



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**MODULACIÓN DE LA CONTRACTILIDAD  
CARDÍACA POR p38-MAPK: ROL DEL  
INTERCAMBIADOR  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE-1) Y DEL  
ESTRÉS OXIDATIVO. POSIBLES IMPLICANCIAS  
CLÍNICAS**

---

**Tesista: Lic. Zavala, Maite Raquel**

**Director/a: Dra. Villa Abrille, María Celeste**

**Codirector/a: Dr. Pérez, Néstor Gustavo**

**Año: 2022**

El presente Trabajo de Tesis Doctoral fue realizado en el Centro de Investigaciones Cardiovasculares “Dr. Horacio E. Cingolani” (CIC), bajo la dirección de la Dra. María Celeste Villa Abrille y la codirección del Dr. Néstor Gustavo Pérez.



Los resultados del presente trabajo forman parte de los siguientes artículos científicos que han sido publicados en revistas de especialidad:

1. **Maite R. Zavala**, Romina G. Díaz, Andrés J. Medina, María P. Acosta, Daiana S. Escudero, Irene L. Ennis IL, Néstor G. Pérez, María C. Villa-Abrille. *p38-MAP kinase negatively regulates the slow force response to stretch in rat myocardium through the up-regulation of dual specificity phosphatase 6 (DUSP6)*. Cellular Physiology and Biochemistry. 52(2):172-185. Epub 2019 Feb 28. doi: 10.33594/000000012.
2. **Zavala MR**, Díaz RG, Villa-Abrille MC, and Pérez NG. *Thioredoxin 1 (TRX1) Overexpression Cancels the Slow Force Response (SFR) Development*. Front. Cardiovasc. Med. 26 February 2021. 8:622583. doi: 10.3389/fcvm.2021.622583

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quiero agradecer a las autoridades actuales del Centro de Investigaciones Cardiovasculares Dr. Horacio E. Cingolani, el Dr. Martín Vila Petroff y el Dr. Alejandro Aiello, que me abrieron las puertas del centro para realizar mi Tesina de grado, así como la Tesis Doctoral. A la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y la Facultad de Ciencias Exactas, que me dieron la oportunidad de obtener mi título de Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular y realizar un doctorado de manera gratuita. A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Ciencia y Técnica (CONICET) por haberme otorgado las becas para que pueda llevar a cabo este trabajo de Tesis.

Mi más profundo agradecimiento a mi directora, María Celeste Villa-Abrille. Gracias por guiarme todos estos años tanto laboral como personalmente. Desde el primer día que llegué al CIC, para empezar a probar lo que era la investigación, confiaste en mí, me aconsejaste, me ayudaste a recibirme, y hoy, diez años después, acá estamos finalizando esta Tesis, discutiendo resultados y hablando de la vida. Muchas gracias por explicarme una y mil veces las cosas, por la paciencia, la buena onda, las charlas personales y laborales; por hacerme descubrir la docencia, algo que no sabía que me gustaba tanto. Por creer en mí y demostrarme que puedo. Por ser una persona en la cual confiar, que estuvo en buenas y malas siempre.

A mi co-director, Néstor Gustavo Pérez. Infinitas gracias por todos estos años, desde lo laboral a lo personal. Por la ayuda constante en experimentos y la redacción de los manuscritos. Los consejos como director y los consejos como “padre”. Por estar ahí para cualquier consulta, por la paciencia, los chistes (infaltables cada vez que nos vemos, y que siempre me sacan una sonrisa). Por comprometerte tanto con mis proyectos que hasta no dormís pensando en los resultados. Gracias por destrabar una nueva obsesión con la “perfección” de las figuras, para que todo este milimétricamente alineado en el Corel.

Gracias a ambos, mis “padres de la ciencia” por transmitirme sus conocimientos, y hacer todo para garantizar mi progreso.

A Gisel Díaz, mi gran compañera de experimentos. Gracias por la ayuda siempre. Desde el día a día en el laboratorio, hasta practicar mi primer póster en inglés. Por poder hablar sin problema de cualquier tema, por entenderme ya que en muchas cosas somos iguales. Gracias por sentarte conmigo a buscar información, escribir, o analizar datos, así como compartir charlas de la vida.

Gracias Claudia Caldiz, por los consejos, el apoyo, y por tu tiempo, sobre todo por haberme ayudado con experimentos en plena pandemia. A Irene Ennis, por el apoyo incondicional, la paciencia y por estar siempre ahí para enseñarme un poco más sobre fisiología. Y gracias por hacerme ver lo linda que es la docencia. Gracias a Julieta Palomeque, por permitirme estar en sus proyectos, y la buena onda más allá de todo. Gracias a Sabina Maté por la ayuda y buena onda de siempre.

Al CIC. A todos y cada uno de sus integrantes, que desde su lugar siempre estuvieron dispuestos a darme una mano en lo que necesitara. Becario/as, CPAs, secretario/as, investigadores. A todo/as muchas gracias. Un agradecimiento especial a los que me ayudaron aportando sus conocimientos y buena voluntad, y aquellos con los que compartimos el almuerzo de las 12 pm. Vero, Caro Ciancio, Alex, Ale Yeves, Ale Orlos, Luis, Charly, Luisa, Caro Jaquenod, Male, Lean Diaz, Flor, Dai, Lean Di Cianni, Mónica, Juan, Omin, Omar.

A los y las becario/as. Gracias por la ayuda, los consejos experimentales, por bancar cuando tenía un mal día y apoyarme siempre, pero por sobre todo por compartir hermosos momentos fuera del laboratorio. Gracias Josh, Fio, Ale Ibañez, Erika, Vale, Sofi, Ale Ciocci, Manu, Juani, Ale Cely, y Andrés. Gracias por la buena onda a Rocío, Sofí y Delfi.

Gracias a dos personas que además de compartir proyectos, experimentos, congresos y salidas, se convirtieron en amigas, Romi Di Mattia y Mari Federico. Gracias por estar siempre, en buenas y malas, ahí están.

A Sole, no solo por el tiempo compartido en el laboratorio, sino la compañía a distancia del último tiempo en pandemia. Gracias por hacer los días más llevaderos y felices con audios eternos del tema que se nos ocurra.

Un agradecimiento especial a Gime, mi amiga incondicional, la que hizo toda la carrera conmigo, y hoy sigue ahí, firme, a mi lado siempre. Gracias por tus más sinceros consejos, tu bondad, tu cariño, por darme fuerzas para todo lo que hago. A Jime, amiga de las que no te falla nunca, que te escucha, te aconseja, y te hace hermosos regalos porque sí, porque ella es así de buena. A Yeyé, que siempre cerca o lejos está para ayudar y darte una mano en lo que sea.

Eternas gracias a ellas, las de siempre, las de toda la vida (literal), las que conocen cada detalle mío y me quieren, así como soy. Las hermanas que me dio la vida y no las cambio por nada. Mer, Agus y Cami. Desde primer grado, cumpleaños, viajes. Las que si tenés un mal día, te llaman, tiran chistes, o lo que sea para verte sonreír, y si es un buen día se alegran con vos. Gracias por confiar en mí. A Flor, Emi y Vic, gracias por estar ahí, por apoyarme siempre, por festejar mis logros como si fueran suyos. A mis amigos de siempre, Nacho, Gabo, David y Gero. Gracias por estar siempre, por las salidas, los viajes, por bancarme cuando caigo sola, por la ayuda. A todos ellos, gracias por el cariño incondicional, siempre feliz de tenerlos cerca.

Por último, pero no menos importante a una gran parte de mi vida. Mi familia. Gracias a mis abuelos, Gracia, Vilma, Rafael, Luis y Syra. A mis tíos, Gaby, Ro, Shirley, Gus, Pepe y Elena que siempre se preocuparon por mí y están para lo que necesite. A mis primos, Mai (si habremos hablado de la vida), Gonza y Eve, Joaco y Agus. A Mamá y Papá. Decirles gracias nunca va a ser suficiente. Sin su apoyo incondicional y confianza plena no sería quién soy. Gracias por estar siempre a mi lado y empujarme hacia adelante. A Lalo, mi hermanito. Feliz de tenerte conmigo siempre. Gracias por tu positivismo y tu buena onda. Gracias a Sofi por estar ahí dándome fuerzas, y mensajes alegres.

*A todos y cada uno de ellos, Muchas Gracias.*

## Índice

|  |    |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN .....   | 8  |
| 1. Respuesta contráctil del miocardio al estiramiento de la pared ventricular..          | 10 |
| 2. SFF: mediadores involucrados .....  | 13 |
| 2.1. Intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> : NHE .....                          | 13 |
| 2.1.1. NHE-1.....  | 15 |
| 2.1.2. p90RSK y ERK1/2: quinasas “upstream” del NHE-1 .....                              | 16 |
| 2.1.3. NHE-1 y SFF .....   | 20 |
| 2.1.4. Hiperactividad del NHE-1 y patologías cardíacas .....                             | 20 |
| 2.2. p38-MAPK: características generales y rol en la contractilidad cardíaca .....       | 21 |
| 2.3. Fosfatasa dual específica (DUSPs) .....   | 23 |
| 2.4. Especies reactivas del oxígeno “ROS” .....  | 25 |
| 2.4.1. ROS y señalización celular .....  | 25 |
| 2.4.2. Sistema antioxidante TRX/TRXr.....  | 27 |
| OBJETIVOS.....   | 30 |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 32 |
| 1. Animales Experimentales.....  | 33 |
| 2. Composición de buffers, geles y soluciones (en orden alfabético) .....                | 33 |
| 3. Reactivos .....   | 35 |
| 4. Extracción de corazones .....   | 36 |
| 5. Aislamiento de músculos papilares y tiras de ventrículo izquierdo .....               | 36 |
| 6. Determinación de la fuerza desarrollada (FD) y de la SFF .....                        | 37 |
| 7. Grupos experimentales.....  | 38 |
| 8. Cálculo de parámetros: TTP, T1/2 +T/-T .....  | 39 |
| 9. Actividad del NHE-1 y variación del pH <sub>i</sub> en músculos papilares .....       | 39 |
| 9.1. Estudio del efecto del estiramiento sobre la recuperación del pH <sub>i</sub> ..... | 41 |
| 9.2. Acidosis intracelular .....   | 41 |
| 10. Determinación de fosforilación o expresión de proteínas .....                        | 43 |
| 10.1. Homogeneización de músculos papilares y de ventrículo izquierdo .....              | 43 |
| 10.2. Cuantificación de proteína total.....  | 43 |
| 10.3. Preparación de muestras .....  | 44 |
| 10.4. Western blot.....  | 44 |
| 11. Determinación indirecta de la actividad del NHE-1.....                               | 47 |
| 11.1. Homogenización.....  | 47 |
| 11.2. Determinación de proteína total.....   | 47 |

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| 11.3.              | Inmunoprecipitación .....   | 48 |
| 11.4.              | Western blot.....   | 48 |
| 12.                | Determinación de ARNm por RT-PCR .....  | 49 |
| 13.                | Determinación de anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ).....  | 50 |
| 14.                | Ecocardiografía en ratones transgénicos.....  | 50 |
| 15.                | Análisis estadístico .....  | 51 |
| RESULTADOS .....   |   | 52 |
|                    | Participación de p38-MAPK sobre el desarrollo de la SFF.....  | 53 |
|                    | p38-MAPK y activación de Fosfolamban (PLN) .....  | 68 |
|                    | Papel de la fosfatasa DUSP6 en la regulación de la actividad del NHE-1 luego del estiramiento del miocardio ..... | 70 |
|                    | Rol del estrés oxidativo y la defensa antioxidante en el desarrollo de la SFF... 73                               |    |
| DISCUSIÓN.....     |   | 85 |
|                    | p38-MAPK y contractilidad.....  | 86 |
|                    | p38-MAPK y NHE-1.....   | 88 |
|                    | p38-MAPK y fosfatasas DUSPs .....   | 90 |
|                    | p38-MAPK y Fosfolamban .....  | 92 |
|                    | p38-MAPK y ROS .....  | 93 |
|                    | TRX1 y ROS .....  | 94 |
|                    | Posibles implicancias clínicas .....  | 95 |
| CONCLUSIONES ..... |   | 96 |

# **INTRODUCCIÓN**



La principal función del corazón es generar un gradiente de presión en el sistema circulatorio que permita impulsar la sangre en cantidad suficiente como para cubrir las demandas metabólicas de los tejidos, y para el adecuado intercambio de gases en la circulación pulmonar. Para ejercer esta crucial función de bomba, el corazón se contrae intermitentemente a razón de 70-80 veces por minuto, y recibe en forma permanente la sangre que proviene de los vasos. Su actividad se encuentra regulada por mecanismos extrínsecos e intrínsecos, capaces de adaptar el volumen eyectado a cambios en las condiciones hemodinámicas. En este sentido, tres factores resultan cruciales para determinar que el volumen eyectado durante la sístole ventricular responda adecuadamente a dichas demandas hemodinámicas: precarga, poscarga y contractilidad. Entre estos factores, la respuesta contráctil del músculo cardíaco al estiramiento parietal (determinante de la precarga, directamente ligada a cambios en el volumen telediastólico) juega un papel clave. El presente trabajo de Tesis Doctoral se centró en este importante mecanismo adaptativo, pero focalizando en la profundización del estudio de un aspecto menos conocido, sumamente interesante por sus connotaciones fisiológicas y a su vez potencialmente patológicas, y que se encuentra escuetamente desarrollado en los libros de fisiología: la “Segunda Fase de Fuerza” (SFF) post-estiramiento, que refiere al aumento lento de fuerza contráctil que se desarrolla luego de la fase rápida inicial, expresión del conocido “Mecanismo de Frank-Starling del corazón”.

Durante los últimos 25 años, nuestro grupo de trabajo ha aportado sólidas evidencias científicas que demuestran que la SFF en respuesta a cambios de precarga es la expresión de un mecanismo autocrino/paracrino disparado por el estiramiento parietal, que desencadena una compleja ruta de señalización que incluye factores de crecimiento, estrés oxidativo, y activación de proteínas de membrana responsables de generar un incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular. En este contexto, el desarrollo del presente trabajo de Tesis ha permitido aportar valiosas evidencias acerca del rol que ejerce la quinasa p38-MAPK sobre la SFF, y a su vez ha contribuido a un mayor entendimiento del papel que juegan las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés “Reactive Oxygen Species”) sobre la misma. Con la idea de familiarizar al lector con el tema, los próximos apartados de esta introducción abordarán resumidamente los aspectos generales de la respuesta contráctil del miocardio al estiramiento, así como las

características y funciones de los principales mediadores del desarrollo de la SFF, para luego plantear los objetivos propuestos, describir las herramientas que se dispusieron para cumplirlos, y presentar/discutir las evidencias recogidas.

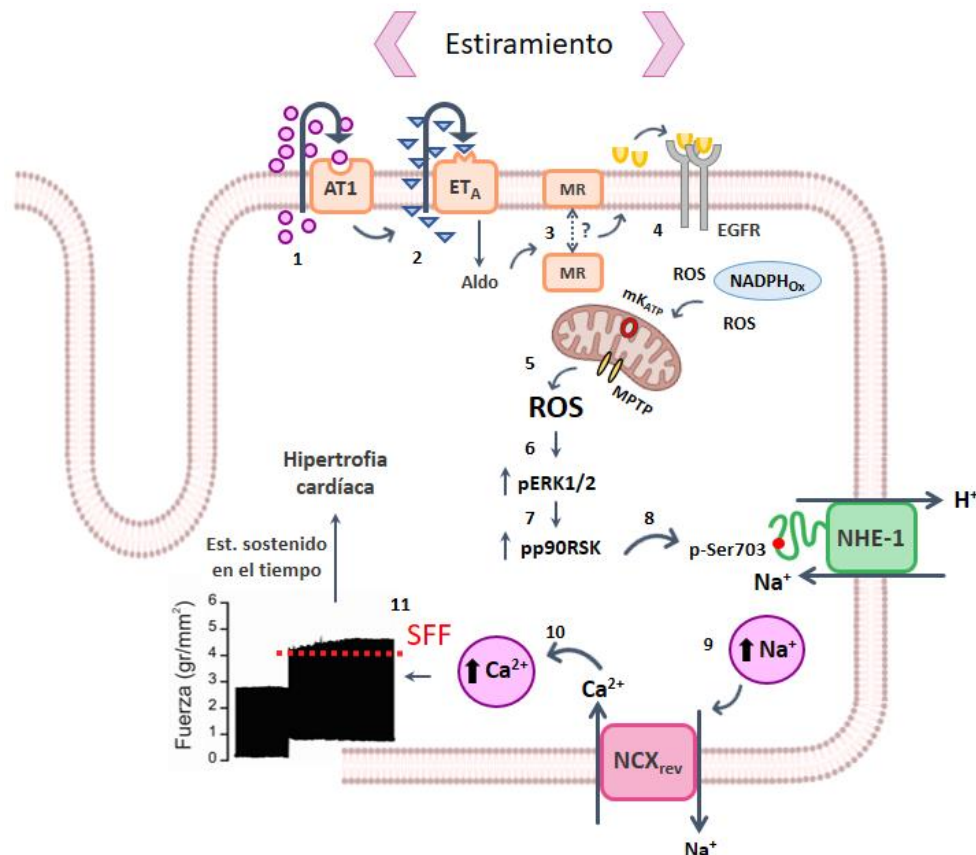
## **1. Respuesta contráctil del miocardio al estiramiento de la pared ventricular**

El estiramiento del miocardio provoca un incremento de la fuerza contráctil en dos fases: una primera inmediata debida al conocido mecanismo de Frank-Starling, seguida de una más lenta denominada SFF, que se considera la manifestación ex vivo del “efecto Anrep” que describiremos en un párrafo posterior. El mecanismo de Frank-Starling o de regulación heterométrica del corazón, fue descrito por Otto Frank y Ernest Starling entre finales del siglo XIX y comienzos del XX. El mismo propone una relación entre la longitud de los sarcómeros de las células miocárdicas y la fuerza de contracción ejercida por el corazón, de modo que, frente a un aumento del retorno venoso, el volumen de sangre aumentará en las cavidades estirando aún más la pared, provocando mayor tensión y finalmente una mayor fuerza de contracción. Estos investigadores plantearon además la existencia de una “longitud óptima” en la cual el corazón realizará su fuerza máxima, mientras que por debajo o por encima de ésta, la fuerza disminuiría. Es importante destacar que durante esta primera fase post-estiramiento existe un incremento de la respuesta de las proteínas contráctiles al calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), sin aumento en la concentración intracelular de dicho ion ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), factor clave para el desarrollo de fuerza contráctil en el músculo. En otras palabras, para una dada  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  el estiramiento optimiza la interacción de los miofilamentos entre sí mejorando la afinidad de las proteínas contráctiles por el ion, generando así un mayor desarrollo de tensión.

Como se dijo antes, si el estiramiento muscular perdura en el tiempo se desarrolla un segundo aumento de fuerza de forma más lenta, hasta lograr su estabilización al cabo de ~10 minutos. Este comportamiento de la fuerza en dos fases sucesivas fue inicialmente descrito en perros por Gleb von Anrep en 1912, quien descubrió que un aumento súbito de la poscarga (generado por oclusión parcial de la aorta ascendente), producía un aumento inmediato del volumen del corazón, así como de las presiones intraventriculares, junto con una disminución abrupta del volumen eyectado. Sin embargo, y a pesar de la persistencia de la constricción aórtica, se observaba luego un

lento retorno hacia el volumen ventricular previo, acompañado de una recuperación (también gradual) del volumen eyectado [1]. von Anrep interpretó acertadamente que se trataba de la manifestación de un efecto inotrópico positivo, sugiriendo que sería consecuencia de la liberación de catecolaminas por las glándulas adrenales en respuesta a una caída en la perfusión sanguínea. Esto último fue descartado varios años después cuando se demostró que el efecto se repetía en corazones aislados, pero más allá del error de interpretación, von Anrep había sentado las bases de lo que *Sarnoff y col.* llamarían “autorregulación homeométrica del corazón” [2]. Algunos años más tarde, las dos fases de aumento de fuerza post-estiramiento fueron puestas de manifiesto en músculos papilares y trabéculas aisladas de miocardio, donde además se logró demostrar que la SFF era consecuencia de un aumento en la amplitud del transitorio de  $Ca^{2+}$  [3], a diferencia de lo que ocurría durante la primera fase. La SFF se propone como el equivalente *ex vivo* del “efecto Anrep”, y constituye un mecanismo por el cual el corazón se adapta frente a cambios en las condiciones hemodinámicas, aumentando la contractilidad ante un incremento de la poscarga o del retorno venoso. Es importante destacar que el mismo estímulo mecánico que genera aumento de fuerza contráctil (estiramiento de la pared), puede conducir a hipertrofia cardíaca si se sostiene en el tiempo, patología que junto con la insuficiencia cardíaca constituyen las principales causas de enfermedad y muerte a nivel mundial. Es por esta razón, que la caracterización precisa de los mecanismos intracelulares que subyacen al incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  que generan la SFF, y que si se sostienen pueden conducir hacia a la hipertrofia cardíaca, podrían eventualmente sentar bases para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra esta patología. En este sentido, experimentos de nuestro laboratorio han permitido demostrar que la SFF constituye la expresión mecánica de un mecanismo autocrino/paracrino desencadenado por el estiramiento del miocardio [4], que se inicia con la activación del receptor tipo 1, AT1, de Angiotensina II (Ang II), continúa con la producción/liberación de Endotelina 1 (ET-1) por parte del miocardio con la consecuente activación de su receptor tipo A, ET<sub>A</sub>, estimulación del receptor de mineralocorticoides (MR) y transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Esto desencadena un incremento en la producción de las ROS por parte de la mitocondria, inducidas por una pequeña cantidad de ROS dependientes de la activación de la NADPH oxidasa (NOX), en un mecanismo que conocido como

“liberación de ROS inducida por ROS” [5] Posteriormente, estas ROS activan ERK1/2 y p90RSK, quinasas redox sensibles responsables de la fosforilación/activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE-1), con el consecuente aumento de la  $[\text{Na}^+]_i$ . Esto favorece que el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) funcione en su modo reverso, resultando así en un incremento en la amplitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$ , responsable final del incremento de fuerza durante la SFF (**Figura 1**).



**Figura 1: Cascada de señalización intracelular disparada por el estiramiento del miocardio.** La secuencia numérica del “1” a “11” sirve para clarificar los pasos sucesivos que conducen al desarrollo de la SFF (véase texto para más detalle). Ald: aldosterona; MMP: metaloproteína involucrada en el proceso de transactivación del EGFR; mK<sub>ATP</sub>: canal de potasio ATP dependiente mitocondrial; MPTP: poro de permeabilidad transitoria mitocondrial; NCX<sub>rev</sub>: modo reverso del NCX, Est: estiramiento. Adaptada con permiso de *Villa-Abrille, M.C., et al* [6].

Es importante destacar, que el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se ha vinculado con la activación de diversas señales pro-hipertróficas, como por ejemplo las vías de calcineurina/factor nuclear de células T activadas (NFAT), quinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CaMKII), entre otras [7]. Esto, sumado a la participación de conocidos factores de crecimiento como Ang II y ET refuerzan la idea de la similitud entre la vía de señalización

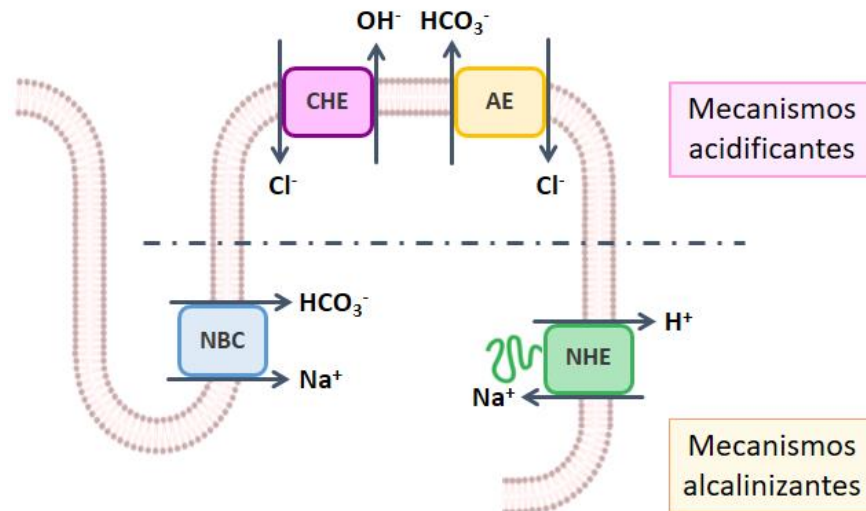
que desencadena la SFF con aquellas que generan hipertrofia e insuficiencia cardíaca [8, 9]. Más aún, otro de los puntos más relevantes de esta vía de señalización es la participación del NHE-1, cuya hiperactividad resulta crucial para el desarrollo de la SFF [4, 10], pero también lo es para el desarrollo de hipertrofia cardíaca [11], motivo por el cual la siguiente sección resumirá las principales características y la función de esta importante proteína.

## 2. SFF: mediadores involucrados

### 2.1. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ : NHE

El metabolismo celular produce una gran cantidad de  $\text{H}^+$  que, de acumularse en el espacio intracelular, podrían perturbar el funcionamiento de las células. En cardiomiocitos se ha visto que un desbalance en la  $[\text{H}^+]$ , puede reducir la sensibilidad de los miofilamentos al  $\text{Ca}^{2+}$  [12], afectar al funcionamiento del NCX [13] o de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplasmático (SERCA2a) [14], así como alterar las  $[\text{Ca}^{2+}]$  sistólicas y diastólicas [15], eventos que culminan en una disfunción contráctil. Es por esto, que se requiere un fino control del pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ) para mantenerlo en un rango estable de  $\sim 7,1-7,2$ .

Las células poseen tanto mecanismos acidificantes como alcalinizantes (**Figura 2**). Entre los primeros podemos mencionar al intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  ("AE" del inglés anion exchanger) y el  $\text{Cl}^-/\text{OH}^-$  (CHE) [16], quienes se activan frente a un aumento del  $\text{pH}_i$ . Dentro de los mecanismos alcalinizantes se encuentran el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) [17] y el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (NBC) [18, 19], que eliminando  $\text{H}^+$  o introduciendo  $\text{HCO}_3^-$  respectivamente, logran reestablecer los valores del  $\text{pH}_i$ .



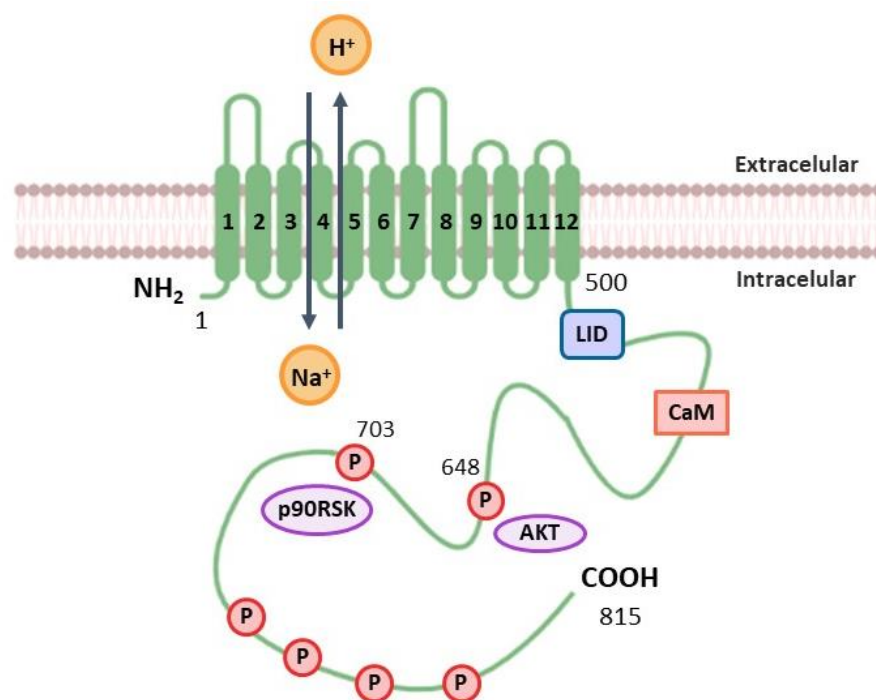
**Figura 2: Esquema de los principales transportadores de membrana responsables del mantenimiento del pHi.**

En condiciones basales el pHi de los cardiomiocitos es más ácido que el del líquido extracelular y esto se debe a que, todos los sistemas de regulación de pH tienen algún grado de actividad basal [19]. El NHE, de particular interés para este trabajo de Tesis, es una proteína integral de membrana que participa en el intercambio electroneuro de un Na<sup>+</sup> extracelular por un H<sup>+</sup> intracelular. El modelo más aceptado es que la extrusión de estos H<sup>+</sup> se da por un aumento en la sensibilidad del sitio alostérico a dichos H<sup>+</sup> citoplasmáticos, más que a una dependencia del pH externo [12]. Se lo clasifica como transportador activo secundario ya que usa el gradiente electroquímico del Na<sup>+</sup> para impulsar el movimiento del H<sup>+</sup> en contra de su gradiente (no utilizando directamente la energía de la hidrólisis del ATP) [20]. Una de sus funciones principales es la regulación fina del pHi, ya que de ello depende la homeostasis celular, pero además participa de la regulación de otros procesos fisiológicos como control del volumen celular, homeostasis de electrolitos o equilibrio ácido-base, siendo además una de las principales vías de ingreso de Na<sup>+</sup> a la célula [20, 21]. Hasta la fecha, se han identificado 10 isoformas (NHE-1 a NHE-10) [22]. Las isoformas 2 a 5 se encuentran expresadas en la membrana plasmática, mientras que las 6 a 9 se encuentran en membranas intracelulares, específicamente en el aparato de Golgi donde mantienen el valor de pH ácido [23]. Por otro lado, se ha visto que la isoforma 10 se encuentra restringida a los osteoclastos [24], mientras que la 3 participa en la reabsorción de Na<sup>+</sup> en el túbulo renal [25]. La isoforma 1 tiene expresión ubicua, encontrándose en la membrana plasmática, así como en la

membrana de algunas organelas [26], siendo la principal y más relevante (en cuanto a expresión) a nivel cardíaco. Por lo tanto, de aquí en más se hablará exclusivamente de esta isoforma.

### 2.1.1. NHE-1

El NHE-1 está codificado por el gen SLC9A1. Tiene un peso molecular de 91 kDa y 2 sitios de glicosilación, que podrían aumentar su peso molecular hasta 110 kDa. Está conformado por 815 aminoácidos dispuestos en 2 dominios funcionales: el extremo Amino-terminal (NH<sub>2</sub>) formado por 12 segmentos transmembrana de 500 aminoácidos, responsable del intercambio iónico, y otro dominio citoplasmático de 315 aminoácidos que forman el extremo Carboxilo-terminal (COOH), encargado de la regulación de su actividad [22, 27] (**Figura 3**).



**Figura 3: Modelo topológico del NHE-1 mostrando algunos elementos regulatorios.** Se observan los 12 dominios transmembrana y la cola citoplasmática, donde se muestran algunos sitios de regulación como puntos de fosforilación o de unión a lípidos (LID); así como también los sitios de unión de ciertas proteínas reguladoras como Calmodulina (CaM). AKT: proteína quinasa B.

En cuanto a su localización, diferentes reportes indican que se encuentra mayoritariamente en la membrana plasmática, y en el caso de los cardiomiocitos se localiza específicamente en los discos intercalares [28] y en los túbulos t [29]. Esta

distribución espacial sugiere que puede regular el  $pH_i$  en los discos intercalares, y selectivamente en el entorno de proteínas cuya función es sensible a los cambios de pH (Ej. Conexina 43), como también cerca de la superficie citosólica de las cisternas del retículo sarcoplasmático (Ej. Receptor de Rianodina, RyR), influyendo así en la conducción de impulsos y en el acoplamiento excito-contráctil [30].

La actividad del NHE-1 se encuentra regulada por diversos mecanismos. Por un lado, se puede modular a través de cambios en la transcripción. En corazón, se ha visto que estímulos estresores como la acidosis crónica, isquemia, ligadura de la coronaria anterior, entre otros, elevan los niveles de ARNm del NHE-1 [31]. Por otro lado, estímulos extracelulares como factores de crecimiento, hormonas peptídicas (Ang II, ET1, noradrenalina, trombina, vasopresina) o estímulos mecánicos, pueden mediar la activación e interacción de proteínas o moléculas con el dominio citoplasmático del intercambiador [12, 31]. Dentro de esta cola citosólica existen diversos sitios de unión a factores reguladores como ATP, calcineurina, calmodulina (proteína de unión a  $Ca^{2+}$ ), hormonas, quinasas, fosfatasas, proteínas del citoesqueleto y de unión a lípidos como el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) [12, 31, 32] (**Figura 3**).

En el miocardio, la principal vía de modulación de la actividad del NHE1, es mediante la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) [33], como por ejemplo la vía MEK-ERK-p90RSK [20], que pueden fosforilar diversos residuos del extremo citoplasmático. Se ha visto que la quinasa p90RSK fosforila directamente al sitio Serina 703 (Ser703) del NHE-1 humano, incrementando su actividad [34]. Cuando este residuo es fosforilado, crea un sitio consenso para la unión de la proteína de andamiaje multifuncional 14-3-3, la cual podría servir como punto focal para la unión de otras moléculas de señalización [20]. Adicionalmente, *Snabaitis* y *col.* demostraron que, cuando se fosforila el sitio Ser648 mediado por la Proteína quinasa B/Akt, la actividad del intercambiador disminuye [35].

### **2.1.2. p90RSK y ERK1/2: quinasas “upstream” del NHE-1**

Como se indicó en el apartado **2.1.1**, el NHE-1 puede activarse por diversos mecanismos, uno de los cuales resulta de la fosforilación producida por quinasas en diversos sitios dentro de su cola citoplasmática, siendo uno de ellos la Ser703, cuya



fosforilación es el resultado final de la activación de la ruta de las quinasas redox-sensibles ERK1/2-p90RSK que se describirán a continuación.

### *p90RSK*

Las *quinasas ribosomales S6 (RSK) de 90 kDa (p90 ribosomal S6 kinases)*, son un grupo de Serina/Treonina (Ser/Thr) quinasas, que actúan aguas abajo de la vía de señalización Ras-MAPK (siendo conocidas como proteínas quinasas activadas por MAPK, MAPKAP-K1) [36], y participan de la regulación de diversos procesos celulares como crecimiento celular, migración, supervivencia y proliferación celular [36]. Esta familia de quinasas está compuesta por seis proteínas: cuatro isoformas humanas de RSK (RSK1-4, siendo RSK1 también designada como p90RSK [37, 38], y dos homólogos estructuralmente relacionados, la quinasa-1 y 2 activada por mitógenos y estrés, MSK1 y MSK2, respectivamente. Las isoformas RSK son activadas directamente por las ERK1/2 en respuesta a factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores, o a través de autofosforilación [36, 39]. Si bien fosforila diversos sustratos citosólicos y nucleares implicados en la regulación de procesos fisiológicos, se ha visto que la hiperactividad de las RSK se asocia con múltiples patologías como cáncer, enfermedades cardiovasculares, fibrosis pulmonar, entre otras [37]. Diversas investigaciones proponen que la p90RSK contribuye a la hipertensión y la cardiomiopatía a través de la fosforilación y activación del NHE-1 [37], proteína que se sabe, está involucrada en la disfunción cardíaca [22]. En cardiomiocitos de rata se ha descrito que regula la actividad del NHE-1 [40] a través de la fosforilación de los residuos Ser703 y/o Ser770/771 dentro del dominio regulador del NHE-1 incrementando su actividad [34, 41]. De hecho, se la conoce como “quinasa del NHE-1” [39].

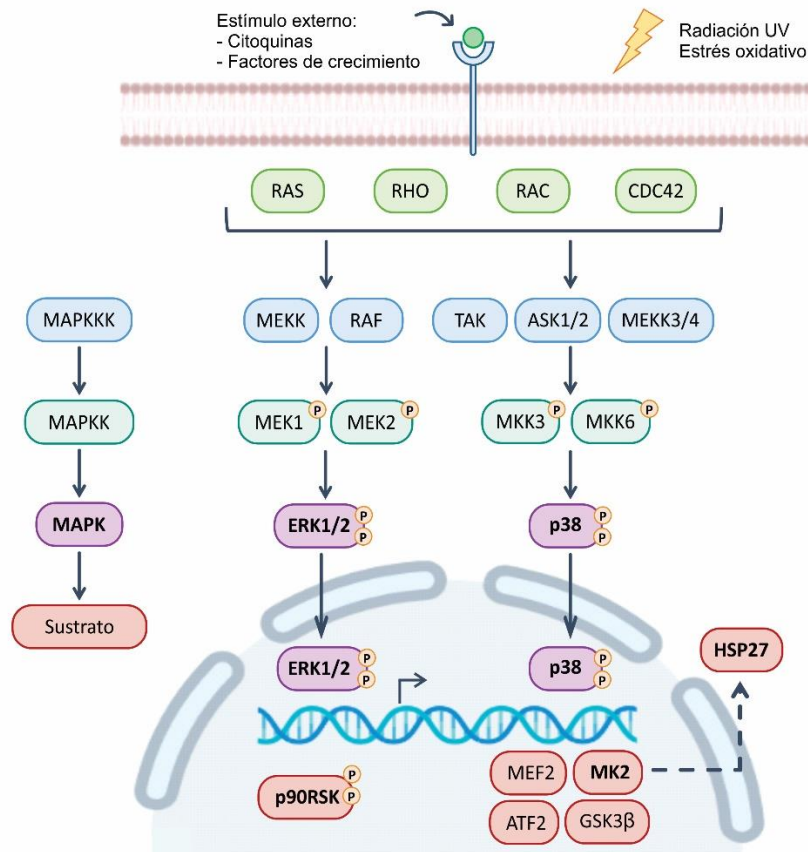
A lo largo de los años se ha encontrado que el NHE-1 juega un papel importante en el daño por isquemia/reperfusión, y que su inhibición farmacológica reduce de forma significativa el tamaño del infarto y mejora la función cardíaca [22, 27]. Sin embargo, los ensayos clínicos mostraron una protección limitada o nula [22, 37]. Este último resultado puede ser la consecuencia de la inhibición de la función basal del NHE-1, remarcando su importancia homeostática, y es por ello que nuevas investigaciones apuntan al desarrollo de fármacos que inhiban o regulen la actividad de quinasas que modulan al NHE-1, como p90RSK, con el objetivo de utilizarlos en las enfermedades

cardiovasculares [37, 42]. Por ejemplo, *Maekawa y col.* demostraron que el silenciamiento de la p90RSK (en un modelo de ratones transgénicos doble mutantes negativos para RSK1), era suficiente para prevenir la activación del NHE-1 y mejorar así el daño producido por isquemia/reperfusión [42].

Como se mencionó, la p90RSK activa al NHE-1 al agregar un grupo fosfato en el sitio Ser703 [34, 42]. Cuando este sitio se encuentra fosforilado crea una secuencia (RIGSDP) similar a la secuencia consenso (RSXSXP) específica para ligandos 14-3-3, lo que llevó a investigar si las proteínas 14-3-3 se podían unir al NHE-1 [43]. Las proteínas 14-3-3 interactúan con diversas proteínas celulares como quinasas, receptores, proteínas estructurales, enzimas y proteínas G pequeñas [44]. El principal motivo de unión para 14-3-3 es una Serina fosforilada (fosfoserina). Dentro de las funciones que cumplen en mamíferos, se puede encontrar la regulación de la actividad de las proteínas con las que interactúan, así como la modulación de la apoptosis y varias vías de señalización celular [44]. Por ejemplo, se sabe que las proteínas 14-3-3 actúan como un andamio para varias proteínas en las vías de las MAPK, incluidas MEKK1, 2 y 3 [44]. Basándose en la similitud de secuencia del sitio de unión 14-3-3 en el NHE-1 y los identificados en ligandos de 14-3-3 conocidos, *Lehoux y col.* demostraron que la fosforilación del NHE-1 en la Ser703 debida a la quinasa p90RSK, crea un sitio de unión para 14-3-3 [43]. Sumado a esto, encontraron que esta unión modula la actividad del intercambiador y que previene la desfosforilación de este sitio [43, 44].

### *ERK1/2*

Las quinasas activadas por señales extracelulares (*Extracellular signal-regulated kinase*) son un grupo de proteínas que forman parte de las MAPKs, una familia de quinasas que participan en la regulación de varios procesos celulares como el crecimiento, el metabolismo, la diferenciación, la expresión génica y la apoptosis [45]. Entre las moléculas de señalización que las activan figuran factores de crecimiento, citoquinas, neurotransmisores, hormonas o agonistas cuyos receptores están acoplados a proteína G [46] o a tirosinas quinasas [47]. Las MAPKs en mamíferos se pueden agrupar en 2 clases: las convencionales (ERK1 y ERK2, la JNK y la p38-MAPK) (**Figura 4**); y las atípicas (ERK3/4, ERK5, ERK7 y ERK8).



**Figura 4: Cascada de señalización de las MAPK convencionales.** Se muestran los diferentes estímulos externos que pueden activar las vías de señalización de las dos MAPK convencionales que serán mencionadas en este trabajo de Tesis, así como algunos de sus sustratos. Los estímulos activan receptores tirosin quinasa, acoplados a proteína G, entre otros, que provocan eventos de fosforilación secuencial canónicos de tres niveles que comprenden a la MAPKKK, la MAPKK y la activación de las MAPK. Estas últimas, una vez activadas se traslocan al núcleo y desencadenan respuestas celulares como la transcripción de genes de proliferación, inflamatorios, apoptóticos, entre otros. Figura adaptada de [48, 49].

Tanto la ERK1 como la ERK2 (ampliamente conocidas como ERK1/2 por su alta secuencia de homología) son Ser/Thr quinasas, es decir fosforilan a sus sustratos en residuos de Serina y Treonina precedidos por un residuo rico en prolina [50], que participan en la cascada de transducción de señales Ras-Raf-MEK-ERK (**Figura 4**).

Se conocen más de 50 sustratos de la familia ERK1/2, incluyendo fosfoproteínas, fosfatasa, proteínas quinasas de la familia RSK, AMPc fosfodiesterasas (PDE4), la fosfolipasa A2 citosólica, proteínas del citoesqueleto y apoptóticas, así como moléculas reguladoras y de señalización [51]. Dentro de la familia de la RSK quinasa, ERK1/2 activa directamente a estas enzimas por fosforilación, en respuesta a factores de crecimiento, hormonas polipeptídicas, neurotransmisores y quimiocinas [51] (**Figura 4**).

Experimentos de nuestro laboratorio permitieron demostrar que, al estirar músculos papilares de gato, se producía un incremento significativo de la fosforilación de ERK1/2, así como de p90RSK, efecto que se previene cuando los músculos son pre-incubados con Losartán (inhibidor del receptor tipo 1 de Ang II, AT1), droga que también abolía el desarrollo de la SFF. A su vez, demostraron que, al inhibir a la MEK (proteína responsable de la activación de ERK1/2), se cancelaba el desarrollo de la SFF [52], indicando que la fosforilación/activación de ERK1/2 es crucial para el incremento de fuerza luego del estiramiento.

Diversos reportes demuestran que existe una relación entre la ERK1/2 y otra de las MAPK convencionales, la p38-MAPK [53-55], protagonista de este trabajo de Tesis Doctoral, por lo que se describirá en detalle en el siguiente apartado.

### **2.1.3. NHE-1 y SFF**

Diversos reportes ponen en evidencia la participación del NHE-1 en el desarrollo de la SFF [56-58]. Esta evidencia no fue unánimemente aceptada por la comunidad científica hasta que se demostró que el silenciamiento génico del NHE-1 con un ARN de interferencia cancelaba dicha fase sin alterar la activación de las MAPK responsables de su fosforilación/activación [10]. Estos resultados permitieron concluir que la activación del NHE-1 es crucial para el desarrollo de la SFF, y que la misma es mediada por activación de las quinasas ERK1/2 y p90RSK.

### **2.1.4. Hiperactividad del NHE-1 y patologías cardíacas**

Si bien el NHE-1 cumple un rol fundamental en la fisiología celular, su hiperactividad se relaciona con diversas patologías y es por ello que ha sido ampliamente estudiado como posible blanco terapéutico en el tratamiento contra el infarto agudo de miocardio [22, 59], daño por isquemia/reperfusión [60], insuficiencia [61, 62] e hipertrofia cardíaca [27, 33]. En este sentido, experimentos realizados hace más de dos décadas por nuestro grupo, en músculos papilares aislados de corazones hipertróficos de ratas espontáneamente hipertensas (SHR), permitieron demostrar que el NHE-1 se encontraba hiperactivo [63], y unos años más tarde, que existía una relación causa-efecto entre dicha hiperactividad y el desarrollo de la patología [64-67]. Resultados similares han podido obtenerse en corazón perfundido [68] y en cardiomiocitos

ventriculares aislados [69], pero también en riñón (túbulo proximal de ratas SHR) [70], y en diversos tejidos de pacientes con hipertensión arterial [71, 72].

## 2.2. p38-MAPK: características generales y rol en la contractilidad cardíaca

Como se desprende del título de esta Tesis Doctoral, la p38-MAPK ocupa un rol central. Ésta es una Ser/Thr quinasa de 38 kDa, perteneciente al grupo de las MAPK convencionales (**Figura 4**), que cataliza la fosforilación reversible de proteínas en respuesta a diferentes estímulos como citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento, ligandos acoplados a proteína G o estrés celular [73, 74]. Existen 4 isoformas de p38-MAPK:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  cuya estructura se encuentra preservada. Si bien, todos los miembros se expresan de forma ubicua, la isoforma p38 $\alpha$  es la principal del músculo cardíaco, aunque también puede hallarse la p38 $\gamma$ . La p38 $\beta$  se expresa con mayor abundancia en cerebro y tejido adiposo, la p38 $\gamma$  en el músculo esquelético, mientras que la p38 $\delta$  en glándulas secretoras [75, 76].

La familia de p38-MAPKs puede dividirse en dos subgrupos, con p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  en uno de ellos, y p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  en el otro. Esta clasificación se debe por un lado a la homología en la secuencia de aminoácidos [75, 77], a la selectividad de los sustratos con los que interactúan [76], y a la susceptibilidad *in vitro* de los inhibidores farmacológicos denominados SB203580 y SB202190, a los que solo resultan sensibles las isoformas p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  [77, 78].

Las 4 isoformas de p38-MAPK se activan por fosforilación dual en residuos de Tirosina y Treonina en el motivo conservado Thr-Gly-Tyr (TGY) a través de las quinasas MAPKK o MKK, siendo los principales activadores *in vivo* las MKK3 y MKK6 [75, 79], aunque algunos autores postulan que también es la MKK4 [80], siendo esta fosforilación altamente selectiva de p38-MAPK [76]. Otras vías muestran que también puede activarse por autofosforilación [81], a través de otras quinasas como la "apoptosis signal-regulating kinase 1/2" (ASK1/2) (**Figura 4**), por estiramiento [82] así como por shock osmótico, isquemia y estrés oxidativo [83].

En cuanto a los sustratos de dicha quinasa, se encuentran tanto citosólicos como nucleares, y si bien se superponen entre las distintas isoformas, existen diferencias entre los dos grupos antes mencionados. Por ejemplo, se ha demostrado que las isoformas

p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  pueden activar factores de transcripción o quinasas que activan dichos factores, así como componentes de la maquinaria de traducción. Si bien la p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  pueden fosforilar muchos de estos mismos sustratos, quinasas como la MAPKAP-K2 (quinasa activadora de la HSP27) y la MAPKAP-K3 solo pueden ser fosforiladas por las p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  [77].

Diversas investigaciones sobre la p38-MAPK en miocardio han sugerido que participa en funciones tanto protectoras como deletéreas frente a diferentes estímulos estresantes. Se ha visto que participa en la regulación de varios procesos como inflamación, apoptosis [83], y su activación se ha asociado con diversas patologías cardíacas como hipertrofia o infarto de miocardio [73, 75]. Un estudio realizado en corazones de pacientes con cardiomiopatía dilatada que presentaban insuficiencia demostró una disminución en la actividad de la p38-MAPK comparada con corazones sin esta patología [84], mientras que otras investigaciones mostraron que la actividad de dicha quinasa se asocia con la insuficiencia cardíaca sistólica y diastólica [75]. Si bien distintos estudios sugieren que la actividad sostenida de p38-MAPK contribuye a la hipertrofia, fibrosis y disfunción, dentro de los efectos beneficiosos se demostró que protege durante el pre-acondicionamiento isquémico, donde la isoforma p38 $\alpha$  pareciera ser importante en la adaptación al estrés hipertrófico. Además, se vio en ratones doble mutantes negativo para la MKK3 o MKK6, que la inhibición de la p38-MAPK conducía a una hipertrofia de ventrículo izquierdo [85], mientras que, si la inactivación es específica de p38 $\alpha$  y p38 $\beta$ , se desarrolla a una hipertrofia ventricular derecha, sugiriendo que ambas isoformas podrían contribuir a mantener el desarrollo y la función normal del corazón [75].

Estudios realizados en músculo liso vascular de rata, evidenciaron que la Ang II (mediador de la SFF) incrementa la fosforilación de ERK1/2 y p38-MAPK, y también la actividad del NHE-1 [53]. Este último efecto fue potenciado luego de la inhibición de p38-MAPK, sugiriendo que esta quinasa regula negativamente la actividad del NHE-1, y fueron postuladas dos posibles rutas: 1) a través de una fosforilación directa del NHE-1 que inhiba su actividad, 2) por una vía indirecta que llevaría a disminuir la actividad de ERK1/2 y p90RSK [53].

Se ha demostrado que la p38-MAPK modula la función contráctil. Por un lado, se vio que la activación sostenida de p38-MAPK en un cultivo de cardiomiocitos de rata,

provoca una disminución de la sensibilidad de las proteínas contráctiles al  $\text{Ca}^{2+}$  [86], impactando negativamente en la contractilidad cardíaca. A su vez, *Kerkela y col.* mostraron que el estiramiento de aurícula de rata induce la activación de la quinasa, lo que resulta en una menor contracción [82]. Por otro lado, se observó que la modulación de la contractilidad por p38-MAPK es mediada por la fosfolamban (PLN) [87], proteína que regula la actividad de la SERCA2a. Cuando PLN se encuentra desfosforilada se une a la SERCA2a y la inhibe, mientras que si está fosforilada la libera y deja de inhibirla provocando el aumento de la retoma de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el retículo sarcoplasmático. PLN es un mediador crítico de los efectos estimuladores  $\beta$ -adrenérgicos y se vio que cambios en su nivel de fosforilación se asocian con alteraciones funcionales del retículo sarcoplasmático y de la contractilidad cardíaca [88]. *Szokodi y col.* encontraron que el efecto inotrópico positivo inducido por ET-1 (mediador de la SFF) era mayor cuando se inhibía farmacológicamente a la p38-MAPK. Adicionalmente encontraron que, este efecto era acompañado de un aumento de los niveles de fosforilación de PLN en Ser16, sitio que, al ser fosforilado por la quinasa dependiente de AMPc, PKA [87], media la respuesta cardíaca máxima frente a los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos [89]. También se demostró que ratones deficientes de las fosfatasaes duales DUSP1 y DUSP4 (que inhiben a p38-MAPK, ver siguiente apartado), presentaban mayor actividad de p38-MAPK cardíaca, junto con una deficiente retoma de  $\text{Ca}^{2+}$  por el retículo sarcoplasmático, y que la pérdida de contractilidad observada se revertía con la delección de PLN [90]. Diversos reportes han demostrado que la p38-MAPK, más específicamente la isoforma  $\alpha$ , participa en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}_i$ , ya que su inhibición provoca un incremento de la fosforilación de PLN, aumentando así el funcionamiento de la SERCA2a [91, 92].

Por último, la actividad de p38-MAPK se encuentra regulada por un grupo de fosfatasaes como las PP2C (Ser/Thr fosfatasa), las PTP (Tyr fosfatasa) [77], así como las fosfatasaes de especificidad dual, DUSPs, las cuales serán descritas con mayor detalle en el próximo apartado, dado el rol preponderante que ocupan en el presente trabajo.

### **2.3. Fosfatasaes duales específicas (DUSPs)**

Si bien las MAPKs modulan diversos procesos celulares, la actividad desmedida de estas quinasas puede provocar efectos perjudiciales, por lo que deben estar finamente reguladas para mantener una adecuada homeostasis celular. Datos bibliográficos

demuestran la existencia de diversas fosfatasa encargadas de retirar un grupo fosfato (las PTP), así como fosfatasa duales específicas conocidas como DUSPs (por sus siglas en inglés: “Dual Specificity Phosphatase”), que desfosforilan al mismo tiempo los grupos fosfato de Treonina y Tirosina del sitio de activación de las quinasas, conocido como TXY. El principal grupo de fosfatasa que regula la actividad de las MAPKs es la familia de las DUSPs, también conocidas como MAPK fosfatasa o MKP, ya que se encargan de quitar grupos fosfato de estas quinasas [93]. Existen al menos 16 isoformas y se expresan en distintos tejidos, tanto en el núcleo como en el citosol. La modulación de la expresión y de la actividad de estas fosfatasa en diferentes células y tejidos controla la intensidad y duración de la actividad de las MAPKs y en definitiva determina el tipo de respuesta fisiológica [94].

En cuanto a la especificidad de sustrato, se ha visto que algunas pueden actuar sobre más de un tipo de MAPK [94, 95], por ejemplo, la DUSP8 y DUSP16 juegan un papel clave en la regulación tanto de la JNK como de la p38-MAPK [96], mientras que otras tienen un sustrato determinado [97]. Si bien no todos los autores coinciden en cuáles son las DUSPs específicamente responsables de inactivar a la p38-MAPK, se ha propuesto recientemente que DUSP2, DUSP9 y DUSP10 son las principales, y pone en duda la participación de la DUSP8 y DUSP16 [97], mientras que otros postulan que son las DUSP1-2, DUSP4 [98], DUSP8-10 y DUSP16 [99]. En el caso de las DUSPs específicas de inactivar a las ERK citosólicas, datos de bibliografía muestran que son las DUSP6 (también conocida como MKP-3), DUSP7 y DUSP9 [93]. Se ha descrito que DUSP6 forma un complejo con ERK2 a través de una serie de aminoácidos que se conservan en ERK1, pero no en ERK5 o ERK3/4, lo que sugiere que es altamente específica para ERK1/2, y se la reconoce como la principal encargada de inactivar a estas 2 isoformas [100]. Esto último es abalado por el incremento de la fosforilación basal de ERK1/2 obtenido en ratones transgénicos que carecen de DUSP6 (tienen una delección del gen de la DUSP6, *dusp6*<sup>-/-</sup>) [101]. Se ha reportado que la regulación de DUSP6 se encuentra afectada en diversas patologías y que el incremento de las ROS produce una oxidación e inhibición catalítica de dicha fosfatasa [95]. En conexión, dado que la producción y liberación de ROS resulta clave para el desarrollo de la SFF, los próximos apartados resumirán algunas características generales de estas importantísimas moléculas de señalización



intracelular involucradas en procesos fisiológicos y patológicos, así como algunos detalles vinculados a la defensa antioxidante del organismo.

## **2.4. Especies reactivas del oxígeno “ROS”**

### **2.4.1. ROS y señalización celular**

Las ROS son moléculas parcialmente reducidas del oxígeno molecular ( $O_2$ ) que se producen como productos de reacciones metabólicas o como subproductos de diversos procesos celulares, como la respiración [102]. Dentro de las ROS se encuentran los radicales libres del oxígeno como el anión superóxido ( $\cdot O_2^-$ ) y radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ), así como los que no son radicales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) [103, 104]. Si bien concentraciones basales resultan indispensables para ciertas funciones celulares al actuar como segundos mensajeros y mediadores de vías de transducción de señales, o participando en la expresión génica y crecimiento celular, niveles mayores presentan efectos deletéreos, causando daño celular, lo que puede desencadenar necrosis y muerte celular por apoptosis [105].

La principal fuente de estas ROS proviene del metabolismo celular para la obtención del ATP. La cadena transportadora de electrones durante la fosforilación oxidativa mitocondrial produce ROS, siendo los complejos I y III los mayores generadores [58]. *Zorov y col.* propusieron que pequeñas cantidades de ROS son capaces de favorecer la apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP), aumentando la liberación de más ROS mitocondriales, efecto que denominaron “producción de ROS inducida por ROS” [5]. Años más tarde, *Villa Abrielle y col.* demostraron que la inhibición del complejo I o del canal de potasio dependiente de ATP mitocondrial ( $mK_{ATP}$ ) (cuya apertura induce la formación de ROS), prevenía la producción de estas especies reactivas [6]. Otra fuente importante de ROS es la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, NOX (por sus siglas en inglés NAPDH Oxidase), una reductasa del  $O_2$  dependiente de NAPDH. Las NOX son proteínas transmembrana que transfieren un electrón del NAPDH al  $O_2$ , generando anión  $\cdot O_2^-$  [106].

Seguidamente, se analizarán aspectos fisiológicos y patológicos vinculados a las ROS, que resultaron trascendentes a la hora de encarar el presente trabajo de investigación.

### *ROS y contractilidad*

Como se expuso en un párrafo anterior, pequeñas concentraciones de ROS resultan claves para ciertas funciones celulares, y la contractilidad miocárdica no escapa a esta aseveración. Experimentos previos de nuestro laboratorio han puesto en evidencia que el estiramiento del miocardio incrementa la producción de ROS, y que éstas resultan indispensables para el desarrollo de la SFF [52]. En tal sentido, el hecho de que la SFF se cancelara tanto al inhibir a la NOX como al bloquear los canales  $mK_{ATP}$  [52], permitió además sugerir que el estiramiento mecánico de la pared ventricular disparaba un mecanismo similar al descrito por *Zorov y col.* que se menciona antes [5]. En conexión, *Prosser y col.* reportaron que el estiramiento incrementa la producción de ROS al activar a la isoforma 2 de la NOX, (NOX2) en un proceso dependiente de los microtúbulos [107], y más recientemente, *Iribe y col.* describieron que el estiramiento del miocardio favorece la hiperpolarización del potencial de membrana mitocondrial, promoviendo una pérdida de electrones por los complejos I y III aumentando así la producción de ROS [108].

### *Estrés oxidativo*

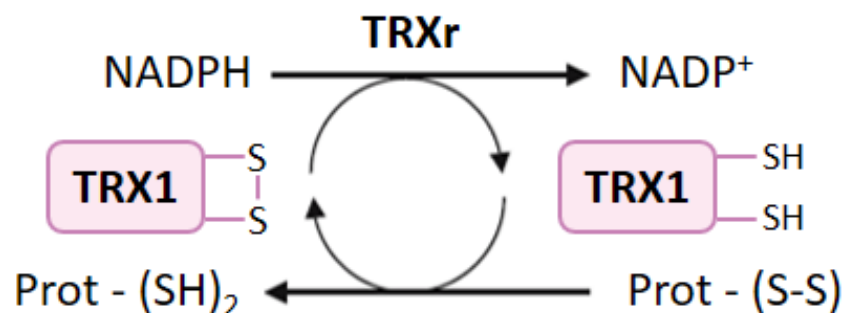
La cara opuesta de las ROS como moléculas de señalización en la función celular normal lo constituye el estrés oxidativo, que se define como un desequilibrio en el estado redox celular, es decir entre la producción y degradación de ROS. Este último mecanismo depende de la funcionalidad de los sistemas antioxidantes, los cuales están encargados de mitigar los posibles efectos nocivos que dañen a las células. Un incremento en la producción de ROS produce un desbalance del estado redox lo que se relaciona con diversas patologías como Alzheimer, aterosclerosis, diferentes tipos de cáncer, enfermedades renales, entre otras. A nivel cardiovascular numerosas patologías como la hipertensión, hipertrofia e insuficiencia cardíaca o daño por isquemia/reperfusión se han asociado con un aumento del estrés oxidativo [106, 109]. Es por esto, que las células poseen diversos mecanismos antioxidantes como los sistemas de la Superóxido Dismutasa (convierte el  $\cdot O_2^-$  en  $O_2$  y  $H_2O_2$ ) y Catalasa (cataboliza  $H_2O_2$ ), entre otros. A nivel cardíaco son dos los principales sistemas antioxidantes: Glutatión/Glutatión reductasa (GSS/GSH) y Tiorredoxina/Tiorredoxina reductasa (TRX/TRXr) [110, 111]. La posibilidad de contar con animales que sobreexpresan TRX a nivel cardíaco, constituyó

una herramienta fundamental para el desarrollo de una parte significativa de este trabajo de Tesis Doctoral, por lo que en la próxima sección profundizaremos la caracterización de este importante sistema antioxidante.

### 2.4.2. Sistema antioxidante TRX/TRXr

El sistema antioxidante TRX/TRXr está compuesto por la TRX, la TRX reductasa, y la NADPH. Dentro de las TRXs se encuentra la isoforma citosólica 1, TRX1 (que puede trasladarse al núcleo), y la TRX2, una proteína redox mitocondrial codificada por un gen nuclear con un péptido señal que la direcciona hacia la mitocondria [112].

La TRX1 es una proteína de 12 kDa expresada de forma ubicua, cuyo sitio activo (Cys – Gly – Pro – Cys) se encuentra conservado desde bacterias a mamíferos y resulta esencial para el mantenimiento del estado redox celular [112, 113]. Se encarga de reducir proteínas oxidadas al transferirles electrones y convertir los grupos disulfuro (S-S) en grupos tiol (-SH) [114], a la vez que la TRX1 se oxida. Para volver a su estado reducido recibe electrones de la NADPH en presencia de la TRXr (Figura 5).



**Figura 5: Sistema TRX.** La TRX reducida (TRX1-Red) cataliza la reducción de las proteínas oxidadas. TRX1-(S)<sub>2</sub>: Trx1 oxidada; TRX1-(SH)<sub>2</sub>: Trx1 reducida; Prot-(SH)<sub>2</sub>: Proteína reducida con grupo tiol; Prot-(S-S): proteína oxidada con grupo disulfuro; TRXr: TRX reductasa. Figura adaptada de *World y col.* [114].

La función principal de este sistema es la de mantener el medio intracelular en un estado reducido, por lo que desempeña un papel protector crítico contra el estrés oxidativo, estímulo primario para inducir la transcripción enzimática y, por lo tanto, la remodelación cardíaca [112]. Junto con las peroxirredoxinas (Prxs), otro sistema

antioxidante, la TRX1 participa en la reducción de peróxidos, por ejemplo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, al reducir sus cisteínas redox activas [115].

Además de su papel antioxidante, se sabe que en tejido cardíaco la TRX1 interacciona con diversas moléculas de señalización y factores de transcripción, modulando funciones celulares [116], y participando en diversos procesos como apoptosis, diabetes, isquemia, hipertrofia, entre otros, ejerciendo efectos beneficiosos [111, 112]. Por ejemplo, *Yamamoto y col.* mostraron que los ratones que sobreexpresan dicha molécula antioxidante en el miocardio responden mejor a una sobrecarga hemodinámica, mostrando efectos anti-hipertróficos [117]. Por otro lado, se vio que los ratones transgénicos que presentan sobreexpresión de la TRX1 en corazón presentan resistencia al daño por isquemia y reperfusión, menor apoptosis, menor área de infarto y mayor recuperación funcional post-isquemia frente a ratones de tipo salvaje [112]. Además, en modelos de isquemia-reperfusión se vio que la sobreexpresión de la TRX1 reduce los marcadores de daño tisular no sólo en corazón [118], sino también en cerebro [119] y riñón [120]. Por otra parte, diversos reportes demuestran que la expresión y/o la actividad de la TRX1 se encuentran incrementadas en patologías cardiovasculares consecuencia de una sobrecarga de presión [117] o en la miocarditis [121, 122]. Estos resultados han sido reproducidos tanto en modelo de murinos [121, 122] como en humanos [123], donde los altos niveles de esta molécula se correlacionaron con la severidad de la enfermedad. En contraposición, *Tanito y col.* describieron años más tarde, que las ratas SHR presentan una menor expresión de TRX1 frente a ratas Wistar-Kyoto (WKY), tanto en aorta como en corazón [124]. Este estudio muestra que en el modelo de hipertensión los niveles de TRX1 se ven suprimidos a pesar del incremento del estrés oxidativo que presentan las SHR, y proponen que el desequilibrio redox en órganos esenciales podría desempeñar un papel crucial en el desarrollo y patogenia de la hipertensión [124].

Considerando los temas desarrollados en la introducción, la idea general del presente trabajo de Tesis Doctoral fue profundizar el conocimiento de las vías intracelulares desencadenadas en respuesta al estiramiento del miocardio, particularmente estudiando el rol que juegan la p38-MAPK y las ROS en el desarrollo de la SFF, y sus

posibles efectos sobre la actividad del NHE-1. En este contexto, se plantearon las siguientes hipótesis:

- *El estiramiento activa a la p38-MAPK limitando la fosforilación del NHE-1 reduciendo su actividad y por ende la respuesta inotrópica. Por el contrario, cuando se inhibe a la p38-MAPK la activación del NHE-1 inducida por el estiramiento es mayor y en consecuencia el desarrollo de SFF.*
- *La sobreexpresión de TRX1 a nivel cardíaco, al aumentar las defensas antioxidantes, disminuye el estrés oxidativo impactando así en un menor desarrollo de la SFF.*

# **OBJETIVOS**

## **Objetivo general**

El objetivo general del presente trabajo de Tesis Doctoral fue estudiar el rol de p38-MAPK, así como del estrés oxidativo, sobre la contractilidad miocárdica luego del estiramiento, poniendo especial atención en los posibles efectos sobre la actividad del NHE-1. A continuación, se indicarán en forma independiente los objetivos específicos abordados.

## **Objetivos específicos**

### **Objetivo 1: Caracterizar el efecto de la activación de p38-MAPK sobre el desarrollo de la SFF en músculos papilares aislados de rata.**

- a. Estudiar si p38-MAPK regula el desarrollo de la SFF.
- b. Evaluar la actividad de p38-MAPK luego del estiramiento.
- c. Determinar si la inhibición de p38-MAPK afecta la fosforilación del NHE-1 y por ende su actividad.
- d. Evaluar si la inhibición de p38-MAPK afecta la fosforilación de ERK1/2 y p90RSK.

### **Objetivo 2: Evaluar si la inhibición de p38-MAPK afecta la fosforilación de PLN**

- a. Estudiar si el estiramiento afecta la fosforilación de PLN
- b. Determinar si p38-MAPK regula el grado de fosforilación de la PLN luego del estiramiento.

### **Objetivo 3: Evaluar la participación de fosfatasas en la regulación del NHE-1**

- a. Determinar si el estiramiento miocárdico modifica la expresión de las fosfatasas duales
- b. Evaluar si p38-MAPK regula la actividad de las fosfatasas

### **Objetivo 4: Evaluar el rol del estrés oxidativo y las defensas antioxidantes en el desarrollo de la SFF.**

- a. Evaluar la relación entre las especies reactivas del oxígeno y p38-MAPK
- b. Estudiar la participación de la defensa antioxidante de la TRX1 en el desarrollo de la SFF.
- c. Determinar si la sobreexpresión de la defensa antioxidante TRX1, afecta la fosforilación del NHE-1.
- d. Evaluar si la sobreexpresión de la TRX1 modifica el grado de fosforilación basal de ERK1/2, p90RSK, p38-MAPK o el grado de expresión basal del NHE-1.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



La totalidad de los protocolos experimentales fueron aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) (Número de protocolo: P05-01-2015).

## **1. Animales Experimentales**

Los animales fueron manipulados de acuerdo con lo establecido en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio [125]. Se mantuvieron en cuartos con ciclos de luz-oscuridad de 12 hs, a temperatura constante (23°C) y con acceso al agua y alimento *ad libitum*.

### Ratas Wistar

Se utilizaron ratas Wistar macho de 4 meses de edad (n=40, peso 300-400 gr) criadas en el Bioterio del Centro de Investigaciones Cardiovasculares "Dr. Horacio E. Cingolani", de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP.

### Ratones FVB

Se utilizaron ratones macho FVB de 4 meses de edad (n=15, peso 25-30 gr) modificados genéticamente para sobreexpresar la molécula antioxidante TRX1, así como su control de tipo salvaje WT (WT, del inglés *wild type*). Estos ratones transgénicos fueron generados originalmente por el laboratorio del Dr. Sadoshima, utilizando el promotor de la cadena pesada de la  $\alpha$ -miosina, para lograr una expresión cardíaca específica [117]. Los mismos fueron generosamente donados por el "Instituto de Patofisiología Cardiovascular" de la Universidad de Buenos Aires.

### Ratones C57BL/6

Ratones C57BL/6 machos de 4 meses de edad (n=9, peso 25-30 gr) criados en el Bioterio del Centro de Investigaciones Cardiovasculares "Dr. Horacio E. Cingolani", fueron utilizados para las determinaciones de quimioluminiscencia.

## **2. Composición de buffers, geles y soluciones (en orden alfabético)**

### a. Buffer de corrida

En mM: 50 Tris buffer, 150 Glicina; 0,1% Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (Bio-Pack)

b. Buffer de inmunoprecipitación (IP)

En mM: 20,0 Tris-HCl; 150,0 NaCl; 1,0 EGTA; 1,0 EDTA; 2,5 PPI; 1,0  $\beta$ -glicerolfosfato; 100,0 NaF; 1,0  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (ortovanadato de sodio); y 1% Tritón X-100, con el agregado de una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Complete Mini Roche).

c. Buffer de lisis

En mM: 50 Tris-HCl, 5 EGTA, 2 EDTA, 100 NaF, 1  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; y 0,05% Tritón X-100; pH=7,5, con el agregado de una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Complete Mini Roche).

d. Buffer RIPA

Para realizar la lisis del tejido se utilizó el RIPA Lysis Buffer System 1X, pH=7,4  $\pm$ 0,1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-24948), con el agregado de inhibidores de proteasas, PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), y  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (10  $\mu\text{l}$  de cada vial de inhibidor /ml de RIPA).

e. Buffer de transferencia

En mM: 25 Tris buffer, 129 Glicina; 15% Metanol

f. Gel de corrida (Porzio y Pearson)

Geles de poliacrilamida al 7% de acuerdo a lo descrito por Porzio y Pearson [126]. Los mismos contienen 30:1 de Acrilamida: bisacrilamida (Invitrogen), 100 mM Tris; 300 mM Glicina; 5,24% Glicerol; 0,1% SDS; 0,1 mM EDTA; 0,08% PSA (persulfato de amonio), 0,08% TEMED (N,N,N,N' tetrametilendiamina).

g. Gel de stacking (Porzio y Pearson)

Geles de poliacrilamida al 4,5%, conteniendo Acrilamida: bisacrilamida, 110 mM Tris a pH=6.8, 0.1% SDS, 0.1% PSA, 0.1% TEMED [126].

h. Sample buffer (SB4X)

Para preparar las muestras se utilizó, siguiendo las indicaciones del fabricante, el buffer NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) (Thermo Fisher Scientific NP0007), el cual contiene dodecil sulfato de litio (LDS) (pH=8,4) que permite la mayor actividad del agente reductor.

i. Solución de calibración de pH<sub>i</sub>

En mM: 140,0 KCl; 1,0  $\text{MgCl}_2$ ; 1,35  $\text{CaCl}_2$ ; 5,0; HEPES 4,0 NaCN; 2,0 BDM (2,3 butanodiona).

j. Solución de lavado T-TBS

En mM: 50 Tris buffer; 150 NaCl; 0,1% de Tween 20; pH= 7,5

k. Solución de Hepes para medidas de pH<sub>i</sub>

En mM: 146,20 NaCl; 4,5 KCl; 1,35  $\text{CaCl}_2$ ; 1,05  $\text{MgSO}_4$ ; 11,00 glucosa y 10,00 Hepes; pH 7,40 equilibrado con 100%  $\text{O}_2$ .

l. Solución de Ringer para el aislamiento y protocolo de estiramiento de músculos papilares

En mM: 128,30 NaCl; 4,50 KCl; 20,23 NaHCO<sub>3</sub>; 0,35 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 ó 1,35 CaCl<sub>2</sub>; 1,05 MgSO<sub>4</sub>; y 11,0 glucosa; burbujeada con carbógeno (95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>), pH= 7,4.

m. Solución de Krebs-Hepes para medida de anión superóxido. Quimioluminiscencia con Lucigenina

En mM: 118,3 NaCl; 4,7 KCl; 1,35 CaCl<sub>2</sub>; 1,2 MgSO<sub>4</sub>; 1,0 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 25,0 NaHCO<sub>3</sub>; 11,0 glucosa; 20,0 HEPES (pH 7,4 burbujeado con 95% O<sub>2</sub> 5% CO<sub>2</sub> a 37°C)

n. Solución de stripping

En mM: 70,0 SDS; 62,5 Tris.

### 3. Reactivos

a. SB202190: Inhibidor de p38-MAPK, SB

El SB202190, 4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole, (Sigma-Aldrich, Cat #S7067) es un inhibidor de p38-MAPK, que inhibe tanto la forma activa (fosforilada) como la inactiva, y que compite con el ATP por el mismo sitio de unión de la forma activa [127]. Es altamente selectivo, y hasta concentraciones de 100 µM no afecta la actividad de otras MAPK como JNK, ERK 1/2, u otras quinasas relacionadas [128, 129]. El mismo se diluyó en DMSO, (dimetilsulfóxido, Sigma Chemical Co) en una concentración final 0,1 %. La concentración utilizada en este trabajo, 10 µM, se eligió basándose en reportes previos [130, 131].

b. SB202474: análogo inactivo del SB202190, AI

El SB202474, 4-[4-ethyl-2-(4-methoxyphenyl)-1H-imidazol-5-yl]-pyridine, (Santa Cruz Biotechnology, sc-222290), es el análogo inactivo del SB202190, por lo que se lo utilizó como control negativo del inhibidor de p38-MAPK. El mismo se preparó en DMSO en una concentración final de 0,1 %. Se utilizó una concentración final igual a 10 µM, valor elegido según bibliografía [131].

c. Indicador fluorescente BCECF-AM

El BCECF-AM (2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein, Acetoxymethyl Ester; Thermo Fisher Scientific B1170) es un indicador fluorescente sensible a H<sup>+</sup>, con un pKa igual a 6,98, lo que lo hace muy adecuado para determinaciones de pH fisiológico. El indicador se solubilizó en DMSO (50µl/vial con 25 µg de indicador) y ácido plurónico

F-127 (20% p/vol) y se trabajó a una concentración final de 10  $\mu$ M en solución tamponada con  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ .

d. Reactivo para PCR

RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)

#### **4. Extracción de corazones**

Para la extracción de los corazones las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (35 mg/kg de peso corporal), mientras que los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Luego se procedió a la apertura de la cavidad torácica (en el caso de las ratas esto se llevó a cabo una vez alcanzada la anestesia profunda, verificada por la pérdida del reflejo corneal y la aparición de respiración diafragmática lenta y profunda), realizando dos cortes sobre las costillas a nivel del esternón para exponer al corazón, y poder separarlo al seccionar la aorta, sin dañar las cavidades ventriculares.

Una vez aislado, el corazón se lavó rápidamente con una solución de Ringer a 37°C de forma tal de eliminar todo resto de sangre que pudiese quedar contenido en el interior de sus cavidades y evitar así la aparición de coágulos.

#### **5. Aislamiento de músculos papilares y tiras de ventrículo izquierdo**

Para disecar los músculos papilares del ventrículo izquierdo (tanto de rata como ratón), el corazón aislado se colocó en una caja de Petri con solución Ringer ( $\text{CaCl}_2$  0,5 mM) burbujeado con 5%  $\text{CO}_2$ /95%  $\text{O}_2$  a 37°C. Se retiraron las aurículas para despejar la comunicación aurículo-ventricular, y así poder ingresar al ventrículo izquierdo. Luego se realizó un corte longitudinal en la pared ventricular izquierda hacia el ápice (paralelo al septum cardíaco), para exponer así dos músculos papilares ubicados uno a cada lado del corte realizado. Posteriormente, se procedió a disecar cada uno de ellos a partir de su extremo superior, tomándolos por la válvula mitral y separándolos cuidadosamente de la pared hasta llegar a su extremo inferior. Se dejó en su extremo una porción muy pequeña de válvula para poder fijar el músculo al soporte del transductor de fuerza sin dañarlo.

Los músculos papilares extraídos del ventrículo izquierdo se utilizaron para medir la fuerza durante la SFF, o para evaluar la actividad del NHE-1.

Adicionalmente, con un bisturí se cortaron finas tiras de ventrículo izquierdo, las cuales fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para luego ser utilizadas como controles del estiramiento en las determinaciones de western blot.

## 6. Determinación de la fuerza desarrollada (FD) y de la SFF

Los músculos papilares se montaron horizontalmente entre un transductor de fuerza y un soporte fijo en una cámara horizontal de sobreperfusión (termostatizada a  $30^{\circ}\text{C}$ ) para determinar la fuerza isométrica. Los experimentos se realizaron en solución Ringer bicarbonato ( $\text{CaCl}_2$  1,35 mM) equilibrada con 5%  $\text{CO}_2$ /95%  $\text{O}_2$ , suplementada con  $1,0 \mu\text{M}$  de Prazosin (antagonista alfa-adrenérgico) y Atenolol (beta-bloqueante), para evitar la posible participación de catecolaminas liberadas por las terminaciones nerviosas. A los efectos de generar la contracción muscular, los papilares fueron estimulados mediante pulsos cuadrados con un voltaje 10% por encima del umbral de estimulación y a una frecuencia constante de 0,2Hz. El área de sección transversal ( $\text{mm}^2$ ) fue calculada para cada músculo (según la fórmula:  $0,75 * \text{ancho (mm)} * \text{espesor (mm)}$ ) y utilizada para normalizar la fuerza obtenida con el transductor (modelo AEM 801, Kronex Technologies Corp). Ni en el caso de las ratas Wistar ( $\text{mm}^2$ : Est:  $0,36 \pm 0,03$ ,  $n=17$ ; Est+SB:  $0,40 \pm 0,02$ ,  $n=21$ ; Est+AI:  $0,37 \pm 0,05$ ,  $n=8$ ), ni de los ratones FVB (en  $\text{mm}^2$ : WT:  $0,17 \pm 0,02$ ,  $n=7$ ; TRX1:  $0,22 \pm 0,02$ ,  $n=8$ ) se encontraron diferencias significativas en el área de sección transversal de los músculos papilares aislados entre los distintos grupos.

Luego de montar cada músculo se determinó su longitud de reposo y se midió la FD y la primera derivada de la fuerza con respecto al tiempo ( $dF/dt$ ). A continuación, se los estiró progresivamente hasta alcanzar la máxima fuerza y así obtener la longitud máxima ( $L_{\text{máx}}$ ). Al cabo de unos minutos en  $L_{\text{máx}}$  se acortaron hasta obtener un 95% de la fuerza máxima de contracción (longitud que se aproxima al 98% de  $L_{\text{máx}}$  y denominada  $L_{98}$ ). Posteriormente, los músculos papilares se aflojaron hasta un 92% de  $L_{\text{máx}}$  ( $L_{92}$ ) y se mantuvieron en esta condición hasta estabilización ( $\sim 20$  minutos). Para estudiar el desarrollo de la SFF los músculos fueron estirados abruptamente desde la  $L_{92}$  a la  $L_{98}$  y se los mantuvo durante varios minutos hasta estabilización. El inhibidor de la p38-MAPK, el SB y así como su análogo inactivo AI, se agregaron a la solución de sobreperfusión cuando los músculos se encontraban en la  $L_{92}$ , y se mantuvieron durante el resto del experimento. Al finalizar el protocolo de estiramiento (en ausencia

y en presencia de los bloqueantes) los músculos fueron congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80° C hasta el momento de ser utilizados.

## 7. Grupos experimentales

### Ratas Wistar

- **Control:** tiras de ventrículo izquierdo sin estirar.
- **Estiramiento = Est:** músculo papilar estabilizado en L92 y posterior estiramiento al 98% de  $L_{máx}$  durante 5 u 8 minutos.
- **Est+SB:** músculo papilar estabilizado en L92 durante 20 minutos con 10  $\mu$ M del inhibidor de p38-MAPK, SB202190, y posterior estiramiento al 98% de  $L_{máx}$  durante 5 u 8 minutos.
- **SB202190 = SB:** músculo papilar de ventrículo izquierdo con SB202190 sin estirar.
- **Est+AI:** músculo papilar estabilizado en L92 durante 20 minutos con 10  $\mu$ M del análogo inactivo del inhibidor de p38-MAPK, el SB202474, y posterior estiramiento al 98% de  $L_{máx}$  durante 5 minutos.
- **SB202474 = AI:** músculo papilar de ventrículo izquierdo con SB202474 sin estirar.
- **Isoproterenol (Iso):** músculo papilar incubado con 100 nM de Iso.

### Ratones FVB

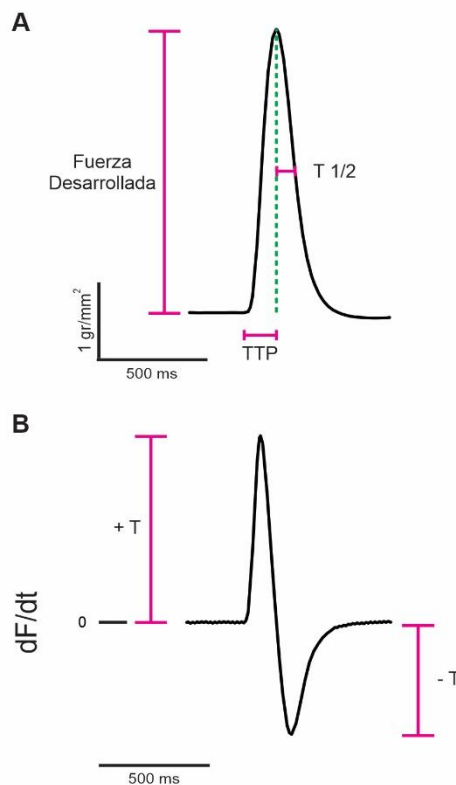
- **Controles WT y TRX1:** tiras de ventrículo izquierdo sin estirar.
- **Est-WT:** músculo papilar de ratón WT estabilizado en L92 y posterior estiramiento al 98% de  $L_{máx}$  durante 10 minutos.
- **Est-TRX1:** músculo papilar de ratón que sobreexpresa la TRX1 estabilizado en L92 y posterior estiramiento al 98% de  $L_{máx}$  durante 10 minutos.

### Ratones C57BL/6

- **Controles:** tiras de ventrículo izquierdo.
- **Ang II:** tiras de ventrículo izquierdo incubadas con 1 nM o 10 nM de Ang II durante 5 minutos.
- **Ang II+SB:** tiras de ventrículo izquierdo incubadas con 1 nM o 10 nM de Ang II durante 5 minutos, seguido de agregado de inhibidor de la p38-MAPK, SB (10  $\mu$ M).
- **Ang II+Aur:** tiras de ventrículo izquierdo incubadas con 1 nM o 10 nM de Ang II durante 5 minutos, seguido de agregado de inhibidor indirecto de la TRX1, Auranofina (2  $\mu$ M)

## 8. Cálculo de parámetros: TTP, T1/2 +T/-T

Luego del estiramiento de los músculos papilares se analizaron los registros obtenidos de fuerza contráctil y de la primera derivada de la fuerza respecto del tiempo ( $dF/dt$ ). En la **Figura 6A** se muestra un registro representativo de un pico de fuerza normalizado por el área de sección transversal, donde se muestran los parámetros calculados: medida de fuerza desarrollada, FD; tiempo hasta el pico de tensión, TTP, y el tiempo de relajación expresado como el tiempo al 50% de la relajación, T1/2. Del registro de la  $dF/dt$  (**Figura 6B**, trazo representativo de la primer derivada) se determinaron los parámetros de máxima velocidad de FD, +T y la máxima velocidad de relajación, -T; con ellos se determinó el cociente de ambas velocidades: +T/-T, que también es utilizado como índice de relajación.



**Figura 6: Trazos representativos de fuerza contráctil y de la primera derivada de la fuerza con respecto al tiempo.** En ellos se muestran cómo se determinó la Fuerza desarrollada (FD), tiempo a la fuerza máxima (TTP) y el tiempo a la mitad de la relajación (T1/2), (A) así como las máximas velocidades de fuerza desarrollada y de relajación, +T y -T respectivamente (B).

## 9. Actividad del NHE-1 y variación del $pH_i$ en músculos papilares

Como se señaló anteriormente, el NHE-1 es uno de los principales mecanismos alcalinizantes de las células, ya que regula el  $pH_i$  mediante la extrusión de protones. Para

determinar su actividad en los músculos papilares aislados se evaluó, por un lado, los cambios de  $pH_i$  obtenidos luego del estiramiento, y por otro la velocidad de recuperación del  $pH_i$  luego de una carga ácida intracelular. En ambos casos se utilizó una técnica de epifluorescencia, cargando a los músculos papilares con un indicador fluorescente sensible a protones, el BCECF-AM.

Los músculos papilares aislados se montaron en una cámara de manera análoga a la anteriormente descrita, de base vidriada y ubicada en la base de un microscopio invertido. Se registraron primeramente los niveles de autofluorescencia y luego los músculos se incubaron durante 1 hora en la solución Ringer que contenía el BCECF-AM. Se utilizó la forma de éster del indicador (Éster acetoximetílico: AM), de manera de que al ingresar al tejido este grupo sea clivado por las esterasas propias de la célula, asegurando así que el indicador permanezca en el interior de éstas. Al finalizar el período de carga, se lavó el espacio extracelular con una solución Ringer libre de indicador durante 30-60 minutos, para permitir la distribución uniforme de la fluorescencia del BCECF-AM en todo el músculo.

La emisión de fluorescencia del indicador se midió filtrando la luz de excitación de una lámpara de Xenón de 75 W alternativamente entre las longitudes de onda de 440 y 495 nm, la cual se transmitió a los músculos en estudio mediante un espejo dicróico (que refleja esas longitudes de onda y es, a su vez, un filtro de paso a  $535 \pm 5$  nm) y de ahí a un fotomultiplicador (modelo R2693, Hamamatsu). La salida por este último se recopiló a través de un convertidor A/D (modelo 2801 A, traducción de datos) y se guardó para su posterior análisis. Para limitar el blanqueamiento, se colocó un filtro de densidad neutra (1% de transmitancia) en la trayectoria de la luz de excitación, y se usó un obturador manual para seleccionar intervalos de muestreo (2 segundos con intervalos de 10 segundos) durante el protocolo.

Al final de cada experimento, la emisión de fluorescencia se calibró exponiendo los músculos con una solución que contiene una alta concentración de KCl (140 mM) y 10  $\mu$ M de Nigericina, un ionóforo que intercambia  $K^+$  y  $H^+$  y permite igualar las  $[H^+]_e$  y  $[H^+]_i$  cuando las concentraciones de  $K^+$  intra y extracelular son iguales. A su vez contenía 2,3-butanodiona (BDM) para prevenir la contractura muscular. El pH de la solución se ajustó con KOH o HCl a cuatro valores diferentes que varían de 7,5 a 6,5. Tal calibración reveló una relación lineal entre el pH y la relación de fluorescencia ( $F_{495}/F_{440}$ ) que se utilizó para



corregir los valores experimentales. Una vez finalizado, se calcularon estas relaciones y se restó el valor de autofluorescencia correspondiente en cada longitud de onda de la siguiente manera: (fluorescencia a 495 nm - autofluorescencia a 495 nm) / (fluorescencia a 440 nm - autofluorescencia a 440 nm).

Las intervenciones farmacológicas, inhibidor de p38-MAPK, SB, o su análogo inactivo, AI, se agregaron durante 20 minutos, mientras los papilares permanecían en el L92, y se mantuvieron durante el resto del protocolo.

### **9.1. Estudio del efecto del estiramiento sobre la recuperación del $pH_i$**

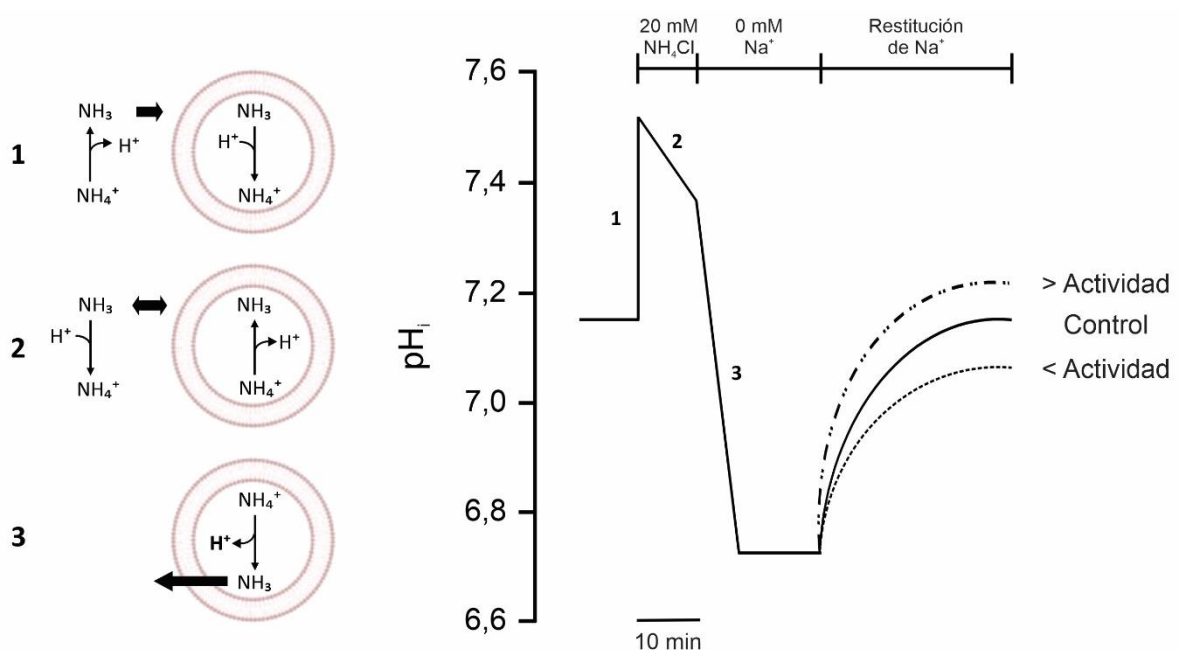
Para estimar la influencia que el estiramiento puede tener sobre la actividad del NHE-1 y su participación como regulador del  $pH_i$ , se realizó un experimento análogo al de estiramiento descrito anteriormente (punto 6), en músculos precargados con BCECF-AM estirados a L92. Brevemente, luego de la carga con el indicador, su lavado, y posterior tiempo de desesterificación, los músculos fueron mantenidos en reposo durante otros 30 minutos extra en el buffer experimental. Para este protocolo experimental se usaron comparativamente 2 buffers diferentes: Hepes y Ringer. En cada buffer, los músculos se estabilizaron por 5 minutos registrando su fluorescencia y súbitamente se estiraron al L98 registrando la fluorescencia durante los siguientes 5 minutos. Los resultados a cada tiempo se expresaron como  $\Delta pH_i$ , respecto a la fluorescencia registrada inmediatamente antes del estiramiento.

### **9.2. Acidosis intracelular**

Una forma de evaluar la actividad de NHE-1 es medir la velocidad de recuperación del  $pH_i$  dependiente de  $Na^+$ , luego de una acidosis sostenida inducida por un pre-pulso de amonio [132]. La determinación de autofluorescencia, así como los experimentos se realizaron en buffer Hepes, carente de bicarbonato, para asegurar que la recuperación del  $pH_i$  posterior a la carga ácida, se debiera únicamente a la activación del NHE-1, y así independizarse de la participación de otros mecanismos alcalinizantes como el  $Na^+/HCO_3^-$  (NBC) que también pudieran activarse frente a la carga ácida.

En la **Figura 7** se presenta un esquema de la técnica del pre-pulso de amonio. Los músculos papilares se cargaron con  $NH_4Cl$  (20 mM) durante 10 minutos, tiempo en el cual el  $NH_4^+$  se transformó en  $NH_3$  (compuesto mucho más permeable a la membrana) e ingresó a la célula, donde, al combinarse con los  $H^+$  intracelulares, formó nuevamente

$\text{NH}_4^+$  produciendo una marcada alcalinización intracelular (punto 1 de la **Figura 7**). Seguidamente, se estableció un equilibrio entre el  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ , provocando una liberación de  $\text{H}^+$  al medio extracelular y una disminución significativa del  $\text{pH}_i$  (punto 2 de la **Figura 7**). Luego las células se lavaron con solución Hepes sin  $\text{Na}^+$  (0 mM  $\text{Na}^+$ , donde el  $\text{NaCl}$  se reemplazó en forma equimolar con N-metil-D-glucamina), provocando una acidosis sostenida (ya que se libera  $\text{NH}_3$  al medio extracelular) durante 10 minutos (punto 3 de la **Figura 7**). Esta acidosis se revirtió por el agregado de  $\text{Na}^+$  externo, que ingresó a la célula mediante el NHE-1, intercambiado por el exceso de protones que había en su interior (punto 4 de la **Figura 7**).



**Figura 7: Esquema de la técnica del pre-pulso de amonio empleada para medir la actividad del NHE-1.** A la izquierda se muestran 3 esquemas donde se observa la entrada de  $\text{NH}_3$  a la célula (1), el equilibrio entre  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  (2) y el lavado del amonio con la consecuente acidificación intracelular (3). A la derecha se muestra un esquema representativo de la variación de  $\text{pH}_i$  en función del tiempo frente a las distintas condiciones antes mencionadas, y los posibles resultados de recuperación del  $\text{pH}_i$ .

La capacidad buffer intrínseca ( $\beta_i$ ) se determinó según se describió anteriormente [133]. El flujo máximo de  $\text{H}^+$  ( $J_{\text{H}^+_{\text{max}}} = \text{dpH}_i / \text{dt}$ .  $\beta_i$ ) se calculó al comienzo de la recuperación de la acidosis (justo después del agregado adicional de  $\text{Na}^+$  extracelular) y se usó para comparar la actividad de NHE-1 entre los diferentes grupos.

## **10. Determinación de fosforilación o expresión de proteínas**

En las diferentes condiciones experimentales se determinó la abundancia de las formas fosforiladas, es decir activas (para evaluar las modificaciones postraduccionales), de las proteínas p38-MAPK, ERK1/2, p90RSK, PLN y HSP27, así como el grado de expresión de DUSP6 y del NHE-1 mediante la técnica de western blot ya empleada en nuestro laboratorio [6]. Al realizar la electroforesis, si la cantidad de proteína cargada en cada carril es la misma, se pueden comparar los niveles relativos de la proteína de interés.

### **10.1. Homogeinización de músculos papilares y de ventrículo izquierdo**

Para preparar los homogenatos de los músculos papilares, así como de los cortes de ventrículo izquierdo, las muestras congeladas en freezer de -80°C se colocaron en buffer RIPA, en un volumen igual a 4 veces el peso del tejido en mg. Se homogeneizó en baño de hielo utilizando un homogeneizador de mano (PRO250 Pro Scientific Inc.) durante 10 segundos con intervalos de 30 segundos, proceso que se realizó por triplicado. Luego las muestras se dejaron reposar en hielo durante 30 minutos, y se las centrifugó con una Micro High Speed Refrigerated Centrifuge Micro 17TR, a 12000 RPM durante 15 minutos, a 4°C. En un tubo nuevo se colectó el sobrenadante, y se lo sonicó con un homogeneizador ultrasónico para eliminar cualquier resto de tejido que pudiera haber quedado. Una vez finalizado todo el protocolo de homogeinización, las muestras se guardaron a -80° C hasta su posterior utilización.

Durante todo el proceso las muestras se mantuvieron en hielo para inhibir la actividad de las proteasas, y evitar así la degradación de las proteínas.

### **10.2. Cuantificación de proteína total**

Existen diversos métodos colorimétricos para medir la concentración de proteínas totales de una muestra, tales como el método de Lowry, Bradford y Ácido Bicinconínico (BCA). Estos se basan en las reacciones producidas entre las proteínas de la muestra y los reactivos de detección.

En el presente trabajo, la concentración de proteínas fue determinada utilizando el método colorimétrico de Bradford que se basa en el cambio de absorbancia del colorante azul de Coomassie Brillante G-250 cuando éste se une a las proteínas. El Azul Brillante de Coomassie G-250 presenta dos colores dependiendo del pH de la solución. Es rojo si la solución es muy ácida (colorante en forma catiónica) y azul si la solución es

neutra o alcalina (colorante en su forma aniónica). Cuando el colorante se une a las proteínas, ocurre una serie de reacciones que permiten que pase de su forma roja (máximo de absorbancia a 465 nm) a su forma aniónica desprotonada de color azul, que presenta su máximo de absorbancia a 595 nm. Por lo tanto, se utiliza la cantidad de complejo colorante-proteína presente en la solución determinada a 595 nm, como medida de la concentración de proteínas (es decir, la concentración de proteína es proporcional a la absorbancia a 595 nm).

Para la cuantificación de la concentración de proteínas se realizó una curva de calibración (regresión lineal) utilizando 4 diluciones de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich) como proteína patrón. Partiendo de diluciones apropiadas de las muestras se realizaron las determinaciones por triplicado leyendo la absorbancia a 595 nm, con sustracción del blanco de reactivos, en un espectrofotómetro UV/visible (SmartSpec 3000, Bio-Rad).

### **10.3. Preparación de muestras**

Los homogenatos se descongelaron en baño de hielo. Se tomó el volumen adecuado según la proteína a analizar para lograr tener en todos los carriles la misma cantidad de proteína total (en  $\mu\text{g}$ , de acuerdo con la concentración obtenida con el Bradford) y se procedió a la desnaturalización y preparación para la electroforesis utilizando Sample Buffer 4X (NuPAGE™ 4X) y ditioneitol (DTT 0,5M) como agente reductor (Invitrogen). Se completó con agua bidestilada para alcanzar el volumen a sembrar en el gel.

El "Sample" buffer posee dodecilsulfato de litio, un compuesto iónico desnaturalizante que envuelve a las proteínas y distorsiona las regiones hidrofóbicas, cubriéndolas con cargas negativas de manera proporcional a su peso molecular (la gran cantidad de cargas negativas del SDS superan a las cargas positivas de la proteína). Como resultado la proteína es desnaturalizada (reducida a su estructura primaria) y toma una estructura lineal. Esto permite independizarse de la forma y la carga de las mismas.

### **10.4. Western blot**

Para determinar la expresión de proteínas (ya sea por cambios en la cantidad o en el grado de fosforilación que indica la activación), se empleó la técnica de western blot, por la cual igual cantidad de proteína de cada muestra fue sometida a una electroforesis

en gel de poliacrilamida siguiendo la técnica de SDS-PAGE. A continuación, se detalla el protocolo utilizado para todas las determinaciones.

**a. Preparación de los geles de poliacrilamida**

Se prepararon geles de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida) de 10 o 15 calles y 1,5 mm de espesor. Los geles estaban formados por una porción superior, *gel de stacking*, donde se sembraron las muestras, y una porción inferior, *gel de corrida*, donde las proteínas se separaron de acuerdo con su peso molecular.

La bisacrilamida es capaz de unir cadenas de acrilamida entre sí (crosslinker), llevando a la formación de un gel. La polimerización de la acrilamida se acelera en presencia de radicales libres, que provienen del PSA en presencia de TEMED.

**b. Electroforesis**

Las muestras fueron separadas en condiciones desnaturalizantes por SDS-PAGE utilizando una cuba para electroforesis (Mini-PROTEAN® Systems, Bio-Rad Laboratories). La técnica SDS-PAGE está basada en la utilización de geles de poliacrilamida que contienen SDS para conferir carga negativa a las proteínas, por lo que éstas son separadas únicamente en función de su peso molecular.

Para llevar a cabo la electroforesis se sembró un volumen de las muestras que correspondía a 60-80 µg de proteína, y en una de las calles se agregó un patrón de peso molecular comercial (Precision Plus Protein Prestained Standards, Dual Color, Bio-Rad Laboratories).

La corrida se realizó con buffer de corrida a temperatura ambiente, durante 15 minutos a 80 Volts (para concentrar la muestra en el borde del gel de corrida), y luego a 100 Volts hasta que el frente de solvente alcanzó el extremo inferior (aproximadamente 90 minutos).

**c. Transferencia**

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas separadas por peso molecular se electro-transferieron a membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno, Millipore). Estas membranas fueron previamente activadas sumergiéndolas durante 30 segundos en metanol, y luego lavadas con agua bidestilada. Los filtros y las esponjas del "cassette" de transferencia fueron sumergidos en el buffer de transferencia. La misma se llevó a

cabo en una cuba (Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad Laboratories) refrigerada y en constante agitación a 65 Volts durante 2 hs.

**d. Bloqueo de membranas e incubación con el anticuerpo primario específico**

Las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora en un agitador orbital a temperatura ambiente con una solución de leche descremada al 5% en T-TBS 1X. Transcurrido este tiempo, las membranas se lavaron con T-TBS 1X y posteriormente se incubaron con una dilución adecuada del anticuerpo primario (**Tabla 1**) contra la proteína de interés, durante 12 hs a 4°C.

| Anticuerpo                                       | Preparado en/ dilución     | Marca y N° Catálogo                 |
|--|----------------------------|-------------------------------------|
| p-ERK1/2   | T-TBS 1X, BSA 1%, 1:1000   | Santa Cruz Biotechnology, sc-16982  |
| p-HSP27  | T-TBS 1X, BSA 1%, 1:1000   | Santa Cruz Biotechnology, sc-166693 |
| p-p90RSK   | T-TBS 1X, BSA 1%, 1:1000   | Cell Signaling #9341                |
| p-p38-MAPK                                       | T-TBS 1X, BSA 1%, 1:1000   | Millipore, MABS64                   |
| DUSP6 (G-4)                                      | T-TBS 1X, BSA 1%, 1:1000   | Santa Cruz Biotechnology, sc-137246 |
| p-Ser16-Fosfolamban                              | T-TBS 1X, BSA 1%, 1:1000   | Bradilla, A010                      |
| NHE-1 (H-160)                                    | T-TBS 1X, BSA 1%, 1:1000   | Santa Cruz Biotechnology, sc-28758  |
| GAPDH  | T-TBS 1X, leche 1%, 1:1000 | Millipore, MAB374                   |
| Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> - ATPasa α (H-3) | T-TBS 1X, BSA 1%, 1:1000   | Santa Cruz Biotechnology, sc-48345  |
| β-Actina   | T-TBS 1X, BSA 1%, 1:1000   | Abcam, ab170325                     |

**Tabla 1:** Anticuerpos primarios

**e. Incubación con anticuerpo secundario**

Luego de retirar el anticuerpo primario y hacer 3 lavados sucesivos con T-TBS 1X (para eliminar restos de anticuerpo no unido, o unido inespecíficamente), las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios específicos. Éstos se encuentran acoplados a la enzima peroxidasa de rabanita (HRP), y están diseñados para reconocer la fracción constante, Fc, específica de la especie en la que se obtuvo el anticuerpo primario (anti-conejo o anti-ratón), haciendo así un nexo entre la proteína de interés y el sistema de detección posterior. En la **Tabla 2** se detallan los anticuerpos secundarios utilizados.

| Anticuerpo  | Preparado en/ dilución   | Marca y N° Catálogo                |
|-------------|--------------------------|------------------------------------|
| Anti-Conejo | T-TBS 1X, BSA 1%, 1:5000 | GE Healthcare Life Sciences, NA934 |
| Anti-Ratón  | T-TBS 1X, BSA 1%, 1:5000 | GE Healthcare Life Sciences, NA931 |

**Tabla 2:** Anticuerpos secundarios

#### **f. Revelado de membranas**

Se utilizó el sustrato HRP quimioluminiscente (Millipore, WBKLS0100) como sistema de detección. La reacción se basa en la generación del éster de acridinio a partir del 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. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría utilizando el programa Image J.

### **11. Determinación indirecta de la actividad del NHE-1**

Debido a que, al momento de la realización de esta Tesis Doctoral, no se encontraba disponible un anticuerpo específico que reconozca el sitio Ser703 fosforilado, (sitio activado por la p90RSK), la determinación del grado de fosforilación/activación del NHE-1 tuvo que hacerse como medida indirecta. Basándose en la bibliografía [42], y estudios previos de nuestro grupo de trabajo [6], se procedió a realizar una inmunoprecipitación previa a la electroforesis.

#### **11.1. Homogenización**

Para la obtención de los homogenatos se realizó el mismo procedimiento de homogeneización que el descrito en el punto 10.1, pero en este caso se utilizó otro buffer de lisis. Las muestras se dejaron reposar en hielo por 30 minutos, y se centrifugaron a 4°C durante 30 minutos a 14000 g. Luego de eliminar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 80 µl de buffer IP, se sonicó y centrifugó durante 60 minutos a 14000 g y 4°C, para finalmente recolectar sobrenadante y guardarlo a -80°C hasta su utilización.

#### **11.2. Determinación de proteína total**

Se realizó el mismo protocolo que el utilizado en el punto 10.2.

### 11.3. Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación es una técnica basada en el uso de una proteína A o proteína G que, al presentar gran afinidad por la región constante de las inmunoglobulinas de los anticuerpos, forman enlaces con los mismos. El lisado proteico se incubaba con un anticuerpo que reconoce específicamente a su antígeno, que es la proteína de interés. Una vez que se establece dicha unión (proteína-anticuerpo) se incubaban con la Proteína A o G, las cuales se encuentran acopladas a bolitas de agarosa, lo que permite su precipitación mediante una centrifugación. Una vez aisladas las bolitas (que tiene unido el anticuerpo y la proteína de interés), se detecta el antígeno mediante la técnica de western blot.

Para la realización de la inmunoprecipitación se tomó una cantidad de homogenato correspondiente a 300 µg de proteína total, al que se le agregó el buffer IP y el anticuerpo específico diseñado contra el NHE-1. Esta mezcla se agitó en un agitador orbital a 4°C durante 60-90 minutos. Luego se agregó la proteína AG agarosa (Santa Cruz Biotechnology, 20 µl), y se la volvió a agitar durante 60-90 minutos. Una vez finalizada, se centrifugó a 1000 g, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en buffer IP. Se realizaron 3 lavados con buffer IP, realizando centrifugaciones de 2 minutos a 1000 g. Por último, el pellet fue resuspendido en buffer IP junto con sample buffer y DTT, y se lo conservó a -20°C hasta realizar la electroforesis.

### 11.4. Western blot

Se procedió siguiendo el protocolo detallado en el punto 10.4. Para estimar el grado de fosforilación del NHE-1, como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo anti-sitio de unión para la proteína 14-3-3 (MU 14-3-3), y un anticuerpo anti-NHE-1 para su normalización (**Tabla 3**).

| Anticuerpo    | Preparado en/ dilución   | Marca y N° Catálogo                |
|---------------|--------------------------|------------------------------------|
| MU 14-3-3     | T-TBS 1X, BSA 1%, 1:1000 | Cell Signaling, #9601              |
| NHE-1 (H-160) | T-TBS 1X, BSA 1%, 1:1000 | Santa Cruz Biotechnology, sc-28758 |

**Tabla 3:** Anticuerpos primarios para la IP

A la hora de querer realizar estos ensayos de la actividad del NHE-1 en los músculos papilares aislados de los ratones, se presentó cierto inconveniente. Debido a que el peso de estos músculos ronda entre los 4-6 mg, y que para realizar una electroforesis se



necesita aproximadamente 20 mg, se tuvo que buscar una alternativa a la hora de realizar la inmunoprecipitación y posterior corrida electroforética. Para ello, fue necesario juntar más de un papilar del mismo grupo para obtener una muestra. Es decir, los 7 papilares de los ratones WT se juntaron en tres grupos (un grupo con tres papilares, y los otros dos grupos con 2 músculos cada uno), mientras que en el caso de los TRX1 los 8 papilares se agruparon en tres grupos (dos grupos de 3 papilares, y un grupo de dos). Una vez que los grupos de músculos fueron homogeneizados, se procedió de igual forma que la antes mencionada para el resto de las muestras (10.1-10.4)

## 12. Determinación de ARNm por RT-PCR

Una vez finalizado los protocolos de estiramiento, los músculos papilares de rata se almacenaron con el buffer RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) y se los guardó a -80°C hasta su uso. Posteriormente, el ARN total de los músculos papilares se aisló de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN (0,8 µg) se retro-transcribió usando el kit Omniscript RT (Qiagen) mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Una dilución del ADNc resultante se utilizó para cuantificar el contenido relativo de ARNm mediante PCR en tiempo real (iCycler iQ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad) usando cebadores apropiados y SYBR Green como sonda fluorescente.

Los cebadores utilizados (diseñados con el software Primer3) fueron:

- **18S** (control interno): cebador directo 5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACAC-3';  
cebador inverso 5'-CCGAGGGCCTCACTAAACC-3';
- **DUSP6**: cebador directo 5'-CTGTGCCAAGGACTCTACTAAC-3';  
cebador inverso 5'-CAAACAGATTGGGCAGATTGG-3';
- **DUSP7**: cebador directo 5'-TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT-3';  
cebador inverso 5'-TGGCCACCCTCTGATATACT-3'.

Las reacciones de PCR se realizaron con TaqDNA polimerasa (Invitrogen). Al final de la amplificación se adquirieron los datos de fluorescencia, se midieron y calcularon los umbrales para todos los ciclos de cada gen, a través de un software de computadora (iCycler IQ OSS, versión 3.0a, Bio-Rad), los cuales fueron normalizados por los valores del ARNr 18s. Para cada experimento de RT-PCR en tiempo real, se obtuvo una curva de

fusión del gen amplificado para confirmar la especificidad de la amplificación y que sólo se había amplificado un producto en cada caso sin formación de dímeros del cebador.

### **13. Determinación de anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ )**

La medida de la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  se realizó a través de la técnica de quimioluminiscencia con Lucigenina. Para ello, tiras finas de tejido de ventrículo izquierdo de ratones C57 se incubaron en solución Krebs-Hepes con o sin Ang II 1 nM (equivalente a la que desencadena la SFF por estiramiento [134]) o 10 nM por 5 minutos. Luego se agregaron los inhibidores de p38-MAPK, SB, (10 $\mu\text{M}$ ) o de TRX1, Auranofina, un inhibidor de la TRXr, (2 $\mu\text{M}$ ) durante 10-15 minutos. Una vez transcurrido los tiempos de incubación se agregó Lucigenina 5  $\mu\text{M}$  y se registró la quimioluminiscencia con un luminómetro (Chameleon, Hidex, Finlandia) durante 30 segundos, con un intervalo de 4-5 min, durante 30 minutos. A las muestras se les restó el fondo y la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  se normalizó por miligramos de tejido de peso seco por minuto, y los resultados se expresaron como porcentaje del Control (C). Si bien hay reportes que indican que el método de la Lucigenina no permite la detección precisa de la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  [135], diversos estudios de nuestro laboratorio demuestran que la sensibilidad es suficiente para detectar aumentos de  $\cdot\text{O}_2^-$  por encima del fondo, tanto en condiciones basales como luego de diversas intervenciones [136, 137].

### **14. Ecocardiografía en ratones transgénicos**

Debido a que los ratones utilizados presentan una sobreexpresión de la TRX1 a nivel cardíaco, previo al sacrificio, se decidió realizar estudios de ecocardiografía transtorácica bajo anestesia suave (287,5 mg/kg de 2,5% 2,2,2-tribromoetano filtrado) para evaluar si esta modificación genética había afectado la geometría y función cardíaca. Para ello se utilizó un transductor lineal de 14 MHz con el cual se realizaron ecocardiografías de eje corto, en un plano de imagen paraesternal de dos dimensiones para obtener un trazado en modo M a nivel de los músculos papilares, como se describió previamente [138].

Las medidas para el análisis de la estructura y función del ventrículo izquierdo se hicieron considerando las imágenes de 3 latidos consecutivos, siguiendo las especificaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía [139]. Los parámetros medidos fueron: DDVI: Diámetro diastólico del ventrículo izquierdo; DSVI: Diámetro

sistólico del ventrículo izquierdo; PPD: Pared posterior en diástole y PPS: Pared posterior en sístole. Para determinar la función sistólica se calculó la Fracción de Eyección (FE%) y la Fracción de Acortamiento (FA%). La FE se estimó relacionando las dimensiones del ventrículo izquierdo elevadas al cubo como  $FE (\%) = [(DDVI^3 - DSVI^3) / DDVI^3] * 100$ . La FA se calculó relacionando los diámetros del ventrículo izquierdo como  $FA (\%) = [(DDVI - DSVI) / DDVI] * 100$ . A su vez, también se determinó la Frecuencia cardíaca (FC).

Para las determinaciones de hipertrofia cardíaca, se pesaron los ratones (PR); luego del sacrificio se pesó el ventrículo izquierdo (MVI) y se midió la longitud de la tibia (LT). Con estos parámetros se determinaron los índices de masa ventricular izquierda, IMVI:  $MVI/PR$  (mg/g) y el  $MVI/LT$  (mg/mm).

## 15. Análisis estadístico

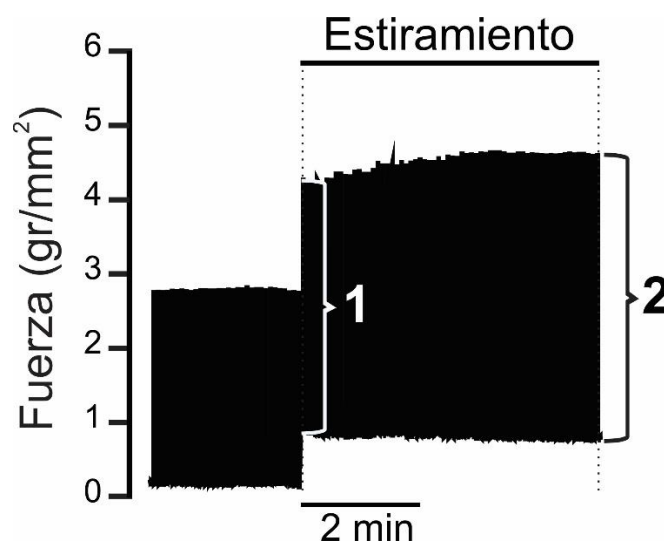
Los datos se expresan como media  $\pm$  Error Standard (ES). El análisis estadístico utilizado dependió del protocolo experimental. Las comparaciones se hicieron por test de t de Student para muestras apareadas, o independientes cuando se compararon dos grupos diferentes. Se usó ANOVA de una vía seguido de un post-test de Student-Newman-Keuls para comparar 3 o más intervenciones. Para los registros de las intervenciones en función del tiempo se utilizó ANOVA de dos vías, seguidos de un post-test de Holm-Sidak's. Para comparar los datos con  $n < 4$  se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Todo el análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad prism y se consideró un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

# **RESULTADOS**

### Participación de p38-MAPK sobre el desarrollo de la SFF

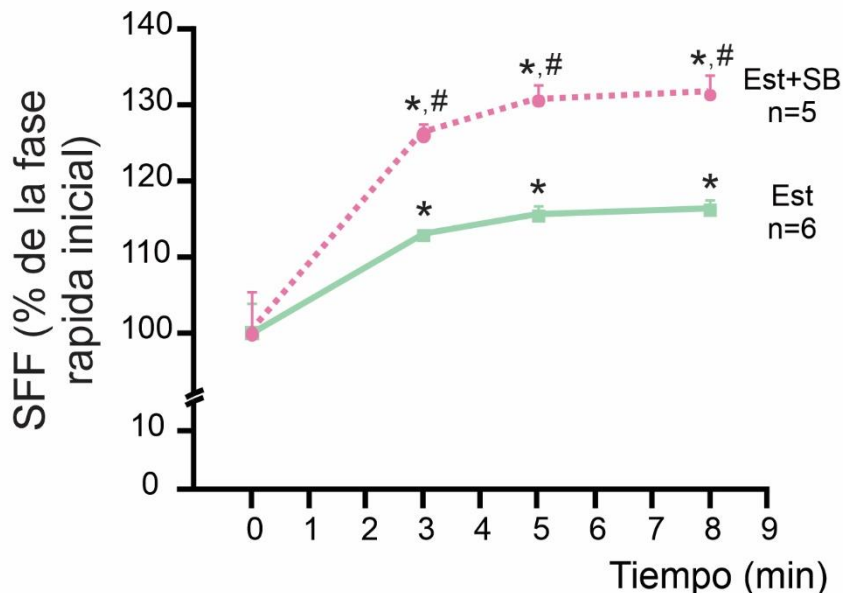
Para cumplir el primer objetivo se procedió a estirar músculos papilares, siguiendo el protocolo detallado en el apartado de *Materiales y Métodos*. La **Figura 8** muestra un registro representativo de la fuerza normalizada por el área de sección transversal, en un músculo papilar que fue estirado abruptamente del 92 al 98% de su longitud máxima. En el registro puede observarse claramente la respuesta de la fuerza en dos fases sucesivas como consecuencia del súbito estiramiento: un aumento rápido e inmediato correspondiente al conocido mecanismo de Frank-Starling (marcado con "1"), seguido de un incremento mucho más lento denominado SFF (marcado con "2").



**Figura 8: Fuerza normalizada por área de sección transversal luego del estiramiento.** Registro representativo de la fuerza normalizada ( $\text{gr}/\text{mm}^2$ ) en un músculo papilar estirado desde el 92 a 98% de  $L_{\text{máx}}$ . El "1" indica la fase rápida inicial generada inmediatamente después del estiramiento y fue considerada como 100%; el "2" muestra la fuerza final observada a los 5 minutos de estiramiento. La magnitud final de la SFF se calculó respecto al aumento inicial de la fuerza como:  $\frac{\text{magnitud } 2 * 100}{\text{magnitud } 1}$ .

Con el objetivo de evaluar si p38-MAPK estaba implicada en la regulación del desarrollo de la SFF, se midió la magnitud de la fuerza contráctil luego del estiramiento de los músculos papilares aislados de rata, en presencia y ausencia del inhibidor de p38-MAPK, el SB202190 (SB), y se comparó esta respuesta a distintos tiempos: 3, 5 y 8 minutos. En la **Figura 9** se presentan los resultados promedios de la fuerza en función del tiempo. Como se puede apreciar el estiramiento abrupto (0 minutos) produjo un incremento significativo de la fuerza a partir de los 3 minutos, y se mantuvo sin diferencias significativas hasta el final del protocolo (8 minutos). Al pre-incubar con SB se observó un aumento significativamente mayor de la SFF respecto a los controles. Este resultado

permitió concluir que la activación de p38-MAPK participa del desarrollo de la SFF ya que su inhibición provoca un aumento mayor de la fuerza contráctil.

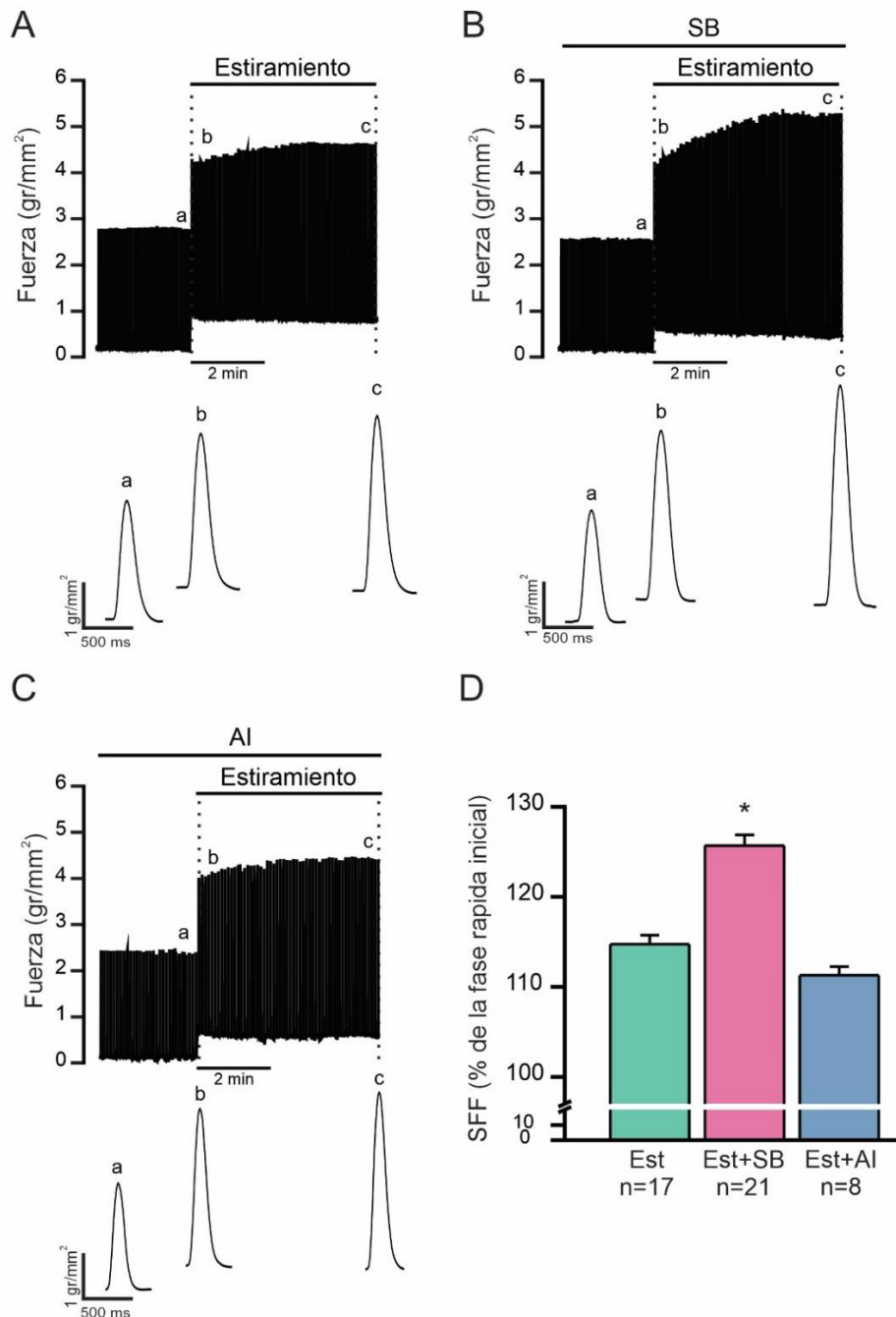


**Figura 9: SFF en función del tiempo de estiramiento.** Resultados promedios de la SFF expresados como porcentaje de la fase rápida inicial, calculados luego de 3, 5 y 8 minutos de estiramiento en ausencia o presencia del SB (10  $\mu$ M). El estiramiento (Est) provocó un aumento significativo de la fuerza, el cual es mayor cuando la p38-MAPK está inhibida (al realizar el estiramiento en presencia de SB). \*indica  $p < 0,05$  vs 0 min; # indica  $p < 0,05$  vs Est.

Debido a que a los 8 minutos de estiramiento la fuerza contráctil no presentaba diferencias significativas con la fuerza obtenida tanto a los 3 como a los 5 minutos, se decidió que de aquí en adelante los siguientes experimentos se realizarían estirando los músculos por 5 minutos.

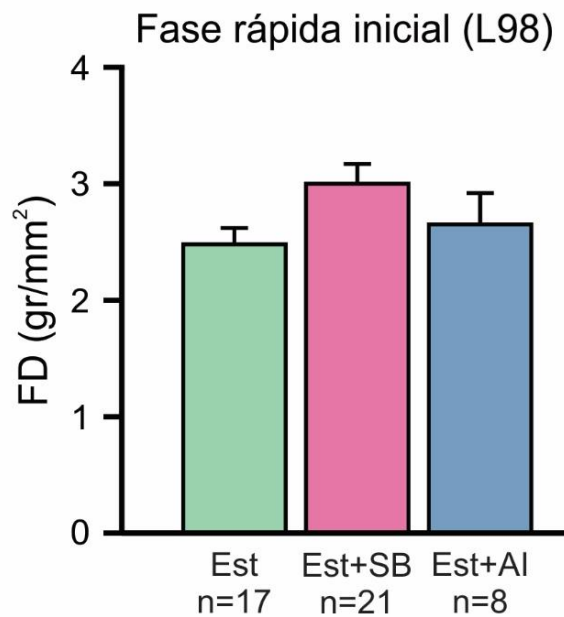
Una nueva serie de músculos papilares fueron estirados por 5 minutos incubados con el inhibidor de la p38-MAPK o con su análogo inactivo, el SB202474 (AI), y comparados con músculos controles (estirados en ausencia de ambas drogas). En la **Figura 10** se muestran los registros representativos de Fuerza normalizada ( $\text{gr}/\text{mm}^2$ ), similares al de la **Figura 8**, en las siguientes condiciones: **(A)** control de estiramiento (Est); **(B)** estiramiento en presencia del inhibidor de p38-MAPK, SB (Est+SB); y **(C)** estiramiento en presencia del análogo inactivo AI (Est+AI). En el caso de los músculos que fueron pre-incubados con el inhibidor de p38-MAPK, se observó un aumento significativo de la SFF comparado con el control estirado, tal como se puede apreciar en los registros representativos (**Figura 10B**, marcado con el punto "c"), así como en los promedios

generales de SFF, donde la fuerza fue expresada como porcentaje de la fase rápida inicial (**Figura 10D**). Los músculos pre-tratados con el análogo inactivo del SB desarrollaron una SFF similar a los controles no tratados (**Figura 10C y 10D**).



**Figura 10: Desarrollo de la SFF de músculos papilares aislados, en ausencia y presencia del inhibidor de p38-MAPK.** La inhibición de p38-MAPK produce un incremento en el desarrollo de la SFF. **A.** Registro representativo de fuerza contráctil de un músculo papilar de rata sometido a un incremento abrupto en su longitud desde L92 a L98, donde se puede apreciar la clásica respuesta de la fuerza en dos fases sucesivas debida al estiramiento (Est). Debajo del registro, se observan los trazos individuales de fuerza correspondientes a los puntos indicados en el panel superior, siendo “a” fuerza en L92 (previo a estirar), “b” fuerza luego del estiramiento abrupto, y “c” fuerza a los 5 minutos del estiramiento. **B y C.** Lo mismo que en A, pero en músculos que fueron pre-incubados con el inhibidor de p38-MAPK, el SB (Est+SB) o con el análogo inactivo (Est+AI) respectivamente (dosis 10  $\mu$ M). **D.** Promedios de la SFF expresados como porcentaje de la fase rápida inicial. \* indica  $p < 0,05$  vs. Est y Est+AI.

Es importante mencionar que ni el inhibidor de la p38-MAPK, ni el análogo inactivo, AI, produjeron cambios en la fuerza basal durante los 20 minutos de incubación en L92 (L92<sub>f</sub> del SB:  $101,95 \pm 1,25$  % del L92<sub>i</sub>-SB, n=21; L92<sub>f</sub> del AI:  $104,16 \pm 1,83$  % del L92<sub>i</sub>-AI, n=8, ns), así como tampoco presentaron diferencias significativas en la fase rápida inicial de aumento de fuerza post-estiramiento (L98), fuerza que se corresponde con el mecanismo de Frank-Starling (**Figura 11**).



**Figura 11: Fuerza contráctil en músculos papilares aislados.** Valores promedio de fuerza desarrollada (FD) inmediatamente luego del estiramiento, L98 (fase rápida inicial). No se encontraron diferencias significativas en las distintas condiciones experimentales

Por otro lado, también se calcularon los tiempos de relajación (en mseg), medidos como el tiempo hasta la mitad de la relajación (T1/2) inmediatamente luego del estiramiento abrupto ("b"), así como a los 5 minutos del mismo ("c") (**Tabla 4**). En este caso, no se observaron cambios significativos bajo la inhibición de p38-MAPK, ni con el agregado del análogo inactivo. Estos resultados sugieren indirectamente que la capacidad de respuesta al calcio por parte de los miofilamentos no sería responsable del aumento observado en la fuerza.



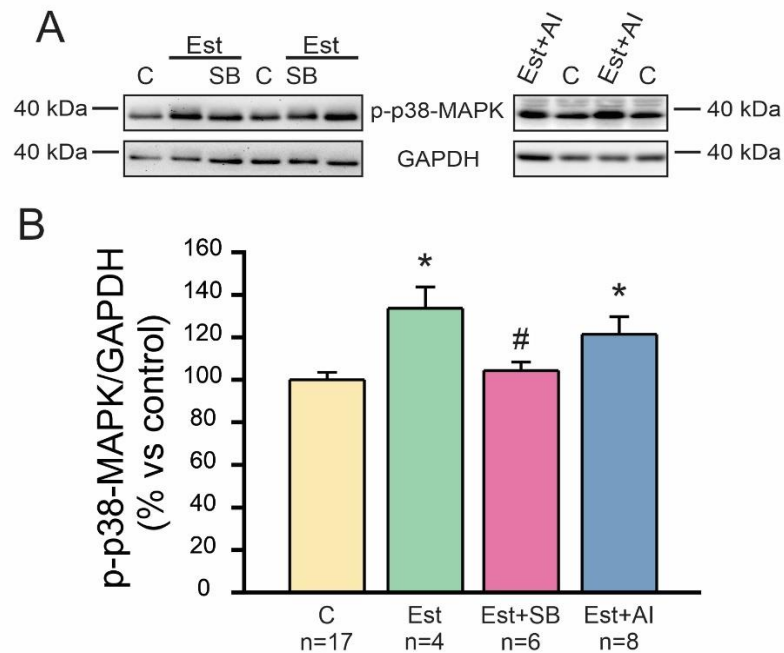
|                    | Est (n=16)    |               | Est+SB (n=21) |               | Est+AI (n=8)  |               |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                    | "b"           | "c"           | "b"           | "c"           | "b"           | "c"           |
| <b>TTP (mseg)</b>  | 154,69 ± 4,09 | 155,31 ± 4,29 | 160,95 ± 5,23 | 161,43 ± 5,79 | 160,63 ± 5,21 | 162,50 ± 4,72 |
| <b>T1/2 (mseg)</b> | 92,81 ± 4,38  | 93,44 ± 4,63  | 100,48 ± 5,59 | 101,67 ± 5,68 | 79,38 ± 4,27  | 77,50 ± 3,27  |
| <b>+T/-T</b>       | 1,62 ± 0,07   | 1,68 ± 0,07   | 1,69 ± 0,07   | 1,72 ± 0,07   | 1,58 ± 0,04   | 1,55 ± 0,05   |

**Tabla 4: Tiempo al pico de tensión (TTP) y parámetros de relajación T1/2 y +T/-T.** Tiempos observados durante la SFF en músculos papilares luego del estiramiento (Est), en presencia de SB (Est+SB) y de AI (Est+AI). "b" y "c" corresponden a los puntos marcados en la Figura 10, inmediatamente luego del estiramiento abrupto y a los 5 minutos posteriores, respectivamente.

De acuerdo con los resultados hasta acá obtenidos, que muestran que la p38-MAPK participa de la SFF, se decidió evaluar su actividad luego de los 5 minutos de estiramiento, en cada una de las condiciones experimentales previamente evaluadas. Para ello, al finalizar el protocolo de estiramiento (5 minutos en L98), los músculos papilares se congelaron y procesaron para realizar luego una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, y detectar los niveles de fosforilación utilizando anticuerpos específicos.

En la **Figura 12A** se observan las bandas representativas, tanto de p38-MAPK fosforilada, p-p38-MAPK, como de la proteína GAPDH utilizada para la normalización; mientras que en el panel **12B** se muestra el porcentaje promedio de la fosforilación de p38-MAPK normalizada (p-p38-MAPK/GAPDH) y expresada como porcentaje del control sin estirar (C). Se puede apreciar que el estiramiento, y el estiramiento en presencia del análogo inactivo (Est y Est+AI), provocaron un aumento significativo en los niveles de p-p38-MAPK (es decir, aumentaron su actividad), con respecto al grupo control sin estirar. Este efecto no se visualizó en los músculos pre-tratados con el inhibidor de p38-MAPK, SB, donde se observaron valores de fosforilación similares a los obtenidos en el grupo control. Esta información resulta valiosa ya que no solo demuestra la activación de p38-MAPK inducida por el estiramiento, sino que a su vez corrobora la efectividad del inhibidor sobre la activación de la quinasa.

Es importante mencionar que las drogas utilizadas no modificaron *per se* los niveles de fosforilación de p38-MAPK de forma significativa (SB: 105,2 ± 3,6% vs control sin estirar, n=11; análogo inactivo del SB, SB202474: 102 ± 4% vs control sin estirar, n=4).

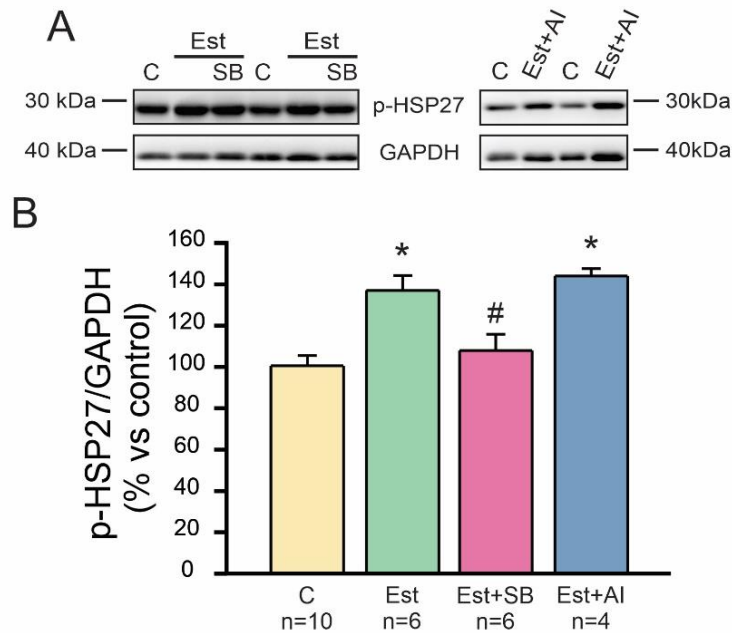


**Figura 12: Activación de p38-MAPK luego del estiramiento.** El estiramiento provocó un aumento significativo de la fosforilación de p38-MAPK (p-p38-MAPK); efecto que fue cancelado al utilizar el inhibidor de dicha quinasa. **A.** Bandas representativas del western blot de la p-p38-MAPK y GAPDH, utilizado como normalizador, en los distintos protocolos realizados. **B.** Resultados promedio de la p-p38-MAPK/GAPDH, expresados como porcentaje del control sin estirar (C). \*  $p < 0,05$  vs C; #  $p < 0,05$  vs Est y Est+AI.

Con el fin de seguir corroborando que p38-MAPK había sido activada luego del estiramiento se decidió utilizar otra estrategia experimental y analizar un blanco conocido de dicha quinasa, la proteína de shock térmico 27 (HSP27, del inglés Heat shock protein 27). Esta quinasa de 27 kDa, sensible al estrés, se fosforila de forma indirecta por la p38-MAPK a través de una MAPK intermediaria (la MAPKAPK-2 y MAPKAPK-3). Se ha demostrado que la vía p38-MAPK/MAPKAPK-2/HSP27 en el miocardio es activada por estímulos estresantes [140, 141].

Como se observa en la **Figura 13**, luego de 5 minutos de estiramiento los niveles de fosforilación de la HSP27 (p-HSP27) aumentaron significativamente, mientras que al inhibir a p38-MAPK este incremento no se evidenció. En los músculos incubados con el AI, se obtuvieron niveles de fosforilación comparables con el grupo estirado.

Cabe destacar que ni el SB ni su análogo inactivo AI, por sí solos modificaron los niveles basales de p-HSP27 ( $88,40 \pm 6,94\%$  vs. el control,  $n=4$  y  $98,73 \pm 12,91\%$  vs el control,  $n=4$ , respectivamente), corroborando que es el estiramiento el responsable de la activación de p38-MAPK, y que esta quinasa fosforila y activa a la HSP27.



**Figura 13: Activación de la HSP27 luego del estiramiento.** Cinco minutos de estiramiento aumentaron significativamente la fosforilación de HSP27 (p-HSP27), blanco conocido de p38-MAPK. Este efecto fue cancelado por el inhibidor de p38-MAPK (Est+SB), pero no así por el análogo inactivo (Est+AI), lo que demuestra que el estiramiento activa p38-MAPK. **A.** Bandas originales de los inmunoblot. **B.** Datos promedios de la p-HSP27/GAPDH, expresados como porcentaje del control sin estirar (C). \* indica  $p < 0,05$  vs C; # indica  $p < 0,05$  vs. Est y Est+AI.

***Por lo tanto, en base a los resultados hasta aquí obtenidos, podemos concluir que la activación de p38-MAPK inducida por el estiramiento, ejerce una regulación negativa sobre el desarrollo de la SFF.***

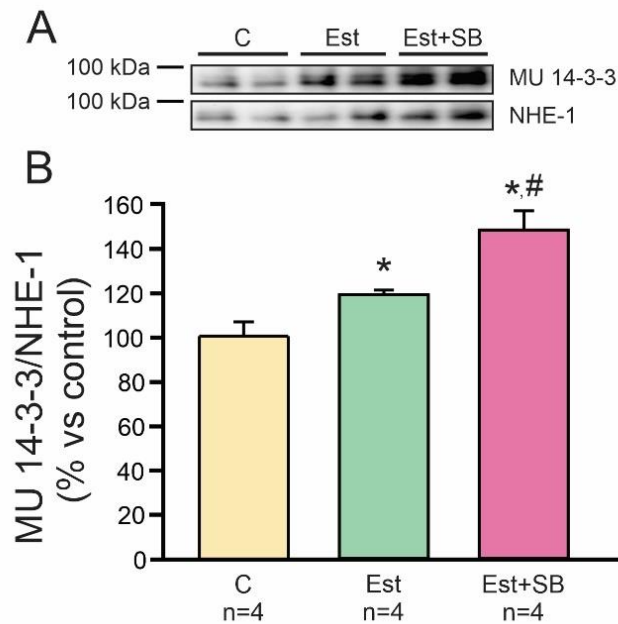
### Activación del NHE-1 por estiramiento del miocardio

Una vez que se confirmó que la activación de p38-MAPK regula el desarrollo de la SFF, se decidió evaluar el mecanismo por el cual esta quinasa modula negativamente dicho proceso. Como se expuso en la introducción, diversos trabajos han demostrado que la participación del NHE-1 resulta crucial en la cadena de eventos que conducen a la SFF, ya que su inhibición con un ARN de interferencia cancela esta fase en respuesta al estiramiento [56, 142, 143]. Por ello el siguiente paso fue determinar si existía una relación entre la activación de p38-MAPK y la actividad del NHE-1.

La actividad del NHE-1 está regulada tanto por quinasas que fosforilan residuos en su extremo citoplasmático C-terminal, que aumentan o inhiben su función, así como por una acidosis intracelular.

Como se comentó en la introducción, *Takahashi y col.* demostraron que la fosforilación del NHE-1 en el residuo Serina 703 (Ser703), mediada por la activación de la quinasa p90RSK, provoca un aumento significativo de su actividad [34]. Por lo tanto, se decidió determinar si la inhibición de p38-MAPK modificaba el nivel de fosforilación del NHE-1 en dicho sitio. Para ello, los músculos papilares (que previamente habían sido sometidos a estiramiento durante 5 minutos, en ausencia y presencia del SB o del AI) se congelaron y procesaron para la cuantificación de la fosforilación del NHE-1. Es importante mencionar que no se encuentra disponible para adquirir de forma comercial un anticuerpo específico que reconozca el sitio fosforilado del NHE-1 por la p90RSK, por lo que no puede cuantificarse de la manera directa (como se realizó en el caso de p38-MAPK). La secuencia de aminoácidos que contiene al residuo Ser703 del NHE-1 (Arg-Ile-Gly-Ser-Asp-Pro) cuando esta fosforilado crea el sitio de unión para la proteína 14-3-3 [43], permitiendo que la determinación del nivel de este sitio utilizando un anticuerpo específico, es decir anticuerpo anti-sitio de unión para la proteína 14-3-3 (MU 14-3-3), sea una herramienta útil para estimar el grado de fosforilación del NHE-1. Con el fin de detectar únicamente el nivel de 14-3-3 unido al NHE-1, y no a otras proteínas, primero se realizó una inmunoprecipitación de dicho intercambiador utilizando un anticuerpo anti-NHE-1 [40, 42] y posteriormente se realizó un western blot para detectar la cantidad de MU 14-3-3.

En la **Figura 14A** se presentan las bandas originales del inmunoblot, correspondientes a la determinación de MU 14-3-3 (bandas superiores) y del NHE-1 total (inferiores) utilizado como normalizador. La **Figura 14B** en tanto, muestra el porcentaje promedio de MU 14-3-3/NHE-1 expresado respecto del control sin estirar (C). Como puede observarse, la fosforilación del NHE-1 en el sitio Ser703 aumentó significativamente durante el estiramiento del miocardio, corroborando resultados previos [6]. Es de destacar que el nivel de fosforilación fue mayor en los músculos que habían sido previamente incubados con el SB (Est+SB), sugiriendo de esta forma que p38-MAPK está limitando la fosforilación/activación del NHE-1, quizás al modular la activación de la p90RSK. El agregado de SB en músculos no estirados no modificó por sí solo la fosforilación basal de NHE-1 ( $91,2 \pm 5,5$  % del control,  $n = 6$ , ns).

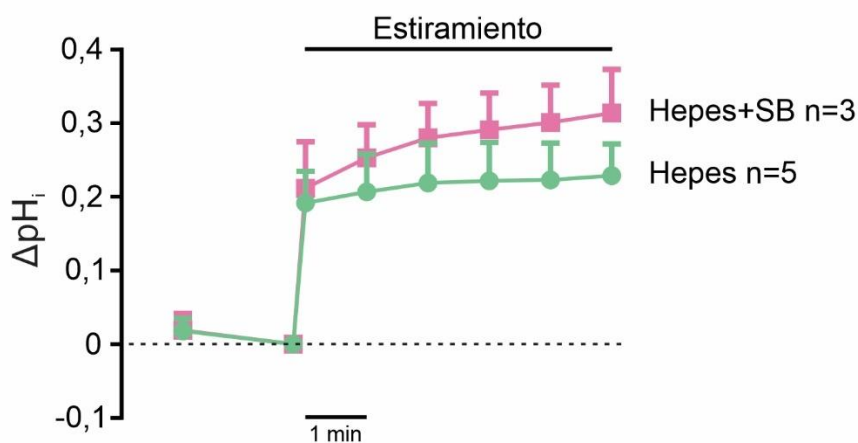


**Figura 14: Fosforilación del NHE-1.** El estiramiento de los músculos papilares indujo el aumento de los niveles de fosforilación del residuo Ser703 del NHE-1, estimado mediante el uso del anticuerpo anti-sitio de unión para la proteína 14-3-3 (MU 14-3-3). Dicho incremento fue aún mayor cuando p38-MAPK estaba inhibida (Est+SB). **A.** Bandas representativas del western blot realizado luego de la inmunoprecipitación del NHE-1. **B.** Resultados promedio del MU 14-3-3/NHE-1 expresados como porcentaje del control sin estirar (C). \*p < 0,05 vs C; # p < 0,05 vs Est.

Como ya se ha mencionado, este intercambiador está involucrado en el mantenimiento del  $pH_i$  a través de la extrusión de protones hacia el medio extracelular, siendo uno de los principales mecanismos alcalinizantes que poseen las células. Por lo tanto, el siguiente paso fue evaluar el impacto de la activación de p38-MAPK, inducida por el estiramiento, en los cambios de  $pH_i$  utilizando dos estrategias diferentes para promover la activación del intercambiador: luego del estiramiento o de una acidosis intracelular sostenida.

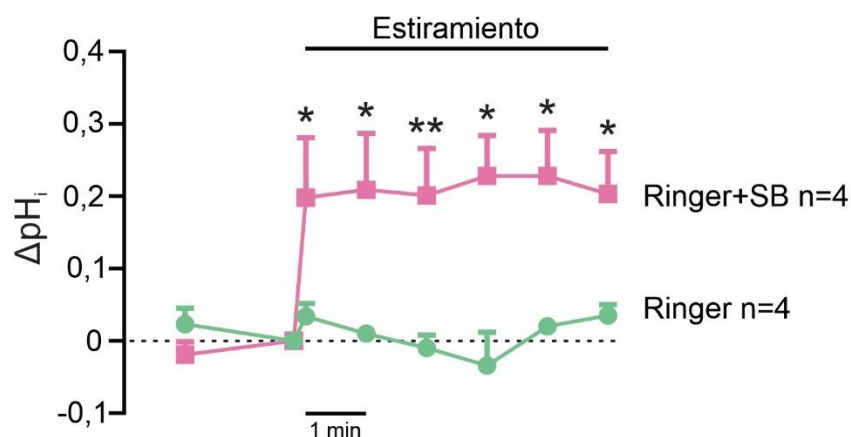
Para estudiar los cambios de  $pH_i$  frente al estiramiento, en un nuevo grupo de papilares se determinó la  $L_{máx}$ , y se los llevó a la L92 donde fueron cargados con el indicador sensible al  $pH_i$ , BCECF-AM. Posteriormente fueron estirados hasta la L98 y se registró la fluorescencia a distintos tiempos durante 5 minutos. Estos experimentos se realizaron en dos buffers distintos. Por un lado, se utilizó el buffer Hepes (solución carente del buffer fisiológico  $HCO_3^-$ ) donde el único mecanismo alcalinizante activo es el NHE-1. En la **Figura 15** se observan los registros representativos de los cambios de  $pH_i$  ( $\Delta pH_i$ ) en función del tiempo, en condición control (Hepes) y en presencia del inhibidor de p38-

MAPK (Hepes+SB). Como se puede observar, el estiramiento provocó un incremento en la variación del  $pH_i$  indicando así la activación del NHE-1, en concordancia con los datos previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo [144]. En el caso de los músculos que habían sido pre-incubados con el inhibidor de la p38-MAPK también se observó un aumento del  $pH_i$  debido al estiramiento. Si bien este incremento pareciera ser mayor que en la condición control al cabo de 5 minutos de estiramiento, no presenta diferencias estadísticamente significativas, lo que probablemente se deba al bajo número de muestras que posee este grupo (Hepes+SB  $n=3$ ). A pesar de esto, los resultados nos permiten especular que el NHE-1 estaría extruyendo más protones, generando así un mayor  $pH_i$  cuando la p38-MAPK se encuentra inhibida. Esto apoyaría la hipótesis de que el incremento en la actividad de p38-MAPK por el estiramiento afecta la fosforilación en el sitio Ser703 del NHE-1 provocando una disminución de su actividad (y por ende un menor  $\Delta pH_i$ ) luego del estiramiento del miocardio, que es revertido al inhibir a la quinasa. Se requiere aumentar el número de experimentos del grupo Hepes+SB para corroborar tal hipótesis. Por otra parte, es importante destacar que en condiciones basales, es decir, previo al estiramiento, no existieron diferencias significativas en el  $pH_i$  entre ambos grupos (Hepes:  $7,13 \pm 0,02$ ,  $n=5$  vs. Hepes+SB:  $7,07 \pm 0,05$ ,  $n=3$ ), lo que indica que el estiramiento es el responsable de aumento abrupto observado del  $pH_i$ .



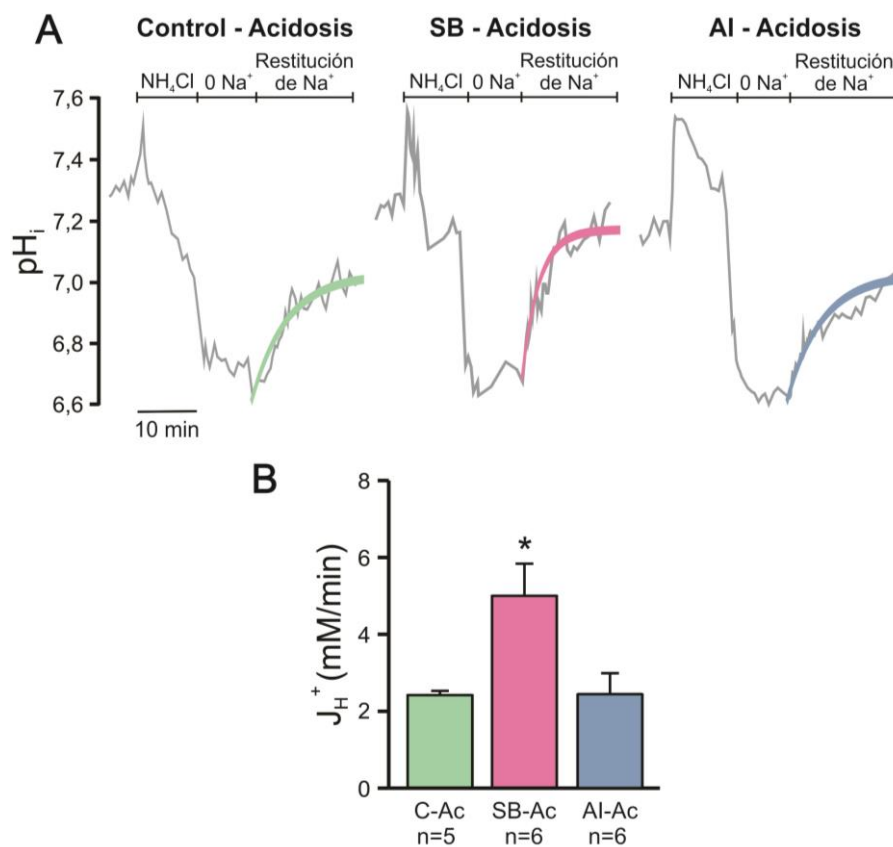
**Figura 15: Variación del  $pH_i$  luego del estiramiento en buffer Hepes.** El estiramiento provoca un incremento en la variación del  $pH_i$ . Registro de la variación del  $pH_i$  en función del tiempo en condiciones basales y luego de un estiramiento abrupto desde la L92 a la L98 (5 minutos de estiramiento). Resultados promedio de  $\Delta pH_i$  expresados como diferencia contra su control basal previo al estiramiento (0 minutos).

El mismo ensayo de la **Figura 15** se repitió en presencia y ausencia del SB, pero ahora en un buffer Ringer que contiene  $\text{HCO}_3^-$ , es decir en las mismas condiciones en las que se determinó la SFF. En este caso, además del NHE-1, se encuentran activos los mecanismos  $\text{HCO}_3^-$ -dependientes involucrados en el mantenimiento del  $\text{pH}_i$ , como el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ , NBC. En condiciones basales, (previo al estiramiento) se observó lo mismo que en el caso anterior: no existen diferencias debidas a la inhibición de p38-MAPK, en los buffer con  $\text{HCO}_3^-$  (Ringer:  $7,17 \pm 0,06$ ,  $n=4$  v. Ringer+SB:  $7,09 \pm 0,04$ ,  $n=4$ ). Sin embargo, luego del estiramiento se evidenció un incremento significativo del  $\text{pH}_i$  en los músculos que se habían pre-incubado con el SB (**Figura 16**). Esto pone en evidencia que la p38-MAPK regula negativamente a los mecanismos alcalinizantes. Por un lado, refuerza la idea de que esta quinasa afecta la activación del NHE-1 (**Figura 14**). Por otro lado, parecieran respaldar hallazgos previos *De Giusti y col.* quienes demostraron en cardiomiocitos aislados de gato, que la Ang II inhibe la isoforma electrogénica del NBC (eNBC) en un mecanismo dependiente de la activación de p38-MAPK [145]. A su vez, en concordancia con lo descrito previamente [143], el estiramiento realizado en Ringer no generó cambios en el  $\text{pH}_i$  debido a que promueve la activación de mecanismos alcalinizantes y acidificantes simultáneamente, lo cual determina que el flujo neto de protones post-estiramiento sea nulo.



**Figura 16: Variación del  $\text{pH}_i$  luego del estiramiento en buffer Ringer.** El estiramiento provocó un incremento significativo en la variación del  $\text{pH}_i$  en presencia del inhibidor SB. Registro de la variación del  $\text{pH}_i$  en condiciones basales y luego de un estiramiento abrupto desde la L92 a la L98. Resultados promedio de  $\Delta\text{pH}_i$  expresados como diferencia contra su control basal previo al estiramiento, 0 minutos. \* indica  $p < 0,05$  vs Ringer.

Por último, para continuar con el estudio de la actividad del NHE-1, en otro grupo de papilares aislados de rata, se midió la velocidad de recuperación del  $\text{pH}_i$  luego una acidosis sostenida (inducida por un pulso de amonio), en ausencia y presencia del inhibidor de p38-MAPK, SB, o de su análogo inactivo, AI. Debido a que los estudios de la activación del NHE-1 mediante acidosis sostenida demostraron no solo que se activa por el incremento de la  $[\text{H}^+]_i$ , sino también que existe una modulación positiva de su actividad mediada por la fosforilación del sitio Ser703 [146], se consideró que esta intervención experimental era ideal para el estudio del efecto de la p38-MAPK sobre el intercambiador de membrana. Es importante mencionar que, para focalizar el efecto de la p38-MAPK sobre el NHE-1, estos experimentos se realizaron en buffer Hepes, con el objetivo de medir únicamente la recuperación del  $\text{pH}_i$  mediada por parte del NHE-1.



**Figura 17: Actividad del NHE-1 expresada como flujo de protones.** Velocidad de recuperación del  $\text{pH}_i$  luego de una acidosis sostenida en Hepes que indica la actividad del NHE-1. **A.** Registros representativos del  $\text{pH}_i$  en función el tiempo, donde se marca el agregado del  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , el inicio de la acidosis (cuando se lava  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en ausencia de  $\text{Na}^+$ , 0  $\text{Na}^+$ ) y la recuperación del  $\text{pH}_i$  al momento de la restitución del  $\text{Na}^+$ . Sobre los registros se superpuso el mejor ajuste exponencial (línea de color) para cada recuperación de  $\text{pH}_i$  post-acidosis. La actividad del NHE-1 fue significativamente mayor cuando p38-MAPK se encontraba inhibida. En presencia del análogo inactivo, la actividad del NHE-1 fue similar al control acidosis. **B** Resultados promedio expresados como flujo máximo de  $\text{H}^+$  en  $\text{mM}/\text{min}$  ( $J_{\text{H}^+}^{\text{máx}} = \text{dpH}_i/\text{dt} * \beta_i$ ). C-Ac: acidosis control; SB-Ac: acidosis en presencia del inhibidor de la p38-MAPK, SB; AI-Ac: acidosis en presencia del análogo inactivo AI. \* indica  $p < 0,05$  vs C-Ac y AI-Ac.



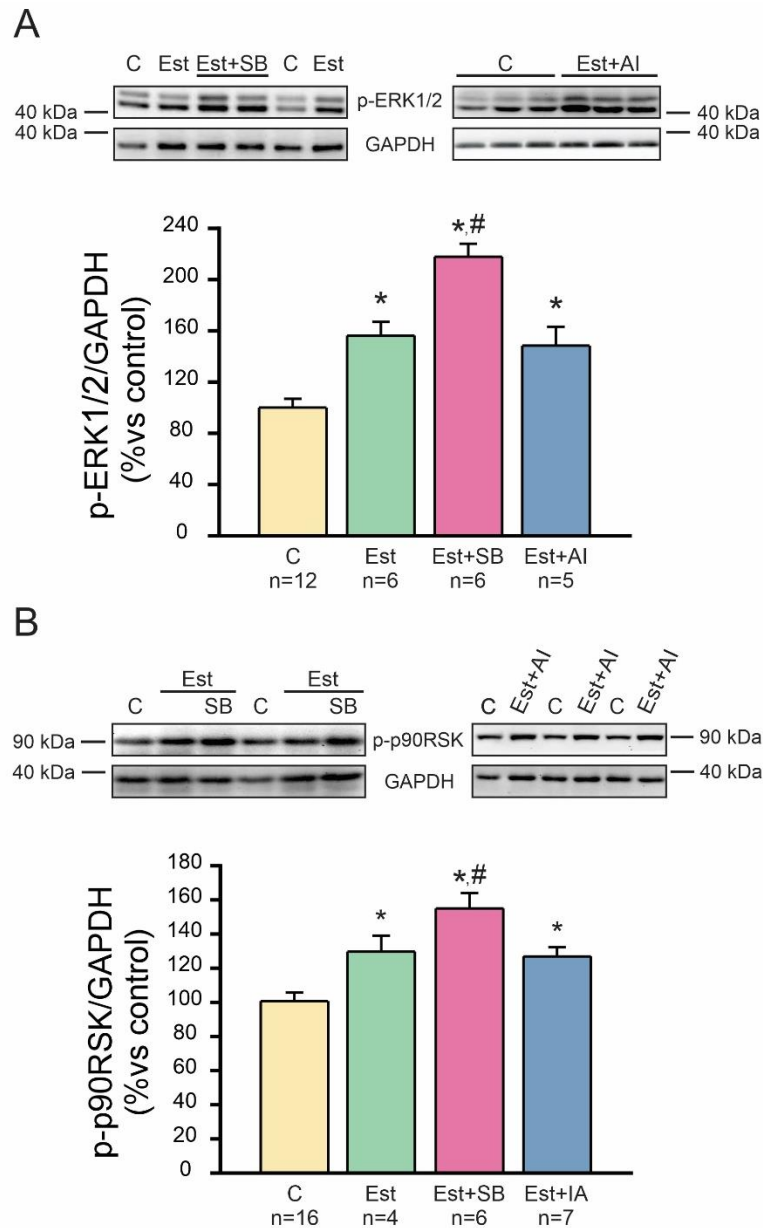
La **Figura 17A** muestra los registros representativos de  $pH_i$  en función del tiempo luego de la inducción de la acidosis intracelular (producida por el agregado de  $NH_4Cl$ , lavado en ausencia de sodio y restitución de  $Na^+$ ), en las tres condiciones estudiadas: control de acidosis (C-Ac), SB en acidosis (SB-Ac) y AI en acidosis (AI-Ac); en tanto que en la **Figura 17B** se presentan los promedios expresados como flujo máximo de protones,  $J_{H^+}^{m\acute{a}x}$ . Los resultados revelaron un aumento significativo en el  $J_{H^+}^{m\acute{a}x}$ , mediado por el NHE-1 luego de la acidosis en presencia del SB (SB-Ac). Sin embargo, este efecto no se evidenció en los músculos pre-incubados con el análogo inactivo (AI-Ac), arrojando valores de  $J_{H^+}^{m\acute{a}x}$  similares al control (C-Ac) (**Figura 17**).

***En conjunto, estos resultados confirman que p38-MAPK regula negativamente la actividad del NHE-1.***

#### **Relación entre p38-MAPK y las quinasas ERK1/2-p90RSK luego del estiramiento**

Los resultados hasta aquí presentados demuestran que el estiramiento provoca un aumento de la actividad de p38-MAPK (**Figura 12 y 13**), la cual modula negativamente la actividad del NHE-1, conduciendo a un menor desarrollo de la SFF (**Figura 11**). A su vez, de acuerdo con lo descripto en la **Figura 14**, cuando p38-MAPK está activa disminuye el grado de fosforilación del NHE-1 en el sitio Ser703, reconocido blanco de la quinasa p90RSK [42]. Datos de *Moor y col.* demostraron, además, la importancia de la regulación de la p90RSK en la activación del NHE-1 en respuesta al estímulo de ET-1 (uno de los factores involucrados en el desarrollo de la SFF) [147]. Estos resultados fueron a su vez observados en trabéculas de ratas sometidas a estiramiento, donde se observó que la liberación de ET-1 (inducida por el estiramiento) activaba al NHE-1 [142]. Teniendo en cuenta todos estos resultados, sumado a que reportes previos confirman la participación de las quinasas ERK1/2 y p90RSK en la activación del NHE-1 frente a una acidosis sostenida [146, 148], y que datos del propio grupo de trabajo establecen que dichas quinasas resultan indispensables para la activación del intercambiador durante la SFF [6, 52], el siguiente paso fue explorar el efecto de la inhibición de p38-MAPK sobre el estado de fosforilación de dichas quinasas en respuesta al estiramiento. Para ello, un grupo de músculos papilares en cada condición experimental (con y sin inhibidores) que

había sido sometido al protocolo de estiramiento se congeló y procesó para determinar el grado de fosforilación de dichas quinasas mediante la técnica de western blot.



**Figura 18: Activación de ERK1/2 y p90RSK post-estiramiento del miocardio.** El estiramiento provocó un aumento de la actividad de ERK1/2 (A) así como de p90RSK (B). En ausencia de la activación p38-MAPK el grado de fosforilación se incrementó aún más, efecto que no se evidenció en presencia del análogo inactivo. **Paneles superiores.** Bandas representativas del inmunoblot mostrando a p-ERK1/2 (presenta una doble banda ya que el anticuerpo utilizado reconoce a 2 de sus isoformas, ERK1 y ERK2) y p-p90RSK respectivamente. En ambos casos se utilizó a GAPDH como normalizador. **Paneles inferiores.** Resultados promedios de p-ERK1/2/GAPDH y p-p90RSK/GAPDH, expresados como porcentaje de su control sin estirar (C). \*indica  $p < 0,05$  vs en C; # indica  $p < 0,05$  vs Est y Est+AI.

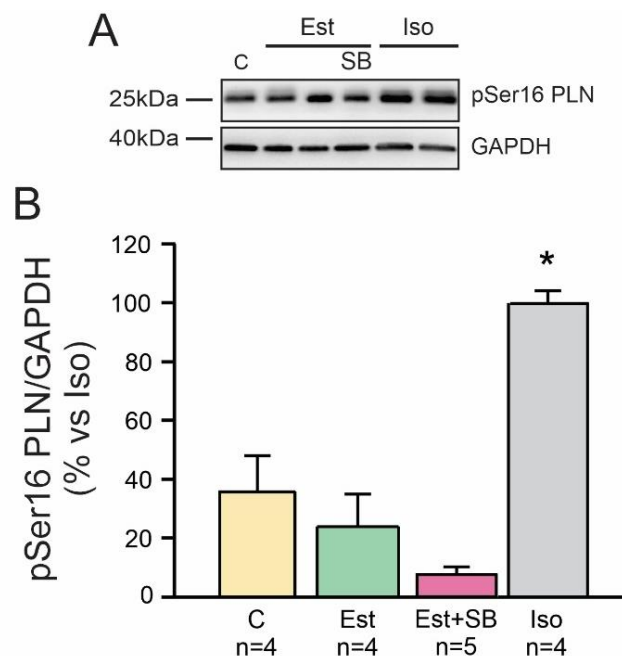
En la **Figura 18** se muestran las bandas representativas de la fosforilación de ERK1/2 (**A**) y p90RSK (**B**), junto a los respectivos promedios generales (**Paneles inferiores**). Se puede apreciar que el estiramiento provocó un aumento significativo de la fosforilación de ERK1/2 y p90RSK, como previamente había sido demostrado por *Villa-Abrille y col.* [6], que resulta consistente con el aumento de fosforilación del NHE-1 mencionado con anterioridad (**Figura 14**). La inhibición de p38-MAPK por SB (Est+SB) provocó un incremento aún mayor en la fosforilación de ambas quinasas luego del estiramiento, mientras que los niveles de fosforilación obtenidos en los músculos pre-tratados con el análogo inactivo (Est+AI) fueron similares a los hallados luego del estiramiento en ausencia de SB (Est). El agregado de las drogas *per se*, SB y AI, no modificó el grado de fosforilación basal de ERK1/2 ( $89 \pm 9$  % vs control, n=5 y  $97 \pm 6$  % vs control, n=5, respectivamente) ni de p90RSK ( $105 \pm 4$  % vs control, n=5 y  $93,8 \pm 7,9$  % vs control, n=4, respectivamente), lo que demuestra que los cambios observados son consecuencia del estiramiento.

***Estos resultados indican que p38-MAPK regula de forma negativa la activación de la ERK1/2 y de la p90RSK, impactando así en la menor activación del NHE-1.***

### **p38-MAPK y activación de Fosfolamban (PLN)**

Como se ha mencionado en la introducción, existe evidencia de que la inhibición farmacológica de p38-MAPK incrementa el efecto inotrópico positivo inducido por ET-1 en corazones perfundidos aislados de ratas, como consecuencia del aumento de la fosforilación en la Ser16 de la PLN [87]. Dado que la ET-1 está involucrada en la vía de señalización desencadenada por el estiramiento miocárdico [4], se decidió explorar si los cambios en la fosforilación de PLN contribuían con la mayor SFF observada bajo la inhibición de p38-MAPK.

Para llevar a cabo estos experimentos, los músculos papilares aislados luego de ser sometidos al protocolo de estiramiento se procesaron adecuadamente para realizar una electroforesis y así poder determinar la fosforilación de PLN en el sitio Ser16. Debido a que la fosforilación de PLN es uno de los principales mediadores de los efectos contráctiles y relajantes de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, y con el fin de conseguir la máxima fosforilación en el sitio Ser16 de esta proteína, se agregó una nueva condición experimental en donde un grupo de músculos se incubó con Isoproterenol (Iso) en una dosis de 100 nM [149].



**Figura 19: Fosforilación de Fosfolamban post-estiramiento.** La fosforilación de PLN en la Ser16 no se vio afectada por el estiramiento miocárdico en ausencia (Est) o presencia de SB (Est+SB) en comparación con los controles no estirados (C). **A.** Se muestran las bandas representativas del western blot. **B.** Datos promedio en todas las condiciones experimentales. La fosforilación de PLN se expresó como porcentaje de su máximo estado de fosforilación obtenido por 100 nM de isoproterenol (Iso). \* indica  $p < 0,05$  vs todos los otros grupos.

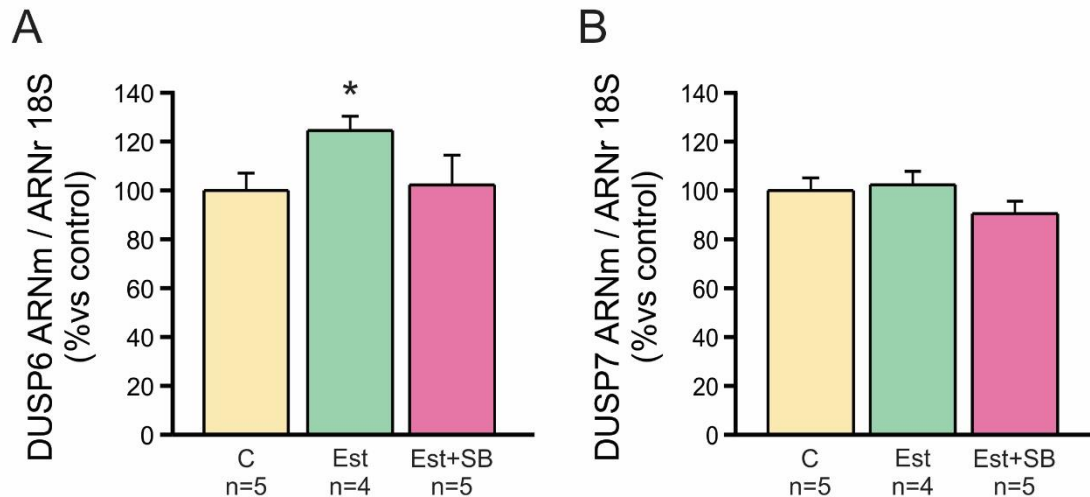
En contraste con los datos de la bibliografía antes citada, la fosforilación de PLN en la Ser16 no se vio afectada por el estiramiento del miocardio, ya sea en ausencia o en presencia del SB (**Figura 19**).

***Estos últimos resultados permiten descartar la participación de PLN en el aumento del desarrollo de la SFF dependiente de la inhibición de p38-MAPK.***

## **Papel de la fosfatasa DUSP6 en la regulación de la actividad del NHE-1 luego del estiramiento del miocardio**

Hasta aquí se logró confirmar la hipótesis de que p38-MAPK regula negativamente el desarrollo de la SFF, a través de la limitación de la activación de las quinasas ERK1/2 y p90RSK que finalmente impactan en la fosforilación y actividad del NHE-1, paso indispensable para el desarrollo de la segunda fase. Sin embargo, quedaba aún por dilucidar el mecanismo subyacente a través del cual p38-MAPK cancela el aumento de la activación de la ERK1/2 y p90RSK. Debido a que p38-MAPK no posee actividad de fosfatasa (es decir, no puede quitar los grupos fosfatos de la ERK1/2 y como consecuencia disminuir su actividad), fue necesario buscar una alternativa. Como se mencionó en la introducción, datos bibliográficos demuestran la existencia de diversas fosfatasas que regulan la actividad de las MAPK, siendo el principal grupo la familia de las DUSPs [93]. Entre ellas, la DUSP6 y DUSP7 se destacan por desfosforilar (quitando simultáneamente los dos grupos fosfatos) específicamente a las proteínas ERK1/2 citosólicas [100]. Por lo tanto, se decidió estudiar si alguna de estas dos fosfatasas estaba involucrada en el mecanismo previamente descrito. Para ello, músculos papilares sometidos al estiramiento en presencia y ausencia del inhibidor de p38-MAPK, se conservaron y procesaron adecuadamente para medir la expresión de las DUSPs tanto a nivel de ARNm como proteico, ya que su actividad depende principalmente del nivel de expresión [100, 150, 151].

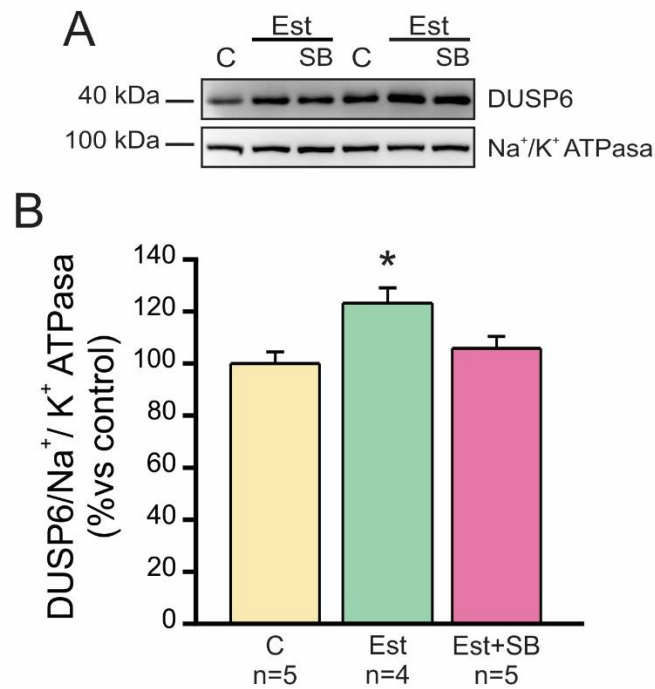
En la **Figura 20** se muestra la cantidad del ARNm de la DUSP6 (**A**) y de la DUSP7 (**B**). Como puede observarse, el estiramiento provocó un aumento significativo de la abundancia del ARNm de la DUSP6; efecto que fue cancelado al inhibir a p38-MAPK con el SB. En el caso de la DUSP7, el estiramiento, tanto en ausencia como en presencia del SB, no provocó cambios significativos en la abundancia de ARNm con respecto al control sin estirar (C).



**Figura 20: Abundancia relativa del ARNm de las DUSPs post-estiramiento.** **A.** Abundancia del ARNm de la DUSP6/ ARNr 18s expresado como porcentaje del control sin estirar (C). Cinco minutos de estiramiento (Est) provocaron un incremento del ARNm de la DUSP6, efecto que fue cancelado en ausencia de actividad de p38-MAPK (Est+SB). **B.** Igual que **A**, pero de la DUSP7. La expresión de esta fosfatasa no fue afectada por el estiramiento. \* indica  $p < 0,05$  vs C y Est+SB.

En base a los resultados obtenidos sobre la expresión (ARNm) de DUSP6 en respuesta a 5 minutos de estiramiento, el siguiente paso fue evaluar si esos cambios en el ARNm se correspondían con un incremento de la expresión de dicha fosfatasa. En la **Figura 21** se muestran los resultados de la expresión proteica de la DUSP6 determinada mediante la técnica de western blot. De forma concordante con lo visto en la **Figura 20**, el estiramiento del miocardio también aumentó significativamente la expresión de la DUSP6 (en comparación con los controles no estirados), efecto que se vio igualmente anulado en presencia del SB (Est+SB) (**Figura 21**). El agregado del SB a los músculos no estirados no modificó el nivel de expresión basal de la DUSP6, demostrando que el aumento de expresión es consecuencia del estiramiento ( $80,03 \pm 14,98$  % vs control,  $n=4$ ).

Estos resultados sugieren que la activación de p38-MAPK por el estiramiento modula positivamente la expresión de DUSP6. En contraste con esto, la DUSP7 parece no estar involucrada en el dicho mecanismo, ya que no se evidenciaron diferencias significativas en el nivel de expresión luego del estiramiento del miocardio tanto en presencia como en ausencia del SB (**Figura 20B**).



**Figura 21: Expresión proteica de DUSP6 post-estiramiento.** El estiramiento (Est) provocó un incremento de la expresión proteica de la DUSP6, efecto que se previno al pre-incubar los músculos papilares con el inhibidor de p38-MAPK (Est+SB). **Parte Superior:** bandas representativas del western blot de la expresión de DUSP6 y de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa utilizada como normalizador. **Parte inferior:** resultados promedio de DUSP6/Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa expresados como porcentaje del control sin estirar (C). \* indica  $p < 0,05$  vs C y Est+SB.

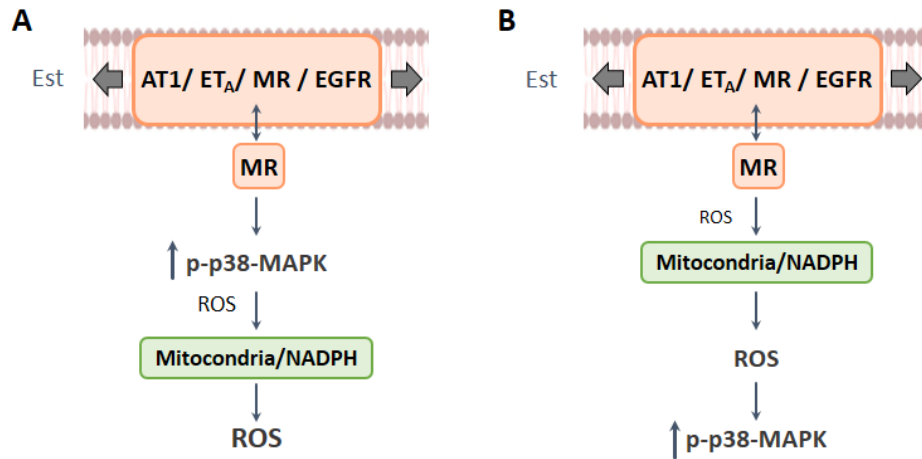
*Tomados en conjunto, los resultados permiten sugerir que p38-MAPK activada por el estiramiento, estimularía a la DUSP6, encargada de desfosforilar a la quinasa ERK1/2 limitando su actividad, y provocando así una menor activación de la p90RSK, lo cual culminaría en un menor desarrollo de SFF debido a una menor actividad del NHE-1.*



## **Rol del estrés oxidativo y la defensa antioxidante en el desarrollo de la SFF**

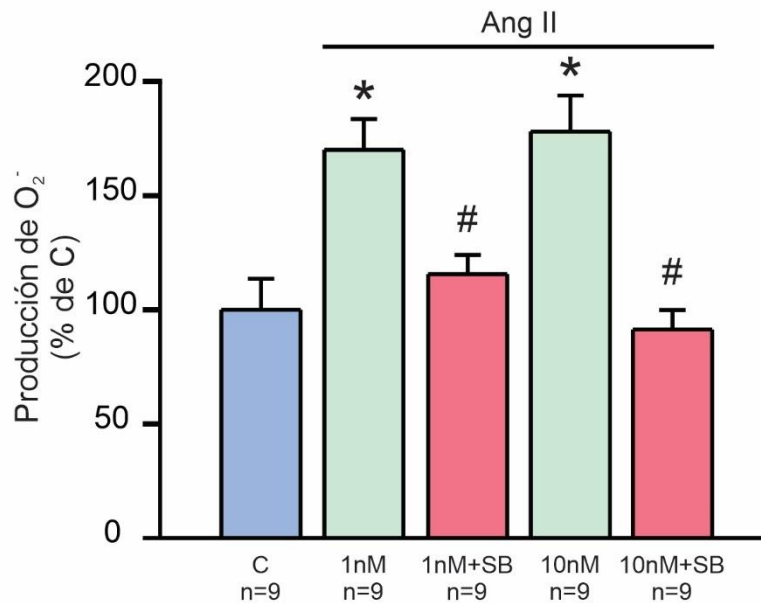
Los resultados hasta acá obtenidos lograron demostrar que la activación de p38-MAPK inducida por el estiramiento modula negativamente el desarrollo de la SFF, a través de la activación de la fosfatasa DUSP6 que inhibe el sistema ERK1/2-p90RSK, impidiendo así la activación del NHE-1. Como se mencionó en apartados previos, experimentos de nuestro grupo de trabajo han puesto en evidencia el rol clave que cumplen las ROS en las vías de señalización que desencadenan la SFF, a través de la modulación de la actividad de las quinasas redox sensibles ERK1/2-p90RSK y por ende del NHE-1 [4, 52]. Sobre la base de estos antecedentes, el siguiente objetivo del presente proyecto de investigación fue estudiar la relación entre las ROS y p38-MAPK.

Diversos estudios avalan la hipótesis de que las ROS son responsables de la activación de p38-MAPK [152], mientras que otros aseguran que p38-MAPK estimula la producción de ROS, los cuales pueden activar nuevamente a la quinasa originando un circuito de retroalimentación positiva que puede proporcionar un mecanismo para la activación sostenida de p38-MAPK [99, 153, 154]. Por lo tanto, existen evidencias controvertidas que dependen de los tejidos, modelos y otras condiciones experimentales, en donde las ROS pueden ser causa o consecuencia de la activación de p38-MAPK [99]. Teniendo en cuenta esto, y que estudios de nuestro laboratorio han demostrado que el estiramiento activa tanto la producción de ROS como a p38-MAPK, aún quedaba por esclarecer dónde entra en juego esta quinasa en la vía que lleva al desarrollo de SFF [4], es decir, si su activación es previa o posterior a la producción de ROS. El esquema de la **Figura 22** resume las dos alternativas a evaluar.



**Figura 22: Esquema que resume las dos posibles ubicaciones de la participación de p38-MAPK y las ROS.** **A.** La activación de p38-MAPK inducida por Ang II es la responsable de la producción/liberación de las ROS mitocondriales. **B.** Las ROS producidas y liberadas por la mitocondria son las responsables de la activación de la quinasa.

Para cumplir con este objetivo se determinó la producción de anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) en tiras de ventrículo izquierdo de ratón, en respuesta a Ang II, en presencia y ausencia de SB (10 $\mu\text{M}$ ). Se utilizó una concentración 1 nM de Ang II ya que previamente se demostró que produce un efecto inotrópico positivo similar al obtenido durante el desarrollo de la SFF como consecuencia del estiramiento [134]. Además, y debido a que en nuestro laboratorio no se había evaluado en ratón el efecto de esta hormona sobre la producción de ROS y desconocíamos si podía reproducir lo observado en otras especies, se adicionó un grupo con una dosis mayor (10 nM). En la **Figura 23** se puede apreciar que ambas concentraciones de Ang II fueron suficientes para incrementar de manera significativa la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$ , mientras que este efecto fue prevenido al pre-incubar las tiras de ventrículo izquierdo con el SB. Estos resultados sugieren que la Ang II incrementa la producción de ROS a través de un mecanismo dependiente de la activación de p38-MAPK.



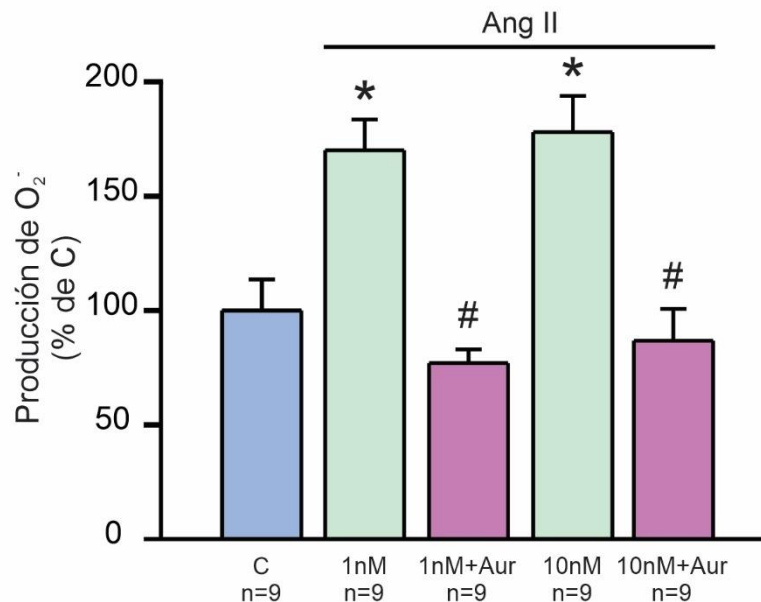
**Figura 23: Producción de  $\cdot\text{O}_2^-$ , efecto de la Ang II en presencia de SB.** La Ang II provocó un aumento significativo en la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$ . Este efecto se canceló al pre-incubar las tiras de ventrículo izquierdo con  $10\mu\text{M}$  de SB. Resultados expresados como porcentaje del control, es decir en ausencia del estímulo de Ang II (C). \* indica  $p < 0,05$  vs C; # indica  $p < 0,05$  vs Ang II.

Seguidamente, habiendo reconocido la importancia de las ROS en el desarrollo de la SFF, y que la activación de p38-MAPK media su producción promovida por la Ang II (paso inicial en la cascada de la SFF), el paso siguiente fue continuar indagando en esta vía de señalización, prestando especial atención al estado oxidativo celular.

En la introducción se mencionó que las células poseen varios mecanismos antioxidantes, ya que el desbalance en el estrés oxidativo desencadena diversas patologías, siendo uno de los principales el sistema TRX/TRXr. Debido a que datos de bibliografía demostraron que la inhibición de TRX1 aumenta el estrés oxidativo [117] y activa a p38-MAPK en respuesta al estrés [155], el siguiente paso fue determinar si la TRX1 participa en la cascada de señalización que lleva al desarrollo de la SFF y qué relación tiene con p38-MAPK.

Lo primero a evaluar fue ver qué ocurría con las ROS al inhibir a la TRX1 en respuesta a la Ang II (como estímulo para simular la vía de la SFF), en un ensayo similar al utilizado con el SB (**Figura 23**). En este caso se utilizó la Auranofina (Aur), droga conocida por inhibir a la TRXr [156] (encargada de reducir a la TRX1), inhibiendo así indirectamente la función de TRX1 (dosis de  $2\mu\text{M}$ ). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 24**, donde se ve que ambas dosis de Ang II produjeron un incremento significativo de la

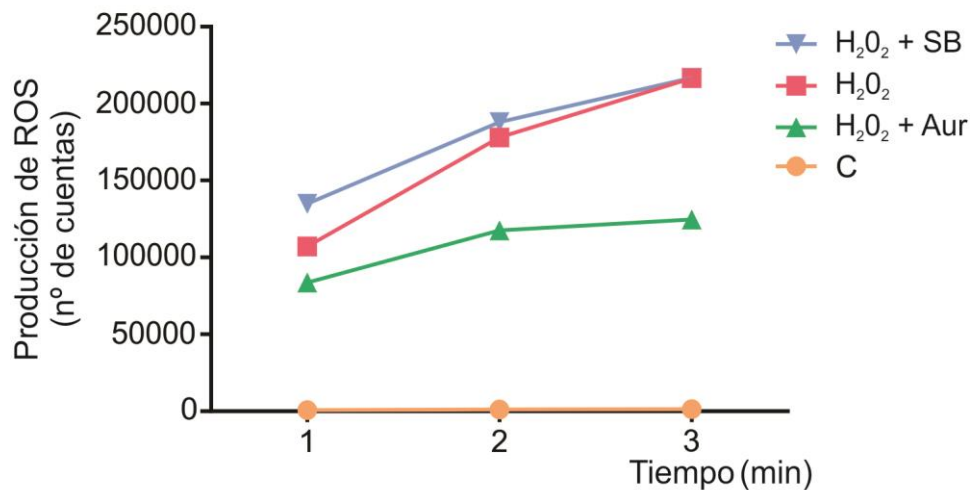
producción de  $\cdot\text{O}_2^-$ , pero que al pre-incubar las tiras de ventrículo izquierdo con Aur, no solo que no se observó mayor estrés oxidativo, sino que éste resultó ser menor que con el estímulo de Ang II.



**Figura 24: Producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  por Ang II en presencia de Auranofina (Aur).** Ambas dosis de Ang II aumentaron significativamente la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$ , efecto que se previno al pre-incubar las tiras de ventrículo izquierdo con  $2\mu\text{M}$  Aur. Resultados expresados como porcentaje del control no estimulado por Ang II (C). \* indica  $p < 0,05$  vs C; # indica  $p < 0,05$  vs Ang II.

Estos datos resultaron llamativos, ya que en diversas investigaciones se observó un incremento en la producción de ROS utilizando la Aur como inhibidor indirecto de la TRX1 [156, 157]. Existe evidencia que demuestra que la reacción de oxidación de la Lucigenina es catalizada por un gran número de iones metálicos [158]. La Aur es un compuesto que contiene Oro, por lo tanto, se decidió evaluar si éste podría estar interfiriendo con el método de detección de la Lucigenina. Para ello, al buffer de medida se le agregó  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $50\mu\text{M}$ ) que en contacto con la Lucigenina emite un fotón. Este ensayo se realizó a su vez en presencia o ausencia de ambos inhibidores. Como puede verse en la **Figura 25**, el pocillo que contenía  $\text{H}_2\text{O}_2$ +Aur produjo un menor número de cuentas por minuto de la producción de ROS comparado con lo que se obtuvo con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  solo. Al realizar el estudio con el inhibidor de la p38-MAPK,  $\text{H}_2\text{O}_2$ +SB, para corroborar que la interferencia en la medida no sea por el agregado de la droga *per se*, se pudo observar que el agregado de SB produjo valores de ROS similares a los producidos por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  solo.

Teniendo en cuenta estos últimos resultados, se comprobó que la Aur interactúa o afecta la medida por el método aquí utilizado, mientras que el SB no, lo que permite confirmar que la falta de activación de p38-MAPK es la responsable del menor aumento de ROS inducido por Ang II.



**Figura 25: Prueba de producción de ROS en presencia de inhibidores.** Medida de la producción de ROS mediada por la reacción entre la Lucigenina con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de Aur (inhibidor indirecto de TRX1, 2 μM) o SB (inhibidor de p38-MAPK, 10 μM). A su vez se determinó la producción de ROS basales (C). Los resultados se muestran como producción de ROS expresados en número de cuentas por minuto.

Debido a que no se puede utilizar la Aur ya que, además de inhibir a la TRX1 interfiere con el método de detección utilizado, se buscó otra estrategia para abordar el estudio de la defensa antioxidante de la TRX1 en la cascada de señalización de la SFF. Para ello se decidió utilizar ratones que sobreexpresan TRX1 específicamente en miocardio. Los mismos fueron generados por el grupo del Dr. Sadoshima [117], y generosamente donados por el “Instituto de Patofisiología Cardiovascular” de la Universidad de Buenos Aires.

### **Caracterización de los ratones que sobreexpresan TRX1: Parámetros morfométricos y ecocardiográficos**

Antes de iniciar las determinaciones experimentales, se decidió evaluar tanto las características morfométricas, como la función cardíaca ya que estos ratones fueron modificados genéticamente al sobreexpresar específicamente la TRX1 en el corazón.

Para ello, se realizaron ecocardiografías transtorácicas en modo M en ratones WT y en los que sobreexpresan TRX1 a los tres meses de edad. Los parámetros determinados se muestran en la **Tabla 5**, donde se puede apreciar que los ratones TRX1 no presentan diferencias significativas ni en el diámetro de fin de diástole y ni en el fin de sístole del ventrículo izquierdo (DDVI y DSVI, respectivamente) comparados con ratones WT. Al medir los diámetros de la pared posterior del ventrículo izquierdo al final de la diástole y de la sístole (PPD y PPS, respectivamente), se observó una leve disminución en el PPD ( $p=0,047$ ). Para evaluar la función cardíaca se calcularon los valores de fracción de eyección (FE %) y de fracción de acortamiento miocárdico (FA %), utilizando los parámetros ecocardiográficos antes mencionados. Como puede verse en la **Tabla 5**, los ratones que sobreexpresan TRX1 conservan la función sistólica. Por último, los ratones presentaron valores similares de frecuencia cardíaca (FC), al ser comparados con sus respectivos controles WT.

|                             | WT (n=5)       | TRX1 (n=5)                |
|-----------------------------|----------------|---------------------------|
| <b>DDVI (mm)</b>            | 3,50 ± 0,15    | 3,58 ± 0,15               |
| <b>DSVI (mm)</b>            | 2,16 ± 0,17    | 2,37 ± 0,13               |
| <b>PPD (mm)</b>             | 0,93 ± 0,03    | 1,07 ± 0,05 ( $p=0,047$ ) |
| <b>PPS (mm)</b>             | 1,24 ± 0,05    | 1,28 ± 0,04               |
| <b>FC (latidos por min)</b> | 482,40 ± 33,75 | 442,40 ± 21,41            |
| <b>FE %</b>                 | 76,45 ± 2,73   | 70,93 ± 1,88              |
| <b>FA %</b>                 | 38,62 ± 2,40   | 33,89 ± 1,49              |

**Tabla 5: Parámetros ecocardiográficos en ratones WT y TRX1.** DDVI: Diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo; DSVI: Diámetro sistólico final del ventrículo izquierdo; PPD: Pared posterior en diástole; PPS: Pared posterior en sístole; FC: Frecuencia cardíaca; FE%: Fracción de eyección; FA%: Fracción de acortamiento.

Luego del sacrificio, los ratones fueron pesados, se les extrajo el corazón y la tibia, para poder calcular dos índices de hipertrofia, donde se relaciona la masa ventricular izquierda (MVI) con el peso corporal del ratón (PR): MVI/PR, mg/gr; o con la longitud de la tibia (LT): MVI/LT, mg/mm. Los datos se presentan en la **Tabla 6**, donde no se observan diferencias significativas en ninguno de dichos parámetros entre ambos ratones.

|                | WT (n=7)      | TRX1 (n=8)    |
|----------------|---------------|---------------|
| PR (gr)        | 28,03 ± 0,93  | 26,30 ± 1,15  |
| LT (mm)        | 20,20 ± 0,63  | 20,23 ± 0,57  |
| PC (mg)        | 128,57 ± 3,40 | 125,00 ± 7,56 |
| MVI (mg)       | 85,71 ± 2,97  | 85,00 ± 5,00  |
| MVI/PR (mg/gr) | 3,06 ± 0,09   | 3,26 ± 0,20   |
| MVI/LT (mg/mm) | 4,27 ± 0,20   | 4,20 ± 0,23   |

**Tabla 6: Determinaciones post-mortem en ratones WT y TRX1.** PR: Peso del ratón; LT: Longitud de la tibia; PC: Peso del corazón; MVI: Masa ventricular izquierda; MVI/PR y MVI/LT: índices de hipertrofia cardíaca.

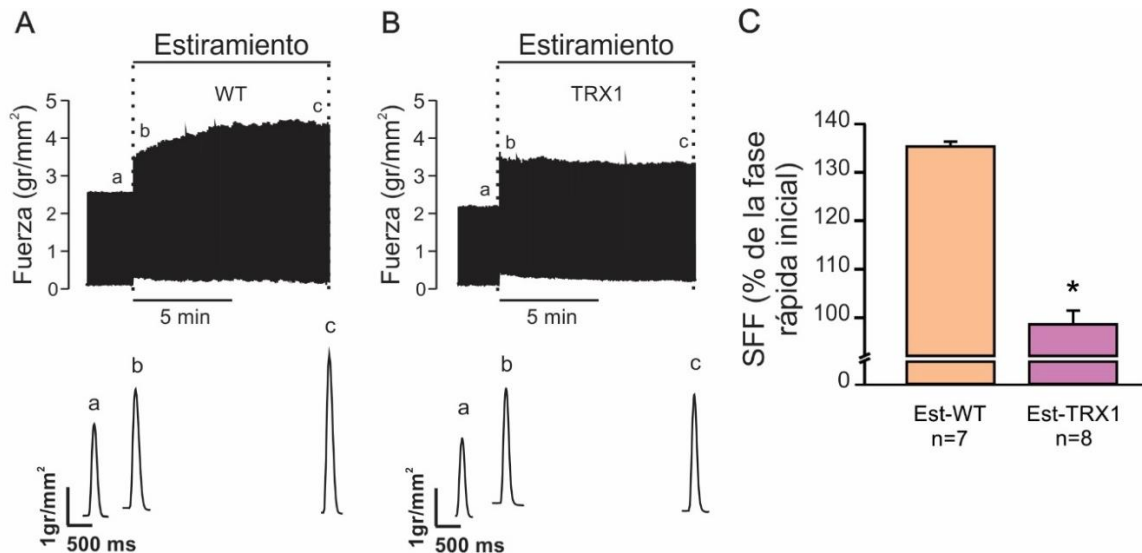
*Estos resultados demuestran que los ratones que sobreexpresan TRX1 conservan tanto la morfología como la función cardíaca, y no presentan hipertrofia cardíaca.*

#### **Determinación de la SFF en ratones que sobreexpresan TRX1**

Una vez caracterizados los ratones transgénicos, el siguiente paso que se decidió abordar fue estudiar si la sobreexpresión de la molécula antioxidante TRX1 afectaba el desarrollo de la SFF. Como se ha descrito previamente, la producción de ROS de origen mitocondrial es un paso determinante en el desarrollo de la SFF [52]. A través de su actividad oxidorreductasa la TRX1 regula el estrés oxidativo, por lo que se planteó la hipótesis de que la sobreexpresión de esta proteína podría disminuir los niveles de las ROS, llevando así a un menor desarrollo de SFF.

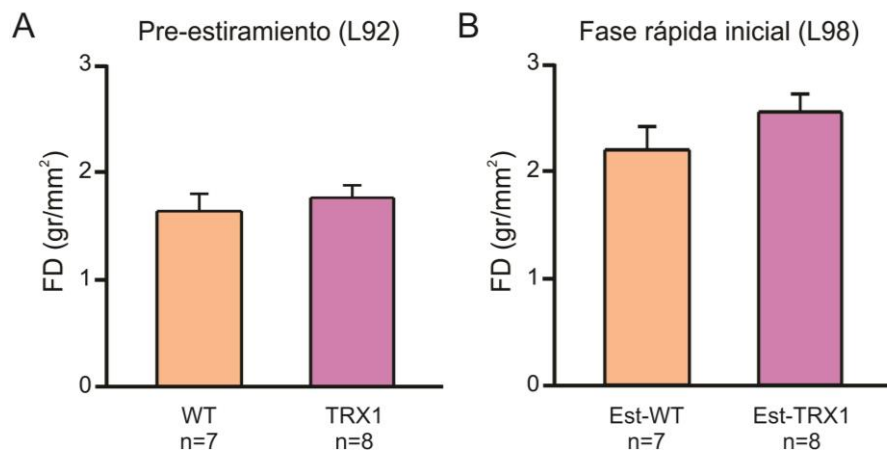
Para corroborar dicha hipótesis, los músculos papilares aislados se sometieron a un estiramiento similar al descrito en el punto 6 de *Materiales y Métodos* (**ver Figura 8 de resultados**).

En la **Figura 26** se muestran los registros representativos de la fuerza normalizada por el área de sección transversal, de un músculo papilar de un ratón WT (**A**) y de uno que sobreexpresa la TRX1 (**B**). En los ratones WT se puede apreciar la clásica respuesta de la fuerza en dos fases sucesivas en respuesta al estiramiento. Sin embargo, al realizar este procedimiento en los TRX1 la SFF se vio completamente cancelada (**Figura 26B y C**). Esta diferencia también puede observarse en los picos de fuerza representativos mostrados debajo de cada registro, donde el punto “c” muestra el valor de fuerza correspondiente a la SFF, alcanzado a los 10 minutos de estiramiento.



**Figura 26: Desarrollo de SFF en músculos papilares aislados de ratones.** La sobreexpresión de TRX1 cancela el desarrollo de la SFF. **A.** Registro representativo de un músculo papilar aislado de un ratón WT, donde puede verse un incremento abrupto luego del estiramiento correspondiente al mecanismo de Frank-Starling (indicado en el punto “b”), seguido de uno lento posterior, denominado SFF (Est-WT). En el panel inferior se pueden observar los trazos individuales correspondientes al desarrollo de fuerza en los distintos momentos indicados en el panel superior, donde “a” corresponde a la fuerza antes del estiramiento, “b” inmediata al estiramiento y “c” a los 10 minutos luego del estiramiento. **B.** Se muestra lo mismo que en **A**, pero de un músculo papilar aislado de un ratón que sobreexpresa TRX1 (Est-TRX1), donde se aprecia la ausencia de SFF. **C:** Resultados promedios de la SFF expresada como porcentaje de la fase rápida inicial. \* indica  $p < 0,05$  vs Est-WT.

Es importante destacar que la sobreexpresión de la TRX1 no alteró la fuerza contráctil basal en L92 (**Figura 27A**), ni la fase rápida inicial de aumento de fuerza post-estiramiento (L98, **Figura 27B**), expresión del mecanismo de Frank-Starling.



**Figura 27: Fuerza contráctil en músculos papilares aislados.** Valores promedio de fuerza desarrollada (FD) en L92 (**A**), y en L98 (fase rápida inicial, **B**). En ambos casos, no se encontraron diferencias significativas.

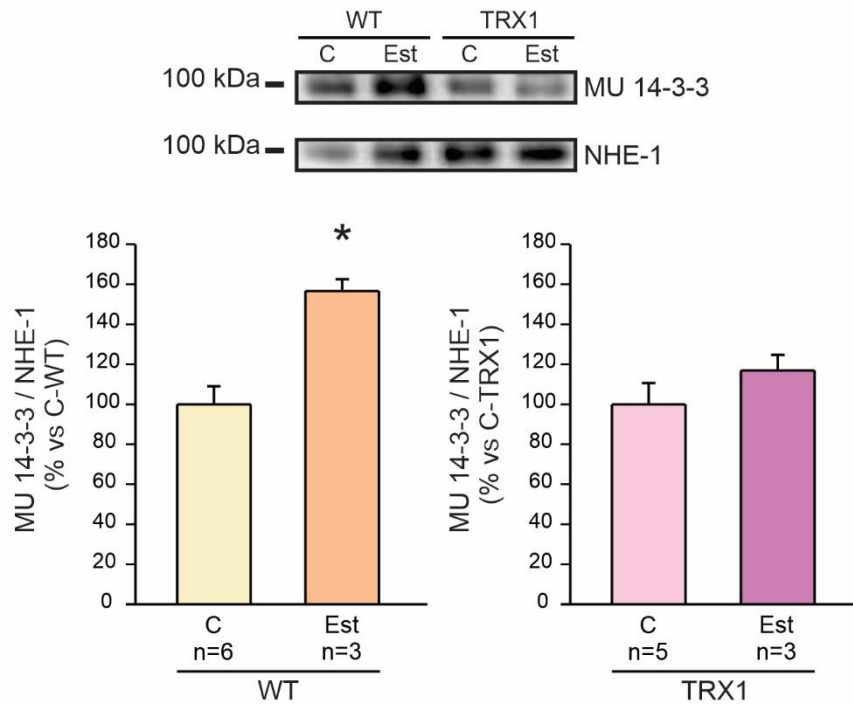


***Los resultados hasta acá obtenidos demuestran que un aumento de la capacidad antioxidante del músculo cardíaco mediante sobreexpresión de TRX1 es capaz de cancelar el desarrollo de la SFF.***

#### **Fosforilación del NHE-1 post-estiramiento del miocardio.**

Previamente se mencionó que la actividad del NHE-1 resulta crucial para el desarrollo de la SFF. Debido a que esta fase estaba ausente en los ratones que sobreexpresan TRX1, se propuso evaluar si la activación/ fosforilación del NHE-1 había sido afectada por la sobreexpresión de dicha proteína antioxidante. Es bien sabido que la actividad del NHE-1 se encuentra regulada por la sensibilidad del sitio alostérico a los H<sup>+</sup>, fosforilación y unión de diversas moléculas dentro de su cola citoplasmática. Reportes previos del grupo de trabajo (así como los expuestos en la sección anterior) demostraron que un incremento en el nivel de fosforilación del sitio Ser703 se correlaciona con una mayor actividad del NHE-1, y con un mayor desarrollo de SFF. Para determinar si la sobreexpresión de TRX1 afectó la actividad del NHE-1 luego del estiramiento, los músculos papilares se procesaron y se sometieron a una inmunoprecipitación para cuantificar los niveles de fosforilación del sitio Ser703 (relacionado indirectamente con los niveles del MU 14-3-3, como se describió en la sección anterior).

En la **Figura 28** se muestran las bandas representativas del western blot original (panel superior) y los datos promedios (panel inferior) de los papilares de los ratones WT (izquierda) y que sobreexpresan TRX1 (derecha). Como era de esperar, se observó un incremento significativo de la fosforilación de Ser703 en los ratones WT (Est-WT) comparados con su control no estirado (C-WT). En contraste, este aumento no se evidenció en los ratones que sobreexpresan TRX1 (Est-TRX1), concordando así con la pérdida de la SFF observada en la **Figura 26**.



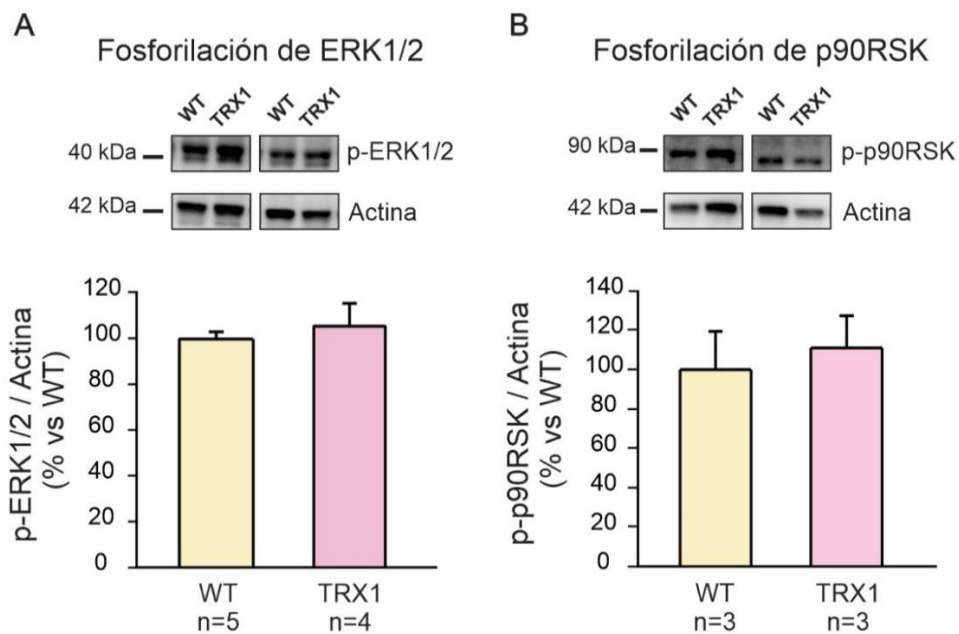
**Figura 28: Fosforilación del NHE-1 luego del estiramiento.** El estiramiento del miocardio promovió un incremento significativo de la fosforilación del NHE-1 (medida de acuerdo con los niveles del MU 14-3-3) únicamente en los ratones WT. **Panel superior:** bandas representativas del western blot. **Panel inferior:** resultados promedio de los ratones WT (izquierda) y de los que sobreexpresan TRX1 (derecha), expresados como porcentaje del control no estirado. “C-WT” y “C-TRX1”: no estirados; “Est-WT” y “Est-TRX1”: estirados. \* indica  $p < 0,05$  vs C-WT.

***Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de TRX1 limitaría la activación/fosforilación del NHE-1 en el sitio Ser703, blanco de la p90RSK.***

#### **Fosforilación de ERK1/2-p90RSK y expresión del NHE-1 en condiciones basales.**

Diversos estudios han demostrado que la activación de las quinasas ERK1/2 y p90RSK son las responsables de activar/fosforilar al NHE-1 en el sitio Ser703 luego del estiramiento. Dado que estas quinasas se activan por aumento en sus niveles de fosforilación, y que en la **Figura 28** se mostró que el NHE-1 no se activó luego del estiramiento del miocardio, se decidió estudiar si los niveles de fosforilación basal de estas quinasas estaban disminuidos como consecuencia de la sobreexpresión de TRX1. Para ello, pedacitos de ventrículo izquierdo de ratones WT y que sobreexpresan TRX1 se procesaron para luego realizar un western blot y así determinar el grado de fosforilación de dichas quinasas. En contraste con esta posibilidad, ni la activación basal de ERK1/2

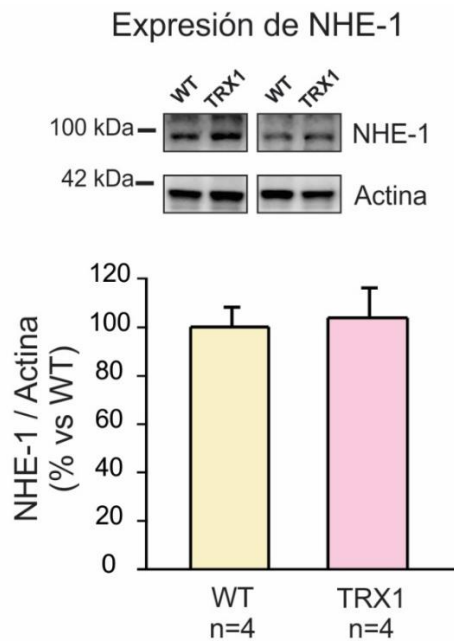
(Figura 29A) ni la de p90RSK (Figura 29B) fueron modificadas como consecuencia de la sobreexpresión de TRX1.



**Figura 29: Fosforilación de ERK1/2 y p90RSK.** La activación de las quinasas en condiciones basales no es afectada por la sobreexpresión de TRX1. **A y B.** Fosforilación basal de ERK1/2 (p-ERK1/2) y de p90-RSK (p-p90RSK), respectivamente, en los dos grupos de ratones. En ambos casos se utilizó a la Actina como normalizador. **Paneles superiores:** bandas originales del western blot. **Paneles inferiores:** resultados promedio expresados como porcentaje respecto del WT.

Asimismo, otra posibilidad para la ausencia de activación del NHE-1 luego del estiramiento, podría haber sido que la sobreexpresión de TRX1 hubiera disminuido su expresión basal. Por lo tanto, se procesaron tiras finas de ventrículo izquierdo y se las sometió a una corrida de western blot para determinar los niveles de expresión del intercambiador.

En la **Figura 30** se puede ver que la expresión basal del NHE-1 fue similar en ambos grupos de animales.



**Figura 30: Expresión basal del NHE-1.** La sobreexpresión de TRX1 no modificó la expresión basal del NHE-1. **Panel superior:** bandas representativas del western blot del NHE-1 y Actina, utilizada como proteína normalizadora, en ambos grupos de ratones. **Panel inferior:** resultados promedio expresados como porcentaje respecto del WT.

***Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de TRX1 no modifica los niveles basales de expresión del NHE-1 como tampoco el de las quinasas involucradas en su activación y en el desarrollo final de la SFF.***

Lamentablemente, una limitación de este trabajo es que aún no se ha podido llevar a cabo la determinación del grado de fosforilación de ERK1/2, p90RSK y p38-MAPK luego del estiramiento, así como el nivel basal de p-p38-MAPK en ratones de ambos grupos. El principal inconveniente surgió del hecho que para medir el grado de fosforilación del NHE-1 en el sitio Ser703, fue necesario juntar más de un papilar del mismo grupo experimental ya que la masa del músculo papilar de ratón no alcanza el peso mínimo requerido para la realización de dicha técnica, agotando las muestras sometidas a estiramiento. Por lo tanto, para llevar a cabo tales medidas se requiere repetir las determinaciones bioquímicas en músculos papilares sometidos al protocolo de estiramiento. La realización de estos experimentos se ha complicado como consecuencia de la pandemia derivada del virus SARS-COV2, situación que hasta el momento no se ha podido resolver.

# DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis profundizan el conocimiento de la modulación de la contractilidad cardíaca por estiramiento mecánico de la pared ventricular, demostrando que tanto la p38-MAPK como la defensa antioxidante otorgada por la TRX1 regulan el desarrollo de la SFF, mediante un mecanismo que modifica la actividad del NHE-1. En la primera sección de resultados se demostró que el estiramiento del miocardio induce la activación de p38-MAPK, que regula negativamente la fuerza contráctil a través de la activación de la fosfatasa DUSP6. Esta enzima limita la fosforilación de la quinasa ERK1/2, impactando en una menor activación de p90RSK y, consecuentemente, en una menor fosforilación/activación del NHE-1. Además, los hallazgos de esta Tesis demuestran la participación de la TRX1 sobre la SFF, ya que una sobreexpresión específica de esta enzima fue capaz de bloquear el desarrollo de la misma, al evitar la fosforilación/activación del NHE-1. Seguidamente se discutirán los resultados obtenidos en función de la bibliografía disponible sobre el tema.

### ***p38-MAPK y contractilidad***

A lo largo de los años, diversas investigaciones de nuestro laboratorio demostraron que el desarrollo de la SFF resulta ser la manifestación mecánica de un mecanismo autocrino/paracrino disparado por el estiramiento, que se inicia con la activación de los receptores AT1 de Ang II, y culmina con la activación del NHE-1, evento crucial para que se desencadene dicha fase. Los resultados aquí presentados, aportan nuevo conocimiento acerca de esta compleja ruta de señalización intracelular, demostrando la participación de p38-MAPK como moduladora negativa de la magnitud del incremento de fuerza contráctil durante la SFF.

En un trabajo de revisión reciente, *Dowrick y col.* muestran las distintas investigaciones relacionadas con la SFF, y mencionan que, dentro de las MAPK, hasta el momento solo se ha relacionado a la ruta ERK1/2-p90RSK como paso importante de la vía de traducción de señales de la SFF [58]. Los datos proporcionados en el presente trabajo demuestran que el estiramiento del miocardio también activa a p38-MAPK (**Figura 12**), incidiendo significativamente en la cascada de señalización que lleva a la SFF, ya que al ser inhibida genera un aumento significativo de la fuerza como se mostró en la **Figura 10**.

Diversos reportes proponen que p38-MAPK modula negativamente la contractilidad cardíaca debido a modificaciones en la respuesta de las proteínas contráctiles al  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular [86]. *Palomeque y col.* demostraron que el efecto inotrópico negativo generado por la Ang II en cardiomiocitos de ratas, es debido a la activación de la p38-MAPK quien reduce la sensibilidad de los miofilamentos al  $\text{Ca}^{2+}$  [159]. Resultados similares fueron obtenidos por *Kockskamper y col.* quienes, trabajando en trabéculas humanas de corazones con insuficiencia, describieron un aumento de la fuerza basal luego de la inhibición de p38-MAPK, así como un incremento de la SFF, lo que llevó a sugerir que la quinasa disminuye la sensibilidad de los miofilamentos al  $\text{Ca}^{2+}$  y como consecuencia, se observa un efecto inotrópico negativo en condiciones basales [160]. Los resultados aquí presentados difieren de estos últimos reportes ya que en los músculos papilares de rata sometidos al protocolo de estiramiento no se encontraron cambios en la contractilidad basal (**Figura 11A**) ni en la duración de la relajación (indicador indirecto de cambios en la respuesta de los miofilamentos al  $\text{Ca}^{2+}$ ) durante el desarrollo de la SFF (**Tabla 4**). En concordancia con nuestros hallazgos, existe evidencia que demuestra que la activación de la p38-MAPK inducida por Arsenito disminuye la contractilidad en cardiomiocitos de rata sin cambios en la respuesta al  $\text{Ca}^{2+}$  [161]. Por otro lado, en el presente trabajo se observó un aumento de la fosforilación/activación del NHE-1 luego de inhibir a p38-MAPK (**Figura 14**) lo que se puede relacionar con un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular dependiente del aumento de  $\text{Na}^+$ , debido a que se favorece el funcionamiento del modo reverso del NCX, resultando así en un incremento del efecto inotrópico positivo. Si bien no resulta sencillo conciliar los propios resultados con los de otros autores, cabe destacar que los estímulos utilizados en los diferentes trabajos para estudiar la participación de la p38-MAPK en la contractilidad cardíaca, fueron distintos. Como ya hemos comentado previamente, el estiramiento provoca la producción/liberación de Ang II, habiéndose comprobado que una dosis igual a 1nM del octapéptido produce un efecto inotrópico positivo similar al incremento de fuerza observado durante el desarrollo de la SFF [134]. En contraste, *Palomeque y col.* demostraron que una dosis más elevada de Ang II (1  $\mu\text{M}$ ) desencadena un efecto inotrópico negativo [159]. Previamente había sido demostrado que dosis de Ang II por encima de 100 nM activan vías de señalización intracelular muy diferentes a la activadas por dosis bajas [162, 163], lo cual supone escenarios experimentales completamente

diferentes. Otro elemento a destacar es que *Kockskamper y col.* utilizaron muestras de pacientes con insuficiencia cardíaca [160]. En tal sentido, se sabe que la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca conlleva un desbalance neuro-humoral que conduce a un aumento de Sistema Renina Angiotensina Aldosterona, aumento de catecolaminas circulante que llevan a un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ ; (dado por mayor pérdida de  $Ca^{2+}$  por el RS, menor expresión de SERCA2a y menor fosforilación de PLN), aumento de la actividad del NCX, mayor producción de ROS, y cambios en la expresión/función de las proteínas contráctiles, entre otros [164]. En resumen, la patología de estos corazones cursa con una alteración significativa de diversos factores que podrían (directa o indirectamente) impactar en la contractilidad cardíaca de base, oscureciendo cualquier tipo de discusión y/o comparación racional con nuestros resultados.

### ***p38-MAPK y NHE-1***

El NHE-1 puede ser activado por fosforilación en su cola citoplasmática (como ya se ha comentado previamente) siendo una de estas vías la de ERK1/2-p90RSK. Si bien existen investigaciones que han demostrado que bloquear mediadores que activan ERK1/2 cancelan la fosforilación del NHE-1, inhibir a p38-MAPK no tuvo tal efecto [165]. Por otro lado, *Khaled y col.* demostraron que el NHE-1 puede ser activado por fosforilación directa de p38-MAPK en los residuos Thr717, Ser722, Ser725, y Ser728 de la región C-terminal, induciendo alcalinización intracelular [166]. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo no parecieran ir de la mano con estos hallazgos. Por un lado, al estudiar los cambios de  $pH_i$  luego del estiramiento en Hepes, la inhibición de p38-MAPK generó un incremento de  $pH_i$  que, si bien sugiere una mayor activación del NHE-1, no alcanzó un nivel estadísticamente significativo (**Figura 15**). Por otro lado, en el presente trabajo se ha analizado el sitio Ser703, fosforilado por la p90RSK, ya que un mayor grado de fosforilación se correlaciona con una mayor actividad del NHE-1 [167, 168]. Es importante remarcar que el sitio Ser703 no puede ser fosforilado por p38-MAPK [34]. Los resultados obtenidos mostraron que el estiramiento provocó un aumento significativo de la fosforilación de este residuo cuando la p38-MAPK se encontraba inhibida (**Figura 14**), demostrando así que esta quinasa modula la fosforilación/activación del NHE-1. Aunque en este trabajo solo se estudió la fosforilación del sitio Ser703, no es posible descartar que exista una fosforilación directa



por p38-MAPK en algún otro sitio del NHE-1 como sugirieron *Khaled y col.* [166] de modo que la sumatoria de fosforilaciones resultantes sobre NHE-1 culmine por inhibirlo. Con respecto a los otros trabajos, las diferencias encontradas podrían deberse al uso de diferentes modelos experimentales o bien a la utilización de otros estímulos para la activación de p38-MAPK.

Al evaluar el  $pH_i$  luego del estiramiento en un buffer de Ringer, es decir en presencia de  $HCO_3^-$ , el estiramiento no produjo cambios en el  $pH_i$ , corroborando datos previos obtenidos por nuestro laboratorio en músculos papilares de gato [56, 144, 169]. Esto se debe a que el estiramiento activa simultáneamente tanto mecanismos alcalinizantes (NHE-1) como acidificantes (AE) [169]. Al inhibir a p38-MAPK, se observó un incremento en el  $pH_i$ , lo que permite sugerir una mayor activación del NHE-1. Esto podría deberse a que la inhibición de p38-MAPK, permitiría la estimulación de las vías de activación del NHE-1 como se vio en la **Figura 14**, donde se observó un incremento en la fosforilación del sitio Ser703. Sin embargo, es necesario destacar que *De Giusti y col.* demostraron que una dosis de 100 nM de Ang II (paso inicial en la cascada de eventos que llevan a la SFF) provoca la inhibición del eNBC en cardiomiocitos de gato a través de la activación de p38-MAPK, y que este mecanismo es independiente de ERK1/2 [145]. Estos datos podrían relacionarse con los obtenidos en esta Tesis, ya que es posible especular con la posibilidad de que al bloquear a p38-MAPK se evite la inhibición del eNBC, permitiendo una mayor alcalinización post-estiramiento, que podría sumarse al efecto estimulatorio sobre el NHE-1 aquí descrito, también mediado por la inhibición de la quinasa. Dado que no es posible encontrar una explicación contundente para nuestro hallazgo, se requiere una investigación más profunda para determinar de manera precisa el mecanismo que subyace a la mayor alcalinización post estiramiento.

Por otro lado, en músculo liso vascular, *Kusuhara y col.* mostraron que p38-MAPK regula negativamente la actividad del NHE-1, y sugieren dos posibilidades: 1) podría ser consecuencia de una fosforilación inhibitoria directa del NHE-1; 2) por disminución de la actividad de las quinasas del NHE-1: ERK1/2-p90RSK [53]. Dichos autores a su vez plantean un entrecruzamiento entre la vía de la ERK1/2 y la de p38-MAPK mediante el cual la estimulación de p38-MAPK por Ang II inhibiría la actividad de ERK1/2. Sin embargo, no explican cuál sería el mecanismo subyacente por el cual p38-MAPK modularía la actividad de esta quinasa [53]. Los resultados obtenidos en este trabajo

demuestran una relación entre ambas quinasas, ya que la inhibición de p38-MAPK permite una mayor activación de la ERK1/2 por el estiramiento, sugiriendo una modulación negativa por parte de p38-MAPK (**Figura 18**). Para que la ERK1/2 tenga menor actividad, debe estar menos fosforilada, y debido a que p38-MAPK no posee la habilidad de quitar grupos fosfato, se investigó la posibilidad de que p38-MAPK activara alguna fosfatasa.

### ***p38-MAPK y fosfatasas DUSPs***

Las células de los mamíferos presentan una gran diversidad de proteínas fosfatasas encargadas de regular la actividad de las MAPK, siendo las más relevantes las fosfatasas de especificidad dual o DUSPs [93, 96]. Estas proteínas están reguladas a través del nivel de expresión génica debido al estrés o la estimulación por mitógenos, proporcionando una retroalimentación negativa de las vías de las MAPK [100, 150]. Una vez expresadas, las DUSPs son constitutivamente activas y capaces de unirse directamente al bucle de activación de las MAPK, lo que da como resultado la desfosforilación.

Como se comentó en un apartado previo, existe una gran variedad de DUSPs, con localización, expresión tisular y sustratos específicos [93, 97]. Se ha demostrado que la fosfatasa citoplasmática DUSP6, puede unirse específicamente a las MAPK clásicas ERK1/2 *in vitro*, y que esta unión es importante para desfosforilar e inactivar específicamente a estas MAPK *in vivo* [93]. Por ejemplo, en ratones sin Dusp6 (Dusp6 -/-), Maillet y col. mostraron un aumento en la fosforilación basal tanto de ERK1 como de ERK2 en varios tejidos, pero ningún cambio en la activación de las quinasas ERK5, p38-MAPK o c-Jun [101]. Aún más importante, Purcell y col. generaron ratones transgénicos que sobreexpresaban DUSP6 a nivel cardíaco y mostraron una ausencia completa de fosforilación basal de ERK1/2 o luego de cualquier estímulo de estrés, mientras que el nivel de fosforilación de ERK5, p38-MAPK y JNK no se vio afectado [170]. En conjunto toda la evidencia experimental indica que DUSP6 solo afecta a las ERK1/2 dentro de la familia MAPK, aunque no se descarta la posibilidad de que pueda afectar a otras proteínas implicadas en el desarrollo de SFF. Se ha visto además que la DUSP6 también puede ser un sustrato de ERK. Por ejemplo, en líneas celulares de cáncer de ovario, así como en corazones del pez cebra, se observó que las ROS oxidan reversiblemente a la DUSP6, llevando a una mayor activación ERK1/2 [171, 172]. A su vez, en fibroblastos

provenientes de una línea celular de hámster, se determinó que es la ERK1/2 la responsable de inactivar a la DUSP6 al fosforilarla en dos los residuos Serina, promoviendo así su ubiquitinación y posterior degradación [97, 173], lo que redundaría en una mayor fosforilación (y por ende mayor actividad) de la quinasa [95, 97]. Los resultados mostrados en las **Figuras 18, 20 y 21** no apoyarían la participación de un mecanismo de estas características en nuestras condiciones experimentales, dado que el estiramiento en presencia del inhibidor de p38-MAPK, SB, incrementó los niveles de p-ERK1/2 sin cambios en la expresión de DUSP6. Por lo tanto, es posible sugerir que el estiramiento del miocardio aumenta la expresión de DUSP6 por activación de p38-MAPK (**Figura 12, 20 y 21**).

Otra forma de corroborar la participación de la DUSP6 en la SFF podría haber sido utilizando un inhibidor contra dicha fosfatasa y evaluar tanto el desarrollo de la SFF como el grado de fosforilación de ERK1/2 en respuesta al estiramiento. En la bibliografía se describen diversos fármacos capaces de inhibir a la DUSP6 de forma específica como el BCI [174], o inespecífica como su análogo el BCI-215 [175], o los basados en quinonas (NSC 672121, NSC 95397) que inhiben tanto a la DUSP6 como a la DUSP1 [176], los cuales pueden ejercer efectos que afecten pasos importantes de la vía de señalización desencadenada por el estiramiento del miocardio. Por ejemplo, si bien depende del tipo celular, se ha visto que algunos de estos inhibidores provocan aumento rápido y sostenido de la fosforilación basal de las quinasas ERK1/2, JNK y p38-MAPK en ausencia de estrés oxidativo [177], mientras que otros generan un incremento [176, 177] o disminución de ROS [178]. Dado que, como se ha mencionado previamente, la generación de ROS y la actividad de las quinasas (ERK1/2 y p38-MAPK) son pasos claves en el desarrollo de la SFF, y que los inhibidores de DUSP6 pueden modificar la producción de ROS (aumentar o disminuir) como también los niveles basales de las quinasas antes mencionadas, consideramos que su uso dificultaría la interpretación de los resultados obtenidos.

Estudios recientes han demostrado que la p38-MAPK puede activar también a la proteína fosfatasa 2A (PP2a), la cual puede desfosforilar el sitio Ser703 del NHE-1 provocando una disminución de su actividad [179]. A su vez se ha visto en cardiomiocitos ventriculares de rata que la PP2A es capaz de inhibir a MEK1/2, quinasa que activa a las ERK1/2 [54, 55]. Teniendo en cuenta estos dos antecedentes es de esperar que la

activación de p38-MAPK conduzca a la inhibición del NHE-1 (vía activación de PP2a). Si bien en este trabajo de Tesis se demostró que la activación de p38-MAPK por estiramiento disminuye la actividad del NHE-1 a través de la activación de la DUSP6, no podemos descartar que también exista activación de PP2a mediada por la activación de p38-MAPK (inducida por el estiramiento), y que esto contribuya con la menor actividad del NHE-1 observada. Quedan pendiente futuras investigaciones que permitan evaluar la participación de la fosfatasa PP2a en la modulación de la contractilidad cardíaca post-estiramiento.

### ***p38-MAPK y Fosfolamban***

Otro punto importante de mencionar, relacionado con los hallazgos de este trabajo y que se describen en la bibliografía, es la participación de ERK1/2 y de p38-MAPK en la regulación aguda de la contractilidad cardíaca en corazón perfundido intacto de rata adulta. *Szokodi y col.* demostraron que la inhibición de p38-MAPK, en corazones perfundidos de rata, aumenta los niveles de fosforilación en el residuo Ser16 (sitio PKA dependiente) de fosfolamban en respuesta a ET-1 (mediador de la SFF), sugiriendo así la participación del retículo sarcoplasmático en el incremento del inotropismo observado por estos autores [87]. Aunque no resulta claro el mecanismo mediante el cual se activa PKA, en cardiomiocitos de ratones se demostró que la activación de esta proteína participa en el efecto inotrópico positivo de la ET-1 [180]. Debido a que la ET-1 es un mediador de la SFF, en este trabajo de Tesis se estudió el grado de fosforilación de la PLN en el sitio Ser16 luego del estiramiento en ausencia y en presencia del inhibidor de p38-MAPK. El nivel de fosforilación se expresó como porcentaje del máximo grado de fosforilación inducido por una dosis de 100 nM Iso, ya que se ha visto que esta dosis es capaz de inducir el máximo porcentaje de fosforilación en Ser16 [149]. Los resultados aquí obtenidos demostraron que el estiramiento de los músculos papilares de rata, en presencia del inhibidor de p38-MAPK, SB, no modificó los niveles de fosforilación del sitio de Ser16 de la PLN (**Figura 19**), sugiriendo que en las condiciones experimentales aquí utilizadas el retículo sarcoplasmático no participa ni en el desarrollo de la SFF ni el efecto observado cuando la p38-MAPK se encuentra inhibida. Estos resultados se correlacionan con los hallados por otros autores quienes vieron en trabéculas [181] y cardiomiocitos de rata [182], así como en músculos papilares de conejo [183] y de hurón

[184], que la SFF es la consecuencia del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en respuesta al estiramiento, sin cambios en la dinámica basal del retículo sarcoplasmático [181].

### **p38-MAPK y ROS**

Investigaciones previas de nuestro laboratorio han demostrado el importante rol de las ROS en el desarrollo de la SFF [4, 6]. En este trabajo se presenta evidencia que p38-MAPK regula negativamente la SFF dado que su inhibición potencia la respuesta contráctil, mediante un mecanismo que involucra ROS. En este sentido, es posible detectar inconsistencias en la bibliografía disponible en cuanto a la ubicación de las ROS respecto de la p38MAPK. Se ha descrito que la activación de la quinasa precede al aumento de ROS, como así también, que es inducida por el incremento de ROS (ver esquema en **Figura 22**). Como se mencionó anteriormente, *De Giusti y col.* demostraron que la activación de p38-MAPK inducida por una dosis alta de Ang II (100 nM) ejercía un efecto inhibitorio sobre la actividad del eNBC, y que el mismo resultaba ser independiente del aumento en la producción intracelular de ROS [145]. A su vez, *Palomeque y col.* sugieren que la Ang II regula la contractilidad de los cardiomiocitos a través de un proceso dependiente de p38-MAPK, pero independiente de la activación de NAD(P)H oxidasa [159]. Por otro lado, varios estudios ubican el aumento de estas ROS entre la activación del receptor AT1 cardíaco y la estimulación de la p38-MAPK [185, 186]. Por ejemplo, en células de músculo liso vascular se describió que la activación de p38-MAPK inducida por Ang II (100 nM), era dependiente de la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y que la sobreexpresión de Catalasa cancelaba este incremento en la actividad de la quinasa [152, 187].

Los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan la idea de que las ROS se generan luego de la activación de la p38MAPK, (primera hipótesis mostrada en la **Figura 22**), ya que, en las condiciones experimentales utilizadas, la p38-MAPK mediaría la producción de ROS en respuesta a la Ang II. Esto se muestra en la **Figura 23**, donde se observa que el aumento de la producción de ROS inducido por Ang 1nM (dosis que genera un efecto inotrópico positivo de magnitud equivalente al incremento de fuerza de la SFF [134]) es cancelado al inhibir a la p38-MAPK. Considerando estas últimas observaciones en conjunto, se puede concluir que, debido a que la activación de la quinasa resulta clave

para el incremento de ROS inducido por Ang II, en nuestras condiciones la activación de la p38-MAPK parecería ser previa a la producción de ROS.

### **TRX1 y ROS**

Es sabido que el desbalance del estrés oxidativo puede causar efectos nocivos que dañen a los tejidos. Como se mencionó previamente, uno de los componentes antioxidantes más importantes del organismo es la TRX1, enzima citosólica cuya función principal es mantener el medio intracelular en un estado reducido, ejerciendo un papel protector clave. Debido a la importancia de las ROS en el desarrollo de la SFF, y que una inhibición de TRX1 provoca un incremento del estrés oxidativo [117], resultaba atractivo evaluar la posible participación de esta enzima en el desarrollo de la SFF. La imposibilidad de utilizar Auranofina como inhibidor de la TRXr (véase **Figuras 24-25** para mayores detalles), motivó a probar directamente la posible participación de la TRX1 en el desarrollo de la SFF utilizando un modelo de ratones transgénicos que sobreexpresaban la enzima a nivel cardíaco. Los resultados obtenidos permitieron determinar que el incremento de la defensa antioxidante dado por la sobreexpresión de TRX1 era capaz de cancelar el desarrollo de la SFF en respuesta al estiramiento (**Figura 26**). Como se expuso anteriormente, estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la activación de NHE-1 inducida por el estiramiento se reduce cuando se evita la generación de ROS, y en consecuencia se previene el aumento de Na<sup>+</sup> intracelular que subyace al desarrollo de SFF. Este efecto se atribuyó principalmente a una disminución en el estado de fosforilación de las quinasas redox sensibles, ERK1/2-p90RSK, responsables de la activación del NHE-1 [52], observando una menor fosforilación del sitio Ser703 [6]. La **Figura 28** muestra que la sobreexpresión cardíaca de TRX1 evita el incremento significativo de la fosforilación del sitio Ser703 del NHE-1 causada por el estiramiento, lo que resulta concordante con la ausencia de SFF (**Figura 26**). Si bien, en este trabajo no se midió la producción de ROS, reportes previos indican que ratones que sobreexpresan la TRX1 a nivel cardíaco, no muestran un aumento significativo del estrés oxidativo frente a estímulos estresores como la isquemia/reperfusión, demostrando la mayor capacidad antioxidante del modelo [188]. Por lo tanto, es posible especular que la sobreexpresión de TRX1, al reducir el estrés oxidativo, afecte la activación del NHE-1, y por ende la SFF.

Se ha descrito que los ratones que sobreexpresan TRX, al tener potenciada su capacidad antioxidante, tienen un menor estrés oxidativo basal [117] que podrían afectar mediadores de la SFF. Una posibilidad sería que se hubieran producido cambios en la actividad basal de las quinasas (corriente arriba del NHE-1) ERK1/2-p90RSK que redundara en una menor fosforilación del NHE-1 luego del estiramiento. Sin embargo, la fosforilación basal ambas quinasas no se vio alterada por la sobreexpresión de la enzima (**Figura 29**). Otra alternativa a contemplar sería una posible modificación en la expresión basal del NHE-1, pero tampoco fue este el caso (**Figura 30**). Previamente se ha mencionado que la cantidad de muestra aportada por cada músculo papilar de ratón era insuficiente para evaluar el grado de fosforilación de las quinasas activadas luego del estiramiento (ERK1/2, p90RSK y p38-MAPK). A pesar de esto, los resultados sugieren que la sobreexpresión de TRX1, al prevenir el incremento de las ROS post-estiramiento, evitaría la fosforilación/activación de ERK1/2-p90RSK, limitando la fosforilación/activación del NHE-1, con la consecuente cancelación de la SFF. Serán necesarios nuevos experimentos para confirmar la vía sugerida.

### ***Posibles implicancias clínicas***

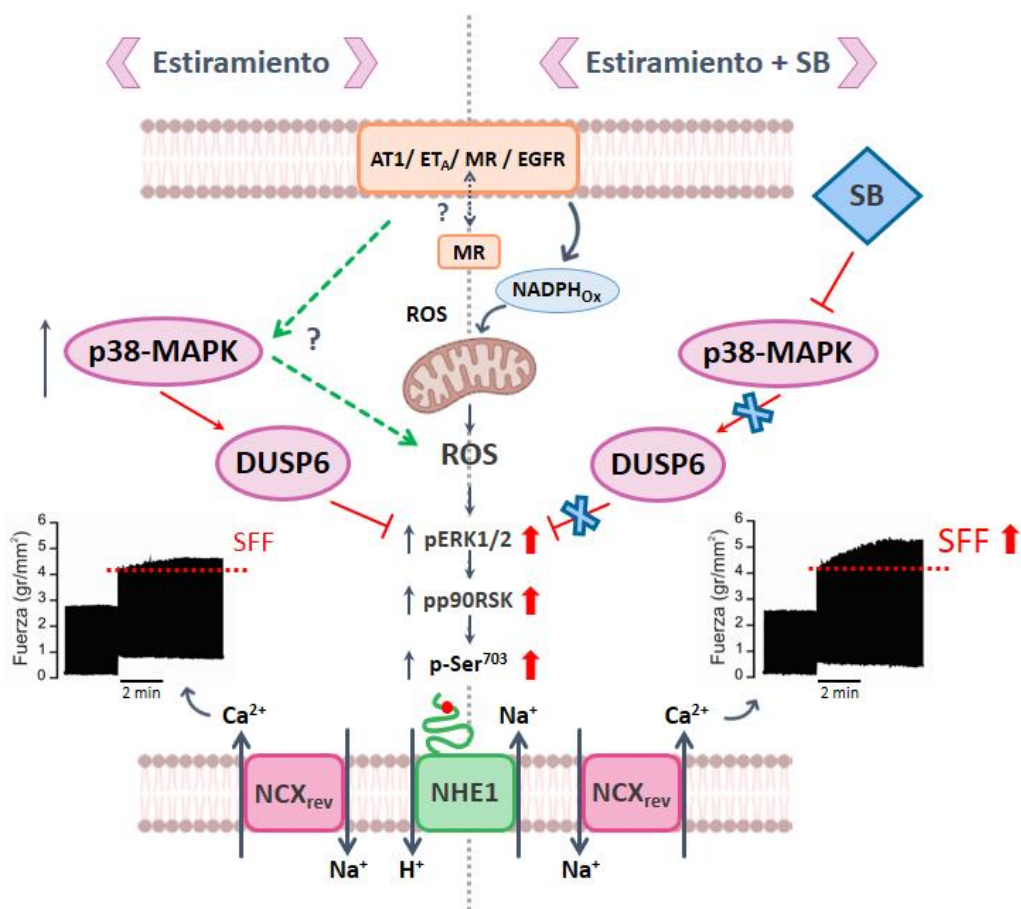
Como se mencionó en apartados previos, el estiramiento mecánico puede no solo desencadenar mecanismos cardíacos intrínsecos inmediatos para adaptar el gasto cardíaco frente a cambios en las condiciones hemodinámicas, sino que, conduciría a la disfunción o al desarrollo de hipertrofia cardíaca si los eventos iniciales se sostienen en el tiempo. Desde una perspectiva clínica, el hecho de que los trastornos cardíacos graves compartan una vía de señalización común con la SFF, aumenta el interés en descifrar los mecanismos subyacentes que conducen al desarrollo de esta fase (como el incremento del estrés oxidativo, la hiperactividad de NHE-1 y el incremento de la  $[Ca^{2+}]$ ) y sienta las bases para investigar posibles blancos terapéuticos contra dichas patologías cardíacas de alta prevalencia en sociedades occidentales.

# **CONCLUSIONES**



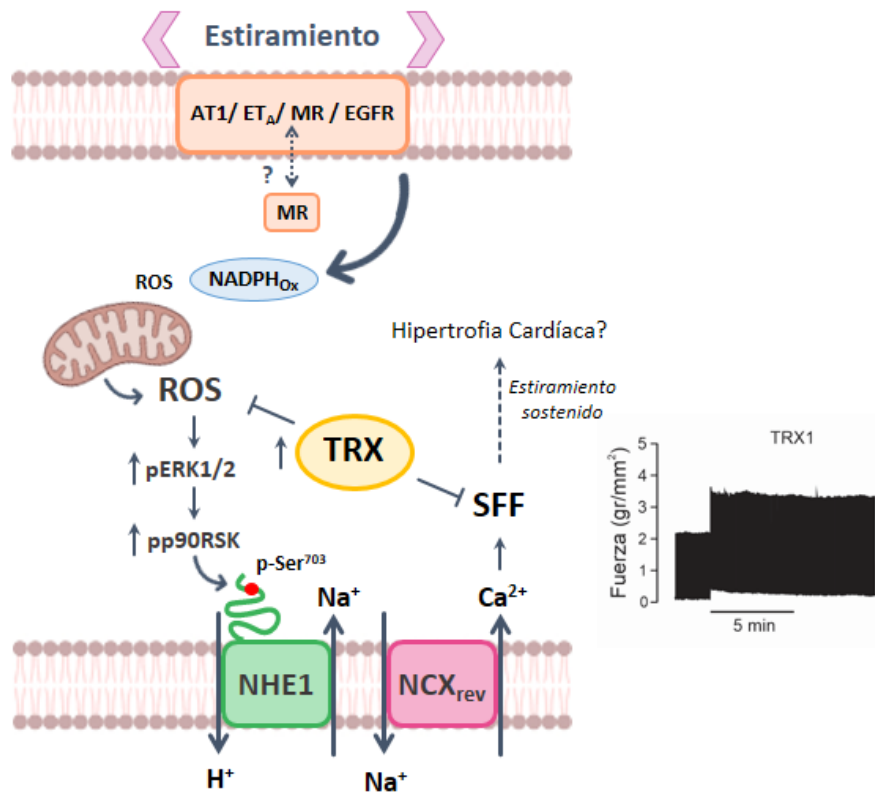
Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. La activación de p38-MAPK inducida por el estiramiento del miocardio regula negativamente el desarrollo de la SFF. El mecanismo subyacente propuesto es que el estiramiento del miocardio activa a p38-MAPK, responsable de activar a la fosfatasa dual DUSP6, la cual limita la fosforilación/activación de ERK1/2-p90RSK y del NHE-1. En la **Figura 31** se muestra una representación esquemática del mecanismo propuesto en ausencia y presencia de SB.



**Figura 31: Esquema del desarrollo de la SFF propuesto en base a los resultados obtenidos.** En condiciones controles (Izquierda) el estiramiento provoca la activación de p38-MAPK, quien provoca una mayor expresión/activación de la DUSP6, responsable de restringir la activación de las quinasas ERK1/2-p90RSK y por lo tanto del NHE-1, limitando así la SFF. En presencia del inhibidor de p38-MAPK, el SB (Derecha) se previene la activación de la DUSP6, por lo que el estiramiento induce una mayor fosforilación de ERK1/2, p90RSK y del NHE-1, y consecuentemente un incremento superior del desarrollo de la SFF. Las líneas verdes punteadas representan el incremento de ROS inducido por Ang II, mecanismo dependiente de la activación de p38-MAPK.

2. Los resultados obtenidos en ratones con sobreexpresión cardíaca de la TRX1 demuestran que un aumento de la defensa antioxidante es suficiente para impedir la fosforilación/activación de NHE-1 inducida por estiramiento y, en consecuencia, el desarrollo de la SFF. Estos hallazgos permiten sugerir la vía de señalización esquematizada en la **Figura 32**.



**Figura 32:** Esquema de la vía de señalización intracelular desencadenada por el estiramiento en el miocardio de ratones que sobreexpresan la TRX1. La fosforilación de ERK1/2-p90RSK dependiente de ROS promueve la activación/fosforilación de NHE-1 en Ser703, paso crucial para favorecer el funcionamiento del modo reverso del NCX (NCX<sub>rev</sub>), responsable del desarrollo de SFF. La sobreexpresión de TRX1 exagera la defensa antioxidante del miocardio, previniendo la acumulación de ROS inducida por el estiramiento, la activación del NHE-1 y en consecuencia el desarrollo de la SFF.

# REFERENCIAS

1. von Anrep, G., *On the part played by the suprarenals in the normal vascular reactions of the body*. J Physiol, 1912. **45**(5): p. 307-17.
2. Sarnoff, S.J., et al., *Homeometric autoregulation in the heart*. Circ Res, 1960. **8**: p. 1077-91.
3. Allen, D.G. and S. Kurihara, *The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle*. J Physiol, 1982. **327**: p. 79-94.
4. Cingolani, H.E., et al., *The Anrep effect: 100 years later*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **304**(2): p. H175-82.
5. Zorov, D.B., et al., *Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1001-14.
6. Villa-Abrille, M.C., et al., *The Anrep effect requires transactivation of the epidermal growth factor receptor*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 9): p. 1579-90.
7. Cingolani, H.E., et al., *Early signals after stretch leading to cardiac hypertrophy. Key role of NHE-1*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 7096-114.
8. Irene L. Ennis, et al., *From Anrep's Phenomenon to Myocardial Hypertrophy: Role of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger*. CURRENT CARDIOLOGY REVIEWS, 2007. **vol. 3** p. 149-149.
9. Cingolani, H.E. and I.L. Ennis, *Sodium-hydrogen exchanger, cardiac overload, and myocardial hypertrophy*. Circulation, 2007. **115**(9): p. 1090-100.
10. Perez, N.G., et al., *Silencing of NHE-1 blunts the slow force response to myocardial stretch*. J Appl Physiol (1985), 2011. **111**(3): p. 874-80.
11. Nakamura, T.Y., et al., *Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 is sufficient to generate Ca<sup>2+</sup> signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure*. Circ Res, 2008. **103**(8): p. 891-9.
12. Wakabayashi, S., T. Hisamitsu, and T.Y. Nakamura, *Regulation of the cardiac Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in health and disease*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **61**: p. 68-76.
13. Boyman, L., et al., *Proton-sensing Ca<sup>2+</sup> binding domains regulate the cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger*. J Biol Chem, 2011. **286**(33): p. 28811-28820.
14. Mandel, F., et al., *The effect of pH on the transient-state kinetics of Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. A comparison with skeletal sarcoplasmic reticulum*. Circ Res, 1982. **50**(2): p. 310-7.
15. Saegusa, N., et al., *Influence of pH on Ca<sup>2+</sup> current and its control of electrical and Ca<sup>2+</sup> signaling in ventricular myocytes*. J Gen Physiol, 2011. **138**(5): p. 537-59.
16. Sun, B., C.H. Leem, and R.D. Vaughan-Jones, *Novel chloride-dependent acid loader in the guinea-pig ventricular myocyte: part of a dual acid-loading mechanism*. J Physiol, 1996. **495 ( Pt 1)**: p. 65-82.
17. Paris, S. and J. Pouyssegur, *Biochemical characterization of the amiloride-sensitive Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in Chinese hamster lung fibroblasts*. J Biol Chem, 1983. **258**(6): p. 3503-8.
18. Lagadic-Gossmann, D., R.D. Vaughan-Jones, and K.J. Buckler, *Adrenaline and extracellular ATP switch between two modes of acid extrusion in the guinea-pig ventricular myocyte*. J Physiol, 1992. **458**: p. 385-407.
19. Leem, C.H., D. Lagadic-Gossmann, and R.D. Vaughan-Jones, *Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte*. J Physiol, 1999. **517 ( Pt 1)**: p. 159-80.
20. Orłowski, J. and S. Grinstein, *Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 549-65.
21. Blatter, L.A. and J.A. McGuigan, *Intracellular pH regulation in ferret ventricular muscle. The role of Na-H exchange and the influence of metabolic substrates*. Circ Res, 1991. **68**(1): p. 150-61.
22. Karmazyn, M., *NHE-1: still a viable therapeutic target*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **61**: p. 77-82.

23. Nakamura, N., et al., *Four Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation*. J Biol Chem, 2005. **280**(2): p. 1561-72.
24. Lee, S.H., et al., *NHE10, an osteoclast-specific member of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger family, regulates osteoclast differentiation and survival [corrected]*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **369**(2): p. 320-6.
25. He, P., J. Klein, and C.C. Yun, *Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 by angiotensin II is mediated by inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) receptor-binding protein released with IP3 (IRBIT) and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II*. J Biol Chem, 2010. **285**(36): p. 27869-78.
26. Alvarez, B.V. and M.C. Villa-Abrille, *Mitochondrial NHE1: a newly identified target to prevent heart disease*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 152.
27. Karmazyn, M., et al., *The myocardial Na<sup>(+)</sup>-H<sup>(+)</sup> exchange: structure, regulation, and its role in heart disease*. Circ Res, 1999. **85**(9): p. 777-86.
28. Garcarena, C.D., et al., *Sarcolemmal localisation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-co-transport influences the spatial regulation of intracellular pH in rat ventricular myocytes*. J Physiol, 2013. **591**(9): p. 2287-306.
29. Donowitz, M., C. Ming Tse, and D. Fuster, *SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchangers*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(2-3): p. 236-51.
30. Petrecca, K., et al., *Subcellular localization of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1 in rat myocardium*. Am J Physiol, 1999. **276**(2): p. H709-17.
31. Fliegel, L., *Molecular biology of the myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **44**(2): p. 228-37.
32. Wakabayashi, S., et al., *Mutations of Arg440 and Gly455/Gly456 oppositely change pH sensing of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1*. J Biol Chem, 2003. **278**(14): p. 11828-35.
33. Karmazyn, M., M. Sawyer, and L. Fliegel, *The Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger: a target for cardiac therapeutic intervention*. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2005. **5**(4): p. 323-35.
34. Takahashi, E., et al., *p90(RSK) is a serum-stimulated Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform-1 kinase. Regulatory phosphorylation of serine 703 of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform-1*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20206-14.
35. Snabaitis, A.K., F. Cuello, and M. Avkiran, *Protein kinase B/Akt phosphorylates and inhibits the cardiac Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1*. Circ Res, 2008. **103**(8): p. 881-90.
36. Anjum, R. and J. Blenis, *The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(10): p. 747-58.
37. Ludwik, K.A. and D.A. Lannigan, *Ribosomal S6 kinase (RSK) modulators: a patent review*. Expert Opin Ther Pat, 2016. **26**(9): p. 1061-78.
38. Lin, L., S.A. White, and K. Hu, *Role of p90RSK in Kidney and Other Diseases*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(4).
39. Takahashi, E., J. Abe, and B.C. Berk, *Angiotensin II stimulates p90rsk in vascular smooth muscle cells. A potential Na<sup>(+)</sup>-H<sup>+</sup> exchanger kinase*. Circ Res, 1997. **81**(2): p. 268-73.
40. Snabaitis, A.K., et al., *A novel role for protein phosphatase 2A in receptor-mediated regulation of the cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1*. J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 20252-62.
41. Malo, M.E., L. Li, and L. Fliegel, *Mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger is mediated through phosphorylation of amino acids Ser770 and Ser771*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6292-9.
42. Maekawa, N., et al., *Inhibiting p90 ribosomal S6 kinase prevents (Na<sup>+</sup>)-H<sup>+</sup> exchanger-mediated cardiac ischemia-reperfusion injury*. Circulation, 2006. **113**(21): p. 2516-23.

43. Lehoux, S., et al., *14-3-3 Binding to Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform-1 is associated with serum-dependent activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 15794-800.
44. Cavet, M.E., S. Lehoux, and B.C. Berk, *14-3-3beta is a p90 ribosomal S6 kinase (RSK) isoform 1-binding protein that negatively regulates RSK kinase activity*. J Biol Chem, 2003. **278**(20): p. 18376-83.
45. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
46. Heineke, J. and J.D. Molkentin, *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(8): p. 589-600.
47. Flaherty, P.T., et al., *Identification of benzimidazole-based inhibitors of the mitogen activated kinase-5 signaling pathway*. Bioorg Med Chem Lett, 2010. **20**(9): p. 2892-6.
48. Cuadrado, A. and A.R. Nebreda, *Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling*. Biochem J, 2010. **429**(3): p. 403-17.
49. Pua, L.J.W., et al., *Functional Roles of JNK and p38 MAPK Signaling in Nasopharyngeal Carcinoma*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(3).
50. Tanoue, T. and E. Nishida, *Molecular recognitions in the MAP kinase cascades*. Cell Signal, 2003. **15**(5): p. 455-62.
51. Roskoski, R., Jr., *ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation*. Pharmacol Res, 2012. **66**(2): p. 105-43.
52. Caldiz, C.I., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species activate the slow force response to stretch in feline myocardium*. J Physiol, 2007. **584**(Pt 3): p. 895-905.
53. Kusahara, M., et al., *p38 Kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: effects on Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and ERK1/2*. Circ Res, 1998. **83**(8): p. 824-31.
54. Liu, Q. and P.A. Hofmann, *Protein phosphatase 2A-mediated cross-talk between p38 MAPK and ERK in apoptosis of cardiac myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(6): p. H2204-12.
55. Junttila, M.R., S.P. Li, and J. Westermarck, *Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival*. FASEB J, 2008. **22**(4): p. 954-65.
56. Perez, N.G., M.C. de Hurtado, and H.E. Cingolani, *Reverse mode of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange after myocardial stretch: underlying mechanism of the slow force response*. Circ Res, 2001. **88**(4): p. 376-82.
57. von Lewinski, D., et al., *Stretch-dependent slow force response in isolated rabbit myocardium is Na<sup>+</sup> dependent*. Cardiovasc Res, 2003. **57**(4): p. 1052-61.
58. Dowrick, J.M., et al., *The slow force response to stretch: Controversy and contradictions*. Acta Physiol (Oxf), 2019. **226**(1): p. e13250.
59. Rupprecht, H.J., et al., *Cardioprotective effects of the Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA*. Circulation, 2000. **101**(25): p. 2902-8.
60. Linz, W.J. and A.E. Busch, *NHE-1 inhibition: from protection during acute ischaemia/reperfusion to prevention/reversal of myocardial remodelling*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2003. **368**(4): p. 239-46.
61. Morris, K., *Targeting the myocardial sodium-hydrogen exchange for treatment of heart failure*. Expert Opin Ther Targets, 2002. **6**(3): p. 291-8.
62. Trum, M., et al., *Empagliflozin inhibits Na<sup>(+)</sup> /H<sup>(+)</sup> exchanger activity in human atrial cardiomyocytes*. ESC Heart Fail, 2020.
63. Perez, N.G., et al., *pHi regulation in myocardium of the spontaneously hypertensive rat. Compensated enhanced activity of the Na<sup>(+)</sup>-H<sup>+</sup> exchanger*. Circ Res, 1995. **77**(6): p. 1192-200.

64. Camilion de Hurtado, M.C., et al., *Regression of cardiomyocyte hypertrophy in SHR following chronic inhibition of the Na(+)/H(+) exchanger*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(4): p. 862-8.
65. Cingolani, H.E., et al., *Regression of hypertensive myocardial fibrosis by Na(+)/H(+) exchange inhibition*. Hypertension, 2003. **41**(2): p. 373-7.
66. Garcarena, C.D., et al., *Chronic NHE-1 blockade induces an antiapoptotic effect in the hypertrophied heart*. J Appl Physiol (1985), 2009. **106**(4): p. 1325-31.
67. Nolly, M.B., et al., *Cardiac hypertrophy reduction in SHR by specific silencing of myocardial Na(+)/H(+) exchanger*. J Appl Physiol (1985), 2015. **118**(9): p. 1154-60.
68. Schussheim, A.E. and G.K. Radda, *Altered Na(+)- H(+)- exchange activity in the spontaneously hypertensive perfused rat heart*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(8): p. 1475-81.
69. Yeves, A.M., et al., *Cardioprotective role of IGF-1 in the hypertrophied myocardium of the spontaneously hypertensive rats: A key effect on NHE-1 activity*. Acta Physiol (Oxf), 2018. **224**(2): p. e13092.
70. Kelly, M.P., et al., *Activity and expression of Na(+)-H+ exchanger isoforms 1 and 3 in kidney proximal tubules of hypertensive rats*. Circ Res, 1997. **80**(6): p. 853-60.
71. Livne, A., et al., *Increased platelet Na+-H+ exchange rates in essential hypertension: application of a novel test*. Lancet, 1987. **1**(8532): p. 533-6.
72. Garciandia, A., et al., *Enhanced Na(+)-H+ exchanger activity and NHE-1 mRNA expression in lymphocytes from patients with essential hypertension*. Hypertension, 1995. **25**(3): p. 356-64.
73. Rose, B.A., T. Force, and Y. Wang, *Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale*. Physiol Rev, 2010. **90**(4): p. 1507-46.
74. Sanz-Ezquerro, J.J. and A. Cuenda, *p38 Signalling Pathway*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(3).
75. Marber, M.S., B. Rose, and Y. Wang, *The p38 mitogen-activated protein kinase pathway - a potential target for intervention in infarction, hypertrophy, and heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **51**(4): p. 485-90.
76. Romero-Becerra, R., et al., *p38 MAPK Pathway in the Heart: New Insights in Health and Disease*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(19).
77. Cuenda, A. and S. Rousseau, *p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1358-75.
78. Evers, P.A., et al., *Use of a drug-resistant mutant of stress-activated protein kinase 2a/p38 to validate the in vivo specificity of SB 203580*. FEBS Lett, 1999. **451**(2): p. 191-6.
79. Raingeaud, J., et al., *MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 1247-55.
80. Kang, Y.J., et al., *Multiple activation mechanisms of p38alpha mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26225-34.
81. Salvador, J.M., et al., *Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 390-5.
82. Kerkela, R., et al., *Key roles of endothelin-1 and p38 MAPK in the regulation of atrial stretch response*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011. **300**(1): p. R140-9.
83. Yokota, T. and Y. Wang, *p38 MAP kinases in the heart*. Gene, 2016. **575**(2 Pt 2): p. 369-376.
84. Takeishi, Y., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinases and p90 ribosomal S6 kinase in failing human hearts with dilated cardiomyopathy*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(1): p. 131-7.
85. Braz, J.C., et al., *Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling*. J Clin Invest, 2003. **111**(10): p. 1475-86.

86. Liao, P., et al., *p38 Mitogen-activated protein kinase mediates a negative inotropic effect in cardiac myocytes*. *Circ Res*, 2002. **90**(2): p. 190-6.
87. Szokodi, I., et al., *Functionally opposing roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of cardiac contractility*. *Circulation*, 2008. **118**(16): p. 1651-8.
88. Kranias, E.G. and R.J. Hajjar, *Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome*. *Circ Res*, 2012. **110**(12): p. 1646-60.
89. Chu, G., et al., *A single site (Ser16) phosphorylation in phospholamban is sufficient in mediating its maximal cardiac responses to beta -agonists*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(49): p. 38938-43.
90. Auger-Messier, M., et al., *Unrestrained p38 MAPK activation in Dusp1/4 double-null mice induces cardiomyopathy*. *Circ Res*, 2013. **112**(1): p. 48-56.
91. Kaikkonen, L., et al., *p38alpha regulates SERCA2a function*. *J Mol Cell Cardiol*, 2014. **67**: p. 86-93.
92. Zhu, S., et al., *Luteolin Enhances Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase Activity through p38 MAPK Signaling thus Improving Rat Cardiac Function after Ischemia/Reperfusion*. *Cell Physiol Biochem*, 2017. **41**(3): p. 999-1010.
93. Caunt, C.J. and S.M. Keyse, *Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling*. *FEBS J*, 2013. **280**(2): p. 489-504.
94. Liu, R. and J.D. Molkentin, *Regulation of cardiac hypertrophy and remodeling through the dual-specificity MAPK phosphatases (DUSPs)*. *J Mol Cell Cardiol*, 2016. **101**: p. 44-49.
95. Bermudez, O., G. Pages, and C. Gimond, *The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010. **299**(2): p. C189-202.
96. Keyse, S.M., *Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling*. *Curr Opin Cell Biol*, 2000. **12**(2): p. 186-92.
97. Chen, H.F., H.C. Chuang, and T.H. Tan, *Regulation of Dual-Specificity Phosphatase (DUSP) Ubiquitination and Protein Stability*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(11).
98. Dougherty, J.A., et al., *Dual-Specificity Phosphatase 4 Overexpression in Cells Prevents Hypoxia/Reoxygenation-Induced Apoptosis via the Upregulation of eNOS*. *Front Cardiovasc Med*, 2017. **4**: p. 22.
99. Tormos, A.M., et al., *p38 MAPK: a dual role in hepatocyte proliferation through reactive oxygen species*. *Free Radic Res*, 2013. **47**(11): p. 905-16.
100. Theodosiou, A. and A. Ashworth, *MAP kinase phosphatases*. *Genome Biol*, 2002. **3**(7): p. REVIEWS3009.
101. Maillet, M., et al., *DUSP6 (MKP3) null mice show enhanced ERK1/2 phosphorylation at baseline and increased myocyte proliferation in the heart affecting disease susceptibility*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(45): p. 31246-55.
102. Gladyshev, V.N., *The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory!* *Antioxid Redox Signal*, 2014. **20**(4): p. 727-31.
103. Tsutsui, H., S. Kinugawa, and S. Matsushima, *Oxidative stress and heart failure*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **301**(6): p. H2181-90.
104. Liochev, S.I., *Reactive oxygen species and the free radical theory of aging*. *Free Radic Biol Med*, 2013. **60**: p. 1-4.
105. Sawyer, D.B., et al., *Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure*. *J Mol Cell Cardiol*, 2002. **34**(4): p. 379-88.
106. Senoner, T. and W. Dichtl, *Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target?* *Nutrients*, 2019. **11**(9).
107. Prosser, B.L., C.W. Ward, and W.J. Lederer, *X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart*. *Science*, 2011. **333**(6048): p. 1440-5.
108. Iribe, G., et al., *Mechano-sensitivity of mitochondrial function in mouse cardiac myocytes*. *Prog Biophys Mol Biol*, 2017. **130**(Pt B): p. 315-322.



109. Peoples, J.N., et al., *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease*. Exp Mol Med, 2019. **51**(12): p. 1-13.
110. Nakamura, H., K. Nakamura, and J. Yodoi, *Redox regulation of cellular activation*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 351-69.
111. Zschauer, T.C., et al., *Interacting with thioredoxin-1--disease or no disease?* Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(9): p. 1053-62.
112. Yoshioka, J., *Thioredoxin superfamily and its effects on cardiac physiology and pathology*. Compr Physiol, 2015. **5**(2): p. 513-30.
113. Holmgren, A., *Thioredoxin. 6. The amino acid sequence of the protein from escherichia coli B*. Eur J Biochem, 1968. **6**(4): p. 475-84.
114. World, C.J., H. Yamawaki, and B.C. Berk, *Thioredoxin in the cardiovascular system*. J Mol Med (Berl), 2006. **84**(12): p. 997-1003.
115. Rhee, S.G., H.Z. Chae, and K. Kim, *Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(12): p. 1543-52.
116. Ago, T. and J. Sadoshima, *Thioredoxin and ventricular remodeling*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **41**(5): p. 762-73.
117. Yamamoto, M., et al., *Inhibition of endogenous thioredoxin in the heart increases oxidative stress and cardiac hypertrophy*. J Clin Invest, 2003. **112**(9): p. 1395-406.
118. Turoczi, T., et al., *Thioredoxin redox signaling in the ischemic heart: an insight with transgenic mice overexpressing Trx1*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(6): p. 695-704.
119. Hattori, I., et al., *Intravenous administration of thioredoxin decreases brain damage following transient focal cerebral ischemia in mice*. Antioxid Redox Signal, 2004. **6**(1): p. 81-7.
120. Kasuno, K., et al., *Protective roles of thioredoxin, a redox-regulating protein, in renal ischemia/reperfusion injury*. Kidney Int, 2003. **64**(4): p. 1273-82.
121. Shioji, K., et al., *Upregulation of thioredoxin (TRX) expression in giant cell myocarditis in rats*. FEBS Lett, 2000. **472**(1): p. 109-13.
122. Miyamoto, M., et al., *Thioredoxin, a redox-regulating protein, is expressed in spontaneous myocarditis in inbred strains of mice*. Int J Cardiol, 2004. **95**(2-3): p. 315-9.
123. Kishimoto, C., et al., *Serum thioredoxin (TRX) levels in patients with heart failure*. Jpn Circ J, 2001. **65**(6): p. 491-4.
124. Tanito, M., et al., *Enhanced oxidative stress and impaired thioredoxin expression in spontaneously hypertensive rats*. Antioxid Redox Signal, 2004. **6**(1): p. 89-97.
125. National Research Council (U.S.). Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals., Institute for Laboratory Animal Research (U.S.), and National Academies Press (U.S.), *Guide for the care and use of laboratory animals*. 2011, National Academies Press,: Washington, D.C. p. xxv, 220 p.
126. Porzio, M.A. and A.M. Pearson, *Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. Biochim Biophys Acta, 1977. **490**(1): p. 27-34.
127. Frantz, B., et al., *The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding*. Biochemistry, 1998. **37**(39): p. 13846-53.
128. Jiang, Y., et al., *Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta)*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17920-6.
129. Manthey, C.L., et al., *SB202190, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, is a powerful regulator of LPS-induced mRNAs in monocytes*. J Leukoc Biol, 1998. **64**(3): p. 409-17.
130. Davies, S.P., et al., *Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors*. Biochem J, 2000. **351**(Pt 1): p. 95-105.

131. Omar, M.A., S. Verma, and A.S. Clanachan, *Adenosine-mediated inhibition of 5'-AMP-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase during reperfusion enhances recovery of left ventricular mechanical function*. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. **52**(6): p. 1308-18.
132. Diaz, R.G., et al., *Phosphodiesterase 5A inhibition decreases NHE-1 activity without altering steady state pH(i): role of phosphatases*. *Cell Physiol Biochem*, 2010. **26**(4-5): p. 531-40.
133. Camilion de Hurtado, M.C., et al., *Upregulation of myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger induced by chronic treatment with a selective inhibitor*. *J Mol Cell Cardiol*, 2002. **34**(11): p. 1539-47.
134. Perez, N.G., et al., *A low dose of angiotensin II increases inotropism through activation of reverse Na<sup>(+)</sup>/Ca<sup>(2+)</sup> exchange by endothelin release*. *Cardiovasc Res*, 2003. **60**(3): p. 589-97.
135. Dikalov, S., K.K. Griendling, and D.G. Harrison, *Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies*. *Hypertension*, 2007. **49**(4): p. 717-27.
136. Caldiz, C.I., et al., *Mineralocorticoid receptor activation is crucial in the signalling pathway leading to the Anrep effect*. *J Physiol*, 2011. **589**(Pt 24): p. 6051-61.
137. Brea, M.S., et al., *Silencing of epidermal growth factor receptor reduces Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger 1 activity and hypertensive cardiac hypertrophy*. *Biochem Pharmacol*, 2019. **170**: p. 113667.
138. Cingolani, O.H., et al., *In vivo key role of reactive oxygen species and NHE-1 activation in determining excessive cardiac hypertrophy*. *Pflugers Arch*, 2011. **462**(5): p. 733-43.
139. Sahn, D.J., et al., *Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements*. *Circulation*, 1978. **58**(6): p. 1072-83.
140. Sugden, P.H. and A. Clerk, *"Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium*. *Circ Res*, 1998. **83**(4): p. 345-52.
141. Dana, A., et al., *Adenosine A<sub>1</sub> receptor induced delayed preconditioning in rabbits: induction of p38 mitogen-activated protein kinase activation and Hsp27 phosphorylation via a tyrosine kinase- and protein kinase C-dependent mechanism*. *Circ Res*, 2000. **86**(9): p. 989-97.
142. Alvarez, B.V., et al., *Mechanisms underlying the increase in force and Ca<sup>(2+)</sup> transient that follow stretch of cardiac muscle: a possible explanation of the Anrep effect*. *Circ Res*, 1999. **85**(8): p. 716-22.
143. Cingolani, H.E., et al., *Intracellular signaling following myocardial stretch: an autocrine/paracrine loop*. *Regul Pept*, 2005. **128**(3): p. 211-20.
144. Cingolani, H.E., et al., *Stretch-induced alkalinization of feline papillary muscle: an autocrine-paracrine system*. *Circ Res*, 1998. **83**(8): p. 775-80.
145. De Giusti, V.C., A. Orłowski, and E.A. Aiello, *Angiotensin II inhibits the electrogenic Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport of cat cardiac myocytes*. *J Mol Cell Cardiol*, 2010. **49**(5): p. 812-8.
146. Haworth, R.S., et al., *Stimulation of the plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1 by sustained intracellular acidosis. Evidence for a novel mechanism mediated by the ERK pathway*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(34): p. 31676-84.
147. Moor, A.N. and L. Fliegel, *Protein kinase-mediated regulation of the Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger in the rat myocardium by mitogen-activated protein kinase-dependent pathways*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(33): p. 22985-92.
148. Haworth, R.S., S. Dashnyam, and M. Avkiran, *Ras triggers acidosis-induced activation of the extracellular-signal-regulated kinase pathway in cardiac myocytes*. *Biochem J*, 2006. **399**(3): p. 493-501.

149. Said, M., et al., *The relative relevance of phosphorylation of the Thr(17) residue of phospholamban is different at different levels of beta-adrenergic stimulation*. Pflugers Arch, 2002. **444**(6): p. 801-9.
150. Owens, D.M. and S.M. Keyse, *Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3203-13.
151. Camps, M., A. Nichols, and S. Arkininstall, *Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function*. FASEB J, 2000. **14**(1): p. 6-16.
152. Mehta, P.K. and K.K. Griendling, *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C82-97.
153. Iwasa, H., J. Han, and F. Ishikawa, *Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway*. Genes Cells, 2003. **8**(2): p. 131-44.
154. Matsuyama, D. and K. Kawahara, *Oxidative stress-induced formation of a positive-feedback loop for the sustained activation of p38 MAPK leading to the loss of cell division in cardiomyocytes soon after birth*. Basic Res Cardiol, 2011. **106**(5): p. 815-28.
155. Saitoh, M., et al., *Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1*. EMBO J, 1998. **17**(9): p. 2596-606.
156. Hwang-Bo, H., et al., *Auranofin, an inhibitor of thioredoxin reductase, induces apoptosis in hepatocellular carcinoma Hep3B cells by generation of reactive oxygen species*. Gen Physiol Biophys, 2017. **36**(2): p. 117-128.
157. Chen, X., et al., *Auranofin Inhibits Retinal Pigment Epithelium Cell Survival through Reactive Oxygen Species-Dependent Epidermal Growth Factor Receptor/ Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway*. PLoS One, 2016. **11**(11): p. e0166386.
158. Rudkowski, R., et al., *Auranofin inhibits the activation pathways of polymorphonuclear leukocytes at multiple sites*. Biochem Pharmacol, 1991. **41**(12): p. 1921-9.
159. Palomeque, J., et al., *Angiotensin II-induced negative inotropy in rat ventricular myocytes: role of reactive oxygen species and p38 MAPK*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(1): p. H96-106.
160. Kockskamper, A., et al., *Relevance of stretch-induced phosphorylation of MAPK and p90rsk in human myocardium*. Front Biosci (Elite Ed), 2013. **5**: p. 883-92.
161. Chen, Y., et al., *Acute p38 MAPK activation decreases force development in ventricular myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(6): p. H2578-86.
162. Villa-Abrille, M.C., et al., *[Angiotensin II-induced endothelin-1 release in cardiac myocytes]*. Medicina (B Aires), 2006. **66**(3): p. 229-36.
163. Yeves, A.M., et al., *Reactive oxygen species partially mediate high dose angiotensin II-induced positive inotropic effect in cat ventricular myocytes*. Cardiovasc Pathol, 2015. **24**(4): p. 236-40.
164. Schwinger, R.H.G., *Pathophysiology of heart failure*. Cardiovasc Diagn Ther, 2021. **11**(1): p. 263-276.
165. Wei, S., et al., *Differential MAP kinase activation and Na(+)/H(+) exchanger phosphorylation by H(2)O(2) in rat cardiac myocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **281**(5): p. C1542-50.
166. Khaled, A.R., et al., *Trophic factor withdrawal: p38 mitogen-activated protein kinase activates NHE1, which induces intracellular alkalinization*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(22): p. 7545-57.
167. Moor, A.N., et al., *Activation of Na+/H+ exchanger-directed protein kinases in the ischemic and ischemic-reperfused rat myocardium*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16113-22.
168. Avkiran, M. and R.S. Haworth, *Regulatory effects of G protein-coupled receptors on cardiac sarcolemmal Na+/H+ exchanger activity: signalling and significance*. Cardiovasc Res, 2003. **57**(4): p. 942-52.

169. Cingolani, H.E., et al., *Influence of Na<sup>+</sup>-independent Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange on the slow force response to myocardial stretch*. *Circ Res*, 2003. **93**(11): p. 1082-8.
170. Purcell, N.H., et al., *Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(35): p. 14074-9.
171. Chan, D.W., et al., *Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells*. *Carcinogenesis*, 2008. **29**(9): p. 1742-50.
172. Helston, O. and E. Amaya, *Reactive oxygen species during heart regeneration in zebrafish: Lessons for future clinical therapies*. *Wound Repair Regen*, 2021. **29**(2): p. 211-224.
173. Marchetti, S., et al., *Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(2): p. 854-64.
174. Molina, G., et al., *Zebrafish chemical screening reveals an inhibitor of Dusp6 that expands cardiac cell lineages*. *Nat Chem Biol*, 2009. **5**(9): p. 680-7.
175. Korotchenko, V.N., et al., *In vivo structure-activity relationship studies support allosteric targeting of a dual specificity phosphatase*. *Chembiochem*, 2014. **15**(10): p. 1436-45.
176. Vogt, A., et al., *A cell-active inhibitor of mitogen-activated protein kinase phosphatases restores paclitaxel-induced apoptosis in dexamethasone-protected cancer cells*. *Mol Cancer Ther*, 2008. **7**(2): p. 330-40.
177. Kaltenmeier, C.T., et al., *A Tumor Cell-Selective Inhibitor of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatases Sensitizes Breast Cancer Cells to Lymphokine-Activated Killer Cell Activity*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2017. **361**(1): p. 39-50.
178. Zhang, F., et al., *DUSP6 Inhibitor (E/Z)-BCI Hydrochloride Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in Murine Macrophage Cells via Activating the Nrf2 Signaling Axis and Inhibiting the NF-kappaB Pathway*. *Inflammation*, 2019. **42**(2): p. 672-681.
179. Diaz, R.G., et al., *p38 mitogen activated protein kinase mediates cardiac Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger inhibition induced by Sildenafil*. *Eur J Pharmacol*, 2019. **849**: p. 96-105.
180. Zhang, Y.H., et al., *The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the positive inotropic response to mechanical stretch in the mammalian myocardium*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1787**(7): p. 811-7.
181. Kentish, J.C. and A. Wrzosek, *Changes in force and cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration after length changes in isolated rat ventricular trabeculae*. *J Physiol*, 1998. **506 ( Pt 2)**: p. 431-44.
182. Calaghan, S. and E. White, *Activation of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange and stretch-activated channels underlies the slow inotropic response to stretch in myocytes and muscle from the rat heart*. *J Physiol*, 2004. **559**(Pt 1): p. 205-14.
183. Bluhm, W.F. and W.Y. Lew, *Sarcoplasmic reticulum in cardiac length-dependent activation in rabbits*. *Am J Physiol*, 1995. **269**(3 Pt 2): p. H965-72.
184. Hongo, K., E. White, and C.H. Orchard, *Effect of stretch on contraction and the Ca<sup>2+</sup> transient in ferret ventricular muscles during hypoxia and acidosis*. *Am J Physiol*, 1995. **269**(3 Pt 1): p. C690-7.
185. Wenzel, S., et al., *Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes*. *FASEB J*, 2001. **15**(12): p. 2291-3.
186. Kimura, S., et al., *Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II*. *Hypertension*, 2005. **45**(5): p. 860-6.
187. Ushio-Fukai, M., et al., *p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(24): p. 15022-9.

188. Perez, V., et al., *Inhibition of endogenous thioredoxin-1 in the heart of transgenic mice does not confer cardioprotection in ischemic postconditioning*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016. **81**(Pt B): p. 315-322.