas. La preproendotelina es clivada por una endopeptidasa para dar Big-ET precursora de ET-1, ET-2 y ET-3 por acción de la ECE.

### 1.2.3. Receptores de Ang II y ET-1

#### 1.2.3.1. Receptores de Ang II: AT1 y AT2

Mediante estudios de unión a ligandos, se comprobó la existencia de dos receptores de Ang II: el tipo I (AT1), y el tipo II (AT2), sensibles al bloqueo con losartán y PD123319, respectivamente [28-30]. Estos receptores se expresan en el corazón humano y de otros mamíferos como el gato, rata, conejo y mono [31]. Los efectos de la estimulación de los receptores AT1 y AT2 sobre el crecimiento son opuestos. Al respecto, se demostró en corazón que la estimulación de los receptores AT2 tiene efectos antiproliferativos, proapoptóticos, de diferenciación celular, y de disminución de la matriz extracelular [32, 33]. Por el contrario, la estimulación de los receptores AT1 produce efecto inotrópico positivo, vasoconstricción, aumento de la expresión génica, de la síntesis proteica, generación de radicales libres, de la fibrosis y del remodelamiento cardíaco que conduce al desarrollo de HC [28, 34-36]. La vía de señalización desencadenada por la estimulación de los receptores AT1 con Ang II se estudió con más detalle en la presente tesis.

#### 1.2.3.2. Receptores de ET-1: ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>

Inicialmente se identificaron dos tipos de receptores para ET-1: los receptores tipo A (ET<sub>A</sub>) y los de tipo B (ET<sub>B</sub>) [37]. Ambos se expresan en una gran variedad de tejidos, incluyendo el cardíaco, aunque en proporciones variables según el tipo [38]. En general, la activación de los receptores ET<sub>A</sub>, está ligada al efecto inotrópico positivo y a la vasoconstricción.

Por otra parte, hay evidencias de que los efectos de la estimulación de los receptores ET<sub>B</sub> están asociados a la vasodilatación y vasoconstricción, según el subtipo de receptor ET<sub>B1</sub> y ET<sub>B2</sub> respectivamente [39-41].



### 1.3. Relación entre Ang II y ET-1: Efectos de Ang II mediados por ET-1

Como se señaló anteriormente, los efectos de ET-1 son similares a los observados con Ang II, como la vasoconstricción, crecimiento celular, aumento del inotropismo y generación de radicales libres. Sin embargo, se demostró que muchos de los efectos de la Ang II son atribuidos a la liberación/formación de ET-1, la cual mediante una acción autócrina/ parácrina produce su efecto. A continuación se describen algunos estudios que demuestran este mecanismo.

Ito y colaboradores describieron la inhibición de la hipertrofia cardiaca inducida por Ang II mediante el uso de bloqueantes del receptor ET<sub>A</sub> o con oligonucleótidos antisentido contra el ARN<sub>m</sub> de la pre-pro-endotelina en miocitos cardiacos de ratas recién nacidas [42].

Posteriormente, Liang y Garner, trabajando con el mismo modelo experimental demostraron que el aumento de la actividad del promotor del gen de ANP inducido por Ang II, se previno por el bloqueo de receptores ET<sub>A</sub> [43].

Recientemente Cingolani y colaboradores demostraron en miocitos ventriculares aislados de gato que el efecto inotrópico positivo inducido por una dosis fisiológica de Ang II (1 nmol/L) es mediado completamente por la liberación/ producción de ET-1. Además demostraron que el efecto inotrópico positivo producido por una dosis equipotente de ET-1 exógena (0.4 nmol/L), se bloqueó con MPG, un secuestrador de especies reactivas del oxígeno (ERO), sugiriendo que una cascada de señalización entre Ang II, ET-1 y ERO es la responsable del efecto inotrópico positivo [44].

En nuestro laboratorio, también se demostró que el estiramiento del miocardio induce la liberación de Ang II, que a través de ET-1 activa al intercambiador Na<sup>+</sup>/ H<sup>+</sup> (NHE-1) y como consecuencia de esto se produce un incremento lento de la fuerza que desarrolla el músculo (Slow force response) [19, 20, 45, 46].

#### 1.4. Vía de señalización intracelular activada por Ang II/ ET-1

En la hipertrofia cardíaca patológica la sobrecarga hemodinámica de presión y/o de volumen induce estrés mecánico (estiramiento), y representa el estímulo hipertrófico inicial más importante. El estiramiento provoca la liberación de factores humorales circulantes o provenientes de las mismas células cardíacas (mecanismos autócrinos y/o parácrinos) como los péptidos vasoactivos (angiotensina II y endotelina 1), catecolaminas, citoquinas y factores de crecimiento [47-51] que a través de la activación de señales intracelulares, promueven el aumento del tamaño de los cardiomiocitos .

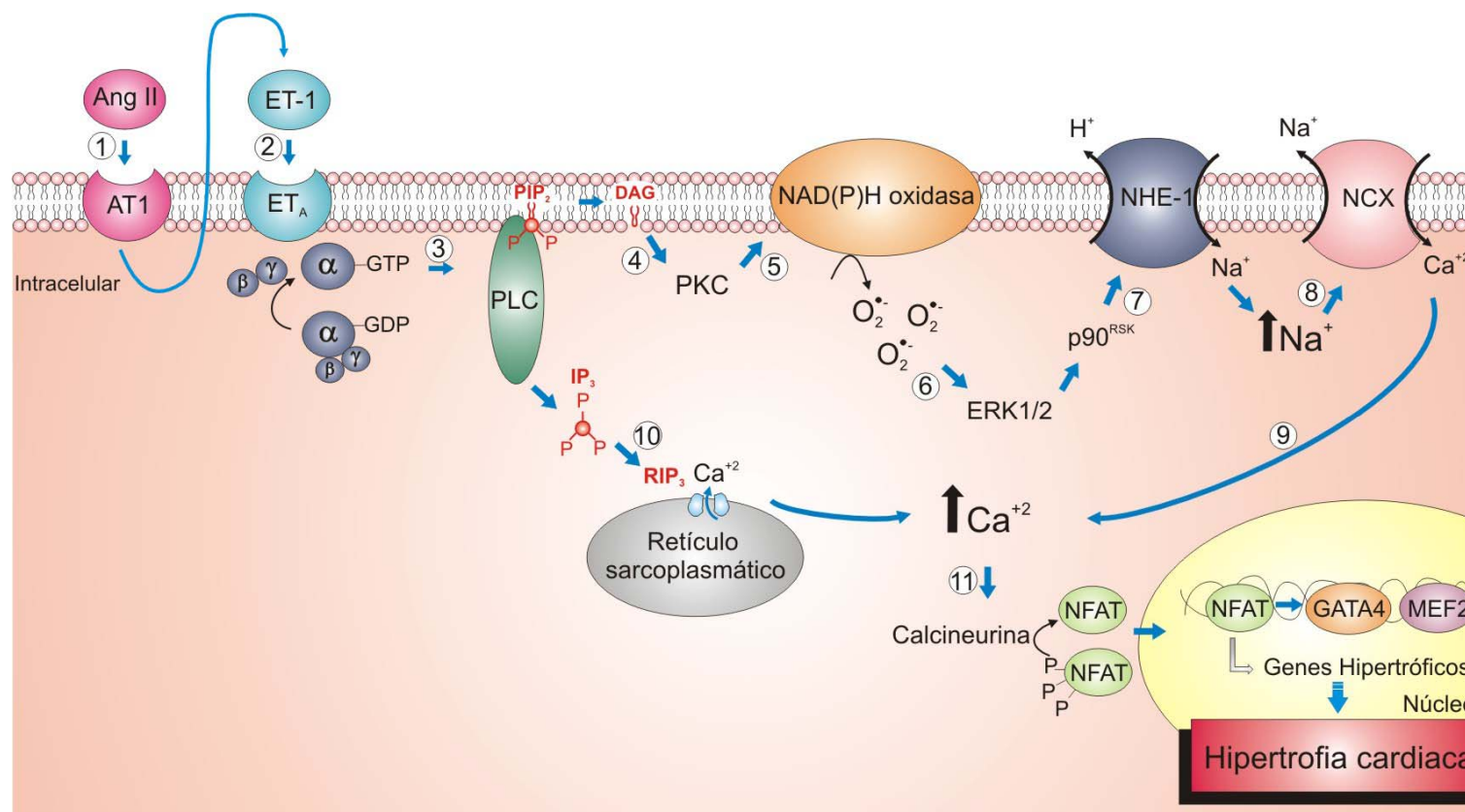
Numerosos estudios involucran al aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular [ $\text{Ca}^{2+}_i$ ] como la señal inductora de la hipertrofia cardíaca. Factores humorales como la Ang II, ET-1 y fenilefrina (FE) conducen al aumento del [ $\text{Ca}^{2+}_i$ ] [49, 52, 53]. Además, como se mencionó anteriormente se ha demostrado que muchos de los efectos de la Ang II son atribuidos a la formación/ liberación de ET-1, la cual mediante una acción autócrina/ parácrina produce su efecto [19, 20, 42-46]. Asimismo, ambos agonistas activan al intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE-1), que al aumentar la concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular [ $\text{Na}^+_i$ ], promueve el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula a través del aumento de actividad del modo reverso del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{NCX}_{\text{rev}}$ ) [19, 45].

Por otra parte, estudios más recientes sugieren que varios de los efectos hipertrofiantes de la Ang II están mediados a través de la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO). Las ERO incluyen al anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y al radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) (para mayor detalle ver la siguiente sección) que activan la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) [54-56]. Es decir, a través de lo señalado anteriormente, el aumento de la producción de ERO induciría el aumento de la actividad del NHE-1 seguido del aumento de [ $\text{Ca}^{2+}_i$ ] e hipertrofia cardíaca.

En la **Figura 2** se describe la vía de señalización intracelular propuesta para explicar la acción de Ang II y ET-1 a través de la activación de los receptores AT1 y  $\text{ET}_A$  respectivamente. Los receptores AT1 de Ang II, y  $\text{ET}_A$  de

ET-1 están acoplados a la proteína Gq (RAPGq), cuyo nombre deriva de su capacidad de unir nucleótidos de guanina, específicamente a la proteína G de tipo q [57]. Esta proteína G es heterotrimérica, es decir, está formada por 3 subunidades: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gama ( $\gamma$ ). La subunidad  $\alpha$ , presenta un sitio de unión a nucleótidos de guanina y actividad GTPasa. En el estado inactivo, una molécula de GDP se encuentra unida al sitio de unión de nucleótidos de  $\alpha$  [58]. La estimulación del receptor AT1 con Ang II, produce un cambio conformacional en la subunidad  $\alpha$ , que causa el reemplazo de GDP por GTP y la disociación del trímero. Esta subunidad  $\alpha_q$  activa a la isoforma  $\beta$  de la fosfolipasa C (PLC $\beta$ ). Esta enzima hidroliza el fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) para dar inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> puede inducir la liberación de Ca<sup>+2</sup> hacia el citosol desde el retículo sarcoplasmático [59, 60]. El DAG que permanece unido a la membrana, es un activador de la proteína quinasa C (PKC). Esta quinasa a través de la activación de la NAD(P)H oxidasa aumenta la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, que activa a la ERK1/2. La MAPK ERK1/2 fosforila a la quinasa p90<sup>RSK</sup>, que al fosforilar al NHE-1 lo activa [61]. De este modo, el aumento de Na<sup>+</sup>, como consecuencia de la hiperactividad del NHE-1, induce el modo reverso del intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup> (NCX), por el cual aumenta la concentración de Ca<sup>+2</sup> intracelular, que induce al desarrollo de hipertrofia cardiaca [19, 20, 45, 46, 62-65], a través de la activación de fosfatasas y/o quinasas, cuyo blanco de acción son factores de transcripción como el NFAT, GATA4, MEF-2 y AP-1 [48, 50, 66, 67] (**Figura 2**).

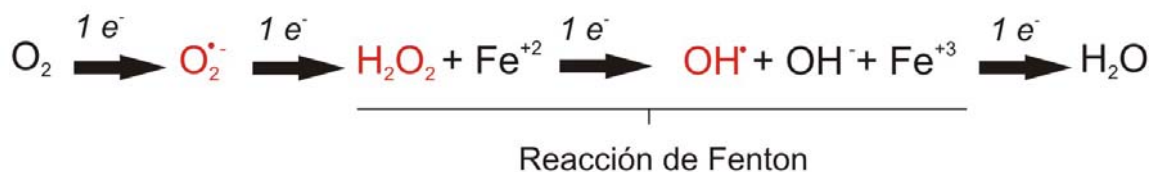
En resumen, la Ang II y la ET-1 producen efecto inotrópico positivo [68-71], e hipertrofia a través de la activación de RAPGq, que inicia una cascada de señales intracelulares que conduce a la producción de ERO y activación de las quinasas: PKC, MAPKs, y CaMK y fosfatasas como calcineurina. Estas últimas promueven el crecimiento celular, a través de la activación de factores de transcripción prohipertróficos (NFAT, GATA4, MEF-2 y AP-1) y factores relacionados con la síntesis de proteínas [48, 50, 66].



**Figura 2.** Vía de señalización intracelular que conduce a hipertrofia cardíaca. La estimulación del receptor AT1 por Ang II (1), induce la producción/ liberación de ET-1 que a través de la estimulación de su receptor ET<sub>A</sub> acoplado a la proteína Gq (2), produce la disociación de la subunidad α de las subunidades βγ de esta proteína, y unión a GTP. Esto lleva a la activación de la fosfolipasa C (PLC) (3), que hidroliza el PIP<sub>2</sub> en DAG e IP<sub>3</sub>. La activación de PKC por DAG (4) activa a la NAD(P)H oxidasa (5) que produce superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), el cual al activar la vía de las quinasas ERK1/2-p90<sup>RSK</sup> (6), conduce a la fosforilación e hiperactividad del NHE-1 (7). En consecuencia aumenta el Na<sup>+</sup> intracelular que favorece el modo reverso del NCX (8) e incrementa el Ca<sup>+2</sup> citosólico (9). Por otro lado, la liberación de Ca<sup>+2</sup> desde el retículo sarcoplasmático por IP<sub>3</sub> (10), producto de la hidrólisis del PIP<sub>2</sub> por PLC, contribuye al aumento de la concentración de este ión. La activación de calcineurina dependiente de Ca<sup>+2</sup> (11) es responsable del desarrollo de hipertrofia cardíaca, a través de la activación de factores de transcripción, como el NFAT, GATA4 y MEF2.

### 1.5. Especies reactivas del oxígeno (ERO)

Las ERO incluyen a los radicales libres: anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), y radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), y especies no radicales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Debido a que los radicales libres tienen electrones desapareados son más reactivos que las especies no radicales [72]. Pueden producirse durante la reducción del oxígeno a agua con 4 electrones, como ocurre en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTE). La donación de un electrón al oxígeno molecular produce  $O_2^{\cdot-}$ . La donación de un segundo electrón al  $O_2^{\cdot-}$  cuando se reduce con un ión hidrógeno rinde  $H_2O_2$ , mientras que la donación de un tercer electrón al  $H_2O_2$  como ocurre en la reacción de Fenton, resulta en la producción del radical  $OH^{\cdot}$  altamente reactivo [73].



#### 1.5.1. Fuentes de ERO

Las fuentes de ERO en el corazón incluyen a la xantina oxidasa, NAD(P)H oxidasa, los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones, y en determinadas circunstancias de la óxido nítrico sintasa (NOS).

##### 1.5.1.1. NAD(P)H oxidasa

Inicialmente, se identificó bioquímica y funcionalmente a la familia de proteínas de NAD(P)H oxidasa (Nox) de neutrófilos, cuya función oxidante es importante en la defensa contra microbios.

La Nox es una enzima que contiene 6 dominios de transmembrana, y una cola citoplasmática a la cual se une el NADH/NAD(P)H. Está asociada a la

membrana plasmática y cataliza la reducción del oxígeno con un electrón a expensas de la oxidación del NAD(P)H a NAD(P)<sup>+</sup> para dar O<sub>2</sub><sup>-</sup>.



La familia de Nox comprende 7 miembros: Nox1-5 y Duox 1 y 2 (oxidasa dual 1 y 2, las cuales tienen un dominio de peroxidasa adicional). En cardiomiocitos, se expresan la Nox2 y la Nox4 [74, 75].

La Nox cardiaca consiste en las subunidades de membrana: gp91<sup>phox</sup> (isoforma 2: Nox2) y p22<sup>phox</sup> y los componentes citosólicos: p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, y la pequeña proteína GTPasa, Rac. El mecanismo de activación de la Nox por agonistas como Ang II, ET-1, agonistas α-adrenérgicos y factor de necrosis tumoral-α, involucra la fosforilación de p47<sup>phox</sup> dependiente de PKC. Asimismo, la activación de Rac-GDP hacia la forma de Rac-GTP, induce la translocación de las demás subunidades citosólicas hacia la membrana plasmática y cambio conformacional que promueve la activación de la subunidad catalítica gp91<sup>phox</sup> [76].

A diferencia de los neutrófilos, en los miocitos cardiacos, como en otros tipos celulares, la Nox se expresa constitutivamente, produce niveles más bajos de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y éste puede actuar como segundo mensajero regulando vías de señalización intracelular [73, 77, 78].

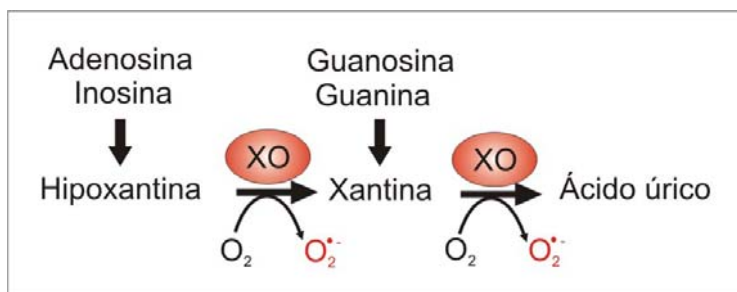
#### 1.5.1.2. Xantina oxidasa

La xantina oxidoreductasa (XOR) se expresa en bajos niveles en el corazón, y su actividad aumenta en insuficiencia del miocardio y en isquemia por aumento de la disponibilidad de su sustrato, las purinas [74].

Esta enzima es codificada por un gen simple, pero existe como un homodímero en dos formas interconvertibles: la xantina deshidrogenasa (XDH) y la xantina oxidasa (XO). La XDH puede convertirse en XO por oxidación reversible de los grupos tioles, o irreversible por clivaje proteolítico. La XOR

cataliza los dos pasos finales de la degradación de purinas, convirtiendo la hipoxantina en xantina, y la xantina en ácido úrico. La XOR es reducida durante la oxidación de la xantina, por lo cual cuando se reoxida, se transfieren al oxígeno dos electrones en cada uno de los pasos, generando  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (**Figura 3**). La XO parece ser la responsable de la generación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , mientras que la XDH prefiere al  $\text{NAD}^+$  como aceptor de electrones (es importante destacar que esta enzima no actúa como Nox) [74].

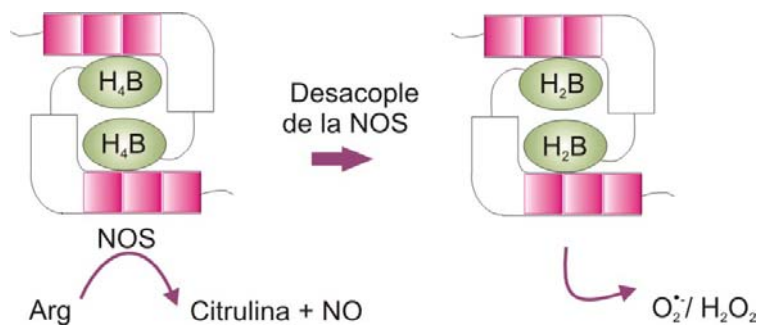
La XOR está presente en el retículo sarcoplasmático de miocitos cardiacos [74].



**Figura 3.** Formación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por reoxidación de la XO durante la degradación de purinas, que ocurre en situaciones de isquemia e insuficiencia cardíaca.

### 1.5.1.3. Óxido nítrico sintasa

Se han publicado varios trabajos que demuestran que no sólo las células endoteliales producen óxido nítrico por la óxido nítrico sintasa (NOS) sino que los miocitos cardiacos también la expresan [79, 80]. El óxido nítrico (NO) se forma durante la conversión de la L-arginina a L-citrulina por la NOS en presencia de oxígeno y NAD(P)H. En ausencia del sustrato arginina y/o del cofactor (6R)-5,6,7,8-tetrahidro-L biopterina reducido ( $\text{H}_4\text{B}$ ), la NOS desacopla la producción de NO activando la producción del  $\text{O}_2^{\cdot-}$  [74, 81] (**Figura 4**).



**.Figura 4.** Formación de  $O_2^{\bullet-}$  por desacople de la NOS (óxido nítrico sintasa) que ocurre por la oxidación de su cofactor  $H_4B$ .

Se han identificado tres isoformas de la NOS: neuronal (nNOS o NOS1), inducible (iNOS o NOS2) y endotelial (eNOS o NOS3). En cardiomiocitos, la eNOS se encuentra en caveolas, mientras que la nNOS se encuentra en retículo sarcoplasmático y también se ha encontrado en mitocondria (mtNOS). Aunque las tres isoformas se postularon como candidatas para la mtNOS, en el corazón la mayor parte de las evidencias involucran a la nNOS como la isoforma mitocondrial [81].

En la **Figura 5** se resumen las fuentes de ERO y los sistemas antioxidantes presentes en las células cardíacas.

#### 1.5.1.4. Mitocondria

##### Bioenergética mitocondrial

La mitocondria es una organela esencial para el mantenimiento de la función celular, ya que en ella se producen reacciones de óxido-reducción que conducen a la síntesis de ATP durante la respiración celular. La glucosa y ácidos grasos son sustratos metabólicos para el corazón. La oxidación de éstos a acetil-CoA conduce a la formación en el ciclo de Krebs del poder reductor representado por NADH y  $FADH_2$  que entran a la cadena de transporte de electrones (CTE). La CTE contiene la coenzima Q (ubiquinona; Q) y 5 complejos respiratorios en la membrana interna mitocondrial (MIM):

*Complejo I* (NADH deshidrogenasa),

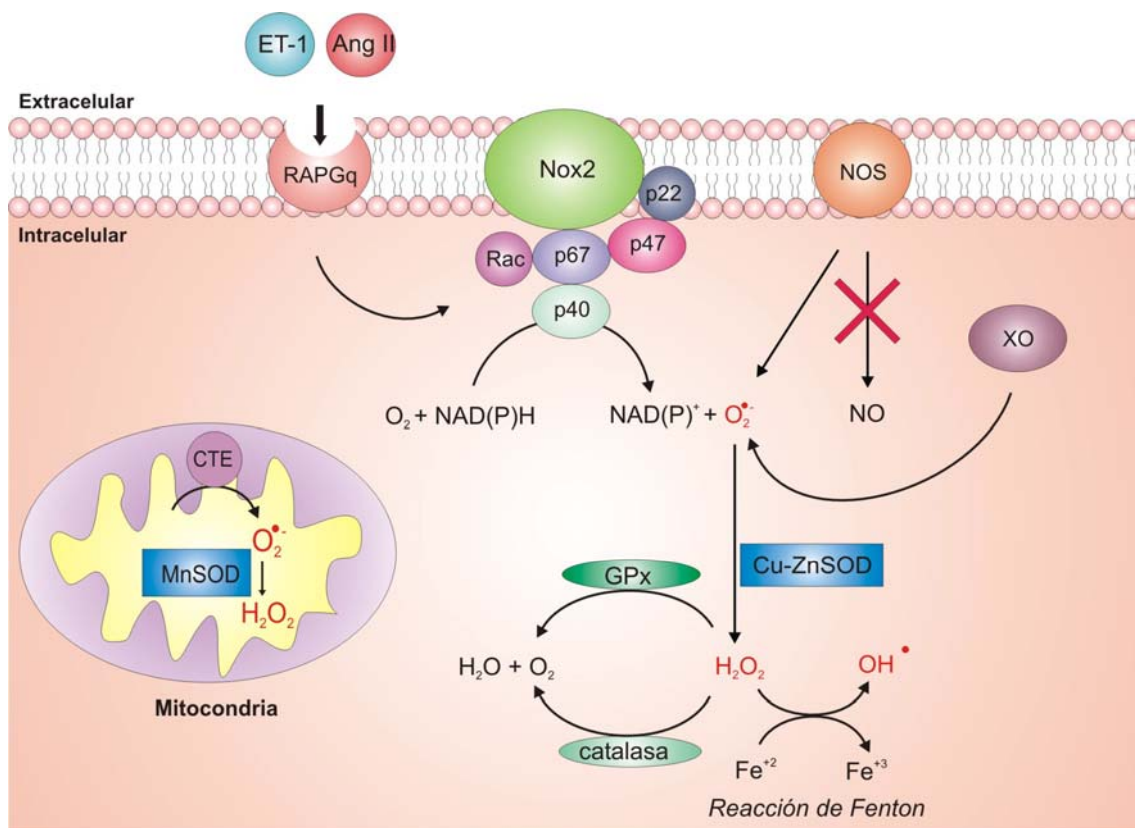


Complejo II (succinato deshidrogenasa, única enzima del ciclo de Krebs unida a la MIM),

Complejo III (citocromo bc1),

Complejo IV (citocromo c oxidasa o aa3) y

Complejo V (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP sintasa).



**Figura 5.** Fuentes de ERO y sistemas antioxidantes en tejido cardíaco. La activación de la Nox inducida por factores como Ang II y ET-1, se produce por la translocación de los componentes regulatorios ( $p47^{\text{phox}}$ ,  $p67^{\text{phox}}$ ,  $p40^{\text{phox}}$  y Rac) hacia la membrana plasmática, conduciendo a la producción del anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) por la subunidad catalítica, Nox2 asociada a  $p22^{\text{phox}}$ . Mediante la reacción de Fenton se genera el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) a partir de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El anión  $O_2^{\bullet-}$  también se genera por desacople de la óxido nítrico sintasa (NOS), por los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTE) y a través de la xantina oxidasa (XO). La superóxido dismutasa (SOD) mitocondrial (MnSOD) y citoplasmática (Cu-ZnSOD), dismutan el  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$ , mientras que la glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa catalizan la conversión de  $H_2O_2$  a agua y oxígeno molecular.

La transferencia de electrones entre los complejos I, II y III no ocurre secuencialmente. Los electrones provenientes de la oxidación del NADH a

través del complejo I y de la oxidación del  $\text{FADH}_2$  y del succinato a fumarato por el complejo II reducen a la ubiquinona (Q). Ésta a través del ciclo Q media la transferencia de electrones desde estos complejos (I y II) al complejo III. El complejo III reduce al complejo IV y por último, éste reduce el oxígeno molecular a  $\text{H}_2\text{O}$ . Las reacciones redox que ocurren en los complejos I, III, y IV están acopladas a la translocación de  $\text{H}^+$  a través de la membrana interna mitocondrial, estableciendo la fuerza protón motriz ( $\Delta p$ ), formada por: el gradiente de pH, y por el potencial de la membrana interna mitocondrial ( $\Psi_m$ ). La fuerza protón motriz permite la producción de ATP a través del complejo V, que es exportado al citosol por la adenina nucleótido translocasa [82] (**Figura 6**).

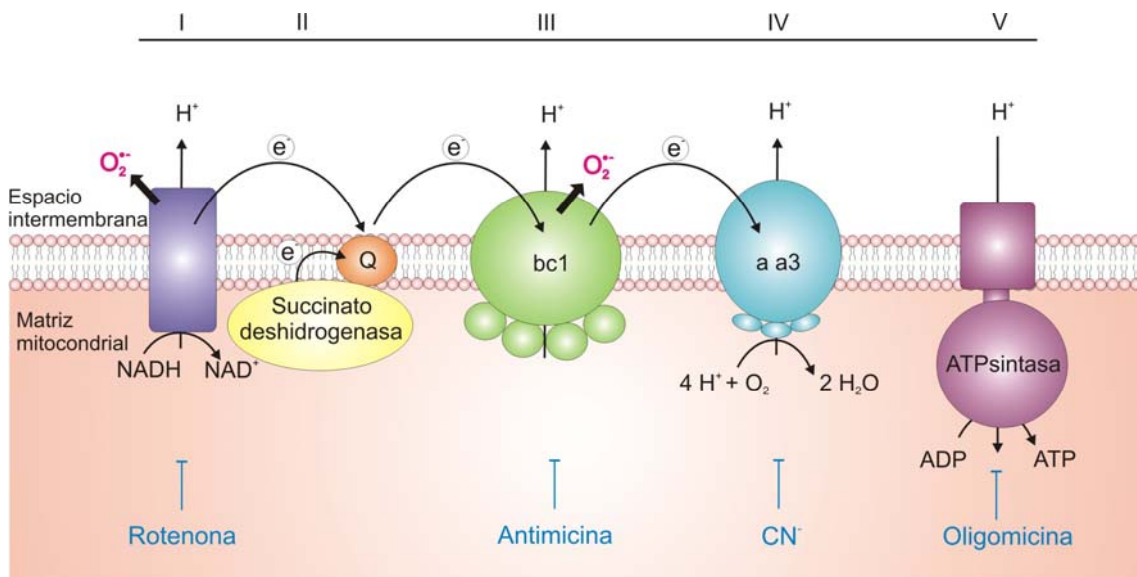
#### Mitocondria como fuente de ERO

Aunque la cadena de transporte de electrones (CTE) durante la óxido-reducción de los transportadores, utiliza con bastante eficiencia el  $\text{O}_2$ , es inevitable la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  durante la fosforilación oxidativa. Ha sido estimado que aproximadamente del 1-5 % de los electrones que fluyen por la CTE se pierden en la formación de ERO [82].

El  $\text{O}_2^{\cdot-}$  se produce a través de los complejos I y III de la CTE (**Figura 6**) [82, 83]. La producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por el complejo I puede bloquearse con rotenona y ser estimulada cuando la dupla  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  está mayoritariamente reducida, mientras que, la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por el complejo III, puede bloquearse frenando el transporte de electrones antes y después de este complejo (con rotenona al complejo I, con cianuro al complejo IV, o con oligomicina que inhibe al complejo V) o inhibiendo con myxotiazol la formación de semiubiquinona ( $\text{QH}^{\cdot}$ , intermediario del ciclo Q) [84] (**Figura 6**).

#### 1.5.2. Sistemas antioxidantes

El estrés oxidativo se produce por un desbalance entre los sistemas productores de ERO y los sistemas antioxidantes. En el miocardio, como en



**Figura 6.** Producción de superóxido mitocondrial. El anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) se produce en la cadena de transporte de electrones a nivel del complejo I (NADH deshidrogenasa) y complejo III (citocromo bc1: citocromo c coenzima Q oxidoreductasa).  $CN^-$  = cianuro, Q = ubiquinona.

otros tejidos, los mecanismos antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) protegen a las células del daño oxidativo, ya que mantienen bajos los niveles de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$ . Se conocen tres isoformas de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en mamíferos: MnSOD (mitocondrial), Cu-ZnSOD (citoplasmática), y ECSOD (extracelular, también tiene Cu-Zn), las cuales dismutan el  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$  [77]. La MnSOD, codificada por un gen nuclear, se encuentra en la matriz mitocondrial, y corresponde a aproximadamente el 90% de la actividad total de SOD en miocitos cardíacos. Esta isoforma participa en el control del  $O_2^{\cdot-}$  mitocondrial producido durante la fosforilación oxidativa normal. La Cu/ZnSOD se localizan en el citosol y unida a la matriz extracelular [77].

Las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa (GPx), ésta última a través de la oxidación del glutatión reducido (GSH), catalizan la conversión de  $H_2O_2$  a agua y oxígeno molecular [74, 77] (**Figura 5**).

Los antioxidantes no enzimáticos incluyen al glutatión, vitaminas A, E y C, y ácido lipoico [74].

### 1.6. Mecanismo de “liberación de ERO inducida por ERO”

Zorov y coautores propusieron el mecanismo de “liberación de ERO inducida por ERO”. En dicho trabajo, se demostró que la acumulación de ERO por la fotoactivación de derivados de la tetrametil rodamina en miocitos cardíacos, produce la disipación del potencial de la membrana interna mitocondrial ( $\Psi_m$ ), lo cual promueve la liberación de ERO desde la mitocondria a través de la apertura del poro de transición mitocondrial (MPT) [85]. Esto sugirió que las ERO del citoplasma pueden inducir la producción de ERO por la mitocondria. Al respecto, se vinculó a los canales mitocondriales de  $K^+$  dependientes de ATP (mitoK<sub>ATP</sub>), con el mecanismo de “liberación de ERO inducida por ERO”. En relación a esto, se demostró que los abridores de los mitoK<sub>ATP</sub>, como pinacidil y cromakalina, despolarizan la membrana interna mitocondrial ( $\Psi_m$ ) y al acelerar la respiración celular, estimulan la producción de ERO [86].

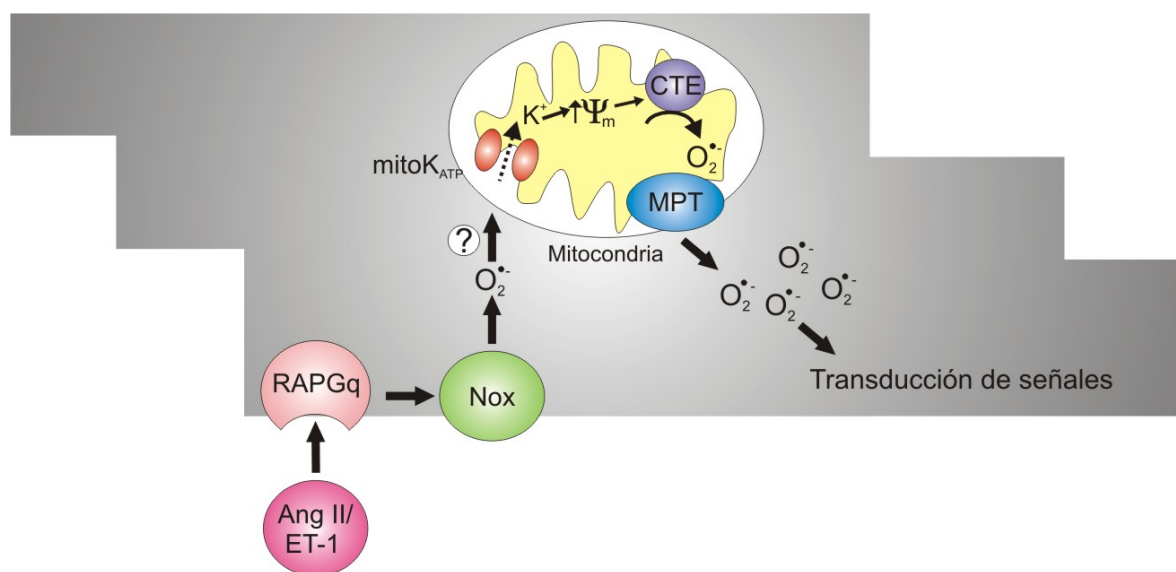
Recientemente, Garlid y Costa demostraron que la apertura de los mitoK<sub>ATP</sub>, produce la entrada de  $K^+$  hacia la matriz mitocondrial, lo cual induce aumento del volumen y alcalinización de la matriz, que activa la producción de  $O_2^{\cdot-}$  por inhibición del complejo I de la CTE [87].

Kimura y colaboradores demostraron que el efecto preconditionante de Ang II contra el daño por isquemia y reperfusión, se debe a la producción de ERO mitocondrial y ésta es dependiente de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  por activación de la Nox. Ellos sugieren que la Ang II estimula la Nox cardíaca por un mecanismo dependiente de PKC, y éstas ERO disparan la apertura de los mitoK<sub>ATP</sub>, lo cual induce la despolarización del  $\Psi_m$  que estimula la producción de ERO mitocondrial [88] (**Figura 7**). Al respecto, un estudio reciente en células endoteliales relacionó las ERO citoplasmáticas, producto de la activación de la Nox por Ang II, con las ERO producidas por la mitocondria [89]. Estos autores proponen que Ang II a través de AT-1 conduce a la rápida producción de ERO, producto de la activación de la Nox dependiente de PKC. Este superóxido produce aumento de la producción de ERO mitocondrial, despolarización del

$\Psi_m$  y disminución del contenido de tioles de bajo peso molecular [89] (**Figura 7**).

Por otra parte, existen evidencias que sustentan que las ERO citoplasmáticas se relacionan con la apertura de los mitoK<sub>ATP</sub>. Zhang y colaboradores demostraron que el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> estimula la apertura de los mitoK<sub>ATP</sub> reconstituidos en bicapas lipídicas de corazón bovino, ya que oxida directamente los grupos sulfidrilos de los residuos de cisteína de este canal [90]. Sin embargo, Garlid y Costa en estudios *in vitro* demostraron que las ERO no activan directamente la apertura de los mitoK<sub>ATP</sub>, ellos proponen que la fosforilación de los éstos canales está mediada por la activación de PKCε inducida por ERO [87].

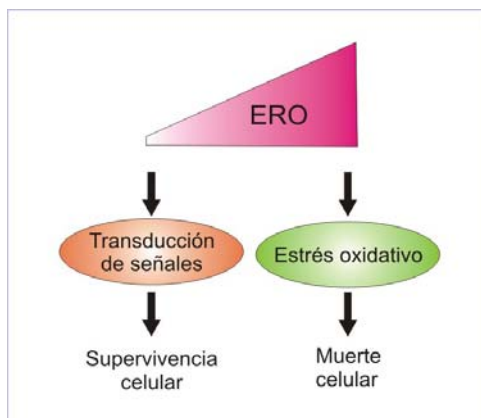
De acuerdo a las evidencias señaladas anteriormente, en la **Figura 7** se resume el mecanismo de liberación de ERO inducida por ERO en cardiomiocitos.



**Figura 7.** Vía de señalización intracelular que involucra la liberación de ERO inducida por ERO. La estimulación de RAPGq con Ang II/ ET-1, activa la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> por la Nox. Este radical libre abre los canales de K<sup>+</sup> mitocondriales dependientes de ATP (mitoK<sub>ATP</sub>) (aunque es controversial si por un mecanismo directo o indirecto), lo cual conduce al aumento del potencial de la membrana interna mitocondrial ( $\Psi_m$ ), y producción de ERO por la mitocondria, que salen hacia el citoplasma por el poro de transición mitocondrial (MPT).

### 1.7. ERO como segundos mensajeros en Hipertrofia cardiaca

Como se mencionó anteriormente, las ERO en bajas concentraciones (0.05-0.07  $\mu\text{mol/L}$  intracelular) [91] pueden actuar como segundos mensajeros en cascadas de señalización intracelular, mientras que a altos niveles están asociadas con el estrés oxidativo y muerte celular [92, 93] (**Figura 8**).



**Figura 8.** Esquema que representa la acción de las ERO en la modulación de las funciones celulares. Cuando los mecanismos de producción de ERO exceden a los sistemas antioxidantes se produce estrés oxidativo que puede conducir a la disfunción y muerte celular. Las ERO a bajas concentraciones pueden actuar como segundos mensajeros en la transducción de señales.

Varios factores involucrados en la cascada de señalización hipertrófica y de apoptosis son activados directa o indirectamente por las ERO, mediante la regulación de la transcripción y/o mediante fosforilación de proteínas quinasas. Estas incluyen PKC, las MAPKs: p38, JNK y ERK1/2, ASK-1, PI3K, Akt, y tirosina quinasas como Src y FAK, calcineurina y factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y la proteína-activadora -1 (AP-1) [92, 93]. El grupo de Collucci demostró que dependiendo de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede promover hipertrofia o apoptosis. A baja concentración ( $\sim 10 \mu\text{mol/L}$ ) se produjo la activación de la ERK1/2 y de la síntesis de proteínas, mientras que a altas concentraciones (100- 300  $\mu\text{mol/L}$ ) puede promoverse la HC o la apoptosis en miocitos cardiacos de rata adulta [94]. Algunos estudios reportaron que las ERO activan a src y PKC a través de la oxidación de los residuos de cisteína dentro de sus dominios regulatorios, mientras que las ERO pueden indirectamente regular la cascada de señalización de las tirosina quinasas mediante la inhibición de las proteínas tirosina fosfatasa [95].

Estudios recientes demostraron que varios de los efectos hipertrofiantes de la Ang II están mediados a través de la generación de ERO. En miocitos ventriculares de ratas recién nacidas se observó que los antioxidantes eliminan la hipertrofia cardiaca inducida por Ang II [96]. Mas aún, se reportó que la expresión inducida por Ang II del marcador de hipertrofia: isoforma  $\beta$  de la cadena pesada de la miosina ( $\beta$ -MHC), está mediada por la activación de las quinasas Ras/Rac/ ERK1/2 dependiente de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  [97]. Estudios posteriores revelaron que la generación de ERO conduce a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B que produce hipertrofia [98]. Los efectos regulatorios directos de ERO sobre la actividad de los factores de transcripción AP-1 y NF- $\kappa$ B se demostraron en varios tipos celulares, incluyendo los cardiomiocitos [99]. Mas aún, posteriormente se demostró que la activación de AP-1 inducida por Ang II es dependiente de la activación de la p38 MAPK secundariamente a la activación de la Nox en miocitos ventriculares de rata adulta [100]. Un trabajo posterior demostró en miocitos ventriculares de ratas recién nacidas que la Ang II activa a AP-1 a través de la generación de ERO [101]. Además, se demostró que la hipertrofia inducida por estimulación  $\alpha$ -adrenérgica con norepinefrina, es mediada por las ERO que producen modificación oxidativa de los tioles de Ras, quinasa que participa en la vía de señalización que involucra la activación de MEK1/2, ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> en miocitos ventriculares de rata adulta [102].

Por otra parte, hay evidencias que relacionan a las ERO con la activación del NHE-1. Al respecto, varios autores demostraron que las ERO activan al NHE-1 a través de la activación de ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> en cardiomiocitos de rata adulta y recién nacida [54-56].

Recientemente, Caldiz y colaboradores propusieron que el aumento lento de la fuerza contráctil del miocardio inducida por el estiramiento (“Slow force response”), se produce como consecuencia de la liberación de Ang II preformada, la cual induce la producción de  $O_2^{\cdot-}$ , que activa la cascada de quinasas ERK1/2-p90<sup>RSK</sup> conduciendo a la fosforilación y activación del NHE-1 [62] **(ver Figura 2)**.

### 1.8. Importancia de la regulación del pH en el miocardio

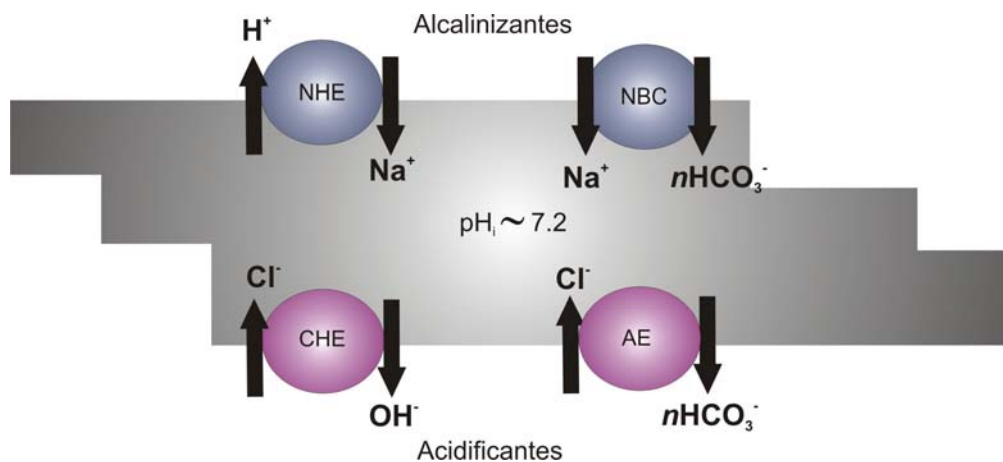
Como producto del metabolismo celular se generan ácidos. El metabolismo aeróbico produce  $\text{CO}_2$ , que cuando se hidrata libera  $\text{H}^+$ , mientras que la oxidación incompleta de biomoléculas en condiciones anaeróbicas genera  $\text{H}^+$  en la forma de ácido láctico [103]. La primera barrera de defensa contra los desequilibrios ácido-base está constituida por los sistemas buffer. Estos incluyen: grupos imidazol de residuos de histidina de proteínas, aminoácidos, como taurina, fosfato inorgánico, y lactato. Estos amortiguadores intracelulares de pH constituyen el sistema buffer intrínseco ( $\beta$ ) (ver su determinación en materiales y métodos, sección 3.8). Mientras que el sistema extrínseco comprendido por  $\text{CO}_2$ /bicarbonato también tiene una participación importante en la regulación del pH [103].

Además existen proteínas transportadoras iónicas de membrana que se encargan de regular el pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ).

### 1.9. Regulación del $\text{pH}_i$ por transportadores iónicos sarcolemales

El pH citoplasmático se mantiene en un rango de pH de 7.1 a 7.2, debido a la actividad de 4 transportadores iónicos de membrana. La actividad de estas proteínas es muy baja en condiciones basales. Sin embargo, frente a una carga ácida se activan los *intercambiadores alcalinizantes*: el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) y el cotransporte  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (NBC), mientras que los *intercambiadores acidificantes*:  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  independiente de  $\text{Na}^+$  (AE) y  $\text{Cl}^-/\text{OH}^-$  (CHE) se activan con una carga intracelular alcalina [103, 104] (**Figura 9**).





**Figura 9.** Esquema que representa un miocito cardíaco, donde se muestran las proteínas transportadoras de equivalentes de H<sup>+</sup> que mantienen el pH<sub>i</sub>~7.2. El NHE y el NBC, se activan por una carga ácida intracelular, mientras que el AE y el CHE se activan bajo condiciones de alcalosis intracelular. Los 4 transportadores iónicos presentan isoformas electroneutras (estequiometría de intercambio iónico 1:1), además el NBC presenta isoformas electrogénicas (estequiometría 1 Na<sup>+</sup>-2 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) mientras que la estequiometría del AE cardíaco electrogénico es controversial (1 Cl<sup>-</sup>- 2 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

#### 1.10. Características estructurales y funcionales del NHE-1

El intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE) cataliza el intercambio electroneutro de un H<sup>+</sup> intracelular por un Na<sup>+</sup> extracelular. Según la sensibilidad a inhibidores farmacológicos, distribución tisular y estructura molecular, se describieron hasta el momento 9 isoformas del NHE (NHE-1 a NHE-9) [105].

En particular, la isoforma 1 (NHE-1) es la que mayoritariamente se expresa en el tejido cardíaco, a nivel de los discos intercalares [106]. El NHE-1 es una glicoproteína situada en el sarcolema de los miocitos cardíacos, cuyo peso molecular es de 91 kDa, correspondiente a los 815 aminoácidos que constituyen su estructura primaria, mientras que la estructura terciaria glicosilada es de 110 kDa.

Contiene dos dominios: un dominio transmembrana de 500 aminoácidos y un dominio citoplasmático de 315 aminoácidos. El dominio transmembrana está formado por 12 segmentos que son esenciales para la función del transporte iónico. Además, contiene un sitio alostérico sensible al pH ya que sensa los H<sup>+</sup> [107] (**Figura 10**).



### 1.11. Rol fisiológico y patológico del NHE-1

#### 1.11.1. Rol fisiológico

El NHE-1 participa en el crecimiento celular, así se demostró en numerosos estudios de inhibición y “knock out” del NHE-1. Ratones que carecen del NHE-1 (Nhe1<sup>-/-</sup>) presentaron una disminución de la tasa de crecimiento y ataques epilépticos. Regula a través del control del pH numerosos genes que participan en la progresión del ciclo celular [108].

#### 1.11.2. Rol patológico

Aunque en condiciones basales el NHE-1 tiene muy baja actividad, se activa en situaciones patológicas como isquemia y reperfusión, remodelamiento del miocardio después del infarto, y por agonistas como Ang II, ET-1, y estimulación  $\alpha$ - adrenérgica [109].

La hiperactividad del NHE-1 conduce al daño del miocardio por cambios estructurales (apoptosis e hipertrofia), y cambios funcionales (arritmias e hipercontractura), debido a que la acumulación intracelular de Na<sup>+</sup> induce sobrecarga de Ca<sup>+2</sup>, a través de la estimulación del modo reverso del intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup> (NCX) [107] (**ver Figura 2**).

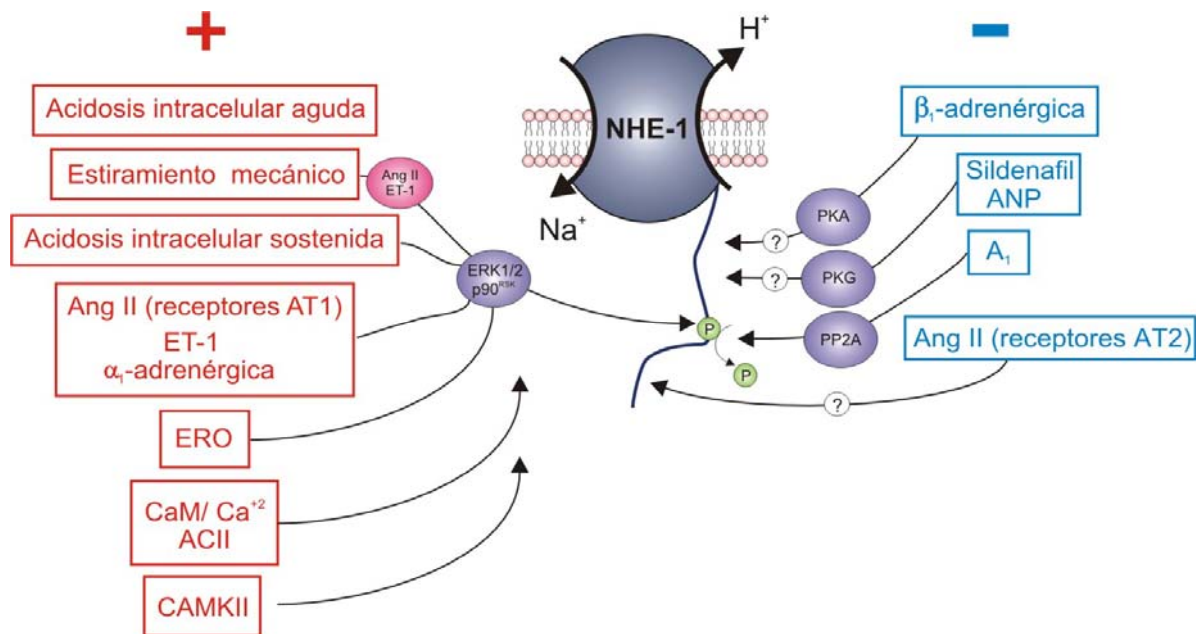
### 1.12. Factores que regulan la actividad del NHE-1

El estímulo primario que activa al NHE-1 es la acidosis intracelular. También puede ser activado por factores extracelulares como hormonas, que incluyen a Ang II, ET-1, factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico, por agonistas  $\alpha_1$  -adrenérgicos y por estímulos mecánicos como el estiramiento de manera dependiente de la fosforilación mediada por las quinasas ERK1/2- p90<sup>RSK</sup> y por PKC [109] (**Figura 11**). Recientemente se ha reportado que la acidosis intracelular sostenida (producida por la inhibición de la activación del NHE-1 en ausencia de Na<sup>+</sup> o con inhibidores específicos),

modula la interacción de los  $H^+$  con el sitio alostérico del NHE-1 a través de la fosforilación de la cola citoplasmática. En ese trabajo la acidosis sostenida por unos pocos minutos, inicia una cascada de señalización que activa al NHE-1 a través de la fosforilación mediada por ERK1/2-p90<sup>RSK</sup> [110] (**Figura 11**). Otro mecanismo por el cual el NHE-1 se activa incluye la fosforilación de ciertos sitios inducida por las ERO. Wei y colaboradores demostraron que el  $H_2O_2$  (50  $\mu\text{mol/L}$ ) induce la activación del NHE-1, que se bloquea por la inhibición de ERK1/2 [54-56]. En estudios *in vitro* se demostró que la  $Ca^{+2}$  Calmodulina quinasa II (CaMKII), fosforila el dominio C-terminal del NHE-1 [111]. Recientemente, Vila-Petroff y colaboradores demostraron en cardiomiocitos de rata que la CaMKII fosforila y activa al NHE-1 [112].

Los mecanismos de activación del intercambiador independientes de fosforilación involucran la interacción con proteínas, como calmodulina (CaM) [113] y ACII [114].

Un mecanismo inhibitorio del NHE-1 se produce a través de la activación del receptor de adenosina ( $A_1$ ) que activa a la proteína fosfatasa 2A (PP2A), la cual desfosforila probablemente su sitio Ser 703 fosforilado por ERK1/2- p90<sup>RSK</sup> [115] (**Figura 11**). Otros factores que regulan negativamente al NHE-1 incluyen a la estimulación  $\beta$ -adrenérgica, a través de PKA [109], y a través de la activación de PKG inducida por sildenafil aunque por un mecanismo aún no conocido [116, 117]. La inhibición del NHE-1 por sildenafil se describe con mayor detalle en la sección 1.13.2 y fue motivo de investigación de esta tesis evaluar la vía de señalización involucrada (ver objetivo II, sección 2.2).



**Figura 11.** Representación esquemática que muestra los factores que regulan la actividad del NHE-1. Los factores activadores del NHE-1, indicados con +, incluyen a la acidosis intracelular aguda, la cual constituye el activador primario, actuando sobre el sitio alostérico. El estiramiento del miocardio (a través de la liberación de Ang II/ ET-1 endógena), la acidosis intracelular sostenida, la estimulación de receptores acoplados a proteína Gq, (con agonistas como Ang II, ET-1 y  $\alpha_1$ -adrenérgica), y las ERO, activan al NHE-1, de manera dependiente de fosforilación mediada por ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup>. También se ha descrito la fosforilación por CAMKII del NHE-1. Además, la interacción del dominio regulatorio con proteínas accesorias ( $\text{Ca}^{+2}$ / CaM, también activa al NHE-1. Los factores que lo inhiben, indicados con -, incluyen a PKA y PKG que median la estimulación  $\beta_1$ -adrenérgica, y con sildenafil y ANP, respectivamente, aunque por mecanismos aún no conocidos. La estimulación de receptores de adenosina ( $A_1$ ) a través de la desfosforilación del NHE-1 mediada por PP2A, tiene un efecto inhibitorio sobre éste. La estimulación con Ang II de receptores AT2, por un mecanismo aún no dilucidado también lo inhibe.

### 1.13. Inhibición del NHE-1 y su relación con PKG

#### 1.13.1. Cardioprotección por inhibición específica del NHE-1

Karmazyn demostró que la inhibición del NHE-1 con amiloride, mejora la recuperación contráctil de los corazones aislados de rata luego de una isquemia [118].

Este efecto cardioprotector se confirmó en varios modelos animales y con diferentes inhibidores específicos del NHE-1 [119-124]. Esto condujo a aumentar el interés de investigar los efectos clínicos de la inhibición del NHE-1.

En los estudios realizados en pacientes con infarto de miocardio las evidencias clínicas del GUARDIAN (Guard During Ischemia Against Necrosis) y del ESCAMI (Evaluation of the Safety and Cardioprotective Effects of eniporide in acute myocardial infarction) no fueron concluyentes [125, 126], mientras que los resultados del EXPEDITION (sodium-hydrogen exchange inhibition to Prevent coronary Events in acute cardiac conditions) indicaron una alta tasa de incidencia de accidente cerebrovascular [127]. Las especulaciones respecto a las diferencias de los resultados entre los modelos animales y estudios clínicos apuntaron a la duración y grado del insulto isquémico, así como al régimen de administración, dosis y duración de la acción de los inhibidores farmacológicos [128].

### 1.13.2. Acción de sildenafil y su efecto sobre el corazón

El sildenafil es un inhibidor específico de la PDE5A, que hidroliza el enlace fosfodiéster del nucleótido guanosina monofosfato cíclico ( $GMP_c$ ) resultando en la forma lineal GMP. Esta enzima pertenece a la familia de 11 isoenzimas de PDE (PDE1- 11) (**Tabla 1**).

Familia	Genes	Sustrato
PDE1	1A, 1B, 1C	$AMP_c/GMP_c$
PDE2	2A	$AMP_c/GMP_c$
PDE3	3A	$AMP_c/GMP_c$
PDE4	4A, 4B, 4C, 4D	$AMP_c$
PDE5	5A	$GMP_c$
PDE6	6A, 6C, 6D, 6G	$GMP_c$
PDE7	7A, 7B	$AMP_c$
PDE8	8A, 8B	$AMP_c$
PDE9	9A	$GMP_c$
PDE10	10A	$AMP_c/GMP_c$
PDE11	11A	$AMP_c/GMP_c$
Total	21	

**Tabla 1.** Familia de PDE. La familia de PDE comprende 11 isoenzimas, que se divide en una subfamilia de 21 isoformas (designadas con letras A, B y C). Las variantes de las isoformas producidas por splicing alternativo no se muestran en la tabla, pero se designan con un número seguido de la letra, dando un total de 48 PDE. En verde se resalta la isoforma cardíaca que cataboliza al  $GMP_c$ .

En miocitos cardíacos, se expresan las PDE: 2, 3 y 5 [129]. Sólo esta última es selectiva para el GMP<sub>c</sub> y se localiza en el citosol [130]. También se ha publicado que la PDE5 puede localizarse en la línea Z de los cardiomiocitos [131-133].

En los últimos años se publicaron varios trabajos que demuestran los efectos cardíacos benéficos de la inhibición con sildenafil de la PDE5A, en modelos de isquemia-reperfusión [134-136]. Además se ha publicado que los pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada, presentan un aumento de la expresión de PDE5A y contribuye al remodelamiento del miocardio después del infarto en un modelo de ratones que sobreexpresan la PDE5A [137].

El sildenafil, al inhibir a la PDE5A, aumenta los niveles de GMP<sub>c</sub> activando así a la PKG, siendo ésta la responsable del efecto cardioprotector [117, 136, 138-141].

Hace varios años se demostró que un aumento de la actividad de PKG inhibe al NHE-1 en células mesangiales renales y en epitelio ciliar ocular, por un mecanismo aún no conocido [142]. Sin embargo, hasta ese momento no se había observado dicho efecto en tejido cardíaco.



***JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS***



## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En estudios recientes se sugiere que en el miocardio las ERO pueden actuar como mediadores intracelulares de la señales inducidas por Ang II y ET-1 [143]. Además, en nuestro laboratorio se demostró en cardiomiocitos ventriculares aislados de gato que el aumento de la contractilidad inducido por una concentración fisiológica de Ang II (1 nmol/L), es completamente mediado por la liberación/producción de ET-1 [44]. En ese trabajo, además se demostró que el efecto inotrópico positivo de una dosis equipotente de ET-1 exógena (0.4 nmol/L), se bloqueó con MPG, un secuestrador de las ERO, sugiriendo que éstas inducen una cascada de señales intracelulares promovidas por la acción de Ang II y ET-1 [44].

### 2.1. **Objetivo I**

**Estudiar en tejido cardiaco y miocitos aislados la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en respuesta a la Ang II (1 nmol/L), y ET-1. Específicamente si el efecto de la Ang II se produce completamente por el mecanismo de liberación de ET-1.**

Como se señaló en la introducción entre los mecanismos que conducen a la activación del NHE-1, se encuentran las ERO [54-56], con el consiguiente efecto deletéreo sobre el corazón debido al aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular secundario al aumento intracelular de  $\text{Na}^{+}$  promovido por el aumento de la actividad del NHE-1 [105, 144, 145].

Por otra parte, debido a que se demostró que la inhibición del NHE-1 resulta beneficiosa, ya que produce inhibición/regresión de la hipertrofia cardiaca [119-124], se diseñaron experimentos en los cuales se inhibe al NHE-1 como estrategia terapéutica para prevenir-revertir la hipertrofia cardiaca. Al respecto, Pérez y colaboradores demostraron que el tratamiento crónico con sildenafil activa a PKG y protege al corazón del remodelamiento post- infarto en ratas con oclusión de la arteria coronaria. Además, estos resultados demuestran en tejido cardíaco que esta protección está asociada a la inhibición del NHE-1 [117].

## 2.2. **Objetivo II**

**Determinar la vía de señalización intracelular por la cual la inhibición de la PDE5A con sildenafil produce inhibición del NHE-1 en un modelo *in vitro* de miocitos cardíacos aislados.**

The page features a decorative design with three horizontal purple lines of varying thicknesses and a light purple L-shaped corner graphic on the right side. The text is centered between the top and middle lines.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Animales

Se utilizaron gatos adultos (peso corporal ~5 kg). Los animales se anestesiaron por inyección intraperitoneal con pentobarbital (35 mg/kg de peso corporal) y los corazones se extrajeron rápidamente.

#### 3.2. Cortes de tejido ventricular

El corazón se perfundió en forma retrógrada con una jeringa a través de la aorta con buffer Krebs-Ringer a pH 7.4 para eliminar la sangre. Se realizaron cortes del de ventrículo izquierdo (1 x 5 mm) y se conservaron a 4 °C hasta iniciar los experimentos.

#### 3.3. Aislamiento de miocitos ventriculares

El corazón se heparinizó (heparina 200 U/ml) y luego se extrajo rápidamente.

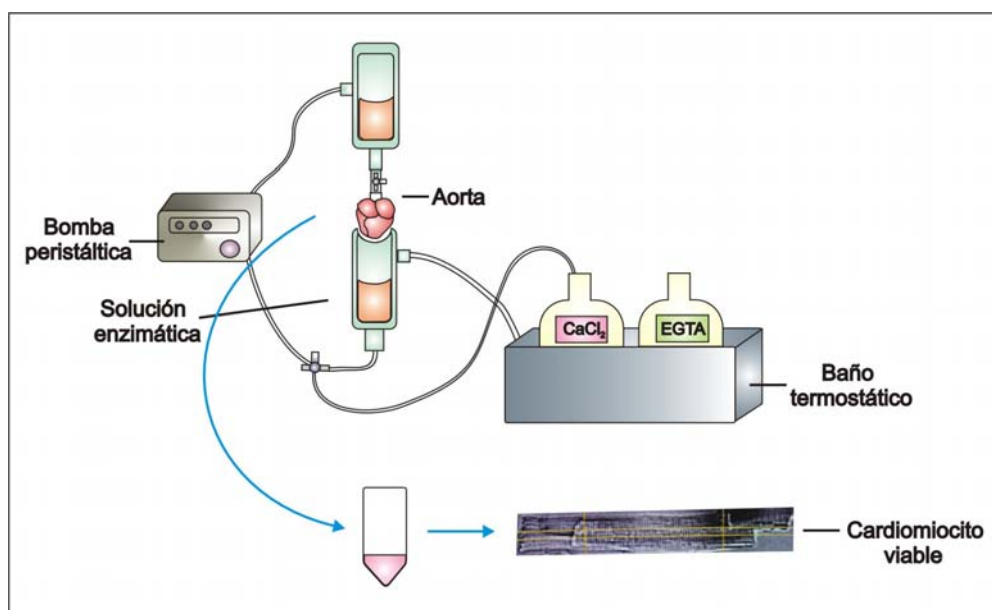
Para obtener miocitos cardiacos aislados, el corazón se perfundió por el método de Langendorff con perfusión retrógrada a través de la aorta (**Figura 12**), a 37°C con un buffer HEPES de la siguiente composición en mmol/L: NaCl 146.2; HEPES 10; glucosa 11; KCl 4.7; NaHPO<sub>4</sub> 0.35; MgSO<sub>4</sub> 1; llevado a pH 7.4 con NaOH equilibrado con O<sub>2</sub> 99.5 %, según el siguiente protocolo:

- 1) Perfusión con buffer HEPES + 1.35 mmol/L de CaCl<sub>2</sub> para lavar la sangre.
- 2) Perfusión con buffer HEPES (0 Ca<sup>+2</sup>) en presencia de EGTA 100 µmol/L durante 5 min. Se ha descrito que en este paso la ausencia de Ca<sup>+2</sup>, produce el desacople intercelular por disociación de los discos intercalares [146].
- 3) Perfusión con buffer HEPES + 60 µmol/L de CaCl<sub>2</sub> en la solución enzimática (colagenasa tipo II 1 mg/ml, proteasa 0.03 mg/ml, albúmina 1 mg/ml) de forma recirculante durante 15-20 min.

4) Luego de la digestión enzimática el corazón se removió del aparato de perfusión. Los cardiomiocitos aislados se separaron del tejido no digerido y se filtraron a través de una malla de nylon de 210  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se les restableció el  $\text{Ca}^{+2}$  hasta 1.35 mmol/L en cuatro pasos (60, 120, 240, 480  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{CaCl}_2$ ), para evitar el daño causado por la entrada masiva del  $\text{Ca}^{+2}$  al interior de la célula proceso conocido como “*paradoja del  $\text{Ca}^{+2}$* ”. La “*paradoja del  $\text{Ca}^{+2}$* ” ocurre cuando las células desacopladas enzimática y mecánicamente, se exponen nuevamente al  $\text{Ca}^{+2}$  para restablecer sus funciones fisiológicas, se produce la entrada masiva del ión, que conduce al aumento excesivo de la contracción (hipercontractura) y ruptura celular [146]. Hasta el momento de las determinaciones, los miocitos se mantuvieron a temperatura ambiente (20-25 °C).

### 3.4. Viabilidad celular

Los miocitos se contaron con una cámara de Neubauer y se determinó el porcentaje de viabilidad celular. Sólo aquellas células cardíacas con forma de bastón se consideraron viables (**Figura 12**).



**Figura 12.** Esquema que representa el sistema de Langendorff a partir del cual se aislaron los cardiomiocitos de gato. Para mayor detalle, ver el texto.

### 3.5. Producción de $O_2^{\cdot-}$

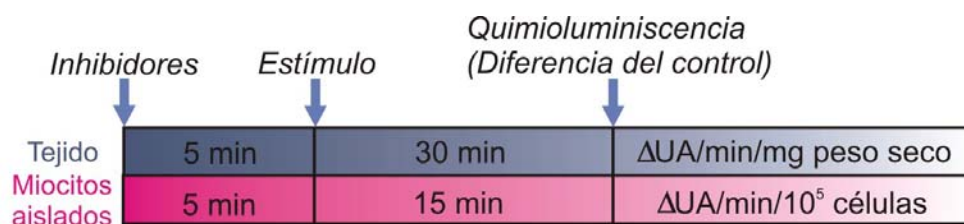
La producción de  $O_2^{\cdot-}$  se determinó por quimioluminiscencia con lucigenina (Bis-N-metilacridinium) 5  $\mu\text{mol/L}$ , en un luminómetro (Chameleon, Hidex). Se utilizó esta concentración de lucigenina, ya que estudios previos demostraron que a mayor concentración se sobrestima la producción de  $O_2^{\cdot-}$  por el fenómeno llamado *ciclado redox*, en el cual el radical lucigenina puede reaccionar con el oxígeno para generar  $O_2^{\cdot-}$  [147, 148].

### 3.6. Protocolo experimental

El tejido o los miocitos se preincubaron 30 o 15 min respectivamente en presencia de la droga a estudiar en buffer Krebs-HEPES de la siguiente composición en mmol/L: NaCl 118.3; KCl 4.7;  $\text{CaCl}_2$  1.35;  $\text{MgSO}_4$  1.2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0;  $\text{NaHCO}_3$  25; glucosa 11; HEPES 20 (llevado a pH 7.4 luego de 1,5 h de equilibrio con una mezcla gaseosa de 95%  $O_2$ / 5%  $\text{CO}_2$  a 37°C), antes de la medición de  $O_2^{\cdot-}$ . Cuando se utilizaron inhibidores se agregaron 5 min previos al estímulo.

Los resultados de las intervenciones farmacológicas se expresaron como diferencia de la señal obtenida del tejido en ausencia de drogas (control), en unidades arbitrarias (UA)/min/mg de peso seco, o en UA/min/ $10^5$  células (**Figura 13**). Previamente se sustrajo la señal en ausencia de tejido.

La luminiscencia en cortes de tejido se determinó durante 30 min con intervalos de 30 seg. y los resultados que se muestran corresponden al valor a los 15 min. La determinación en miocitos se realizó durante 10 min con intervalos de 10 seg. Los resultados corresponden al valor promedio de todos los obtenidos.



**Figura 13.** Protocolo experimental para determinar la producción de  $O_2^{\cdot -}$  en tejido y miocitos cardíacos aislados de gato. Para mayor detalle ver el texto.

### 3.7. Medición del pH intracelular

La medición del pH intracelular ( $pH_i$ ) se realizó de acuerdo a la técnica de epifluorescencia con 2'-7'-bis (2 carboxyethyl) -5',6'- carboxyfluoresceína (BCECF-AM) con el microscopio de epifluorescencia (Ion Optix, Milton, MA) (**Figura 14**). Los miocitos cardíacos se incubaron con el indicador fluorescente BCECF-AM ( $5 \mu\text{mol/L}$ ) a temperatura ambiente durante 10 min en oscuridad y luego se lavaron en buffer HEPES durante 30 min.

Los miocitos cardíacos se colocaron en una cámara de perfusión sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon y Olympus CK2 respectivamente). Se perfundieron continuamente a una velocidad de  $1.33 \text{ ml/ min}$  a  $30^\circ\text{C}$  y se estimularon a una frecuencia de  $0.5 \text{ Hz}$ . Los experimentos se realizaron en presencia de un buffer HEPES libre de bicarbonato (para eliminar el efecto del cotransportador  $\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$  sobre el  $pH_i$ ) de la misma composición que la usada para aislar los cardiomiocitos (ver página 33 y 66).



**Figura 14.** Microscopio de epifluorescencia utilizado en la determinación del pH intracelular en miocitos cardíacos aislados de gato (Ion Optix, Milton, MA).

### 3.8. Calibración de pH

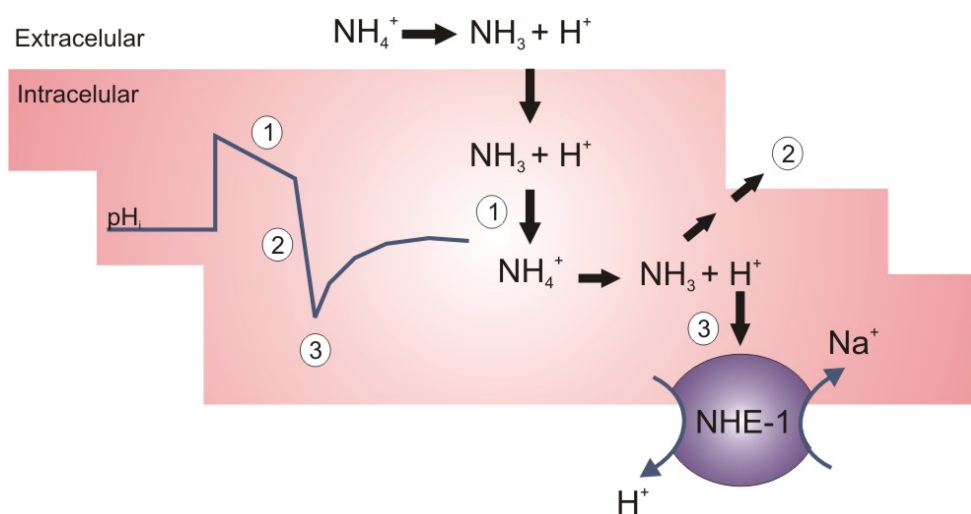
La fluorescencia del indicador BCECF-AM se obtuvo por excitación del indicador a dos longitudes de onda:  $440$  y  $495 \text{ nm}$  (con una lámpara xenon de  $75 \text{ watt}$ ), mientras que la fluorescencia de emisión se colectó con un fotomultiplicador después del pasaje por un filtro a  $535 \text{ nm}$ . El  $pH_i$  se calculó a partir del cociente

de fluorescencia entre 495 nm y 440 nm. Los cocientes se convirtieron a valores de  $\text{pH}_i$  a través del método del BCECF de calibración *in situ* con nigericina ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) al final de cada experimento, utilizando soluciones de  $\text{pH}$  conocido. La solución de calibración de  $\text{pH}_i$  contenía en  $\text{mmol/L}$ : KCl 140,  $\text{MgCl}_2$  1, HEPES 12, glucosa 11, EGTA 2, nigericina 0.001, 2,3- butanodionamonoxima (BDM) 20, con valores de  $\text{pH}$  entre 7.7 a 6.6 ajustados con KOH [149, 150].

### 3.9. Actividad del NHE-1

La actividad del NHE-1 se midió a través de la recuperación del  $\text{pH}_i$  luego de una carga ácida intracelular inducida por un prepulso de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) a  $\text{pH}$  extracelular constante ( $\text{pH}_o$  7.4).

Fundamento de la técnica de Pulso de amonio. La exposición abrupta a  $\text{NH}_4\text{Cl}$  aumenta rápidamente el  $\text{pH}_i$  debido a que el  $\text{NH}_3$  entra en los miocitos y captura los  $\text{H}^+$ . Luego el  $\text{pH}_i$  cae levemente a medida que el  $\text{NH}_4^+$  entra a la célula a través de canales de  $\text{K}^+$  y se disocia. Cuando se lava el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  extracelular, éste se disocia en  $\text{NH}_3$ , que sale de la célula, e iones hidrógeno, que quedan retenidos dentro de ella, generando la acidosis intracelular que activa al NHE-1 [71] (**Figura 15**).





**Figura 15.** Fundamento de la técnica de pulso de amonio. El amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en el medio extracelular se disocia a amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) y  $\text{H}^+$ , el primero, por ser permeable a la membrana del cardiomiocito ingresa y captura los  $\text{H}^+$  intracelulares produciendo alcalinización (1). El lavado del amonio (2) produce acidificación intracelular ya que el  $\text{NH}_3$  sale, y los  $\text{H}^+$  quedan retenidos en la célula conduciendo a la activación del NHE-1 (3).

La velocidad de recuperación del  $\text{pH}_i$  ( $\text{dpH}_i / \text{dt}$ ) a cualquier  $\text{pH}_i$  seleccionado, se calculó como la derivada del ajuste exponencial del registro  $\text{pH}_i$  vs. Tiempo. (**Figura 16**).

El eflujo neto de  $\text{H}^+$  ( $J_{\text{H}^+}$ , en  $\text{mmol/L/min}$ ) durante la recuperación del  $\text{pH}_i$  se calculó como:

$$J_{\text{H}^+} = \text{dpH}_i / \text{dt} \times \beta_i$$

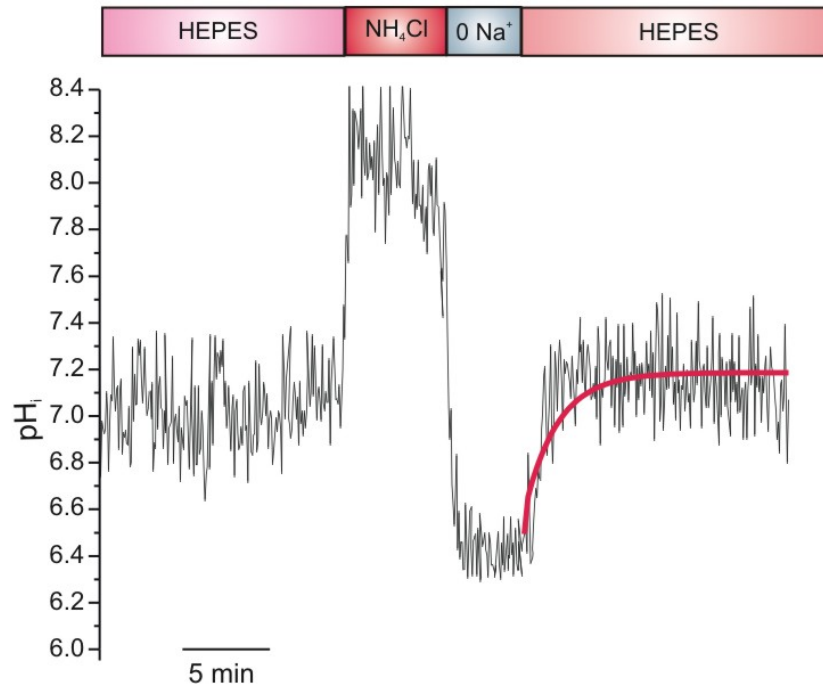
Las diferentes intervenciones farmacológicas se compararon a  $\text{pH}_i$  6.8, dado que el  $\text{pH}_i$  de acidificación máxima, varió con cada intervención farmacológica.

### 3.10. Protocolo experimental

La actividad del NHE-1 se determinó en un modelo de **Acidosis sostenida** en el cual, el amonio se lava con un buffer HEPES libre de  $\text{Na}^+$  que inhibe al NHE-1 y luego al restablecer este ión se activa el intercambiador (**Figura 16**).

Los registros de  $\text{pH}_i$  vs Tiempo se realizaron de acuerdo al siguiente protocolo experimental:

- 1) *Estabilización* de la señal fluorescente (~3 min).
- 2) *Incubación* con la droga a ensayar durante 10 min, (que se mantuvo durante el resto del experimento, excepto en el control).
- 3) *Pulso de amonio* con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20  $\text{mmol/L}$ ) durante 3 min
- 4) Acidosis sostenida con 0  $\text{Na}^+$  (5 min).
- 5) *Recuperación del  $\text{pH}_i$*  por activación del NHE-1 a través de la restitución del  $\text{Na}^+$  (**Figura 16**).



**Figura 16.** Registro representativo control de pH<sub>i</sub> vs tiempo en miocitos cardíacos de gato. En rojo se muestra el mejor ajuste exponencial, a partir del cual se calculó la derivada (dpH<sub>i</sub>/dt). El lavado del NH<sub>4</sub>Cl con buffer HEPES 0 Na<sup>+</sup> durante 5 min produce la acidosis intracelular sostenida. La recuperación del pH<sub>i</sub> por activación del NHE-1 se produjo por la restitución del Na<sup>+</sup>.

### 3.11. Capacidad intrínseca buffer

La capacidad intrínseca buffer ( $\beta_i$ ) se define como la cantidad de ácido o base que se debe adicionar al citosol para cambiar el pH<sub>i</sub> en 1 unidad. Para determinarla se utiliza la siguiente ecuación:

$$\beta_i = \Delta[\text{NH}_4^+]_i / \Delta\text{pH}_i$$

La concentración de amonio intracelular  $[\text{NH}_4^+]_i$  se calcula a partir de la exposición de los cardiomiocitos de gato a distintas concentraciones de NH<sub>4</sub>Cl extracelular (20, 15, 12, 9, 5 y 3 mmol/L,  $[\text{NH}_4^+]_o$ ) en buffer HEPES libre de Na<sup>+</sup>, según la siguiente ecuación:

$$\text{NH}_4^+{}_i = [\text{NH}_4^+]_o \times 10^{(\text{pH}_o - \text{pH}_i)} / 1 + 10^{(\text{pH}_o - \text{pK})}$$

siendo el pK del  $\text{NH}_4^+$  = 9.21 y  $\text{pH}_o$  el pH extracelular [151].

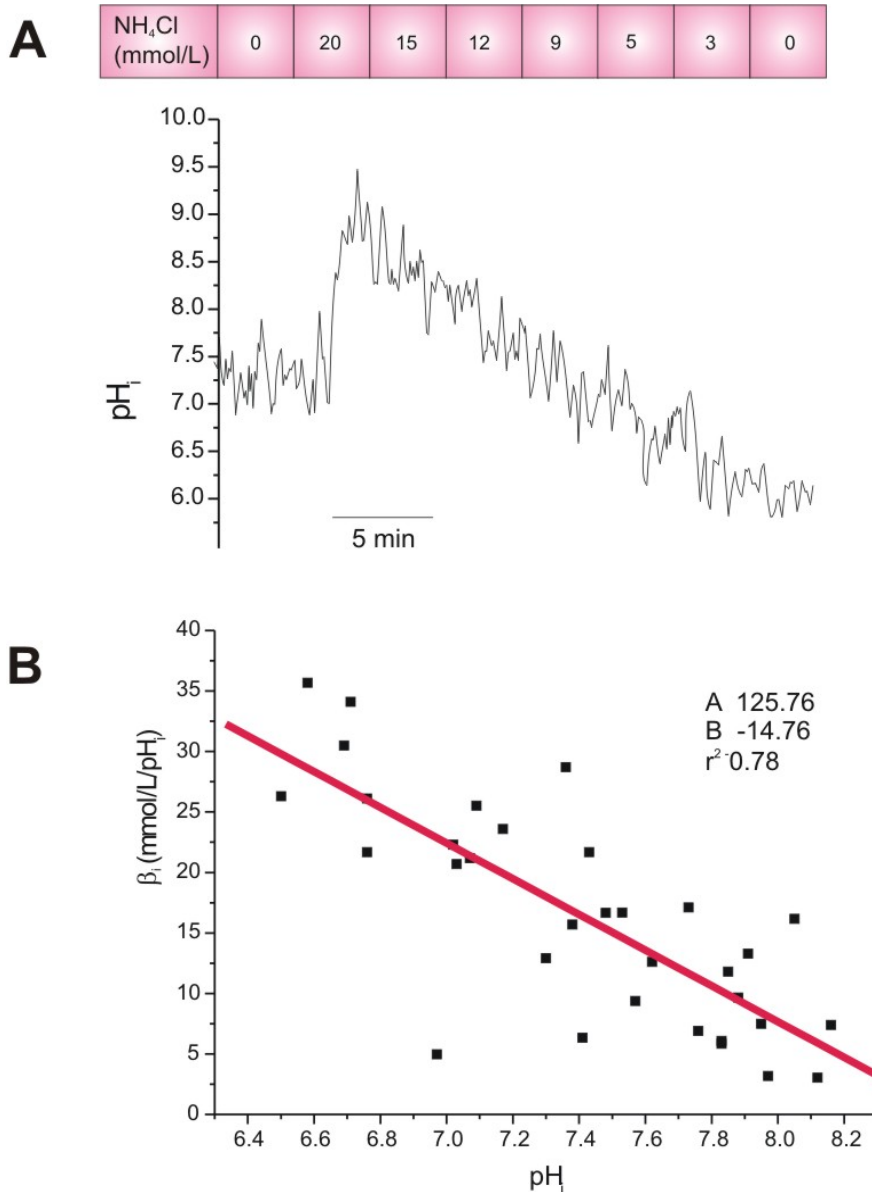
El buffer HEPES libre de  $\text{Na}^+$  se preparó reemplazando el NaCl por *N*-metil-D-glucamina, cuya composición en mmol/L es: HEPES 25, KCl 4.66,  $\text{MgSO}_4$  1.05,  $\text{CaCl}_2$  1.35, *N*-metil-D-glucamina 148, glucosa 11 ajustado a pH 7.4 con HCl 1N.

En la **Figura 17** se observa la capacidad intrínseca buffer que se obtuvo para cardiomiocitos de gato a partir del ajuste lineal de la capacidad intrínseca buffer en respuesta a los diferentes  $\text{pH}_i$ ,:  $\beta_i = 125.76 - 14.76 \times \text{pH}_i$ . La relación inversa entre la capacidad buffer y el  $\text{pH}_i$  coincide con resultados previos, en los cuales  $\beta_i$  es máxima a pH ácidos cercanos a los valores de pK de las proteínas y aminoácidos intracelulares que amortiguan los cambios de  $\text{pH}_i$  [151, 152].

### 3.12. Determinación de la fosforilación de ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup>

Los miocitos ventriculares de gato se incubaron en placas de cultivo de 35 mm ( $5 \times 10^5$  células por placa). El efecto de sildenafil se estudió en las células de acuerdo al protocolo usado en los pulsos de amonio. También se determinó la fosforilación de las quinasas siguiendo un protocolo de incubación farmacológica similar al empleado en la medición de ERO, por lo cual los cardiomiocitos se preincubaron 15 min en presencia de los inhibidores losartán, apocinina, MPG, 5H-D y glibenclamida, y luego 30 min con Ang II (1 nmol/L).

Al finalizar la preincubación, los miocitos se lavaron con buffer PBS y se homogeneizaron en buffer de lisis de la siguiente composición en mmol/L: Tris-HCl 50, EGTA 5, EDTA 2, NFA 100,  $\text{NaVO}_4$  1, Tritón X-100 0.05% a pH 7.5. Luego de una centrifugación a  $14,000 \times g$  durante 60 min a 4 °C, se determinó la concentración de proteínas mediante el ensayo de Bradford. Las muestras se desnaturalizaron, se sometieron a PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Después de bloquear las membranas con leche en polvo descremada se



**Figura 17.** Relación entre la capacidad intrínseca buffer ( $\beta_i$ ) y  $pH_i$  en cardiomiocitos aislados de gato.

**A.** La capacidad buffer intrínseca se determinó mediante los cambios de  $pH_i$  registrados a distintas concentraciones de  $NH_4Cl$  en presencia de un buffer HEPES libre de  $Na^+$  (ver fórmulas en el texto). La  $\beta_i$  permitió expresar la actividad del NHE-1 como eflujo de  $H^+$  ( $J_{H^+} = dpH_i / dt \times \beta_i$ ).

**B.** Los parámetros del ajuste lineal son la ordenada al origen y la pendiente: A= 125.76 y B= -14.76, respectivamente (n=32 mediciones de 8 miocitos).

incubaron toda la noche con anticuerpos policlonales anti P-p90<sup>RSK</sup> y P-ERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology). Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a peroxidada anti Rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas se visualizaron usando el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL-Plus (Amersham). Las formas fosforiladas de p90<sup>RSK</sup> y ERK1/2 se normalizaron por las formas no fosforiladas.

### 3.13. Determinación de la fosforilación del NHE-1.

Los miocitos ventriculares aislados de gato se incubaron en discos de cultivo de 35 mm y se sometieron a una carga ácida como se describió anteriormente. Al finalizar el protocolo los miocitos se homogeneizaron en buffer de lisis.

Las muestras proteicas se inmunoprecipitaron con un anticuerpo policlonal anti NHE-1 (Amersham Biosciences) que reconoce el sitio de unión de la proteína 14-3-3 cuando está fosforilado en la Ser 703. Previos reportes demostraron que la Ser 703, ubicada en una secuencia de aminoácidos específica (Arg-Ile-Gly-Ser-Asp-Pro) en el NHE-1 cuando está fosforilada, crea una secuencia consenso a la cual se une la proteína 14-3-3, de modo que el uso de un anticuerpo anti el sitio de unión a fosfo Ser 703, representa una herramienta útil para la estimación de la fosforilación del NHE-1 [115, 153, 154].

Los miocitos se lavaron con buffer PBS frío y se lisaron con buffer de lisis a pH 7.5 que contenía en mmol/L: Tris-HCl 50, EGTA 5, EDTA 2, NaF 100, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1, digitonina 0.05% y cocktail inhibidor de proteasa (Complete Mini, Roche). Luego el lisado de células se centrifugó a 14000 × g durante 30 min a 4 °C y el sobrenadante se descartó. El precipitado se solubilizó en buffer de lisis a pH 7.5 que contenía en mmol/L: Tris-HCl 20, NaCl 150, EDTA 1, EGTA 1, pirofosfato de sodio 2.5, β-glicerofosfato 1, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 y NaF 100, así como también 1% Triton X-100 y coctel inhibidor de proteasa (Roche). Las muestras se centrifugaron a 14,000 × g durante 60 min a 4 °C, luego el sobrenadante que contenía las membranas celulares solubilizadas se removió y se determinó la concentración de proteínas mediante el ensayo de Bradford. Se incubaron cantidades fijas de proteínas (400 ug) con un anticuerpo policlonal de conejo contra el NHE-1 (4 μL; Millipore) durante 3 hs. a 4 °C. Entonces, los complejos inmunes se mezclaron con proteína A/G Plus-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) durante 3 h a 4 °C y se lavaron 3 veces con buffer de inmunoprecipitación. Los complejos inmunes se disociaron por la adición de buffer de muestra Laemmli y se calentaron durante 3 minutos a 60 °C. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE 7 % y se analizaron por Western blot usando un anticuerpo policlonal de ratón que reconoce el sitio fosfo-Ser de unión de la proteína 14-3-3. Se utilizó

como anticuerpo secundario el de conejo conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) y las bandas se visualizaron usando el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL-Plus (Amersham). Después del stripping, la misma membrana se incubó con el anticuerpo anti NHE y los resultados se mostraron como el cociente entre la proteína fosforilada y la proteína total. Los autoradiogramas se analizaron por análisis densitométrico (Scion Image).

#### 3.14. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  error estándar (ES).y se analizaron por test de t de Student para muestras apareadas, o no apareadas, o por ANOVA de una vía seguido del test de Student-Newman Keuls según corresponda. Se consideró significativo  $P < 0.05$ .



## ***RESULTADOS***

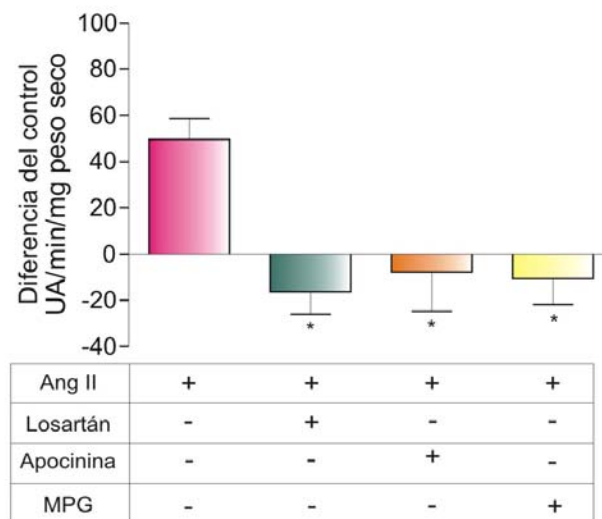
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Producción de $O_2^{\cdot-}$ por acción de la Ang II en tejido cardíaco

En la **Figura 18** se muestran los resultados obtenidos sobre la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en cortes de tejido de ventrículo izquierdo luego de 30 min de incubación en presencia de las distintas intervenciones farmacológicas a las cuales se les sustrajo la producción basal.

La Ang II (1 nmol/L) produjo un aumento de  $49.6 \pm 8.9$ ,  $n=34$  UA/min/mg peso seco. Dicho efecto se suprimió con losartán (Los 1  $\mu$ mol/L) bloqueante del receptor tipo I de Ang II (AT-1), (Los,  $-16.3 \pm 9.78$ ,  $n=8$ ), inhibiendo a la NAD(P)H oxidasa (Nox) con apocinina 0.3 mmol/L ( $-7.73 \pm 17.03$ ,  $n=7$ ) y con el “scavenger” Mercapto-Propionil-Glicina (MPG 1 mmol/L,  $-10.7 \pm 11.1$ ,  $n=5$ ) (**Figura 18**).

Los distintos inhibidores no afectaron la producción basal (Los,  $4.71 \pm 2.84$ ,  $n=7$ ; Apo  $0.67 \pm 7.14$ ,  $n=8$ , MPG,  $-10.7 \pm 1.1$ ,  $n=5$ ) (ver Figura 1A suplementaria).



**Figura 18.** Producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) por Ang II en tejido cardíaco. La Ang II (1 nmol/L) produjo un aumento de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  que se previno con el bloqueante del receptor de Ang II tipo I (AT-1): losartán (1  $\mu$ mol/L), con el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, apocinina (0.3 mmol/L), y por el “scavenger” de ERO, MPG (1 mmol/L). \* indica  $P < 0.01$  vs Ang II.



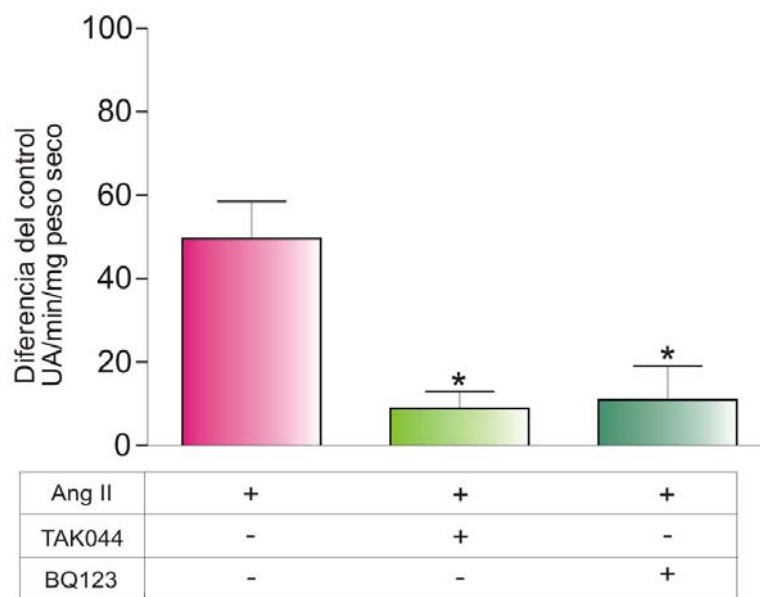
**Los resultados obtenidos en cortes de tejido cardíaco ventricular muestran que el aumento de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  inducida por Ang II es a través del receptor AT1, proviene de la actividad de la Nox y se elimina con el “scavenger” MPG.**

#### 4.2. Producción de $O_2^{\cdot-}$ por Ang II en tejido cardíaco: rol autócrino de ET-1

Como ya se mencionó, muchos de los efectos de la Ang II son atribuidos a la formación/ liberación de ET-1, la cual mediante una acción autócrina/parácrina produce su efecto [155-157]. Al respecto, nuestro laboratorio demostró que el efecto inotrópico positivo inducido por Ang II 1 nmol/L, concentración que está dentro del rango fisiológico detectado en el intersticio [18], es mediado completamente por la liberación de ET-1 endógena y que dicho efecto sobre la contractilidad de miocitos cardiacos está mediado por las ERO [44].

La **Figura 19** muestra los resultados obtenidos en cortes de tejido ventricular. La producción de  $O_2^{\cdot-}$  inducida por Ang II se suprime con el inhibidor no específico (TAK044, 5  $\mu$ mol/L,  $8.88 \pm 4.08$ , n=7) y específico del receptor ET<sub>A</sub> (BQ123, 10  $\mu$ mol/L,  $10.93 \pm 8.15$ , n= 8).

La producción basal no se afectó con TAK044 ( $8.9 \pm 4$ , n=7) y BQ123 ( $10.9 \pm 8.2$ , n=8) (Figura 1 suplementaria).



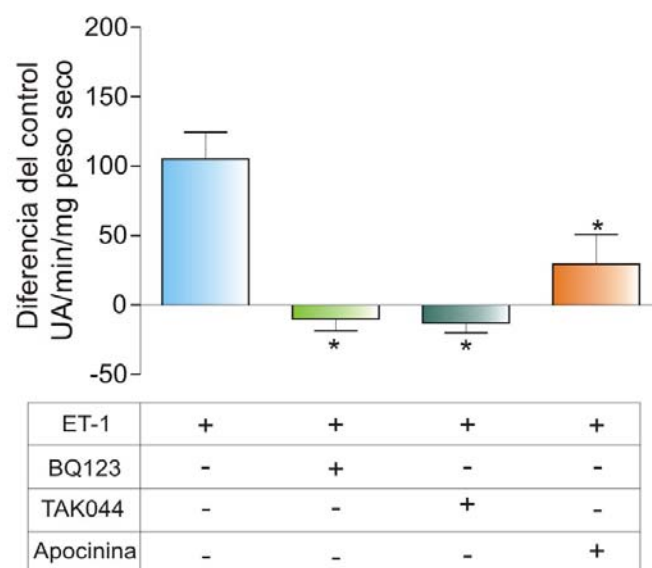
**Figura 19.** Producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en tejido cardíaco por Ang II: acción autócrina de ET-1. El aumento de la producción de superóxido por Ang II (1 nmol/L) se previno con el bloqueo de receptores de ET-1: selectivo con BQ123 (bloqueante de  $ET_A$ ) y no selectivo con TAK044 (bloqueante de  $ET_A$  y  $ET_B$ ). \* indica  $P < 0.01$  vs Ang II.

**Los resultados obtenidos en cortes de tejido cardíaco, muestran que la producción de  $O_2^{\cdot-}$  por Ang II (1 nmol/L) se produce por la liberación de ET-1 endógena y a través de los receptores  $ET_A$ .**

#### 4.3. Producción de $O_2^{\cdot-}$ por ET-1 en tejido cardíaco

Bajo las mismas condiciones experimentales que con Ang II, se examinó el efecto de la ET-1, un agonista que, al igual que Ang II, actúa a través de su receptor acoplado a proteína Gq y también se ha demostrado que activa a la Nox [158]

En presencia de ET-1 se observó un aumento de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  ( $105.2 \pm 19.3$ ,  $n=11$ ) que se suprimió con el bloqueo inespecífico (TAK044 5  $\mu\text{mol/L}$ ,  $-12.9 \pm 7.18$ ,  $n=6$ ) y específico de receptores  $ET_A$  (BQ123 10  $\mu\text{mol/L}$ ,  $-10.2 \pm 8.49$ ,  $n=6$ ) y con el inhibidor de la Nox (Apocinina, 0.3 mmol/L,  $29.5 \pm 21.2$ ,  $n=4$ ) (Figura 20).



**Figura 20.** Producción de anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) en tejido cardíaco por ET-1. El aumento de la producción de superóxido por ET-1 (5 nmol/L), se previno con el bloqueo selectivo de receptores de ET-1 con BQ123 (sólo bloquea  $ET_A$ , 10  $\mu$ mol/L) y no selectivo con TAK044 (bloquea a  $ET_A$  y  $ET_B$ , 5  $\mu$ mol/L) y con el inhibidor de la Nox, apocinina (0.3 mmol/L). \* indica  $P < 0.01$  vs ET-1.

**Estos resultados confirman que la producción de  $O_2^{\bullet-}$  inducida por Ang II, está mediada por la liberación de ET-1 endógena, la cual a través de la estimulación de los receptores  $ET_A$ , estimula a la Nox, siendo ésta enzima la única fuente productora de  $O_2^{\bullet-}$  en nuestro modelo experimental, ya que apocinina abolió completamente el aumento inducido por Ang II y ET-1 en tejido cardíaco.**

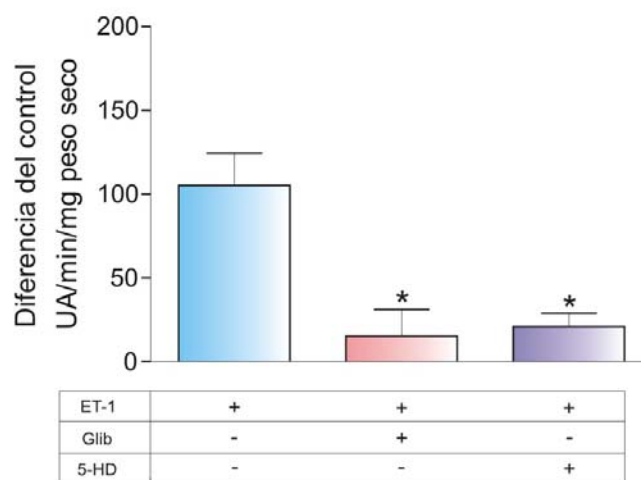
#### 4.4. Participación de la mitocondria en la producción de $O_2^{\bullet-}$ inducida por ET-

##### 1

Para determinar si la producción de  $O_2^{\bullet-}$  por activación de la Nox induce la producción de  $O_2^{\bullet-}$  desde la mitocondria por el mecanismo denominado “*liberación de ERO inducida por ERO*”, se estudió el efecto de la inhibición de la apertura de

los canales de  $K^+$  mitocondriales dependientes de ATP (mito $K_{ATP}$ ) sobre la producción de  $O_2^{\cdot-}$  inducida por ET-1.

En la **Figura 21** se muestra que el bloqueo inespecífico con glibenclamida (Glib, 50  $\mu\text{mol/L}$ ) y específico con el ácido 5- hidroxidecanoico (5-HD, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) de los mito $K_{ATP}$  inhibe el aumento de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  inducida por ET-1 en tejido cardiaco (Glib  $15.3 \pm 15.9$ ,  $n=6$  y 5-HD  $20.9 \pm 7.9$ ,  $n=5$ ,  $P<0.05$  vs ET-1).



**Figura 21.** Producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en tejido cardiaco por ET-1: mecanismo de “liberación de ERO inducido por ERO”. El aumento de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  inducido por ET-1 (5  $\text{nmol/L}$ ), se previno con el bloqueo selectivo con 5-HD (100  $\mu\text{mol/L}$ ) y no selectivo con glibenclamida (Glib, 50  $\mu\text{mol/L}$ ) de los canales mito  $K_{ATP}$ . \* indica  $P<0.05$  vs ET-1.

**Los resultados muestran que la producción de  $O_2^{\cdot-}$  inducida por Ang II/ ET-1 es de origen mitocondrial y dependiente de la Nox.**

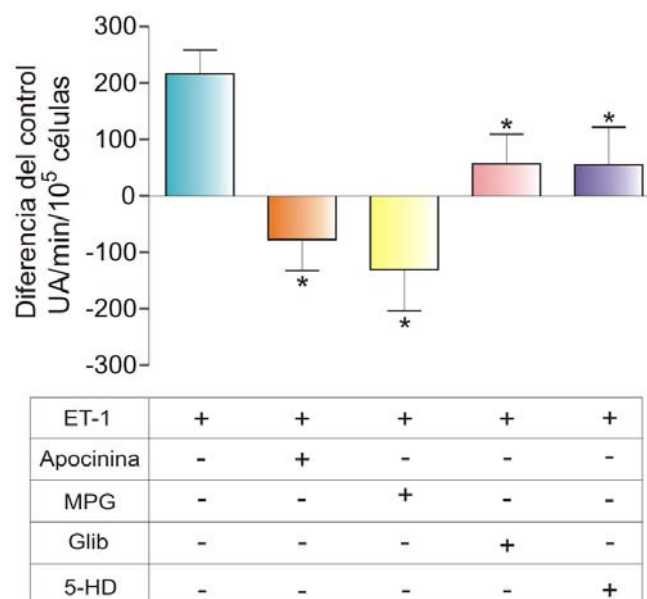
#### 4.5. Producción de $O_2^{\cdot-}$ por ET-1 en miocitos cardiacos

Los resultados obtenidos en preparaciones cardiacas multicelulares (cortes de tejido) se confirmaron en cardiomiocitos aislados de gato, para descartar la respuesta de otros tipos celulares del miocardio como células endoteliales, células musculares lisas vasculares y fibroblastos.

En la **Figura 22** se muestra que ET-1 0.4  $\text{nmol/L}$  aumentó la producción de  $O_2^{\cdot-}$  ( $216 \pm 42$ ,  $n=12$  UA/min/ $10^5$  células). Dicho aumento se anuló por inhibición de la Nox con apocinina (0.3  $\text{mmol/L}$ ,  $-77 \pm 55$ ,  $n=13$ ), por el “scavenger” de ERO,

MPG (2 mmol/L,  $-130 \pm 74$ ,  $n=12$ ) y por el bloqueo de los mitoK<sub>ATP</sub> (Glib 50  $\mu$ mol/L  $57 \pm 52$   $n=20$  y 5-HD 100  $\mu$ mol/L,  $55 \pm 67$ ,  $n=15$ ).

La producción basal no se afectó con las drogas usadas (apocinina  $54 \pm 39$ ,  $n=18$ ; MPG  $-137 \pm 80$ ,  $n=10$ ; Glib,  $21 \pm 55$ ,  $n=6$  y 5-HD,  $6 \pm 45$ ,  $n=8$ ) (Figura 1 Suplementaria).

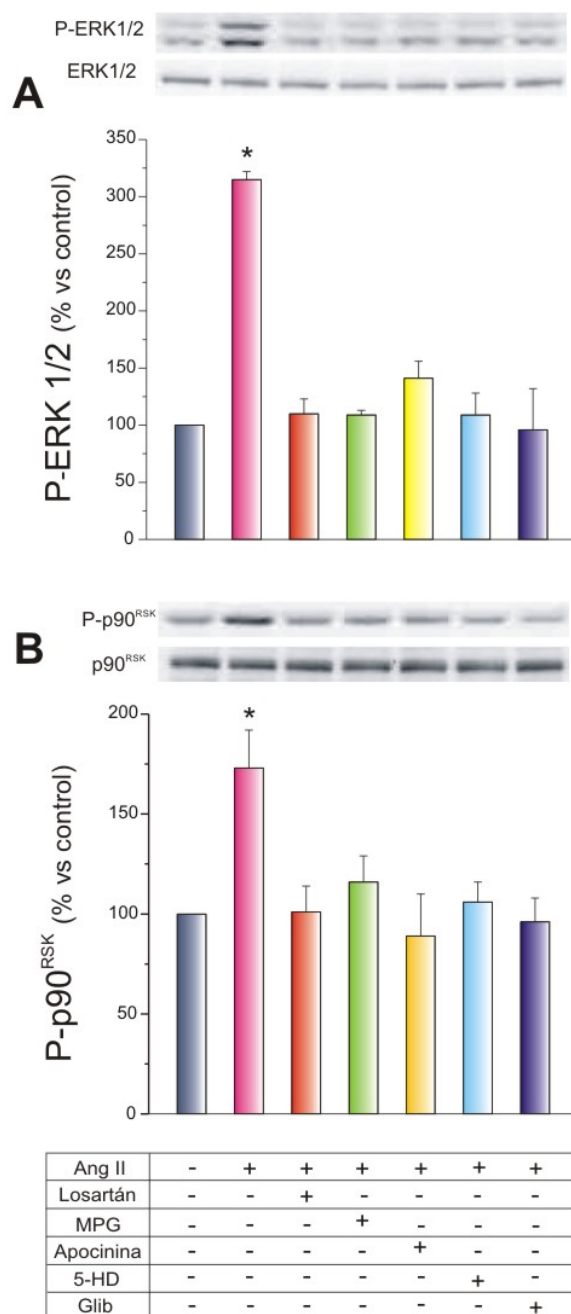


**Figura 22.** Producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) por ET-1 en cardiomiocitos aislados. El aumento de la producción de  $O_2^{\cdot -}$  por ET-1 (0.4 nmol/L), se previno con el bloqueo de la Nox con apocinina (0.3 mmol/L), con el "scavenger" de ERO, MPG (2 mmol/L) y con el bloqueo selectivo con 5-HD (100  $\mu$ mol/L) y no selectivo con glibenclamida (Glib, 50  $\mu$ mol/L) de los canales mitoK<sub>ATP</sub>. \* indica  $P < 0.05$  vs ET-1.

#### 4.6. Fosforilación de ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> inducida por Ang II

Existen evidencias de que las ERO pueden actuar como segundos mensajeros activando vías de señales intracelulares mediadas por proteínas quinasas entre las que se encuentra la familia de las MAPKs [55, 56, 159]. Por lo tanto, se estudió el efecto de la Ang II sobre la fosforilación de ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup>. Los resultados muestran que la Ang II 1 nmol/L, produjo un aumento significativo de la fosforilación de dichas quinasas, que se canceló inhibiendo los receptores AT1 con losartán (1  $\mu$ mol/L), la Nox con apocinina (300  $\mu$ mol/L), las ERO con

MPG (2 mmol/L), y los mitoK<sub>ATP</sub> con 5-HD (100 μmol/L), y glibenclamida (Glib 50 μmol/L) (**Figura 23**).



**Figura 23.** Fosforilación de ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> inducida por Ang II. La Ang II (1 nmol/L) produjo un aumento de la fosforilación de ERK1/2 (**A**) y p90<sup>RSK</sup> (**B**) en miocitos ventriculares aislados, que se previno con losartán (1 μmol/L), MPG (2 mmol/L), apocinina (300 μmol/L), 5-HD (100 μmol/L) y glibenclamida (Glib, 50 μmol/L). No se observaron cambios en ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> total. \* indica  $P < 0.05$  vs todos los grupos.

Estas evidencias demuestran que el aumento de  $O_2^{\cdot-}$  producido en respuesta a la acción de Ang II a la dosis usada en nuestros experimentos es a través de los receptores AT1 y conduce a la activación de las quinasas ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup>.

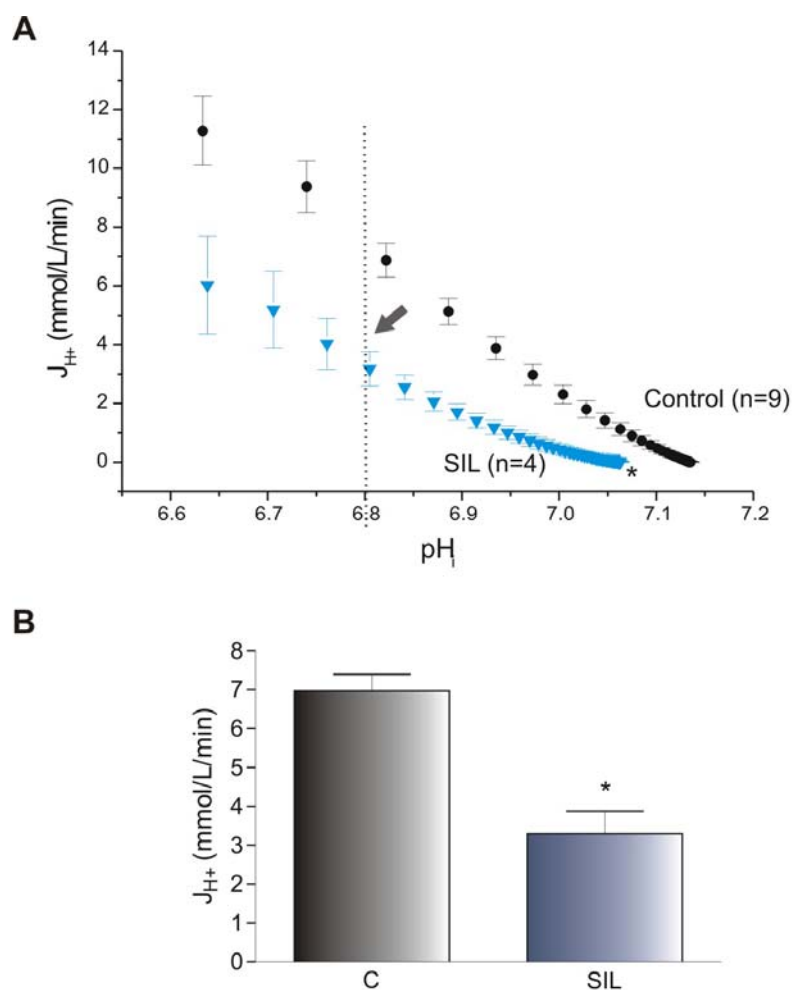
***La activación de estas quinasas requiere de la liberación/ producción de  $O_2^{\cdot-}$  mitocondrial dependiente de la actividad de la Nox.***

#### 4.7. Actividad del NHE-1 cuando se inhibe la PDE5A

##### 4.7.1. Efecto de SIL sobre la actividad del NHE-1 inducida por acidosis sostenida

Como se señaló en la introducción, entre los mecanismos que activan al NHE-1, se encuentran la acidosis intracelular, a través de la interacción de los  $H^+$  con el sitio alostérico. En presencia de una acidosis sostenida se activa un mecanismo adicional, por el cual la fosforilación del extremo citoplasmático regula el sitio alostérico. Al respecto, se demostró previamente que la acidosis sostenida (de 3 a 6 min) aumenta la actividad del NHE-1 a través de su fosforilación mediada por ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> [110].

A continuación se describe el efecto de inhibir la PDE5A con sildenafil en un modelo de acidosis sostenida. La **Figura 24** muestra que el sildenafil disminuyó significativamente el aumento de actividad del NHE-1 inducida por la acidosis sostenida durante 5 min (SIL  $3.3 \pm 0.58$ , n=4 vs control  $6.97 \pm 0.43$ , n=9,  $P < 0.01$  vs control).

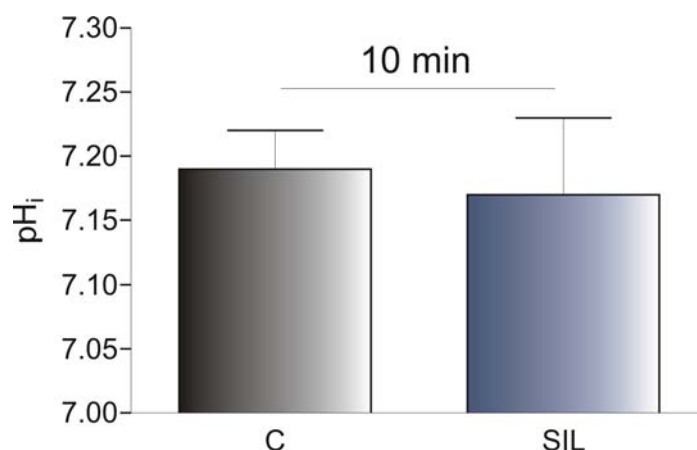


**Figura 24.** Actividad del NHE-1 inducida por acidosis sostenida con inhibición de la PDE5A. **A.** Representación esquemática de la actividad del NHE-1 como eflujo de H<sup>+</sup> (J<sub>H+</sub>) en un medio sin bicarbonato a diferentes valores de pH<sub>i</sub>. Se observó una disminución de la actividad del NHE-1, inducida por acidosis sostenida durante 5 min con HEPES libre de Na<sup>+</sup>, por inhibición de la PDE5A con sildenafil (SIL 1 μmol/L). **B.** A pH<sub>i</sub> 6.8, la actividad del NHE-1 disminuyó significativamente cuando se inhibió la PDE5A con SIL (1 μmol/L). \* indica  $P < 0.01$  vs control.

#### 4.7.2. Efecto de sildenafil sobre el pH<sub>i</sub> basal

En la **Figura 25** se muestra que el sildenafil perfundido 10 min antes del pulso de NH<sub>4</sub>Cl (en ausencia de acidosis intracelular) no afectó el pH<sub>i</sub> basal (SIL pH<sub>i</sub> 7.17 ± 0.06, n=10 vs control 7.19 ± 0.03, n=10). Este resultado se confirmó empleando otro inhibidor de la PDE5A, el EMD360527/5 0.1 μmol/L (pH<sub>i</sub> 7.20 ± 0.03, n=5 vs control 7.22 ± 0.03, n=5).





**Figura 25.** Efecto de la inhibición de la PDE5A sobre la actividad basal del NHE-1. El pH<sub>i</sub> basal no se modificó por la inhibición de PDE5A con sildenafil (SIL).

***Los resultados demuestran que sildenafil inhibe la actividad del NHE-1 en presencia de acidosis intracelular sin afectar su actividad en condiciones basales.***

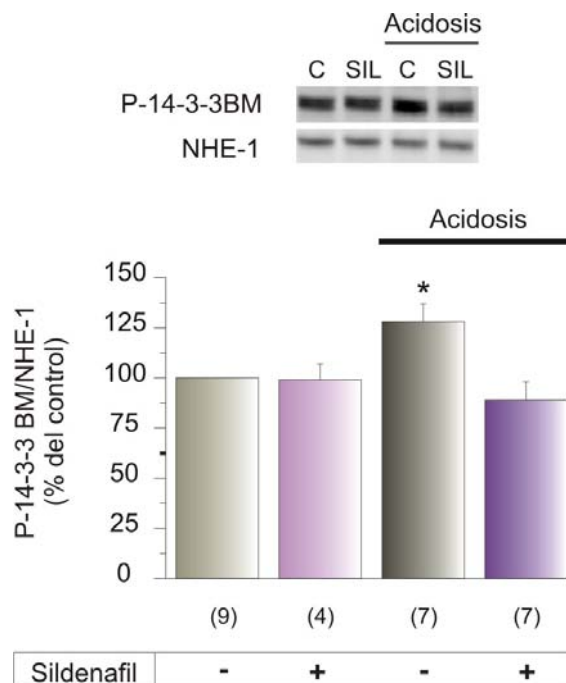
#### 4.8. Fosforilación del NHE-1: acción de sildenafil

Para determinar si la disminución de la actividad del NHE-1 inducida por sildenafil, se correlaciona con una disminución de su nivel de fosforilación, se estimó la fosforilación del intercambiador, en las mismas condiciones en las que se midió su actividad, mediante el uso de un anticuerpo fosfoespecífico que reconoce la Ser 703 fosforilada del extremo citosólico del NHE-1, en el sitio de unión de la proteína chaperona 14-3-3.

En condiciones basales, o sea en ausencia de acidosis intracelular, la fosforilación del NHE-1 con sildenafil no fue significativamente diferente al control (**Figura 26**). Sin embargo, el sildenafil disminuyó significativamente (~36 %) el aumento de la fosforilación del NHE-1 en acidosis intracelular (Control  $128 \pm 9.5$ ,  $n=7$  vs sildenafil  $82 \pm 11.7$ ,  $n=7$ ).

***Los resultados muestran que la disminución de la actividad del NHE-1 inducida por la inhibición de la PDE5A con sildenafil se correlacionó con***

**una disminución de su fosforilación en condiciones de acidosis intracelular sostenida.**

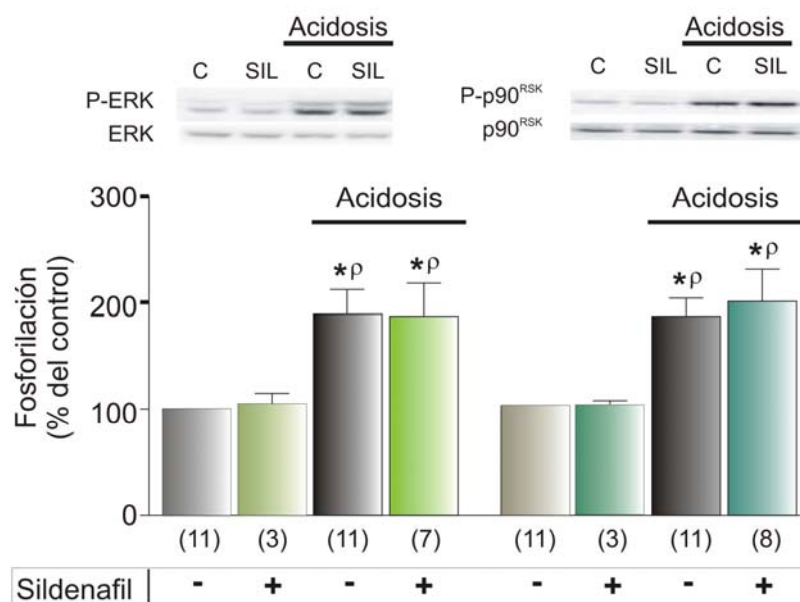


**Figura 26.** Fosforilación del NHE-1 inducida por acidosis sostenida: efecto de la inhibición de la PDE5A. La fosforilación del NHE-1 se estimó usando un anticuerpo contra el sitio fosforilado (Ser 703) al cual se une la proteína chaperona 14-3-3. La acidosis intracelular sostenida durante 5 min con  $0 \text{ Na}^+$  se acompañó de un aumento de la fosforilación del NHE-1 en la Ser 703. Este efecto se previno por la inhibición de la PDE5A con SIL ( $1 \mu\text{mol/L}$ ). \* indica  $P < 0.05$  vs todos los grupos.

#### 4.9. Fosforilación de las quinasas ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> cuando se inhibe a la PDE5A

Para estudiar si la disminución de la fosforilación del NHE-1 por sildenafil se debe al efecto sobre ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> se estudió el efecto de sildenafil sobre la fosforilación de estas quinasas.

En la **Figura 27** se muestra que la acidosis intracelular sostenida produjo un aumento de los niveles de fosforilación de las quinasas ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> ( $189 \pm 23$ ,  $n=11$  y  $187 \pm 17$ ,  $n=11$ , respectivamente). El sildenafil no tuvo efecto sobre la fosforilación de ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> en ausencia y presencia de acidosis sostenida (en acidosis ERK1/2  $187 \pm 31$ ,  $n=7$  y p90<sup>RSK</sup>  $201 \pm 30$ ,  $n=8$ ).



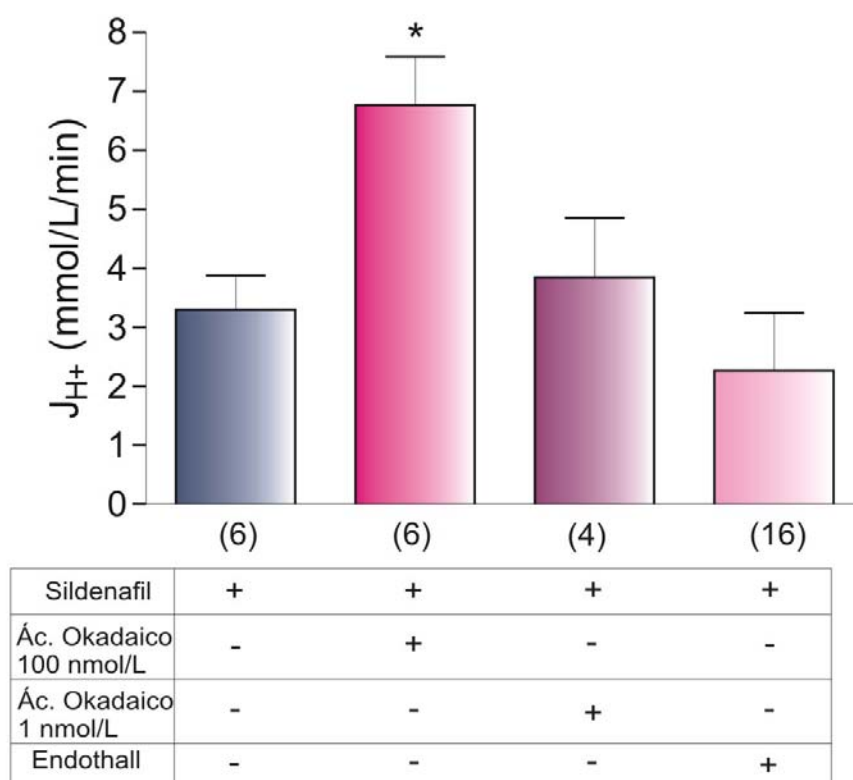
**Figura 27.** Fosforilación de ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> inducida por acidosis intracelular: efecto de inhibición de PDE5A. Los cardiomiocitos se sometieron a acidosis sostenida con buffer HEPES libre de Na<sup>+</sup> durante 5 min en presencia/ ausencia de sildenafil (1 μmol/L). La activación de estas quinasas se determinó por inmunoblot con anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas. El aumento de la fosforilación de las quinasas inducido por la acidosis no se previno con SIL. \* indica  $P < 0.05$  vs todos los grupos.

***La inhibición de la PDE5A con sildenafil produce una disminución de la fosforilación del NHE-1 por un mecanismo que no involucra una disminución de la fosforilación de las quinasas ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup>.***

#### 4.10. Inhibición de fosfatasa sobre la actividad del NHE-1 cuando se inhibe a la PDE5A

Para determinar si las proteínas fosfatasa 1 y 2 (PP1 y PP2A) median el efecto de sildenafil, se investigó el efecto de inhibición de estas enzimas sobre la actividad del NHE-1 inducida por acidosis sostenida. La dosis de ácido okadaico 100 nmol/L, que inhibe a PP1 y a PP2A, revirtió el efecto de sildenafil ( $6.77 \pm 0.82$ ,  $n=6$ ,  $P < 0.05$  vs SIL), mientras que el ácido okadaico a la dosis de 1 nmol/L, que inhibe sólo a PP2A, no bloqueó el efecto de sildenafil ( $3.86 \pm 1$ ,  $n=4$   $P < 0.05$

vs todos los grupos) (**Figura 28**). Las curvas de  $J_{H^+}$  vs  $pH_i$  en presencia de inhibición de las fosfatasa se muestra en la **Figura 2 suplementaria**. Endothall 100  $\mu\text{mol/L}$  (inhibidor específico de PP2A) no revirtió la acción de sildenafil sobre el NHE-1 ( $1.74 \pm 0.93$ ,  $n=16$ ,  $P<0.05$  vs todos los grupos) (**Figura 28**).

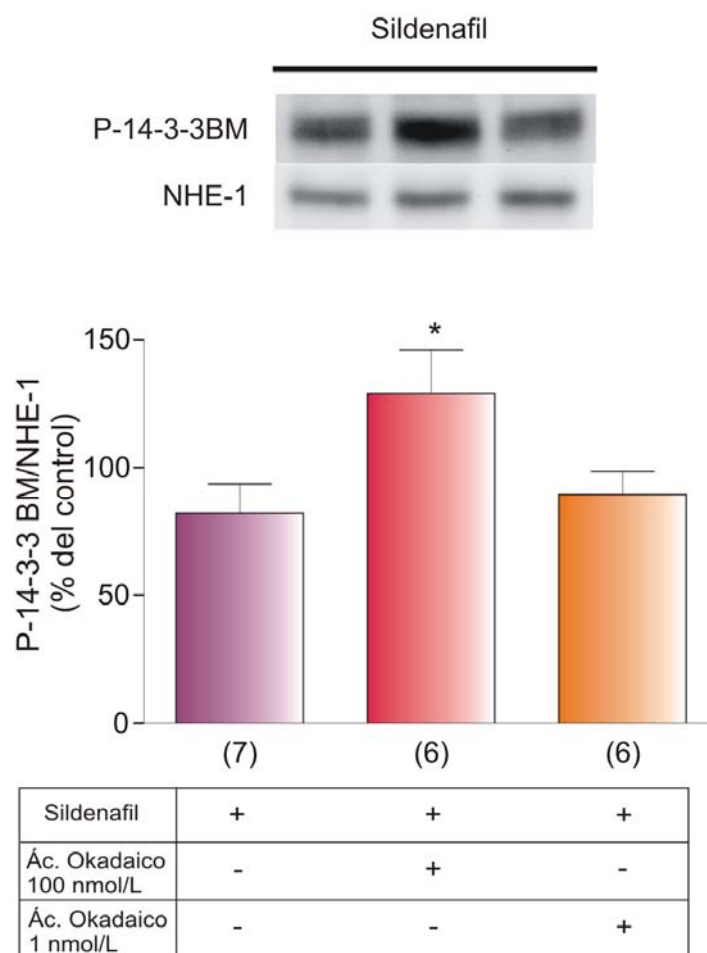


**Figura 28.** Efecto de sildenafil sobre la actividad del NHE-1 bajo inhibición de proteínas fosfatasa. El efecto inhibitorio de sildenafil sobre la actividad del NHE-1 se estudió durante la recuperación de una acidosis sostenida en presencia de un inhibidor de fosfatasa, el ácido okadaico. La actividad del NHE-1 aumentó significativamente cuando se inhibió a PP1 y PP2A con ácido okadaico 100 nmol/L. La inhibición selectiva de PP2A con ácido okadaico 1 nmol/L y específica con endothall 100  $\mu\text{mol/L}$  no previno el efecto de SIL sobre la actividad del NHE-1. \* indica  $P<0.01$  vs todos los grupos.

***La disminución de la actividad del NHE-1 inducida por inhibición de la PDE5A involucra la activación de la proteína fosfatasa PP1.***

#### 4.11. Inhibición de fosfatasa sobre la fosforilación del NHE-1 cuando se inhibe a la PDE5A

El efecto de inhibición de las fosfatasa PP1 y PP2A, sobre la acción de sildenafil, también se estudió sobre la fosforilación del NHE-1 (**Figura 29**). La disminución de la fosforilación del NHE-1, inducida por sildenafil, se previno por inhibición de las proteínas fosfatasa PP1 y PP2A con OKA 100 nmol/L, mientras que la inhibición de PP2A con OKA 1 nmol/L, no previno este efecto (OKA 100, nmol/L,  $129 \pm 17$ , n=6, OKA 1 nmol/L,  $89.6 \pm 9$ , n=6 vs SIL  $82 \pm 11.7$ , n=7,  $P < 0.05$  vs todos los grupos).



**Figura 29.** Fosforilación del NHE-1 bajo inhibición de proteínas fosfatasa. La inhibición de la PDE5A con sildenafil produjo una disminución de la fosforilación del NHE-1, estimada con un anticuerpo contra el sitio fosforilado (Ser 703) de unión de la proteína 14-3-3. Este efecto se previno con la inhibición de PP1 y PP2A con ácido okadaico 100 nmol/L. Sin embargo, cuando se

inhibió a PP2A con ácido okadaico 1 nmol/L, no se previno el efecto de sildenafil. \* $P < 0.05$  vs todos los grupos.

***La inhibición de la PDE5A con sildenafil, produce una disminución de la actividad del NHE-1 inducida por acidosis sostenida, debido a una desfosforilación mediada por la activación de la PP1.***

The page features a decorative design with a dark purple horizontal line at the top, a lighter purple horizontal line at the bottom, and a light purple L-shaped graphic on the right side. The text is centered between the top and bottom lines.

## ***CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN***

## 5. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

En la primera parte de este estudio se analizó el mecanismo por el cual la Ang II y la ET-1 aumentan la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en tejido cardiaco y en cardiomiocitos aislados.

Durante varios años se relacionaron a las ERO con sus efectos deletéreos, ya que a altas concentraciones producen daño por estrés oxidativo. Sin embargo, en numerosos trabajos se demostró que concentraciones de ERO subletales (0.05-0.07  $\mu\text{mol/L}$ ), pueden actuar como transductores de señales a través de la regulación de la actividad de proteínas quinasas que participan en la inducción de señales intracelulares [77, 160].

Como ya mencionamos en la introducción, en miocitos cardiacos se expresa principalmente la isoforma Nox2 de la NAD(P)H oxidasa. Recientemente Ago y colaboradores demostraron en mitocondria de cardiomiocitos de ratón la existencia de la Nox4, que se colocaliza con el complejo V de la CTE y sugieren que su actividad es constitutiva, ya que a diferencia de la Nox2 no requiere de los factores citosólicos p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, y Rac GTPasa para su activación [161]. Por lo tanto, se podría descartar la participación de la Nox4 en la producción de  $O_2^{\cdot-}$  presentada en nuestro modelo experimental, debido a que la apocinina inhibe a la Nox2 a través de la oxidación de los grupos SH de la subunidad p47<sup>phox</sup> [162]. Por otra parte, otros autores sugieren que concentraciones de apocinina mayores a las utilizadas en este estudio, podrían inhibir también a la Nox4 [163-165].

Las evidencias presentadas en este estudio demuestran que una concentración fisiológica de Ang II (1 nmol/L), que coincide con lo detectado en el espacio intersticial del corazón [18], aumenta la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en tejido cardiaco de gato. Dicho aumento es dependiente de la actividad de la Nox pues se suprime con apocinina (**Figura 18**). Además, la producción de  $O_2^{\cdot-}$  proviene de la formación/liberación de ET-1 pues se elimina completamente con el bloqueo de los receptores ET<sub>A</sub> de la ET-1 (**Figura 19**). Estos resultados obtenidos determinan que la producción de  $O_2^{\cdot-}$  inducida por la Ang II está de acuerdo con evidencias previas de estudios realizados en nuestro laboratorio donde se demostró que el



efecto inotrópico positivo de la Ang II en miocitos cardiacos aislados se produjo a través de la ET-1, lo cual lleva a la activación del NHE-1 promoviendo a su vez el aumento de calcio intracelular a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) trabajando en su modo reverso (NCX)<sub>rv</sub>. En el mismo trabajo se observó que en dicha serie de eventos participan las ERO y se demostró la presencia de pre-proET-1, ET-1 grande y ET-1 en miocitos cardiacos de gato [44].

Los resultados presentados en nuestro estudio demuestran además que la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por acción de Ang II y ET-1 en cortes de tejido cardiaco y por ET-1 en miocitos aislados se suprimió con el bloqueo de los mitoK<sub>ATP</sub> (**Figura 20 y 21**). Estos resultados muestran que la Ang II, actuando a través de la liberación de ET-1 endógena activa la Nox2 que, al producir cierta cantidad de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , induce la apertura de los mitoK<sub>ATP</sub> y, en consecuencia, promueve la generación de cantidades mayores de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por la mitocondria, mediante el mecanismo propuesto por otros autores de “*liberación de ERO inducida por ERO*” (**Figura 30**). Mas aun, también se demostró que la Ang II produce un aumento de la fosforilación de las quinasas ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup>, que se abolió inhibiendo a los receptores AT1, la Nox, los mitoK<sub>ATP</sub> y por el “scavenger” de las ERO (**Figura 23**). Esto sugiere que las ERO que provienen de la mitocondria inducidas por las ERO producidas por la Nox2 actúan como segundos mensajeros, ya que participan en la activación de las quinasas ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup>. Además, otros autores demostraron que otro integrante de las ERO, el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , activa a la ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> [54-56].

En las condiciones de nuestro estudio, no se observó la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  producto de la activación de la Nox2 cuando se bloqueó la apertura de los mitoK<sub>ATP</sub> con glibenclamida y 5-HD (o sea la mencionada producción de ERO mitocondriales). Esto podría explicarse por lo siguiente:

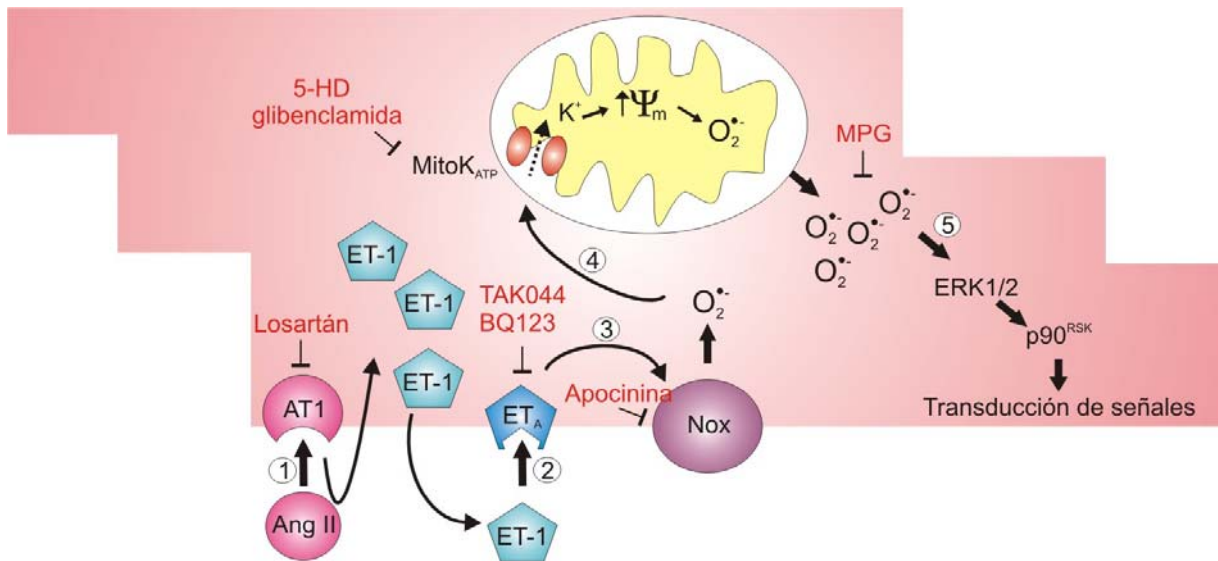
1) La producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por la Nox2 es muy rápida, y la señal quimioluminiscente registrada en este protocolo de estudio es luego de 30 min (en cortes de tejido) o 15 min (en miocitos aislados) de incubación en presencia de Ang II y/o ET-1.

2) La producción es muy pequeña, quedando por debajo del umbral de detección por el método utilizado para medir  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .

Al respecto, Griendling y colaboradores estudiaron la cinética de producción de  $O_2^{\cdot-}$  en respuesta a la Ang II en células musculares lisas vasculares. Ellos determinaron que la producción de  $O_2^{\cdot-}$  por Ang II es bifásica, ya que se produjo un aumento rápido a los 30 seg., que bajó al minuto, y luego aumento hasta alcanzar un máximo a los 30 min. Sin embargo, estos autores no implicaron a la mitocondria como fuente de ERO mas tardía [76].

3) Otra consideración puede ser que el  $O_2^{\cdot-}$  producido por la Nox sea dismutado inmediatamente a  $H_2O_2$  por la Cu-ZnSOD y esta especie no radical sería la responsable de la apertura de los mitoK<sub>ATP</sub> promoviendo la liberación de  $O_2^{\cdot-}$  detectado por la lucigenina.

Por otra parte, los estudios relacionados con el mecanismo por el cual el  $O_2^{\cdot-}$  sale de la mitocondria (ya que es impermeable a la membrana interna mitocondrial) sugieren que es a través del poro de transición mitocondrial (MPT) [85]. El MPT es un poro de gran conductancia que permite el pasaje no selectivo de solutos mayores a ~1500 Da. También se implicaron como vía de salida del  $O_2^{\cdot-}$  a los canales aniónicos de la membrana interna mitocondrial (IMAC) [82]. Al respecto, en estudios realizados en nuestro laboratorio se demostró que el aumento de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en respuesta a la Ang II se suprimió bloqueando el MPT con ciclosporina A [166] (**Figura 30**).



**Figura 30.** Mecanismo de señalización propuesto por el cual el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) actúa como transductor de la señal inducida por Ang II (1 nmol/L). La estimulación de los receptores AT1 por Ang II (1), produce la liberación de ET-1 endógena, la cual a través de la estimulación de receptores de ET<sub>A</sub> (2) produce la activación de la Nox (3). El  $O_2^{\bullet-}$  generado por esta enzima estimula la producción de  $O_2^{\bullet-}$  desde la mitocondria (4), a través de la apertura de los mitoK<sub>ATP</sub>, que activa a las quinasas ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> (5).

Como ya se mencionara, las ERO promueven señales intracelulares que activan al NHE-1 el cual a través del NCX<sub>rev</sub> puede inducir hipertrofia cardiaca. Al respecto, en la segunda parte de este estudio se analizó el mecanismo por el cual la inhibición de la PDE5A inhibe la actividad del NHE-1.

El NHE-1 es regulado primariamente por la concentración de H<sup>+</sup> intracelular. En condiciones fisiológicas a pH<sub>i</sub> ~7.2 tiene actividad muy baja, mientras que en acidosis intracelular su actividad aumenta por la interacción de los H<sup>+</sup> con el sitio alostérico del dominio transmembrana. Otro mecanismo de regulación de la actividad del NHE-1 se produce a través de modificaciones post-transduccionales como fosforilación e interacción con proteínas regulatorias del extremo citoplasmático, que alteran la interacción de los H<sup>+</sup> con el sitio alostérico bajo diferentes estímulos como el estiramiento del miocardio, estimulación con neurohormonas, las ERO, o por el aumento del tiempo de la acidosis intracelular [54, 55, 62, 109, 110].

Recientemente se ha propuesto que la inhibición de la enzima PDE5A con sildenafil tiene efecto beneficioso en la insuficiencia cardiaca [133, 138]. En los últimos años surgieron evidencias del efecto cardioprotector de esta droga contra el remodelamiento del miocardio después del infarto inducido por sobrecarga de presión, y contra el daño inducido por isquemia-reperfusión [117, 138, 140].

El presente estudio confirma las evidencias recientes de nuestro laboratorio que demostraron que el efecto cardioprotector de sildenafil está relacionado con la inhibición del NHE-1 [117].

Nuestros resultados mostraron que:

1) la inhibición de la PDE5A con sildenafil regula negativamente la actividad del NHE-1 luego de una carga ácida sostenida por 5 minutos (El SIL disminuyó 52% la actividad del NHE-1 respecto al Control a  $\text{pH}_i$  6.8) (**Figura 24**).

2) La inhibición de PDE5A con sildenafil y EMD360527/5 (inhibidores estructuralmente distintos) no tuvo efecto sobre la actividad basal del NHE-1 (**Figura 25**), lo que indica que es necesaria la activación de una vía de señalización durante la acidosis intracelular para la acción inhibitoria del sildenafil. Esto se correlaciona con lo propuesto por Maekawa y colaboradores, quienes establecieron que las estrategias terapéuticas de inhibición del NHE-1 se deben enfocar en el bloqueo de su activación preservando la función basal [154].

3) La inhibición de la actividad del NHE-1 por sildenafil se debe a la desfosforilación del sitio Ser 703 presente en la cola citoplasmática mediada por la activación de PP1 (**Figura, 28 y 29**). Pérez y colaboradores demostraron que la acción del sildenafil es a través de la PKG [117], esto sugiere que la activación de PP1 es dependiente de dicha quinasa. En este modelo de cardiomiocitos aislados, el efecto de sildenafil sobre el NHE-1 se debe a la activación de PP1, mientras que no tuvo efecto sobre las quinasas ERK1/2 y  $\text{p90}^{\text{RSK}}$  (**Figura 27**).

Los resultados sugieren que sildenafil produce su efecto sobre el NHE-1, a través de la activación de PP1 (**Figura 31**), la cual al desfosforilarlo produce una disminución de la sensibilidad del NHE-1 por los  $\text{H}^+$  [109].

Recientemente se ha demostrado que las fosfatasas estudiadas en esta tesis regulan la actividad del NHE-1. En ensayos *in vitro*, se demostró que PP1

desfosforila completamente la cola citoplasmática del NHE-1 [153], y además se ha demostrado que está asociada físicamente con el NHE-1 [167].

Nuestros resultados muestran que durante la acidosis la fosforilación de ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> no se modificó por la acción del sildenafil. Contrariamente a los resultados de esta tesis, en trabajos recientes se demostró que las quinasas ERK1/2 y p90<sup>RSK</sup> son los mediadores “downstream” de la cascada iniciada por GMP<sub>c</sub>-PKG inducida por sildenafil. Takimoto y coautores demostraron que la inhibición del catabolismo del GMP<sub>c</sub> con sildenafil suprime la hipertrofia por sobrecarga de presión de cardiomiocitos de rata de neonato y mejora la función contráctil de corazones de ratones sometidos a constricción aórtica. Sugieren que la inhibición de PDE5A desactiva vías de señalización hipertróficas a través de la inhibición de las quinasas PI3K/Akt y ERK1/2 [138].

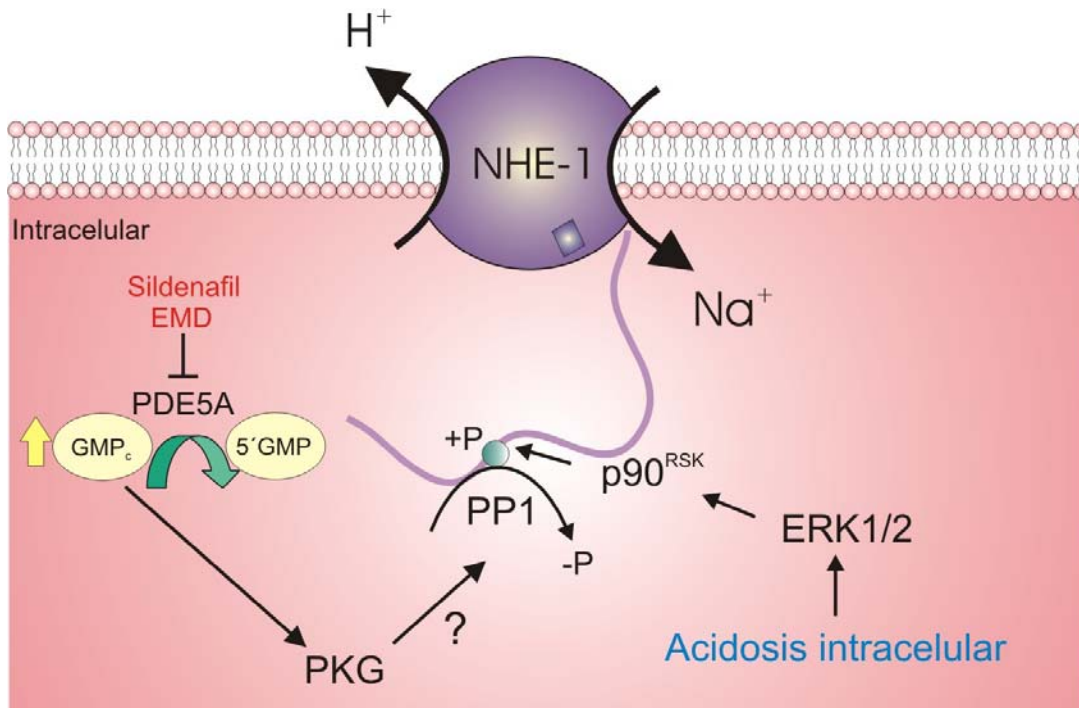
Recientemente, Das y coautores demostraron que el efecto cardioprotector de sildenafil se debe a la activación de ERK1/2 dependiente de PKG en corazones de ratones inyectados con sildenafil 24 hs antes de un protocolo de I/R [140]. Ellos proponen que la PKG activa a ERK1/2, la cual mediante la apertura de los mitoK<sub>ATP</sub> dependiente de la fosforilación de GSK3 $\beta$  y activación de eNOS/iNOS produce cardioprotección contra el daño por isquemia-reperfusión.

Sin embargo, en ambos trabajos la acción protectora de sildenafil sobre el remodelamiento del miocardio no se vincula con la inhibición del NHE-1.

Si bien se pudo establecer que PP1 se activa con sildenafil y que es la responsable de la desfosforilación del sitio Ser 703 del NHE-1, no se determinó si la PKG tiene un efecto directo sobre PP1, o si están involucradas en este mecanismo proteínas accesorias. Recientemente se propuso que el efecto cardioprotector de sildenafil en ratones con sobrecarga de presión es a través de la activación del regulador de la proteína G de señalización 2 (RGS2) dependiente de la PKG [168].

Por otra parte, se debe considerar la posibilidad de que sildenafil tenga efecto sobre otros sitios del NHE-1, además de la Ser 703. Recientemente, Coccaro demostró que la acidosis intracelular sostenida y fenilefrina, que actúa a

través de RAPGq, activan a ERK1/2 y ésta fosforila el sitio Ser 770 y Ser 771 del NHE-1 [169].



**Figura 31.** Mecanismo de señalización propuesto por el cual sildenafíl (1  $\mu\text{mol/L}$ ) en acidosis intracelular sostenida produce su acción inhibitoria sobre el NHE-1 en cardiomiocitos aislados. La inhibición de la PDE5A con sildenafíl y EMD360527/5, aumenta el nivel de GMP<sub>c</sub>, que activa a la PKG. La reversión del efecto de sildenafíl sobre la actividad y fosforilación del NHE-1 con inhibidores de fosfatasas, demuestra activación de PP1, la cual al desfosforilar al NHE-1 causa la reducción de su actividad.



# ***APÉNDICE***

## 6. APÉNDICE

**Buffer Krebs-HEPES (para lucigenina)** en mmol/L: NaCl 118.3; KCl 4.7; CaCl<sub>2</sub> 1.35; MgSO<sub>4</sub> 1.2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0; NaHCO<sub>3</sub> 25; glucosa 11; HEPES 20 (llevado a pH 7.4 luego de 1.5 h de equilibrio con una mezcla gaseosa de 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> a 37°C).

**Buffer HEPES para actividad del NHE-1 y aislamiento de miocitos cardíacos:** composición en mmol/L: NaCl 146.2; HEPES 10; glucosa 11; KCl 4.69; NaHPO<sub>4</sub> 0.35; MgSO<sub>4</sub> 1.05, 1.35 CaCl<sub>2</sub> llevado a pH 7.4 con NaOH,

**Solución de calibración de pH:** composición en mmol/L: 140 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 0.001 nigericina, 20 2,3- butanodionamonoxima (BDM), ajustado con KOH a 4 valores de pH, entre 7.7 a 6.6.

**Buffer HEPES libre Na<sup>+</sup> para interrumpir la actividad del NHE-1,** composición en mmol/L: 25 HEPES, 4.66 KCl, 1.05 MgSO<sub>4</sub>, 1.35 CaCl<sub>2</sub>, 148 N-metil-D-glucamina, 11 glucosa, llevado a pH 7.4 con HCl 1 N.

**Buffer Ringer para el aislamiento de músculos papilares,** de la siguiente composición en mmol/L: 20.2 NaHCO<sub>3</sub>, 128.3 NaCl, 11 glucosa, 4.5 KCl ; 0.35 NaHPO<sub>4</sub> ; 1.05 MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> 1.35 equilibrado a pH 7.4 con una mezcla gaseosa de CO<sub>2</sub> 5% y 95% de O<sub>2</sub> .

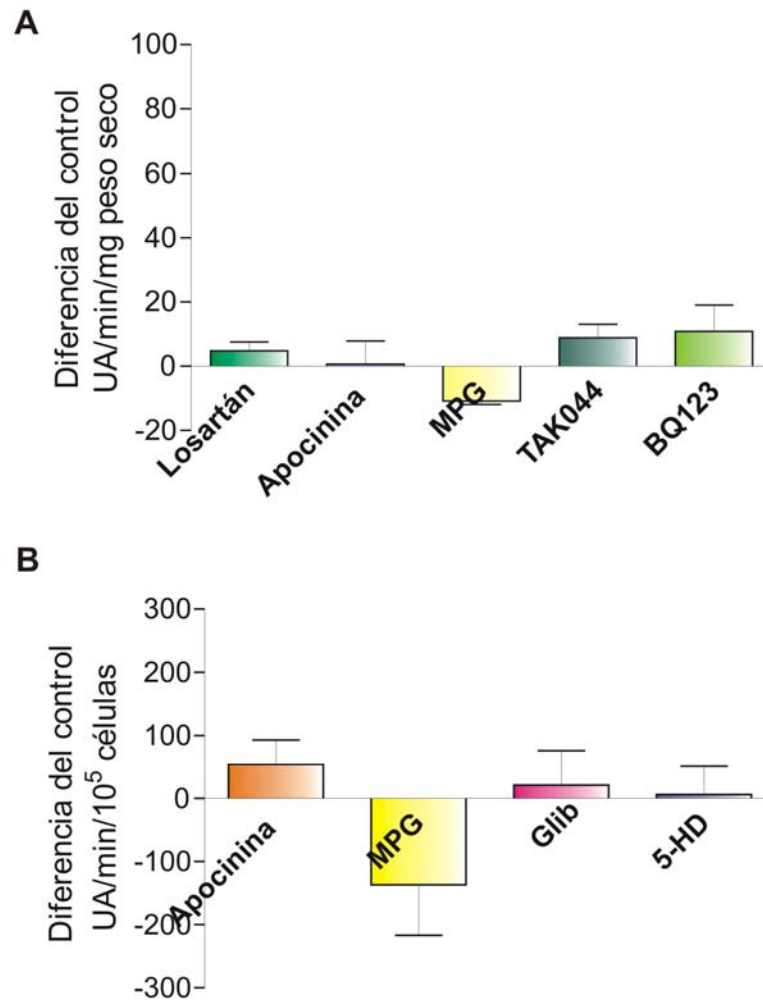
**Buffer de lisis,** de la siguiente composición en mmol/L: 50 Tris-HCl, 5 EGTA, 2 EDTA, 100 FNa, 1 NaVO<sub>4</sub>, 0.05% Tritón X-100 a pH 7.5



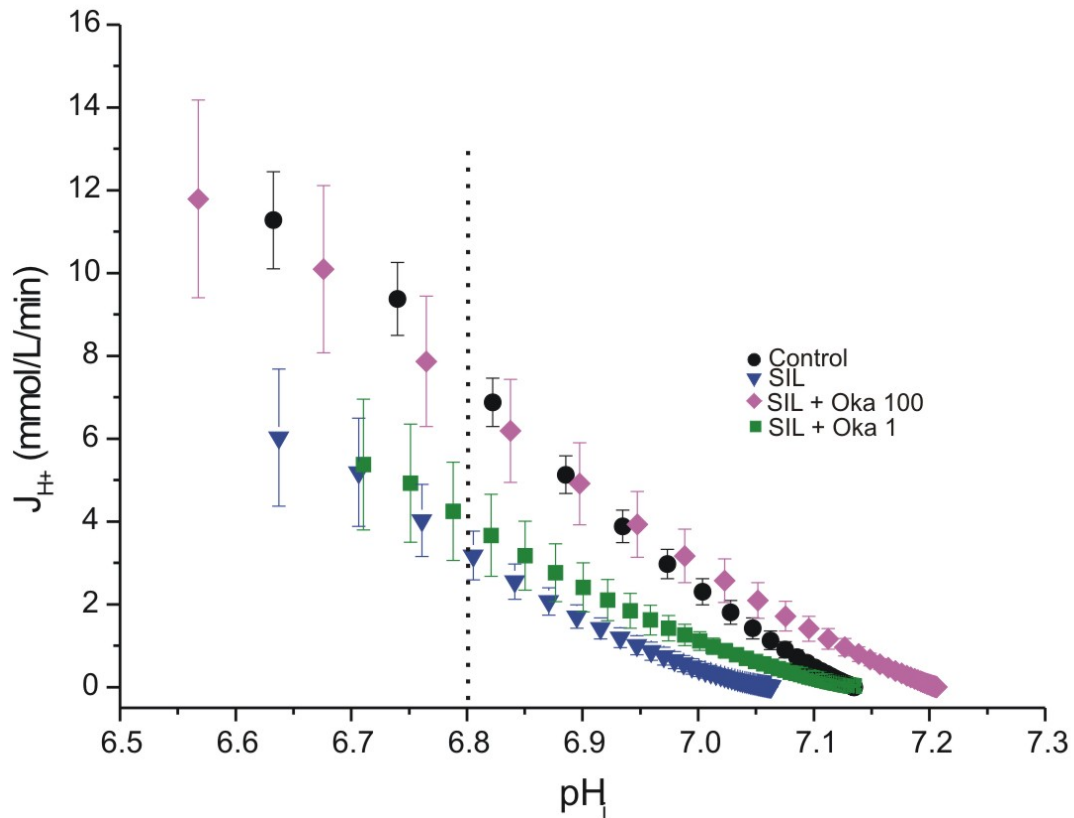


***FIGURAS SUPLEMENTARIAS***

## 7. FIGURAS SUPLEMENTARIAS



**Figura 1 Suplementaria.** Efecto de diferentes inhibidores sobre la producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) basal en tejido cardíaco **(A)** y en cardiomiocitos aislados **(B)**. La producción de  $O_2^{\cdot -}$  basal no se previno con el bloqueante de los receptores tipo I de Ang II, (AT-1): losartán (1  $\mu\text{mol/L}$ ), con el inhibidor de la Nox, apocinina (0.3 mmol/L), ni por el removedor de ERO, MPG (1 mmol/L). Tampoco se previno con el bloqueo de receptores de ET-1: selectivo con BQ123 (bloqueante de  $ET_A$ ) y no selectivo con TAK044 (bloqueante de  $ET_A$  y  $ET_B$ ). El bloqueo selectivo con 5-HD (100  $\mu\text{mol/L}$ ) y no selectivo con glibenclamida (Glib, 50  $\mu\text{mol/L}$ ) de los canales de  $K^+$  dependientes de ATP de la mitocondria ( $mitoK_{ATP}$ ) no afectó la producción basal.



**Figura 2 Suplementaria.** Actividad del NHE-1 como eflujo de  $\text{H}^+$  ( $J_{H^+}$ ) en un medio sin bicarbonato a diferentes valores de  $\text{pH}_i$ . La inhibición de la actividad del NHE-1 por SIL (1  $\mu\text{mol/L}$ ) se revirtió por inhibición de las fosfatasas con ácido okadaico (Oka). La inhibición de PP1 y PP2A con Oka 100  $\text{nmol/L}$  revirtió el efecto de sildenafil, mientras que la inhibición de PP2A con Oka 1  $\text{nmol/L}$  no previno el efecto de inhibición de la PDE5A con SIL en acidosis sostenida.



## ***REFERENCIAS***

## 8. REFERENCIAS

1. Shiojima, I., et al., *Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2108-18.
2. Tanaka, N., et al., *Effects of growth hormone and IGF-I on cardiac hypertrophy and gene expression in mice*. Am J Physiol, 1998. **275**(2 Pt 2): p. H393-9.
3. Sadoshima, J. and S. Izumo, *The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress*. Annu Rev Physiol, 1997. **59**: p. 551-71.
4. Urbanek, K., et al., *Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10440-5.
5. Chen, X., et al., *Adolescent feline heart contains a population of small, proliferative ventricular myocytes with immature physiological properties*. Circ Res, 2007. **100**(4): p. 536-44.
6. McKinsey, T.A. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(3): p. 267-74.
7. van Empel, V.P. and L.J. De Windt, *Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act*. Cardiovasc Res, 2004. **63**(3): p. 487-99.
8. Chien, K.R., *Stress pathways and heart failure*. Cell, 1999. **98**(5): p. 555-8.
9. MacLellan, W.R. and M.D. Schneider, *Success in failure: modeling cardiac decompensation in transgenic mice*. Circulation, 1998. **97**(15): p. 1433-5.
10. Bumpus, F.M., H. Schwarz, and I.H. Page, *Synthesis and pharmacology of the octapeptide angiotonin*. Science, 1957. **125**(3253): p. 886-7.
11. Tsai, B.S., et al., *Synthesis and evaluation of (Des-Asp<sup>1</sup>)angiotensin I as a precursor for (Des-Asp<sup>1</sup>)angiotensin II ("Angiotensin III")*. J Med Chem, 1975. **18**(12): p. 1180-3.
12. Mitchell, P. and J. Moyle, *Respiration-driven proton translocation in rat liver mitochondria*. Biochem J, 1967. **105**(3): p. 1147-1162.
13. Braun-Menendez, E., et al., *The substance causing renal hypertension*. J Physiol, 1940. **98**(3): p. 283-98.
14. Baker, K.M., G.W. Booz, and D.E. Dostal, *Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system*. Annu Rev Physiol, 1992. **54**: p. 227-41.
15. Johnston, C.I., *Franz Volhard Lecture. Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control*. J Hypertens Suppl, 1992. **10**(7): p. S13-26.
16. Kunapuli, S.P. and A. Kumar, *Molecular cloning of human angiotensinogen cDNA and evidence for the presence of its mRNA in rat heart*. Circ Res, 1987. **60**(5): p. 786-90.

17. Dostal, D.E., et al., *Detection of angiotensin I and II in cultured rat cardiac myocytes and fibroblasts*. Am J Physiol, 1992. **263**(4 Pt 1): p. C851-63.
18. Dell'Italia, L.J., et al., *Compartmentalization of angiotensin II generation in the dog heart. Evidence for independent mechanisms in intravascular and interstitial spaces*. J Clin Invest, 1997. **100**(2): p. 253-8.
19. Alvarez, B.V., et al., *Mechanisms underlying the increase in force and Ca(2+) transient that follow stretch of cardiac muscle: a possible explanation of the Anrep effect*. Circ Res, 1999. **85**(8): p. 716-22.
20. Perez, N.G., M.C. de Hurtado, and H.E. Cingolani, *Reverse mode of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange after myocardial stretch: underlying mechanism of the slow force response*. Circ Res, 2001. **88**(4): p. 376-82.
21. Yamazaki, T., et al., *Angiotensin II partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy*. Circ Res, 1995. **77**(2): p. 258-65.
22. Miyata, S., et al., *Renin-angiotensin system in stretch-induced hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells*. Eur J Pharmacol, 1996. **307**(1): p. 81-8.
23. Yanagisawa, M., et al., *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 411-5.
24. Inoue, A., et al., *The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2863-7.
25. Endoh, M., et al., *Endothelin: receptor subtypes, signal transduction, regulation of Ca<sup>2+</sup> transients and contractility in rabbit ventricular myocardium*. Life Sci, 1998. **62**(17-18): p. 1485-9.
26. Shinmi, O., et al., *Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **164**(1): p. 587-93.
27. Talukder, M.A., et al., *Inotropic response of rabbit ventricular myocytes to endothelin-1: difference from isolated papillary muscles*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(2): p. H596-605.
28. Peach, M.J., *Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action*. Physiol Rev, 1977. **57**(2): p. 313-70.
29. Dudley, D.T., et al., *Subclasses of angiotensin II binding sites and their functional significance*. Mol Pharmacol, 1990. **38**(3): p. 370-7.
30. Whitebread, S., et al., *Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **163**(1): p. 284-91.
31. Chang, R.S. and V.J. Lotti, *Angiotensin receptor subtypes in rat, rabbit and monkey tissues: relative distribution and species dependency*. Life Sci, 1991. **49**(20): p. 1485-90.
32. Stoll, M., et al., *The angiotensin AT<sub>2</sub>-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells*. J Clin Invest, 1995. **95**(2): p. 651-7.

33. Dzau, V.J., H. Sasamura, and L. Hein, *Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications*. J Hypertens Suppl, 1993. **11**(3): p. S13-8.
34. Catt, K. and A. Abbott, *Molecular cloning of angiotensin II receptors may presage further receptor subtypes*. Trends Pharmacol Sci, 1991. **12**(8): p. 279-81.
35. Schmermund, A., et al., *Cardiac production of angiotensin II and its pharmacologic inhibition: effects on the coronary circulation*. Mayo Clin Proc, 1999. **74**(5): p. 503-13.
36. Timmermans, P.B., et al., *Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists*. Pharmacol Rev, 1993. **45**(2): p. 205-51.
37. Simonson, M.S. and A. Rooney, *Characterization of endothelin receptors in mesangial cells: evidence for two functionally distinct endothelin binding sites*. Mol Pharmacol, 1994. **46**(1): p. 41-50.
38. Takanashi, M. and M. Endoh, *Characterization of positive inotropic effect of endothelin on mammalian ventricular myocardium*. Am J Physiol, 1991. **261**(3 Pt 2): p. H611-9.
39. Hosoda, K., et al., *Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA*. FEBS Lett, 1991. **287**(1-2): p. 23-6.
40. Ogawa, Y., et al., *Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **178**(1): p. 248-55.
41. Haynes, W.G., F.E. Strachan, and D.J. Webb, *Endothelin ETA and ETB receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo*. Circulation, 1995. **92**(3): p. 357-63.
42. Ito, H., et al., *Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes*. J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 398-403.
43. Liang, F. and D.G. Gardner, *Autocrine/paracrine determinants of strain-activated brain natriuretic peptide gene expression in cultured cardiac myocytes*. J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14612-9.
44. Cingolani, H.E., et al., *The positive inotropic effect of angiotensin II: role of endothelin-1 and reactive oxygen species*. Hypertension, 2006. **47**(4): p. 727-34.
45. Cingolani, H.E., et al., *Stretch-induced alkalization of feline papillary muscle: an autocrine-paracrine system*. Circ Res, 1998. **83**(8): p. 775-80.
46. Cingolani, H.E., et al., *Influence of Na<sup>+</sup>-independent Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange on the slow force response to myocardial stretch*. Circ Res, 2003. **93**(11): p. 1082-8.
47. Kojima, M., et al., *Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 induces regression of hypertensive left ventricular hypertrophy in vivo and inhibits the intracellular signaling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy in vitro*. Circulation, 1994. **89**(5): p. 2204-11.
48. Sugden, P.H., *Signalling pathways in cardiac myocyte hypertrophy*. Ann Med, 2001. **33**(9): p. 611-22.

49. Sadoshima, J., et al., *Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro*. Cell, 1993. **75**(5): p. 977-84.
50. Yamazaki, T., et al., *Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes*. J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 438-46.
51. Molkenkin, J.D. and G.W. Dorn, 2nd, *Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy*. Annu Rev Physiol, 2001. **63**: p. 391-426.
52. Karliner, J.S., T. Kagiya, and P.C. Simpson, *Effects of pertussis toxin on alpha 1-agonist-mediated phosphatidylinositide turnover and myocardial cell hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes*. Experientia, 1990. **46**(1): p. 81-4.
53. Sadoshima, J. and S. Izumo, *Signal transduction pathways of angiotensin II--induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers*. Circ Res, 1993. **73**(3): p. 424-38.
54. Wei, S., et al., *Differential MAP kinase activation and Na(+)/H(+) exchanger phosphorylation by H(2)O(2) in rat cardiac myocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **281**(5): p. C1542-50.
55. Rothstein, E.C., et al., *H(2)O(2)-induced Ca(2+) overload in NRVM involves ERK1/2 MAP kinases: role for an NHE-1-dependent pathway*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(2): p. H598-605.
56. Snabaitis, A.K., D.J. Hearse, and M. Avkiran, *Regulation of sarcolemmal Na(+)/H(+) exchange by hydrogen peroxide in adult rat ventricular myocytes*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(2): p. 470-80.
57. de Gasparo, M., et al., *International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(3): p. 415-72.
58. Rockman, H.A., W.J. Koch, and R.J. Lefkowitz, *Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 206-12.
59. Spat, A., A. Fabiato, and R.P. Rubin, *Binding of inositol trisphosphate by a liver microsomal fraction*. Biochem J, 1986. **233**(3): p. 929-32.
60. Berridge, M.J., *Inositol trisphosphate and calcium signalling*. Nature, 1993. **361**(6410): p. 315-25.
61. Moor, A.N. and L. Fliegel, *Protein kinase-mediated regulation of the Na(+)/H(+) exchanger in the rat myocardium by mitogen-activated protein kinase-dependent pathways*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 22985-92.
62. Caldiz, C.I., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species activate the slow force response to stretch in feline myocardium*. J Physiol, 2007. **584**(Pt 3): p. 895-905.
63. Ennis, I.L., et al., *Enalapril induces regression of cardiac hypertrophy and normalization of pHi regulatory mechanisms*. Hypertension, 1998. **31**(4): p. 961-7.



64. Ennis, I.L., et al., *From Anrep's Phenomenon to myocardial hypertrophy: Role of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger*. Current Cardiology Reviews, 2007. **3**: p. 149-164.
65. Dulce, R.A., et al., *Endothelin-1 induced hypertrophic effect in neonatal rat cardiomyocytes: involvement of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **41**(5): p. 807-15.
66. Akazawa, H. and I. Komuro, *Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy*. Circ Res, 2003. **92**(10): p. 1079-88.
67. Frey, N., T.A. McKinsey, and E.N. Olson, *Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function*. Nat Med, 2000. **6**(11): p. 1221-7.
68. Chu, L., et al., *Differential inotropic effects of endothelin-1, angiotensin II, and phenylephrine induced by crosstalk with cAMP-mediated signaling process in dog ventricular myocardium*. J Pharmacol Sci, 2004. **96**(2): p. 199-207.
69. Hartmann, H.A., et al., *Effects of phenylephrine on calcium current and contractility of feline ventricular myocytes*. Am J Physiol, 1988. **255**(5 Pt 2): p. H1173-80.
70. Mollmann, H., et al., *Contractile effects of angiotensin and endothelin in failing and non-failing human hearts*. Int J Cardiol, 2007. **114**(1): p. 34-40.
71. Ito, N., et al., *Endothelin and angiotensin II stimulation of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange is impaired in cardiac hypertrophy*. J Clin Invest, 1997. **99**(1): p. 125-35.
72. Dhalla, N.S., R.M. Temsah, and T. Netticadan, *Role of oxidative stress in cardiovascular diseases*. J Hypertens, 2000. **18**(6): p. 655-73.
73. Giordano, F.J., *Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 500-8.
74. Zimmet, J.M. and J.M. Hare, *Nitroso-redox interactions in the cardiovascular system*. Circulation, 2006. **114**(14): p. 1531-44.
75. Griending, K.K., *Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system*. Heart, 2004. **90**(5): p. 491-3.
76. Seshiah, P.N., et al., *Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators*. Circ Res, 2002. **91**(5): p. 406-13.
77. Sawyer, D.B., et al., *Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(4): p. 379-88.
78. Schreck, R., P. Rieber, and P.A. Baeuerle, *Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1*. Embo J, 1991. **10**(8): p. 2247-58.
79. Kaye, D.M., et al., *Frequency-dependent activation of a constitutive nitric oxide synthase and regulation of contractile function in adult rat ventricular myocytes*. Circ Res, 1996. **78**(2): p. 217-24.
80. Kelly, R.A., J.L. Balligand, and T.W. Smith, *Nitric oxide and cardiac function*. Circ Res, 1996. **79**(3): p. 363-80.
81. Dedkova, E.N. and L.A. Blatter, *Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 4): p. 851-72.

82. O'Rourke, B., S. Cortassa, and M.A. Aon, *Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death*. Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 303-15.
83. Aon, M.A., S. Cortassa, and B. O'Rourke, *Mitochondrial oscillations in physiology and pathophysiology*. Adv Exp Med Biol, 2008. **641**: p. 98-117.
84. O'Rourke, B., *Evidence for mitochondrial K<sup>+</sup> channels and their role in cardioprotection*. Circ Res, 2004. **94**(4): p. 420-32.
85. Zorov, D.B., et al., *Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1001-14.
86. Holmuhamedov, E.L., et al., *Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels modulate cardiac mitochondrial function*. Am J Physiol, 1998. **275**(5 Pt 2): p. H1567-76.
87. Costa, A.D. and K.D. Garlid, *Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(2): p. H874-82.
88. Kimura, S., et al., *Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide*. Hypertension, 2005. **45**(3): p. 438-44.
89. Doughan, A.K., D.G. Harrison, and S.I. Dikalov, *Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction*. Circ Res, 2008. **102**(4): p. 488-96.
90. Zhang, D.X., et al., *Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels*. Circ Res, 2001. **89**(12): p. 1177-83.
91. Stone, J.R. and S. Yang, *Hydrogen peroxide: a signaling messenger*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(3-4): p. 243-70.
92. Sabri, A., H.H. Hughie, and P.A. Lucchesi, *Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes*. Antioxid Redox Signal, 2003. **5**(6): p. 731-40.
93. Trachootham, D., et al., *Redox regulation of cell survival*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(8): p. 1343-74.
94. Kwon, S.H., et al., *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(6): p. 615-21.
95. Nakashima, I., et al., *Redox-linked signal transduction pathways for protein tyrosine kinase activation*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(3): p. 517-31.
96. Nakamura, K., et al., *Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II*. Circulation, 1998. **98**(8): p. 794-9.
97. Shih, N.L., et al., *Reactive oxygen species modulate angiotensin II-induced beta-myosin heavy chain gene expression via*

- Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase pathway in neonatal rat cardiomyocytes.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **283**(1): p. 143-8.
98. Brasier, A.R., et al., *Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor.* Mol Cell Biochem, 2000. **212**(1-2): p. 155-69.
  99. Griendling, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease.* Circ Res, 2000. **86**(5): p. 494-501.
  100. Hirotoni, S., et al., *Involvement of nuclear factor-kappaB and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy.* Circulation, 2002. **105**(4): p. 509-15.
  101. Wu, S., et al., *Activation of AP-1 through reactive oxygen species by angiotensin II in rat cardiomyocytes.* Free Radic Biol Med, 2005. **39**(12): p. 1601-10.
  102. Kuster, G.M., et al., *Alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes is mediated via thioredoxin-1-sensitive oxidative modification of thiols on Ras.* Circulation, 2005. **111**(9): p. 1192-8.
  103. Vaughan-Jones, R.D., K.W. Spitzer, and P. Swietach, *Intracellular pH regulation in heart.* J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(3): p. 318-31.
  104. Avkiran, M. and M.S. Marber, *Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects.* J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(5): p. 747-53.
  105. Karmazyn, M., A. Kilic, and S. Javadov, *The role of NHE-1 in myocardial hypertrophy and remodelling.* J Mol Cell Cardiol, 2008. **44**(4): p. 647-53.
  106. Malo, M.E. and L. Fliegel, *Physiological role and regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger.* Can J Physiol Pharmacol, 2006. **84**(11): p. 1081-95.
  107. Karmazyn, M., et al., *The myocardial Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange: structure, regulation, and its role in heart disease.* Circ Res, 1999. **85**(9): p. 777-86.
  108. Putney, L.K. and D.L. Barber, *Expression profile of genes regulated by activity of the Na-H exchanger NHE1.* BMC Genomics, 2004. **5**(1): p. 46.
  109. Avkiran, M. and R.S. Haworth, *Regulatory effects of G protein-coupled receptors on cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity: signalling and significance.* Cardiovasc Res, 2003. **57**(4): p. 942-52.
  110. Haworth, R.S., et al., *Stimulation of the plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1 by sustained intracellular acidosis. Evidence for a novel mechanism mediated by the ERK pathway.* J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 31676-84.
  111. Fliegel, L., et al., *Phosphorylation of the C-terminal domain of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II.* Biochem J, 1992. **282** ( Pt 1): p. 139-45.
  112. Vila-Petroff, M., et al., *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to intracellular pH recovery from acidosis via Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activation.* J Mol Cell Cardiol. **49**(1): p. 106-12.
  113. Bertrand, B., et al., *The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and*

- characterization of calmodulin-binding sites.* J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13703-9.
114. Li, X., et al., *A novel carbonic anhydrase II binding site regulates NHE1 activity.* Biochemistry, 2006. **45**(7): p. 2414-24.
115. Snabaitis, A.K., et al., *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, 2006. **281**(29): p. 20252-62.
116. Ito, N., et al., *Effects of the nitric oxide donor sodium nitroprusside on intracellular pH and contraction in hypertrophied myocytes.* Circulation, 1997. **95**(9): p. 2303-11.
117. Perez, N.G., et al., *Phosphodiesterase 5A inhibition induces Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger blockade and protection against myocardial infarction.* Hypertension, 2007. **49**(5): p. 1095-103.
118. Karmazyn, M., *Amiloride enhances postischemic ventricular recovery: possible role of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange.* Am J Physiol, 1988. **255**(3 Pt 2): p. H608-15.
119. Camilion de Hurtado, M.C., et al., *Regression of cardiomyocyte hypertrophy in SHR following chronic inhibition of the Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger.* Cardiovasc Res, 2002. **53**(4): p. 862-8.
120. Chen, L., et al., *Inhibition and reversal of myocardial infarction-induced hypertrophy and heart failure by NHE-1 inhibition.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(1): p. H381-7.
121. Engelhardt, S., et al., *Inhibition of Na<sup>(+)</sup>-H<sup>(+)</sup> exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice.* Circ Res, 2002. **90**(7): p. 814-9.
122. Ennis, I.L., et al., *Regression of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibition.* Hypertension, 2003. **41**(6): p. 1324-9.
123. Baartscheer, A., et al., *Chronic inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger attenuates cardiac hypertrophy and prevents cellular remodeling in heart failure.* Cardiovasc Res, 2005. **65**(1): p. 83-92.
124. Yoshida, H. and M. Karmazyn, *Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchange inhibition attenuates hypertrophy and heart failure in 1-wk postinfarction rat myocardium.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(1): p. H300-4.
125. Theroux, P., et al., *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, 2000. **102**(25): p. 3032-8.
126. Zeymer, U., et al., *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, 2001. **38**(6): p. 1644-50.
127. Mentzer, R.M., Jr., et al., *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, 2008. **85**(4): p. 1261-70.
128. Leineweber, K., G. Heusch, and R. Schulz, *Regulation and role of the presynaptic and myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1: effects on the sympathetic nervous system in heart failure.* Cardiovasc Drug Rev, 2007. **25**(2): p. 123-31.
129. Maurice, D.H., *Cyclic nucleotide phosphodiesterase-mediated integration of cGMP and cAMP signaling in cells of the cardiovascular system.* Front Biosci, 2005. **10**: p. 1221-8.
130. Kass, D.A., H.C. Champion, and J.A. Beavo, *Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation.* Circ Res, 2007. **101**(11): p. 1084-95.
131. Takimoto, E., et al., *cGMP catabolism by phosphodiesterase 5A regulates cardiac adrenergic stimulation by NOS3-dependent mechanism.* Circ Res, 2005. **96**(1): p. 100-9.
132. Senzaki, H., et al., *Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure.* Faseb J, 2001. **15**(10): p. 1718-26.
133. Das, A., L. Xi, and R.C. Kukreja, *Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling.* J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12944-55.
134. Ockaili, R., et al., *Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(3): p. H1263-9.
135. Salloum, F., et al., *Sildenafil induces delayed preconditioning through inducible nitric oxide synthase-dependent pathway in mouse heart.* Circ Res, 2003. **92**(6): p. 595-7.
136. Salloum, F.N., et al., *Sildenafil (Viagra) attenuates ischemic cardiomyopathy and improves left ventricular function in mice.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(3): p. H1398-406.
137. Pokreisz, P., et al., *Ventricular phosphodiesterase-5 expression is increased in patients with advanced heart failure and contributes to adverse ventricular remodeling after myocardial infarction in mice.* Circulation, 2009. **119**(3): p. 408-16.
138. Takimoto, E., et al., *Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy.* Nat Med, 2005. **11**(2): p. 214-22.
139. Das, A., L. Xi, and R.C. Kukreja, *Protein kinase G-dependent cardioprotective mechanism of phosphodiesterase-5 inhibition involves phosphorylation of ERK and GSK3beta.* J Biol Chem, 2008. **283**(43): p. 29572-85.
140. Das, A., et al., *ERK phosphorylation mediates sildenafil-induced myocardial protection against ischemia-reperfusion injury in mice.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296**(5): p. H1236-43.

141. Nagayama, T., et al., *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, 2009. **53**(2): p. 207-15.
142. Schulte, E.A., et al., *Natriuretic peptides and diadenosine polyphosphates modulate pH regulation of rat mesangial cells*. Cell Physiol Biochem, 1999. **9**(6): p. 310-22.
143. Sugden, P.H. and A. Clerk, *Oxidative stress and growth-regulating intracellular signaling pathways in cardiac myocytes*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(11-12): p. 2111-24.
144. Cingolani, H.E. and I.L. Ennis, *Sodium-hydrogen exchanger, cardiac overload, and myocardial hypertrophy*. Circulation, 2007. **115**(9): p. 1090-100.
145. Karmazyn, M., J.V. Sostaric, and X.T. Gan, *The myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger: a potential therapeutic target for the prevention of myocardial ischaemic and reperfusion injury and attenuation of postinfarction heart failure*. Drugs, 2001. **61**(3): p. 375-89.
146. Piper, H.M., *The calcium paradox revisited: an artefact of great heuristic value*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(1): p. 123-7.
147. Tarpey, M.M., D.A. Wink, and M.B. Grisham, *Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **286**(3): p. R431-44.
148. Dikalov, S., K.K. Griending, and D.G. Harrison, *Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies*. Hypertension, 2007. **49**(4): p. 717-27.
149. Chiappe de Cingolani, G., et al., *Hyperactivity and altered mRNA isoform expression of the Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anion-exchanger in the hypertrophied myocardium*. Cardiovasc Res, 2001. **51**(1): p. 71-9.
150. Thomas, J.A., et al., *Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ*. Biochemistry, 1979. **18**(11): p. 2210-8.
151. Zaniboni, M., et al., *Intracellular proton mobility and buffering power in cardiac ventricular myocytes from rat, rabbit, and guinea pig*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(3): p. H1236-46.
152. Goldsmith, D.J. and P.J. Hilton, *Relationship between intracellular proton buffering capacity and intracellular pH*. Kidney Int, 1992. **41**(1): p. 43-9.
153. Lehoux, S., et al., *14-3-3 Binding to Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform-1 is associated with serum-dependent activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 15794-800.
154. Maekawa, N., et al., *Inhibiting p90 ribosomal S6 kinase prevents (Na<sup>+</sup>)-H<sup>+</sup> exchanger-mediated cardiac ischemia-reperfusion injury*. Circulation, 2006. **113**(21): p. 2516-23.
155. Barton, M., et al., *Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of*

- ETA receptors for endothelin regulation.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **238**(3): p. 861-5.
156. Chua, B.H., et al., *Regulation of endothelin-1 mRNA by angiotensin II in rat heart endothelial cells.* Biochim Biophys Acta, 1993. **1178**(2): p. 201-6.
157. Dohi, Y., et al., *Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries.* Hypertension, 1992. **19**(2): p. 131-7.
158. Li, L., et al., *Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension.* Circulation, 2003. **107**(7): p. 1053-8.
159. Sabri, A., et al., *Hydrogen peroxide activates mitogen-activated protein kinases and Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in neonatal rat cardiac myocytes.* Circ Res, 1998. **82**(10): p. 1053-62.
160. Thannickal, V.J. and B.L. Fanburg, *Reactive oxygen species in cell signaling.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(6): p. L1005-28.
161. Ago, T., et al., *Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes.* Circ Res. **106**(7): p. 1253-64.
162. Kanegae, M.P., et al., *The reactivity of ortho-methoxy-substituted catechol radicals with sulfhydryl groups: contribution for the comprehension of the mechanism of inhibition of NADPH oxidase by apocynin.* Biochem Pharmacol, 2007. **74**(3): p. 457-64.
163. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.* Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
164. Ellmark, S.H., et al., *The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle.* Cardiovasc Res, 2005. **65**(2): p. 495-504.
165. Rouhanizadeh, M., et al., *Oxidized-1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine induces vascular endothelial superoxide production: implication of NADPH oxidase.* Free Radic Biol Med, 2005. **39**(11): p. 1512-22.
166. Garciarena, C.D., et al., *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1 inhibitors decrease myocardial superoxide production via direct mitochondrial action.* J Appl Physiol, 2008.
167. Misik, A.J., et al., *Protein phosphatase regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform I.* Biochemistry, 2005. **44**(15): p. 5842-52.
168. Takimoto, E., et al., *Regulator of G protein signaling 2 mediates cardiac compensation to pressure overload and antihypertrophic effects of PDE5 inhibition in mice.* J Clin Invest, 2009. **119**(2): p. 408-20.
169. Coccaro, E., et al., *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, 2009. **297**(2): p. H846-58.