



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**Regulación de la actividad del intercambiador Na^+/H^+
miocárdico por proteína quinasa G.
Posibles implicancias terapéuticas.**

Tesista: Lic. Escudero, Daiana Sabrina

Director: Dr. Pérez, Néstor Gustavo

Codirector: Dra. Díaz, Romina Gisel

Año: 2019

Agradecimientos

Agradezco a las autoridades del Centro de Investigaciones Cardiovasculares “Dr. Horacio E. Cingolani”- Facultad de Ciencias Médicas de La Plata (CIC) el Dr. Martín Vila Petroff y el Dr. Alejandro Aiello, donde se desarrolló el presente trabajo de tesis por permitirme realizar mi trabajo de investigación.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANCyPT) por haberme otorgado la Beca Doctoral, que me permitió iniciar el presente trabajo. Y al CONICET, por haberme otorgado la Beca de Finalización de Doctorado Tipo II para poder terminarlo.

En especial quiero agradecer a mi director el Dr. Néstor Gustavo Pérez por abrirme las puertas a la investigación básica y brindarme los recursos y conocimientos necesarios para poder realizar dicho trabajo, a mi co-directora Dra. Romina Gisel Díaz por ayudarme en el desafío de llevar a cabo el “experimento de cada día”, compartir conmigo su experiencia, consejos y mates.

A todo el resto del CIC becarios, CPA, personal administrativo y directivos por los consejos brindados y los momentos compartidos

INDICE

	Página
Sección I:	
INTRODUCCIÓN	
1. Hipertrofia Cardíaca	9
1.1 Generalidades: Visión global del problema	9
1.2 Insuficiencia e Hipertrofia Cardíaca	10
1.3 Características generales de hipertrofia cardíaca patológica	11
1.3.1 Mecanismos responsables de su desarrollo	11
1.3.2 Vías de señalización	12
1.3.3 Respuestas celulares	15
2. Intercambiador sodio-hidrógeno miocárdico	16
2.1 Estructura y función	16
2.2 Regulación de la actividad de NHE1 y su relación con patologías cardíacas	18
3. Terapias farmacológicas contra la hipertrofia cardíaca	19
3.1 Inhibidores de NHE1	19
3.2 Posible uso de sildenafil como terapia anti-hipertrofiante	20
OBJETIVOS	
Objetivos	25
Sección II:	
METODOLOGÍA	
4. Modelos experimentales	29
4.1 Ratas espontáneamente hipertensas	29
4.2 Células H9C2	30
4.2.1 Mantenimiento de la línea celular	30
4.2.2 Diseño experimental con Células H9C2	31

5. Ensayos en células aisladas	31
5.1 Aislamiento	31
5.2 Determinación de pH_i	32
6. Experimentos en animales	33
6.1 Diseño experimental	33
6.2 Determinación de presión arterial	34
6.3 Parámetros Morfométricos	34
6.4 Aislamiento de músculos papilares de ventrículo izquierdo	35
6.5 Determinación de rigidez miocárdica	35
6.6 Determinación de pH_i en músculos papilares	35
6.7 Técnicas histológica	36
6.8 Determinación de producción de especies reactivas del oxígeno	36
6.9 Determinación de peroxidación lipídica	37
6.10 Técnica inmunoquímica:	37
6.10.1 Western Blot	37
6.10.2 Inmunoprecipitación	39
7. Estadística	39
Sección III:	
RESULTADOS	
8. Efecto agudo de Sildenafil sobre la actividad de NHE1 en miocitos aislados de ratas Wistar y SHR	43
9. Hipertrofia inducida por Angiotensina II en células H9C2. Efecto del tratamiento crónico con Sildenafil	44
10. Efectos de la administración crónica de Sildenafil sobre la hipertrofia cardíaca patológica de ratas SHR jóvenes	46
11. Efecto de Sildenafil sobre miocardio hipertrófico de ratas adultas	49
12. Posibles mecanismos Sildenafil: blancos intracelulares	51

12.1 Efecto de Sildenafil sobre el estrés miocárdico	54
12.2 Efecto de Sildenafil sobre las vías de calcineurina/NFAT y caspasa 3	57
12.3 Efecto de Sildenafil sobre hipertrofia cardíaca y función diastólica	58
Sección IV:	
DISCUSIÓN	61
CONCLUSIÓN	71
Perspectivas a futuro	73
BIBLIOGRAFÍA	77

Lista de abreviaturas

Ang II: angiotensina II

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

EROs: especies reactivas del oxígeno

HC: hipertrofia cardíaca

I/R: Isquemia – reperfusión

MAPK: quinasas activadas por mitógenos

NHE1: Intercambiador de sodio-hidrógeno cardíaco

NOX: NADPH oxidasa

PDE5A: fosfodiesterasa 5 A

pH_i: pH intracelular

SHR: ratas espontáneamente hipertensas

SIL: Sildenafil

SST: superficie de sección transversal

TAC: constricción de la aorta transversa

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Sección I:

INTRODUCCIÓN

1. Hipertrofia Cardíaca

1.1 Generalidades: Visión global del problema

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en el mundo, por encima del cáncer, las enfermedades respiratorias y la diabetes (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>). **Alrededor de 17 millones de personas mueren al año por esta razón**, lo que representa un tercio del total de muertes, concentrada mayormente en los países de menores ingresos, en los que la dificultad para acceder a programas integrados de atención primaria de salud que permitan la detección temprana y el tratamiento de factores de riesgo pareciera ser la clave. Sin embargo, en países de altos ingresos donde esta detección y tratamiento son una realidad, tampoco se ha logrado disminuir sustancialmente su morbilidad.

Si bien la implementación de políticas higiénico-dietarias como promoción de dietas más saludables, minimizar consumo de tabaco y alcohol, o actividad física regular son esenciales para restringir factores de riesgo y prevenir el desarrollo de estas patologías, no es menos importante la búsqueda de alternativas terapéuticas que permitan enfrentarlas con mayor éxito.

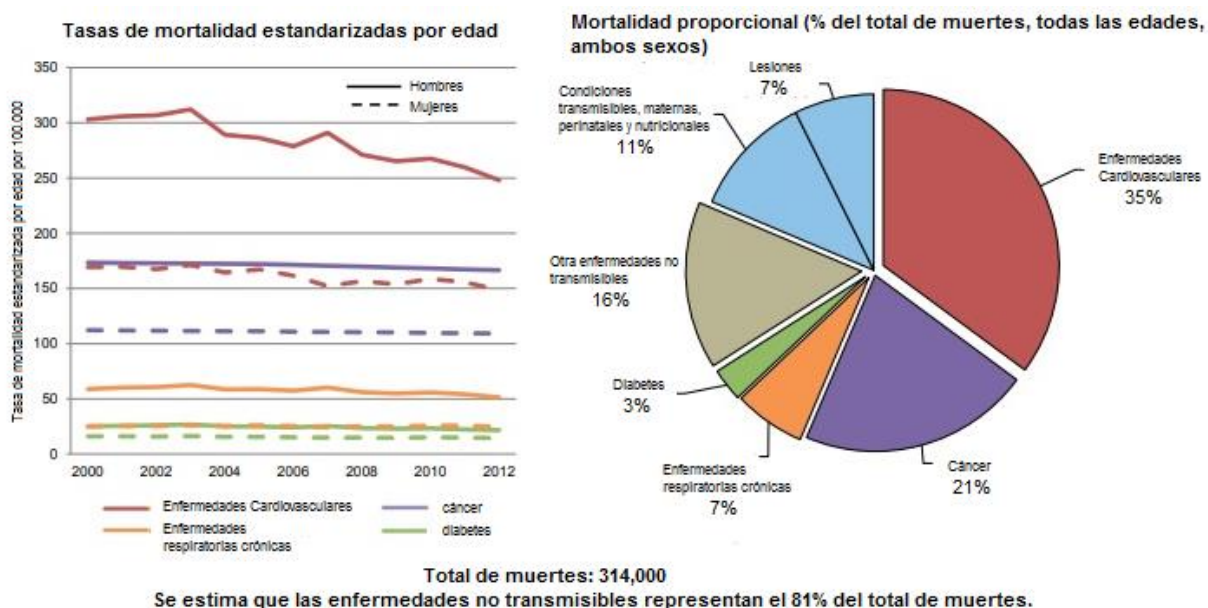


Figura 1. Porcentajes de muerte por enfermedades no transmisibles en Argentina. Adaptado de Riley y colaboradores (Riley, L. and M. Cowan 2014).

Según el último relevamiento de la Organización Mundial de la Salud del año 2014, la población Argentina sigue la tendencia mundial. En tal sentido, del total de muertes por

enfermedades no transmisibles, el 35% son decesos por enfermedades cardíacas seguidas por cánceres (21%) y otras enfermedades no transmisibles (16%) (**Figura 1**). Cifras del Ministerio de Salud de la Nación muestran que patologías que afectan al corazón como hipertensión arterial, procesos isquémicos, hipertrofia e insuficiencia cardíaca provocaron la muerte de 71.893 argentinos en 2015, lo que representa **una persona cada siete minutos**. De ese valor el 25% fueron decesos por insuficiencia cardíaca. Además, este riesgo de mortalidad aumenta conforme aumenta el rango etario (**Figura 2**), lo cual genera una perspectiva preocupante teniendo en cuenta el creciente “envejecimiento” poblacional (<http://www.deis.msal.gov.ar/index.php/estadisticas-vitales/>).

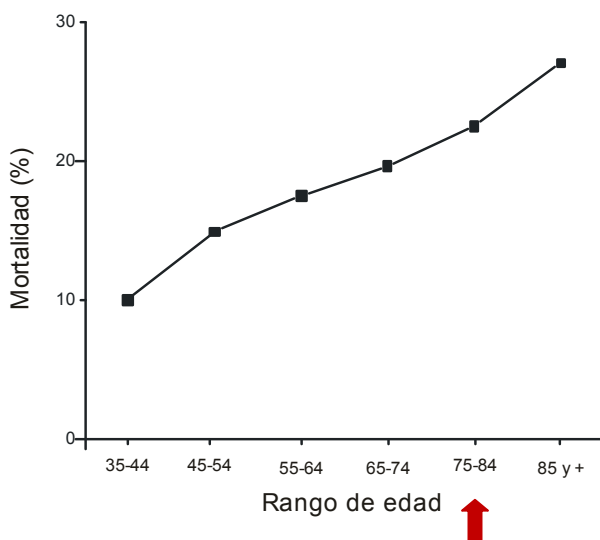


Figura 2. Porcentaje de mortalidad por enfermedades del corazón según rango etario en Argentina en el año 2015. En el rango de 75-84 años es la primera causa de muerte según el Ministerio de la Salud de la Nación.

1.2 Insuficiencia e Hipertrofia Cardíaca

La insuficiencia cardíaca es un complejo cuadro clínico que describe la incapacidad del corazón de bombear sangre en volúmenes adecuados como para satisfacer las demandas metabólicas. La hipertrofia cardíaca (HC) es por definición un aumento en la masa miocárdica. Se la clasifica en fisiológica, que involucra a aquella que se manifiesta en deportistas o en mujeres embarazadas y no será tratada en este trabajo de Tesis Doctoral, y patológica, objeto principal de nuestro estudio, cuyos disparadores son diversos e involucra cambios morfológicos y funcionales que la posicionan como una de las principales vías de entrada hacia la insuficiencia cardíaca.

La HC ha sido considerada clásicamente como una respuesta adaptativa del miocardio para compensar el aumento del estrés parietal. Sin embargo, esta postura ha sido

severamente cuestionada ante la rápida aparición de síntomas claros de disfunción cardíaca cuando la patología se cronifica, poniendo de manifiesto que es en realidad una respuesta maladaptativa del miocardio (Selvetella and Lembo 2005). Es por eso que la HC patológica es considerada actualmente un factor de riesgo independiente de morbilidad y mortalidad de origen cardiovascular en adultos (de Simone, Gottdiener et al. 2008, Frohlich, Gonzalez et al. 2011). Entre los factores que predisponen al desarrollo de HC patológica aparecen diversas patologías como hipertensión arterial, estenosis aórtica o valvulopatías. La morfología del corazón cambia drásticamente, se caracteriza por un aumento de la fibrosis intersticial, muerte celular principalmente de cardiomiocitos y disfunción cardíaca. El crecimiento de cardiomiocitos que se produce durante este proceso supera la capacidad de los capilares para suministrar adecuadamente nutrientes y oxígeno, lo que lleva a hipoxia celular y muerte. Se ha postulado que este remodelamiento general del miocardio no sólo se vincula a la progresión hacia insuficiencia cardíaca, sino también a otras patologías cardíacas como infarto de miocardio, arritmias y muerte súbita (Levy, Garrison et al. 1990, Koren, Devereux et al. 1991). En este marco la caracterización precisa de las bases fisiopatológicas que llevan al desarrollo de HC patológica constituye un paso clave para el desarrollo de terapias de prevención y/o reversión de la misma. El presente trabajo está orientado precisamente a la caracterización de dichos mecanismos y al eventual desarrollo de terapias eficaces para su control en un modelo genético de HC por hipertensión arterial. En particular haremos hincapié en la hipertrofia ventricular izquierda, más adelante, en el apartado **4.1**, describiremos en detalle el modelo genético de hipertrofia patológica a utilizar.

1.3 Características generales de hipertrofia cardíaca patológica

1.3.1 Mecanismos Responsables de su desarrollo

Ante un estímulo inicial como puede ser una sobrecarga de presión, se genera un estiramiento miocárdico que promueve la liberación de factores neurohumorales como Angiotensina II (Ang II), Endotelina 1 (ET1) y Noradrenalina (NA) (Sadoshima, Xu et al. 1993, Adiarto, Heiden et al. 2012), los cuales se unirán a sus receptores específicos (acoplados a proteína G, "GPCR") AT1 de Ang II, ET_A y ET_B de ET1, y α 1 y β 1 adrenérgicos, provocando la activación de quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y calcineurina/NFAT, ruta de señalización que se describirá con más detalle en la sección **1.3.2**. La activación de estos receptores, y en consecuencia de sus respectivos efectores corriente abajo, generará el desencadenamiento de las respuestas celulares características de la HC patológica como aumento del área celular y de la producción de

colágeno intersticial (fibrosis), disparo de rutas pro-apoptóticas, y mayor estrés oxidativo (ver **1.3.3**), dando como resultado un deterioro general de la función cardíaca.

Uno de los efectos más relevantes de la señalización corriente abajo de GPCR es el aumento en la actividad del intercambiador Na^+/H^+ cardíaco (NHE1) (Cingolani, Alvarez et al. 1998). La activación del NHE1 es consecuencia de una ruta de eventos autócrinos/parácrinos desencadenados a partir de la estimulación de los receptores de Ang II y ET1 y que involucran la activación de NADPH oxidasa con el consiguiente aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) (Caldiz, Garcarena et al. 2007), las cuales han sido vinculadas estrechamente con el desarrollo de HC (Cave, Grieve et al. 2005, Maulik and Kumar 2012).

1.3.2 Vías de señalización

De las múltiples vías de señalización que participan en la respuesta hipertrófica maladaptativa, en este apartado nos centraremos en las relacionadas a MAPKs, a estrés oxidativo y en la ruta de la fosfatasa calcineurina.

Las MAPKs se clasifican en 3 subfamilias: ERK (quinasa regulada por señales extracelulares), JNK (quinasa c-Jun amino-terminal) y quinasa p38. Esta familia de quinasas se encuentran involucradas en procesos biológicos importantes como proliferación, diferenciación, metabolismo, motilidad y apoptosis (Pearson, Robinson et al. 2001). Todas ellas son activadas por fosforilación a partir de una quinasa activadora específica (McCubrey, Steelman et al. 2007) y dicha activación responde a agonistas de GPCR como mencionamos anteriormente, a especies reactivas del oxígeno (Son, Cheong et al. 2011) y/o a estrés mecánico (Sadoshima, Qiu et al. 1995, Takeishi, Huang et al. 2001). La activación de ERK1/2 en particular fue descrita tanto para procesos adaptativos (Bueno, De Windt et al. 2000) como maladaptativos y su acción depende del sitio fosforilado. Esta quinasa se activa por fosforilación en residuos conservados de treonina y tirosina, y se inactiva por desfosforilación por fosfatasas de doble especificidad, tirosina fosfatasas y serina-treonina fosfatasas como es la serina-treonina fosfatasa 2A (PP2A) (Alessi, Gomez et al. 1995). Se ha descrito que la autofosforilación de ERK en el sitio de Thr188 conduce a una localización nuclear de la quinasa y a la promoción de la transcripción de genes relacionados con hipertrofia patológica (Lorenz, Schmitt et al. 2009). Asimismo estímulos como Ang II o estiramiento mecánico de la pared miocárdica estimulan la señalización de MAPK inducida por MEK (MEK-ERK1/2), que culmina con la activación de la quinasa corriente abajo p90 ribosomal S6 (p90RSK) y la fosforilación directa de la extremidad C-terminal del NHE1 en el sitio Ser703 (Cingolani, Perez et al.

2013). Esto hace que ERK sea un factor importante de regulación del NHE1 (Moor and Fliegel 1999).

Las otras dos subfamilias, JNK y p38, también presentan roles duales, en general se las asocia con estrés, daño cardíaco y desarrollo de hipertrofia (Izumi, Kim et al. 2000, Behr, Nerurkar et al. 2001). Sin embargo, algunos autores describen la función cardioprotectora de JNK contra la insuficiencia cardíaca en respuesta a la sobrecarga de presión (Sadoshima, Montagne et al. 2002) y un papel cardioprotector contra el daño por isquemia/reperfusión (I/R) para p38 (Hernandez, Lal et al. 2011).

La quinasa p38 merece un párrafo aparte ya que se evaluará en el presente trabajo de Tesis. La dualidad en las funciones de p38 dependerá de la isoforma que esté involucrada, de los blancos corriente abajo que active, y del balance entre los mismos. Se sabe que existen 4 isoformas de p38 MAPK: p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ . Las isoformas α y β fueron reportadas como las prevalentes en el corazón (Lemke, Bloem et al. 2001). Mientras que a p38 α se le asignan funciones pro-apoptóticas mediante la activación de p53 (Liu, Pedram et al. 2011), p38 β participaría en procesos de supervivencia mediante la inhibición de la generación de EROs (Kim, Pedram et al. 2006). La quinasa p38 modula diferentes funciones cardíacas como proliferación de miocitos, apoptosis y tiene una función importante en la regulación de la respuesta hipertrófica en cardiomiocitos (Nemoto, Sheng et al. 1998). Diferentes líneas de investigación han indicado que la inhibición de la actividad de p38 puede inducir la reentrada y la progresión del ciclo celular en miocitos adultos y mejorar la proliferación celular en los cardiomiocitos progenitores y neonatales (Engel, Hsieh et al. 2006). En cuanto a la apoptosis, se ha demostrado que bajo condiciones de estrés como daño por I/R o estrés oxidativo los cardiomiocitos mueren por apoptosis. Como observó Kaiser y col. (Kaiser, Bueno et al. 2004) en cultivo celular de neonatos, la sobreexpresión de p38 α disminuye la expresión de la proteína anti-apoptótica bcl2. También se ha observado la interacción de dos rutas de MAPK opuestas y se ha demostrado que la activación de p38 disminuye la activación de ERK inducida por H₂O₂ a través de un mecanismo dependiente de PP2A en miocitos ventriculares cardíacos (Liu and Hofmann 2004). En el marco de la interacción de p38 con PP2A, nuestro grupo de trabajo cuenta con evidencia experimental que esta quinasa participa en la vía que lleva a la inhibición de la hiperactividad del NHE1 por Sildenafil (SIL) (Diaz, Escudero et al. 2019) lo cual le conferiría un papel cardioprotector como se detallara en la sección **3.2**. Como se dijo antes, el aumento de EROs es también una característica del miocardio hipertrófico patológico. El estrés oxidativo ocurre cuando hay un desequilibrio entre EROs

producidas y la capacidad del corazón de eliminarlos mediante sistemas antioxidantes intrínsecos, como por ejemplo, superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (Nordberg and Arner 2001). Este desbalance en las EROs ha sido asociado con HC patológica y con insuficiencia cardíaca tanto en modelos animales como en humanos (Dhalla, Temsah et al. 2000, Pimentel, Amin et al. 2001, Date, Morita et al. 2002, Seddon, Looi et al. 2007). En pacientes con insuficiencia cardíaca se ha observado un aumento de marcadores de estrés oxidativo tanto sistémicos como en fluido pericárdico (Mallat, Philip et al. 1998), mientras que en ratones se ha demostrado que una inyección intraperitoneal de un antioxidante disminuye significativamente la HC inducida por TAC (Date, Morita et al. 2002). Se han reportado tres principales fuentes de EROs en el corazón: (1) el complejo enzimático unido a membrana Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato (NADPH) oxidasa (Fleming, Michaelis et al. 2001), (2) los complejos mitocondriales I y III de la cadena respiratoria mitocondrial cuando operan en mal funcionamiento (Ide, Tsutsui et al. 2001), y (3) la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en modo desacoplado (Vasquez-Vivar, Kalyanaraman et al. 1998, Takimoto, Champion et al. 2005), (4) el sistema xantino oxidasa (Engberding, Spiekermann et al. 2004). Respecto al origen de las EROs que participan en el desarrollo de HC, se ha demostrado que la NADPH oxidasa juega un papel importante ya que ratones transgénicos deficientes de la subunidad gp91 de la enzima resultan estar protegidos contra el desarrollo de hipertrofia patológica inducida por Ang II (Bendall, Cave et al. 2002). Por otra parte, la producción de EROs de origen mitocondrial también cumple un rol fundamental, habiéndose demostrado una liberación de EROs mitocondriales como amplificación de los producidos por NADPH oxidasa provenientes de una señal citosólica (Zorov, Filburn et al. 2000) y su participación en la señalización producida por Ang II (Dai, Johnson et al. 2011, Cingolani, Perez et al. 2013).

Los estímulos hipertróficos como Ang II, ET-1, catecolaminas, citocinas y el estiramiento mecánico de la pared pueden inducir un aumento en la producción de EROs en músculo cardíaco (Pollock and Pollock 2005, Hitomi, Fukui et al. 2006, Caldiz, Garcarena et al. 2007). En cardiomiocitos de rata se observó que las EROs inducen la activación de la vía MEK-ERK1/2-p90RSK, lo que aumenta la actividad de NHE1 a través de un proceso de fosforilación (Wei, Rothstein et al. 2001). En este marco, se ha demostrado que el efecto cardioprotector de los inhibidores de NHE1 como cariporide está relacionado con una disminución del estrés oxidativo (Fantinelli, Cingolani et al. 2006, Garcarena, Caldiz et al. 2009).

Respecto de la ruta de la fosfatasa calcineurina se ha propuesto que desempeña un papel clave en el desarrollo de HC. Calcineurina es una proteína fosfatasa de señalización dependiente de calcio que, desfosforila e induce la translocación del factor nuclear de células T-activadas (NFAT) desde el citoplasma al núcleo. De esta manera, NFAT activa la transcripción de los genes diana pro-hipertrofiantes (Bueno, Wilkins et al. 2002). Respecto de la relación de calcineurina con la generación de hipertrofia por estiramiento, se ha demostrado que los inhibidores de NHE1 como cariporide llevan a la regresión de la HC a través de la inactivación de esta vía calcineurina/NFAT (Ennis, Garcarena et al. 2007).

1.3.3 Respuestas celulares

El corazón contiene varios tipos celulares incluyendo cardiomiocitos, fibroblastos, células del músculo liso vascular, endoteliales e inmunes. Los cardiomiocitos constituyen, aproximadamente el 30% del número total de células, pero representan entre el 70-80% de la masa del corazón, por lo que la HC se relaciona con el agrandamiento de este tipo celular (Popescu, Gherghiceanu et al. 2006). Tienen la capacidad de detectar el estiramiento mecánico debido a la sobrecarga hemodinámica y convertirlo en señales de crecimiento, lo que conduce a la hipertrofia. Experimentos *in vitro* han demostrado que el estiramiento de cardiomiocitos aislados provoca la activación de sistemas de segundos mensajeros inducidos por factores de crecimiento (Sadoshima and Izumo 1997).

Los fibroblastos constituyen el 64% del total de los tipos celulares cardíacos y sintetizan colágeno y glucosaminoglucanos de la matriz. Estos tipos celulares permiten mantener la homeostasis en condiciones fisiológicas y el remodelamiento tisular en respuesta al estrés. Los fibroblastos cardíacos expresan receptores de matriz extracelular acoplando los estímulos mecánicos a las respuestas funcionales, y son críticos reguladores de la respuesta fibrótica y por ende de la rigidez ventricular. La matriz proporciona una red organizada alrededor de los cardiomiocitos, que no solo sirve como plataforma para los componentes celulares, sino que también ayuda a soportar una variedad de procesos mecánicos, químicos y eléctricos que mantienen la homeostasis y coordinan la función contráctil y el acoplamiento eléctrico entre cardiomiocitos. El estrés mecánico resulta en la activación y proliferación persistente de fibroblastos, que conduce a la deposición aberrante (intersticial y/o de reemplazo) y posterior acumulación de colágeno en el corazón. El principal colágeno fibrilar presente en la fibrosis cardíaca es el colágeno tipo 1 y la acumulación excesiva de colágeno endurece los ventrículos, lo que dificulta la contracción y relajación, el acoplamiento eléctrico de los miocitos cardíacos con las

proteínas de la matriz extracelular y reduce la densidad capilar. La fibrosis y la densidad capilar reducida aumentan las distancias de difusión de oxígeno, lo que lleva a la isquemia del miocardio y es probable que contribuya a la transición de la HC a insuficiencia cardíaca (Eckhouse and Spinale 2012). Esta fibrosis causa rigidez mecánica, contribuyendo así a la disfunción diastólica que puede progresar a disfunción sistólica (Brower, Gardner et al. 2006).

2. Intercambiador sodio – hidrógeno miocárdico

El intercambiador de Na^+/H^+ (NHE) pertenece a una familia de proteínas de membrana presentes en todos los organismos vivos que median el intercambio de un ion sodio (Na^+) extracelular por un ion hidrógeno (H^+) intracelular siendo su principal función la protección de la célula contra la acidificación intracelular. Existen diez isoformas conocidas que tienen distintas ubicaciones, expresión y funciones fisiológicas dentro del organismo. Las isoformas del 1 al 5 se encuentran en membrana plasmática, del 6 al 9 están en membranas intracelulares, mientras que la isoforma 10 parece expresarse únicamente en osteoclastos (Fliegel 2008). La isoforma 1 (NHE1) fue la primera en ser descubierta y por ende la más estudiada (Sardet, Franchi et al. 1989). Se encuentra en casi todos los tejidos y, como mencionamos anteriormente, es la principal isoforma en miocardio mamífero, lo que la hace conocida como la isoforma cardíaca. En los miocitos se encuentra principalmente en la región de discos intercalares y túbulos transversos de miocitos ventriculares (Petrecca, Atanasiu et al. 1999).

2.1 Estructura y función:

El NHE1 es una glicoproteína con un total de 815 aminoácidos. Está formada por dos dominios principales, un dominio transmembrana de 500 aminoácidos y un dominio citoplasmático carboxiterminal de 315 aminoácidos. Se sabe que la mínima unidad funcional necesaria para la extrusión de protones es el monómero de NHE1, pero se ha demostrado que NHE1 es capaz de formar homodímeros (Fafournoux, Noel et al. 1994, Slepko and Fliegel 2002). Como se puede ver en la **Figura 3**, el dominio transmembrana está formado por 12 hélices o unidades que son fundamentales para el transporte de iones, mientras que la cola citosólica tiene un rol importante en la regulación de la actividad del intercambiador ya que contiene numerosos sitios de fijación para otros factores reguladores (Wakabayashi, Fafournoux et al. 1992). Como mencionamos anteriormente, la principal función del NHE1 es proteger a la célula de la acidificación. El intercambiador se activa por disminución en el pH intracelular (pH_i). Cuando existe acidosis, la actividad de NHE1 aumenta restaurando el pH_i a valores normales mediante

la extrusión electroneutra de un H^+ en intercambio por un Na^+ que ingresa a la célula (estequiometría 1:1) (Aronson 1985).

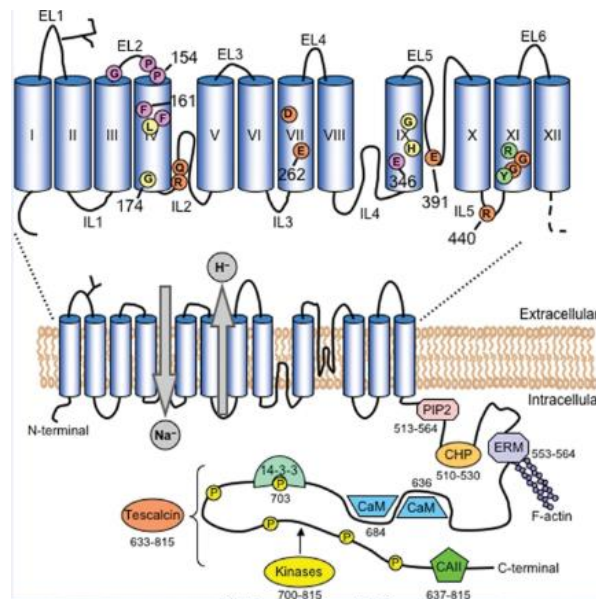


Figura 3. Estructura del NHE1. Formado por un dominio transmembrana (contiene 12 hélices con el dominio N y C terminal ubicado en el citosol) y un dominio citoplasmático de 315 aminoácidos que interactúa con los distintos factores para la regulación de su actividad. Reproducido de Spelkov y col. (Spelkov, Rainey et al. 2007)

En el cardiomiocito existen dos mecanismos de extrusión que se activan en el caso de una acidificación intracelular, uno es el mencionado NHE1 y el otro es el cotransportador Na^+/HCO_3^- (NBC). La contribución relativa de cada transportador no es equitativa, de hecho se observa que el NHE1 es el transportador dominante para el eflujo (Vaughan-Jones, Villafuerte et al. 2006).

Además de la regulación del pH_i , el NHE1 ha sido involucrado con otras funciones celulares que enumeraremos a continuación:

- 1- Regulación del flujo de sodio y el volumen celular después de la contracción osmótica (Grinstein, Woodside et al. 1992).
- 2- Diferenciación celular (Wang, Singh et al. 1997).
- 3- Anclaje estructural, dado que participa en la organización del citoesqueleto (Denker and Barber 2002)
- 4- Crecimiento celular (Rotin, Steele-Norwood et al. 1989).

2.2 Regulación de la actividad de NHE1 y su relación con patologías cardíacas

Debido a su vinculación con distintas funciones celulares, el NHE1 está sujeto a una intensa y compleja regulación que varía según el tipo celular. Como se dijo antes, el estímulo principal para su activación es la acidosis intracelular. Sin embargo, también se activa en respuesta a otros estímulos como factores de crecimiento, hormonas y estrés osmótico (Fliegel and Karmazyn 2004). La mayoría de estas respuestas son mediadas por fosforilación en el extremo C-terminal de la cola citosólica y este estímulo es clave en el desarrollo de procesos patológicos. En general, un aumento en la fosforilación del intercambiador se relaciona con un aumento de su actividad, habiéndose identificado varios sitios de fosforilación que se activarán dependiendo del tipo de estímulo. Cuando el estímulo es el sostenimiento de la acidosis, se dispara la vía de señalización mediada por Ras que culmina con la fosforilación del intercambiador por ERK en los sitios Ser770, Ser771 (Coccaro, Karki et al. 2009) y por p90RSK en Ser703 (Takahashi, Abe et al. 1999). En el caso del estiramiento miocárdico se ha visto que el NHE1 incrementa su fosforilación en Ser703 (Cingolani, Perez et al. 2013), lo que conduce a una hiperactividad del mismo.

Las MAPKs tienen un papel importante en la regulación del NHE1 ya que algunas de ellas como ERK1/2, p90RSK y p38 interactúan directa o indirectamente con el intercambiador. Como se dijo antes, ERK1/2 y p90RSK fosforilan de forma directa al dominio citoplasmático del NHE1 miocárdico activándolo (Moor and Fliegel 1999) y esta fosforilación puede ser inducida por EROs (McCubrey, Lahair et al. 2006). La quinasa p38 en cambio puede inhibir o activar al intercambiador dependiendo del tipo celular que se trate (Kusuhara, Takahashi et al. 1998, Khaled, Moor et al. 2001). Es necesario destacar que el nivel de activación del NHE1 dependerá del balance neto fosforilación-desfosforilación generado entre estas quinasas y las fosfatasas PP1 y PP2A presentes en el miocardio (Misik, Perreault et al. 2005, Snabaitis, D'Mello et al. 2006).

La hiperactividad del NHE1 ha sido vinculada a diversas patologías miocárdicas entre las que se puede mencionar el daño por isquemia/reperfusión, proceso durante el cual la acumulación de Na^+ intracelular lleva a la sobrecarga de Ca^{2+} por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, responsable de contractura y arritmias cardíacas, así como de muerte celular por necrosis y/o apoptosis (Karmazyn, Gan et al. 1999). Estudios sugieren que la disminución en la apoptosis a través de la inhibición de NHE1 se debe a un aumento en la concentración de Ca^{2+} mitocondrial, una reducción en la actividad de caspasa 3 y un aumento en la relación de la proteína anti-apoptótica bcl2 con la proteína pro-apoptótica

bax (Sun, Wang et al. 2004). Del mismo modo, y como se mencionó con anterioridad, el NHE1 tiene un rol esencial en el desarrollo de HC patológica, existiendo evidencia experimental de que se encuentra hiperactivo en modelos animales de HC, y que su inhibición crónica es capaz de revertir la misma (Kusumoto, Haist et al. 2001, Camilion de Hurtado, Portiansky et al. 2002, Perez, Piaggio et al. 2007, Garcarena, Caldiz et al. 2009).

3. Terapias farmacológicas contra la Hipertrofia Cardíaca

3.1 Inhibidores de NHE1

Como hemos mencionado antes, el NHE1 juega un papel importante en el desarrollo de patologías del miocardio. Esto ha puesto en evidencia la necesidad de caracterizar de manera precisa sus mecanismos de regulación como paso previo clave para el desarrollo de estrategias terapéuticas tendientes a prevenir las consecuencias de su hiperactividad. En tal sentido, y sobre la base de un enorme acúmulo de información obtenida en modelos experimentales, se propuso que la inhibición del NHE1 sería clave para prevenir el remodelamiento ventricular independientemente de su origen. Sin embargo, estudios clínicos como ESCAMI (Zeymer, Suryapranata et al. 2001), GUARDIAN (Theroux, Chaitman et al. 2000) o EXPEDITION (Mentzer, Bartels et al. 2008) no arrojaron resultados alentadores. ESCAMI fue un ensayo clínico de fase 2 realizado en pacientes con infarto agudo de miocardio en el que se evaluó el efecto de eniporide (inhibidor del NHE1) sobre el tamaño de infarto, pero falló en mostrar mejoras. El ensayo GUARDIAN evaluó los posibles efectos beneficiosos de cariporide (otro inhibidor del NHE1) en tres subgrupos de pacientes con distintas afecciones cardíacas, pero no mostró evidencia general de cardioprotección, excepto en un grupo limitado de pacientes con injerto de derivación de la arteria coronaria tratados con altas dosis. El estudio EXPEDITION fue un ensayo clínico de fase 3 que también se orientó a probar el efecto cardioprotector del cariporide, pero debió finalizarse tempranamente debido a un considerable aumento de accidentes cerebrovasculares. A pesar de estos inesperados resultados, la inhibición del NHE1 sigue siendo considerada como el potencial blanco terapéutico más efectivo para prevenir el remodelamiento patológico del miocardio (Karmazyn 2013). Más aún, se especula que la ineficacia de los inhibidores específicos del NHE1 (eniporide y cariporide) utilizados en los ensayos clínicos en pacientes podría relacionarse con la eliminación plena de la actividad del intercambiador, incluyendo su importantísima función homeostática basal, sugiriendo que las nuevas líneas de investigación deberían apuntar a intervenciones que disminuyan solamente la sobreactivación del intercambiador.

3.2 Posible uso de Sildenafil como terapia anti-hipertrofiante

SIL es un inhibidor de la fosfodiesterasa 5A (FDE5A), enzima encargada de degradar el GMP cíclico (GMPc) a 5'GMP. A pesar que fue pensado originalmente para el tratamiento de la angina de pecho (Andersson 2018), este conocido vasodilatador es ampliamente destacado por su utilización en el tratamiento de la disfunción eréctil (Eardley, Brooks et al. 1999). SIL actúa a nivel del cuerpo cavernoso del pene inhibiendo la degradación del GMPc generado por el NO liberado por neuronas no adrenérgicas - no colinérgicas y por las células endoteliales arteriolares, potenciando así la acción vasodilatadora del mismo. Como consecuencia de la relajación muscular lisa vascular y trabecular, y de la dilatación de las arterias del pene, se favorece la erección (Rajfer, Aronson et al. 1992). Diferentes estudios demuestran que los inhibidores de FDE5A son seguros y bien tolerados (Jackson, Montorsi et al. 2006) y que no hay diferencias significativas en cuanto a esos parámetros entre los distintos inhibidores aprobados para uso en pacientes como SIL, Vardenafil y Tadalafil (Hatzimouratidis, Salonia et al. 2016). También está aprobado su uso para el tratamiento de la hipertensión pulmonar y del edema pulmonar de altitud (Ladha, Bonnet et al. 2005, Bates, Thompson et al. 2011).

En los últimos años, promisorios resultados en modelos experimentales, han reimpulsado la idea de usar SIL para el tratamiento de patologías miocárdicas en las que la HC es una característica saliente. Das y col. (Das, Xi et al. 2005) trabajando en un modelo de isquemia simulada en corazón de ratones adultos mostraron que SIL tiene efectos directos en la prevención de necrosis y apoptosis de células cardíacas. Takimoto y col. (Takimoto, Champion et al. 2005) han mostrado que SIL es capaz de revertir la HC en ratones con constricción de la aorta transversa. También, se ha observado que el tratamiento con SIL post-infarto de miocardio alivia la disfunción del ventrículo izquierdo en ratón (Chau, Salloum et al. 2011). Además se ha demostrado que SIL es capaz de revertir la HC inducida por L-NAME en miocitos ventriculares de ratas neonatas (Zeidan, Siam et al. 2012). Nuestro grupo de trabajo también ha aportado importantes resultados que han proporcionado la base sobre la cual se pensó y desarrolló el presente trabajo de Tesis Doctoral. En tal sentido, se ha demostrado que el aumento de la actividad de la proteína quinasa G (PKG) por inhibición de la FDE5A con SIL mejora el remodelamiento post-infarto agudo de miocardio en rata, previniendo la hipertrofia del tejido sobreviviente, la fibrosis que acompañaba al crecimiento anómalo de los cardiomiocitos y la disfunción ventricular, efectos que podrían ser asignados a la inhibición del NHE1 por SIL (Perez, Piaggio et al. 2007). Por otra parte, en un estudio realizado en un modelo de isquemia

regional en corazones aislados de rata se observó la eficacia de SIL en cuanto a reducción del tamaño de infarto y mejoramiento de la disfunción mecánica post-isquémica (Garcarena, Fantinelli et al. 2011), efecto que también se acompañó con una menor fosforilación del NHE1 en Ser703. En un trabajo posterior que se orientó a caracterizar el mecanismo intracelular que desencadenaría las acciones beneficiosas demostradas en distintos procesos isquémicos se pudo confirmar el efecto inhibitorio de SIL sobre el NHE1 mediante un mecanismo que involucrara la activación de la fosfatasa PP2A con la consecuente desfosforilación del intercambiador (Diaz, Nolly et al. 2010). Como adelantamos en una sección anterior (1.3.2), trabajos recientes mostraron que la activación de la quinasa p38 sería de gran importancia para la citada activación de PP2A y posterior disminución de la actividad de NHE1 (Diaz, Escudero et al. 2019). El presente Proyecto de Tesis Doctoral fue orientado a profundizar el estudio de la regulación del NHE1 por la ruta GMPc/PKG, para posteriormente evaluar el potencial rol anti-hipertrofiante de SIL en un tratamiento crónico, sobre modelos de hipertrofia *in vitro* e *in vivo*.

OBJETIVOS

Objetivo general:

El presente trabajo de Tesis Doctoral tiene como objetivo general la caracterización funcional y molecular de la regulación del NHE1 por fosforilación en el miocardio, poniendo especial énfasis en el análisis de la participación de la ruta GMPc/PKG en condiciones normales (miocardio normotrófico) y patológicas (miocardio hipertrófico).

Objetivos específicos:

-Caracterizar la activación de la ruta GMPc/PKG inducida por inhibición de la FDE5A con SIL sobre la actividad del NHE1 en cardiomiocitos de ratas normotensas Wistar y espontáneamente hipertensas SHR.

-Evaluar el posible efecto anti-hipertrofiante de la administración crónica de SIL en un modelo *in vitro* de crecimiento celular disparado por Ang II en células H9C2 (línea celular proveniente de mioblastos de miocardio de rata).

-Evaluar el posible efecto anti-hipertrofiante de la administración crónica de SIL *in vivo* en un modelo de hipertrofia miocárdica por hipertensión (ratas SHR), caracterizando los posibles mecanismos intracelulares involucrados.

Sección II:

METODOLOGÍA

4. Modelos experimentales

4.1 Ratas Espontáneamente Hipertensas

Como modelo animal de hipertrofia para nuestros experimentos elegimos las ratas espontáneamente hipertensas o SHR (Spontaneously Hypertensive Rats). Estas cepas de ratas se obtuvieron en los años 60 por Okamoto y col. (Okamoto and Aoki 1963) quienes cruzaron una cepa de ratas normotensas Wistar-Kyoto con ratas que tenían presión arterial alta. Se considera que esta cepa es un modelo puramente patológico y ofrece predisposición genética específica y uniforme, lo que permite el estudio de las causas, los mecanismos y la patología de la hipertensión, así como sus consecuencias conductuales, y enfermedades cardiovasculares.

Como características principales esta cepa de ratas presenta un desarrollo de hipertensión que comienza a las 5-6 semanas de edad, un ascenso creciente de la presión sistólica (Sen, Tarazi et al. 1974), la que se encuentra en 180-200 mmHg en ratas adultas (**Figura 4**) y el desarrollo de características de enfermedades cardiovasculares como insuficiencia cardíaca entre las 40-50 semanas (Conrad, Brooks et al. 1995)

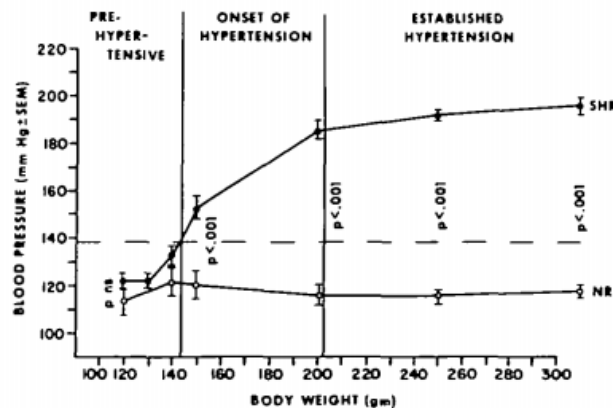


FIGURE 1
Blood pressure and body weight in normal rats (NR) and spontaneously hypertensive rats (SHR).

Figura 4. Curva de crecimiento y desarrollo de hipertensión en el modelo de ratas SHR. Reproducido de Sen y col. (Sen, Tarazi et al. 1974)

La sobrecarga de presión se asocia con niveles elevados de Ang II, catecolaminas y ET-1 (Schunkert, Dzau et al. 1990, Rapacciuolo, Esposito et al. 2001, Yayama, Horii et al. 2004). El desarrollo de insuficiencia cardíaca en SHR envejecidas se relaciona con una marcada fibrosis miocárdica, una rigidez pasiva aumentada y una función contráctil

alterada en relación a animales SHR sin insuficiencia cardíaca y a controles no hipertensos de la misma edad (aprox. 12 meses).

Se ha determinado, además, que células derivadas de SHR jóvenes muestran un crecimiento exagerado, producen Ang II y expresan varias enzimas, moléculas de adhesión y citocinas, que son independientes de la hipertensión y posiblemente se asocian con anomalías genéticas (Fukuda, Hu et al. 2002).

Como mencionamos anteriormente el NHE1 tiene un rol fundamental en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca y se ha demostrado que éste se encuentra hiperactivo en ratas SHR (Perez, Alvarez et al. 1995). Este modelo también presenta un aumento de la vía calcineurin/NFAT con respecto al miocardio normotenso de ratas Wistar (Ennis, Garcarena et al. 2007). Además se ha observado que se encuentra aumentada la activación de las caspasas 3, 8 y 9 (Deng, Xia et al. 2015) y presentan un aumento significativo de la peroxidación lipídica (T-BARS) a los 11 meses de edad (Alvarez, Caldiz et al. 2008).

4.2 Células H9C2

Para completar los estudios realizados en animales utilizamos la línea celular de mioblastos de miocardio de rata *Rattus norvegicus* H9C2. Esta línea celular se obtuvo originalmente del tejido ventricular de rata embrionario (Kimes and Brandt 1976), que es importante ya que la hipertrofia cardíaca resultante de la hipertensión se produce principalmente en el músculo ventricular del corazón. Los cultivos de cardiomiocitos, generalmente de corazones neonatales de rata, se usan ampliamente para investigar los cambios celulares y moleculares que subyacen a la respuesta hipertrófica. Estos incluyen un aumento en el tamaño celular, acumulación y reorganización de proteínas contráctiles y regulación positiva de un perfil de genes específico de hipertrofia. Está confirmado que las células H9C2 imitan una amplia gama de rasgos hipertróficos mostrados por los cardiomiocitos primarios en respuesta a los agentes hipertrofiantes como ET-1 y Ang II (Watkins, Borthwick et al. 2011) y por eso los elegimos para los estudios *in vitro*.

4.2.1 Mantenimiento de la línea celular

La línea celular fue mantenida en condiciones de temperatura (37°C) y tensión de CO₂ (5%) constantes. Las células fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Microvet), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (Natocor) y 1% (v/v) de los antibióticos penicilina y estreptomycin (Life Technologies). Se las mantuvo en placas de 100 mm y fueron subcultivadas una vez por semana. Para el subcultivo se retiró el medio de cultivo, se lavó la monocapa de células con PBS y se agregó 0,5 ml de

tripsina 0,25% en EDTA (Life Technologies). La acción de la tripsina se terminó por adición de 5 ml de medio de cultivo, y las células se dispersaron por pipeteo. Una décima parte del volumen de células dispersadas se colocó en una placa nueva y se agregaron 10 ml de medio. Todo el material de cultivo fue esterilizado por autoclave o por filtración (con filtro de 0.22 μm) en el caso de los medios de cultivo y las drogas adicionadas.

4.2.2 Diseño experimental con células H9C2

Las células provenientes del subcultivo se dispusieron en placas de 6 wells con DMEM suplementado y se dejaron estabilizar por 24 horas. Pasado este tiempo se las expuso a un medio DMEM sin suero por otras 24 horas, en estas condiciones se adicionó Ang II en dosis crecientes (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M). Para determinar área celular, a las 24 y 48 horas desde la inoculación de Ang II se tomaron fotografías de las placas en los distintos wells (microscopio invertido Olympus IX71, objetivo de 20X) y se la estimó utilizando el programa Image pro-plus 6.0. Cada n corresponde a una serie y cada serie es una placa de 6 wells, los cuales tienen el control sin agregado de droga alguno y las diferentes intervenciones. Se contaron alrededor de 40 a 60 células por cada well.

En otro set de experimentos, se seleccionó una única dosis de Ang II y se procedió a la inoculación de las células como fue descrito anteriormente. A las 24 horas del agregado de Ang II se incorporó al medio SIL en dosis crecientes (0.5, 1, 5 y 10 μM) y pasadas 24 horas luego del agregado de SIL se procedió a la evaluación de área celular.

5. Ensayos en células aisladas

5.1 Aislamiento de cardiomiocitos.

Se utilizaron ratas Wistar y SHR macho de 4 meses de edad. Los animales fueron anestesiados con ketamina (75mg/Kg) + diazepam (5mg/Kg) intraperitoneal. Luego de constatar anestesia profunda se abrió la cavidad torácica, se expuso el corazón, previa canulación de la aorta se lo extrajo y se colocó el corazón en un sistema tipo Langendorff para perfusión retrógrada. Se lo perfundió con una solución libre de bicarbonato (buffer HEPES) conteniendo (en mmol/L) HEPES 10, NaCl 148.0, KCl 4.5, CaCl_2 1.0, MgSO_4 1.05, glucosa 11.0, pH final 7.4; lo cual permitió limpiar el tejido. Luego se cambió a un medio HEPES libre de Ca^{+2} con 0.1 mmol/L de EGTA durante 5 minutos y se recirculó una solución de digestión compuesta por HEPES libre de Ca^{+2} , 0.50 mg/ml de colagenasa tipo II (300U/ml), 0.02 mg/ml de proteasa y albúmina bovina 0.5 mg/ml. Concluida la digestión, el corazón fue desmontado y el tejido ventricular no digerido fue disociado mecánicamente con tijeras. La suspensión de células obtenida fue sometida luego a 4

pasos de decantación y resuspensión en soluciones cada vez más concentradas de CaCl_2 hasta lograr 1 mmol/L, la cual se mantuvo durante los protocolos experimentales.

5.2 Determinación de pH_i

El pH_i se midió siguiendo la técnica de epifluorescencia con BCECF-AM (2'-7'-Bis(2-CarboxiEtil)-5,6-CarboxiFluoresceína Acetoximetiléster) (Yeves, Villa-Abrille et al. 2014). El BCECF es un indicador fluorescente pH -métrico con relación de excitación doble y con un $\text{pK}_a \sim 6.98$. Las mediciones de pH_i con BCECF se realizan determinando la relación de intensidad de emisión dependiente del pH_i , detectada a 535 nm, cuando el colorante se excita a ~ 490 nm y cuando se excita en su punto isobéptico de ~ 440 nm.

El BCECF-AM se solubilizó en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Co) para favorecer la penetración. La forma acetoximetiléster del indicador una vez ingresada a las células a través de la membrana, sufre un clivaje mediante esterasas intracelulares que lo retiene en el citoplasma. Cuando los H^+ se unen a esta forma desesterificada se produce una modificación de la emisión de la misma dependiente de la longitud de onda incidente. Las células cargadas se colocaron en una cámara de perfusión de un microscopio invertido (Nikon, TE 2000-U) y se perfundieron continuamente con HEPES. Se proporcionó una excitación doble (440 y 495 nm) mediante una lámpara de arco de xenón de 75 watts y una rueda de filtros que permite la alternancia entre las longitudes de onda de excitación. La fluorescencia emitida se recogió con un tubo fotomultiplicador equipado con un filtro a 535 nm. La relación de fluorescencia de 495 a 440 nm se digitalizó a 10 kHz (software de análisis de fluorescencia ION WIZARD). Al final de cada experimento, la relación de fluorescencia se convirtió a pH_i mediante calibraciones *in vivo* utilizando el método de nigericina-alto K^+ .

El flujo de protones (J_{H^+}) se calculó como $\text{dpH}_i / \text{dt} \times \beta_i$ y la comparación entre los diferentes grupos se realizó a un pH_i común de 6,8. El dpH_i / dt en cada pH_i se obtuvo a partir de un ajuste exponencial de la fase de recuperación. La capacidad de tamponamiento intracelular de los miocitos (β_i) se midió exponiendo las células a concentraciones variables de NH_4Cl en HEPES libre de Na^+ . Fueron estimados a diferentes niveles de pH_i a partir de las líneas de regresión de mínimos cuadrados de β_i vs parcelas pH_i .

Los miocitos aislados (ver 5.1) se cargaron con BCECF (Invitrogen, Molecular Probes) a una concentración final de 10 $\mu\text{mol/L}$ durante 10 minutos, se lavó el indicador por centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en medio HEPES libre de BCECF. Se cargó una gota de suspensión celular sobre la platina y se realizó un pulso de

2 minutos de NH_4Cl (30mM), luego se lavó con una solución de HEPES carente de Ca^{2+} y de Na^+ con el fin de sostener la acidosis por 1 minuto. Finalmente se recirculó HEPES y se observó la recuperación del pH_i . La capacidad inhibitoria de SIL (1 $\mu\text{mol/L}$) sobre el NHE1 se determinó tanto en cardiomiocitos de miocardio normal (Wistar) como hipertrófico (SHR).

6. Experimentos en animales

Los experimentos se realizaron en ratas macho SHR respetando las normas bioéticas nacionales e internacionales para el manejo de animales de laboratorio: “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health, NIH Publication No. 85-23, revised 1996”, y Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio “CICUAL” de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP. A continuación se describen las preparaciones usadas y los protocolos experimentales aplicados

6.1 Diseño experimental

Para demostrar el efecto crónico de SIL en ratas SHR, utilizamos tres grupos experimentales.

- El grupo experimental 1 estaba constituido de ratas machos SHR de 4 meses de edad. Este grupo fue tratado con SIL a una dosis de 100mg/Kg/día (“SHR+SIL”) y comparado con ratas SHR controles, es decir sin tratamiento (“SHR”). La droga fue incorporada en la dieta de los animales disuelta en el agua de bebida y el tratamiento duró 3 meses.
- El grupo experimental 2 se realizó con ratas macho SHR de 8 meses de edad que también fueron tratadas de la misma forma y con la misma dosis de SIL que el grupo experimental 1.
- El grupo experimental 3 se realizó con ratas macho SHR de 8 meses de edad que también fueron tratadas de la misma forma y con la misma dosis de SIL que los grupos experimentales anteriores, pero fueron sacrificadas al mes del tratamiento.

En todos los grupos experimentales se realizaron seguimientos de presión arterial, antes de iniciar el tratamiento y finalizando el mismo, antes del sacrificio (realizado como consta en el inciso **5.1**). Se tomaron los pesos de las ratas y al momento del sacrificio se pesó también el ventrículo izquierdo para determinar el índice de hipertrofia cardíaca (**6.3**): cociente peso ventricular izquierdo sobre peso corporal. En ese momento se disecaron los músculos papilares del ventrículo izquierdo (**6.4**), uno fue utilizado para la determinación de rigidez miocárdica (**6.5**) y el otro papilar para medición de pH_i (**6.6**). También se

tomaron muestras para preparar cortes histológicos que se utilizaron en la determinación de la superficie de sección transversal (SST) de los cardiomiocitos y fibrosis intersticial mediante porcentaje de colágeno total a través de técnicas histológicas descritas en el apartado 6.7. Además, se tomaron muestras para la posterior medición de los parámetros de estrés oxidativo: EROs (6.8) y T-BARS (6.9) y para la evaluación de proteínas involucradas en las vías de señalización (6.10).

6.2 Determinación de presión arterial:

La presión arterial sistólica fue registrada en la arteria de la cola de las ratas, según lo descrito en la técnica de *RivaRocci* (Bunag 1973). Este método de lectura indirecta se realizó antes del inicio, durante y al final del período de tratamiento.

Primero se dejó al animal en una cámara de calor durante 15 minutos aproximadamente con la finalidad de provocar una vasodilatación en las arterias caudales para una mejor detección de los pulsos pletoisográficos. Luego se lo trasladó a una caja compacta de acrílico con orificios. El cuerpo de la rata se amolda con facilidad a este tipo de jaulas evitando el movimiento excesivo y brusco para

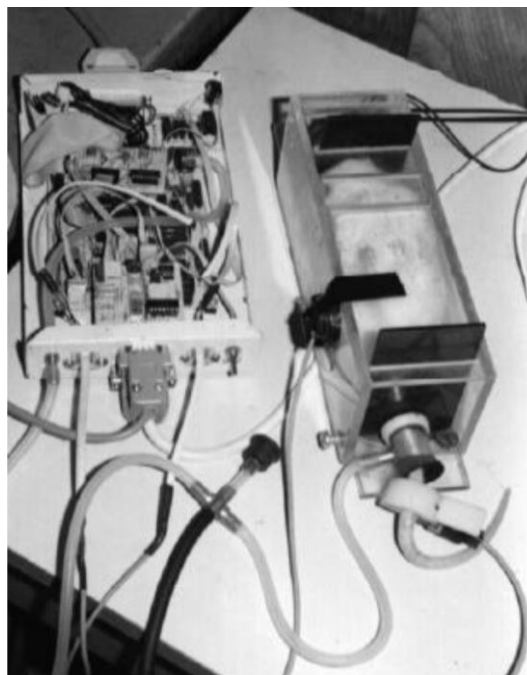


Figura 5. Imagen del equipo de toma de presión

facilitar la utilización de electrodos (Figura 5). La unidad del pletoisógrafo se acopla a una pinza especial en forma curva que se amolda a la forma redonda de la cola de la rata. La señal obtenida se registró mediante un transductor de presión conectado a una computadora.

6.3 Parámetros Morfométricos

Para establecer los parámetros hipertróficos por balanza se tomaron los pesos corporales correspondientes a cada rata antes de ser sacrificadas. Antes de extraer los músculos papilares se pesó el ventrículo izquierdo, expuesto a sobrecarga por incremento en la presión arterial. El índice de hipertrofia cardíaca se estimó como el cociente entre el peso ventricular izquierdo respecto al peso corporal (PVI/PC).

6.4 Aislamiento de músculos papilares de ventrículo izquierdo

En animales anestesiados con ketamina (75mg/Kg) + diazepam (5mg/Kg) vía intraperitoneal, se abrió la cavidad torácica, se expuso el corazón, se lo extrajo y se lo perfundió con una solución Ringer de siguiente composición (en mmoles/L): NaCl 128.3, KCl 4.5, CaCl₂ 1.35, NaHCO₃ 20.23, MgSO₄ 1.05, glucosa 11.0, burbujeado con 5% CO₂/95% O₂ a 30°C para eliminar la sangre residual.

Se aislaron 2 músculos papilares de ventrículo izquierdo por corazón (uno fue destinado a la **Determinación de pH_i** y el otro a **Determinación de rigidez miocárdica**) los que fueron montados horizontalmente en sendas cámaras de perfusión ubicadas sobre la platina de un microscopio invertido, entre un soporte fijo y un transductor de fuerza.

6.5 Determinación de rigidez miocárdica.

Los músculos papilares aislados fueron montados en una cámara de perfusión y sobreperfundidos con solución Ringer. La posible participación de catecolaminas liberadas por las terminaciones nerviosas se previno mediante el bloqueo de los receptores adrenérgicos con 1,0 μmol/L de prazosin más 1,0 μmol/L de atenolol. Los músculos se estimularon a 0,2 Hz a una tensión del 10% por encima del umbral mantenido a 30°C, y se registraron las contracciones isométricas. Al cabo de un tiempo de estabilización se determinó la longitud basal (Lslack), así como el ancho y espesor de los músculos papilares. Luego se los estiró progresivamente en intervalos de 10% del Lslack hasta alcanzar la longitud a la cual desarrollaban máxima fuerza (Lmáx). El área de la SST (calculada como 0,75 del producto de espesor y ancho) se usó para normalizar los registros de fuerza obtenidos con un medidor de tensión de silicio (modelo AEM 801, Sensor Technologies, Horten, Noruega). Los datos experimentales de tensión de reposo fueron expresados en porcentaje de la tensión medida a Lmáx y ajustados a una función exponencial para luego promediar valores a porcentajes fijos de tensión.

6.6 Determinación de pH_i

Los músculos papilares fueron montados en un sistema similar al anterior, pero en medio HEPES. Luego de determinarse su Lslack, fueron estirados paulatinamente hasta llegar a Lmáx. Posteriormente se los desestiró hasta ~98% de Lmáx, longitud a la cual se desarrollaron los experimentos. Al igual que en el caso anterior, el medio fue suplementado con atenolol y prazosin (1 μmol/L ambos) para inhibir las respuestas adrenérgicas.

La actividad del NHE1 se determinó midiendo la recuperación del pH_i dependiente de Na⁺ luego de una acidosis sostenida generada por un pulso de cloruro de amonio (NH₄Cl:

30mM) (Perez, Piaggio et al. 2007). Los experimentos fueron realizados en ausencia nominal de bicarbonato (buffer HEPES) para asegurar que el único mecanismo activo de regulación de pH_i fuera el NHE1. Los músculos se cargaron con BCECF-AM (10 $\mu\text{mol/L}$) por una hora, luego se lavó repetidas veces el espacio extracelular con solución libre de indicador. Los experimentos se realizaron ~30 minutos después de este lavado, tiempo al cual la fluorescencia del BCECF se hallaba uniformemente distribuida. La actividad del NHE1 se estimó comparando en los distintos grupos experimentales el eflujo de H^+ (J_{H^+}) a un pH_i común de ~6.8 luego de una acidosis sostenida (lavando el amonio con HEPES en el cual el Na^+ fue reemplazado equimolarmente por N-metil-D-glucamina) de 10 minutos o de una acidosis transitoria (lavando el amonio con buffer HEPES).

6.7 Técnicas Histológicas

Para determinaciones de SST y fibrosis, fueron cortados secciones transversales de 3 a 4 mm de ancho de cada base de corazón. El tejido ventricular se fijó en formaldehído al 10% durante 24 horas y se embebió en parafina. Los portaobjetos con el preparado de tejido en parafina fueron teñidos con hematoxilina/eosina. Para evaluar SST, solo se observaron células redondas a ovoides con núcleo redondo visible considerado, y se contaron 50 células en al menos 10 imágenes obtenidas de cada muestra de corazón.

La fibrosis intersticial se evaluó con la técnica de picrosirius red (Vogel B, Siebert H, Hofmann U, Frantz S. 2015). El porcentaje de colágeno se calculó como la suma de las áreas de colágeno dividido por el área total del ventrículo izquierdo. La fracción volumétrica de colágeno se calculó como la suma de todas las áreas de tejido conectivo dividido por la superficie total de la sección, en no menos de 10 imágenes. El colágeno perivascular se excluyó de esta medida (Portiansky, Alonso et al. 2002)

Microscopio confocal: Muestras de ventrículo izquierdo fueron extraídas en formalina durante 24 horas, y luego cortadas de manera serial en secciones de 10 μm de grosor usando un vibrátomo (Leica VT 1000S). La fluorescencia se detectó usando un microscopio confocal (Olympus FV1000). Se usó un láser de 559 nm para excitar el fluoróforo DsRed, y el objetivo 4X para determinar la distribución viral en el tejido. Para la captura de imágenes, la intensidad del láser de 559 nm y la de su fotomultiplicador se mantuvieron constantes a fin de comparar cualitativamente las muestras.

6.8 Determinación de la producción de especies reactivas del oxígeno

Se disecaron tiritas de tejido cardiaco del ventrículo izquierdo (1x5mm) de SHR tratadas y sin tratar y se utilizó el método quimioluminiscencia aumentada por lucigenina para medir la producción $O_2^{\cdot -}$ (Caldiz, Garciaarena et al. 2007). La quimioluminiscencia en unidades

arbitrarias (AU) se registró con un luminómetro (Chameleon, Hidex; Finland) durante 30 segundos cada 4,5 min por un período total de 30 min. La producción de O_2^- se normalizó a miligramos de peso seco de tejido por minuto.

Dado que las concentraciones elevadas de lucigenina ($> 20 \mu\text{mol} / \text{L}$) pueden favorecer el ciclo redox, utilizamos $5 \mu\text{mol/l}$ de lucigenina, en la que se ha demostrado que la cantidad de artefactos es insignificante (Li, Zhu et al. 1998).

6.9 Determinación de la peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se determinó midiendo la tasa de producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), expresada como unidades arbitrarias. Los homogenatos de corazón se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes (0,5 ml) se mezclaron con 1,5 ml de ácido tricloroacético (30% p / v), 1 ml de ácido tiobarbitúrico (0,7% p / v) y 0,5 ml de agua, seguido de ebullición durante 15 minutos. Después del enfriamiento, la absorbancia se determinó espectrofotométricamente a 535 nm, usando un valor de ϵ de $1,56 \times 10^5 (\text{mol} / \text{l})^{-1}$ (Buege and Aust 1978).

6.10 Técnicas Inmunoquímicas

6.10.1 Western Blot

Homogenización: Las muestras fueron congeladas a -80°C , se colocaron en 4 volúmenes (4ml/g) de buffer de lisis RIPA que contenía (en moles/L): sacarosa 300, DTT 1, EGTA 4, ortovanadato de Na^+ (pH 7.4) 1, Tris-HCl (pH7.4) 20, NaF 50, EDTA 2, pirofosfato 5, adicionado con cocktail de inhibidores de proteasas (Complete Mini Roche) 1 pastilla/15 ml de buffer y pepstatin $1 \mu\text{g/ml}$. Se realizaron 3 pasos de homogeneización en baño de hielo utilizando la velocidad 6 del homogeneizador de tejidos Polytron (Brikmann modelo PCU11), de 10 segundos cada uno, separados por 30 segundos. Luego de la homogeneización, las muestras se mantuvieron en baño de hielo durante 30 minutos para completar la acción del buffer de lisis. A continuación, se realizó una centrifugación a baja 12000rpm a 4°C durante 15 minutos (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge), para separar los restos de tejido no homogeneizado. El pellet fue descartado y el sobrenadante se sonicó 5 segundos y se conservó como homogenato a -80°C .

Se midió la concentración de proteínas mediante el método de Bradford en lector de microplaca. Las muestras se descongelaron en baño de hielo. Se tomó el volumen adecuado según la proteína a analizar y se procedió a la desnaturalización y preparación para electroforesis utilizando buffer de muestra: SB 5X (que contiene: Tris 1.5 ml pH 6.8, glicerol 100%, β -mercaptoetanol, SDS, azul de bromofenol).

Para la separación electroforética de las proteínas se utilizaron geles poliacrilamida al 8 %. Se sembró un volumen apropiado de las muestras en las respectivas calles del gel. La corrida electroforética se realizó a 65 mV durante 30 minutos para apilar las proteínas en el frente de corrida y luego a 100 mV, suministrados por una fuente de poder PS 251-2 (Sigma-Aldrich). La corrida se prolongó durante el tiempo necesario para que el frente de solvente alcanzara el extremo del gel (aprox. 90 minutos).

Las proteínas separadas por su peso molecular fueron transferidas a membranas de PVDF (Millipore) por técnica de transferencia en húmedo. Las membranas se activaron sumergiéndolas durante 30 segundos en metanol, luego se las enjuagó con agua bidestilada y se las dejó equilibrar en el buffer de transferencia varios minutos, al igual que los papeles de filtro y las esponjas utilizadas en el sándwich. La transferencia se llevó a cabo con la cuba en baño de hielo, utilizando el voltaje y el tiempo apropiados en cada caso. Una vez finalizada, se retiraron las membranas y se corroboró la presencia de proteínas en la misma mediante tinción reversible con rojo Ponceau (0.1% Ponceau en 0.5% de ácido acético) y posteriormente se enjuagó con T-TBS (Tris base 0.05 mol/L, NaCl 0.15 mol/L, Tween 20 0.1%).

Las membranas se bloquearon durante 60 minutos en agitador orbital (Decalab) a temperatura ambiente con solución en T-TBS de leche en polvo descremada o de BSA al 5%. Luego de un breve enjuague con T-TBS de la solución de bloqueo, se incubaron las membranas con la dilución correspondiente de anticuerpo primario contra la proteína de interés. Este procedimiento se realizó *overnight*, a 4°C. Se utilizaron anticuerpos anti-fosfo ERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology), y anti-fosfo p38 α/β (Santa Cruz Biotechnology), anti ERK2 (Santa Cruz Biotechnology), anti p38 (Santa Cruz Biotechnology), anti NHE1, anti calcineurina A β , anti caspasa 3 (Santa Cruz Biotechnology), anti gp91, anti SOD Cu-Zn (Abcam), anti SOD Mn (Santa Cruz Biotechnology). Se utilizó anti gapdh como normalizador.

Posteriormente las membranas se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente y con agitación, con 10mL de la dilución apropiada del anticuerpo secundario correspondiente. Como anticuerpo secundario se usó IgG peroxidasa conjugada anti-ratón o anti-conejo según correspondiera (Santa Cruz Biotechnology), que está acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) y diseñado así para reconocer la fracción específica de la especie en la que se obtuvo el anticuerpo primario, haciendo de nexo entre la proteína de interés y el sistema posterior de detección.

Para el revelado se utilizó el sistema de detección ECL Plus (Amersham) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La reacción se basa en la generación de éster de acridinio a partir de un sustrato, agua oxigenada y la HRP, en las condiciones alcalinas del medio esta sustancia se oxida generando un producto excitado que emite señal quimioluminiscente que puede ser detectada y cuantificada. La detección se realizó mediante la cámara CCD de un equipo Chemidoc XRS (Bio-Rad), que captura y digitaliza las imágenes. Se cuantificó la intensidad de las bandas por densitometría utilizando el programa ScionImage.

6.10.2 Inmunoprecipitación

Se homogeneizaron en IP-Buffer tiritas de ventrículo izquierdo de ambos grupos experimentales. Se incubó con proteína A/G sefarosa y se centrifugó a 9000rpm para hacer un *clearance*. El sobrenadante fue incubado con anticuerpo monoclonal de conejo anti-NHE1 a 4°C durante 3 horas y a continuación nuevamente con la proteína A/G sefarosa a 4°C hasta el día siguiente. Las perlas enriquecidas en NHE1 se lavaron repetidas veces, se resuspendieron en buffer de carga para SDS-PAGE y se calentaron antes de la realización del Western Blot. Se estimó fosforilación del residuo Serina 703 (Ser703) del NHE1 empleando un anticuerpo anti-motivo de unión para la proteína 14-3-3 (anti 14-3-3BM) (Snabaitis, D'Mello et al. 2006). Además se estimó interacción entre NHE1 y la fosfatasa PP2A utilizando un anticuerpo anti PP2A (Santa Cruz Biotechnology).

7. Estadística

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar. El análisis estadístico entre los distintos grupos experimentales se realizó mediante la prueba t de Student, ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls como post-hoc o ANOVA de dos vías según correspondiera. Se usó el programa Primer of Biostatistics (McGraw Hill) para realizar estas pruebas estadísticas. Se estableció como límite de significación un valor de $p < 0,05$.

Sección III:

RESULTADOS

8. Efecto agudo de Sildenafil sobre la actividad de NHE1 en miocitos aislados de ratas Wistar y SHR

El efecto agudo de SIL sobre la actividad de NHE1 se describió originalmente en el miocardio normotrófico de rata Wistar (Perez, Piaggio et al. 2007), por lo que decidimos inicialmente probar que la capacidad inhibitoria de SIL sobre el NHE1 también estaba presente en cardiomiocitos aislados del miocardio hipertrófico de ratas SHR, donde el NHE1 se encuentra hiperactivo (Perez, Alvarez et al. 1995). Para ello evaluamos la recuperación de pH_i luego de una acidosis sostenida (calculada como el J_{H^+} a un mismo pH_i) generada mediante la técnica del pulso de amonio (ver **metodología 5.2**) en cardiomiocitos de ambas cepas, en presencia y ausencia de SIL. El panel A de la **Figura 6** muestra los registros originales de pH_i , y el gráfico de barras del panel B los promedios generales de J_{H^+} obtenidos en las diferentes condiciones experimentales a un pH_i común de 6.8. Como era de esperar, el efecto inhibitorio de SIL sobre la actividad del NHE1 demostrado previamente en músculos papilares de rata Wistar, también se evidenció en cardiomiocitos aislados indicando que es un efecto directo de SIL sobre la célula miocárdica.

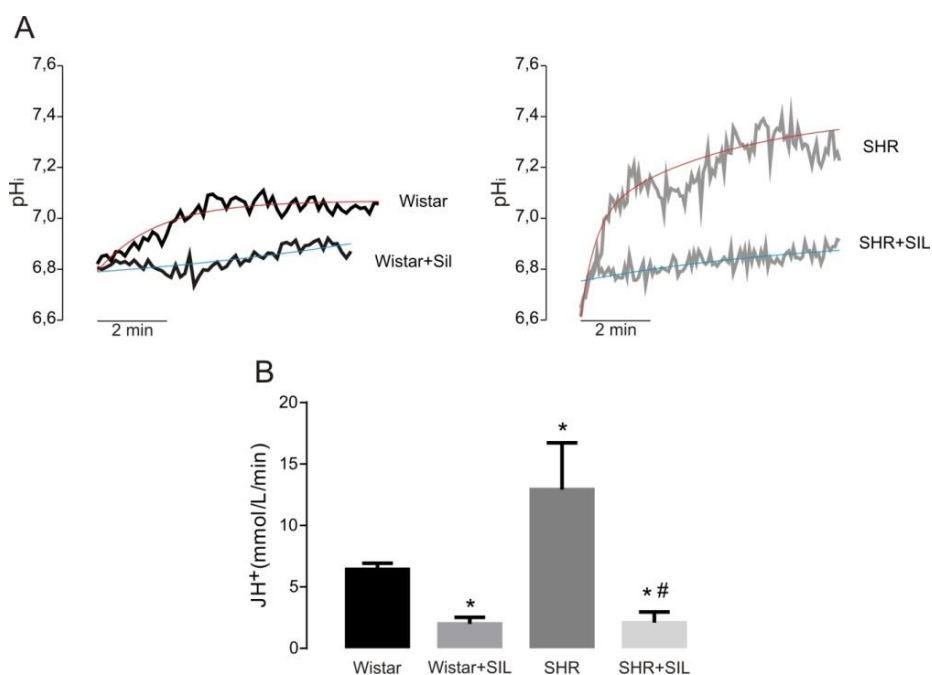


Figura 6. A) Registros representativos con su correspondiente aproximación exponencial de la recuperación de pH_i en miocitos aislados de ratas Wistar y de SHR, en presencia y ausencia de SIL. **B)** Promedios generales de eflujo de protones a un pH_i común de 6,8 en todos los grupos experimentales. * $p < 0,05$ con respecto a Wistar; # $p < 0,05$ SHR+SIL con respecto a SHR.

Los registros representativos mostrados a la derecha del panel A corresponden a experimentos realizados en cardiomiocitos aislados de rata SHR, donde no solo se confirma la acción inhibitoria de SIL sobre el NHE1 en estas células hipertróficas, sino que además se puede observar que la recuperación de la acidosis en ausencia de SIL fue significativamente mayor que la observada en cardiomiocitos de rata Wistar, confirmando hallazgos previos de nuestro grupo que demostraron la hiperactividad del NHE1 en el miocardio hipertrófico de SHR (Perez, Alvarez et al. 1995).

Resulta interesante destacar que la acción inhibitoria de SIL sobre el NHE1 deja una actividad remanente del mismo de magnitud similar en ambas cepas de ratas. En tal sentido, y tomando en cuenta hallazgos previos (Haworth, McCann et al. 2003, Perez, Piaggio et al. 2007), es factible especular con la posibilidad de que SIL esté promoviendo la desfosforilación plena del NHE1 en ambos casos, dejando como resto de actividad solamente aquella debida a la sensibilidad del sitio alostérico del intercambiador al H^+ intracelular (Wakabayashi, Bertrand et al. 1994). Es importante recordar aquí que la hiperactividad del NHE1 en SHR no sería debida a un aumento de la expresión del intercambiador (Siczkowski, Davies et al. 1994) sino que sería producto de un estado de hiperfosforilación basal del mismo como sugiere Siczkowski y col. (Siczkowski, Davies et al. 1994).

9. Hipertrofia inducida por Angiotensina II en células H9C2. Efecto del tratamiento crónico con Sildenafil

En el apartado anterior se demostró la capacidad inhibitoria de SIL sobre el NHE1 en cardiomiocitos hipertróficos de SHR. El objetivo principal de los apartados siguientes será demostrar que esta nueva propiedad de SIL le confiere capacidad anti-hipertrofiante. En ésta etapa nos enfocamos en la evaluación de los efectos crónicos de SIL sobre células cardíacas sometidas a un estímulo pro-hipertrofiante. A tal fin utilizamos un cultivo celular derivado de células mioblasticas H9C2, las cuales fueron sometidas a estimulación con Ang II, como agente pro-hipertrofiante (Watkins, Borthwick et al. 2011) y a tratamientos con diferentes dosis de SIL, evaluando el incremento porcentual en el área celular (*ver metodología 4.2.2*). Cabe recordar que la hiperactividad del NHE1 se halla estrechamente vinculada al desarrollo de HC (Camilion de Hurtado, Portiansky et al. 2002), y que diversos factores de crecimiento como Ang II o endotelina no solo son ampliamente reconocidos por su capacidad pro-hipertrofiante (Sadoshima, Xu et al. 1993,

Adiarto, Heiden et al. 2012) sino además por promover la activación del NHE1 (Cingolani, Perez et al. 2005).

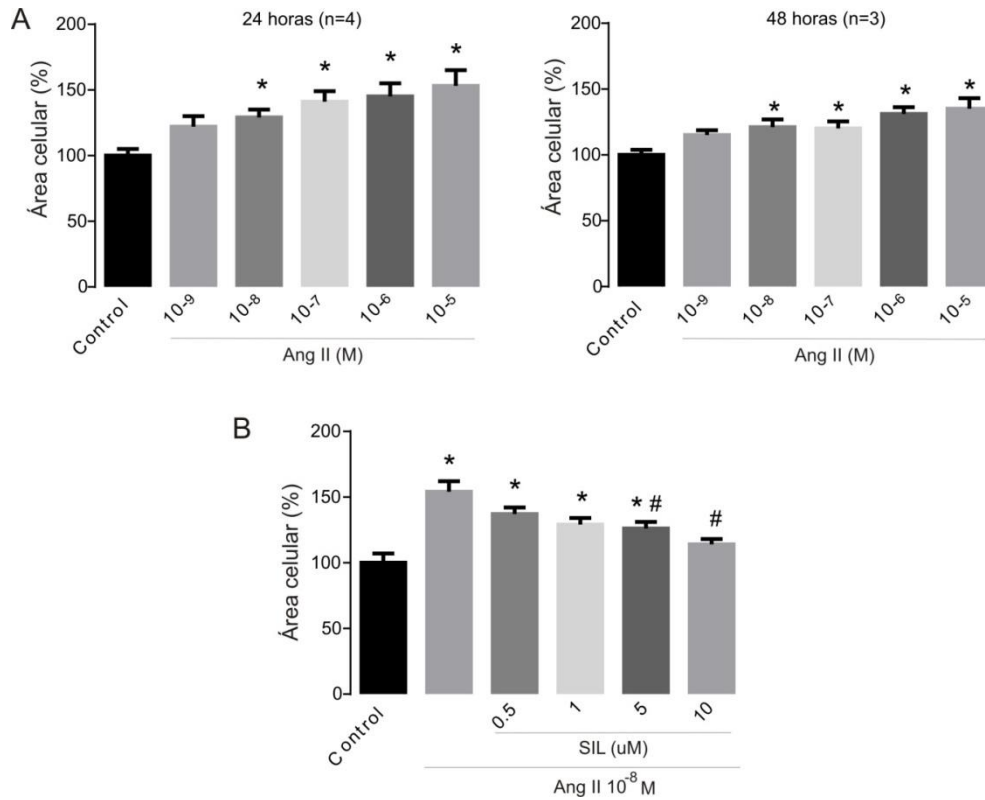


Figura 7. A) Incremento en el área celular de H9C2 con estímulos dosis-creciente de Ang II. Los tiempos de incubación fueron 24horas (Izquierda) y 48horas (Derecha). **B)** Efecto de concentraciones crecientes de SIL sobre la hipertrofia inducida por 24horas de incubación con Ang II 10⁻⁸M. * p<0,05 con respecto a control; # p<0,05 con respecto a Ang II.

Se emplearon diferentes dosis de Ang II para corroborar la magnitud de su efecto hipertrofiante en esta línea celular (Watkins, Borthwick et al. 2011). Se evaluó el incremento en el área celular luego de 24 y 48 horas de iniciado el tratamiento en las distintas condiciones experimentales. La **Figura 7 A** muestra que Ang II a dosis iguales o mayores a 10⁻⁸M fue capaz de inducir un incremento significativo y sostenido en el área de las células H9C2, que se mantuvo en el tiempo hasta las 48 horas. Seguidamente, y dado que nuestro objetivo principal era comprobar el potencial rol anti-hipertrofiante de SIL, evaluamos el efecto de este compuesto sobre el incremento en el área inducido tras 24 horas de incubación con una dosis única de Ang II de 10⁻⁸M. El área celular se determinó luego de 24 horas de incubación con diferentes dosis de SIL (es decir, 48 horas totales de incubación con Ang II). SIL provocó una reducción dosis dependiente de la

hipertrofia celular que alcanzó valores estadísticamente significativos a concentraciones de 5 y 10 μM como se observa la **Figura 7 B**. Vale destacar que a la dosis mayor de SIL ensayada (10 μM) la reversión del efecto hipertrofiante de Ang II fue total. Los resultados indican que SIL es capaz de revertir la hipertrofia generada por Ang II en células H9C2. Este efecto de SIL podría estar asociado a su capacidad inhibitoria sobre la hiperactividad del NHE1, el cual se encuentra expresado en esta línea celular (Jaballah, Mohamed et al. 2015) y cuya relación con Ang II se ha demostrado previamente (Costa-Pessoa, Figueiredo et al. 2013).

10. Efectos de la administración crónica de Sildenafil sobre la hipertrofia cardíaca patológica de ratas SHR jóvenes

Trabajos anteriores de nuestro laboratorio demostraron que la inhibición crónica de la actividad del NHE1 con cariporide (durante 3 meses) promueve un mejoramiento en la HC, la fibrosis y la distensibilidad miocárdica en ratas SHR jóvenes (Camilion de Hurtado, Portiansky et al. 2002, Cingolani, Rebolledo et al. 2003). Por otro lado, el tratamiento crónico con SIL (6 semanas) en ratas sometidas a infarto agudo de miocardio fue capaz de prevenir la generación de HC producida a consecuencia del mismo, efecto que se vio acompañado de una disminución significativa de la actividad del NHE1 (Perez, Piaggio et al. 2007). En este contexto, y para tratar de corroborar si los resultados obtenidos en cultivos celulares podían ser reproducidos en un modelo de HC *in vivo*, decidimos probar si SIL era capaz de prevenir la HC administrándolo crónicamente a ratas SHR. Como primera aproximación, utilizamos animales jóvenes de 4 meses de edad, los cuales fueron medicados con SIL 100mg/kg/día mediante el agua de bebida durante 3 meses (SHR+SIL, n=4), y comparados con sus respectivos controles que no recibieron medicación (SHR, n=4). Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, los animales fueron sacrificados y se midieron parámetros funcionales e índices de HC.

Debido al conocido efecto vasodilatador de SIL (que justifica sus indicaciones terapéuticas), evaluamos la posibilidad de que exista un efecto vascular en nuestro modelo, determinando presión arterial a lo largo del tratamiento. Como se puede ver en la **Figura 8**, las presiones arteriales de las ratas tratadas no fueron diferentes de sus controles sin tratar a lo largo de todo el tiempo de tratamiento. Para una mejor comparación en el panel B se exhiben los promedios de presiones arteriales al inicio y al final del tratamiento. Estos resultados nos permitieron descartar una posible acción

antihipertensiva de SIL que pudiera afectar la sobrecarga hemodinámica y, en consecuencia, la HC de estos animales.

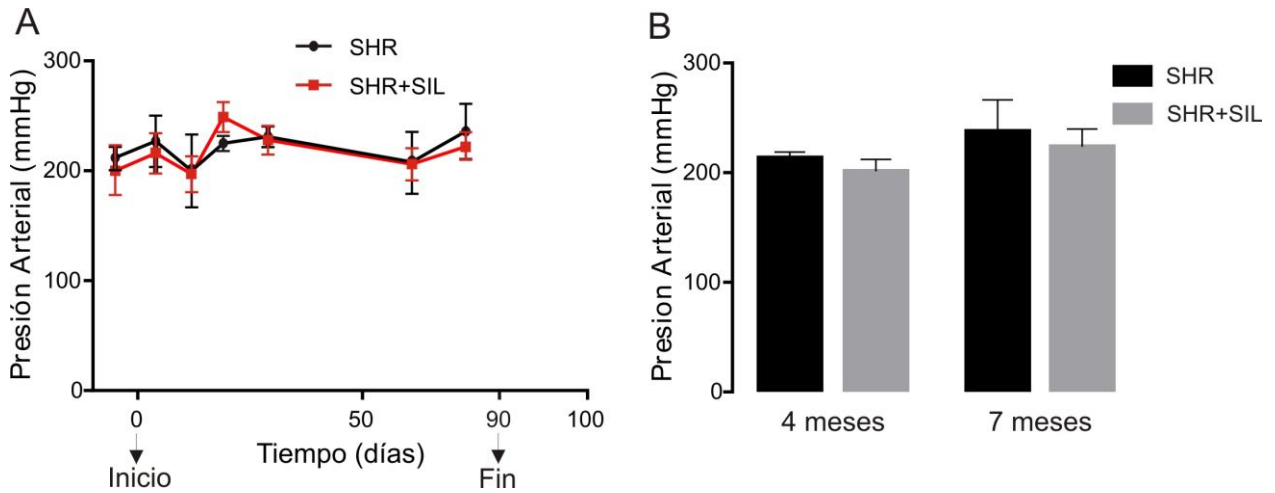


Figura 8. Presión arterial sistólica en ambos grupos experimentales. **A)** Seguimiento durante el período de tratamiento. **B)** Valores al inicio y al final del tratamiento en cada grupo.

El cociente peso ventricular izquierdo (PVI) / peso corporal (PC) se utilizó para estimar HC en ambos grupos de animales. En tal sentido, la **Figura 9** muestra que el tratamiento crónico con SIL de ratas SHR jóvenes fue capaz de reducir significativamente la HC de estos animales.



Figura 9. Promedio del parámetro hipertrófico PVI/PC (peso ventricular izquierdo sobre peso corporal) en un grupo de SHR sin tratamiento y al cabo de 3 meses de tratamiento con SIL en animales jóvenes. * $p < 0,05$ SHR+SIL con respecto a SHR sin tratamiento.

Como ya se ha dicho en un apartado anterior, la HC se caracteriza por un aumento de la fibrosis intersticial y disfunción cardíaca. Parte de esta disfunción se evidencia en que los corazones hipertróficos presentan un incremento en la presión diastólica final independientemente del volumen debido principalmente a una mayor rigidez de su pared (Gilbert and Glantz 1989). Con la idea de estimar función diastólica evaluamos rigidez miocárdica en músculos papilares aislados de ambos grupos experimentales comparando

curvas longitud-tensión. Como se puede observar en la **Figura 10**, el tratamiento con SIL disminuyó significativamente la rigidez del miocardio de SHR, lo que a su vez se correlacionó con una disminución del colágeno intersticial total, componente clave para la determinación de dicha rigidez.

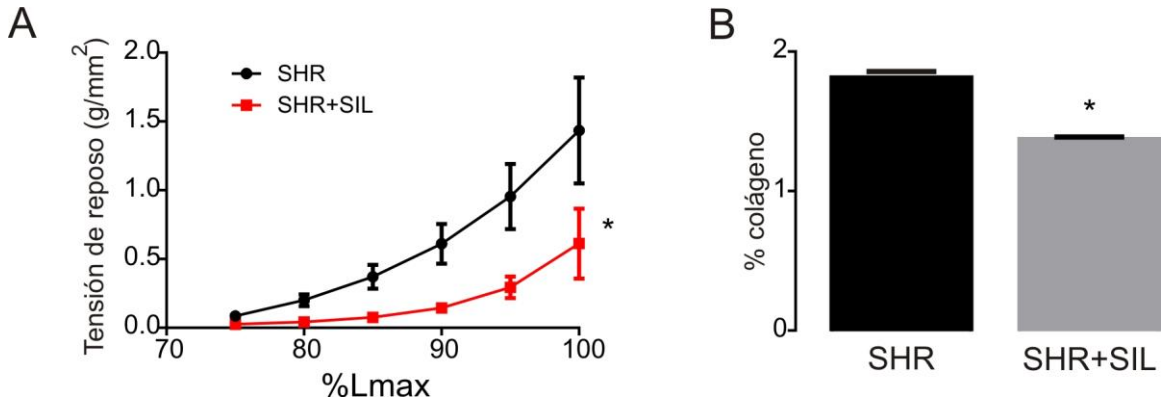


Figura 10. A) Evaluación de la rigidez miocárdica mediante curvas longitud-tensión en músculos papilares aislados de ventrículo izquierdo. **B)** Porcentaje de colágeno total (tipos I y III) que permite evaluar fibrosis intersticial. * $p < 0,05$ SHR+SIL con respecto a SHR sin tratamiento.

Como ya se mencionó, la inhibición del NHE1 es clave tanto para la reversión de la hipertrofia post-infarto de miocardio (Perez, Piaggio et al. 2007) como para la prevención del desarrollo de hipertrofia por sobrecarga de presión (Camilion de Hurtado, Portiansky et al. 2002, Cingolani, Rebolledo et al. 2003). Por esta razón, decidimos evaluar la actividad del NHE1 en músculos papilares aislados del ventrículo izquierdo de ratas SHR controles y tratadas con SIL. La actividad del intercambiador fue estimada mediante la recuperación de pH_i luego de una acidosis sostenida.

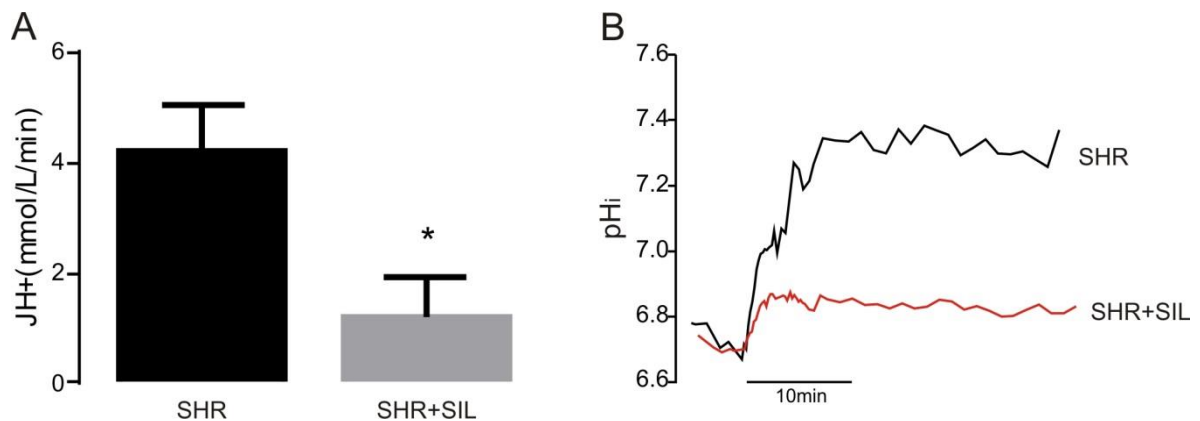


Figura 11. A) Promedios generales de la actividad de NHE1 estimada mediante el flujo de protones durante la recuperación de la acidosis a un pH_i común de $\sim 6,8$. * $p < 0,05$ SHR+SIL con respecto a SHR sin tratamiento. **B)** Registros típicos de medición de pH_i durante la totalidad de la recuperación de la acidosis luego del pulso de amonio en una rata SHR control y una tratada con SIL.

Los resultados presentados en la **Figura 11** muestran que el tratamiento crónico con SIL promovió una disminución significativa de la actividad del NHE1, de manera similar a lo observado en cardiomiocitos aislados en los que SIL fue aplicado agudamente. Estos resultados sustentan firmemente la posibilidad de que la inhibición crónica del intercambiador haya sido responsable del efecto anti-hipertrofiante de SIL sobre el miocardio de ratas SHR (**Figura 9**).

11. Efecto de Sildenafil sobre miocardio hipertrófico de ratas adultas.

Sobre la base de las mejoras observadas en ratas SHR jóvenes, nos preguntamos si el tratamiento crónico con SIL también sería capaz de revertir la hipertrofia en ratas con un mayor grado de avance de la patología. Con este propósito, se repitió el tratamiento con SIL (durante 3 meses, 100mg/kg/día) en animales de 8 meses y se los comparó con sus respectivos controles no tratados.

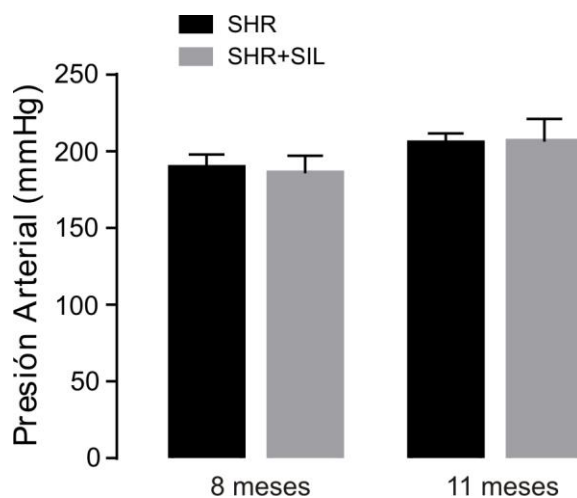


Figura 12. Promedios de presión arterial medida al inicio y al final del período de tratamiento en ambos grupos experimentales.

Similarmente a lo mostrado en ratas jóvenes, SIL no tuvo efecto vasodilatador (**Figura 12**) y provocó una disminución significativa de la relación PVI/PC como se aprecia en la **Figura 13 A**, indicando que el tratamiento anti-hipertrofiante también es efectivo en animales con mayor edad, y por ende con un desarrollo más avanzado de la patología.

La disminución del cociente PVI/PC observada en el grupo tratado con SIL tuvo su correlato en una disminución significativa del área de sección transversal de los cardiomiocitos, como se puede observar en la **Figura 13 B**.

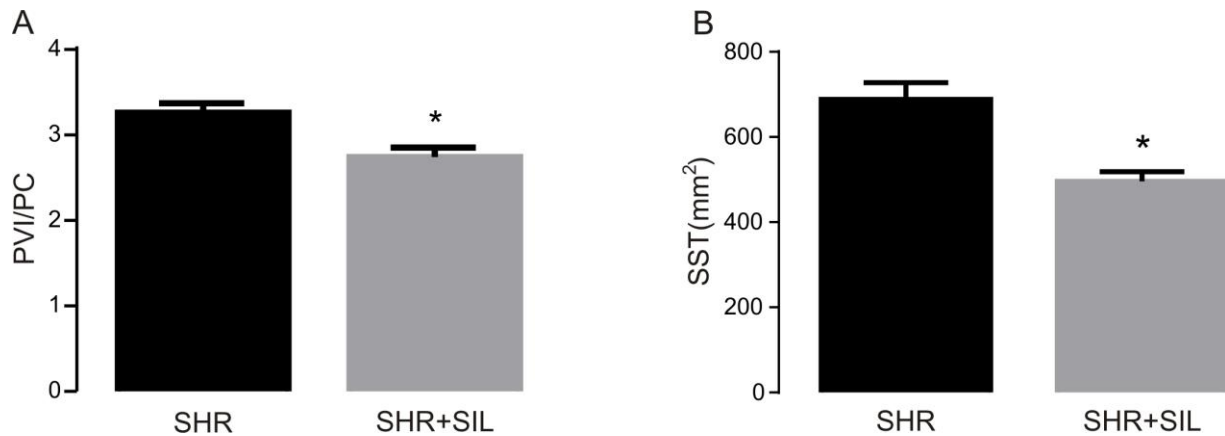


Figura 13. A) Relación PVI/PC en ambos grupos luego de 3 meses de tratamiento con SIL en ratas de 8 meses de edad. **B)** Promedios del área de sección de cardiomiocitos ventriculares. * $p < 0,05$ SHR+SIL con respecto a SHR sin tratamiento

En cuanto a la función miocárdica, observamos una disminución significativa de la rigidez de la pared en el grupo tratado con SIL (**Figura 14 A**), que al igual que en las ratas jóvenes se correlacionó con una disminución en los niveles de colágeno intersticial (**Figura 14 B**), indicando una significativa mejoría en la función diastólica en estos animales.

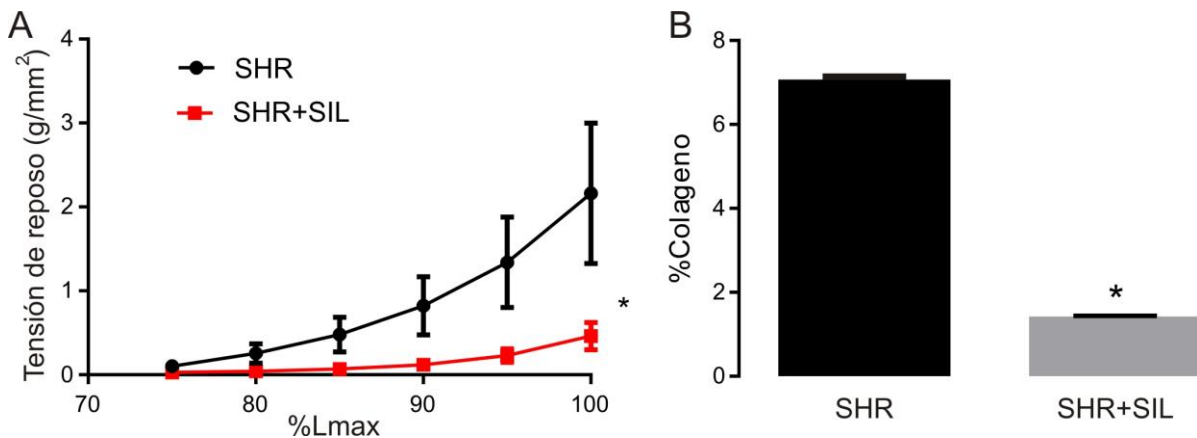


Figura 14. A) Evaluación de la rigidez miocárdica mediante curvas longitud-tensión en músculos papilares aislados de ventrículo izquierdo. **B)** Porcentaje de colágeno total (intersticial). * $p < 0,05$ SHR+SIL con respecto a SHR sin tratamiento.

Finalmente, no encontramos diferencias significativas en la fosforilación de las quinasas involucradas en vías relacionadas a la hipertrofia. Por esta razón decidimos evaluar posibles cambios prematuros a tiempos más cortos de tratamiento con SIL.

12. Posible mecanismo de acción de Sildenafil: Blancos intracelulares

Una vez que verificamos la disminución significativa de la HC por SIL en ratas de 8 meses de edad nos propusimos identificar el posible mecanismo por el cual SIL generó los efectos beneficiosos. Para ello tratamos ratas de 8 meses de edad durante un período de tiempo más corto (1 mes), con la idea de detectar posibles cambios precoces en las rutas de señalización que pudieran haberse enmascarado en etapas más tardías de tratamiento.

Al igual que en los grupos anteriores el tratamiento con SIL no modificó significativamente los valores de presión arterial (**Figura 15**). Dado que en ratas SHR se ha demostrado una exacerbada producción de Ang II (Fukuda, Hu et al. 2002), que sería responsable de una mayor activación de la vía autócrino-parácrina que lleva a un aumento en la fosforilación y actividad del NHE1 en cardiomiocitos (Cingolani, Perez et al. 2013), nos propusimos inicialmente evaluar la actividad del NHE1 en músculos papilares aislados de ambos grupos experimentales, pero en esta oportunidad utilizando un modelo de acidosis transitoria. La idea acá era poder evaluar la actividad basal del intercambiador en cada grupo experimental evitando que el desafío acidótico altere *per se* los niveles de fosforilación del intercambiador como lo hace la acidosis sostenida (Haworth, McCann et al. 2003). Así, si el NHE1 se encontrase hiperfosforilado basalmente en SHR y el tratamiento con SIL afectara su fosforilación y consecuentemente su actividad, podríamos ponerlo fácilmente de manifiesto mediante esta simple maniobra experimental.

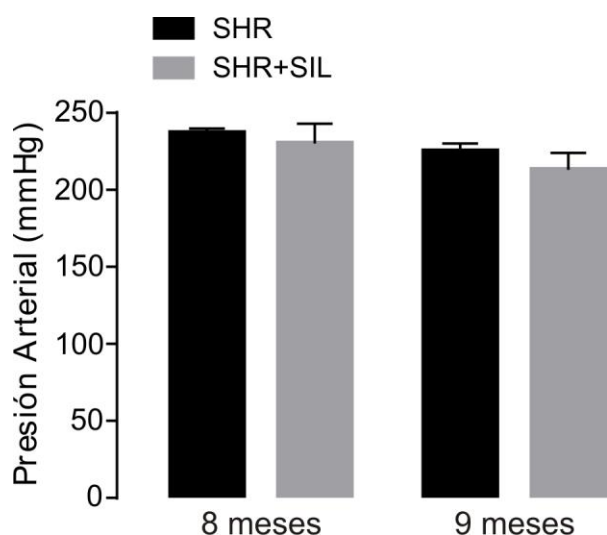


Figura 15. Promedios de presión arterial medida al inicio y al final del período de tratamiento en ambos grupos experimentales.

Como se puede ver en la **Figura 16**, la actividad del NHE1 tras acidosis transitoria también fue reducida por el tratamiento crónico con SIL, reforzando la idea de que la

inhibición del intercambiador por SIL subyace a los efectos anti-hipertrofiantes del compuesto.

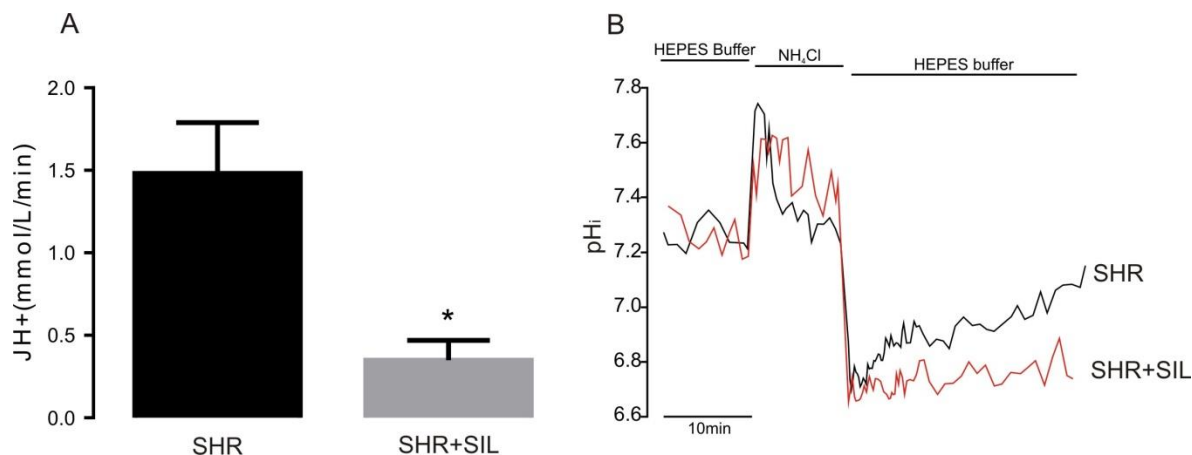


Figura 16. A) Actividad de NHE1 estimada mediante el flujo de protones a un pH común de ~ 6,8. * $p < 0,05$ SRH+SIL con respecto a SHR sin tratamiento. **B)** Registro típico de medición de pH; durante un pulso de amonio completo en un papilar de cada grupo experimental.

La menor actividad del NHE1 luego del tratamiento con SIL podría deberse a una disminución de su fosforilación, como hemos descrito en Wistar (Diaz, Nolly et al. 2010) y creemos que efectivamente está ocurriendo aquí; a una menor expresión proteica, como sucede en las ratas infartadas tratadas con este fármaco (Perez, Piaggio et al. 2007); o eventualmente a una combinatoria de ambas situaciones. Como se ve en la **Figura 17 A**, el tratamiento crónico con SIL no generó variaciones en la expresión total del intercambiador. Interesantemente, la fosforilación en el sitio Ser703 de la cola citosólica del NHE1, evaluada por expresión del motivo de unión a la proteína adaptadora 14-3-3 en muestras inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-NHE1 (ver **Metodología 6.10.2**), disminuyó significativamente (**Figura 17 B**), lo cual nos permite sugerir que el efecto de SIL sería únicamente sobre la actividad intrínseca del NHE1 sin alterar su expresión. Como se dijo previamente, resultados anteriores de nuestro grupo de trabajo muestran que en agudo, SIL induce la activación de la fosfatasa PP2A (Diaz, Nolly et al. 2010) y que dicha activación estaría mediada por la quinasa p38 llevando a la desfosforilación del NHE1 (Diaz, Escudero et al. 2019). Para identificar si esta ruta pudiera explicar los resultados observados en este modelo de tratamiento crónico con SIL, evaluamos la fosforilación de p38 como estimación de su activación.

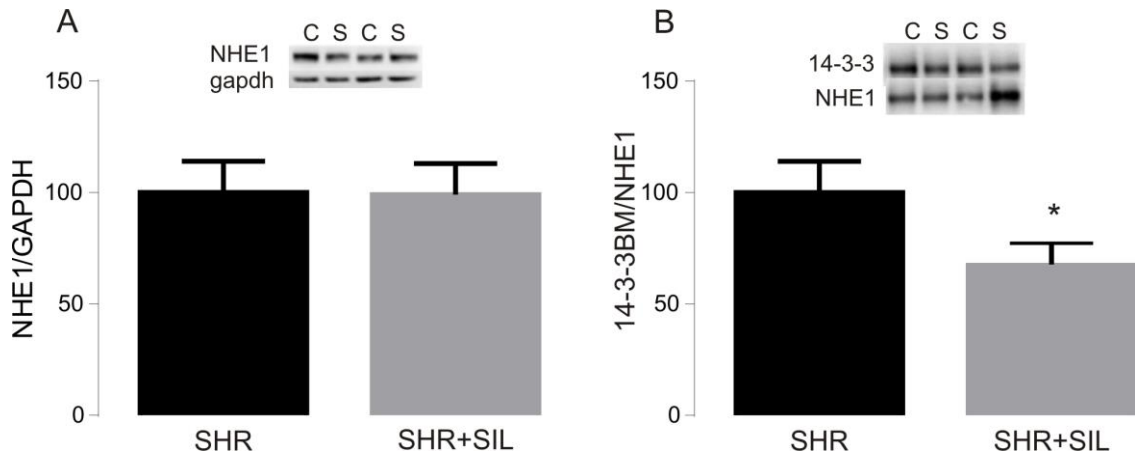


Figura 17. A) Expresión del NHE1 referida a una proteína de expresión invariante en ambas cepas como es GAPDH. **B)** Fosforilación en el sitio Ser703 de NHE1, evaluada a través de la expresión del motivo de unión para la proteína 14-3-3. Sobre los gráficos de barras se observan western blots representativos, C: SHR, S: SHR+SIL. * $p < 0,05$ SHR+SIL con respecto a SHR sin tratamiento

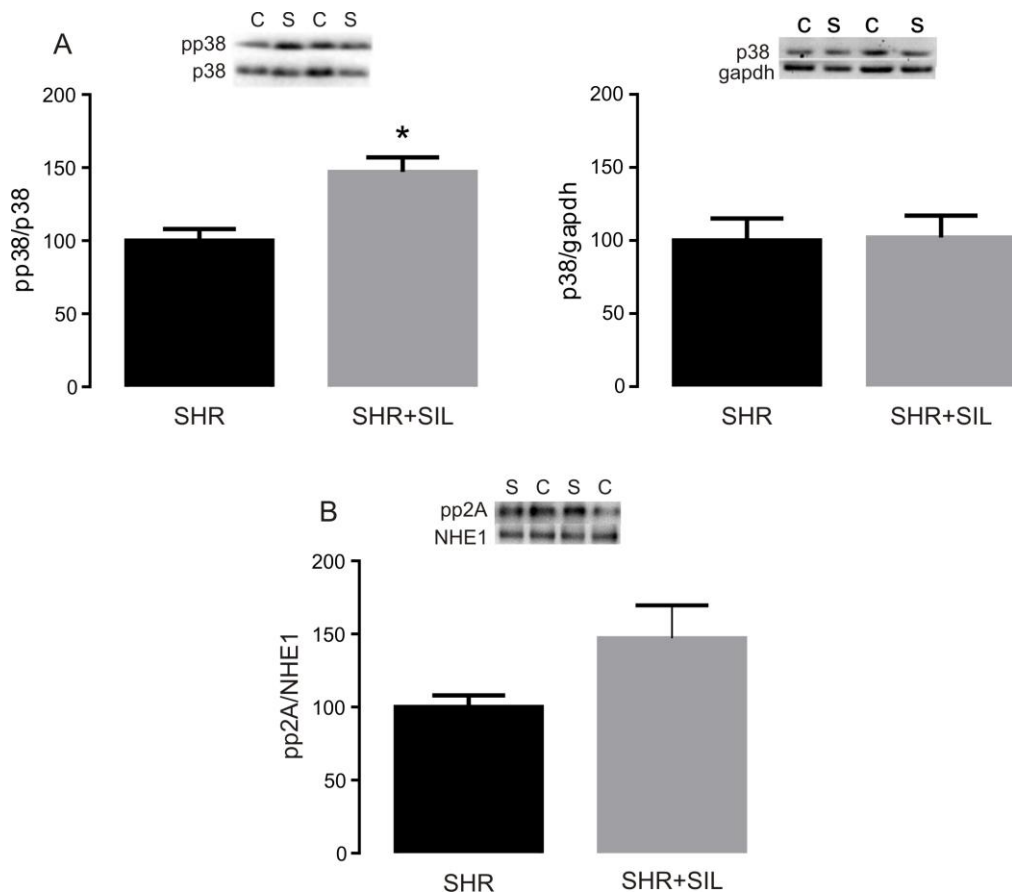


Figura 18. A) Promedio de la fosforilación de p38 (izquierda) y promedio de la expresión de p38 (derecha) estimadas mediante western blot. **B)** Promedio de la interacción de PP2A con NHE1 estimada mediante inmunoprecipitación. Sobre los gráficos de barras se observan western blots representativos, C: SHR, S: SHR+SIL * $p < 0,05$ SHR+SIL con respecto a SHR sin tratamiento

La **Figura 18** muestra un aumento significativo en la fosforilación/activación de p38 sin cambios en la expresión de esta quinasa. Como se dijo antes, postulamos que p38 activaría a PP2A, y ésta desfosforilaría al NHE1 en el sitio Ser703 disminuyendo su actividad con el consecuente efecto anti-hipertrofiante. Con la idea de sumar evidencia en favor de la hipótesis decidimos evaluar (mediante inmunoprecipitación) la posible existencia de una interacción entre la enzima PP2A y su sustrato el NHE1 (Snabaitis, D'Mello et al. 2006), y de ser así, si esa interacción se modificaba por el tratamiento con SIL. El ensayo permitió corroborar la existencia de una interacción entre PP2A y NHE1 que se vio incrementada con el tratamiento con SIL a pesar de no alcanzar un nivel estadísticamente significativo ($p=0,059$).

12.1 Efecto de Sildenafil sobre el estrés oxidativo miocárdico

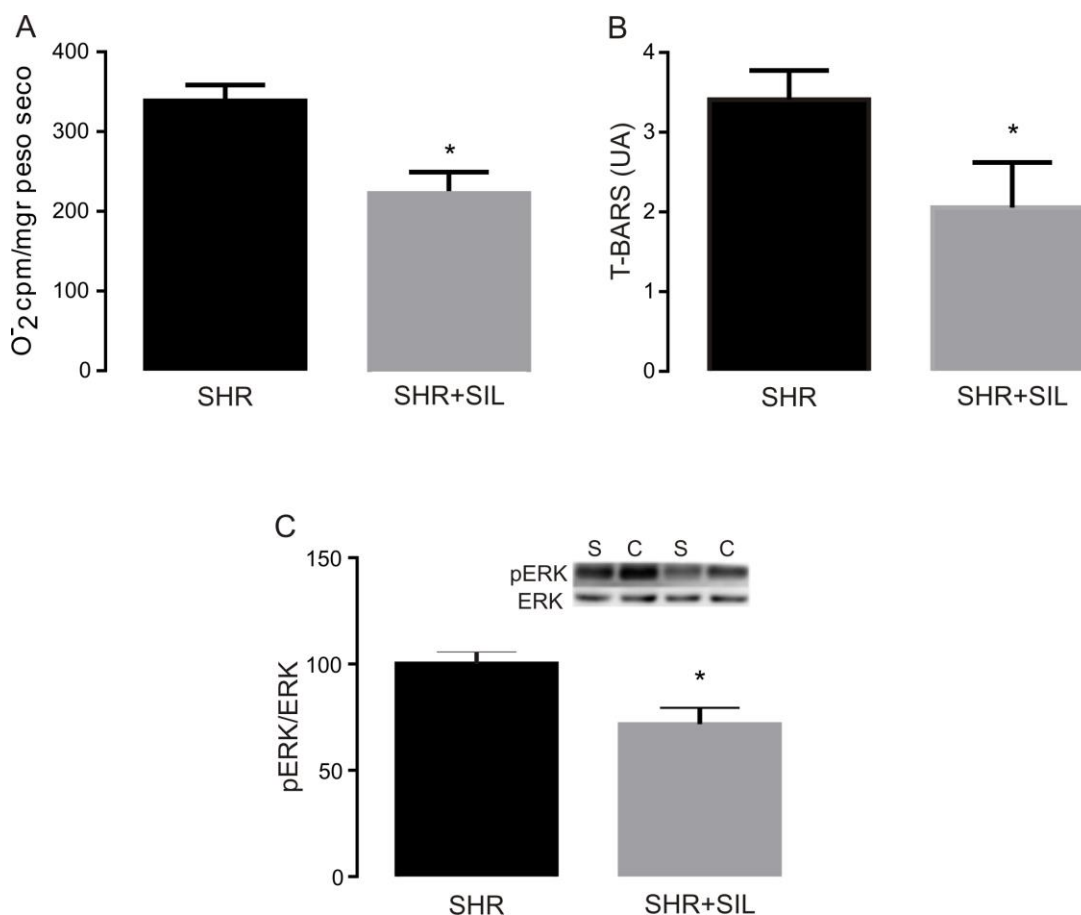


Figura 19. Indicadores de estrés Oxidativo. **A)** Producción basal de anión superóxido estimado por método de lucigenina. **B)** Estimación de peroxidación lipídica mediante la técnica de T-BARS. **C)** Fosforilación de la quinasa redox-sensible ERK1/2 (sobre el gráfico de barras se observa un western blot representativo, C: SHR, S: SHR+SIL). * $p<0,05$ con respecto a SHR sin tratamiento.

Como las ratas SHR presentan un mayor estrés oxidativo (Kunes, Hojna et al. 2004), estimamos la concentración de EROs basales mediante la técnica de lucigenina (*ver metodología 6.8*) con la idea de detectar posibles cambios generados por el tratamiento crónico con SIL. Los resultados presentados en el panel A de la **Figura 19** muestran que el tratamiento con SIL generó una disminución significativa de las EROs. En concordancia, el análisis de T-BARS permitió comprobar una disminución del daño oxidativo a nivel lipídico generado como consecuencia de las elevadas concentraciones intracelulares de EROs (**Figura 19 B**). Consistentemente, se detectó una disminución en la activación de la proteína redox sensible ERK1/2 (**Figura 19 C**), quinasa corriente arriba en la regulación por fosforilación del NHE1.

Seguidamente nos preguntamos cuáles podrían ser las causas del efecto antioxidante de SIL. En tal sentido, se ha sugerido que SIL podría participar en la regulación de varios de los numerosos sistemas que participan en la homeostasis de las EROs. Un estudio en humanos ha demostrado un aumento de las enzimas antioxidantes en sangre como SOD y catalasa (Perk, Armagan et al. 2008) a consecuencia del tratamiento con SIL, mientras que en las arterias del cuerpo cavernoso de conejo se ha visto que SIL ejerce un efecto inhibitorio sobre NADPH oxidasa (Jeremy, Ballard et al. 1997, Koupparis, Jeremy et al. 2005). Con la idea de dilucidar posibles blancos cardíacos de SIL que pudieran promover la disminución de EROs observada en la **Figura 19**, evaluamos expresión de gp91, subunidad glicosilada de NADPH oxidasa citosólica. Esta enzima, cuyas subunidades se acoplan para permitir su funcionamiento y se degradan cuando no está activa (Groemping and Rittinger 2005) produce pequeñas cantidades de EROs que luego son amplificadas en mitocondria (Zorov, Filburn et al. 2000). Como se puede apreciar en la **Figura 20**, no observamos cambios significativos en la expresión de esta subunidad entre ambos grupos de ratas, lo que nos permite desestimar a NADPH como blanco de las acciones de SIL en el miocardio de SHR.

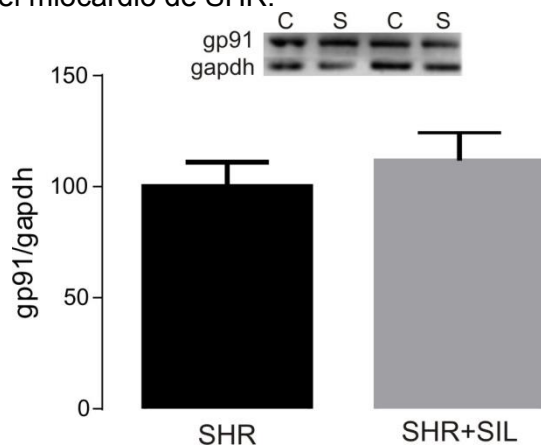


Figura 20. Western blot representativo (C: SHR, S: SHR+SIL) y promedio general de la expresión de la subunidad glicosilada de NADPH oxidasa gp91 en ambos grupos experimentales.

Como se dijo antes, otros potenciales blancos de la acción de SIL que justifiquen la disminución en EROs podrían ser los sistemas antioxidantes. Se ha demostrado en neuronas de ratón sometidas a estímulos estresores que SIL aumentaría la expresión de mensajeros de enzimas antioxidantes como por ejemplo SOD (Sikandaner, Park et al. 2017). Por esta razón evaluamos la expresión de dos isoformas de SOD, SOD1 (SOD Cu-Zn) y SOD2 (SOD-Mn) en ambos grupos de ratas. Sin embargo, como se puede observar en la **Figura 21**, no se detectaron cambios apreciables en la expresión de estas enzimas, permitiéndonos descartar también un posible efecto de SIL sobre este sistema antioxidante enzimático.

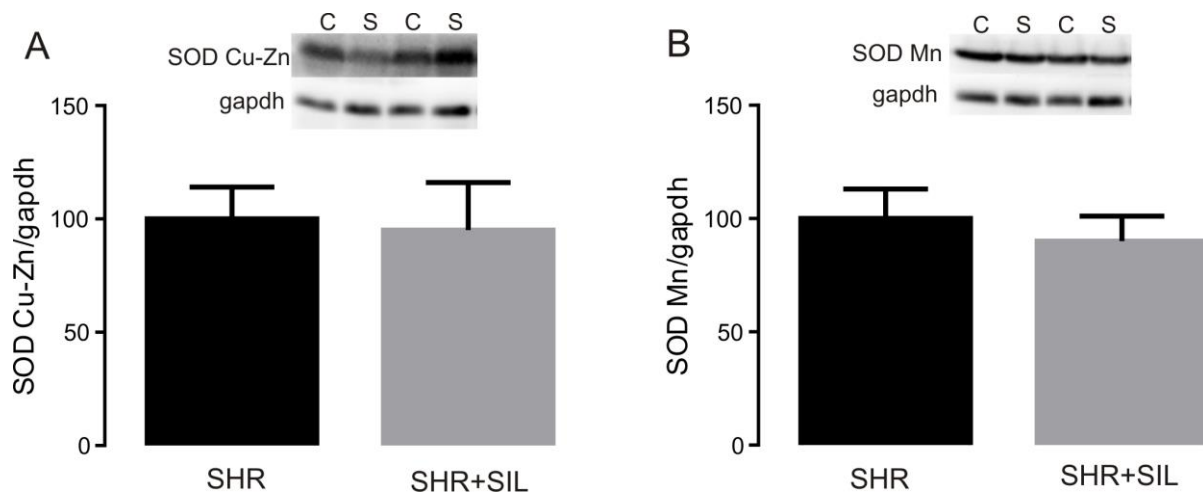


Figura 21. Evaluación de expresión de las enzimas antioxidantes. **A)** Promedio de la expresión de SOD Cu-Zn (SOD1). **B)** Expresión de SOD Mn (SOD2). Sobre los gráficos de barras se observan western blots representativos, C: SHR, S: SHR+SIL.

Estudios anteriores de nuestro laboratorio mostraron que la disminución de la actividad de NHE1 mitocondrial determina una menor generación de EROs (Garciaarena, Caldiz et al. 2008, Garciaarena, Fantinelli et al. 2011). Dado que no hemos detectado cambios en las proteínas relacionadas a la generación citosólica de EROs como NADPH oxidasa, o a la degradación de las mismas, se podría especular con una inhibición del NHE1 mitocondrial promovida por SIL como posible causa de la disminución de EROs. Lamentablemente no contamos actualmente con datos que permitan validar o refutar esta hipótesis, la cual intentaremos probar mediante experimentos futuros.

12.2 Efecto de Sildenafil sobre las vías de Calcineurina/NFAT y caspasa 3

La hiperactividad del NHE1 se ha asociado a un incremento en el calcio citosólico, principalmente por promover una sobrecarga de Na^+ que forzaría un mayor funcionamiento del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en modo inverso (Cingolani, Perez et al. 2013). Dicho incremento de calcio se ha demostrado que es suficiente para desencadenar señales deletéreas (Nakamura, Iwata et al. 2008), las cuales pueden ser consecuencia de la activación de la vía calcineurina/NFAT que lleva a un aumento de la transcripción de distintos genes pro-hipertrofiantes (Ennis, Garcarena et al. 2007). Por este motivo, sospechamos que SIL podría estar afectando esta vía. Además, se ha mostrado evidencia que SIL protege contra apoptosis y necrosis en miocitos ventriculares de ratones adultos sometidos a isquemia simulada, mediante un mecanismo que involucra la disminución de caspasa 3 (Das, Xi et al. 2005). En este contexto, decidimos evaluar ambas rutas intracelulares en nuestras condiciones experimentales, para lo cual analizamos la expresión de la isoforma inducible de calcineurina (Cn $\text{A}\beta$), cuya inducción es indicio de su actividad, y de caspasa 3, enzima perteneciente a la familia de las cisteína-proteasas.

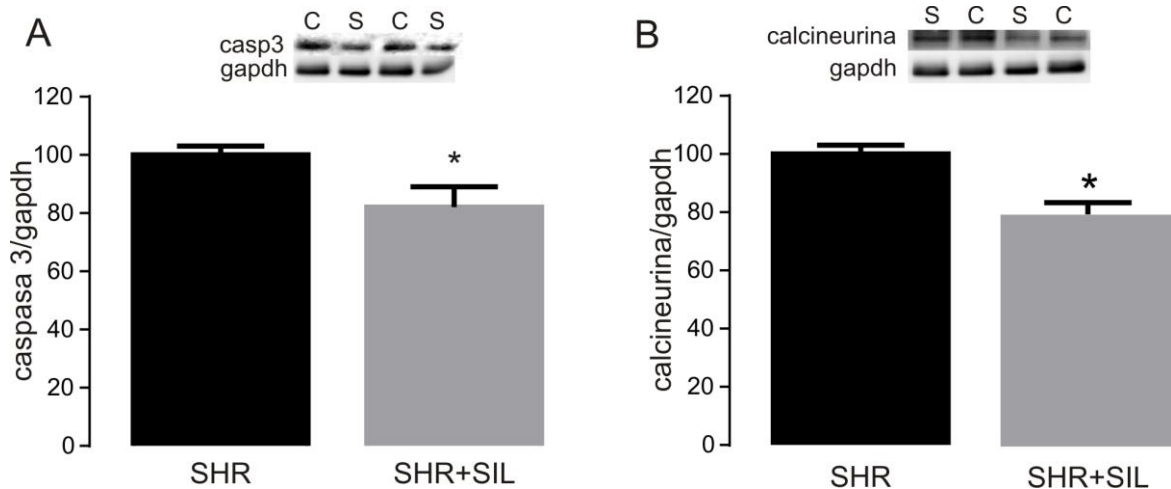


Figura 22. Evaluación de la expresión de enzimas involucradas en vías deletéreas. **A)** Expresión de caspasa 3. **B)** Expresión de calcineurina. Sobre los gráficos de barras se observan western blots representativos, C: SHR, S: SHR+SIL. * $p < 0,05$ SHR+SIL con respecto a SHR sin tratamiento.

Como muestra la **Figura 22**, ambas proteínas se encuentran disminuidas significativamente en las ratas tratadas con SIL. Esto sugiere que en ratas SHR adultas la acción de SIL implicaría una posible inhibición de las rutas que conducen tanto a la hipertrofia como a la apoptosis de las células miocárdicas.

12.3 Efecto de Sildenafil sobre hipertrofia cardíaca y función diastólica

Una vez más evaluamos la relación PVI/PC como índice de HC y la distensibilidad del músculo papilar como medida funcional. A pesar de las diversas rutas afectadas por el tratamiento de un mes con SIL en ratas de 8 meses de edad (**Figuras 18 a 22**), solo se pudo observar una leve tendencia (no significativa) a disminuir el desarrollo de HC en el grupo tratado sin cambios detectables en la rigidez parietal (**Figura 23**).

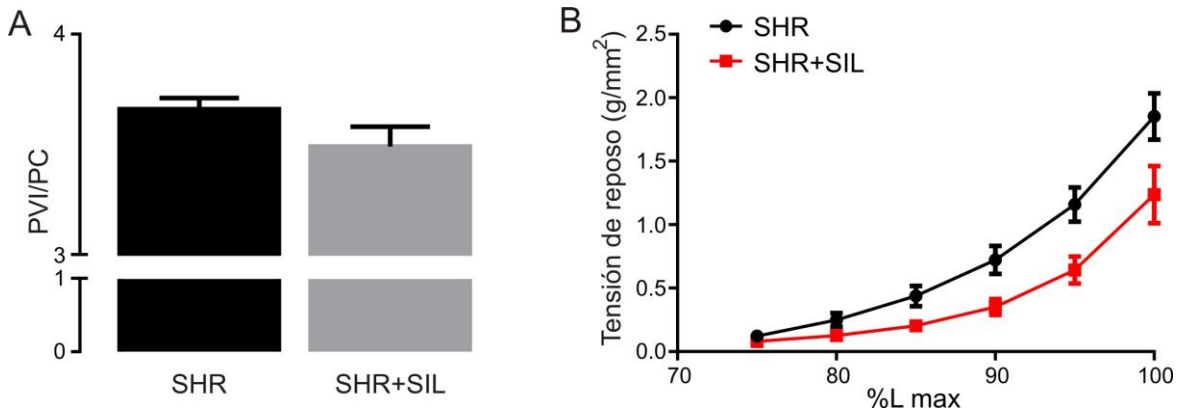


Figura 23. Hipertrofia y rigidez miocárdica. **A)** Promedio de PVI/PC. **B)** Rigidez miocárdica evaluada mediante curvas longitud-tensión en músculos papilares de ventrículo izquierdo.

En resumen, la administración de SIL durante un mes indujo la disminución de la fosforilación en Ser703 y de la actividad del NHE1, por una vía que involucra a la quinasa p38 y la fosfatasa PP2A. El tratamiento también provocó una reducción significativa del estrés oxidativo y de las quinasas redox-sensibles corriente arriba del NHE1. Además, y aunque no se pudieron detectar evidencias morfológicas y funcionales concretas (**Figura 23**) probablemente por el escaso tiempo de tratamiento, también fue capaz de reducir la activación de calcineurina y por ende la vía pro-hipertrofica cascada abajo (calcineurina/NFAT), como así también la activación de caspasa 3 y su consecuente ruta pro-apoptótica.

En conjunto, y más allá de los puntos que aún no hemos logrado dilucidar con precisión, los resultados obtenidos permiten sugerir que el tratamiento crónico con SIL es capaz de interferir con el desarrollo de HC en SHR, mediante un mecanismo que podría asignarse a una disminución del estrés oxidativo y de la actividad del NHE1.

Sección IV:

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis demuestran que el tratamiento crónico con SIL, conocido inhibidor de FDE5A ampliamente usado en clínica médica, determina cambios beneficiosos en el miocardio hipertrófico (patológico) de ratas SHR. En tal sentido, 3 meses de tratamiento con SIL provocaron una disminución de la hipertrofia ventricular izquierda (menor índice PVI/PC que tuvo su correlato en una disminución de la superficie de sección de los cardiomiocitos), y de la fibrosis intersticial, lo cual se tradujo en una menor rigidez de la pared ventricular. Estos hallazgos nos permiten concluir que el tratamiento crónico con SIL es efectivo para mejorar tanto la morfología como la función miocárdica, posicionando a este compuesto como una interesante alternativa terapéutica para esta patología de alta prevalencia en sociedades occidentales. Seguidamente analizaremos algunos aspectos del presente trabajo que merecen ser considerados.

En primera instancia discutiremos los **modelos experimentales** utilizados durante el trabajo. Como vimos en la sección “Resultados”, con el fin de estudiar los efectos de SIL en un tratamiento crónico sobre un modelo *in vitro* se utilizaron células H9C2, las cuales como hemos mencionado anteriormente son una línea celular derivada de ventrículo de embrión de rata, presentando varias semejanzas morfológicas y de expresión proteica con los cardiomiocitos primarios (Hescheler, Meyer et al. 1991). Sin embargo, a diferencia de estos últimos, su uso asociado a ensayos relacionados con hipertrofia puede ser cuestionable debido a que son una línea celular proliferativa. Más allá de eso, esta línea ha sido utilizada en múltiples trabajos orientados al estudio de la HC (Shubeita, McDonough et al. 1990, Rosenkranz 2004, Watkins, Borthwick et al. 2011, Somvanshi, Qiu et al. 2013, Song, Zhang et al. 2015, Luo, Zheng et al. 2016, Mao, Wang et al. 2016). Entre ellos, Watkins y col. (Watkins, Borthwick et al. 2011) demostraron que esta línea celular responde a estímulos pro-hipertrofiantes como Ang II y ET1 de forma similar a un cultivo de cardiomiocitos primarios de neonatos. Más aún, demostraron que luego de 48 horas de incubación con dichos factores, se producían aumentos significativos en el área celular y en la expresión de genes que habitualmente se expresan en respuesta a estímulos hipertrofiantes como BNP y ANP, lo cual no sólo avala nuestra elección como modelo experimental, sino que además respalda nuestros resultados en área celular obtenidos luego de 24/48 horas con Ang II (**Figura 7**). Respecto de la elección de Ang II como agente pro-hipertrofiante en H9C2, decidimos utilizar este factor de crecimiento con la idea de simular las condiciones hipertrofiantes que presentan las ratas SHR, en las que se ha descrito un aumento de Ang II localmente en células lisas vasculares (Hu, Fukuda

et al. 2002), como también una exacerbación general del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (Lijnen and Petrov 1999).

Otro aspecto a discutir es la **edad de las ratas SHR** utilizadas en el tratamiento crónico. En el presente trabajo se seleccionaron dos grupos etéreos al inicio del tratamiento: animales jóvenes de 4 meses de edad y adultos de 8 meses. Se sabe que la hipertensión espontánea característica de este modelo comienza a manifestarse aproximadamente a los 2 meses de vida, y que para los 4 meses ya cuentan con un crecimiento hipertrófico manifiesto que alcanza su máximo nivel aproximadamente a los 6 meses de edad (Sen, Tarazi et al. 1974). Revisando la literatura es posible detectar que la mayoría de los trabajos en SHR han sido llevados a cabo en animales de entre 2 y 6 meses de edad, siendo lo más común realizar ensayos a partir de los 3 o 4 meses de edad (Cingolani, Rebolledo et al. 2003, Chiang, Badrealam et al. 2018, Melo Junior, Dalpiaz et al. 2018). Sin embargo, Bell y col (Bell, Kelso et al. 2004) sostienen que éste es un período de cambios importantes para los animales por lo que la elección de la edad puede ser responsable de la variabilidad de resultados en estudios experimentales. Entendemos que independientemente de las variaciones experimentales que pudiera suponer el uso de un modelo de hipertrofia con ratas jóvenes (**Figuras 8 a 11**), el uso de ratas de 8 meses de edad con una hipertrofia totalmente establecida valida nuestras conclusiones acerca de la disminución significativa de la HC mediante el tratamiento con SIL (**Figuras 12 a 14**).

Otro punto importante a tratar es el posible **efecto hipotensor** de SIL. Como mencionamos en “Introducción” este fármaco ha sido ampliamente usado para tratar la disfunción eréctil (Eardley, Brooks et al. 1999) y la hipertensión pulmonar (Singh 2010) debido a su acción vasodilatadora. Se ha demostrado en pacientes que si bien SIL potencia el efecto hipotensor de nitratos orgánicos como gliceril trinitrato disminuyendo significativamente la presión arterial, no tiene efecto hipotensor *per se* (Webb, Freestone et al. 1999). Más aún, resultados obtenidos por Jackson y col. (Jackson, Benjamin et al. 1999) en los primeros estudios clínicos de fase I en voluntarios sanos indicaron que SIL tiene modestas propiedades vasodilatadoras sin cambios significativos en la presión arterial. Por otro lado, se ha reportado un efecto hipotensor de SIL en pacientes con hipertensión resistente a 24 horas de la administración de una única dosis de SIL (Santa Catharina, Modolo et al. 2016) por lo que tal vez tenga un efecto hipotensor transitorio en administración aguda y no en un tratamiento crónico como ocurre en nuestro caso. En efecto, en cuanto a su uso para el tratamiento de la hipertensión pulmonar, se ha reportado que SIL tiene una disminución significativa en la presión pulmonar sin afectar la presión

arterial sistémica (Gillies, Roblin et al. 2002). En diferentes trabajos clínicos se ha observado que una dosis de SIL oral preoperatorio en pacientes con hipertensión pulmonar severa produce durante el periodo perioperatorio un importante efecto vasodilatador pulmonar sin generar cambios en la presión arterial (Shim, Choi et al. 2006, Gandhi, Shah et al. 2014)

En ratas SHR no existe pleno acuerdo acerca del posible efecto hipotensor de SIL, planteando un escenario por lo menos incierto debido a la disparidad de resultados. En tal sentido, si bien nuestros resultados (**Figuras 8, 12 y 15**) coinciden con los de Fowler y col. (Fowler, Naz et al. 2007) quienes muestran ausencia de efecto de SIL sobre la presión arterial en SHR, parecieran diferir de los de Yaguas y col. (Yaguas, Bautista et al. 2010) quienes observaron una tendencia (estadísticamente no significativa) a la disminución de la presión arterial en ratas SHR de aproximadamente 4 meses tratadas con una dosis baja (2.5 mg/kg/día) de SIL durante 6 meses. En favor de estos autores se encuentra el hecho de que usaron un método de registro de presión arterial que involucraba la introducción de un catéter en la arteria carótida, que resulta mucho más sensible que el método pletismográfico usado en nuestro trabajo (método indirecto no invasivo de la cola, ver apartado **6.2** de **Metodología**), a pesar de lo cual tampoco pudieron observar diferencias significativas.

Respecto de la **dosis de SIL utilizada** (100mg/kg/día), si bien pareciera ser muy alta, es necesario recordar que el metabolismo de SIL en ratas es diferente al de humanos. En un estudio realizado por Walker y col. (Walker, Ackland et al. 1999) en el que se compara la farmacocinética de SIL en diferentes mamíferos, se observó que las ratas macho tienen mayor metabolismo de la droga que los humanos y una excreción significativamente aumentada de SIL al cabo de 24 horas (64% vs. 19%).

Un hallazgo importante de nuestro trabajo es la reducción de la **fibrosis intersticial** en SHR, tanto en animales jóvenes como adultos. Se la evaluó mediante la variación del porcentaje de colágeno intersticial. El colágeno es sintetizado por los fibroblastos que, como dijimos en “Introducción”, constituyen el 64% del total de los tipos celulares cardíacos. También es sabido que Ang II además de actuar sobre los miocitos cardíacos generando el remodelamiento característico, actúa sobre los **miofibroblastos** generando tanto proliferación (Cheng, Cheng et al. 2003) como un incremento en la síntesis de colágeno (Rosenkranz 2004), por lo que es esperable que en las ratas SHR se encuentre aumentada la fibrosis. Nuestros resultados permitirían inferir que SIL también está actuando sobre este tipo celular. En este sentido, en fibroblastos cardíacos aislados de

ratones sometidos a TAC y tratados con SIL durante 4 semanas se observó una disminución de la actividad de los mismos, que abarca proliferación, transformación a miofibroblastos y síntesis de colágeno (Gong, Yan et al. 2014). En concordancia con nuestro hallazgo, también se observó un efecto antifibrótico en otro modelo de HC inducida por Ang II en ratones tratados durante 3 semanas con SIL oral (Patrucco, Domes et al. 2014). Además del efecto medido en fibroblastos, es necesario destacar que en diferentes grupos de investigación, empleando ratones sometidos a TAC y tratados con SIL (Gong, Yan et al. 2014, Nakamura, Zhu et al. 2018), se pudo comprobar una mejora en la función cardíaca, resultados que concuerdan con los mostrados en la presente Tesis (**Figuras 10 y 13**).

Para dilucidar el posible mecanismo subyacente a los efectos beneficiosos de SIL sobre la HC, evaluamos distintos blancos intracelulares. Basándonos en nuestros resultados previos, que sugieren que SIL inhibe al NHE1 mediante un mecanismo que involucra la activación secuencial de PKG, quinasa p38 y fosfatasa PP2A con la consecuente desfosforilación en Ser703 del intercambiador (Perez, Piaggio et al. 2007, Diaz, Nolly et al. 2010, Diaz, Escudero et al. 2019), quisimos probar si esa misma ruta era responsable de los efectos anti-hipertrofiantes de SIL en ratas SHR. Los resultados que se muestran en la **Figura 18** parecieran apoyar esta idea. Sin embargo, el rol de p38 en el miocardio ha generado controversias que merecen ser analizadas. Por un lado, es importante recordar aquí que la quinasa p38 tiene funciones duales según el tipo de tejido y la isoforma que se evalúe (Yokota and Wang 2016). En miocardio se ha observado que p38 α tiene un efecto pro-apoptótico (Wang, Huang et al. 1998) mientras que p38 β tiene una función de supervivencia mediante la inhibición de la formación de EROs (Liu, Pedram et al. 2011). Podríamos especular entonces que el aumento de pp38/p38 observado en nuestras condiciones experimentales pudiera ser responsable no solo de la activación de PP2A, sino también contribuir a disminuir las EROs como se muestra en la **Figura 19**. Es importante destacar que el vínculo p38-PP2A fue descrito por Liu y col. (Liu and Hofmann 2004) en cardiomiocitos aislados de rata adulta estimulados con H₂O₂, quienes observaron que un aumento en la actividad de p38 estimulaba la apoptosis y a su vez, mediante la activación de PP2A, promovía la inhibición de la ruta anti-apoptótica disparada por ERK. Estos resultados contrastan claramente con los nuestros que asignan un rol cardioprotector a la p38 disminuyendo la generación de EROs y la activación de ERK. Sin embargo, no debemos perder de vista que las condiciones experimentales de dichos estudios configuran un escenario sustancialmente diferente al nuestro lo que

podría justificar las discrepancias observadas. Por otro lado, Sugden y col. (Sugden and Clerk 1998) han demostrado que el estrés oxidativo es un poderoso activador de las MAP quinasas ERK, JNK y p38 en cardiomiocitos neonatales de rata. Si por acción de SIL disminuyeran las EROs, como se puede apreciar en la **Figura 19**, deberían disminuir las activaciones de ERK y de p38. Sin embargo, como mencionamos en el párrafo anterior p38 aumentó con el tratamiento (**Figura 18**) lo cual da sustento a pensar que en nuestras condiciones experimentales *in vivo* y con administración crónica de SIL se repetiría la vía PKG-p38-PP2A descrita en agudo (Diaz, Nolly et al. 2010, Diaz, Escudero et al. 2019).

Más allá de cualquier especulación, y a pesar de la mencionada dualidad funcional de p38, es innegable que esta quinasa ha sido históricamente relacionada con la generación de apoptosis y con vías de desarrollo de HC (Wang, Huang et al. 1998, Liu, Pedram et al. 2011). Una posible justificación para nuestros hallazgos que sugieren una acción cardioprotectora de p38 podría radicar en una activación diferencial de quinasas. En tal sentido, Kwon y col. (Kwon, Pimentel et al. 2003) observaron, en cardiomiocitos de rata adulta estimulados con H₂O₂, que los efectos de EROs son dependientes de su concentración, generando una activación diferencial de distintas quinasas. Mientras que a bajas concentraciones de H₂O₂ (concentraciones pro-hipertrofiantes) se activa principalmente ERK1/2 pero no p38 llevando a hipertrofia en ausencia de apoptosis, por el contrario, a altas concentraciones (concentraciones pro-apoptóticas) produce activación de ERK1/2, JNK, p38 y akt (Kwon, Pimentel et al. 2003). Por otro lado, cabe aclarar que en nuestros experimentos la fosforilación de p38 utilizada como índice de activación, involucra tanto a las isoformas α como β , que como dijimos anteriormente se relacionan con vías intracelulares muy diferentes. Si bien no contamos con elementos como para discernir cuál de las isoformas aumenta a consecuencia del tratamiento con SIL, los resultados obtenidos invitan a sugerir que se trataría de la isoforma β .

Respecto de la acción específica de SIL sobre las EROs, y como mencionamos anteriormente, la **Figura 19** muestra claramente que el tratamiento disminuye el estrés oxidativo. Entre las alternativas que nos permitirían explicar este hallazgo, debiéramos considerar la posibilidad de que SIL estuviera modulando la actividad de las distintas fuentes de EROs o bien la capacidad antioxidante del tejido cardíaco. Como se sabe, una de las fuentes de EROs es la NADPH oxidasa (Brandes, Weissmann et al. 2014). En arteria pulmonar de cerdo se ha descrito que SIL inhibe la formación de EROs mediante la inhibición de la expresión de NADPH oxidasa (Muzaffar, Shukla et al. 2005). En el

presente trabajo evaluamos la subunidad glicosilada de la NADPH oxidasa (gp91) en los corazones de ambos grupos de ratas, pero no se encontraron cambios significativos entre ambos (**Figura 20**), lo que excluye a esta enzima como potencial blanco de SIL. Como se dijo antes, otra alternativa para explicar la disminución de EROs podría ser mediante una potenciación de los sistemas antioxidantes (Brown and Griendling 2015). En tal sentido, se ha demostrado que el SIL es capaz de producir una disminución de EROs en ratones sometidos a estrés sonoro, mediante un mecanismo que lleva a la sobreexpresión de enzimas antioxidantes como SOD (Sikandaneh, Park et al. 2017). Sin embargo, tampoco encontramos cambios significativos en cuanto a enzimas antioxidantes en nuestras condiciones experimentales (**Figura 21**). Por último, es sabido que la mayor fuente de EROs es la mitocondria, en la que se generan como bioproducto de la respiración (Murphy 2009). Evidencias previas muestran que SIL es capaz de proteger de la injuria por isquemia-reperfusión en rata mediante un mecanismo que involucra mejoramiento de la función y morfología mitocondrial (Garciaarena, Fantinelli et al. 2011, Lee, Kwon et al. 2014). También en ratas, otro estudio muestra que la apertura PKG-dependiente de los canales de mBKCa (canales de potasio sensibles a calcio) juega un papel fundamental en la cardioprotección inducida por SIL (Behmenburg, Dorsch et al. 2015). Por otra parte, experimentos de Ascha y col. (Aschah, Khairallah et al. 2011) han demostrado que SIL puede evitar la apertura excesiva del poro de permeabilidad de transición mitocondrial en corazones de ratones distróficos. Finalmente, experimentos en rata de nuestro propio laboratorio permitieron demostrar que la inhibición del NHE1 con cariporide es capaz de reducir la producción de EROs inducidos por Ang II debido a una acción directa sobre el NHE1 mitocondrial (Garciaarena, Caldiz et al. 2008). Es importante destacar que los resultados del presente trabajo de Tesis muestran que SIL provocó una disminución significativa de la fosforilación en Ser703 del intercambiador (**Figura 17**) que se correlacionó con una marcada inhibición de su actividad general (**Figura 16**). Tomando en conjunto los antecedentes mencionados y nuestros propios resultados, se podría especular con la posibilidad de una acción de SIL sobre el NHE1 mitocondrial, lo cual provocaría una disminución de la generación de EROs.

Como mencionamos anteriormente p38 puede afectar la vía hipertrofiante calcineurina/NFAT (Braz, Bueno et al. 2003) y las quinasas relacionadas con las vías pro-apoptóticas (Wang, Huang et al. 1998). Interesantemente, se ha demostrado que un aumento de la actividad de PKG inhibe la vía de señalización calcineurina/NFAT (Fiedler, Lohmann et al. 2002). Por otra parte, un trabajo de nuestro propio grupo permitió

demostrar que la HC de ratas SHR caracterizada por una sobreactivación del NHE1 (Perez, Alvarez et al. 1995), involucra la activación de la vía calcineurina/NFAT, y que la misma puede ser normalizada mediante inhibición específica del intercambiador con cariporide (Ennis, Garcarena et al. 2007). Por último, Zhang y col. (Zhang, Wang et al. 2015) demostraron que el efecto protector de SIL en un modelo de disfunción miocárdica post-resucitación en cerdos está relacionado con la disminución de la apoptosis, evaluada mediante TUNEL, relación bcl2/bax y expresión de caspasa 3. En nuestras condiciones experimentales hemos podido detectar una disminución significativa tanto en la expresión de calcineurina como en la de caspasa 3 (**Figura 22**), indicando que el tratamiento con SIL estaría interfiriendo en vías involucradas en la generación de HC y en aquellas conducentes a apoptosis.

Considerando todos estos datos en conjunto, podemos sugerir que el tratamiento crónico con SIL (oral) podría representar una excelente alternativa terapéutica para combatir la HC patológica producida por sobrecarga hemodinámica. Nuestros hallazgos contrastan sin embargo con otros publicados por Straubinger y col. (Straubinger, Schottle et al. 2015) quienes demostraron la ineffectividad del SIL administrado en el agua de bebida (400mg/l) durante 2 meses para revertir la HC en un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa el receptor AT1 de Ang II, sugiriendo que SIL carece de efecto a nivel del cardiomiocito. Sin embargo, Takimoto y col. (Takimoto, Champion et al. 2005) demostraron que un tratamiento de 2 semanas con SIL en ratones sometidos a TAC, procedimiento que se sabe que involucra la activación de receptores AT1 de Ang II (Cingolani, Perez et al. 2011), es suficiente para prevenir el desarrollo de HC en estos animales. En nuestras condiciones experimentales, tanto en cardiomiocitos aislados (**Figura 6**) como en el modelo de hipertrofia inducida *in vitro* (**Figura 7**) hemos podido demostrar convincentemente que SIL tiene un efecto directo sobre estos tipos celulares inhibiendo la actividad del NHE1 y revirtiendo la hipertrofia generada por Ang II. Asimismo, el tratamiento crónico con SIL por 3 meses logró una disminución efectiva de la HC generada por sobrecarga hemodinámica en el modelo SHR (**Figura 13 A**). Además, aunque no lo hemos comprobado experimentalmente, nos permitimos especular con la posibilidad de que SIL también pudiera estar actuando sobre otros tipos celulares como fibroblastos basándonos en los efectos sobre el colágeno intersticial (**Figura 13 B**).

Por último, es importante hacer referencia al tiempo de tratamiento necesario para lograr efectos significativos sobre la hipertrofia miocárdica. Si bien no conseguimos detectar una disminución significativa de los índices de HC al cabo de un mes de tratamiento con SIL

(Figura 23), este efecto fue identificado claramente cuando el tratamiento se prolongó durante 3 meses (Figura 13). Vale recordar aquí que aunque la inhibición total y crónica del NHE1 con cariporide en ratas SHR logró reducir la HC tan precozmente como al mes de tratamiento, tanto el colágeno intersticial como su consecuencia directa, la rigidez de la pared, requirieron entre dos y tres meses para normalizarse (Cingolani, Rebolledo et al. 2003). Basándonos en estos antecedentes y en los resultados propios de este trabajo de Tesis Doctoral, pareciera factible especular con la posibilidad de que un mes de tratamiento no sea suficiente como para detectar cambios morfológicos que pudieran depender de tasas de recambio intrínsecas (“turnover”) de las proteínas directamente vinculadas al proceso pro-hipertrofiante (Lyon, Lange et al. 2013). En contraposición, podría ser un tiempo suficiente como para comenzar (y por ende detectar experimentalmente) procesos intracelulares beneficiosos que pudieran manifestarse morfológica y funcionalmente luego de períodos más prolongados de tratamiento. Una vez más, nuestros resultados en los modelos animales descritos (Figuras 9 y 13) muestran un claro efecto anti-hipertrofiante y antifibrótico disparado por el tratamiento con SIL durante 3 meses. La disminución de la actividad del NHE1 pareciera ser un factor clave de este efecto, como blanco final de una ruta intracelular disparada por la inhibición de la FDE5A por SIL, y que incluiría la activación secuencial de PKG, p38 y PP2A.

CONCLUSIÓN

- Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento crónico (3 meses) con SIL es capaz de revertir la HC y la fibrosis intersticial miocárdica en ratas SHR, mejorando la distensibilidad de la pared ventricular, por lo que **podemos concluir que el tratamiento mejora la morfología y la función del corazón.**
- Esta mejora sería atribuible primariamente a una disminución de la actividad exacerbada del NHE1, característica de los corazones hipertróficos de ratas SHR, **mediante un mecanismo que limita el grado de fosforilación del intercambiador** en el sitio Ser703 sin afectar su nivel de expresión génica.
- Se propone la siguiente ruta intracelular como responsable del efecto anti-hipertrofiante: SIL, mediante inhibición de la FDE5A, aumenta la actividad de PKG, la cual por activación de la quinasa p38 promueve **una mayor interacción entre la fosfatasa PP2A y el NHE1** con la consecuente desfosforilación del intercambiador.
- Los resultados obtenidos permiten además sospechar que **la disminución del estrés oxidativo podría subyacer a los efectos beneficiosos del tratamiento con SIL.**
- Los resultados en cardiomiocitos aislados y en células H9C2 sugieren que **SIL tiene un efecto directo sobre los cardiomiocitos.**
- El efecto beneficioso del tratamiento sobre la fibrosis intersticial sugeriría una **posible acción de SIL sobre los fibroblastos.**

Desde el punto de vista de una **potencial aplicación clínica de nuestros hallazgos**, es importante destacar que **el efecto inhibitorio de SIL sobre el NHE1 no afecta su importantísima función homeostática basal**, lo cual posiciona a este compuesto como una **interesante alternativa terapéutica** para combatir diversas patologías cardiovasculares que se caracterizan por una exacerbada actividad del intercambiador, **evitando los efectos secundarios** que se observaron en ensayos clínicos utilizando inhibidores específicos del NHE1.

Perspectivas a futuro

- Como observamos en resultados, uno de los efectos favorables del tratamiento con SIL fue la disminución significativa de EROs. Sin embargo, no vimos cambios en las proteínas relacionadas a la generación de EROs como NADPH oxidasa, o a la degradación de las mismas. Por lo tanto, sería interesante estudiar el efecto que SIL podría generar sobre el NHE1 mitocondrial de manera directa en mitocondrias aisladas.
- Asimismo, sería interesante continuar el estudio de los efectos del tratamiento crónico con SIL sobre fibroblastos, el otro tipo celular clave en la generación de disfunción cardíaca secundaria a HC.

BIBLIOGRAFÍA

Adiaro, S., S. Heiden, N. Vignon-Zellweger, K. Nakayama, K. Yagi, M. Yanagisawa and N. Emoto (2012). "ET-1 from endothelial cells is required for complete angiotensin II-induced cardiac fibrosis and hypertrophy." *Life Sci* **91**(13-14): 651-657.

Alessi, D. R., N. Gomez, G. Moorhead, T. Lewis, S. M. Keyse and P. Cohen (1995). "Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines." *Curr Biol* **5**(3): 283-295.

Alvarez, M. C., C. Caldiz, J. C. Fantinelli, C. D. Garcarena, G. M. Console, G. E. Chiappe de Cingolani and S. M. Mosca (2008). "Is cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats the cause or the consequence of oxidative stress?" *Hypertens Res* **31**(7): 1465-1476.

Andersson, K. E. (2018). "PDE5 inhibitors - pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery." *Br J Pharmacol* **175**(13): 2554-2565.

Aronson, P. S. (1985). "Kinetic properties of the plasma membrane Na⁺-H⁺ exchanger." *Annu Rev Physiol* **47**: 545-560.

Ascah, A., M. Khairallah, F. Daussin, C. Bourcier-Lucas, R. Godin, B. G. Allen, B. J. Petrof, C. Des Rosiers and Y. Burelle (2011). "Stress-induced opening of the permeability transition pore in the dystrophin-deficient heart is attenuated by acute treatment with sildenafil." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**(1): H144-153.

Bates, M. G., A. A. Thompson, J. K. Baillie, A. I. Sutherland, J. B. Irving, N. Hirani and D. J. Webb (2011). "Sildenafil citrate for the prevention of high altitude hypoxic pulmonary hypertension: double blind, randomized, placebo-controlled trial." *High Alt Med Biol* **12**(3): 207-214.

Behmenburg, F., M. Dorsch, R. Huhn, D. Mally, A. Heinen, M. W. Hollmann and M. M. Berger (2015). "Impact of Mitochondrial Ca²⁺-Sensitive Potassium (mBKCa) Channels in Sildenafil-Induced Cardioprotection in Rats." *PLoS One* **10**(12): e0144737.

Behr, T. M., S. S. Nerurkar, A. H. Nelson, R. W. Coatney, T. N. Woods, A. Sulpizio, S. Chandra, D. P. Brooks, S. Kumar, J. C. Lee, E. H. Ohlstein, C. E. Angermann, J. L. Adams, J. Sisko, J. D. Sackner-Bernstein and R. N. Willette (2001). "Hypertensive end-organ damage and premature mortality are p38 mitogen-activated protein kinase-dependent in a rat model of cardiac hypertrophy and dysfunction." *Circulation* **104**(11): 1292-1298.

Bell, D., E. J. Kelso, C. C. Argent, G. R. Lee, A. R. Allen and B. J. McDermott (2004). "Temporal characteristics of cardiomyocyte hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat." *Cardiovasc Pathol* **13**(2): 71-78.

Bendall, J. K., A. C. Cave, C. Heymes, N. Gall and A. M. Shah (2002). "Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice." *Circulation* **105**(3): 293-296.

Brandes, R. P., N. Weissmann and K. Schroder (2014). "Redox-mediated signal transduction by cardiovascular Nox NADPH oxidases." *J Mol Cell Cardiol* **73**: 70-79.

Braz, J. C., O. F. Bueno, Q. Liang, B. J. Wilkins, Y. S. Dai, S. Parsons, J. Braunwart, B. J. Glascock, R. Klevitsky, T. F. Kimball, T. E. Hewett and J. D. Molkentin (2003). "Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling." *J Clin Invest* **111**(10): 1475-1486.

Brower, G. L., J. D. Gardner, M. F. Forman, D. B. Murray, T. Voloshenyuk, S. P. Levick and J. S. Janicki (2006). "The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function." *Eur J Cardiothorac Surg* **30**(4): 604-610.

Brown, D. I. and K. K. Griending (2015). "Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system." *Circ Res* **116**(3): 531-549.

Buege, J. A. and S. D. Aust (1978). "Microsomal lipid peroxidation." *Methods Enzymol* **52**: 302-310.

Bueno, O. F., L. J. De Windt, K. M. Tymitz, S. A. Witt, T. R. Kimball, R. Klevitsky, T. E. Hewett, S. P. Jones, D. J. Lefer, C. F. Peng, R. N. Kitsis and J. D. Molkentin (2000). "The MEK1-ERK1/2 signaling

pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice." EMBO J **19**(23): 6341-6350.

Bueno, O. F., B. J. Wilkins, K. M. Tymitz, B. J. Glascock, T. F. Kimball, J. N. Lorenz and J. D. Molkentin (2002). "Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4586-4591.

Bunag, R. D. (1973). "Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure." J Appl Physiol **34**(2): 279-282.

Caldiz, C. I., C. D. Garcarena, R. A. Dulce, L. P. Novaretto, A. M. Yeves, I. L. Ennis, H. E. Cingolani, G. Chiappe de Cingolani and N. G. Perez (2007). "Mitochondrial reactive oxygen species activate the slow force response to stretch in feline myocardium." J Physiol **584**(Pt 3): 895-905.

Camilion de Hurtado, M. C., E. L. Portiansky, N. G. Perez, O. R. Rebolledo and H. E. Cingolani (2002). "Regression of cardiomyocyte hypertrophy in SHR following chronic inhibition of the Na(+)/H(+) exchanger." Cardiovasc Res **53**(4): 862-868.

Cave, A., D. Grieve, S. Johar, M. Zhang and A. M. Shah (2005). "NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **360**(1464): 2327-2334.

Cingolani, H. E., B. V. Alvarez, I. L. Ennis and M. C. Camilion de Hurtado (1998). "Stretch-induced alkalinization of feline papillary muscle: an autocrine-paracrine system." Circ Res **83**(8): 775-780.

Cingolani, H. E., N. G. Perez, E. A. Aiello and M. C. de Hurtado (2005). "Intracellular signaling following myocardial stretch: an autocrine/paracrine loop." Regul Pept **128**(3): 211-220.

Cingolani, H. E., N. G. Perez, O. H. Cingolani and I. L. Ennis (2013). "The Anrep effect: 100 years later." Am J Physiol Heart Circ Physiol **304**(2): H175-182.

Cingolani, H. E., O. R. Rebolledo, E. L. Portiansky, N. G. Perez and M. C. Camilion de Hurtado (2003). "Regression of hypertensive myocardial fibrosis by Na(+)/H(+) exchange inhibition." Hypertension **41**(2): 373-377.

Cingolani, O. H., N. G. Perez, I. L. Ennis, M. C. Alvarez, S. M. Mosca, G. R. Schinella, E. M. Escudero, G. Console and H. E. Cingolani (2011). "In vivo key role of reactive oxygen species and NHE-1 activation in determining excessive cardiac hypertrophy." Pflugers Arch **462**(5): 733-743.

Coccaro, E., P. Karki, C. Cojocar and L. Fliegel (2009). "Phenylephrine and sustained acidosis activate the neonatal rat cardiomyocyte Na⁺/H⁺ exchanger through phosphorylation of amino acids Ser770 and Ser771." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(2): H846-858.

Conrad, C. H., W. W. Brooks, J. A. Hayes, S. Sen, K. G. Robinson and O. H. Bing (1995). "Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat." Circulation **91**(1): 161-170.

Costa-Pessoa, J. M., C. F. Figueiredo, K. Thieme and M. Oliveira-Souza (2013). "The regulation of NHE(1) and NHE(3) activity by angiotensin II is mediated by the activation of the angiotensin II type I receptor/phospholipase C/calcium/calmodulin pathway in distal nephron cells." Eur J Pharmacol **721**(1-3): 322-331.

Chau, V. Q., F. N. Salloum, N. N. Hoke, A. Abbate and R. C. Kukreja (2011). "Mitigation of the progression of heart failure with sildenafil involves inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway." Am J Physiol Heart Circ Physiol **300**(6): H2272-2279.

Cheng, T. H., P. Y. Cheng, N. L. Shih, I. B. Chen, D. L. Wang and J. J. Chen (2003). "Involvement of reactive oxygen species in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in rat cardiac fibroblasts." J Am Coll Cardiol **42**(10): 1845-1854.

Chiang, J. T., K. F. Badrealam, M. A. Shibu, C. H. Kuo, C. Y. Huang, B. C. Chen, Y. M. Lin, V. P. Viswanatha, W. W. Kuo and C. Y. Huang (2018). "Eriobotrya japonica ameliorates cardiac hypertrophy in H9c2 cardiomyoblast and in spontaneously hypertensive rats." Environ Toxicol.

Dai, D. F., S. C. Johnson, J. J. Villarín, M. T. Chin, M. Nieves-Cintrón, T. Chen, D. J. Marcinek, G. W. Dorn, 2nd, Y. J. Kang, T. A. Prolla, L. F. Santana and P. S. Rabinovitch (2011). "Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure." Circ Res **108**(7): 837-846.

Das, A., L. Xi and R. C. Kukreja (2005). "Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling." J Biol Chem **280**(13): 12944-12955.

Date, M. O., T. Morita, N. Yamashita, K. Nishida, O. Yamaguchi, Y. Higuchi, S. Hirofuchi, Y. Matsumura, M. Hori, M. Tada and K. Otsu (2002). "The antioxidant N-2-mercaptopyrionyl glycine attenuates left ventricular hypertrophy in in vivo murine pressure-overload model." J Am Coll Cardiol **39**(5): 907-912.

de Simone, G., J. S. Gottdiener, M. Chinali and M. S. Maurer (2008). "Left ventricular mass predicts heart failure not related to previous myocardial infarction: the Cardiovascular Health Study." Eur Heart J **29**(6): 741-747.

Deng, X. U., K. E. Xia, P. O. Chen, M. S. Ali Sheikh, D. F. Yang, S. M. Li and T. L. Yang (2015). "Reversion of left ventricle remodeling in spontaneously hypertensive rats by valsartan is associated with the inhibition of caspase-3, -8 and -9 activities." Biomed Rep **3**(4): 533-536.

Denker, S. P. and D. L. Barber (2002). "Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1." J Cell Biol **159**(6): 1087-1096.

Dhalla, N. S., R. M. Temsah and T. Netticadan (2000). "Role of oxidative stress in cardiovascular diseases." J Hypertens **18**(6): 655-673.

Diaz, R. G., D. S. Escudero, M. S. Brea, P. E. Morgan and N. G. Perez (2019). "p38 mitogen activated protein kinase mediates cardiac Na⁺/H⁺ exchanger inhibition induced by Sildenafil." Eur J Pharmacol.

Diaz, R. G., M. B. Nolly, C. Massarutti, M. J. Casarini, C. D. Garciarena, I. L. Ennis, H. E. Cingolani and N. G. Perez (2010). "Phosphodiesterase 5A inhibition decreases NHE-1 activity without altering steady state pH(i): role of phosphatases." Cell Physiol Biochem **26**(4-5): 531-540.

Eardley, I., J. Brooks, P. K. Yates, P. Ellis and M. Boolell (1999). "Sildenafil citrate (VIAGRA): an oral treatment for erectile function with activity for up to four hours' duration." Int J Clin Pract Suppl **102**: 32-34.

Eckhouse, S. R. and F. G. Spinale (2012). "Changes in the myocardial interstitium and contribution to the progression of heart failure." Heart Fail Clin **8**(1): 7-20.

Engberding, N., S. Spiekermann, A. Schaefer, A. Heineke, A. Wiencke, M. Müller, M. Fuchs, D. Hilfiker-Kleiner, B. Hornig, H. Drexler and U. Landmesser (2004). "Allopurinol attenuates left ventricular remodeling and dysfunction after experimental myocardial infarction: a new action for an old drug?" Circulation **110**(15): 2175-2179.

Engel, F. B., P. C. Hsieh, R. T. Lee and M. T. Keating (2006). "FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(42): 15546-15551.

Ennis, I. L., C. D. Garciarena, E. M. Escudero, N. G. Perez, R. A. Dulce, M. C. Camilion de Hurtado and H. E. Cingolani (2007). "Normalization of the calcineurin pathway underlies the regression of hypertensive hypertrophy induced by Na⁺/H⁺ exchanger-1 (NHE-1) inhibition." Can J Physiol Pharmacol **85**(3-4): 301-310.

Fafournoux, P., J. Noel and J. Pouyssegur (1994). "Evidence that Na⁺/H⁺ exchanger isoforms NHE1 and NHE3 exist as stable dimers in membranes with a high degree of specificity for homodimers." J Biol Chem **269**(4): 2589-2596.

Fantinelli, J. C., H. E. Cingolani and S. M. Mosca (2006). "Na⁺/H⁺ exchanger inhibition at the onset of reperfusion decreases myocardial infarct size: role of reactive oxygen species." Cardiovasc Pathol **15**(4): 179-184.

Fiedler, B., S. M. Lohmann, A. Smolenski, S. Linnemuller, B. Pieske, F. Schroder, J. D. Molkenin, H. Drexler and K. C. Wollert (2002). "Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11363-11368.

Fleming, I., U. R. Michaelis, D. Breidenkotter, B. Fisslthaler, F. Dehghani, R. P. Brandes and R. Busse (2001). "Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries." Circ Res **88**(1): 44-51.

Fliegel, L. (2008). "Molecular biology of the myocardial Na⁺/H⁺ exchanger." J Mol Cell Cardiol **44**(2): 228-237.

Fliegel, L. and M. Karmazyn (2004). "The cardiac Na-H exchanger: a key downstream mediator for the cellular hypertrophic effects of paracrine, autocrine and hormonal factors." Biochem Cell Biol **82**(6): 626-635.

Fowler, M. R., J. R. Naz, M. D. Graham, C. H. Orchard and S. M. Harrison (2007). "Age and hypertrophy alter the contribution of sarcoplasmic reticulum and Na⁺/Ca²⁺ exchange to Ca²⁺ removal in rat left ventricular myocytes." J Mol Cell Cardiol **42**(3): 582-589.

Frohlich, E. D., A. Gonzalez and J. Diez (2011). "Hypertensive left ventricular hypertrophy risk: beyond adaptive cardiomyocytic hypertrophy." J Hypertens **29**(1): 17-26.

Fukuda, N., W. Y. Hu, J. Teng, S. Chikara, M. Nakayama, H. Kishioka and K. Kanmatsuse (2002). "Troglitazone inhibits growth and improves insulin signaling by suppression of angiotensin II action in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats." Atherosclerosis **163**(2): 229-239.

Gandhi, H., B. Shah, R. Patel, R. Toshani, J. Pujara, J. Kothari and N. Shastri (2014). "Effect of preoperative oral sildenafil on severe pulmonary artery hypertension in patients undergoing mitral valve replacement." Indian J Pharmacol **46**(3): 281-285.

Garciaarena, C. D., C. I. Caldiz, M. V. Correa, G. R. Schinella, S. M. Mosca, G. E. Chiappe de Cingolani, H. E. Cingolani and I. L. Ennis (2008). "Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitors decrease myocardial superoxide production via direct mitochondrial action." J Appl Physiol (1985) **105**(6): 1706-1713.

Garciaarena, C. D., C. I. Caldiz, E. L. Portiansky, G. E. Chiappe de Cingolani and I. L. Ennis (2009). "Chronic NHE-1 blockade induces an antiapoptotic effect in the hypertrophied heart." J Appl Physiol (1985) **106**(4): 1325-1331.

Garciaarena, C. D., J. C. Fantinelli, C. I. Caldiz, G. Chiappe de Cingolani, I. L. Ennis, N. G. Perez, H. E. Cingolani and S. M. Mosca (2011). "Myocardial reperfusion injury: reactive oxygen species vs. NHE-1 reactivation." Cell Physiol Biochem **27**(1): 13-22.

Gilbert, J. C. and S. A. Glantz (1989). "Determinants of left ventricular filling and of the diastolic pressure-volume relation." Circ Res **64**(5): 827-852.

Gillies, H. C., D. Roblin and G. Jackson (2002). "Coronary and systemic hemodynamic effects of sildenafil citrate: from basic science to clinical studies in patients with cardiovascular disease." Int J Cardiol **86**(2-3): 131-141.

Gong, W., M. Yan, J. Chen, S. Chaugai, C. Chen and D. Wang (2014). "Chronic inhibition of cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase 5 prevented cardiac fibrosis through inhibition of transforming growth factor beta-induced Smad signaling." Front Med **8**(4): 445-455.

Grinstein, S., M. Woodside, C. Sardet, J. Pouyssegur and D. Rotin (1992). "Activation of the Na⁺/H⁺ antiporter during cell volume regulation. Evidence for a phosphorylation-independent mechanism." J Biol Chem **267**(33): 23823-23828.

Groemping, Y. and K. Rittinger (2005). "Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective." *Biochem J* **386**(Pt 3): 401-416.

Hatzimouratidis, K., A. Salonia, G. Adaikan, J. Buvat, S. Carrier, A. El-Meliegy, A. McCullough, L. O. Torres and M. Khera (2016). "Pharmacotherapy for Erectile Dysfunction: Recommendations From the Fourth International Consultation for Sexual Medicine (ICSM 2015)." *J Sex Med* **13**(4): 465-488.

Haworth, R. S., C. McCann, A. K. Snabaitis, N. A. Roberts and M. Avkiran (2003). "Stimulation of the plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 by sustained intracellular acidosis. Evidence for a novel mechanism mediated by the ERK pathway." *J Biol Chem* **278**(34): 31676-31684.

Hernandez, G., H. Lal, M. Fidalgo, A. Guerrero, J. Zalvide, T. Force and C. M. Pombo (2011). "A novel cardioprotective p38-MAPK/mTOR pathway." *Exp Cell Res* **317**(20): 2938-2949.

Hescheler, J., R. Meyer, S. Plant, D. Krautwurst, W. Rosenthal and G. Schultz (1991). "Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart." *Circ Res* **69**(6): 1476-1486.

Hitomi, H., T. Fukui, K. Moriwaki, K. Matsubara, G. P. Sun, M. Rahman, A. Nishiyama, H. Kiyomoto, S. Kimura, K. Ohmori, Y. Abe and M. Kohno (2006). "Synergistic effect of mechanical stretch and angiotensin II on superoxide production via NADPH oxidase in vascular smooth muscle cells." *J Hypertens* **24**(6): 1089-1095.

Hu, W. Y., N. Fukuda and K. Kanmatsuse (2002). "Growth characteristics, angiotensin II generation, and microarray-determined gene expression in vascular smooth muscle cells from young spontaneously hypertensive rats." *J Hypertens* **20**(7): 1323-1333.

Ide, T., H. Tsutsui, S. Hayashidani, D. Kang, N. Suematsu, K. Nakamura, H. Utsumi, N. Hamasaki and A. Takeshita (2001). "Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction." *Circ Res* **88**(5): 529-535.

Izumi, Y., S. Kim, Y. Zhan, M. Namba, H. Yasumoto and H. Iwao (2000). "Important role of angiotensin II-mediated c-Jun NH(2)-terminal kinase activation in cardiac hypertrophy in hypertensive rats." *Hypertension* **36**(4): 511-516.

Jaballah, M., I. A. Mohamed, B. Alemrayat, F. Al-Sulaiti, M. Mlih and F. Mraiche (2015). "Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 induced cardiomyocyte hypertrophy involves activation of p90 ribosomal s6 kinase." *PLoS One* **10**(4): e0122230.

Jackson, G., N. Benjamin, N. Jackson and M. J. Allen (1999). "Effects of sildenafil citrate on human hemodynamics." *Am J Cardiol* **83**(5A): 13C-20C.

Jackson, G., P. Montorsi and M. D. Cheitlin (2006). "Cardiovascular safety of sildenafil citrate (Viagra): an updated perspective." *Urology* **68**(3 Suppl): 47-60.

Jeremy, J. Y., S. A. Ballard, A. M. Naylor, M. A. Miller and G. D. Angelini (1997). "Effects of sildenafil, a type-5 cGMP phosphodiesterase inhibitor, and papaverine on cyclic GMP and cyclic AMP levels in the rabbit corpus cavernosum in vitro." *Br J Urol* **79**(6): 958-963.

Kaiser, R. A., O. F. Bueno, D. J. Lips, P. A. Doevendans, F. Jones, T. F. Kimball and J. D. Molkentin (2004). "Targeted inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion in vivo." *J Biol Chem* **279**(15): 15524-15530.

Karmazyn, M. (2013). "NHE-1: still a viable therapeutic target." *J Mol Cell Cardiol* **61**: 77-82.

Karmazyn, M., X. T. Gan, R. A. Humphreys, H. Yoshida and K. Kusumoto (1999). "The myocardial Na⁽⁺⁾-H⁽⁺⁾ exchange: structure, regulation, and its role in heart disease." *Circ Res* **85**(9): 777-786.

Khaled, A. R., A. N. Moor, A. Li, K. Kim, D. K. Ferris, K. Muegge, R. J. Fisher, L. Fliegel and S. K. Durum (2001). "Trophic factor withdrawal: p38 mitogen-activated protein kinase activates NHE1, which induces intracellular alkalization." *Mol Cell Biol* **21**(22): 7545-7557.

Kim, J. K., A. Pedram, M. Razandi and E. R. Levin (2006). "Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms." *J Biol Chem* **281**(10): 6760-6767.

Kimes, B. W. and B. L. Brandt (1976). "Properties of a clonal muscle cell line from rat heart." Exp Cell Res **98**(2): 367-381.

Koren, M. J., R. B. Devereux, P. N. Casale, D. D. Savage and J. H. Laragh (1991). "Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension." Ann Intern Med **114**(5): 345-352.

Koupparis, A. J., J. Y. Jeremy, S. Muzaffar, R. Persad and N. Shukla (2005). "Sildenafil inhibits the formation of superoxide and the expression of gp47 NAD[P]H oxidase induced by the thromboxane A2 mimetic, U46619, in corpus cavernosal smooth muscle cells." BJU Int **96**(3): 423-427.

Kunes, J., S. Hojna, M. Kadlecova, Z. Dobesova, H. Rauchova, M. Vokurkova, J. Loukotova, O. Pechanova and J. Zicha (2004). "Altered balance of vasoactive systems in experimental hypertension: the role of relative NO deficiency." Physiol Res **53 Suppl 1**: S23-34.

Kusuhara, M., E. Takahashi, T. E. Peterson, J. Abe, M. Ishida, J. Han, R. Ulevitch and B. C. Berk (1998). "p38 Kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: effects on Na⁺/H⁺ exchange and ERK1/2." Circ Res **83**(8): 824-831.

Kusumoto, K., J. V. Haist and M. Karmazyn (2001). "Na⁺/H⁺ exchange inhibition reduces hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(2): H738-745.

Kwon, S. H., D. R. Pimentel, A. Remondino, D. B. Sawyer and W. S. Colucci (2003). "H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways." J Mol Cell Cardiol **35**(6): 615-621.

Ladha, F., S. Bonnet, F. Eaton, K. Hashimoto, G. Korbitt and B. Thebaud (2005). "Sildenafil improves alveolar growth and pulmonary hypertension in hyperoxia-induced lung injury." Am J Respir Crit Care Med **172**(6): 750-756.

Lee, K. H., S. J. Kwon, J. S. Woo, G. J. Lee, S. R. Lee, H. H. Jang, H. S. Kim, J. W. Kim, H. K. Park, K. S. Cho and W. Kim (2014). "Effects of sildenafil on nanostructural and nanomechanical changes in mitochondria in an ischaemia-reperfusion rat model." Clin Exp Pharmacol Physiol **41**(10): 763-768.

Lemke, L. E., L. J. Bloem, R. Fouts, M. Esterman, G. Sandusky and C. J. Vlahos (2001). "Decreased p38 MAPK activity in end-stage failing human myocardium: p38 MAPK alpha is the predominant isoform expressed in human heart." J Mol Cell Cardiol **33**(8): 1527-1540.

Levy, D., R. J. Garrison, D. D. Savage, W. B. Kannel and W. P. Castelli (1990). "Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study." N Engl J Med **322**(22): 1561-1566.

Li, Y., H. Zhu, P. Kuppusamy, V. Roubaud, J. L. Zweier and M. A. Trush (1998). "Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems." J Biol Chem **273**(4): 2015-2023.

Lijnen, P. and V. Petrov (1999). "Renin-angiotensin system, hypertrophy and gene expression in cardiac myocytes." J Mol Cell Cardiol **31**(5): 949-970.

Liu, H., A. Pedram and J. K. Kim (2011). "Oestrogen prevents cardiomyocyte apoptosis by suppressing p38alpha-mediated activation of p53 and by down-regulating p53 inhibition on p38beta." Cardiovasc Res **89**(1): 119-128.

Liu, Q. and P. A. Hofmann (2004). "Protein phosphatase 2A-mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(6): H2204-2212.

Lorenz, K., J. P. Schmitt, E. M. Schmitteckert and M. J. Lohse (2009). "A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy." Nat Med **15**(1): 75-83.

Luo, J. W., X. Zheng, G. C. Cheng, Q. H. Ye, Y. Z. Deng and L. Wu (2016). "Resistin-induced cardiomyocyte hypertrophy is inhibited by apelin through the inactivation of extracellular signal-

regulated kinase signaling pathway in H9c2 embryonic rat cardiomyocytes." Biomed Rep **5**(4): 473-478.

Lyon, R. C., S. Lange and F. Sheikh (2013). "Breaking down protein degradation mechanisms in cardiac muscle." Trends Mol Med **19**(4): 239-249.

Mallat, Z., I. Philip, M. Lebret, D. Chatel, J. Maclouf and A. Tedgui (1998). "Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure." Circulation **97**(16): 1536-1539.

Mao, H. P., X. Y. Wang, Y. H. Gao, Y. X. Chang, L. Chen, Z. C. Niu, J. Q. Ai and X. M. Gao (2016). "Danhong injection attenuates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by regulating p38 and NF-kappaB pathway." J Ethnopharmacol **186**: 20-29.

Maulik, S. K. and S. Kumar (2012). "Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review." Toxicol Mech Methods **22**(5): 359-366.

McCubrey, J. A., M. M. Lahair and R. A. Franklin (2006). "Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways." Antioxid Redox Signal **8**(9-10): 1775-1789.

McCubrey, J. A., L. S. Steelman, W. H. Chappell, S. L. Abrams, E. W. Wong, F. Chang, B. Lehmann, D. M. Terrian, M. Milella, A. Tafuri, F. Stivala, M. Libra, J. Basecke, C. Evangelisti, A. M. Martelli and R. A. Franklin (2007). "Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1263-1284.

Melo Junior, A. F., P. L. M. Dalpiaz, G. J. Sousa, P. W. C. Oliveira, A. M. Birocale, T. U. Andrade, G. R. Abreu and N. S. Bissoli (2018). "Nandrolone alter left ventricular contractility and promotes remodelling involving calcium-handling proteins and renin-angiotensin system in male SHR." Life Sci **208**: 239-245.

Mentzer, R. M., Jr., C. Bartels, R. Bolli, S. Boyce, G. D. Buckberg, B. Chaitman, A. Haverich, J. Knight, P. Menasche, M. L. Myers, J. Nicolau, M. Simoons, L. Thulin, R. D. Weisel and E. S. Investigators (2008). "Sodium-hydrogen exchange inhibition by cariporide to reduce the risk of ischemic cardiac events in patients undergoing coronary artery bypass grafting: results of the EXPEDITION study." Ann Thorac Surg **85**(4): 1261-1270.

Misik, A. J., K. Perreault, C. F. Holmes and L. Fliegel (2005). "Protein phosphatase regulation of Na⁺/H⁺ exchanger isoform I." Biochemistry **44**(15): 5842-5852.

Moor, A. N. and L. Fliegel (1999). "Protein kinase-mediated regulation of the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger in the rat myocardium by mitogen-activated protein kinase-dependent pathways." J Biol Chem **274**(33): 22985-22992.

Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." Biochem J **417**(1): 1-13.

Muzaffar, S., N. Shukla, A. Srivastava, G. D. Angelini and J. Y. Jeremy (2005). "Sildenafil citrate and sildenafil nitrate (NCX 911) are potent inhibitors of superoxide formation and gp91phox expression in porcine pulmonary artery endothelial cells." Br J Pharmacol **146**(1): 109-117.

Nakamura, T., G. Zhu, M. J. Ranek, K. Kokkonen-Simon, M. Zhang, G. E. Kim, K. Tsujita and D. A. Kass (2018). "Prevention of PKG-1alpha Oxidation Suppresses Antihypertrophic/Antifibrotic Effects From PDE5 Inhibition but not sGC Stimulation." Circ Heart Fail **11**(3): e004740.

Nakamura, T. Y., Y. Iwata, Y. Arai, K. Komamura and S. Wakabayashi (2008). "Activation of Na⁺/H⁺ exchanger 1 is sufficient to generate Ca²⁺ signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure." Circ Res **103**(8): 891-899.

Nemoto, S., Z. Sheng and A. Lin (1998). "Opposing effects of Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinases on cardiomyocyte hypertrophy." Mol Cell Biol **18**(6): 3518-3526.

Nordberg, J. and E. S. Arner (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system." Free Radic Biol Med **31**(11): 1287-1312.

Okamoto, K. and K. Aoki (1963). "Development of a strain of spontaneously hypertensive rats." Jpn Circ J **27**: 282-293.

Patrucco, E., K. Domes, M. Sbroggio, A. Blaich, J. Schlossmann, M. Desch, S. D. Rybalkin, J. A. Beavo, R. Lukowski and F. Hofmann (2014). "Roles of cGMP-dependent protein kinase I (cGKI) and PDE5 in the regulation of Ang II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(35): 12925-12929.

Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. H. Cobb (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-183.

Perez, N. G., B. V. Alvarez, M. C. Camilion de Hurtado and H. E. Cingolani (1995). "pHi regulation in myocardium of the spontaneously hypertensive rat. Compensated enhanced activity of the Na(+)-H+ exchanger." Circ Res **77**(6): 1192-1200.

Perez, N. G., M. R. Piaggio, I. L. Ennis, C. D. Garcarena, C. Morales, E. M. Escudero, O. H. Cingolani, G. Chiappe de Cingolani, X. P. Yang and H. E. Cingolani (2007). "Phosphodiesterase 5A inhibition induces Na+/H+ exchanger blockade and protection against myocardial infarction." Hypertension **49**(5): 1095-1103.

Perk, H., A. Armagan, M. Naziroglu, S. Soyupek, M. B. Hoscan, R. Sutcu, A. Ozorak and N. Delibas (2008). "Sildenafil citrate as a phosphodiesterase inhibitor has an antioxidant effect in the blood of men." J Clin Pharm Ther **33**(6): 635-640.

Petrecca, K., R. Atanasiu, S. Grinstein, J. Orłowski and A. Shrier (1999). "Subcellular localization of the Na+/H+ exchanger NHE1 in rat myocardium." Am J Physiol **276**(2 Pt 2): H709-717.

Pimentel, D. R., J. K. Amin, L. Xiao, T. Miller, J. Viereck, J. Oliver-Krasinski, R. Baliga, J. Wang, D. A. Siwik, K. Singh, P. Pagano, W. S. Colucci and D. B. Sawyer (2001). "Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes." Circ Res **89**(5): 453-460.

Pollock, D. M. and J. S. Pollock (2005). "Endothelin and oxidative stress in the vascular system." Curr Vasc Pharmacol **3**(4): 365-367.

Popescu, L. M., M. Gherghiceanu, M. E. Hinescu, D. Cretoiu, L. Ceafalan, T. Regalia, A. C. Popescu, C. Ardeleanu and E. Mandache (2006). "Insights into the interstitium of ventricular myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC)." J Cell Mol Med **10**(2): 429-458.

Portiansky, E. L., C. R. Alonso, E. F. Costa and E. J. Gimeno (2002). "Collagenous and elastic system fibres in the aorta of cattle poisoned by Solanum glaucophyllum." Vet Rec **150**(2): 42-45.

Rajfer, J., W. J. Aronson, P. A. Bush, F. J. Dorey and L. J. Ignarro (1992). "Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission." N Engl J Med **326**(2): 90-94.

Rapacciuolo, A., G. Esposito, K. Caron, L. Mao, S. A. Thomas and H. A. Rockman (2001). "Important role of endogenous norepinephrine and epinephrine in the development of in vivo pressure-overload cardiac hypertrophy." J Am Coll Cardiol **38**(3): 876-882.

Rosenkranz, S. (2004). "TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling." Cardiovasc Res **63**(3): 423-432.

Rotin, D., D. Steele-Norwood, S. Grinstein and I. Tannock (1989). "Requirement of the Na+/H+ exchanger for tumor growth." Cancer Res **49**(1): 205-211.

Sadoshima, J. and S. Izumo (1997). "The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress." Annu Rev Physiol **59**: 551-571.

Sadoshima, J., O. Montagne, Q. Wang, G. Yang, J. Warden, J. Liu, G. Takagi, V. Karoor, C. Hong, G. L. Johnson, D. E. Vatner and S. F. Vatner (2002). "The MEKK1-JNK pathway plays a protective role in pressure overload but does not mediate cardiac hypertrophy." J Clin Invest **110**(2): 271-279.

Sadoshima, J., Z. Qiu, J. P. Morgan and S. Izumo (1995). "Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca(2+)-dependent signaling." Circ Res **76**(1): 1-15.

Sadoshima, J., Y. Xu, H. S. Slayter and S. Izumo (1993). "Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro." Cell **75**(5): 977-984.

Santa Catharina, A., R. Modolo, A. M. Ritter, T. Quinaglia, R. F. de Amorim, H. Moreno and A. P. de Faria (2016). "Acute Sildenafil Use Reduces 24-Hour Blood Pressure Levels in Patients With Resistant Hypertension: A Placebo-Controlled, Crossover Trial." J Clin Hypertens (Greenwich) **18**(11): 1168-1172.

Sardet, C., A. Franchi and J. Pouyssegur (1989). "Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na⁺/H⁺ antiporter." Cell **56**(2): 271-280.

Schunkert, H., V. J. Dzau, S. S. Tang, A. T. Hirsch, C. S. Apstein and B. H. Lorell (1990). "Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation." J Clin Invest **86**(6): 1913-1920.

Seddon, M., Y. H. Looi and A. M. Shah (2007). "Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure." Heart **93**(8): 903-907.

Selvetella, G. and G. Lembo (2005). "Mechanisms of cardiac hypertrophy." Heart Fail Clin **1**(2): 263-273.

Sen, S., R. C. Tarazi, P. A. Khairallah and F. M. Bumpus (1974). "Cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats." Circ Res **35**(5): 775-781.

Shim, J. K., Y. S. Choi, Y. J. Oh, D. H. Kim, Y. W. Hong and Y. L. Kwak (2006). "Effect of oral sildenafil citrate on intraoperative hemodynamics in patients with pulmonary hypertension undergoing valvular heart surgery." J Thorac Cardiovasc Surg **132**(6): 1420-1425.

Shubeita, H. E., P. M. McDonough, A. N. Harris, K. U. Knowlton, C. C. Glembotski, J. H. Brown and K. R. Chien (1990). "Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy." J Biol Chem **265**(33): 20555-20562.

Siczkowski, M., J. E. Davies and L. L. Ng (1994). "Sodium-hydrogen antiporter protein in normotensive Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats." J Hypertens **12**(7): 775-781.

Sikandaneer, H. E., S. Y. Park, M. J. Kim, S. N. Park and D. W. Yang (2017). "Neuroprotective effects of sildenafil against oxidative stress and memory dysfunction in mice exposed to noise stress." Behav Brain Res **319**: 37-47.

Singh, T. P. (2010). "Clinical use of sildenafil in pulmonary artery hypertension." Expert Rev Respir Med **4**(1): 13-19.

Slepkov, E. and L. Fliegel (2002). "Structure and function of the NHE1 isoform of the Na⁺/H⁺ exchanger." Biochem Cell Biol **80**(5): 499-508.

Slepkov, E. R., J. K. Rainey, B. D. Sykes and L. Fliegel (2007). "Structural and functional analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger." Biochem J **401**(3): 623-633.

Snabaitis, A. K., R. D'Mello, S. Dashnyam and M. Avkiran (2006). "A novel role for protein phosphatase 2A in receptor-mediated regulation of the cardiac sarcolemmal Na⁺/H⁺ exchanger NHE1." J Biol Chem **281**(29): 20252-20262.

Somvanshi, R. K., X. Qiu and U. Kumar (2013). "Isoproterenol induced hypertrophy and associated signaling pathways are modulated by somatostatin in H9c2 cells." Int J Cardiol **167**(3): 1012-1022.

Son, Y., Y. K. Cheong, N. H. Kim, H. T. Chung, D. G. Kang and H. O. Pae (2011). "Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways?" J Signal Transduct **2011**: 792639.

Song, R., J. Zhang, L. Zhang, G. Wang, D. Wo, J. Feng, X. Li and J. Li (2015). "H₂O₂ induces myocardial hypertrophy in H9c2 cells: a potential role of Ube3a." Cardiovasc Toxicol **15**(1): 23-28.

Straubinger, J., V. Schottle, N. Bork, H. Subramanian, S. Dunnes, M. Russwurm, M. Gawaz, A. Friebe, M. Nemer, V. O. Nikolaev and R. Lukowski (2015). "Sildenafil Does Not Prevent Heart Hypertrophy and Fibrosis Induced by Cardiomyocyte Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling." J Pharmacol Exp Ther **354**(3): 406-416.

Sugden, P. H. and A. Clerk (1998). ""Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium." Circ Res **83**(4): 345-352.

Sun, H. Y., N. P. Wang, M. E. Halkos, F. Kerendi, H. Kin, R. X. Wang, R. A. Guyton and Z. Q. Zhao (2004). "Involvement of Na⁺/H⁺ exchanger in hypoxia/re-oxygenation-induced neonatal rat cardiomyocyte apoptosis." Eur J Pharmacol **486**(2): 121-131.

Takahashi, E., J. Abe, B. Gallis, R. Aebersold, D. J. Spring, E. G. Krebs and B. C. Berk (1999). "p90(RSK) is a serum-stimulated Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1 kinase. Regulatory phosphorylation of serine 703 of Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1." J Biol Chem **274**(29): 20206-20214.

Takeishi, Y., Q. Huang, J. Abe, M. Glassman, W. Che, J. D. Lee, H. Kawakatsu, E. G. Lawrence, B. D. Hoit, B. C. Berk and R. A. Walsh (2001). "Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch." J Mol Cell Cardiol **33**(9): 1637-1648.

Takimoto, E., H. C. Champion, M. Li, D. Belardi, S. Ren, E. R. Rodriguez, D. Bedja, K. L. Gabrielson, Y. Wang and D. A. Kass (2005). "Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy." Nat Med **11**(2): 214-222.

Takimoto, E., H. C. Champion, M. Li, S. Ren, E. R. Rodriguez, B. Tavazzi, G. Lazzarino, N. Paolucci, K. L. Gabrielson, Y. Wang and D. A. Kass (2005). "Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load." J Clin Invest **115**(5): 1221-1231.

Theroux, P., B. R. Chaitman, N. Danchin, L. Erhardt, T. Meinertz, J. S. Schroeder, G. Tognoni, H. D. White, J. T. Willerson and A. Jessel (2000). "Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. Guard during ischemia against necrosis (GUARDIAN) Investigators." Circulation **102**(25): 3032-3038.

Vasquez-Vivar, J., B. Kalyanaraman, P. Martasek, N. Hogg, B. S. Masters, H. Karoui, P. Tordo and K. A. Pritchard, Jr. (1998). "Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9220-9225.

Vaughan-Jones, R. D., F. C. Villafuerte, P. Swietach, T. Yamamoto, A. Rossini and K. W. Spitzer (2006). "pH-Regulated Na⁺ influx into the mammalian ventricular myocyte: the relative role of Na⁺-H⁺ exchange and Na⁺-HCO₃⁻ Co-transport." J Cardiovasc Electrophysiol **17** Suppl 1: S134-S140.

Wakabayashi, S., B. Bertrand, M. Shigekawa, P. Fafournoux and J. Pouyssegur (1994). "Growth factor activation and "H⁺-sensing" of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1). Evidence for an additional mechanism not requiring direct phosphorylation." J Biol Chem **269**(8): 5583-5588.

Wakabayashi, S., P. Fafournoux, C. Sardet and J. Pouyssegur (1992). "The Na⁺/H⁺ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H⁺-sensing"." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(6): 2424-2428.

Walker, D. K., M. J. Ackland, G. C. James, G. J. Muirhead, D. J. Rance, P. Wastall and P. A. Wright (1999). "Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man." Xenobiotica **29**(3): 297-310.

Wang, H., D. Singh and L. Fliegel (1997). "The Na⁺/H⁺ antiporter potentiates growth and retinoic acid-induced differentiation of P19 embryonal carcinoma cells." J Biol Chem **272**(42): 26545-26549.

Wang, Y., S. Huang, V. P. Sah, J. Ross, Jr., J. H. Brown, J. Han and K. R. Chien (1998). "Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family." J Biol Chem **273**(4): 2161-2168.

Watkins, S. J., G. M. Borthwick and H. M. Arthur (2011). "The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro." In Vitro Cell Dev Biol Anim **47**(2): 125-131.

Webb, D. J., S. Freestone, M. J. Allen and G. J. Muirhead (1999). "Sildenafil citrate and blood-pressure-lowering drugs: results of drug interaction studies with an organic nitrate and a calcium antagonist." Am J Cardiol **83**(5A): 21C-28C.

Wei, S., E. C. Rothstein, L. Fliegel, L. J. Dell'Italia and P. A. Lucchesi (2001). "Differential MAP kinase activation and Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger phosphorylation by H₂O₂ in rat cardiac myocytes." Am J Physiol Cell Physiol **281**(5): C1542-1550.

Yaguas, K., R. Bautista, Y. Quiroz, A. Ferrebuz, H. Pons, M. Franco, N. D. Vaziri and B. Rodriguez-Iturbe (2010). "Chronic sildenafil treatment corrects endothelial dysfunction and improves hypertension." Am J Nephrol **31**(4): 283-291.

Yayama, K., M. Horii, H. Hiyoshi, M. Takano, H. Okamoto, S. Kagota and M. Kunitomo (2004). "Up-regulation of angiotensin II type 2 receptor in rat thoracic aorta by pressure-overload." J Pharmacol Exp Ther **308**(2): 736-743.

Yeves, A. M., M. C. Villa-Abrille, N. G. Perez, A. J. Medina, E. M. Escudero and I. L. Ennis (2014). "Physiological cardiac hypertrophy: critical role of AKT in the prevention of NHE-1 hyperactivity." J Mol Cell Cardiol **76**: 186-195.

Yokota, T. and Y. Wang (2016). "p38 MAP kinases in the heart." Gene **575**(2 Pt 2): 369-376.

Zeidan, A., A. Siam, A. Al Kaabba, M. Mohammad and S. Khatib (2012). "The ability of phosphodiesterase-5 inhibitors sildenafil and ordonafil to reverse L-NAME induced cardiac hypertrophy in the rabbit: possible role of calcineurin and p38." Can J Physiol Pharmacol **90**(9): 1247-1255.

Zeymer, U., H. Suryapranata, J. P. Monassier, G. Opolski, J. Davies, G. Rasmanis, G. Linszen, U. Tebbe, R. Schroder, R. Tiemann, T. Machnig, K. L. Neuhaus and E. Investigators (2001). "The Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial." J Am Coll Cardiol **38**(6): 1644-1650.

Zhang, Q., G. Wang, W. Yuan, J. Wu, M. Wang and C. Li (2015). "The effects of phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil against post-resuscitation myocardial and intestinal microcirculatory dysfunction by attenuating apoptosis and regulating microRNAs expression: essential role of nitric oxide synthases signaling." J Transl Med **13**: 177.

Zorov, D. B., C. R. Filburn, L. O. Klotz, J. L. Zweier and S. J. Sollott (2000). "Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes." J Exp Med **192**(7): 1001-1014.