



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en
Ciencias Químicas en el área de Bioquímica y
Biología Molecular:**

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL SILDENAFILO SOBRE LA REMODELACIÓN DEL VENTRÍCULO DERECHO DE RATAS CON HIPERTENSIÓN PULMONAR INDUCIDA POR DIABETES TIPO 1

PRESENTA:

M. en C. Miguel Ángel García González



Facultad de Ciencias Químicas BUAP



Directores de tesis:

Dr. José Gustavo López y López

FCQ-BUAP

Dra. Verónica Vallejo Ruiz

CIBIOR-IMSS

Diciembre 2022

Es verdad que en la ciencia no hay caminos reales; que la investigación se abre camino en la selva de los hechos, y que los científicos sobresalientes elaboran su propio estilo de pesquisas.

Mario Bunge

La ciencia comienza en la confusión y termina en una confusión pero de un orden superior.

Basada en un dicho citado por Alan F. Chalmers

AGRADECIMIENTOS:



Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado a lo largo del doctorado, asignándome una beca con el número: 700457.

También le agradezco al CONACYT por colaborar con el financiamiento del proyecto doctoral bajo el programa de Infraestructura 2019-300379.

Agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y estudios de posgrado (VIEP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por colaborar con el financiamiento del proyecto doctoral bajo el número 100317188-VIEP-2021.

Agradezco a la vida, porque con lo bueno y lo malo me ha enseñado a valorar lo que tengo y me ha demostrado lo que soy capaz de alcanzar.

A mis directores de tesis, Dr. Gustavo López y Dra. Verónica Vallejo, les agradezco la oportunidad de aprender y trabajar con ustedes, porque sin su guía, su apoyo incondicional, sus consejos y su amistad, no hubiera sido posible alcanzar esta meta.

A mis revisores de tesis, Dr. Alfonso Díaz, Dr. Everardo Avelino, Dra. Paola Maycotte, Dra. Bertha León y Dr. Julio Reyes; les agradezco su disponibilidad, consejos y su colaboración en el desarrollo del proyecto doctoral.

A mi esposa Mayra Rangel, por su compañía, alegría, motivación, apoyo y amor incondicional.

A mis padres Juan y Emiliana por el amor y el apoyo a lo largo de mi vida.

A mis hermanos Memo, Jony, Xó y Chuy, a mi cuñada Male, y a mi sobrino en camino, por todas las sonrisas y por ser parte fundamental de mi vida.

A toda mi familia Rangel, por su calidez, los ánimos, el apoyo, sus consejos, su amistad y cariño.

A mi asesor, consejero, compañero, pero sobre todo amigo Fausto Atonal, por las ideas, la confianza y todo el apoyo brindado a lo largo de los años.

A mis amigos, Carlos Atilano, Víctor Sarmiento, Oswaldo Torres, Luis Márquez, Lorena Arroyo, Diana Moroni, Joel de la Cruz, Avelino Cortés, Vladimir Carranza, Arturo Cabañas, más todos los que solo por espacio omito, gracias por la compañía, sonrisas y momentos que se quedan grabados en la memoria.

Al CIBIOR y al bioterio Claude Bernard y sus integrantes que siempre tuvieron la disponibilidad de trabajar en equipo y me brindaron su apoyo y amistad.

A mis compañeros y colegas de los laboratorios de Farmacia Clínica (FCQ-BUAP), Biología Molecular (CIBIOR-IMSS), Químico-Clínicas (FCQ-BUAP) y Neuromodulación (IF-BUAP) que me han brindado su compañía y apoyo.

RESUMEN

La diabetes es una condición que afecta a más de 460 millones de personas alrededor del mundo. Las enfermedades cardiovasculares son las principales complicaciones de la diabetes y se asocian con la presencia de disfunción endotelial (DE) y alteraciones hemodinámicas. Actualmente se considera que la diabetes es un fuerte factor de riesgo para el desarrollo de hipertensión pulmonar (HP), sin embargo, poco se ha descrito sobre los mecanismos implicados en la comorbilidad entre diabetes e HP. Hoy en día existe un gran abanico de estrategias farmacológicas dirigidas al tratamiento de la HP no asociada a la diabetes, siendo, algunos de los fármacos más empleados los inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 como el sildenafil. Evidencias clínicas y experimentales demuestran que el sildenafil es capaz de prevenir las complicaciones cardiovasculares secundarias a la HP y a la diabetes (de manera independiente). A pesar de esto, existen pocas evidencias que describan el efecto del tratamiento con sildenafil sobre el lecho vascular pulmonar y cardíaco durante la HP secundaria a la diabetes. Por lo tanto, nosotros evaluamos los efectos beneficiosos del tratamiento crónico con sildenafil sobre la presión arterial pulmonar y los mecanismos que regulan el tono vascular pulmonar, al mismo tiempo que la hipertrofia ventricular derecha (HVD) y los cambios tisulares que ocurren en el ventrículo derecho de ratas con HP secundaria a la diabetes. Se emplearon ratas Sprague-Dawley que se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales, la diabetes fue inducida con una dosis única de estreptozotocina (50 mg/kg) y la administración de sildenafil (60 mg/kg) ocurrió con una frecuencia diaria durante 12 semanas. Al término de ese tiempo se evaluó la presión arterial pulmonar, se realizaron ensayos de reactividad vascular pulmonar, se evaluó la presencia de hipertrofia y los cambios tisulares del ventrículo derecho. En la presente tesis doctoral, hallamos que el tratamiento crónico con sildenafil evita la disminución de la capacidad relajante dependiente del endotelio y la hiperrespuesta contráctil de las arterias pulmonares. También describimos que la diabetes provoca HVD, cambios en el tamaño celular y remodelación del tejido cardíaco derecho. Dichos efectos fueron evitados por el tratamiento crónico con sildenafil. Por lo tanto, la presente tesis doctoral aporta una nueva serie de evidencias experimentales que indican que el sildenafil evita la DE arterial pulmonar, la HP, la HVD y la remodelación del tejido cardíaco derecho durante la diabetes.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT: Serotonina	Mg ²⁺ : Ion magnesio
AMPC: Adenosín monofosfato cíclico	NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
AND: Ácido desoxirribonucleico	NO: Óxido nítrico
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero	O ₂ ⁻ : Radicales superóxido
BMPRII: Receptor tipo 2 de la proteína morfogenética de hueso	ONOO ⁻ : Peroxinitrito
c-sild: Citrato de sildenafilo	PDE: Fosfodiesterasa
Ca ²⁺ : Ion calcio	PDE5: Fosfodiesterasa tipo 5
CaMKII: Cinasa tipo 2 de calcio calmodulina	PKG: Proteína cinasa dependiente de guanosín monofosfato cíclico
DE: Disfunción endotelial	ROS: Especies reactivas de oxígeno
eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial	SD: Ratas Sprague Dawley
FDA: U.S. Food and Drug Administration	SERCA: ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico
GAF _A : Dominio activo de la PDE5	TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta
GAF _B : Dominio regulatorio de la PDE5	TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa
GCs: Guanilato ciclasa soluble	VD: Ventrículo derecho
GLUT-2: Transportador de glucosa tipo 2	VI: Ventrículo izquierdo
GMPc: Guanosín monofosfato cíclico	WK: Ratas Wistar-Kyoto
GTP: Guanosín trifosfato	Zn ²⁺ : Ion zinc
HP: Hipertensión pulmonar	
HVD: Hipertrofia ventricular derecha	
HVI: Hipertrofia ventricular izquierda	
IC: Insuficiencia cardiaca	
IL: Interleucina	
iPDE5: Inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5	
Kv: Canales de potasio dependientes de voltaje	

GLOSARIO

Disfunción diastólica: Disminución de la capacidad relajante del corazón.

Disfunción sistólica: Disminución de la capacidad contráctil del corazón.

Falla mitocondrial de los fibroblastos: La falla mitocondrial de los fibroblastos deriva en déficit energético, provoca daño celular y sobre producción de colágeno que favorece la presencia de fibrosis ventricular.

Fibroblasto: Tipo celular más común que se encuentran en el tejido conectivo. Libera colágeno que se utiliza para mantener la estructura de muchos tejidos.

Fibrosis: Formación patológica de tejido fibroso (principalmente por aumento del colágeno y cambios en la matriz extracelular).

Fracción de eyección: Porcentaje de sangre expulsada de un ventrículo con cada latido, se obtiene por ecocardiografía y se considera una prueba ideal para la evaluación funcional del corazón.

Hipertrofia ventricular: Aumento de la masa muscular del ventrículo en respuesta a estímulos mecánicos (aumento sostenido de la presión o sobrecargas de volumen).

Obliteración arteriopulmonar: Oclusión de la arteria pulmonar.

Poscarga ventricular: Presión que se debe ejercer para vencer la resistencia que se opone a la eyección de la sangre durante la contracción cardiaca.

Relajación isovolumétrica: Primera etapa de la relajación cardiaca. Es la capacidad cardiaca de variar la extensión de acortamiento para un grado dado de estiramiento inicial, conservando su volumen.

Resistencia vascular pulmonar: Grado de oposición al flujo sanguíneo por parte de la vasculatura pulmonar.

Sobrecarga ventricular: Condición patológica generada por el aumento de presión y volumen en el ventrículo que provoca el desarrollo de hipertrofia y fibrosis ventricular.

ÍNDICE

Página

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

LISTA DE ABREVIATURAS

GLOSARIO

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Diabetes mellitus.....	1
1.1.1. Clasificación de la diabetes.....	1
1.1.2. Complicaciones cardiovasculares de la diabetes	2
1.1.2.1. Complicaciones cardíacas	2
1.1.2.1.1. Complicaciones del ventrículo izquierdo	3
1.1.2.1.1.1. Disfunción del ventrículo izquierdo	4
1.1.2.1.1.2. Rigidez ventricular izquierda	4
1.1.2.1.1.3. Hipertrofia ventricular izquierda	5
1.1.2.1.2. Complicaciones del ventrículo derecho	6
1.1.2.1.2.1. Disfunción del ventrículo derecho	7
1.1.2.1.2.2. Rigidez ventricular derecha	7
1.1.2.1.2.3. Hipertrofia ventricular derecha	8
1.2. Hipertensión pulmonar	8
1.2.1. Clasificación de la hipertensión pulmonar	9
1.2.2. Complicaciones vasculares	9
1.2.3. Complicaciones cardíacas	10
1.2.3.1. Cambios funcionales del ventrículo derecho	11
1.2.3.2. Cambios morfológicos del ventrículo derecho	11
1.2.3.3. Cambios histológicos del ventrículo derecho	12
1.2.4. Tratamiento farmacológico para la hipertensión pulmonar.....	13

1.2.4.1. Efecto del sildenafil en el sistema cardiopulmonar....	14
1.2.5. Fosfodiesterasa tipo 5	16
1.2.5.1. Estructura de la fosfodiesterasa tipo 5	17
1.2.5.2. Actividad enzimática de la fosfodiesterasa tipo 5	18
1.2.5.3. Mecanismo de regulación de la fosfodiesterasa tipo 5.....	19
1.2.5.3.1. Gen de la fosfodiesterasa tipo 5	20
1.2.5.3.2. Cambios en la regulación de la fosfodiesterasa tipo 5 durante la diabetes en el sistema cardiovascular.....	21
1.2.5.3.3. Cambios en la regulación de la fosfodiesterasa tipo 5 durante la hipertensión pulmonar en el sistema cardiovascular.....	22
1.3. Efectos del sildenafil en el terreno cardiopulmonar...	24
1.3.1. Efecto del sildenafil sobre la circulación pulmonar.....	24
1.3.2. Efecto del sildenafil sobre el corazón	25
1.3.2.1. Acciones sobre el ventrículo izquierdo	26
1.3.2.2. Acciones sobre el ventrículo derecho	26
1.3.2.2.1. Cambios morfológicos y funcionales	27
1.3.2.2.2. Cambios histológicos	28
1.4. Hipertensión pulmonar como una complicación de la diabetes	29
2. ANTECEDENTES	32
2.1. Modelos animales de hipertensión pulmonar secundaria a diabetes.....	32
2.2. Mecanismo inducido por la diabetes que da origen a la hipertensión pulmonar	33
2.3. Efecto del sildenafil sobre los cambios cardiopulmonares durante la hipertensión pulmonar diabética.....	35
3. JUSTIFICACIÓN	38
4. HIPÓTESIS	41

5. OBJETIVOS	42
5.1. General	42
5.2. Específicos	42
6. METODOLOGÍA	43
6.1. Obtención y mantenimiento de animales.....	43
6.2. Formación de grupos experimentales.....	43
6.3. Inducción de diabetes y tratamiento con sildenafil ...	43
6.4. Obtención de órganos	44
6.5. Evaluación de la presión arterial pulmonar	45
6.6. Determinación del índice de Fulton	45
6.7. Evaluación histológica	45
6.8. Evaluación de la función endotelial	46
6.9. Análisis de datos y estadística	47
6.9.1. Evaluación de la presión arterial pulmonar	47
6.9.2. Determinación del índice de Fulton	47
6.9.3. Evaluación histológica	47
6.9.4. Evaluación de la función endotelial	47
7. RESULTADOS.....	49
7.1. Glucosa sanguínea y peso corporal del modelo experimental 48 horas posteriores a la administración de estreptozotocina.....	49
7.2. Efecto del sildenafil sobre la glucosa sanguínea y peso corporal de ratas con hipertensión pulmonar secundaria a la diabetes.....	49
7.3. Efecto del sildenafil sobre la presión arterial pulmonar de ratas con hipertensión pulmonar secundaria a la diabetes.....	52
7.4. Efecto del sildenafil sobre la hipertrofia ventricular derecha de ratas con hipertensión pulmonar secundaria a la diabetes.....	53

7.5.	Efecto del sildenafil sobre la remodelación tisular del ventrículo derecho de ratas con hipertensión pulmonar secundaria a la diabetes.....	57
7.6.	Efecto del sildenafil sobre la función endotelial de las arterias pulmonares de ratas con hipertensión pulmonar secundaria a la diabetes.....	58
7.7.	Efecto del citrato de sildenafil sobre la función endotelial vascular pulmonar de ratas con hipertensión pulmonar secundaria a la diabetes.....	58
8.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	63
8.1.	El tratamiento con sildenafil no modifica los valores de glucosa sanguínea o el peso corporal.....	63
8.2.	El tratamiento crónico de sildenafil en ratas diabéticas tipo 1 evita el desarrollo de la hipertensión pulmonar, a través de la prevención de la disfunción endotelial.....	64
8.3.	El sildenafil evita la hipertrofia y remodelación ventricular derecha en ratas diabéticas tipo 1.....	66
9.	CONCLUSIONES.....	71
10.	PERSPECTIVAS.....	72
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	74
	Apéndice A. Protocolo para tinción con hematoxilina y eosina.....	85
	Apéndice B. Artículos publicados durante el periodo doctoral.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura del sildenafil en complejo con la fosfodiesterasa tipo 5	16
Figura 2. Fosfodiesterasa 3',5'-ciclase específica de GMPc	18
Figura 3. Reacción química de la fosfodiesterasa tipo 5.....	19
Figura 4. Porción río arriba del gen PDE5A	21
Figura 5. Regulación de la relajación vascular pulmonar	25
Figura 6. Disfunción endotelial de las arterias pulmonares durante la diabetes.....	35
Figura 7. Descripción temporal de los grupos experimentales ...	44
Figura 8. Efecto temporal del sildenafil sobre la glucosa sanguínea y peso corporal.	51
Figura 9. El sildenafil evita el aumento de la presión arterial pulmonar en ratas diabéticas.	53
Figura 10. El sildenafil previene la disfunción endotelial y la hiperrespuesta contráctil a serotonina.....	55
Figura 11. Efecto del nitroprusiato sobre la reactividad vascular pulmonar.....	56
Figura 12. Efecto del citrato de sildenafil sobre la reactividad vascular pulmonar.	57
Figura 13. El sildenafil evita el desarrollo de hipertrofia ventricular derecha en ratas diabéticas.	58
Figura 14. El sildenafil evita la remodelación del tejido cardíaco en ratas diabéticas.....	59
Figura 15. El sildenafil evita la hipertrofia del cardiomiocito.....	60
Figura 16. El sildenafil evita el aumento en la deposición de colágeno en el tejido cardíaco de ratas diabéticas.	61
Figura 17. El sildenafil evita la fibrosis ventricular derecha.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de la hipertensión pulmonar	9
Tabla 2. Efecto del sildenafil sobre la glucosa sanguínea y peso corporal, antes y después de la administración de estreptozotocina.....	52
Tabla 3. Efecto del sildenafil sobre la afinidad y potencia de los agonistas vasomoduladores empleados en la evaluación de la reactividad vascular pulmonar.....	56

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Diabetes mellitus

De acuerdo con la Federación Internacional de la Diabetes (International Diabetes Federation, 2019), en el 2019 existían más de 460 millones de diabéticos alrededor del mundo y estima que la prevalencia alcance los 700 millones de diabéticos para el 2045. En México, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud (Shamah-Levy y cols., 2020), aproximadamente el 10% de la población adulta es diabética. La diabetes mellitus es una enfermedad crónica y grave que se produce cuando las células β -pancreáticas no pueden producir la hormona insulina o la hacen de manera ineficiente, o bien cuando el organismo no puede utilizar de manera eficaz dicha hormona (International Diabetes Federation, 2019). El principal signo clínico de diabetes mellitus es el valor elevado de glucosa sanguínea, sin embargo, el diagnóstico de la diabetes debe acompañarse con otras pruebas de laboratorio como la glucosa en plasma en ayunas, la hemoglobina glicosilada y la identificación de características clínicas como la poliuria, polidipsia y la pérdida de peso (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2018).

1.1.1. Clasificación de la diabetes

La diabetes mellitus (que denominaremos en este texto como, diabetes) es una enfermedad que se puede clasificar considerando las causas que provocan la hiperglucemia. De acuerdo con la Asociación Americana de la Diabetes (American Diabetes Association, 2018), existe una gran variedad de formas de diabetes relacionadas con trastornos genéticos, endocrinopatías, infecciones, etc., sin embargo, se identifican tres principales categorías. La diabetes tipo 1, que se caracteriza por la destrucción inmunomediada o idiopática de las células β -pancreáticas, lo que conduce a una deficiencia parcial o absoluta de insulina, por lo que pacientes deben administrarse la hormona (International Diabetes Federation, 2019). La diabetes tipo 2, que es la más frecuente alrededor del mundo y es de origen multifactorial, sin embargo, mayoritariamente se desarrolla debido a condiciones genéticas acompañadas de factores ambientales (Castro-Juárez y

cols., 2017) y se caracteriza por presentar una gran cantidad de trastornos metabólicos relacionados con la resistencia a la insulina. Por otra parte, la diabetes gestacional, que aparece en cualquier momento del embarazo, tiene su origen en factores como la edad avanzada, el sobre peso, la etnia y antecedentes familiares de diabetes tipo 2 (Lende y Rijhsinghani, 2020).

1.1.2. Complicaciones cardiovasculares de la diabetes

Las enfermedades cardiovasculares son la principal complicación de la diabetes y son la principal causa de morbilidad y mortalidad (American Diabetes Association, 2018). La diabetes duplica el riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular (International Diabetes Federation, 2019) y se ha descrito que sus principales complicaciones son retinopatía, nefropatía, neuropatía, accidente cerebrovascular, hipertensión sistémica, cardiopatía coronaria, cardiopatía isquémica e infarto al miocardio (American Diabetes Association, 2018; International Diabetes Federation, 2019). La aparición de estas complicaciones depende del tiempo y grado de hiperglucemia, de la actividad física del paciente y del tratamiento médico que se emplee.

1.1.2.1. Complicaciones cardiacas

Las complicaciones cardiovasculares más frecuentes de la diabetes son las cardiomiopatías, como la cardiopatía coronaria y la insuficiencia cardiaca congestiva, que pueden derivar en hospitalizaciones y muertes por síndromes coronarios agudos, infarto de miocardio y muerte súbita (International Diabetes Federation, 2019). Se estima que la diabetes aumenta hasta cuatro veces más la probabilidad de desarrollar fallas cardiacas diastólicas con fracción de eyección preservada y sistólica con fracción de eyección reducida (Shah y Brownlee, 2016). La diabetes provoca cardiomiopatía con disminución de la perfusión microvascular debida a disfunción endotelial (DE) e incremento en la deposición de colágeno acompañado de fibrosis y remodelación del miocardio, lo que provoca la falla

cardiaca tanto sistólica como diastólica (Burchfield y cols., 2013). Los pacientes diabéticos presentan arritmias ventriculares (Shah y Brownlee, 2016) y/o cardiopatía isquémica, factores de riesgo para generar insuficiencia cardiaca (Nahar y Ahmed, 2019). En este sentido, en los pacientes con diabetes presentan factores de riesgo relacionados con el desarrollo de la cardiopatía isquémica y la hipertensión arterial (Arrieta y cols., 2018).

El mecanismo implicado en los cambios mecánicos y celulares que conducen a las complicaciones cardiacas, incluye la disminución de la transcripción de la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA) y el aumento de la fosforilación del receptor de rianodina por activación de la cinasa tipo 2 de calcio calmodulina (CaMKII) (Erickson y cols., 2013). Dichos cambios dan lugar al aumento de la concentración intracelular de calcio, lo que contribuye a la presencia de arritmias por la formación de complejos ventriculares prematuros y post despolarizaciones tardías, así como la activación de una vía mitocondrial oxidativa (Su y cols., 2017). Estos mecanismos juegan un papel muy importante en el desarrollo de las complicaciones cardiacas ocasionadas por la diabetes, sin embargo, existen una gran variedad de alteraciones bioquímicas, metabólicas y celulares como cambios en la actividad de diversas enzimas y factores de transcripción, resistencia a la insulina, presencia de inflamación y fibrosis, así como el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Por lo tanto, en conjunto, esta serie de cambios contribuyen al incremento de miocardiopatía, infarto y muerte durante la diabetes (Shah y Brownlee, 2016).

1.1.2.1.1. Complicaciones del ventrículo izquierdo

La diabetes es una enfermedad que provoca múltiples alteraciones bioquímicas y metabólicas mediadas principalmente por el estatus oxidativo (Shah y Brownlee, 2016), que provocan la aparición de complicaciones como la remodelación del ventrículo izquierdo (VI) que se caracteriza principalmente por la presencia de fibrosis e hipertrofia ventricular izquierda (HVI), acompañado de insuficiencia cardiaca (IC) y fracción de eyección reducida (Singh y cols., 2020). En este sentido,

la remodelación del VI se ha asociado con disfunción diastólica y aumento de la mortalidad en pacientes diabéticos adultos (Litwin y cols., 2020).

1.1.2.1.1.1. Disfunción del ventrículo izquierdo

Una de las evidencias más recurrentes que demuestran la insuficiencia cardiaca izquierda es la disminución del porcentaje de la fracción de eyección del VI (Singh y cols., 2020), aunque también se ha reportado la disfunción diastólica y fibrilación del VI con fracción de eyección conservada (Tadic y Cuspidi, 2021). Se sabe que la diabetes no solamente implica alteraciones en el metabolismo de la insulina, sino que también es un predictor de enfermedad cardiovascular e IC (Oikonomou y cols., 2018). Se ha descrito que la presencia de IC en el VI esta mediada principalmente por la aparición de alteraciones en la homeostasis del calcio, en el metabolismo de los ácidos grasos libres, el aumento del estatus redox y la aparición de productos de glicosilación avanzada en los cardiomiocitos (Shah y Brownlee, 2016). Otro mecanismo implicado en la disfunción del VI que quizá se encuentra a la par de los anteriormente mencionados, es la alteración en las redes mitocondriales de los cardiomiocitos diabéticos, esto ocasiona alteraciones en la comunicación intracelular y modifica la capacidad de adaptación del cardiomiocito (Popov, 2017). En este sentido, se ha reportado que las alteraciones bioquímicas y celulares del cardiomiocito están asociadas con la disminución del rendimiento sistólico y diastólico del VI (Oikonomou y cols., 2018).

1.1.2.1.1.2. Rigidez ventricular izquierda

La fibrosis ventricular izquierda puede ser considerada como la causa más común de rigidez cardiaca. Comúnmente los pacientes diabéticos desarrollan hipertensión arterial sistémica, dando lugar a cambios en el sobre el tejido ventricular izquierdo, como remodelación y rigidez del VI a consecuencia de la fibrosis (Black y cols., 2010). El proceso de rigidez ventricular implica la acumulación de colágeno que puede localizarse en el área intersticial, perivascular o sobre el tejido conectivo

(Weber y cols., 1992) y está asociada con la aparición de la rigidez diastólica (Black y cols., 2010). Se señala a la desregulación de la síntesis de colágeno y fibronectina, así como un desequilibrio de las metaloproteasas de la matriz extracelular como principales mecanismos implicados en el desarrollo de rigidez ventricular y como principal causa de la fibrosis (Lin y cols., 2017). Adicionalmente el colágeno es una molécula susceptible a los productos de glicosilación avanzada ocasionados por la diabetes, lo que agrava los procesos de rigidez ventricular debido a que estas moléculas se acumulan y provocan el daño del tejido cardiaco (Vlassara y Palace, 2002). La presencia de fibrosis del VI puede derivar en alteraciones de las capacidades eléctricas y mecánicas del cardiomiocito, que se asocian con mayor riesgo de infarto al miocardio (Black y cols., 2010).

1.1.2.1.1.3. Hipertrofia ventricular izquierda

La prevalencia de hipertensión arterial sistémica en los pacientes diabéticos es muy alta, aunque de acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud varía dependiendo de la raza. La diabetes en comorbilidad con la hipertensión arterial sistémica representa un mayor riesgo para desarrollar efectos cardiovasculares adversos, que inciden principalmente en el VI (Zhang y cols., 2020). En este sentido, existen múltiples evidencias de que la diabetes provoca el desarrollo de HVI (Lin y cols., 2017; Litwin y cols., 2020; Singh y cols., 2020; Li y cols., 2021), es decir que, de manera independiente a la hipertensión arterial sistémica, la diabetes actúa como un factor de riesgo para la remodelación anómala del VI mediado principalmente por los desórdenes metabólicos en el cardiomiocito (Li y cols., 2021). Durante la diabetes se presenta disfunción diastólica del VI acompañada del incremento de la masa del VI, específicamente detectado como el aumento del grosor de la capa ventricular izquierda (Li y cols., 2021), además el desarrollo de HVI está asociado con la presencia de fibrosis (Lin y cols., 2017). Por lo tanto, la HVI durante la diabetes puede desembocar en el desarrollo de arritmias, isquemia, falla cardiaca congestiva y muerte súbita (Li y cols., 2021).

Evidencias clínicas demuestran que el grado de remodelación del VI durante la diabetes es dependiente de la concentración de la glucosa y de la presión arterial sistémica (Zhang y cols., 2020), por lo tanto, el control de la glucosa sanguínea reduce las complicaciones cardiovasculares como la HVI (Brown y cols., 2020). También se ha demostrado que la sobreexpresión de la enzima convertidora de la angiotensina 2 está involucrada en la remodelación del VI (Hao y cols., 2015). En la misma dirección, uno de los mecanismos más relevantes en el desarrollo de HVI durante la diabetes se centra en los cotransportadores tipo 2 de sodio y glucosa (Brown y cols., 2017). La desregulación de este cotransportador ocasiona la presencia de edema intersticial, aumento del intercambio sodio-hidrógeno, cambios en la capacidad bioenergética del cardiomiocito y también se asocia con el aumento de la precarga y poscarga del VI (Brown y cols., 2020). Además, la HVI impide el llenado del VI durante la sístole, provoca insuficiencia cardíaca diastólica, reduce la perfusión coronaria y es considerada arritmogénica (Brown y cols., 2017).

1.1.2.1.2. Complicaciones del ventrículo derecho

Ya hemos resaltado que la diabetes es una enfermedad que induce la aparición de cardiomiopatías, esto implica la alteración del tejido cardíaco completo en su porción izquierda y derecha. A pesar de que han sido desatendidas las complicaciones de la diabetes sobre el ventrículo derecho (VD) y de que existe una menor cantidad de información sobre ellas, estas complicaciones son tan relevantes como las que se presentan en el VI. Al igual que en el tejido ventricular izquierdo, las complicaciones del VD están mediadas por los problemas bioquímicos y metabólicos del cardiomiocito generados por la diabetes (Shah y Brownlee, 2016). Se ha demostrado que la diabetes se asocia de manera independiente al desarrollo de complicaciones en la poscarga del VD (Gorter y cols., 2018), y provoca remodelación y cambios estructurales (Linssen y cols., 2020), que de manera temprana ocasiona disfunción diastólica (Miao y cols., 2014) y sistólica (Gorter y cols., 2018), y que finalmente provocan la aparición de insuficiencia ventricular derecha.

1.1.2.1.2.1. Disfunción del ventrículo derecho

La remodelación y el aumento de la masa del VD se ha asociado con mayor riesgo de insuficiencia cardíaca (Linssen y cols., 2020). Actualmente se desconoce gran parte de los mecanismos implicados en la disfunción del VD ocasionada por la diabetes. A pesar de ello, se ha descrito que la diabetes provoca disfunción diastólica (Kosmala y cols., 2004; Kosmala y cols., 2007) y sistólica en el VD y que estos resultados podrían explicarse de la misma manera que en el VI (Nahar y cols., 2019). Recientemente se ha descrito en pacientes con insuficiencia cardíaca, que la disfunción del VD ha sido un mayor predictor de mortalidad comparado con la disfunción del VI (Linssen y cols., 2020).

Los mecanismos implicados en el desarrollo de la disfunción del VD durante la diabetes se pueden agrupar de manera directa e indirecta. Los mecanismos que afectan al cardiomiocito de manera directa son la fibrosis, aumento del estatus oxidativo, la alteración de la homeostasis del calcio y del metabolismo celular, (Boudina y Abel, 2007) por otra parte, los mecanismos que afectan de manera indirecta la función del VD están relacionados con el sistema vascular como la rigidez vascular y la disfunción microvascular (Whitaker y cols., 2018), así como los cambios mecánicos inducidos por el VI a través de la pared septal y el pericardio (Linssen y cols., 2020).

1.1.2.1.2.2. Rigidez ventricular derecha

La remodelación del VD durante la diabetes está mediada principalmente por la fibrosis de la pared libre ventricular (Hao y cols., 2015), es decir que la rigidez del VD tiene un rol importante durante la diabetes. En el mismo sentido que la rigidez ventricular izquierda, los principales mecanismos mediadores de la fibrosis se basan en la acumulación de colágeno y fibronectina en el espacio intersticial y conectivo (Weber y cols., 1992), al igual que el desequilibrio de las metaloproteasas de la matriz extracelular (Lin y cols., 2017). Evidencias clínicas y experimentales sugieren que la hiperactivación de los sistemas dependientes de angiotensina 2 participan

activamente en la inducción de la fibrosis ventricular (Hao y cols., 2015; Touyz y Montezano, 2018). También las evidencias indican que la sobreexpresión de los receptores tipo 1 y 2 de angiotensina y de la ATPasa dependiente de calcio del retículo sarcoplásmico están implicados en el desarrollo de fibrosis del VD (Hao y cols., 2015). La presencia de la fibrosis ventricular derecha durante la diabetes es muy recurrente, pues se ha demostrado que incluso con un grado leve de diabetes se presenta fibrosis perimisial (Nunoda y cols., 1985). Por lo tanto, la fibrosis adquiere gran importancia en el mecanismo de la disfunción del VD.

1.1.2.1.2.3. Hipertrofia ventricular derecha

El estudio de la hipertrofia ventricular derecha (HVD) ocasionada de manera independiente por la diabetes cuenta con muy pocos datos, y en la mayoría de los reportes el origen de la remodelación ventricular derecha se asocia con el aumento de la presión arterial pulmonar (que se describe más adelante). Sin embargo, los reportes existentes indican que la diabetes provoca la desregulación hormonal y metabólica cardíaca, esto conduce al aumento de la actividad de la angiotensina que da origen a anomalías como el desarrollo de HVD (Romaní-Pérez y cols., 2015). La remodelación del VD se considera un efecto secundario a las anomalías metabólicas secundarias a la diabetes (Widya y cols., 2013) y la evidencia confirmatoria de la presencia de HVD durante la diabetes es el aumento del diámetro medio del cardiomiocito del VD respecto al diámetro medio de cardiomiocitos del VD sin diabetes (Nunoda y cols., 1985).

1.2. Hipertensión pulmonar

La hipertensión pulmonar (HP) se define por valores de presión arterial pulmonar media en reposo de 20 mmHg o superiores, acompañado de un valor de 3 o más unidades de Wood (Galiè y cols., 2019). Hasta el día de hoy, la HP sigue siendo considerada una enfermedad incurable y fulminante que se caracteriza por tener como principales manifestaciones clínicas a la disnea, presencia de debilidad,

fatiga, soplos de insuficiencia pulmonar, cianosis y síncope (Simonneau y cols cols, 2019).

1.2.1. Clasificación de la hipertensión pulmonar

El origen de la HP puede ser multifactorial y se clasifica en distintos grupos. Uno de los principales propósitos de clasificar a la HP es asociar las condiciones clínicas con los mecanismos fisiopatológicos que dan su origen (Simonneau y cols, 2019). La clasificación más común de la HP es la llamada clasificación clínica que toma en cuenta los factores que dan origen a la enfermedad (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de la hipertensión pulmonar (modificada de Simonneau y cols., 2019).

Grupo	Definición	Fisiopatología
1	Hipertensión arterial pulmonar	Idiopática, hereditaria, inducida por fármacos y toxinas, compromiso venoso/capilar, VIH, hipertensión portal o cardiopatías congénitas.
2	Hipertensión pulmonar debida a enfermedad del corazón izquierdo	Insuficiencia cardíaca izquierda, cardiopatía valvular, condiciones cardiovasculares congénitas que provocan HP poscapilar.
3	Hipertensión pulmonar debida a enfermedades pulmonares y/o hipoxia	Enfermedad pulmonar obstructiva, restrictiva o mixta, hipoxia, trastornos pulmonares del desarrollo.
4	Hipertensión pulmonar debida a obstrucciones de la arteria pulmonar	Tromboembolismo crónico y otras obstrucciones de la arteria pulmonar.
5	Hipertensión pulmonar debida a mecanismos poco claros y/o multifactoriales	Cardiopatías congénitas complejas, trastornos hematológicos, sistémicos y metabólicos, y otros.

1.2.2. Complicaciones vasculares

Independientemente del tipo de HP que se desarrolle, esta condición afecta drásticamente la vasculatura pulmonar. Una de las alteraciones mayoritariamente reportadas en este lecho vascular durante la HP es la alteración del mensajero y del receptor tipo 2 de la proteína morfogenética de hueso (BMPRII). Este receptor

pertenece a la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (Portillo y cols., 2010), por lo que su alteración está implicada en múltiples alteraciones de las células vasculares que conducen a la proliferación celular y alteraciones metabólicas (Portillo y cols., 2010; Thenappan y cols., 2018). Durante la HP también se presenta la remodelación de la matriz extracelular acompañada del aumento y redistribución del colágeno, así como ruptura de láminas elásticas (Thenappan y cols., 2018-B). En el mismo terreno extracelular se desarrolla desequilibrio en las enzimas proteolíticas como las metaloproteasas y esto conduce a disfunción de las células endoteliales e inflamación (Thenappan y cols., 2018-B). En general la desregulación de la matriz extracelular y los cambios vasculares del colágeno provocan rigidez vascular que se ha asociado con la proliferación de las células vasculares y el engrosamiento de las capas íntima y media de las arterias pulmonares (Thenappan y cols., 2018-B).

El endotelio es una capa vascular que regula el tono vascular y también sufre alteraciones durante la HP. En este sentido, el endotelio presenta alteraciones en la apoptosis y proliferación, procesos que se asocian con el aumento de estrés oxidativo (López-López y cols., 2008) junto con una desregulación energética a consecuencia de un daño mitocondrial (Yu y Chan, 2017). La inflamación también se presenta en el lecho vascular y está mediada principalmente por cambios en los complejos de citocinas, linfocitos, macrófagos, células *natural killer* y anticuerpos, por lo que se sugiere que la HP también puede ser una enfermedad inmunomediada (Yu y Chan, 2017; Thenappan y cols., 2018).

1.2.3. Complicaciones cardiacas

Los síntomas de la HP tienen su origen en el sobreesfuerzo cardiaco, por lo que incluyen disnea, fatiga, dolor precordial por oclusión de arteria coronarias, distensión del segundo ruido cardiaco (Humbert y cols., 2009; Galié y cols., 2009) y falla del VD (Whitaker y cols., 2018). La HP se caracteriza por generar lesiones vasculares pulmonares resultando en la disminución de la perfusión distal y daño del VD (Rajagopal y Yu, 2022). Los cambios que ocurren en el tejido cardiaco están

inducidos por los cambios estructurales y funcionales de las arterias pulmonares durante la HP que provocan el aumento de la poscarga ventricular derecha y finalmente el desarrollo de cambios funcionales, morfológicos e histológicos que explican la aparición de HVD e insuficiencia cardíaca derecha (Thenappan y cols., 2018; Rajagopal y Yu, 2022).

1.2.3.1. Cambios funcionales del ventrículo derecho

La obliteración y obstrucción de las arteriolas pulmonares conducen al aumento de la resistencia arterial pulmonar, aumento de la poscarga ventricular derecha, desarrollo de HVD e insuficiencia cardíaca derecha (Rajagopal y Yu, 2022). Se considera que la función del VD determina la supervivencia del paciente, por lo que la insuficiencia cardíaca derecha resulta ser la principal causa de mortalidad en pacientes con HP (Lan y cols., 2018). Se ha descrito que la sobrecarga ventricular derecha conduce a la activación de la vía del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) en los fibroblastos, lo que provoca fibrosis ventricular por remodelación y representa uno de los principales contribuyentes en la falla del VD (Khateeb y cols., 2019).

Por otra parte, los cambios hemodinámicos generados por la HP a consecuencia de la lesión por presión sostenida y congestión venosa son la principal causa de la disminución del gasto cardíaco (McLure y Peacock, 2009) y el desarrollo de insuficiencia cardíaca derecha con fracción de eyección reducida o conservada (Guazzi, 2018). La insuficiencia cardíaca derecha está acompañada de alteraciones en la precarga, aumento de la poscarga y falla en el soporte mecánico, por lo que involucra cambios adaptativos y desadaptativos en el VD (Cassady y Ramani, 2020).

1.2.3.2. Cambios morfológicos del ventrículo derecho

En condiciones normales, el VD tiene una forma geométrica definida y presenta una pared ventricular delgada (aproximadamente una sexta parte de la masa del VI),

además con aproximadamente el 25% de trabajo sistólico bombea la misma cantidad de sangre que el VI debido a la baja resistencia de la arteria pulmonar (McLure y Peacock, 2009). Sin embargo, bajo condiciones de HP el cambio del volumen sistólico del VD es uno de los cambios clínicamente más relevantes ya que se correlaciona con la función del ventrículo (Grünig y Peacock, 2015). Se ha descrito que la HP aumenta el volumen telesistólico y telediastólico, alterando la capacidad sistólica y diastólica del VD (McLure y Peacock, 2009; Grünig y Peacock, 2015). De manera recurrente se ha demostrado la presencia de HVD (aumento de la masa del VD) como efecto compensatorio al aumento de la poscarga pulmonar, efecto que fue medido con un índice de masa ventricular (Índice de Fulton) que se considera de alta especificidad y sensibilidad (McLure y Peacock, 2009).

La evaluación morfológica del VD durante la HP es relevante al momento de determinar la progresión y gravedad de la enfermedad. En este sentido la evaluación morfológica del VD durante la HP se ha realizado empleando las técnicas de ecocardiografía y resonancia magnética. Estos estudios han evidenciado el desplazamiento del septum interventricular, identificado por la presencia de un mayor índice de excentricidad, además se presentan cambios en la longitud de las fibras miocárdicas acompañado de derrame pericárdico del VD (Grünig y Peacock, 2015) y cambios en la capacidad mecánica de la pared del VD (McLure y Peacock, 2009).

1.2.3.3. Cambios histológicos del ventrículo derecho

Se ha demostrado que los corazones con HVD secundaria a HP muestran disminución en la capacidad de angiogénesis, cambios en la señalización adrenérgica, alteración del metabolismo mitocondrial del cardiomiocito y fibrosis del VD (Tian y cols., 2018).

Con respecto a la HVD, histológicamente se ha demostrado que la HP induce el aumento del tamaño de los cardiomiocitos del VD (Rai y cols., 2018), quizá a través de la fragmentación mitocondrial, proceso que implica la desregulación de proteínas

de control mitocondrial como Drp1 y algunas mitofusinas (Tian y cols., 2018). Además, la disfunción mitocondrial provoca la disminución de la apoptosis, el aumento en la tasa de proliferación de fibroblastos y la producción de colágeno tipo III (Tian y cols., 2018). Por lo tanto, todo este conjunto de mecanismos también explica la presencia de fibrosis del VD (principal causa de rigidez ventricular). Se ha demostrado que la fibrosis del VD participa en el mecanismo de insuficiencia ventricular durante la HP y que la presencia de fibrosis en la pared libre del VD es un componente que se asocia con los cambios ventriculares adversos (Kim y cols., 2021).

La disminución de la concentración del guanósín monofosfato cíclico (GMPc) se ha asociado con la presencia de fibrosis e hipertrofia cardiaca (Rai y cols., 2018; Tian y cols., 2018; Khateeb y cols., 2019; Kim y cols., 2021). Las evidencias indican que la HP provoca fibrosis con alto contenido de colágeno tipo III presente en la matriz extracelular (Tian y cols., 2018; Rai y cols., 2018). El mecanismo propuesto para este proceso se centra en los receptores tipo TGF- β a través de la activación de proteínas Smad (reguladas por GMPc) y sus respectivos factores de transcripción (Rai y cols., 2018). Esta evidencia se fortalece y adquiere mayor especificidad sobre el VD (que hipotéticamente debería ser el único ventrículo afectado durante la HP) ya que recientemente se ha descrito con resonancia magnética la pared libre del VD presenta una alta densidad de colágeno sin afectar la pared libre del VI (Kim y cols., 2021).

1.2.4. Tratamiento farmacológico para la hipertensión pulmonar.

No existe un único tratamiento para de la HP, debido a que su origen puede ser multifactorial y su progresión variada. Recientemente en el 6° simposio mundial sobre HP un grupo de expertos enfatizó la importancia de tratar a los pacientes hipertensos pulmonares en función del riesgo y seguimiento, donde el tratamiento se base en la gravedad y en los riesgos multiparamétricos de cada paciente (Galiè y cols., 2019). La aplicación de un algoritmo de tratamiento (monoterapia o terapia combinada doble o triple) deberá estar asignado en función de los riesgos del

paciente, que deben ser calculados respecto a parámetros y biomarcadores clínicos hemodinámicos, pulmonares y cardiacos (Galiè y cols., 2019; Simonneau y cols, 2019). Actualmente existen diversos medicamentos aprobados o experimentales que han demostrado reducir la presión arterial pulmonar, restaurar la reactividad vascular pulmonar, mejorar la hemodinamia, la clínica y la supervivencia (Simonneau y cols, 2019). Sin embargo, de acuerdo a la Guía de la Práctica Clínica del Instituto Mexicano del Seguro Social, en México los medicamentos aprobados para el tratamiento de la HP en el adulto son los antagonistas de los receptores de la endotelina (ambrisentan), bloqueadores de los canales de calcio (amlodipino y nifedipino), anticoagulantes (warfarina), suplementos de hierro (sulfato ferroso) e inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 (sildenafil) (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2010), los cuales pueden ser administrados solos o combinados, de acuerdo con las guías internacionales.

1.2.4.1. Efecto del sildenafil en el sistema cardiopulmonar

El citrato de sildenafil es un fármaco inhibidor de la PDE5 (iPDE5) creado para el tratamiento de angina de pecho y enfermedades coronarias, pero que es indicado principalmente para el tratamiento de la disfunción eréctil (Ala y cols., 2021). A partir del 2005 la FDA de los Estados Unidos lo incorporó en la lista de tratamientos para la HP y hasta la fecha ha permitido mejorar la calidad de vida de los pacientes, y representa una terapia paliativa efectiva (Bhogal y cols., 2019). Esto ha hecho que el sildenafil se posicione como uno de los medicamentos de mayor interés a nivel clínico y experimental principalmente para el tratamiento de la HP y otras enfermedades cardiovasculares (Ala y cols., 2021).

La fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5) es una ciclasa específica para GMPc, por lo que su actividad reduce la concentración de este segundo mensajero. El sildenafil es un inhibidor competitivo de la PDE5 (Wallis, 1999), y ya que es un compuesto químico con una estructura muy semejante al GMPc, se considera como un inhibidor selectivo para la PDE5 (FDA, 2014).

En condiciones normales, gran parte de la regulación contráctil del corazón es a través de la vía de señalización del óxido nítrico (NO). Este se produce en las células del sistema cardiovascular (células endoteliales y cardiomiocitos) a través de la activación de la enzima guanilato ciclasa y difunde de manera paracrina en células vasculares y autocrina en los cardiomiocitos regulando el tono vascular y modulando la contractilidad de los cardiomiocitos dosis-dependiente (Smiljić y cols., 2014). A nivel cardiovascular, las acciones protectoras del sildenafil están relacionadas con el mecanismo celular de la vía de señalización mediada por la inhibición de la PDE5 y consecuente activación del eje GMP-Proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG), tanto en los miocitos ventriculares como en la vasculatura pulmonar (Patel y cols., 2017). Por lo tanto, uno de los mecanismos más importantes para lograr la potenciación de la vía de señalización es a través del incremento del GMPc citosólico por la inhibición de la PDE5 (Wilkins, 2012).

El sildenafil no es un relajante directo, pero sí mejora el efecto del NO por inhibición competitiva de la PDE5 (Figura 1) y su posterior incremento en la concentración del GMPc (Wallis, 1999; FDA, 2014). El efecto inhibitorio del sildenafil sobre la PDE5 es considerado uno de los más potentes comparado con otros tipos de fosfodiesterasa (PDE) y sus correspondientes moléculas inhibitorias (FDA, 2014). Es sabido que el sildenafil puede inhibir otras PDE además de la PDE5, esto es cierto principalmente con respecto a la PDE3 y 6, sin embargo, se considera que el sildenafil presenta una afinidad 4 mil veces menor para la PDE3 y presenta solo una décima parte de su afinidad por la PDE6 (FDA, 2014). Pese a que podría parecer un gran porcentaje de afinidad por la PDE6, en el terreno cardiovascular esta PDE no es de gran relevancia ya que se considera mayoritariamente expresada en retina (Kayik y cols., 2017).

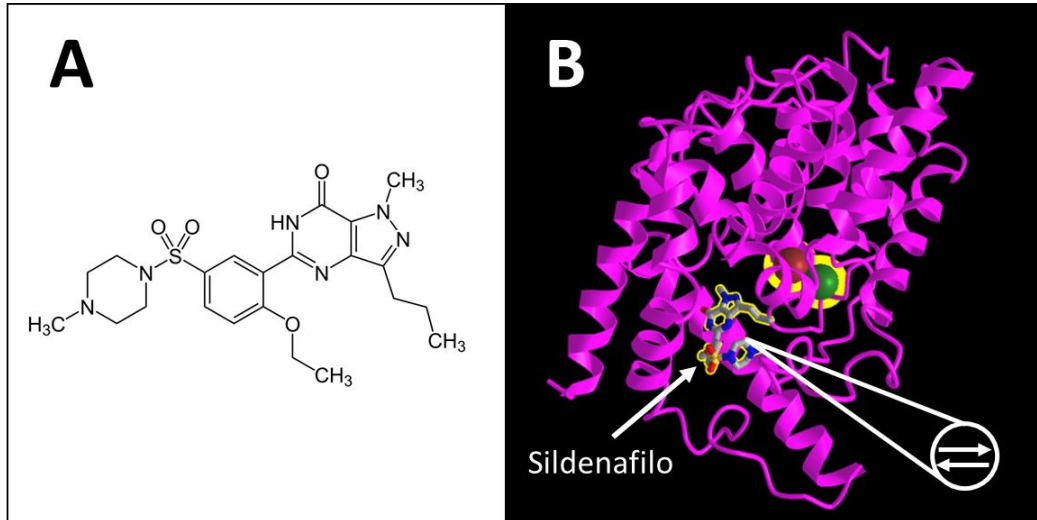


Figura 1. Estructura del sildenafil en complejo con la fosfodiesterasa tipo 5. **A.** Estructura química del sildenafil. **B.** Complejo sildenafil-PDE5, se resalta la estructura química del sildenafil y se representa la inhibición competitiva de la PDE5. (A, figura de dominio público; B, modificada de NCBI, Structure Summary MMDb, 2022).

1.2.5. Fosfodiesterasa tipo 5

Las fosfodiesterasas son un conjunto de metalohidrolasas que catalizan reacciones de descomposición de nucleótidos cíclicos, de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) o GMPc a AMP y GMP inactivos (Das y cols., 2015). Las PDE se clasifican en 11 familias (PDE1 - PDE11) y se encuentran en todos los tejidos de sistemas vertebrados y mamíferos, aunque su distribución puede variar de acuerdo con el tejido (Kayik y cols., 2017; Andersson, 2018). De esta superfamilia de PDE, las PDE 5, 6 y 9 son específicas para GMPc, las PDE 4, 7 y 8 son específicas para AMPC y las PDE 1-3, 10 y 11 presentan doble especificidad sobre el AMPC y GMPc (Lee y Kass, 2012; Das y cols., 2015).

La hidrólisis del GMPc en el sistema cardiovascular está regulada por las PDE 1, 2 y 5 (Lee y Kass, 2012). Sin embargo, la PDE5 tiene mayor dominio en la regulación del GMPc este sistema (Das y cols., 2015; Kayik y cols., 2017), por esta razón, la comunidad científica ha colocado la mayoría del esfuerzo en el estudio de esta PDE y su relación con las enfermedades cardiovasculares. El GMPc es un segundo

mensajero intracelular producido por la unión de ligandos a proteínas guanilato ciclasas, y cumple con la regulación de diversos sistemas fisiológicos como el crecimiento celular, metabolismo, inflamación, apoptosis, tono vascular, contracción cardiaca, entre otros (Ahmed y cols., 2021). Por lo tanto, estos procesos son regulados por la PDE5.

1.2.5.1. Estructura de la fosfodiesterasa tipo 5

La PDE5 es una fosfodiesterasa 3',5'-ciclase específica de GMPc, es una proteína homodimérica y está conformada por 875 aminoácidos plegados en forma de α -hélices y hojas β antiparalelas (Ahmed y cols., 2021). La PDE5 cuenta con dos dominios, el dominio 1 está constituido por los aminoácidos 164 – 314 y corresponde al sitio C-terminal que contiene los sitios putativos para la unión de los metales divalentes ion zinc (Zn^{2+}) o ion magnesio (Mg^{2+}) y dominios llamados GAF (fosfodiesterasa dependiente de GMP de mamíferos c, Anabaena adenilil ciclase y E. coli FhIA), el dominio 2 está constituido por los aminoácidos 346 – 503 y corresponde al sitio N-terminal que contiene también dos sitios GAF de unión al GMPc (Figura 1) (Madej y cols., 2014; NCBI, Structure Summary MMDB, 2022; Uniprot, 2022).

La PDE5 contiene dominios GAF_A y GAF_B en tándem, y son las regiones de unión al GMPc (Kayik y cols., 2017; Ahmed y cols., 2021). El dominio GAF_A contiene el sitio activo de unión al GMPc que inicia la actividad de la enzima a través de la fosforilación en la posición ser92. Para la activación de este dominio se requiere la participación del extremo C-terminal de la proteína que contiene el dominio de unión al metal divalente ya que actúa como cofactor enzimático (Das y cols., 2015), aunque bajo ciertos estímulos también puede actuar con actividad catalítica (Ahmed y cols., 2021). Sin embargo, ya que el dominio GAF_A es principalmente el sitio activo, el dominio GAF_B posee actividad principalmente regulatoria (Lee y Kass, 2012; Kayik y cols., 2017).

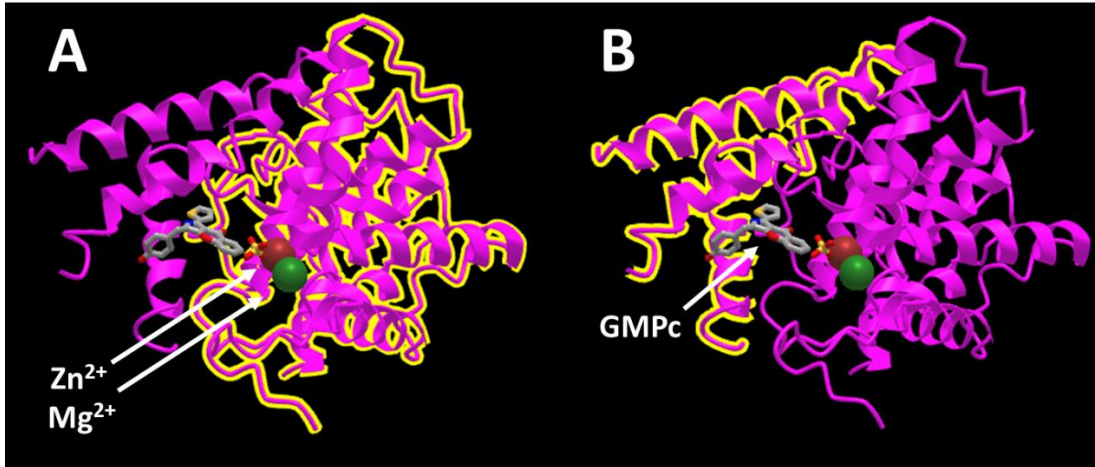


Figura 2. Fosfodiesterasa 3',5'-ciclasa específica de GMPC. **A.** Estructura que resalta el dominio 1 de la PDE5 que contiene los sitios de unión a los metales divalentes zinc (Zn²⁺) y magnesio (Mg²⁺). **B.** Estructura que resalta el dominio 2 de la PDE5 que contiene los sitios de unión a GMPC. (Modificada de Madej y cols., 2014; NCBI, Structure Summary MMDB, 2022).

1.2.5.2. Actividad enzimática de la fosfodiesterasa tipo 5

La PDE5 es una proteína multidominio que cuenta con su dominio catalítico en la porción C-terminal y su dominio regulador en la porción N-terminal con sus respectivos dominios GAF que también colaboran en la dimerización de la proteína (Ahmed y cols., 2021). Tanto en la porción C como N-terminal, los dominios GAF_A son el sitio de unión del GMPC, unión que se logra gracias a la interacción de los hidrógenos del grupo guanina del GMPC con el residuo de ácido aspártico del dominio GAF_A (Kayik y cols., 2017; Ahmed y cols., 2021). Respecto al dominio GAF_B, se ha descrito que contribuye para lograr la dimerización de la PDE5 y puede aumentar la afinidad de unión del dominio catalítico (Ahmed y cols., 2021).

El sitio de unión al GMPC se crea gracias a la geometría de coordinación entre el Zn²⁺, Mg²⁺, histidina, aspartato y moléculas de agua. El Zn²⁺ actúa como ácido de Lewis y activa el grupo hidroxilo extraído de las moléculas de agua que se inserta gracias a los iones metálicos divalentes en el grupo fosfato, permitiendo la ruptura del enlace fosfodiéster del GMPC y obteniendo como producto el 5'GMP (Ahmed y cols., 2021) (Figura 3).

Cuando la concentración de GMPc se eleva en la célula, se une alostéricamente con el sitio regulador de la PDE5 y esto aumenta la actividad del dominio catalítico (Ahmed y cols., 2021). Además, se ha reportado que la activación de la PKG logra fosforilar a la PDE5 y aumentar su actividad catalítica (Lee y Kass, 2012). Este mecanismo dependiente de GMPc representa un proceso de autorregulación de los niveles de GMPc mediado por la PDE5 (Das y cols., 2015).

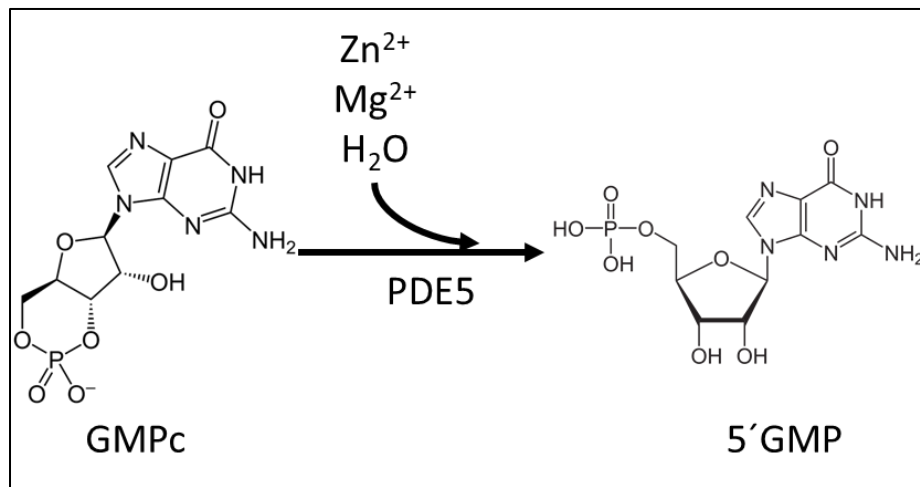


Figura 3. Reacción química de la fosfodiesterasa tipo 5. La fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5) en presencia de agua y metales divalentes zinc (Zn^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) cataliza la ruptura del enlace fosfodiéster del GMPc para producir 5'GMP. (Basada en la descripción de Ahmed y cols., 2021).

1.2.5.3. Mecanismo de regulación de la fosfodiesterasa tipo 5

La PDE5 es una proteína que se expresa en distintos tejidos, por lo tanto, se ha descrito que su expresión puede estar regulada por distintos procesos. De acuerdo con las evidencias existentes, la expresión de la PDE5 depende del tejido analizado y de los estímulos a los que se encuentra expuestos. Se ha demostrado que en el tejido cavernoso del pene durante la disfunción eréctil la regulación de la PDE5 podría estar asociada con la presencia de hormonas (andrógenos) o directamente dependiente de la cantidad de músculo liso (Lin y cols., 2013). Por otra parte, en el tejido vascular se ha asociado con la actividad del NO y el GMPc, de manera que

cuando aumenta la cantidad de este nucleótido cíclico, aumenta la expresión de la PDE5, evidenciando una retroalimentación negativa que evita una relajación vascular excesiva (Cesarini y cols., 2019).

Desafortunadamente aún se desconoce mucho de los procesos bioquímicos y celulares que regulan la expresión de la PDE5. No obstante, genética y molecularmente sabemos que la regulación de esta PDE es un proceso que está mediado por la expresión de distintas isoformas de la proteína, donde también participan procesos postraduccionales como la fosforilación y nitrosilación que favorece la activación y ubiquitinación respectivamente (Ahmed y cols., 2021).

1.2.5.3.1. Gen de la fosfodiesterasa tipo 5

La PDE5 es codificada por el gen *PDE5A* que tiene un tamaño de 134,402 pb ubicado en el cromosoma 4 (NCBI, GenBank, 2022). El gen *PDE5A*, es el único que codifica para la PDE5. Este gen cuenta con tres variantes de ARNm que codifican tres isoformas proteicas, las PDE5A1, PDE5A2 y PDE5A3 (Lee y Kass, 2012). El gen está compuesto por 24 exones ubicados en el cromosoma 4q26 (NCBI, Gene: ID 8654), los tres primeros exones son los alternativos (PDE5 A1-A3) que codifican para el extremo amino terminal de cada una de las isoformas (Lin, 2004). Estos exones se encuentran separados por intrones de 434 (entre A1 y A3) y 361 pb (entre A3 y A2). El promotor de PDE5A1 y PDE5A3 se encuentran río arriba del exón A1, mientras que el promotor de PDE5A2 se ubica río arriba del exón A2 (Lin y cols., 2002). Ambos promotores cuentan con sitios de unión a los factores de transcripción Sp1 y AP2, y en el caso del promotor para A1 y A3 cuenta con sitios potenciadores dependientes de GMPc y AMPc (Lin, 2004), los cuales confieren mayor actividad al promotor (Figura 4).

La traducción de las tres isoformas del *PDE5A* genera proteínas de diferencias no mayores a 55 aminoácidos (NCBI, GenBank, 2022), por lo tanto, la diferencia entre las tres isoformas de la PDE5 radica en la secuencia del extremo N-terminal que forma parte del segmento de fosforilación (Wang y cols., 2010; Lin, 2004), no

obstante, ya que las tres comparten exactamente el mismo dominio catalítico, no se han reportado diferencias funcionales (Lee y Kass, 2012; Andersson, 2018; Ahmed y cols., 2021). Las isoformas PDE5A1 y PDE5A2 se pueden expresar ampliamente en distintos tejidos, a diferencia de la PDE5A3 que se ha reportado principalmente en el músculo liso vascular (Ahmed y cols., 2021), aunque existen tejidos como el cardiaco donde se han reportado las tres isoformas (Lin, 2004).

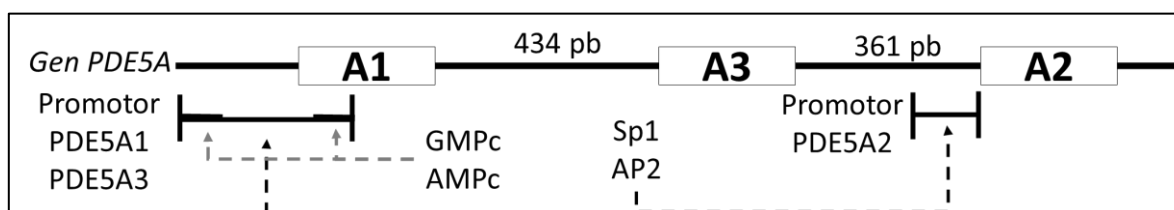


Figura 4. Porción río arriba del gen PDE5A. Se representan los exones que que codifican para parte del extremo amino de cada una de las tres isoformas de la PDE5 (A1-A3), se señala la posición de los promotores y sus respectivos sitios de unión a factores de transcripción (Sp1 y AP2), así como los potenciadores sensibles a nucleótidos cíclicos (GMPc y AMPc). (Modificada de Lin y cols., 2002).

1.2.5.3.2. Cambios en la regulación de la fosfodiesterasa tipo 5 durante la diabetes en el sistema cardiovascular

A pesar de que aún podría existir controversia sobre la expresión de la PDE5 en el sistema cardiovascular, actualmente la mayoría de las evidencias demuestran que la PDE5 se expresa tanto en el tejido vascular como en el corazón (Lin, 2004; Das y cols., 2015; NCBI, Structure Summary MMDB, 2022; Uniprot, 2022). Aún se desconoce mucho acerca de la función fisiológica de la PDE5 en estos tejidos, sin embargo, se ha descrito que la desregulación de esta PDE durante la diabetes se asocia con peores condiciones patológicas (Ribaud y cols., 2016).

Existen pocos estudios que vinculan a la diabetes con los cambios en la regulación de la PDE5. A pesar de ello, los reportes existentes describen que la diabetes ejerce diversos efectos adversos sobre el lecho vascular, y aquellos que son de naturaleza asociada a la PDE5 son los que involucran el aumento de citocinas inflamatorias

circulantes, daño tisular, inflamación, DE y la desregulación de mediadores angiogénicos (Venneri y cols., 2019). También se sabe que los pacientes diabéticos cursan con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares debido a la disminución de la biodisponibilidad del NO (Koka y cols., 2013). En este sentido, durante la diabetes se ha descrito que ocurre vasculopatía y DE mediada por la disminución del NO, evidencias que fueron asociadas con la PDE5 (Das y cols., 2015).

Respecto al miocardio, los corazones diabéticos son muy vulnerables a lesiones por isquemia-reperfusión, por lo que durante la diabetes el peor grado de infarto se asoció con el aumento de la actividad de la PDE5 (Das y cols., 2015). Además, se sugiere que la desregulación de la PDE5 durante la diabetes está involucrada en la progresión de la cardiomiopatía y la presencia de desórdenes inflamatorios mediados principalmente por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (IL) 1 β y 10 (Ribaudó y cols., 2016). Ya que se ha descrito que gran parte de la regulación celular y bioenergética de los cardiomiocitos se modula por la vía NO-GMPc, se considera que la desregulación de la PDE5 altera cascadas de fosforilación como Akt y AMPK durante la diabetes (Das y cols., 2015). Además, la sobreexposición del cardiomiocito a hiperglucemia provoca un intenso aumento del estrés oxidativo mediado principalmente por la lipoperoxidación, la oxidación del glutatión y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (Shah y Brownlee, 2016), efectos que también fueron asociados con la desregulación de la PDE5 (Das y cols., 2015).

1.2.5.3.3. Cambios en la regulación de la fosfodiesterasa tipo 5 durante la hipertensión pulmonar en el sistema cardiovascular

La PDE5 se expresa ampliamente en el tejido vascular pulmonar (Kayik y cols., 2017; Andersson, 2018) y es un regulador crítico del tono vascular. Se ha reportado que durante la enfermedad vascular pulmonar aumenta la expresión de la PDE5 (Di Salvo, 2012), aumentando el metabolismo del GMPc y provocando disminución de la capacidad relajante dependiente de NO endotelial. La sobreexpresión de la PDE5

en el lecho vascular pulmonar durante la HP se puede asociar con el aumento de la hidrólisis del GMPc y las alteraciones en la vía de señalización del NO que además explica la disminución de la capacidad relajante dependiente del endotelio (Hemnes y Champion, 2006). Además, la sobreexpresión de la PDE5 en la vasculatura pulmonar durante la HP está relacionada con la proliferación vascular pulmonar (Andersson, 2018) y conduce a disfunción vascular, hipertrofia de la capa íntima y aumento del tono contráctil vascular pulmonar (Hemnes y Champion, 2006).

En el terreno cardiaco, se ha demostrado que la PDE5 se sobreexpresa en los cardiomiocitos ventriculares durante enfermedades cardiacas (Andersson, 2018). En corazones expuestos a sobrecarga, se ha detectado el aumento en la expresión de la PDE5 y se asoció con un aumento del catabolismo del GMPc (Das y cols., 2015). En el caso específico de las alteraciones cardiacas ocasionadas por la HP, el aumento de la resistencia vascular pulmonar provoca el desarrollo de HVD, proceso en el que también se ha reportado que aumenta la expresión de la PDE5 como su ARNm (Nagendran y cols., 2007; Korkmaz-Icöz y cols., 2018). En los trabajos revisados bibliográficamente, no se ha descrito que aumente la capacidad catalítica de la PDE5 durante la HP, por lo tanto, es el aumento de la expresión de la enzima la propuesta del mecanismo que modifica la concentración de GMPc, la capacidad contráctil del VD y el origen de la disminución de la poscarga del VD (Sharma y cols., 2019). El GMPc es el encargado de la regulación contráctil del cardiomiocito, por lo que la sobreexpresión de PDE5 representa su disminución y el aumento del efecto inotrópico del VD (Nagendran y cols., 2007). El desarrollo de HVD y presencia de insuficiencia cardiaca derecha es muy común durante la HP. Por lo tanto, durante la HVD secundaria a HP también se ha reportado que aumenta la expresión de la PDE5 (Di Salvo, 2012) y repercute directamente sobre la función cardiaca, explicando la aparición de rigidez ventricular e insuficiencia cardiaca durante la HP (Tian y cols., 2018; Rajagopal y Yu, 2022).

1.3. Efectos del sildenafil en el terreno cardiopulmonar

1.3.1. Efecto del sildenafil sobre la circulación pulmonar

El NO vascular es producido en las células endoteliales por la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y difunde hacia las células músculo liso vasculares donde activa a la guanilato ciclasa soluble (GCs) que convierte al guanosín trifosfato (GTP) en GMPc, el cual por diversos mecanismos como la regulación positiva de los canales de potasio e inhibición de los canales de calcio (Bhogal y cols., 2019), provoca la reducción intracelular del calcio y favorece la relajación vascular (Carvajal y cols., 2000) (Figura 5-A). Esta vía de señalización es regulada por factores como la PDE5 y su inhibición ha resultado una buena herramienta terapéutica que favorece la vía de señalización del NO y su correspondiente modulación vascular (Bhogal y cols., 2019). El sildenafil al ser un inhibidor selectivo de la PDE5 (Wallis, 1999; Nagendran y cols., 2007) aumenta el efecto vasodilatador del NO (Bhogal y cols., 2019) ya que permite la conservación y aumento de los niveles de GMPc en las células del músculo liso vascular (Figura 5-B). Ya que la PDE5 se encuentra ampliamente distribuida en la vasculatura pulmonar (Kelly y cols., 2017), el sildenafil se presenta como una estrategia farmacológica que mejora el estado funcional vascular pulmonar y alarga el tiempo de empeoramiento clínico, lo que representa una herramienta útil en el tratamiento de la HP, que además de ser una enfermedad debilitante se caracteriza por presentar aumento de la resistencia vascular pulmonar (Bhogal y cols., 2019).

Algunos efectos beneficiosos del sildenafil sobre la vasculatura pulmonar durante la HP son la reducción de la hiperrespuesta a diversos agonistas contráctiles, aumento de la vasodilatación y mejora el estatus oxidativo (Fang y cols., 2007), quizá por el aumento de las concentraciones de GMPc como efecto de la inhibición de la PDE5 y restauración de la función vasomoduladora del NO. También se ha descrito que el tratamiento con sildenafil logra reducir la resistencia arterial pulmonar, mejora del gasto cardíaco, la capacidad de ejercicio y la supervivencia de los pacientes con HP (Kelly y cols., 2017). Debido a que el sildenafil induce estos efectos beneficiosos en la circulación pulmonar, es que es considerado como un

modulador de la vía NO-GMPc, y es clínicamente aprobado para el tratamiento de la HP (Galié y cols., 2016). Además, el sildenafil mejora la capacidad de ejercicio y los parámetros hemodinámicos en pacientes con HP sintomática (Simmoneau y cols., 2019).

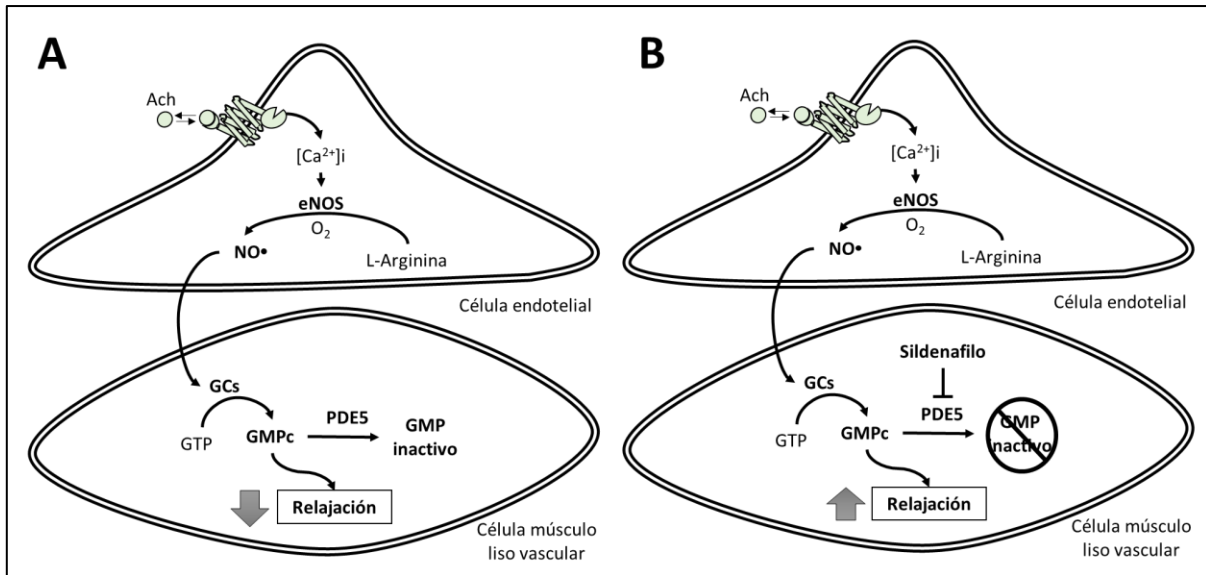


Figura 5. Regulación de la relajación vascular pulmonar. **A.** La fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5) inactiva al GMPc producido por la guanilato ciclasa soluble (GCs) y disminuye la capacidad de relajación vascular pulmonar. **B.** El sildenafil inhibe a la PDE5 y favorece que se mantengan los niveles de GMPc para producir relajación vascular pulmonar. (Modificada de García-González y cols., 2021).

1.3.2. Efecto del sildenafil sobre el corazón

Diversas evidencias experimentales apuntan a que la estimulación del eje GMPc-PKG, mejora la función contráctil en insuficiencia cardiaca, favorece la reversión de la hipertrofia cardiaca, protege del daño isquémico y reduce el tamaño de infarto, suprime arritmias inducidas por isquemia y aumenta la supervivencia celular (Kukreja y cols, 2012; Korkmaz-Icöz y cols, 2018; Hutchings y cols 2018). Uno de los mecanismos más importantes para lograr la potenciación de la vía de señalización es a través del incremento del GMPc citosólico por la administración de iPDE5 como el sildenafil (Wilkins y cols, 2008). Existen muchas evidencias clínicas y experimentales que correlacionan de manera directa la sobreexpresión de

la PDE5 con el grado de daño cardíaco y su inhibición con la prevención de los cambios morfo-funcionales, es decir que la PDE5 es expresada en músculo cardíaco y es sobrerregulada en hipertrofia cardíaca, infarto, insuficiencia cardíaca, y en miocardiopatía diabética, por lo que se ha dirigido la atención de múltiples investigaciones hacia los efectos directos del sildenafil sobre el miocardio.

1.3.2.1. Acciones sobre el ventrículo izquierdo

El desarrollo de cardiopatías del VI son quizá las más reportadas en el ámbito clínico y su origen puede ser multifactorial. El sildenafil ha demostrado ser efectivo para aliviar diversas cardiopatías, donde se ha demostrado es bien tolerado y seguro para aliviar la sobrecarga mecánica (Ravichandran y cols., 2018). En pacientes que presentaban miocardiopatía con características tempranas como la hipertrofia concéntrica del VI asociada con la dinámica alterada de la contracción miocárdica, se observó que la inhibición crónica de la PDE5 con sildenafil, tuvo un efecto antirremodelado, lo que resultó en una mejor cinética cardíaca y marcadores circulantes, así como en la disminución de los cambios en la geometría, mejorando la relación entre masa y volumen cardíaco. Dicho efecto es independiente de cualquier otro efecto vasodilatador o endotelial y aparentemente se ejerce a través de una acción intramiocárdica directa (Giannetta y cols., 2012).

1.3.2.2. Acciones sobre el ventrículo derecho

Se han descrito múltiples efectos beneficiosos del sildenafil sobre la función del VD en pacientes con HP (Borgdorff y cols., 2012; Fernandes y cols., 2015). Dichos efectos se fundamentan en la activación del eje GMPc-PKG (Korkmaz-Icöz y cols, 2018; Hutchings y cols 2018). Al inhibir a la PDE5, el sildenafil aumenta los niveles de GMPc, por lo que desarrolla efectos inotrópicos positivos, lo que explica en parte la capacidad del sildenafil para aumentar el gasto cardíaco durante la HP (Archer y Michelakis, 2009). Varios estudios agudos y crónicos en pacientes con fracción de eyección del VD reducida muestran que el sildenafil mejora la capacidad de

ejercicio y la calidad de vida en pacientes con HP e insuficiencia cardíaca sistólica (Guazzi y cols., 2018). En modelos animales de HP, el sildenafil provocó la reducción de la hipertrofia y la restauración de la función del VD (Bae y cols., 2016; Yoshiyuki y cols., 2016). También se describió que en un modelo experimental de HVD el sildenafil disminuyó la disfunción diastólica del VD con una reducción de la fibrosis ventricular (Borgdorff y cols., 2014).

1.3.2.2.1. Cambios morfológicos y funcionales

La HP deriva en insuficiencia cardíaca derecha (Bhogal y cols., 2019). En este sentido, la capacidad funcional del VD es considerada como un parámetro de pronóstico de la HP. Cuando se presenta HP, el VD se somete a cambios hemodinámicos que derivan en la aparición progresiva de adaptación, disfunción y falla cardíaca (Borgdorff y cols., 2014). Se sabe que la HP implica el aumento de la presión auricular derecha y un flujo sanguíneo pobre en la arteria pulmonar (Borgdorff y cols., 2014), pero aún se desconoce gran parte de los mecanismos hemodinámicos implicados en el proceso de disfunción y desacople del VD (Corrado y cols., 2021). En pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada y fracción de eyección reducida (no asociado con HP), el sildenafil es empleado para la reducción de dichos efectos (Monzo y cols., 2019).

Con respecto a los cambios del VD durante la HP, el sildenafil ha sido empleado para mejorar la función cardíaca (Corrado y cols., 2021), ya que se ha descrito que conserva y mejora la función diastólica del VD. Repetidamente se ha demostrado que el sildenafil es útil para prevenir los cambios en la fracción de eyección, evitar la contracción anormal prematura (Rai y cols., 2018), reducir tanto el volumen como la presión sistólica y diastólica final del VD (Borgdorff y cols., 2014), atenuar la dilatación ventricular y mejorar la tolerancia al ejercicio (Borgdorff y cols., 2012) durante la HP. Además, el sildenafil presenta efectos beneficiosos con respecto al índice cardíaco, frecuencia cardíaca, volumen sistólico, volumen telediastólico, fracción de flujo directo y fracción de eyección del VD, lo que representa una mejora hemodinámica completa (Corrado y cols., 2021). También, los efectos beneficiosos

del sildenafil incluyen la reducción de la presión auricular derecha y aumento del gasto cardíaco derecho, además de aumentar la fracción de eyección sin generar cambios en la contractilidad del VD, evidencias que se asociaron con la mejoría del acoplamiento de la arteria pulmonar con el VD y la disminución de la carga ventricular, lo que explica la mejora de la distensibilidad diastólica ventricular y disminución de la constricción pericárdica (Monzo y cols., 2019). Estos resultados refuerzan el efecto protector del sildenafil durante la insuficiencia del VD por HP.

1.3.2.2. Cambios histológicos

Algunos de los efectos adversos del VD más importantes durante la HP son la remodelación cardíaca adversa que implica la hipertrofia y fibrosis. Se ha descrito que los cambios más comunes en la composición del tejido ventricular derecho implican la activación de la vía TGF- β . Esta es una vía de señalización que induce fibrosis y deposición de colágeno en los corazones con sobrecarga y en cardiomiocitos por activación de proteínas intracelulares Smad (Rai y cols., 2018).

Es lógico pensar que los efectos beneficiosos del sildenafil se puede explicar por la acción de reducir la poscarga del VD a consecuencia de la reducción de la presión arterial pulmonar (Borgdorff y cols., 2014), sin embargo, se han descrito efectos beneficiosos directos del sildenafil sobre el VD sobrecargado (Borgdorff y cols., 2012). En cardiomiocitos con sobre estimulación de la vía TGF- β , el tratamiento con sildenafil ha demostrado ser eficaz en la prevención de la fibrosis y en la reducción de síntesis de colágeno, a través de la disminución de la fosforilación de las proteínas Smas2/3 y la correspondiente inhibición de los factores de transcripción sobre los que ellas inciden (Rai y cols., 2018). El tratamiento con sildenafil también logró reducir la fibrosis ventricular sin modificar la elastancia telediastólica ni la actividad de PKG, por lo que el tratamiento con este iPDE5 atenúa la fibrosis intersticial independiente de la poscarga (Borgdorff y cols., 2014). Otra serie de beneficios del sildenafil están mediados por la inhibición de la PDE5 y el consecuente aumento de GMPc (Aljanabi y cols., 2020), que se ha asociado con la disminución de la rigidez ventricular durante la HVD en la HP, ya que se sabe que

la rigidez diastólica está mediada por la rigidez del sarcómero y la presencia de fibrosis en el VD (Rai y cols., 2018). Con estas evidencias podemos asegurar que el sildenafil presenta un alto valor antirremodelante durante la HP.

La presencia de sobrecarga y aumento del volumen ventricular, son procesos que dan origen a hipotrofia cardiaca (Aljanabi y cols., 2020). En algunos trabajos se ha reportado que el tratamiento con sildenafil no presenta ningún efecto sobre la HVD durante la HP (Borgdorff y cols., 2014; Rai y cols., 2018). Este resultado podría ser controversial, ya que otros grupos de investigación reportan que el sildenafil si presenta un efecto beneficioso sobre el tamaño del cardiomiocito (Kiso y cols., 2013; Aljanabi y cols., 2020; Escudero y cols., 2021). Estos reportes demuestran que el sildenafil además de tener incidencia sobre la HVD, presenta una mejora en la presión del VD y mejora la eficiencia de contracción durante la hipertrofia (Aljanabi y cols., 2020). Uno de los mecanismos propuestos que explican la reducción de la HVD por parte del sildenafil, está basado en la reducción de la fosforilación (que evita la hiperactividad) del intercambiador cardiaco sodio-hidrógeno, el cual resulta fundamental para regular el volumen y el funcionamiento celular (Escudero y cols., 2021). Se considera que dicha fosforilación implica cambios en la actividad de la vía de señalización PKG-MAP cinasas (Escudero y cols., 2021), la cual podría también interferir en la vía de regulación de colágeno y presencia de fibrosis por la actividad de la vía TGF- β (Rai y cols., 2018). Otro mecanismo propuesto por el cual el sildenafil evita la HVD consiste en la inhibición de la actividad y expresión de los canales canónicos de potencial receptor transitorio, los cuales contienen alta permeabilidad al ion calcio (Ca^{2+}) y se sobre regulan durante la HVD (Kiso y cols., 2013).

1.4. Hipertensión pulmonar como una complicación de la diabetes

A principio del siglo XXI se aportaron las primeras evidencias sobre la correlación entre diabetes y la HP. En los primeros hallazgos clínicos se reportó que la diabetes es un fuerte factor de riesgo para desarrollar falla cardiaca, enfermedad coronaria, hipertensión (Kosmala y cols., 2004) y disfunción sistólica y diastólica del VD

(Kosmala y cols., 2007), sin embargo, estas evidencias no fueron asociadas a la HP. Cronológicamente, una serie de evidencias clínicas indican una fuerte relación entre la diabetes tipo 2 (resistencia a la insulina y dislipidemia) y la presencia de HP, comparado con la población sin diabetes (Movahed y cols., 2005; Pugh y cols., 2011; Abernethy y cols., 2015; Takahashi y cols., 2018; Khaing y cols., 2019). En este sentido se considera que los pacientes diabéticos tienen hasta el 24% de probabilidad de desarrollar HP frente al 10% de probabilidad de los sujetos no diabéticos (Lang y cols., 2013).

La prueba de la caminata de los seis minutos es una prueba clínica de esfuerzo que se emplea para el diagnóstico y pronóstico de la HP. Se han reportado peores resultados de esta prueba para los pacientes diabéticos que cursan con HP respecto a los pacientes solamente hipertensos pulmonares (Mclaughlin y cols., 2015). También en pacientes diabéticos con HP se hallaron alteraciones hemodinámicas como el aumento en la presión de la aurícula derecha y de la presión media de enclavamiento capilar pulmonar respecto a pacientes sin diabetes (Khateeb y cols., 2019). Bajo estas condiciones, también se ha observado que el volumen sistólico del VD se reduce, por lo que el pronóstico de supervivencia de los pacientes diabéticos con HP es menor que el de los pacientes sin diabetes (Khateeb y cols., 2019). Otro hallazgo clínico es que los pacientes hipertensos pulmonares presentan intolerancia a la glucosa (Pugh y cols., 2011), evidenciando que los desórdenes en el metabolismo de la glucosa se correlacionan con la HP.

Actualmente, es aceptado que existe una correlación clínica entre la diabetes e HP (Takahashi y cols., 2018; Khateeb y cols., 2019; Kayano y cols., 2020). Se sabe que la diabetes es un factor independiente para el desarrollo de HP (Takahashi y cols., 2018) y es considerada como un factor de mal pronóstico en pacientes con enfermedades respiratorias, ya que en comorbilidad con la HP puede provocar disfunción del VD y afectar negativamente la supervivencia (Khateeb y cols., 2019). Es decir, la diabetes es un predictor de morbilidad y mortalidad durante la HP (Kayano y cols., 2020; Trammell y cols., 2020), asociado principalmente con el desarrollo de miocardiopatía hipertrófica (Kayano y cols., 2020).

A la fecha, las evidencias clínicas que correlacionan a la diabetes con la HP se han realizado en pacientes con la diabetes tipo 2 (Trammell y cols., 2020), pero no se ha descartado, ni afirmado que exista una vinculación de la diabetes tipo 1 con la HP. Actualmente hay varios estudios en modelos animales con diabetes tipo 1 y tipo 2 encaminados a describir el mecanismo fisiopatológico que vincula a la Diabetes con la HP (López-López y cols., 2008; López-López y cols., 2011; Moral-Sanz y cols., 2011; Moral-Sanz y cols., 2012; Morales-Cano y cols., 2019; López-López y cols., 2021).

Entre las primeras evidencias experimentales, se puede mencionar a la descripción del daño cardíaco derecho durante la diabetes (Al-Shafei y cols., 2002), pero no se asoció con la HP. Pero posteriormente, en la diabetes inducida por estreptozotocina (tipo 1), se reportó la “clásica” reducción de los niveles del BMPRII (Moral-Sanz y cols., 2012; Khaing y cols., 2019) que presentan los modelos animales de HP no diabéticos, así como el incremento en la presión arterial pulmonar (> 20 mm Hg) e HVD. Estos resultados fueron recientemente replicados en un estudio de seguimiento ecocardiográfico de ratas diabéticas tipo 1, las cuales también presentaron sobrecarga del VD, disfunción ventricular sistólica y diastólica y alto riesgo de falla cardíaca (López-López y cols., 2021). Por otra parte, en modelos animales de diabetes tipo 2, se ha reportado que la hiperglucemia y el resto de los desórdenes metabólicos provocan HP. Estos animales presentaron una disminución del BMPRII, incremento del estatus oxidativo, disminución de la FC, insuficiencia cardíaca con fracción de eyección conservada y desarrollo de HVD (Irwin y cols., 2014; Meng y cols., 2017; Pan y cols., 2017; Sui y cols., 2018; Morales-Cano y cols., 2019).

2. ANTECEDENTES

Los hallazgos clínicos y experimentales demuestran una correlación entre la diabetes y la HP. A pesar de esto, a la fecha los mecanismos que vinculan a estas dos enfermedades son en gran medida desconocidos, aunque ya existe una serie de evidencias que presentan una descripción de los procesos que ocurren en el territorio cardiopulmonar durante la HP secundarios a la diabetes. El descubrimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la HP de pacientes con diabetes es de gran importancia, debido a la búsqueda de dianas con interés farmacológico y por lo tanto terapéutico.

2.1. Modelos animales de hipertensión pulmonar secundaria a la diabetes

Los modelos animales que se emplea en la búsqueda de los mecanismos que vinculan a la diabetes con la HP, son modelos de diabetes experimental tipo 1 y tipo 2. El modelo animal de rata diabética tipo 1 inducido por estreptozotocina, tiene su origen en la destrucción de las células β -pancreáticas, proceso que es mediado por la citotoxicidad selectiva de la estreptozotocina a través de los transportadores de glucosa tipo 2 (GLUT-2), dando paso a la alquilación del ADN y a la apoptosis de las células β -pancreáticas (Lenzen, 2007; García-González y cols., 2022). Por lo tanto, este es un modelo que provoca la deficiencia de insulina y de manera secundaria hiperglucemia, estrés oxidativo, lipoperoxidación y pérdida de peso corporal (Alsalahi y cols., 2018; Dhaliwal y cols., 2020), como principales parámetros. En el modelo de diabetes tipo 1, empleando ratas de la cepa Sprague Dawley (SD), en todos los estudios de nuestro grupo de investigación se ha hallado HP e HVD (López-López y cols., 2008; López-López y cols., 2011; López-López y cols., 2021; García-González y cols., 2022), por otra parte, al desarrollar el modelo en ratas Wistar-Kyoto (WK) el aumento de la presión pulmonar y la remodelación del VD tuvo que ser inducido con la presencia de hipoxia (Moral-Sanz y cols., 2012). Una de las mayores desventajas de este modelo de diabetes tipo 1, es que no cursa con el cuadro de complicaciones clínico-metabólicas (síndrome metabólico y

resistencia a la insulina) característico de diabetes tipo 2, que es el tipo de diabetes más frecuente en la población. En este sentido se han hecho esfuerzos por identificar un modelo de diabetes tipo 2 que desarrolle HP. Los animales empleados en el estudio de la diabetes tipo 2 son ratas Zucker obesas que presentan hiperglucemia (Moral-Sanz y cols., 2011; Morales-Cano y cols., 2019). Este es un modelo con obesidad genética que causa mutaciones en el receptor de leptina, hiperfagia, alteración lipídica e hiperinsulinemia características semejantes a las desarrolladas durante el síndrome metabólico y resistencia a la insulina (Aleixandre y Miguel, 2008). La desventaja de este modelo animal es que solo desarrolla una ligera intolerancia a la glucosa y no presenta aumento de las lipoproteínas de baja densidad, además de que no se considera como un modelo de hipertensión arterial sistémica (Aleixandre y Miguel, 2008). Quizá por estas razones es que los resultados en este modelo son controversiales, ya que bajo las mismas condiciones en un primer momento no se reportó aumento de la presión arterial pulmonar ni remodelación del VD (Moral-Sanz y cols., 2011), aunque otros trabajos sí reportan tanto HP como HVD (Irwin y cols., 2014; Morales-Cano y cols., 2019).

2.2. Mecanismo inducido por diabetes que da origen a la hipertensión pulmonar

Los datos que permiten proponer el posible mecanismo de correlación entre diabetes e HP han sido obtenidos utilizando ambos modelos de ratas diabéticas tipo 1 y tipo 2. En el modelo de rata diabética tipo 1 inducida por estreptozotocina sometido a hipoxia, se describió que en el aumento de la presión arterial pulmonar participa en gran medida la reducción en la expresión del BMPRII pulmonar, ya que puede provocar el desequilibrio de procesos proliferativos y la muscularización de las arterias pulmonares, además se reportó que este proceso se acompaña de la reducción de las corrientes de potasio asociado a la reducción en la expresión de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) (Moral-Sanz y cols., 2012). En ratas SD diabéticas tipo 1 sin exposición a hipoxia, se describió que las arterias pulmonares presentaron DE caracterizada por la disminución de la biodisponibilidad

del NO, sin presentar cambios en su vía de señalización y en la expresión de la eNOS (López-López y cols., 2001; López-López y cols., 2008). La disminución de la capacidad relajante dependiente del endotelio vascular pulmonar se atribuyó al aumento de los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) provenientes de la sobreexpresión de algunas subunidades de la NAPH oxidasa y que derivan en la disminución de la biodisponibilidad del NO con la formación de peroxinitrito (López-López y cols., 2008; Pérez-Vizcaíno y cols., 2010; García-González y cols., 2021) (Figura 6). La serotonina (5-HT) también participa en el desarrollo de la HP, ya que en las arterias pulmonares de las ratas diabéticas induce una hiperrespuesta contráctil (López-López y cols., 2011), proliferación de las células del músculo liso vascular y bloqueo de los Kv (Pérez-Vizcaíno y cols., 2010). También se ha descrito que en ratas WK diabéticas tipo 1 sin hipoxia, los eventos que preceden a la HP son la inflamación predominada por macrófagos y la DE, quizá también dependiente de la disminución la biodisponibilidad del NO secundario al aumento del superóxido, aunque no se pueden descartar posibles alteraciones en la expresión de la eNOS (evidencia no reportada) (Moral-Sanz y cols., 2012).

Empleando ratas Zucker hiperglucémicas se ha logrado describir que durante la HP se presenta la disminución del ARNm del BMPRII, lo que puede explicar el aumento del grosor de la pared arterial pulmonar y neomuscularización de las arteriolas distales del árbol pulmonar (Morales-Cano y cols., 2019). Algo importante de este modelo de diabetes tipo 2, es que sus arterias pulmonares no presentan DE, pues no se halló una reducción significativa de la capacidad relajante inducida por acetilcolina (Ach), ni alteraciones en la respuesta a los vasoconstrictores fenilefrina y 5-HT (Morales-Cano y cols., 2019). Sorpresivamente tampoco se encontraron elevados los niveles de citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α y a pesar de encontrar una tendencia, tampoco se halló una disminución significativa de los genes que codifican para distintos Kv que regulan el tono vascular pulmonar (Morales-Cano y cols., 2019). Es decir que, en este modelo animal de diabetes tipo 2, el origen de la HP no es clara, ya que no está asociada con la regulación del tono vascular, por lo que puede ser promovida por alteraciones celulares como la disminución del BMPRII y otros desordenes metabólicos secundarios a la

hiperglucemia. Este conjunto de evidencias recopiladas de los modelos animales con diabetes tipo 1 y tipo 2, representan el posible mecanismo que explica el origen de la HP secundaria a la diabetes.

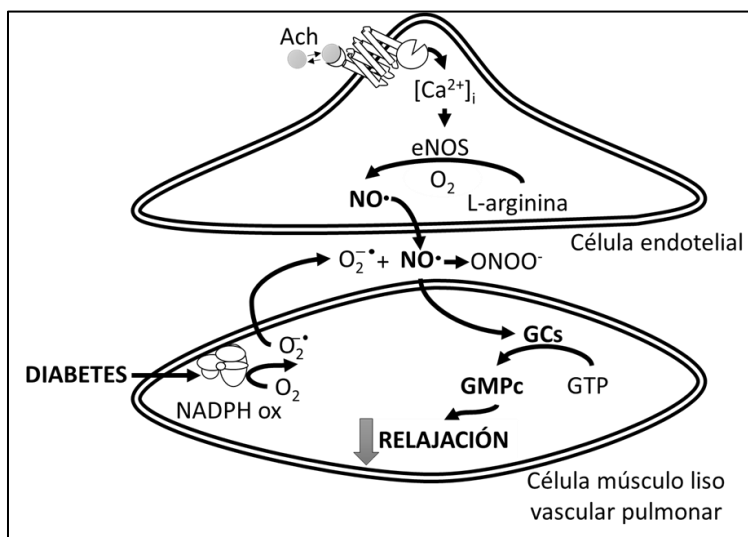


Figura 6. Disfunción endotelial de las arterias pulmonares durante la diabetes. Cuando el óxido nítrico (NO) producido por la célula endotelial difunde hacia la célula músculo liso vascular pulmonar reacciona con el superóxido ($O_2^{\cdot-}$) producido principalmente por la enzima NADPH oxidasa (inducida por la diabetes) y forma peroxinitrito ($ONOO^-$) impidiendo la relajación vascular pulmonar. (Modificada de García-González y cols., 2021).

2.3. Efecto del sildenafil sobre los cambios cardiopulmonares durante la hipertensión pulmonar diabética

Las ratas diabéticas que desarrollan HP también presentan HVD. El terreno cardiaco secundario a la comorbilidad diabetes-HP ha sido muy poco explorado, y las pocas evidencias que asocian a la HP diabética con HVD se limitan a una descripción de insuficiencia cardiaca derecha con sobre carga y con presencia de HVD, evaluada a las 12 semanas de progresión del modelo por la disminución de la fracción de eyección del VD y el aumento del grosor de la pared ventricular (López-López y cols., 2021), resultando que coincide con lo reportado a las 8 semanas, donde también se encontró aumento de la masa del VD (García-González y cols., 2022). La única evidencia que nos aporta un punto de referencia en la búsqueda de

un mecanismo por el cual se desarrolla HVD durante HP diabética, es el aumento de la expresión de la PDE5 en corazón completo (García-González y cols., 2022). Sabemos que gran parte de la regulación mecánica y celular de los cardiomiocitos es dependiente de GMPc, por lo que la sobreexpresión de la PDE5 puede tener un fuerte impacto sobre la regulación cardíaca.

En el territorio vascular pulmonar nuestro grupo de investigación ha descrito que el tratamiento crónico con una dosis de 20 mg/Kg sildenafil por ocho semanas evita el desarrollo de HP durante la diabetes (García-González, tesis de maestría, 2017; García-González y cols., 2022). Este efecto no se debe a que el sildenafil modifique el metabolismo de la glucosa ni la capacidad de ganancia de peso de las ratas diabéticas, pues no se hallaron cambios en la concentración glucosa sanguínea o peso corporal respecto a las ratas diabéticas sin tratamiento con sildenafil. Dicho efecto beneficioso puede deberse a que el sildenafil evita la DE, al normalizar la capacidad relajante dependiente del endotelio vascular pulmonar inducido por Ach y al evitar la hiperrespuesta contráctil a la 5-HT (García-González, tesis de maestría, 2017; García-González y cols., 2022). Este mecanismo podría generar estos efectos a través de la modulación de la vía de señalización del NO. Se desconoce el efecto del sildenafil sobre el estatus oxidativo durante la HP diabética, por lo que quizá el sildenafil no aumenta la biodisponibilidad del NO en la vasculatura pulmonar, sin embargo, de acuerdo con su mecanismo canónico, al inhibir a la PDE5 evitaría la degradación de GMPc, manteniendo su concentración intracelular, lo que permitiría la regulación intracelular del calcio y la vasodilatación. Hasta el momento estas son las únicas evidencias sobre el posible mecanismo protector del sildenafil sobre la regulación del tono vascular pulmonar durante la diabetes por un probable aumento de la actividad de la vía NO-GMPc.

Respecto a los beneficios que ejerce el sildenafil en el corazón, existe una gran cantidad de reportes bibliográficos que resaltan este hecho, sin embargo, respecto al efecto que ejerce sobre el miocardio durante la HP secundaria a la diabetes solo existen las evidencias recientemente publicadas por nuestro grupo de investigación. En dicho trabajo se evidenció que la administración por 8 semanas de 20 mg/Kg de

sildenafil evita el desarrollo de HVD y reduce la expresión de la PDE5 en el corazón de ratas diabéticas (García-González y cols., 2022). Estos resultados supondrían que el sildenafil evita la remodelación del VD y que dicho efecto está asociado con la expresión de la PDE5 y por lo tanto con la concentración de GMPc. Con base en las evidencias bibliográficas disponibles, podemos creer que el mecanismo del sildenafil sobre los cambios cardiopulmonares durante la HP secundaria a la diabetes, podría ocurrir a través de la inhibición de la PDE5 y potenciar la vía NO-GMPc-PKG (Korkmaz-Icöz y cols., 2018; Hutchings y cols., 2018) en el VD, esto permitiría la regulación de vías de señalización y procesos celulares que impidan la remodelación del VD. No obstante, aún se desconocen los mecanismos sobre los cuales actúa el sildenafil tanto en el lecho vascular pulmonar, como en el tejido cardiaco, por lo que se debe continuar con el estudio del efecto del sildenafil sobre la HVD de ratas con HP inducida por diabetes tipo 1.

3. JUSTIFICACIÓN

Para la descripción de los cambios cardiopulmonares desarrollados durante la HP diabética, debido a la prevalencia mundial de la diabetes tipo 2, quizá sería más adecuado emplear un modelo de este tipo de diabetes, ya que resultaría más representativo. Sin embargo, dado que en las ratas Zucker obesas con hiperglucemia no se lograron replicar los signos de HP en cada uno de los reportes (efectos controvertidos), no existe certeza de que dicho modelo animal se puede considerar como un modelo de HP secundario a la diabetes y por lo tanto no sería adecuado evaluar los efectos farmacológicos del sildenafil en este modelo. A pesar de ello, tenemos claro que la incursión en este modelo debe ser un paso obligado en el futuro de nuestra investigación.

Considerando que la hiperglucemia sostenida es el factor que da origen a los cambios celulares y metabólicos que conducen al desarrollo de HP, el modelo de rata diabética tipo 1 es el modelo animal que cuenta con una mayor cantidad de reportes bibliográficos que nos permiten tener un panorama más claro de los mecanismos que participan en la comorbilidad diabetes-HP, ya que en este modelo animal se han realizado la mayor cantidad de hallazgos que además son precisos y reproducibles. Por lo tanto, en la presente tesis doctoral se decidió continuar bajo esta línea de investigación, empleando ratas diabéticas tipo 1.

En resultados previamente obtenidos en nuestro laboratorio, se dio un seguimiento de 8 semanas al modelo experimental, pero una desventaja es que en este periodo el modelo animal no desarrolla todas las características que definen a un modelo animal de HP, por lo que no resulta conveniente continuar evaluando con 8 semanas de progresión (García-González, tesis de maestría, 2017). Paralelamente los resultados previos fueron obtenidos con una administración diaria de sildenafil a una dosis de 20 mg/Kg de peso (García-González, tesis de maestría, 2017). Esta dosis de sildenafil es baja respecto a la mayoría de las dosis empleadas experimentalmente, a pesar de ello se reportó que logra evitar la DE, el aumento de presión pulmonar, la HVD y la sobreexpresión de la PDE5 en corazón durante la HP diabética; no obstante, esta dosis no logró evitar completamente el aumento de la

respuesta contráctil de las arterias pulmonares diabéticas a 5-HT, efecto que podría explicar por qué se presentó una tendencia a la alza de la presión arterial pulmonar (no significativa) durante la diabetes. Por lo tanto, es conveniente probar con dosis más elevadas.

Recientemente hemos descrito que las ratas diabéticas presentan aumento de la presión arterial pulmonar desde la semana 4, pero es hasta la semana 12 donde además de presentar HP y remodelación del VD, presentan insuficiencia cardiaca (López y López y cols., 2021), lo cual representa un cuadro clínico completo de la HP. Por esta razón el seguimiento del modelo animal en la presente tesis doctoral se realizó por un periodo de 12 semanas. Por otra parte, la administración clínica y experimental del sildenafil para el tratamiento de la HP se encuentra en un promedio de 60 mg/Kg (Ladha y cols., 2005; Jasińska-Stroschein y cols., 2013; Mahdavi y cols., 2016; Vizza y cols., 2017; Mulvaney y cols., 2020), la cual coincide con la recomendación de la guía de la práctica clínica del IMSS para el tratamiento de la HP en el adulto. Por lo tanto, en el desarrollo del protocolo experimental decidimos administrar la dosis de 60 mg/Kg. En este sentido, al modificar el tiempo de seguimiento experimental y la dosis de administración del sildenafil, debíamos caracterizar el grado de disfunción endotelial (capacidad relajante y contráctil) de las arterias pulmonares durante la diabetes y el grado de protección por parte del sildenafil. Además, era importante identificar el estado funcional de la vía de señalización del NO y el grado de actividad de la PDE5 en las arterias pulmonares, por lo que también realizamos curvas dosis respuesta a nitroprusiato de sodio (NPS) y a citrato de sildenafil (c-sild).

También hemos reportado que los corazones de las ratas diabéticas desarrollan HVD y que dicho efecto es prevenido con el tratamiento crónico con sildenafil (García-González y cols., 2022). Con la finalidad de una mejor caracterización de los cambios histológicos cardiacos de nuestro modelo experimental, en la presente tesis, empleando histología, nos propusimos evidenciar el probable cambio del tamaño del cardiomiocito y los cambios en la estructura de la matriz extracelular por

la presencia de colágeno, ya que dichos estudios pueden confirmar el diagnóstico de hipertrofia y de fibrosis ventricular, además de que aportaría información sobre el mecanismo por el cual se desarrolla la HVD durante la HP diabética, (como se ha descrito en otros modelos de HP no diabética), así como también el efecto que ejerce el sildenafil sobre dichos cambios histológicos.

Al contar con esta serie de evidencias y basándose en los reportes bibliográficos, se podría proponer con mayor certeza el mecanismo de remodelación del VD que involucre la actividad vascular de la PDE5, así como su repercusión en los cambios de presión pulmonar y su impacto en la remodelación del VD durante la HP secundaria a diabetes. Además, nos permite proponer si estos mecanismos están modulados por la acción del sildenafil.

4. HIPÓTESIS

La inhibición de la fosfodiesterasa tipo 5 con sildenafil protege al ventrículo derecho del desarrollo de hipertrofia, remodelación y rigidez, a través de la inhibición de la disfunción endotelial e HP secundaria a la diabetes tipo 1

5. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar el efecto de la inhibición de la fosfodiesterasa tipo 5 con sildenafil sobre la remodelación del ventrículo derecho de ratas con hipertensión arterial pulmonar secundaria a la diabetes tipo 1.

5.2. Específicos

- A. Evaluar el efecto del sildenafil sobre la presión arterial pulmonar de ratas diabéticas tipo 1
- B. Evaluar el efecto del sildenafil sobre la función endotelial de ratas diabéticas tipo 1
- C. Evaluar el efecto del sildenafil sobre la remodelación del ventrículo derecho de ratas con hipertensión pulmonar diabética.

6. METODOLOGÍA

6.1. Obtención y mantenimiento de animales

Ratas macho Sprague-Dawley de al menos 200 g de peso fueron provistas, criadas y cuidadas por el Bioterio Claude Bernard de la BUAP, bajo los lineamientos establecidos en la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio), y la Legislación Mexicana Relativa vigente (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2020). El proyecto fue aprobado por el comité para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la BUAP con clave 100003977-UALVIEP-19/2.

6.2. Formación de grupos experimentales

Un total de 64 de animales fueron divididos de forma aleatoria en 4 grupos: control (CTRL), control tratado con sildenafil (CTRL/SILD), diabético (DM) y diabético tratado con sildenafil (DM/SILD). Los grupos tuvieron un periodo de seguimiento de 12 semanas y al finalizar este periodo se realizaron los procedimientos experimentales correspondientes.

6.3. Inducción de diabetes y tratamiento con sildenafil

La inducción de la diabetes se realizó con una dosis única de estreptozotocina (50 mg/kg de peso) vía intraperitoneal (i.p.) en las ratas del grupo DM. La evaluación de la concentración de glucosa en sangre se realizó 48 horas posteriores a la inducción, con un glucómetro (ACCU-CHEK Active). Aquellos animales que alcanzaron una concentración ≥ 350 mg/dL se consideraron diabéticos y aquellos que no, fueron excluidos de sus grupos respectivos.

Los animales de los grupos DM/SILD y CTRL/SILD fueron sometidos al tratamiento diario con sildenafil a una dosis de 60 mg/kg de peso administrado vía oral. Este

procedimiento se realizó durante todo el periodo de seguimiento para los grupos correspondientes (Figura 7).

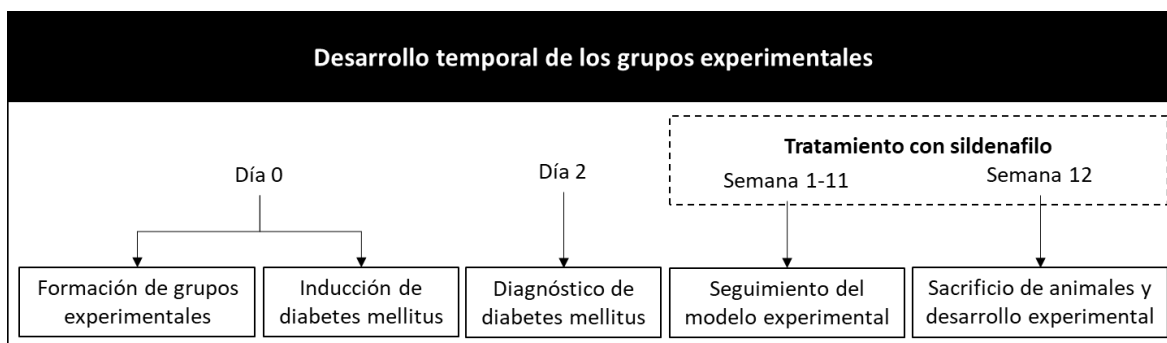


Figura 7. Descripción temporal de los grupos experimentales. Indica el tiempo donde se realizan las distintas maniobras experimentales.

6.4. Obtención de órganos

Se indujo una sedación profunda con una mezcla Ketamina-Xilacina (60 y 4 mg /Kg respectivamente) vía i.p. (con la finalidad de evitar la percepción, el dolor y el sufrimiento animal). Comprobada la sedación del animal, se colocó a la rata en posición decúbito dorsal, posteriormente se sujetó y se realizaron cortes (de tejido cutáneo, muscular y óseo) dorso-laterales del centro del abdomen en dirección a las extremidades superiores para crear un estado de tórax abierto y expuesto. A continuación, se extrajo todo el conjunto visceral que inmediatamente después se colocó para su limpieza en solución fisiológica precalentada a 37°C y burbujeada con carbógeno (mezcla de 95 % O₂ y 5% CO₂), posteriormente se disecaron los órganos (corazón y pulmón) y se colocaron en solución fisiológica (en las condiciones anteriormente mencionadas). En el caso del corazón se prosiguió con los distintos protocolos experimentales que se describen más adelante. En el caso del pulmón se extrajo la arteria pulmonar en toda su longitud y finalmente con ayuda de una regla en escala milimétrica se seccionó la en anillos de 3 mm de longitud.

6.5. Evaluación de la presión arterial pulmonar

Se empleó el cateterismo cardiaco derecho que se realizó de la siguiente manera: primero se sedó al con Ketamina-Xilacina (60 y 4 mg/Kg respectivamente), se rasuró el área lateral derecha del cuello de la rata y se cortaron los pliegues cutáneos que se encuentran sobre la arteria carótida hasta exponer la vena yugular externa derecha; se realizó un proceso de homeostasia mecánica y se realizó un en la vena y se introdujo el catéter (1 lumen de poliuretano de 3 fr x 10 cm), hasta alcanzar la arteria pulmonar. El catéter se mantuvo conectado a un transductor de presión (AD INSTRUMENTS MLT0380/A) acoplado a un amplificador (CIDES AMPLIFICADOR DCT001). La señal generada fue enviada y almacenada en una computadora con la ayuda del software LabChart 7.0.

6.6. Determinación del Índice de Fulton

Al corazón aislado y limpio se le retiraron las aurículas y grandes vasos sanguíneos. Después, se separó el ventrículo derecho del ventrículo izquierdo más septum realizando un corte sobre el borde del tejido papilar hasta que se logró la separación completa del tejido ventricular derecho, posteriormente, con ayuda de la toalla se eliminó el exceso de solución fisiológica y sangre; finalmente, se pesó (peso húmedo) en una balanza analítica de cuatro cifras decimales. El índice Fulton es el cociente del peso en gramos del ventrículo derecho sobre el ventrículo izquierdo más septum ($VD/VI+S$).

6.7. Evaluación histológica

Los corazones disecados se perfundieron con formalina al 10% (J.T.Baker; 2106-03) y posteriormente fueron seccionados en tres porciones (del mismo grosor) de manera transversal. Las secciones fueron sometidas a un tren de deshidratación con ayuda de un histoquinete tipo carrusel (Leica TP1020), posteriormente, fueron embebidas en paraplast (Leica Biosystems) y cortadas en un microtomo rotatorio (Leica RM2125 RTS) en láminas de 5 μ m de grosor. Los cortes se colocaron sobre

laminillas recubiertas con APES para mejorar la adherencia del tejido. Previo a las tinciones, las laminillas se colocaron dentro de una estufa a 60°C por un periodo de 1.5 horas para iniciar el proceso de desparafinación, posteriormente, se realizó una hidratación del tejido y se prosiguió con la tinción colorimétrica de hematoxilina y eosina para teñir los ribosomas y núcleo celular, así como y citoplasma y tejido conectivo (respectivamente) y la tinción colorimétrica de las fibras de colágeno con rojo sirio. El procedimiento completo se muestra en el apéndice A.

6.8. Evaluación de la función endotelial.

Anillos arteriales pulmonares fueron montados entre dos alambres de acero inoxidable en forma de L y sujetados dentro de copas de Ahllin con 5 mL de solución fisiológica Krebs-Henselleit (NaCl 118 mM, KCl 4.75 mM, NaHCO₃ 25 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.0 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM y C₆H₁₂O₆ 11 mM), las copas se mantuvieron a una temperatura constante de 37 °C y para mantener los requerimientos de oxígeno y pH se burbujearon con carbógeno a un flujo moderado. Cuando el registro se mantuvo estable (10 min sin cambios de tensión) se agregó a la copa 80 mM de cloruro de potasio (KCl), se esperó a obtener el efecto máximo estable contráctil y cuando el registro se mantuvo estable, se eliminó la solución con KCl aplicando tres lavados con solución Krebs-Henselleit, posteriormente se aplicó una concentración de 1X10⁻⁷ M de fenilefrina (Phe) y una vez alcanzado el efecto contráctil máximo estable, se construyó la curva concentración respuesta a Ach con concentraciones acumulativas de 1X10⁻⁹ hasta 3X10⁻⁵ M, al igual que curvas concentración respuesta acumulativas a NPS de 1X10⁻¹² hasta 3X10⁻⁵ M y curvas concentración respuesta a c-sild de 1X10⁻¹⁰ hasta 3X10⁻⁵ M.

Para la evaluación de la capacidad vasocontráctil de las arterias pulmonares se evaluó la viabilidad del tejido y se aplicó sobre la copa una concentración de 80 mM de KCl, se esperó el efecto máximo contráctil estable; se realizaron tres lavados con solución Krebs-Henselleit, hasta que el registro se mantuvo estable en la tensión basal y en ese momento se construyó la curva concentración respuesta a 5-HT con concentraciones acumulativas de 1X10⁻⁹ hasta 3X10⁻⁵ M.

En todos los casos, el registro de los cambios de tensión se obtuvo con un transductor (GRASS FT-03) acoplado a un amplificador (GRASS 7-DAJK) con el software LabChart 7.0.

6.9. Análisis de datos y estadística

6.9.1. Evaluación de la presión arterial pulmonar

Todos los animales del grupo DM presentaron valores de presión arterial pulmonar por arriba de 25 mm de Hg y fueron significativamente mayores a los valores de presión del grupo CTRL. Por lo tanto, valores de presión arterial pulmonar >25 mm de Hg fue considerado como hipertensión arterial pulmonar.

6.9.2. Determinación del índice Fulton

El aumento significativo de este índice respecto al grupo CTRL fue considerado como el indicador de la presencia de HVD.

6.9.3. Evaluación histológica

Empleando el software ImageJ, se midieron las estructuras histológicas cardiacas para identificar la presencia de remodelación ventricular derecha. El aumento significativo del tamaño celular identificado por la tinción de hematoxilina y eosina y la densidad de colágeno teñido con rojo sirio fueron los indicadores de remodelación, hipertrofia y fibrosis ventricular respectivamente.

6.9.4. Evaluación de la función endotelial.

Las curvas concentración-respuesta acumulativas para Ach y para 5-HT se ajustaron mediante el programa de análisis de datos Origin 8.5 con la siguiente ecuación logística: $E = E_{max} \frac{1}{1 + e^{-k*((fármaco)-pD_2)}}$. Los resultados son expresados en porcentaje como la media \pm el error estándar de la media para un

determinado número de anillos arteriales pulmonares (n) de los distintos animales. Se obtuvieron los componentes de la curva Efecto máximo (Emax) y logaritmo de la dosis efectiva 50 (pD₂).

7. RESULTADOS

7.1. Glucosa sanguínea y peso corporal del modelo experimental 48 horas posteriores a la administración de estreptozotocina

Encontramos que 48 horas posteriores a la administración de STZ, las ratas de los grupos DM y DM/SILD presentaron valores de glucosa sanguínea por arriba de los 400 mg/dL, mientras que las ratas de los grupos CTRL y CTRL/SILD no sobrepasaron el valor de 110 mg/dL. Además, a las 48 horas posteriores a la administración de la STZ, el peso corporal, no mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales (Tabla 2).

7.2. Efecto del sildenafil sobre la glucosa sanguínea y peso corporal de ratas con hipertensión pulmonar secundaria a la diabetes.

La figura 8 (A) muestra el curso temporal de los cambios en la glucemia de los cuatro grupos de ratas. Se observa que durante todo el periodo de estudio los grupos CTRL y CTRL/SILD mantienen el nivel de glucemia (~100 mg/dL), mientras que los grupos DM y DM/SILD presentan un incremento de glucemia (>400 mg/dL) a partir de las dos semanas y durante las 10 semanas restantes. El análisis estadístico, indica que a las dos semanas hay una diferencia significativa entre los valores de glucosa sanguínea de los grupos CTRL y el grupo DM, además, también existe una diferencia significativa entre el grupo CTRL/SILD y el grupo DM/SILD durante las 10 semanas restantes. La tabla 2 muestra que al final del periodo de estudio (12 semanas) el grupo CTRL y el CTRL/SILD no muestran diferencias significativas, mientras que los grupos DM y DM/SILD presentan una diferencia significativa con respecto a los grupos CTRL y CTRL/SILD respectivamente.

La figura 8 (B) muestra el curso temporal de los cambios de peso corporal de los cuatro grupos de ratas. Se observa que durante todo el periodo de estudio los grupos CTRL y CTRL/SILD tienen un incremento sostenido hasta la doceava semana. También se muestra que los grupos DM y DM/SILD presentan una pequeña ganancia de peso durante las primeras 6 semanas, pero en el periodo

restante hay una pérdida de peso. El análisis estadístico, indica que a partir de las cuatro semanas hay una diferencia significativa entre el grupo CTRL y el grupo DM y además existe una diferencia significativa entre el grupo CTRL/SILD y el grupo DM/SILD durante el periodo de las ocho semanas restantes. La tabla 2 muestra que al final del periodo de estudio el grupo CTRL y el CTRL/SILD no muestran diferencias significativas, mientras que los grupos DM y DM/SILD presentan diferencias significativas con respecto a los grupos CTRL y CTRL/SILD respectivamente.

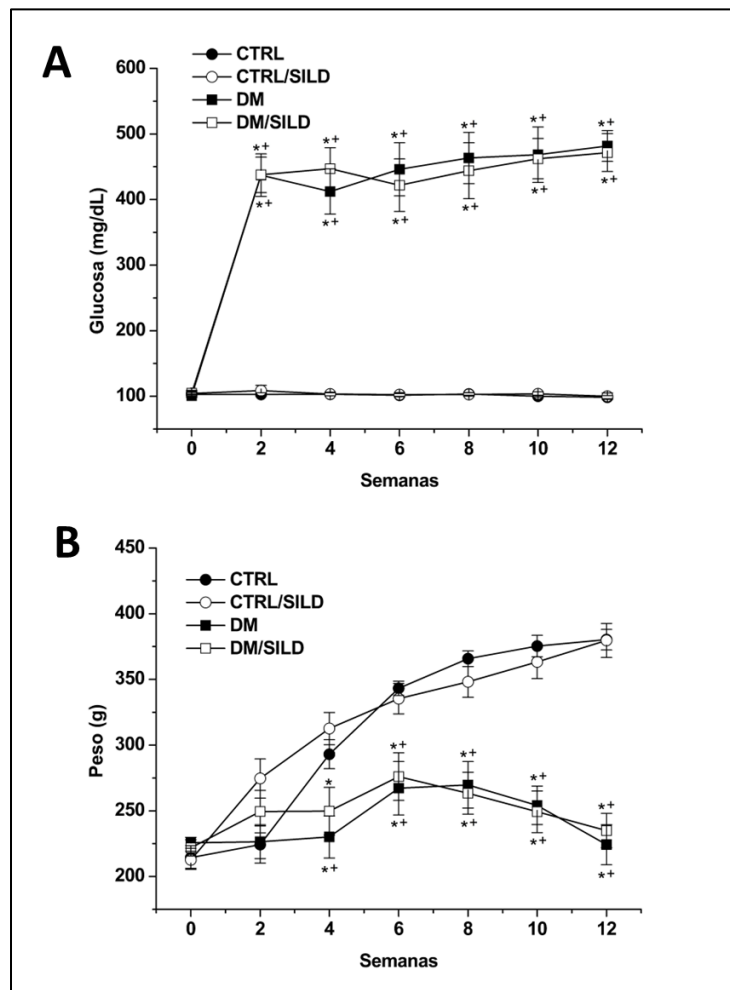


Figura 8. Efecto temporal del sildenafil sobre la glucosa sanguínea y peso corporal. A. Valores de glucosa sanguínea expresada en mg/dL de los cuatro grupos experimentales. **B.** Valores de peso corporal expresado en gramos (g) de los cuatro grupos experimentales. Los resultados son expresados como la media \pm EEM ($n = 9$). * indica $p < 0.05$ vs CTRL; + indica $p < 0.05$ vs CTRL/SILD. El valor de p fue calculado usando una prueba de ANOVA de una vía acoplada a una prueba post hoc de Bonferroni.

Tabla 2. Efecto del sildenafil sobre la glucosa sanguínea y peso corporal, antes y después de la administración de estreptozotocina.

Parámetro	Grupo	Antes de la STZ	48 horas posterior a STZ	12 sem posterior a STZ
Glucosa	CTRL	102.83 ± 3.01	101.33 ± 2.82	98.58 ± 2.54
	CTRL/SILD	104.5 ± 4.56	108.50 ± 8.00	100.16 ± 4.95
	DM	100.83 ± 2.57	430.41 ± 59.89**	481.58 ± 23.53**
	DM/SILD	104.75 ± 2.69	431.66 ± 24.53**	471.58 ± 28.96**
Peso corporal	CTRL	214.41 ± 9.05	238.83 ± 8.06	380.25 ± 7.87
	CTRL/SILD	212.75 ± 6.54	237.33 ± 7.65	379.66 ± 12.92
	DM	225.66 ± 4.11	228.91 ± 5.44	224.25 ± 15.19**
	DM/SILD	221.75 ± 6.19	232.58 ± 9.53	235.00 ± 13.09**

STZ: Estreptozotocina. Los resultados son expresados como la media ± EEM (n = 9). * indica P<0.05 vs CTRL; + indica P<0.05 vs CTRL/SILD. El valor de p fue calculado empleando una prueba de ANOVA de una vía acoplada a una prueba post hoc de Bonferroni.

7.3. Efecto del sildenafil sobre la presión arterial pulmonar de ratas con hipertensión pulmonar secundaria a la diabetes.

Al finalizar el periodo experimental, encontramos que las ratas del grupo DM presentan un incremento significativo de la presión arterial pulmonar con respecto al grupo CTRL (Figura 9), mientras que las del grupo DM/SILD no presentaron diferencias significativas con respecto a los grupos CTRL y CTRL/SILD.

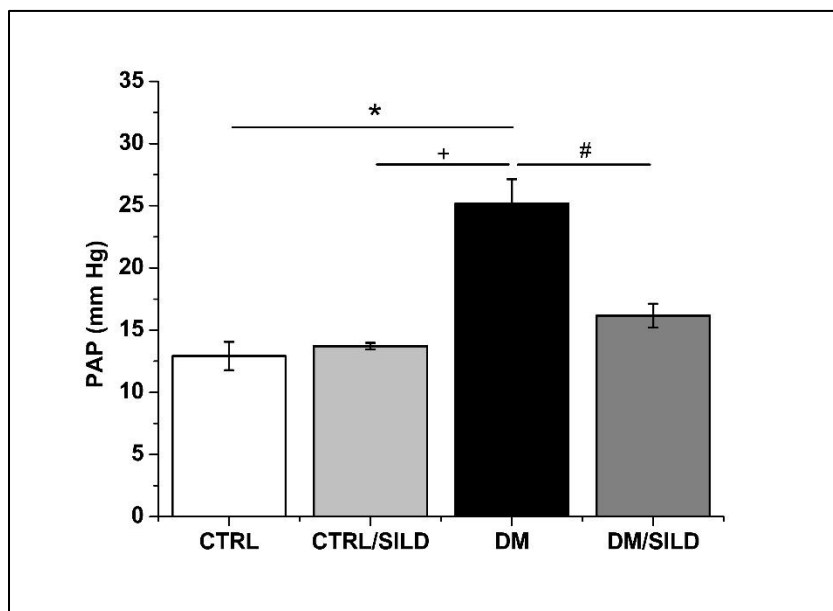


Figura 9. El sildenafil evita el aumento de la presión arterial pulmonar en ratas diabéticas. El tratamiento con sildenafil previene el aumento de la presión arterial pulmonar durante la diabetes sin generar cambios en condiciones control. Los resultados se expresan como la media \pm EEM (n = 9). * indica $P < 0.05$ vs CTRL; + indica $P < 0.05$ vs CTRL/SILD; # indica $P < 0.05$ vs DM/SILD. El valor de p fue calculado usando una prueba de ANOVA de una vía acoplada a una prueba post hoc de Bonferroni.

7.4. Efecto del sildenafil sobre la función endotelial de las arterias pulmonares de ratas con hipertensión pulmonar secundaria a la diabetes.

Al término del periodo experimental, encontramos que las arterias pulmonares de las ratas del grupo DM presentaron DE, representada por la reducción del Emax de relajación a la Ach. La reducción en la relajación es de un 27%, y estadísticamente significativa con respecto al efecto de la Ach de las ratas de los grupos CTRL y CTRL/SILD. Por otra parte, las arterias pulmonares de las ratas diabéticas que estuvieron en presencia del tratamiento crónico con sildenafil, presentaron un aumento de la capacidad de la relajación de aproximadamente un 30% con respecto al efecto vasodilatador de la ACh de las ratas diabéticas. Dicho efecto fue estadísticamente significativo con respecto al grupo DM, sin diferencias

significativas con respecto a los grupos CTRL y CTRL/SILD, (Figura 10-A y Tabla 3).

Con el fin de explorar la vía de señalización del NO en la capa muscular de las arterias pulmonares de las ratas diabéticas, realizamos las curvas concentración respuesta de NPS, que es un donador intracelular de NO (Lopez-Lopez y cols. 2001). Observamos que el NPS en las arterias pulmonares de las ratas del grupo DM presentan una curva a relajación semejante a la curva a relajación de las arterias pulmonares del grupo CTRL. Es decir, no encontramos diferencia significativa en el Emax (115.24 ± 5.98 vs 125.21 ± 6.03 ; respectivamente), pero encontramos un aumento significativo en el valor de pD_2 de la curva del grupo DM respecto a la curva del grupo CTRL (9.65 ± 0.023 vs 10.74 ± 0.28 ; respectivamente) (Figura 11).

Por otra parte, con el fin de explorar la capacidad compensatoria del endotelio a una acción contráctil, realizamos las curvas concentración-respuesta a 5HT. Hallamos un efecto significativamente mayor en el efecto contráctil de la 5HT en las arterias pulmonares de las ratas del grupo DM con respecto al efecto presentado por las arterias pulmonares de las ratas del grupo CTRL y CTRL/SILD (aproximadamente un 100%). Pero este efecto hipercontráctil de la 5HT en las arterias pulmonares de ratas diabéticas no se observó cuando fueron sometidas al tratamiento crónico de sildenafil. El análisis estadístico nos indicó que el grupo DM/SILD no presento diferencia significativa con los grupos CTRL y CTRL/SILD (Figura 10-B y Tabla 3).

Con respecto a la pD_2 de los cuatro grupos experimentales, no encontramos diferencia significativa al comprar entre los grupos experimentales, es decir, que no se presentó diferencia significativa al comparar la pD_2 de los grupos DM/SILD contra DM, CTRL/SILD contra CTRL, DM contra CTRL, así como tampoco DM/SILD contra CTRL/SILD (Tabla 3).

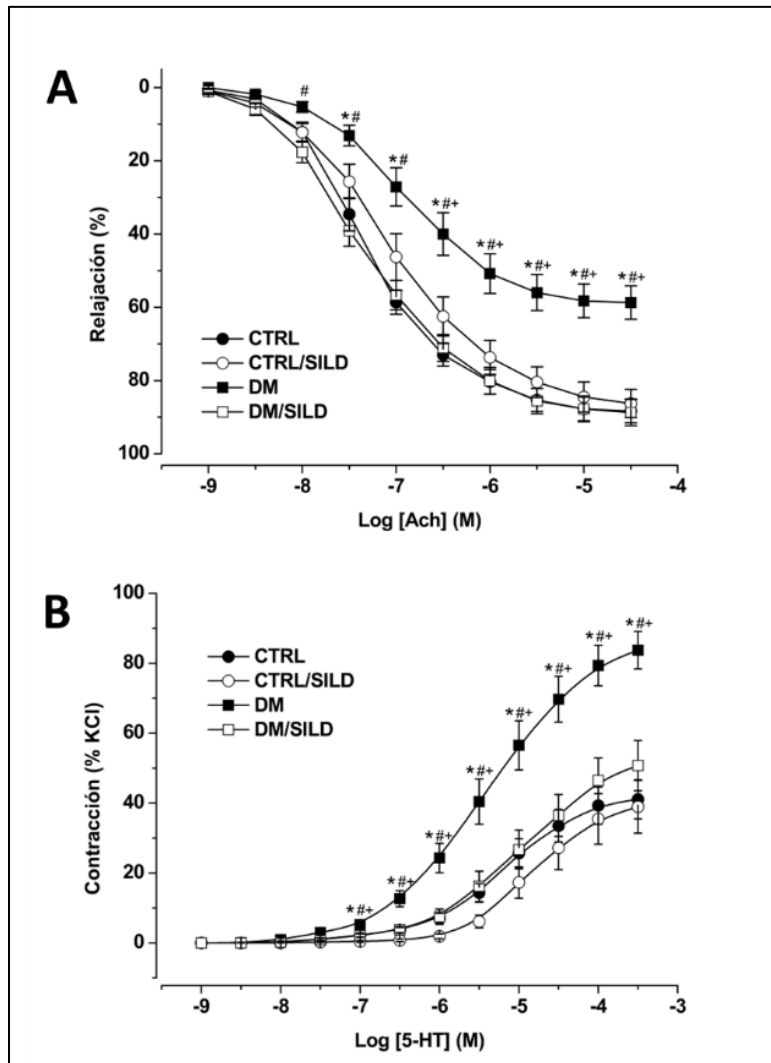


Figura 10. El sildenafil previene la disfunción endotelial y la hiperrespuesta contráctil a serotonina (5HT). (A) Relajación arterial pulmonar inducida por una curva dosis respuesta a acetilcolina (ACh). (B) Contracción arterial pulmonar inducida por una curva dosis respuesta a 5-HT. Los resultados son expresados como la media \pm EEM (n = 9). * indica $p < 0.05$ vs CTRL; + indica $p < 0.05$ vs CTRL/SILD; # indica $P < 0.05$ vs DM/SILD. El valor de p fue calculado usando una prueba de ANOVA de una vía acoplada a una prueba post hoc de Bonferroni.

Tabla 3. Efecto del sildenafil sobre la afinidad y potencia de los agonistas vasomoduladores empleados en la evaluación de la reactividad vascular pulmonar.

Agonista	Parámetro	CTRL	CTRL/SILD	DM	DM/SILD
Ach	E _{max}	87.52 ± 3.09	89.56 ± 4.66	60.98 ± 4.05*#+	92.08 ± 4.20
	pD ₂	7.32 ± 0.07	7.08 ± 0.13	6.86 ± 0.13*#	7.43 ± 0.10
5-HT	E _{max}	42.40 ± 5.66	41.26 ± 6.96	90.26 ± 5.27*#+	53.61 ± 7.96
	pD ₂	5.19 ± 0.10	4.82 ± 0.16	5.29 ± 0.14	5.00 ± 0.13

Ach: acetilcolina, 5-HT: serotonina, E_{max}: efecto máximo, pD₂: log DE₅₀. los valores de E_{max} y pD₂ se calcularon a partir de las curvas dosis respuesta de las arterias pulmonares. Los resultados se expresan como la media ± EEM (n = 9). * indica p<0.05 vs CTRL, + indica p<0.05 vs CTRL/SILD, # indica p<0.05 vs DM/SILD. El valor de p fue calculado usando una prueba de ANOVA de una vía acoplada a una prueba post hoc de Bonferroni.

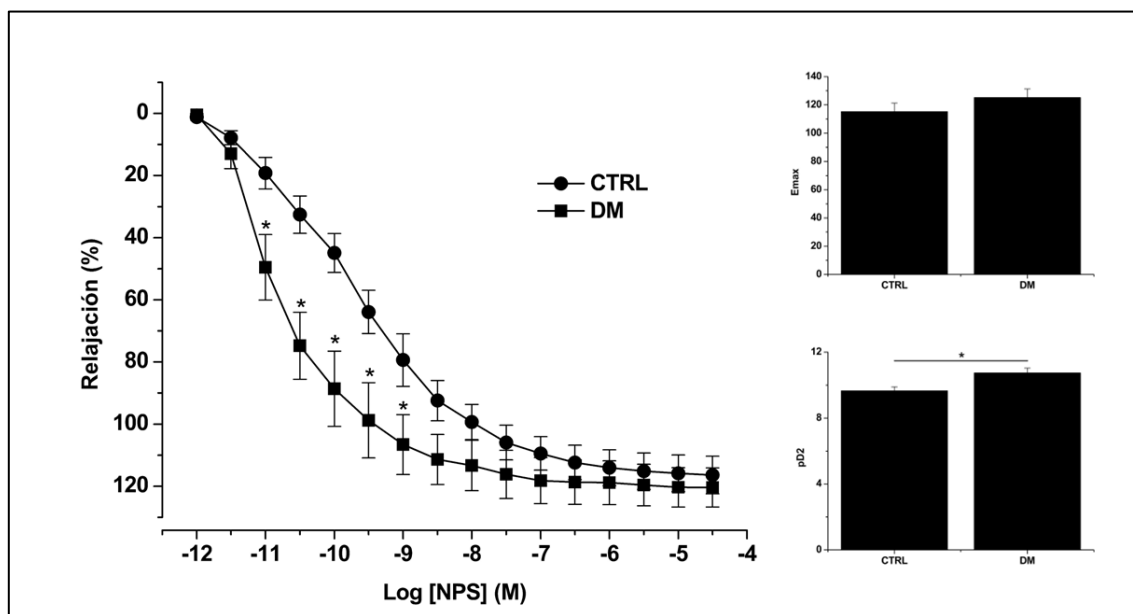


Figure 11. Efecto del nitroprusiato sobre la reactividad vascular pulmonar. Curva dosis respuesta a relajación inducida por nitroprusiato de sodio (NPS) (izquierda), efecto máximo (E_{max}) y logaritmo de la DE₅₀ (pD₂) (derecha). Los resultados son expresados como la media ± EEM (n = 9). * indica p<0.05 vs CTRL. El valor de p fue calculado usando una prueba de ANOVA de una vía acoplada a una prueba post hoc de Bonferroni.

7.5. Efecto del citrato de sildenafil sobre la función endotelial vascular pulmonar de ratas con hipertensión pulmonar secundaria a la diabetes

Con el fin de evaluar el efecto del sildenafil sobre la DE de las arterias pulmonares de las ratas diabéticas, realizamos la curva concentración respuesta de sildenafil. Encontramos que la función endotelial de las ratas control es semejante a la que presentan las ratas diabéticas con la administración in vitro de sildenafil. Es decir, no presentaron diferencias significativas en el Emax (125.52 ± 9.08 vs 111.19 ± 7.74) ni en la pD_2 (10.38 ± 0.45 vs 10.61 ± 0.28) (DM y CTRL, respectivamente), (Figura 12).

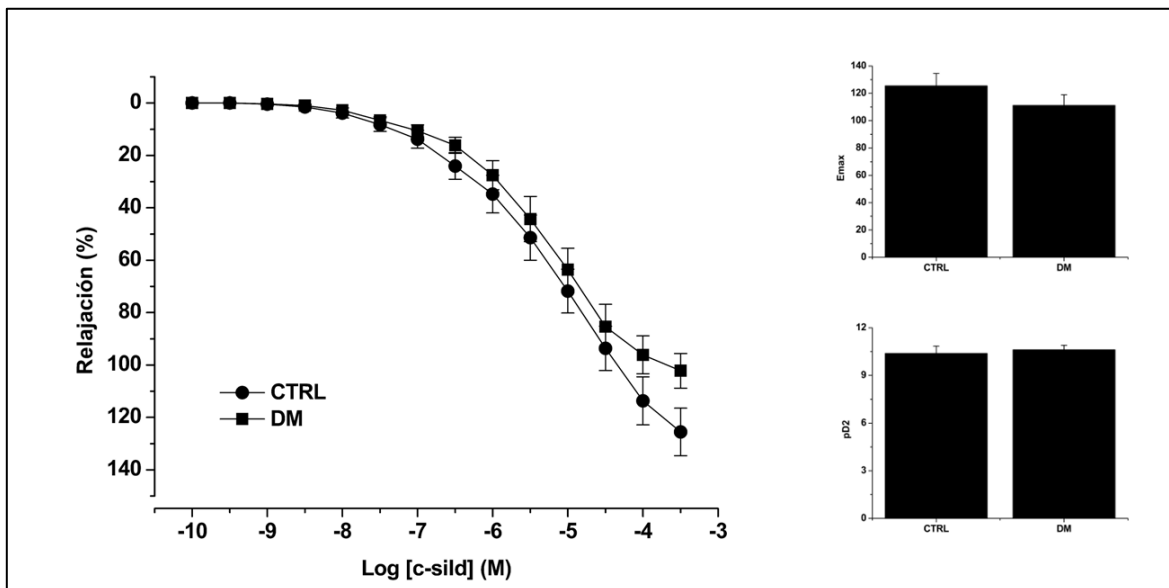


Figure 12. Efecto del citrato de sildenafil sobre la reactividad vascular pulmonar. Curva dosis respuesta a relajación inducida por citrato de sildenafil (c-sild) (izquierda), efecto máximo (Emax) y logaritmo de la DE_{50} (pD_2) (derecha). Los resultados son expresados como la media \pm EEM ($n = 9$).

7.6. Efecto del sildenafil sobre la hipertrofia ventricular derecha de ratas con hipertensión pulmonar secundaria a la diabetes.

Encontramos que después de 12 semanas, valor de índice Fulton de los corazones de las ratas del grupo DM, se incrementó un 40% por arriba del valor del índice Fulton ratas del grupo CTRL. Dicho incremento es estadísticamente significativo con respecto a los grupos DM/SILD, CTRL/SILD y CTRL (Figura 13).

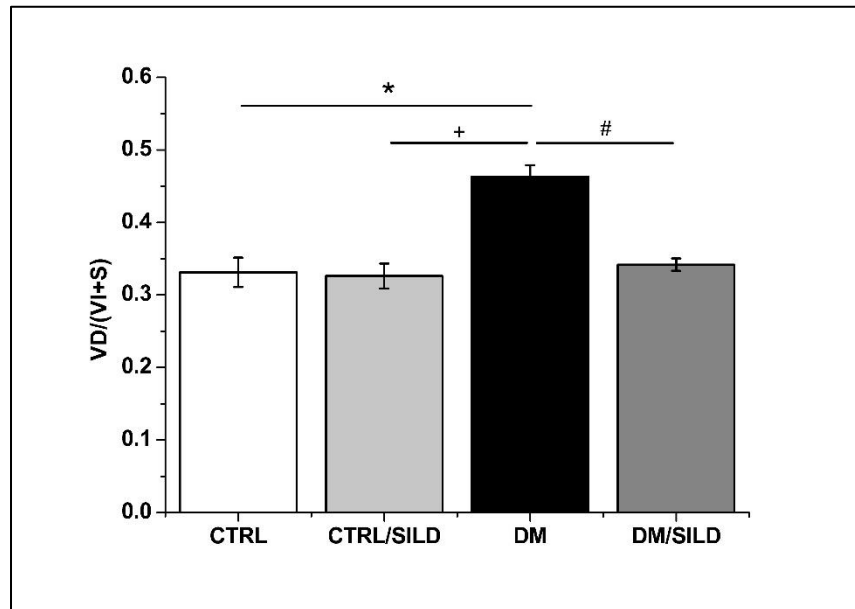


Figura 13. El sildenafil evita el desarrollo de hipertrofia ventricular derecha en ratas diabéticas. El tratamiento con sildenafil del grupo DM (grupo DM/SILD) evitó el aumento de la masa ventricular derecha (índice Fulton, calculado con la formula: $VD/(V+V+S)$), sin presentar cambios en la masa ventricular del grupo CTRL/SILD. Los resultados se expresan como la media \pm EEM ($n = 9$). * indica $P < 0.05$ vs CTRL; + indica $P < 0.05$ vs CTRL/SILD; # indica $P < 0.05$ vs DM/SILD. El valor de p fue calculado usando una prueba de ANOVA de una vía acoplada a una prueba post hoc de Bonferroni.

7.7. Efecto del sildenafil sobre la remodelación tisular del ventrículo derecho de ratas con hipertensión pulmonar secundaria a la diabetes.

El conjunto de imágenes obtenidas con la tinción de hematoxilina y eosina de la figura 14, muestran que, con 12 semanas de seguimiento experimental, el área celular aparente, la pigmentación y la distribución del tejido cardiaco derecho de las ratas del grupo DM es diferente al área celular aparente, pigmentación y la

distribución del tejido cardiaco derecho de las ratas CTRL y que además, en la imagen del grupo DM/SILD no se percibe remodelación de la célula, aumento excesivo de la pigmentación o redistribución del tejido, por lo que tampoco se observan cambios aparentes en la distribución de este tejido al comparar con los tejidos cardiacos derechos de las ratas de los grupos CTRL y CTRL/SILD. Al evaluar de manera cuantitativa el tamaño de las células del VD, encontramos que el área de los cardiomiocitos de las ratas del grupo DM/SILD es de $164.4 \pm 13.7 \mu\text{m}^2$, lo que representa un valor significativamente menor comparado contra las $256.1 \pm 31.8 \mu\text{m}^2$ que mide al área de los cardiomiocitos del grupo DM, además hallamos que las $132.0 \pm 9.4 \mu\text{m}^2$ que mide el área de los cardiomiocitos del grupo CTRL, no es diferente significativamente contra las $164.0 \pm 13.7 \mu\text{m}^2$ que mide el área de los cardiomiocitos del grupo CTRL/SILD, así como tampoco es diferente significativamente al comparar contra el área de los cardiomiocitos del grupo DM/SILD (Figura 15).

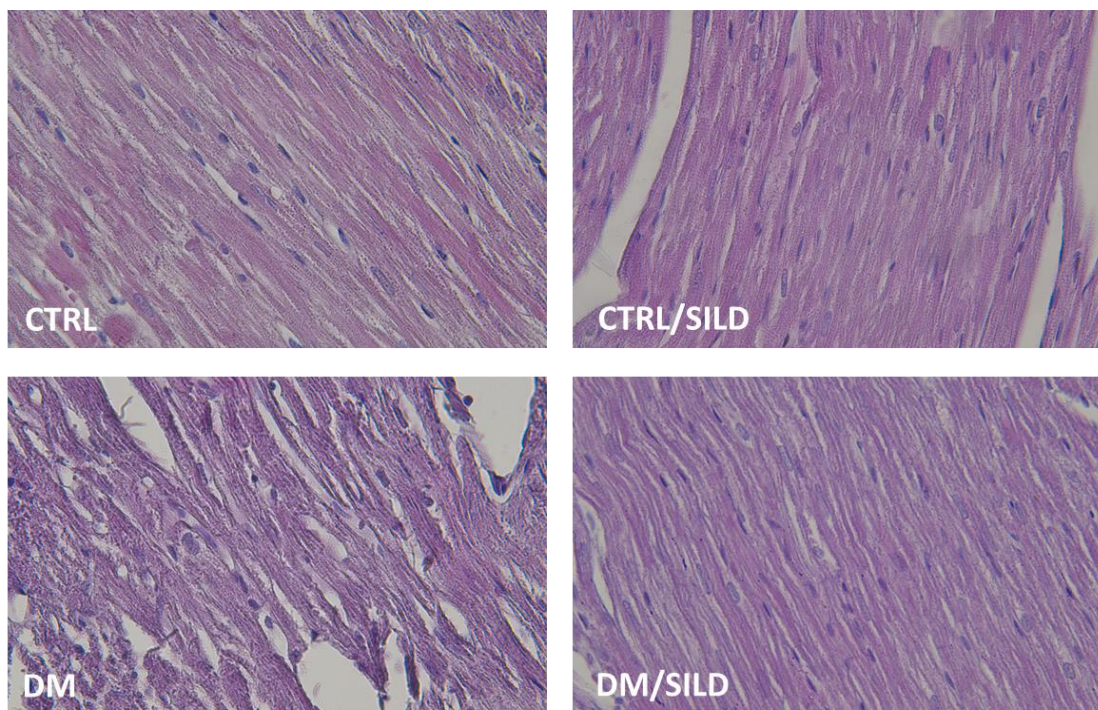


Figura 14. El sildenafil evita la remodelación del tejido cardiaco en ratas diabéticas. La hematoxilina y eosina tiñen el citoplásmicas, núcleo y de matriz extracelular del tejido cardiaco derecho y detectadas bajo microscopio (40X). En la imagen del grupo diabético (DM) se observa una remodelación tisular, proceso que fue evitado por el sildenafil durante la diabetes (DM/SILD).

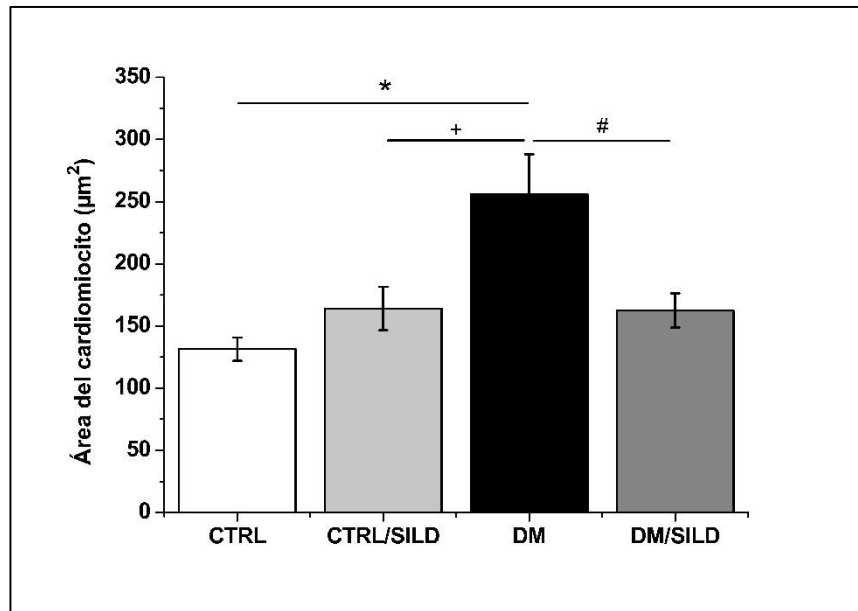


Figura 15. El sildenafil evita la hipertrofia del cardiomiocito. El tratamiento con sildenafil del grupo DM (grupo DM/SILD) evitó el aumento del área del cardiomiocito, sin generar cambios en el área de los cardiomiocitos del grupo CTRL/SILD. Los resultados se expresan como la media \pm EEM (n = 9). * indica $P < 0.05$ vs CTRL; + indica $P < 0.05$ vs CTRL/SILD; # indica $P < 0.05$ vs DM/SILD. El valor de p fue calculado usando una prueba de ANOVA de una vía acoplada a una prueba post hoc de Bonferroni.

De manera semejante, el conjunto de imágenes de la figura 16, muestra que, el tejido cardíaco derecho de las ratas del grupo DM presentan mayor coloración y entramado de las fibras rojas en la imagen (colágeno teñido) al comparar con la imagen del tejido cardíaco derecho de las ratas del grupo CTRL, también se observó que el tejido cardíaco derecho de las ratas del grupo DM/SILD presenta una menor coloración y entramado respecto a la presentada en los tejidos cardíacos derechos de la rata del grupo DM, sin presentar una diferencia aparente con la coloración y distribución de fibras del resto de tejidos cardíacos derechos de la imagen. Estas observaciones concuerdan con los valores cuantitativos, ya que encontramos que la cantidad de colágeno presente en el VD de las ratas del grupo DM/SILD es del 7.03 ± 1.03 %, menor significativamente comparado contra el 16.17 ± 1.86 % encontrado en el VD de las ratas del grupo DM, además encontramos que no hay diferencia significativa entre la cantidad de colágeno presente en los ventrículos

derechos de las ratas pertenecientes a los grupos CTRL y CTRL/SILD (6.00 ± 0.51 vs 8.20 ± 1.09 %; respectivamente), así mismo no hallamos diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de colágeno presente en los ventrículos derechos de las ratas pertenecientes a los grupos DM/SILD vs CTRL/SILD y DM/SILD vs CTRL (Figura 17).

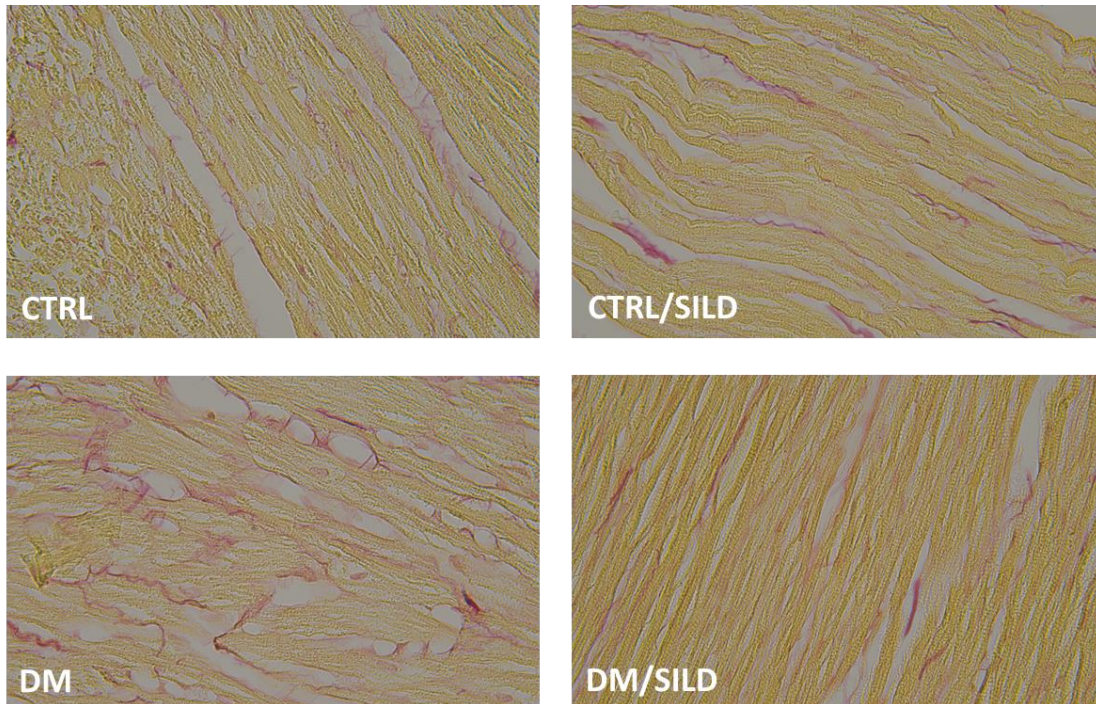


Figura 16. El sildenafil evita el aumento en la deposición de colágeno en el tejido cardíaco de ratas diabéticas. Las fibras de colágeno fueron teñidas de color rojo por el colorante rojo 80 y detectadas bajo microscopio (40X). La imagen del grupo diabético (DM) muestra mayor presencia, entramado y engrosamiento de las fibras de colágeno, proceso que fue evitado por el sildenafil durante la diabetes (DM/SILD).

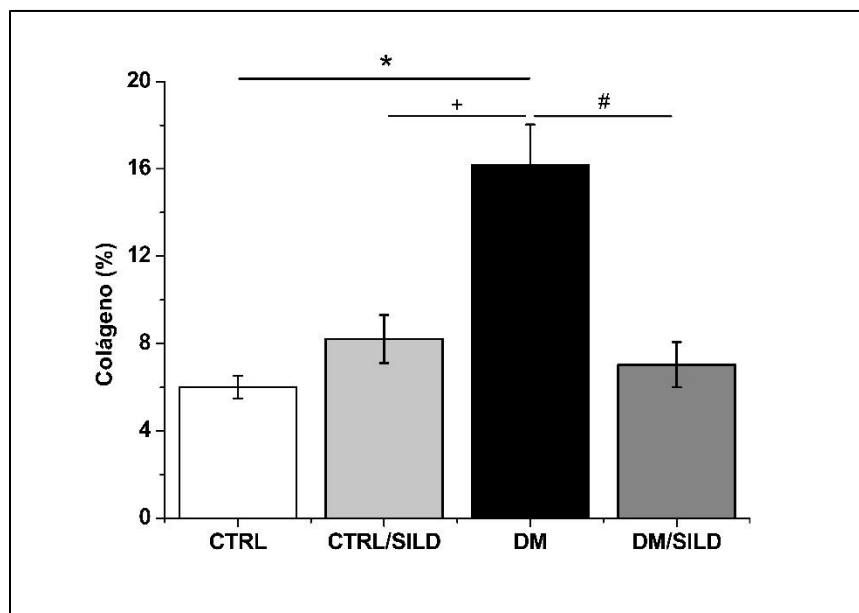


Figura 17. El sildenafil evita la fibrosis ventricular derecha. La administración crónica con sildenafil durante la diabetes (grupo DM/SILD) evitó el aumento de la presencia de colágeno en el ventrículo derecho, sin inducir cambios en la presencia de colágeno en el ventrículo derecho del grupo CTRL/SILD. Los resultados se expresan como la media \pm EEM ($n = 9$). * indica $P < 0.05$ vs CTRL; + indica $P < 0.05$ vs CTRL/SILD; # indica $P < 0.05$ vs DM/SILD. El valor de p fue calculado usando una prueba de ANOVA de una vía acoplada a una prueba post hoc de Bonferroni.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1. El tratamiento con sildenafil no modifica los valores de glucosa sanguínea o el peso corporal

Los valores de glucosa sanguínea y peso corporal son semejantes a los reportados recientemente por nuestro grupo de trabajo (García-González y cols., 2022) y por otros grupos que emplean un modelo animal de diabetes tipo 1 (Alsalahi y cols., 2018; Dhaliwal y cols., 2020).

Hallamos que 48 horas posteriores a la administración de la STZ y a lo largo del seguimiento del modelo experimental, en los grupos DM se elevó el valor de glucosa sanguínea por arriba de los 400 mg/dL, comparado con los 100 mg/dL (aproximadamente) que presentaron los grupos CTRL y CTRL/SILD. Desafortunadamente, en la presente tesis doctoral no exploramos el mecanismo de acción de la STZ, por lo tanto, creemos que la hiperglucemia en las ratas DM actúa acorde al mecanismo reportado en la bibliografía. Se ha propuesto que esta sustancia diabetogénica ingresa a las células β pancreáticas a través de los transportadores GLUT-2 y desencadena un proceso de alquilación principalmente en el oxígeno en la posición 6 de la guanina (O^6), resultando en la fragmentación de ADN (Lenzen, 2007). Además del daño directo sobre los ácidos nucleicos, se considera que la STZ desgasta los mecanismos de reparación de ADN y puede generar glicación de proteínas clave en la obtención de ATP, por lo que la disminución de la energía celular favorece la necrosis de las células β -pancreáticas (Lenzen, 2007; Yan, 2022). Por lo tanto, se pierde la capacidad de producir insulina y su efecto regulador de la glucemia. Al mismo tiempo encontramos que el tratamiento con sildenafil no modifica el valor de la hiperglucemia durante la diabetes. Por lo tanto, proponemos que el sildenafil no participa en el control de la glucemia sanguínea.

Respecto al peso corporal, encontramos una disminución en la capacidad de ganancia de peso de los animales pertenecientes a los grupos DM y DM/SILD. El mecanismo no fue explorado en este estudio, por lo tanto, asumimos que la pérdida de la capacidad de ganancia está relacionada con la ausencia de la insulina, como

se ha reportado en la bibliografía (Baumeier y cols., 2017; Anderson y cols., 2018). Se propone que esta hormona regula procesos anabólicos al favorecer el transporte de glucosa y aminoácidos a las fibras del músculo esquelético, además de disminuir la degradación de proteínas y favorecer la lipogénesis. En este sentido, al no encontrar recuperación en la capacidad de ganancia de peso corporal en las ratas diabéticas tratadas con sildenafil, suponemos que dicho tratamiento no participa en los mecanismos de regulación de los procesos metabólicos y de remuscularización.

8.2. El tratamiento crónico de sildenafil en ratas diabéticas tipo 1 evita el desarrollo de la hipertensión pulmonar, a través de la prevención de la disfunción endotelial

Encontramos que las ratas diabéticas desarrollaron HP a las 12 semanas. Este resultado es semejante al reportado en la bibliografía y publicado por nuestro grupo de investigación en un modelo de rata con diabetes tipo1 (López-López y cols., 2021). Por otra parte, es importante mencionar que la diabetes es un importante factor de riesgo en la progresión de la HP y la mortalidad durante la comorbilidad de estas dos enfermedades (Khateeb y cols., 2019; Trammell y cols., 2020).

El mecanismo por el cual la diabetes induce HP en este modelo de ratas ha sido explorado por nuestro grupo de investigación y por el grupo del Dr. Pérez Vizcaíno de la Universidad Complutense de Madrid. Se ha propuesto que la HP secundaria a la diabetes está relacionada con la DE de las arterias pulmonares. La reducción en la eficiencia del endotelio se ha vinculado con la sobreexpresión de las enzimas NADPH oxidasa y COX-2, que son productoras de radicales superóxidos en el territorio pulmonar (López y López y cols., 2008; López y López y cols., 2011; García-González y cols., 2021). En esta dirección, nuestros resultados sobre el mecanismo de la hipertensión secundaria a la diabetes podrían interpretarse de la misma manera.

Al comparar nuestros resultados en función de la capacidad relajante y contráctil de las arterias pulmonares de las ratas diabéticas contra los datos publicados por nuestro grupo de investigación pero con un periodo de seguimiento experimental menor, podemos describir que, la capacidad relajante inducida por Ach en las arterias pulmonares con 8 semanas de seguimiento, se reduce en un 21% respecto a la misma capacidad en las arterias pulmonares de ratas control, mientras que en las ratas diabéticas con 12 semanas de seguimiento se reduce un 27% al comparar con la respuesta de las arterias pulmonares control. Además, encontramos que la capacidad contráctil inducida por 5HT de las arterias pulmonares diabéticas a las 12 semanas es del 48% mayor comparado a la contracción de arterias pulmonares control, contra un 33% más de contracción obtenido a las 8 semanas de las arterias pulmonares diabéticas al comparar contra las arterias pulmonares control. Es decir que la tasa de disminución de la capacidad relajante es de 1.2 veces mayor a las 12 semanas comparado contra las 8 semanas, mientras que la tasa de aumento de contracción es de 1.4 veces, a las 12 semanas comparado contra las 8 semanas. Por lo tanto, este análisis nos indica que el grado de DE en las ratas diabéticas, es dependiente del tiempo, por lo que a las 12 semanas se presenta un mayor grado de DE. Esta afirmación coincide con el hecho de que el valor de presión pulmonar aumenta progresivamente, como se ha demostrado en un análisis temporal por ecocardiograma (López-López y cols., 2021). Estas evidencias fortalecen la hipótesis de que la HP durante la diabetes tiene su origen en la DE.

Con respecto al efecto del sildenafil es importante mencionar que nuestro grupo de investigación ha encontrado por primera vez un efecto “protector” sobre la HP en las ratas diabéticas (García-González y cols., 2022). Haciendo la aclaración que el sildenafil se encuentra indicado en la guía de la práctica clínica del IMSS y en las guías clínicas internacionales como medicamento para el tratamiento de la HP de origen no diabético (GPC, IMSS, 2010; Galiè y cols., 2019; Simonneau y cols, 2019).

Con la evaluación de la respuesta vascular al citrato de sildenafil, podemos suponer que la actividad de la PDE5 en las arterias pulmonares de las ratas diabéticas no se encuentra modificada, por lo que los cambios en la regulación del

efecto vasomotor mediado por GMPc pueden deberse al aumento en la expresión de la PDE5 como se demostró en corazón durante la HP secundaria a diabetes (García-González y cols., 2022) y por su puesto a la disminución de la biodisponibilidad del NO como ya hemos mencionado anteriormente.

En este sentido, el efecto terapéutico del sildenafil se ha relacionado con la inhibición competitiva de la PDE5 pulmonar, evitando la degradación del GMPc (Cohen y cols., 2019), permitiendo la reducción eficiente de la concentración de Ca^{2+} intracelular vascular pulmonar (Rashid y cols., 2017). Este mecanismo permite que el NO liberado parácrinamente por el endotelio, incremente su eficiencia en la inducción de su efecto vasodilatador en las arterias pulmonares (Galiè y cols., 2019).

El mecanismo “protector” del sildenafil sobre la presión arterial de las ratas diabéticas, puede explicarse de la misma forma que en el párrafo anterior. Como hemos mencionado anteriormente, la HP de las ratas diabéticas está relacionada con un incremento del estatus oxidativo y por lo tanto una reducción de la biodisponibilidad de NO liberado por el endotelio. Bajo la acción del sildenafil, es probable que el poco NO que alcanza a llegar a la capa media de la arteria pulmonar resulte más eficiente en la producción y conservación del GMPc y, por lo tanto, se evade la DE. Esta propuesta puede respaldarse por el efecto que presenta el sildenafil (tratamiento *in vivo* y administración *in vitro*) sobre la mejora en la relajación a Ach y la inhibición de la hipercontracción a 5HT de las arterias pulmonares de ratas diabéticas.

8.3. El sildenafil evita la hipertrofia y remodelación ventricular derecha en ratas diabéticas tipo 1

Nuestros resultados demuestran que las ratas diabéticas con HP también desarrollan aumento de la masa del VD, hipertrofia de los cardiomiocitos y fibrosis ventricular derecha. Este resultado concuerda con los hallazgos recientemente publicados nuestro grupo de investigación.

Bajo condiciones semejantes a las desarrolladas en este trabajo (HP secundaria a la diabetes), previamente reportamos que a las 8 semanas de seguimiento experimental las ratas diabéticas presentan aumento de la masa del VD (García-González y cols., 2022), mientras que a las 12 semanas de seguimiento experimental, los corazones de las ratas diabéticas presentan aumento de la poscarga, disminución de la fracción de acortamiento, sobrecarga y disfunción del VD, acompañado de cambios en los índices Tei y TAPSE, los cuales son indicadores indirectos de la función cardíaca (López y López y cols., 2021). De manera similar, durante la HP no asociada a la diabetes, se ha descrito que los cambios que ocurren en el VD se presentan como un mecanismo adaptativo secundario al incremento en la resistencia vascular pulmonar (Vonk Noordegraaf y cols., 2017; Guazzi, 2018) que se acompaña con el aumento de la masa y de la contractilidad del VD para compensar el incremento de la poscarga del VD (Thenappan y Weir, 2020).

En la búsqueda de la caracterización y descripción de los cambios que ocurren en el VD de ratas con HP secundaria a la diabetes que dan origen a la HVD, obtuvimos una serie de resultados novedosos. Encontramos que los corazones de las ratas diabéticas presentan remodelación tisular cardíaca derecha, aumento del tamaño del cardiomiocito y aumento en la disposición de colágeno presente en la matriz extracelular.

De manera descriptiva y cuantitativa podemos comentar que el aumento del tamaño del cardiomiocito de las ratas diabéticas confirma el diagnóstico de HVD propuesto con el hallazgo del incremento del indicador general de HVD (índice Fulton) y con la remodelación del VD observada por ecocardiografía (López-López y cols., 2021). En ausencia de diabetes, se ha planteado el mecanismo por el cual se genera la hipertrofia del cardiomiocito durante la HP. Las evidencias indican que el aumento del tamaño del cardiomiocito se encuentra asociado a la sobrecarga del VD, ya que induce la desregulación de las proteínas cinasas dependientes de GMPc y Ca^{2+} (PKG y PKC) y su correspondiente desregulación de factores mitógenos que dan origen al crecimiento del cardiomiocito y al aumento de la masa del VD (Lee y cols.,

2012; Lorenz y cols., 2014; Vázquez y cols, 2020). Por lo tanto, podemos sugerir que la sobrecarga del VD durante la HP secundaria a la diabetes, repercute sobre factores de regulación del crecimiento celular, que deriva en una redistribución tisular e hipertrofia de los cardiomiocitos del VD.

Otro hallazgo inédito que aporta la presente tesis es el aumento en la presencia de colágeno del VD durante la HP diabética. Existen evidencias de que los modelos animales de HP sin diabetes presentan un aumento en la distribución del colágeno, y que dicho efecto se debe a la activación de receptores tipo TGF- β , los cuales son fosforilados por la sobrecarga del VD, por lo que a través de proteínas Smad activan a factores de transcripción como CREB-1 que induce la activación de genes que regulan la matriz extracelular a partir de la síntesis de colágeno (Gong y cols., 2014; Grinnan y cols., 2016). Por lo tanto, nosotros consideramos que ocurre un mecanismo semejante bajo nuestras condiciones experimentales. Creemos que el aumento en la resistencia pulmonar provoca el aumento en la sobrecarga del VD que da origen a la activación factores de transcripción que derivan en el aumento de la síntesis de colágeno y su distribución extracelular.

De manera global, el aumento en la presencia de colágeno es un indicador de fibrosis cardiaca. Por lo tanto, el aumento en la disposición de colágeno que observamos en los ventrículos derechos de las ratas diabéticas demuestra la presencia de fibrosis ventricular (rigidez ventricular) que es considerada como uno de los principales factores que dan origen a la insuficiencia cardiaca (Tian y cols., 2018; Kim y cols., 2021), que como hemos descrito recientemente, también presentan nuestro modelo experimental a las 12 semanas de seguimiento (López y López y cols., 2021).

Por lo tanto, y con respecto a la HP secundaria a la diabetes, la hipertrofia del cardiomiocito y el aumento de la presencia de colágeno en el VD, aportan nuevas evidencias sobre los cambios que dan origen a la remodelación e insuficiencia cardiaca derecha durante la HP secundaria a la diabetes.

Bajo nuestras condiciones experimentales, encontramos que el tratamiento con sildenafil (60 mg/kg de peso) evade completamente el desarrollo y tendencia a la HVD. A diferencia de reportes previos (con condiciones experimentales semejantes), donde si bien el sildenafil evita el desarrollo de HVD, se mantuvo una ligera tendencia al aumento de la masa del VD, este efecto se asoció con el hecho de que no se logró prevenir en su totalidad la hiperrespuesta a agonistas contráctiles, por lo que podría mantenerse un ligero aumento de la resistencia vascular pulmonar (García-González y cols., 2022). Clínicamente se ha reportado que, en ausencia de diabetes, pacientes hipertensos pulmonares tratados con sildenafil mejoran sus síntomas clínicos y previenen la remodelación y falla cardiaca (Belyavskiy y cols., 2020). Además, en modelos animales sin diabetes, el tratamiento con sildenafil tiene la capacidad de evitar el aumento de la presión del VD, la remodelación estructural, el desarrollo de hipertrofia y mejorar la función del VD (Yoshiyuki y cols., 2016; Li y cols., 2021), efecto que se ha asociado a la reducción de la resistencia vascular pulmonar y la reducción de la sobrecarga del VD (Monzo y cols., 2021), por lo que no existe la activación de los procesos adaptativos que desencadenan la remodelación del VD. Con este respaldo bibliográfico, creemos que el sildenafil reduce la resistencia vascular pulmonar y, por lo tanto, la sobrecarga del VD durante la diabetes. Este mecanismo respalda el hecho de que la administración de sildenafil logró evitar la remodelación histológica y la hipertrofia del cardiomiocito durante la HP diabética. Por lo tanto, creemos que el efecto del sildenafil en la prevención de la HP evade la sobrecarga ventricular y logra evitar la remodelación del tejido ventricular derecho y la hipertrofia de los cardiomiocitos del VD.

Además, nuestro hallazgo de que el tratamiento con sildenafil logró evitar el aumento en la disposición de colágeno presente en la matriz extracelular se explica en el mismo sentido que en el párrafo anterior. Sabemos que el tratamiento crónico con sildenafil durante la diabetes logró evitar la HP y seguramente la sobrecarga del VD, es decir, que la probable reducción de la poscarga ventricular derecha asociada al sildenafil evitó la activación de vías de señalización encargadas de la síntesis de colágeno, evitando su sobreexpresión en la matriz extracelular. Este

proceso representa un posible mecanismo de protección contra la fibrosis e insuficiencia cardíaca derecha durante la HP secundaria a diabetes.

Consideramos que los mecanismos hasta ahora propuestos son los principales encargados de evitar la remodelación del VD durante la HP diabética, sin embargo, no descartamos la posibilidad de que el sildenafil presente efectos regulatorios directos sobre el tejido cardíaco derecho no asociados con el cambio de presión o resistencia vascular pulmonar, ya que se ha reportado que el tratamiento con sildenafil puede disminuir la expresión de proteínas involucradas en la regulación de GMPc (Archer y Michelakis, 2009; Aljanabi y cols., 2020), modificar mecanismos celulares implicados en la función celular (Kiso y cols., 2013; Escudero y cols., 2021) y modificar la capacidad de fosforilación de proteínas que regulan factores de transcripción (Rai y cols., 2018). Por lo tanto, para las investigaciones futuras, debemos considerar la posibilidad de evaluar estos probables efectos.

9. CONCLUSIONES

- A. La diabetes conduce al desarrollo de HP por disminución de la capacidad relajante dependiente del endotelio y aumento de la hiperrespuesta contráctil en el lecho vascular pulmonar, sin modificar la vía de señalización del NO ni la actividad vascular de la PDE5.
- B. El aumento de la presión arterial pulmonar, provoca el aumento de la resistencia vascular pulmonar y la sobrecarga del VD, dando lugar a la hipertrofia del cardiomiocito y el aumento en la presencia de colágeno del VD, con la consecuente remodelación, fibrosis, aumento de la masa e insuficiencia cardíaca derecha.
- C. El tratamiento crónico con sildenafil evita la HP a través de la prevención de la disfunción endotelial vascular pulmonar, por lo tanto, impide la sobrecarga del VD y evade los mecanismos adaptativos de hipertrofia, remodelación, fibrosis e insuficiencia cardíaca derecha.
- D. Este conjunto de evidencias contribuye a la actual descripción del mecanismo de remodelación del VD presente en la hipertensión pulmonar originada por la diabetes y al mecanismo antihipertensivo pulmonar del sildenafil durante la diabetes.

10. PERSPECTIVAS

- A. Los resultados obtenidos en la presente tesis indican que el tratamiento crónico con sildenafil evita la disfunción endotelial de las arterias pulmonares de ratas diabéticas, por lo tanto, previene los cambios hemodinámicos en la artera pulmonar y evita la inducción de mecanismos adaptativos del ventrículo que deriven en la hipertrofia ventricular derecha. Sin embargo, somos conscientes de que aún nos encontramos distantes de poder proponer un mecanismo celular y molecular completo de los cambios presentes durante la diabetes que dan el origen a la hipertensión pulmonar y a la hipertrofia ventricular derecha. Por lo tanto, se debe profundizar en los mecanismos subyacentes que nos permitan una descripción completa del proceso fisiopatológico y la repercusión del tratamiento con sildenafil sobre el mismo.
- B. Aunque en la presente tesis se aportaron evidencias que describen la hipertrofia ventricular derecha y la presencia de fibrosis a nivel histológico, se debe confirmar el aumento del tamaño celular con una herramienta más específica que permita la visualización exacta del límite celular y confirmar que el aumento en la masa del VD se debe a la hipertrofia del cardiomiocito.
- C. Continuando con la descripción del mecanismo celular que describa los cambios ventriculares durante la diabetes y bajo tratamiento con sildenafil, se debe cuantificar la expresión de la PDE5 en ventrículo derecho durante la diabetes, ya que hasta el momento solo se cuenta con datos de expresión, pero de homogenizado de corazón completo. Además, es necesario confirmar a nivel ventricular que la capacidad de inhibición de la actividad enzimática del sildenafil no cambia durante la diabetes, como lo propusimos en esta tesis sobre el lecho vascular pulmonar. Los posibles cambios tanto de la expresión como de la actividad de la PDE5 en VD, deben ser analizados y discutidos considerando el valor de la concentración de GMPc en el VD durante la diabetes, en presencia y ausencia de sildenafil, por lo que también se debe cuantificar.

- D. También sabemos que debemos profundizar la búsqueda de los mecanismos de regulación de la expresión de la PDE5 en VD, por lo que se debe evaluar la expresión del mensajero de la PDE5, ya que se ha reportado que dicho gen es regulado por proteínas cinasas dependientes de GMPc, por lo que sería muy relevante proponer los mecanismos de regulación inducidos por el sildenafil. Durante la diabetes e hipertensión pulmonar se provocan cambios en la actividad de enzimas reguladas por calcio y por GMPc. Por lo tanto, es necesario iniciar con la evaluación de los cambios en la señalización y activación o inhibición de genes involucrados en las cascadas de señalización que involucran a las cinasas PKG y PKC, como posibles mecanismos que participan en la prevención de remodelación y adaptación del VD a la hipertensión pulmonar secundaria a la diabetes.
- E. También es necesario que se describan los parámetros cardíacos durante la HP secundaria a la diabetes de manera funcional, es decir, que se debe confirmar que los efectos protectores del sildenafil, no solamente se encuentran a nivel histológico o celular, sino que debemos evaluar si realmente la protección se traduce en la conservación de la función cardíaca derecha durante la HP secundaria a la diabetes.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abernethy AD, Stackhouse K, Hart S, Devendra G, Bashore TM, Dweik R, Krasuski RA.** Impact of diabetes in patients with pulmonary hypertension. *Pulm Circ* 5: 117-123, 2015.
- Ahmed WS, Geethakumari AM, Biswas KH.** Phosphodiesterase 5 (PDE5): Structure-function regulation and therapeutic applications of inhibitors. *Biomed Pharmacother.* 134:111128. 2021.
- Ala M, Mohammad Jafari R, Dehpour AR.** Sildenafil beyond erectile dysfunction and pulmonary arterial hypertension: Thinking about new indications. *Fundam Clin Pharmacol.* 35:235-259. 2021.
- Aleixandre A, Miguel M.** Zucker rats as an experimental model for the study of various diseases. *Endocrinol Nutr.* 55:217-22. 2008.
- Aljanabi MA, Alfaqih MA, Al-Khayat AMA, Bataineh HN.** Sildenafil reverses the hypertrophy of mice right ventricle caused by hypoxia but does not reverse the changes in the myosin heavy chain isoforms. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 12:79-87. 2020.
- Alsalahi A, Alshawsh MA, Chik Z, Mohamed Z.** Effect of *Catha edulis* (khat) on pancreatic functions in streptozotocin-induced diabetes in male Sprague-Dawley rats. *Exp Anim.* 67:517-526. 2018.
- Al-Shafei, Al, Wise RG, Gresham GA, Bronns G, Carpenter TA, Hall LD, Huang CL.** Non-invasive magnetic resonance imaging assessment of myocardial changes and the effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic rats. *Am J Physiol.* 538; 541-553. 2002.
- American Diabetes Association.** Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care.* The journal of clinical and applied research and education. 41, 1. 2018.
- Anderson LJ, Tamayose JM, Garcia JM.** Use of growth hormone, IGF-I, and insulin for anabolic purpose: Pharmacological basis, methods of detection, and adverse effects. *Mol Cell Endocrinol.* 464:65-74. 2018.
- Andersson KE.** PDE5 inhibitors - pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery. *Br J Pharmacol.* 175:2554-2565. 2018.
- Archer SL, Michelakis, ED.** Phosphodiesterase type 5 inhibitors for pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine,* 361(19), 1864–1871. 2009.
- Arrieta F, Iglesias P, Botet JP, Becerra A.** Grupo de Riesgo Cardiovascular de la Sociedad Española de Diabetes (SED). Diabetes mellitus and cardiovascular risk: Update of the recommendations of the Diabetes and Cardiovascular Disease working group of the Spanish Diabetes Society (SED, 2018). *Clin Investig Arterioscler.*30, 137-153. 2018.
- Baumeier C, Schlüter L, Saussenthaler S, Laeger T, Rödiger M, Alaze SA, Fritsche L, Häring HU, Stefan N, Fritsche A.** Elevated hepatic DPP4 activity promotes insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Metab.* 6:1254–63. 2017.
- Behringer A, Trappiel M, Berghausen EM, Ten Freyhaus H, Wellenhofer E, Odenthal M, Blaschke F, Er F, Gassanov N, Rosenkranz S, Baldus S, Kappert K, Caglayan E.** Pioglitazone alleviates cardiac and vascular remodelling and improves survival in monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 389: 369-379, 2016.
- Belyavskiy E, Ovchinnikov A, Potekhina A, Ageev F, Edelmann F.** Phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil in patients with heart failure with preserved ejection fraction and combined pre- and postcapillary pulmonary hypertension: a randomized open-label pilot study. *BMC Cardiovasc Disord.* 20:408. 2020.
- Bhogal S, Khraisha O, Al Madani M, Treece J, Baumrucker SJ, Paul TK.** Sildenafil for Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Ther.* 26:e520-e526. 2019.

Black MJ, D'Amore A, Auden A, Stamp L, Osicka T, Panagiotopoulos S, Jerums G. Chronic type 1 diabetes in spontaneously hypertensive rats leads to exacerbated cardiac fibrosis. *Cardiovasc Pathol.* 19:361-70. 2010.

Borgdorff MA, Bartelds B, Dickinson MG, Boersma B, Weij M, Zandvoort A, Sillje HH, Steendijk P, de Vroomen M, Berger RM. Sildenafil enhances systolic adaptation, but does not prevent diastolic dysfunction, in the pressure-loaded right ventricle. *Eur J Heart Fail* 14: 1067–1074, 2012.

Borgdorff MA, Bartelds B, Dickinson MG, van Wiechen MP, Steendijk P, de Vroomen M, Berger RM. Sildenafil treatment in established right ventricular dysfunction improves diastolic function and attenuates interstitial fibrosis independent from afterload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1;307:H361-9. 2014.

Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circ.* 115:3213–3223. 2007.

Broderick TL, King TM. Upregulation of GLUT-4 in right ventricle of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Med Sci Monit.* 14: BR261-4. 2008.

Brown AJM, Gandy S, McCrimmon R, Houston JG, Struthers AD, Lang CC. A randomized controlled trial of dapagliflozin on left ventricular hypertrophy in people with type two diabetes: the DAPA-LVH trial. *Eur Heart J.* 41:3421-3432. 2020.

Brown AJM, Lang C, McCrimmon R, Struthers A. Does dapagliflozin regress left ventricular hypertrophy in patients with type 2 diabetes? A prospective, double-blind, randomised, placebo-controlled study. *BMC Cardiovasc Disord.* 17:229. 2017.

Brunner NW, Skhiri M, Fortenko O, Hsi A, Haddad F, Khazeni N, Zamanian RT. Impact of insulin resistance on ventricular function in pulmonary arterial hypertension. *J Heart Lung Transplant* 33: 721-726, 2014.

Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation.*128, 388-400. 2013.

Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol.* 184:409-20. 2000.

Cassady SJ, Ramani GV. Right Heart Failure in Pulmonary Hypertension. *Cardiol Clin.* 38:243-255. 2020.

Castro-Juárez CJ, Ramírez-García SA, Villa-Ruano N, García-Cruz D. Epidemiología genética sobre las teorías causales y la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 2. *Gac Med Mex.* 153:864-874. 2017.

Cesarini V, Pisano C, Rossi G, Balistreri CR, Botti F, Antonelli G, Ruvolo G, Jannini EA, Dolci S. Regulation of PDE5 expression in human aorta and thoracic aortic aneurysms. *Sci Rep.* 9:12206. 2019.

Cohen JL, Nees SN, Valencia GA, Rosenzweig EB, Krishnan US. Sildenafil use in children with Pulmonary Hypertension. *J Pediatr.* 2019;205:29–34.e1.

Corrado PA, Barton GP, Francois CJ, Wieben O, Goss KN. Sildenafil administration improves right ventricular function on 4D flow MRI in young adults born premature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 320:H2295-H2304. 2021.

Das A, Durrant D, Salloum FN, Xi L, Kukreja RC. PDE5 inhibitors as therapeutics for heart disease, diabetes and cancer. *Pharmacol Ther.* 147:12-21. 2015.

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

Dhaliwal J, Dhaliwal N, Akhtar A, Kuhad A, Chopra K. Beneficial effects of ferulic acid alone and in combination with insulin in streptozotocin induced diabetic neuropathy in Sprague Dawley rats. *Life Sci.* 15;255:117856. 2020.

Di Salvo TG. Pulmonary hypertension and right ventricular failure in left ventricular systolic dysfunction. *Curr Opin Cardiol.* 27:262-72. 2012.

Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, Dao K, Copeland RJ, Despa F, Hart GW, Ripplinger CM, Bers DM. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature.*502, 372-6. 2013.

Escudero DS, Pérez NG, Díaz RG. Myocardial Impact of NHE1 Regulation by Sildenafil. *Front Cardiovasc Med.* 8:617519. 2021.

Fang K, Fu W, Beardsley AR, Sun X, Lisanti MP, Liu J. Overexpression of Caveolin-1 Inhibits Endothelial Cell Proliferation by Arresting the Cell Cycle at G0/G1 Phase. *Cell Cycle.* 6: 199-204. 2007.

Felix NS, de Mendonça L, Braga CL, da Silva JS, Samary CDS, Vieira JB, Cruz F, Rocha NN, Zapata-Sudo G, Rocco PRM. Effects of the FGF receptor-1 inhibitor, infogratinib, with or without sildenafil, in experimental pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol.* 176:4462–73. 2019.

Fernandes AM, Andrade AC, Barroso ND, Borges IC, Carvalho-Andrade D, Rodrigues ES, Guimarães LC, Durães AR, Borges SM, Aras R. The immediate effect of sildenafil on right ventricular function in patients with heart failure measured by cardiac magnetic resonance: A randomized control trial. *PLOS ONE,* 10. 2015.

Galiè N, Hoepfer MM, Humbert M. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 34: 1219–1263. 2009

Galiè N, Humbert M, Vachieri JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoepfer M. ESC Scientific Document Group. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J.* 37(1):67-119. 2016.

Galiè N, McLaughlin VV, Rubin LJ, Simonneau G. An overview of the 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension. *Eur Respir J.* 53:1802148. 2019.

Galiè N., Ghofrani H. A., Torbicki A. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine.* 353:2148–2157. 2005

García-González M, Vallejo-Ruiz V, López-López G. La hipertensión pulmonar: una complicación de la diabetes mellitus. *Elementos* 123; 35-39. 2021.

García-González MA, Vallejo-Ruiz V, Atonal-Flores F, Flores-Hernandez J, Torres-Ramírez O, Díaz-Fonsecae A, Perez Vizcaino F, Lopez-Lopez JG. Sildenafil prevents right ventricular hypertrophy and improves heart rate variability in rats with pulmonary hypertension secondary to experimental diabetes. *Clin Exp Hypertens.* 20:1-11. 2022.

García-González MA. Efecto del sildenafil sobre la hipertensión arterial pulmonar de ratas diabéticas. Tesis de maestría. 1-141. 2017.

Giannetta E, Isidori AM, Galea N, Carbone I, Mandosi E, Vizza CD, Naro F, Morano S, Fedele F, Lenzi A. Chronic Inhibition of cGMP Phosphodiesterase 5A Improves Diabetic Cardiomyopathy, A Randomized, Controlled Clinical Trial Using Magnetic Resonance Imaging With Myocardial Tagging. *Circulation.* 125: 2323-2333. 2012

Gorter TM, Streng KW, van Melle JP, Rienstra M, Dickinson MG, Lam CSP, Hummel YM, Voors AA, Hoendermis ES, van Veldhuisen DJ. Diabetes Mellitus and Right Ventricular Dysfunction in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Am J Cardiol.* 121:621-627. 2018.

Grünig E, Peacock AJ. Imaging the heart in pulmonary hypertension: an update. *Eur Respir Rev.* 24:653-64. 2015.

Guazzi M. Pulmonary hypertension and heart failure: a dangerous liaison. *Heart Fail Clin.* 14:297–309. 2018.

Hansmann G, Wagner RA, Schellong S, Perez VA, Urashima T, Wang L, Sheikh AY, Suen RS, Stewart DJ, Rabinovitch M. Pulmonary arterial hypertension is linked to insulin resistance and reversed by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Circulation.* 115: 1275-1284, 2007.

Hao PP, Yang JM, Zhang MX, Zhang K, Chen YG, Zhang C, Zhang Y. Angiotensin-(1-7) treatment mitigates right ventricular fibrosis as a distinctive feature of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 308:H1007-19. 2015.

Hemnes AR, Champion HC. Sildenafil, a PDE5 inhibitor, in the treatment of pulmonary hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 4:293-300. 2006.

Humbert M, Joseph P, Lynch II. Pulmonary hypertension. *Lun Biol Health Dis.* 236: 1-497. 2009.

Hutchings DC, Anderson SJ, Caldwell J, Trafford AW. Phosphodiesterase-5 inhibitors and the heart: compound cardioprotection? *Heart.* 104:1244–1250. 2018.

Instituto Mexicano del Seguro Social. Diagnóstico y Tratamiento de la Hipertensión Arterial Primaria en el Adulto. Guía de la práctica clínica GPC. IMSS-433-11. 2010.

Instituto Mexicano del Seguro Social. Diagnóstico y Tratamiento Farmacológico de la Diabetes Mellitus Tipo 2 en el Primer Nivel de Atención. Guía de la práctica clínica GPC. IMSS-718-18. 2018.

Internacional Diabetes Federation. Diabetes Atlas. 9th Edition. 2019.

Irwin DC, Garat CV, Crossno JT Jr, MacLean PS, Sullivan TM, Erickson PF, Jackman MR, Harral JW, Reusch JE, Klemm DJ. Obesity-related pulmonary arterial hypertension in rats correlates with increased circulating inflammatory cytokines and lipids and with oxidant damage in the arterial wall but not with hypoxia. *Pulm Circ.* 4:638-53. 2014.

Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Łuczak A, Orszulak-Michalak D. The beneficial impact of fasudil and sildenafil on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats: a hemodynamic and biochemical study. *Pharmacology.* 91:178-84. 2013.

Kayano H, Koba S, Hirano T, Matsui T, Fukuoka H, Tsujita H, Tsukamoto S, Hayashi T, Toshida T, Watanabe N, Hamazaki Y, Geshi E, Murakami M, Aihara K, Kaneko K, Yamada H, Kobayashi Y, Shinke T. Dapagliflozin Influences Ventricular Hemodynamics and Exercise-Induced Pulmonary Hypertension in Type 2 Diabetes Patients - A Randomized Controlled Trial. *Circ J.* 25;84:1807-1817. 2020.

Kayık G, Nurcan S, Tüzün SD. Investigation of PDE5/PDE6 and PDE5/PDE11 selective potent tadalafil-like PDE5 inhibitors using combination of molecular modeling approaches, molecular fingerprint-based virtual screening protocols and structure-based pharmacophore development. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 32: 311-330. 2017

Kayık G, Tüzün NŞ, Durdagi S. Investigation of PDE5/PDE6 and PDE5/PDE11 selective potent tadalafil-like PDE5 inhibitors using combination of molecular modeling approaches, molecular fingerprint-based virtual screening protocols and structure-based pharmacophore development. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 32:311-330. 2017.

- Kelly LE, Ohlsson A, Shah PS.** Sildenafil for pulmonary hypertension in neonates. *Cochrane Database Syst Rev.* 4;8(8):CD005494. 2017.
- Khaing P, Pandit P, Awsare B, Summer R.** Pulmonary Circulation in Obesity, Diabetes, and Metabolic Syndrome. *Compr Physiol.* 10:297-316. 2019.
- Khateeb J, Fuchs E, Khamaisi M.** Diabetes and lung disease: A neglected relationship. *Rev Diabet Stud.* 15:1–15. 2019.
- Kim PK, Hong YJ, Shim HS, Im DJ, Suh YJ, Lee KH, Hur J, Kim YJ, Choi BW, Lee HJ.** Serial T1 mapping of right ventricle in pulmonary hypertension: comparison with histology in an animal study. *J Cardiovasc Magn Reson.* 23:64. 2021.
- Kiso H, Ohba T, Iino K, Sato K, Terata Y, Murakami M, Ono K, Watanabe H, Ito H.** Sildenafil prevents the up-regulation of transient receptor potential canonical channels in the development of cardiomyocyte hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 436:514-8. 2013.
- Koka S, Das A, Salloum FN, Kukreja RC.** Phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil attenuates oxidative stress and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in type 2 diabetic mice. *Free Radic Biol Med.* 60:80-8. 2013.
- Korkmaz-Icöz S, Radovits T, and Szabó G.** Targeting phosphodiesterase 5 as a therapeutic option against myocardial ischaemia/reperfusion injury and for treating heart failure. *British Journal of Pharmacology,* 175: 223–231. 2018.
- Kosmala W, Colonna P, Przewlocka-Kosmala M, Mazurek W.** Right ventricular dysfunction in asymptomatic diabetic patients. *Diabetes Care.* 27:2736-8. 2004.
- Kosmala W, Kucharski W, Przewlocka-Kosmala M, Mazurek W.** Comparison of left ventricular function by tissue Doppler imaging in patients with diabetes mellitus without systemic hypertension versus diabetes mellitus with systemic hypertension. *Am J Cardiol.* 94; 395-9. 2004.
- Kosmala W, Przewlocka-Kosmala M, Mazurek W.** Subclinical right ventricular dysfunction in diabetes mellitus--an ultrasonic strain/strain rate study. *Diabet Med.* 24:656-63. 2007.
- Kukreja RC, Salloum FN, Das A.** Role of cGMP Signaling and Phosphodiesterase-5 inhibitors in Cardioprotection. *Journal of the American College of Cardiology.* 59:1921–1927. 2012
- Ladha F, Bonnet S, Eaton F, Hashimoto K, Korbitt G, Thébaud B.** Sildenafil improves alveolar growth and pulmonary hypertension in hyperoxia-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 172:750-6. 2005.
- Lan NSH, Massam BD, Kulkarni SS, LangCC.** Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment. *Diseases.* 6, 38. 2018.
- Lang IM, Simonneau G, Pepke-Zaba JW, Mayer E, Ambrož D, Blanco I, Torbicki A, Mellekjaer S, Yaici A, Delcroix M.** Factors associated with diagnosis and operability of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. A case-control study. *Thromb Haemost.* 110:83–91. 2013.
- Leal MAS, Aires R, Pandolfi T, Marques VB, Campagnaro BP, Pereira TMC, Meyrelles SS, Campos-Toimil M, Vasquez EC.** Sildenafil reduces aortic endothelial dysfunction and structural damage in spontaneously hypertensive rats: Role of NO, NADPH and COX-1 pathways. *Vascul Pharmacol.* 124:106601. 2020.
- Lee DI, Kass DA.** Phosphodiesterases and cyclic GMP regulation in heart muscle. *Physiology (Bethesda).* 27:248-58. 2012.
- Lee MY, Tsai KB, Hsu JH, Shin SJ, Wu JR, Yeh JL.** Liraglutide prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by suppressing ET-1 and enhancing eNOS/sGC/PKG pathways. *Sci Rep* 6: 31788, 2016.

- Lende M, Rijhsinghani A.** Gestational Diabetes: Overview with Emphasis on Medical Management. *Int J Environ Res Public Health*. 17:9573. 2020.
- Lenzen S.** The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 51:216–226. 2007.
- Li T, Li G, Guo X, Li Z, Yang J, Sun Y.** The influence of diabetes and prediabetes on left heart remodeling: A population-based study. *J Diabetes Complications*. 35:107771. 2021.
- Li YL, Li YQ, Zeng FQ, Lin XY, Li XT, Ren XQ, Yang DL.** Sildenafil improves right ventricular remodelling in monocrotaline-induced rats by decreasing myocardial apoptosis and activating peroxisome proliferator-activated receptors. *J Pharm Pharmacol*. 73:145–51. 2021.
- Lin CS, Chow S, Lau A, Tu R, Lue F.** Human PDE5A gene encodes three PDE5 isoforms from two alternate promoters. *International Journal of Impotence Research*. 14; 15–24. 2002.
- Lin CS, Xin Z, Namiki M, Albersen M, Muller D, Lue TF.** Direct androgen regulation of PDE5 gene or the lack thereof. *Int J Impot Res*. 25:81-5. 2013.
- Lin CS.** Tissue expression, distribution, and regulation of PDE5. *Int J Impot Res*. 1:S8-S10. 2004.
- Lin X, Yang P, Reece EA, Yang P.** Pregestational type 2 diabetes mellitus induces cardiac hypertrophy in the murine embryo through cardiac remodeling and fibrosis. *Am J Obstet Gynecol*. 217:216.e1-216.e13. 2017.
- Linssen PBC, Veugen MGJ, Henry RMA, van der Kallen CJH, Kroon AA, Schram MT, Brunner-La Rocca HP, Stehouwer CDA.** Associations of (pre)diabetes with right ventricular and atrial structure and function: the Maastricht Study. *Cardiovasc Diabetol*. 19:88. 2020.
- Litwin L, Sundholm JKM, Rönö K, Koivusalo SB, Eriksson JG, Sarkola T.** Transgenerational effects of maternal obesity and gestational diabetes on offspring body composition and left ventricle mass: the Finnish Gestational Diabetes Prevention Study (RADIEL) 6-year follow-up. *Diabet Med*. 37:147-156. 2020.
- López-López G, Tepox Galicia AY, Atonal Flores F, Flores Hernández J, Pérez Vizcaino F, Villa Mancera AE, Miguél GG, Reynoso Palomar A.** Echocardiographic follow-up to right ventricular modifications in secondary pulmonary hypertension to diabetes in rats. *Clin Exp Hypertens*. 43:242-253. 2021.
- López-López JG, Moral J, Frazziano G, Gómez MJ, Flores J, Monjaraz E, Cogolludo A, Pérez-Vizcaino F.** Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 295, L727-L732. 2008.
- López-López JG, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A, Ibarra M, Zaragoza-Arnaez F, Tamargo J.** Nitric oxide- and nitric oxide donors- induced relaxation and its modulation by oxidative stress in piglet pulmonary arteries. *Br. J. Pharmacol*. 133; 615-624. 2001.
- López-López, Moral-Sanz J, Frazziano G, Gomez-Villalobos MJ, Moreno L, Menendez C, Flores-Hernandez J, Lorente JA, Cogolludo A, Perez-Vizcaino F.** Type 1 Diabetes-Induced Hyper-Responsiveness to 5-Hydroxytryptamine in Rat Pulmonary Arteries via Oxidative Stress and Induction of Cyclooxygenase-2. *JPET*. 359; 123-145. 2011.
- Luo L, Dai DZ, Cheng YS, Zhang Q, Yuan WJ, Dai Y.** Sildenafil improves diabetic vascular activity through suppressing endothelin receptor A, iNOS and NADPH oxidase which is comparable with the endothelin receptor antagonist CPU0213 in STZ-injected rats. *J Pharm Pharmacol*. 63:943-51. 2011.
- Madej T, Lanczycki CJ, Zhang D, Thiessen PA, Geer RC, Marchler-Bauer A, Bryant SH.** " MMDB and VAST+: tracking structural similarities between macromolecular complexes. *Nucleic Acids Res*. 42(Database issue):D297-303. 2014.

Mahdavi N, Joukar S, Najafipour H, Asadi-Shekaari M. The promising effect of barberry (Zereshk) extract against experimental pulmonary microvascular remodeling and hypertension: A comparison with sildenafil. *Pharm Biol.* 54:509-15. 2016.

McLaughlin V, Galie N, Barbera JA, Frost A, Ghofrani H. A comparison of characteristics and outcomes of patients with atypical and classical pulmonary arterial hypertension from the AMBITION trial. Denver, Colorado, USA. ATS Conference. Proceedings of the Mini Symposium. 2015.

McLure LE, Peacock AJ. Cardiac magnetic resonance imaging for the assessment of the heart and pulmonary circulation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 33:1454-66. 2009.

Meng Q, Lai YC, Kelly NJ, Bueno M, Baust JJ, Bachman TN, Goncharov D, Vanderpool RR, Radder JE, Hu J, Goncharova E, Morris AM, Mora AL, Shapiro SD, Gladwin MT. Development of a Mouse Model of Metabolic Syndrome, Pulmonary Hypertension, and Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 56:497-505. 2017.

Miao Y, Zhang W, Zhong Y, Ma X. Diastolic function of the right ventricle is impaired in experimental type 2 diabetic rat models. *Turk J Med Sci.* 44:448-53. 2014.

Monzo L, Reichenbach A, Al-Hiti H, Borlaug BA, Havlenova T, Solar N, Tupy M, Ters J, Kautzner J, Melenovsky V. Acute Unloading Effects of Sildenafil Enhance Right Ventricular-Pulmonary Artery Coupling in Heart Failure. *J Card Fail.* 27:224-232. 2021.

Morales-Cano D, Callejo M, Barreira B, Mondejar-Parreño G, Esquivel-Ruiz S, Ramos S, Martín MÁ, Cogolludo A, Moreno L, Perez-Vizcaino F. Elevated pulmonary arterial pressure in Zucker diabetic fatty rats. *PLoS One.* 14(1):e0211281. 2019.

Moral-Sanz J, Lopez-Lopez JG, Menendez C, Moreno E, Barreira B, Morales-Cano D, Moreno L. Different patterns of pulmonary vascular disease induced by type 1 diabetes and moderate hypoxia in rats. *Experimental physiology,* 97(5), 676-686. 2012.

Moral-Sanz J, Menendez C, Moreno L, Moreno E, Cogolludo A, Perez-Vizcaino F. Pulmonary arterial dysfunction in insulin resistant obese Zucker rats. *Respir Res.* 12:51. 2011

Movahed M-R, Hashemzadeh M, Jamal MM. The prevalence of pulmonary embolism and pulmonary hypertension in patients with type II diabetes mellitus. *Chest* 128: 3568-3571, 2005.

Mulvaney EP, Reid HM, Bialesova L, Mendes-Ferreira P, Adão R, Brás-Silva C, Kinsella BT. Efficacy of the thromboxane receptor antagonist NTP42 alone, or in combination with sildenafil, in the sugen/hypoxia-induced model of pulmonary arterial hypertension. *Eur J Pharmacol.* 15:889: 173658. 2020.

Nagendran J, Archer SL, Soliman D, Gurtu V, Moudgil R, Haromy A, St Aubin C, Webster L, Rebeyka IM, Ross DB, Light PE, Dyck JR, Michelakis ED. Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation.* 116:238-48. 2007.

Nahar S, Ahmed CM, Shakil SS. Echocardiographic Evaluation of Right Ventricular Function in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Mymensingh Med J.* 28:370-377. 2019

National Center for Biotechnology Information (NCBI), Gene. PDE5A phosphodiesterase 5A [Homo sapiens (human)]. Gene ID: 8654, Acceso en octubre 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=8654>. 2022.

National Center for Biotechnology Information (NCBI), GeneBank. Homo sapiens chromosome 4, GRCh38.p13 Primary Assembly. Acceso en octubre 2022. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000004.12?report=genbank&from=119494403&to=119628804&strand=true. 2022.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Crystal Structure Of Pde5 In Complex With Inhibitor 5r. Structure Summary MMDB. Acceso en octubre del 2022. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d/full.html?&mmdbid=121317&bu=1&showanno=1&source=full-feature>. 2022.

Nunoda S, Genda A, Sugihara N, Nakayama A, Mizuno S, Takeda R. Quantitative approach to the histopathology of the biopsied right ventricular myocardium in patients with diabetes mellitus. *Heart Vessels*. 1:43-7. 1985.

Oikonomou E, Mourouzis K, Fountoulakis P, Papamikroulis GA, Siasos G, Antonopoulos A, Vogiatzi G, Tsalamadris S, Vavuranakis M, Tousoulis D. Interrelationship between diabetes mellitus and heart failure: the role of peroxisome proliferator-activated receptors in left ventricle performance. *Heart Fail Rev*. 23:389-408. 2018.

Pan M, Han Y, Si R, Guo R, Desai A, Makino A. Hypoxia-induced pulmonary hypertension in type 2 diabetic mice. *Pulm Circ*. 7:175-185. 2017.

Patel D, Lakhkar A, Wolin MS. Redox Mechanisms Influencing cGMP Signaling in Pulmonary Vascular Physiology and Pathophysiology. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 967, 227–240. 2017.

Perez-Vizcaino F, Cogolludo A, Moreno L. Reactive oxygen species signaling in pulmonary vascular smooth muscle. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 174: 212–220. 2010.

Popov LD. Mitochondrial networking in diabetic left ventricle cardiomyocytes. *Mitochondrion*. 34:24-31. 2017.

Portillo K, Santos S, Madrigal I, Blanco I, Paré C, Borderías L, Peinado VI, Roca J, Milà M, Barberà JA. Estudio del gen BMR2 en pacientes con hipertensión arterial pulmonar [Study of the BMR2 gene in patients with pulmonary arterial hypertension]. *Arch Bronconeumol*. 46:129-34. 2010.

Pugh ME, Robbins IM, Rice TW, West J, Newman JH, Hemnes AR. Unrecognized glucose intolerance is common in pulmonary arterial hypertension. *J Heart Lung Transplant*. 30: 904–911. 2011

Rai N, Veeroju S, Schymura Y, Janssen W, Wietelmann A, Kojonazarov B, Weissmann N, Stasch JP, Ghofrani HA, Seeger W, Schermuly RT, Novoyatleva T. Effect of Riociguat and Sildenafil on Right Heart Remodeling and Function in Pressure Overload Induced Model of Pulmonary Arterial Banding. *Biomed Res Int*. 3;2018:3293584. 2018.

Rajagopal S, Yu YA. The Pathobiology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Cardiol Clin*. 40:1-12. 2022.

Rajagopal S, Yu YA. The Pathobiology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Cardiol Clin*. 40:1-12. 2022.

Rashid J, Patel B, Nozik-Grayck E, McMurtry IF, Stenmark KR, Ahsan F. Inhaled sildenafil as an alternative to oral sildenafil in the treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH). *J Control Release*. 250:96–106. 2017.

Ravichandran AK, LaRue SJ, Novak E, Joseph SA, Schilling JD. Sildenafil in Left Ventricular Assist Device Is Safe and Well-Tolerated. *ASAIO J*. 64:280-281. 2018.

Ribaud G, Pagano MA, Bova S, Zagotto G. New Therapeutic Applications of Phosphodiesterase 5 Inhibitors (PDE5-Is). *Curr Med Chem*. 23:1239-49. 2016.

Romaní-Pérez M, Outeiriño-Iglesias V, Moya CM, Santisteban P, González-Matías LC, Vigo E, Mallo F. Activation of the GLP-1 Receptor by Liraglutide Increases ACE2 Expression, Reversing Right Ventricle Hypertrophy, and Improving the Production of SP-A and SP-B in the Lungs of Type 1 Diabetes Rats. *Endocrinology*. 156:3559-69. 2015.

Santiago-Vacas E, García-Lunar I, Solanes N, Dantas AP, Ascaso M, Jimenez-Trinidad FR, Ramirez J, Fernández-Friera L, Galán C, Sánchez J, Sabaté M, Pérez-Villa F, Rigol M, Pereda

D, Ibañez B, García-Álvarez A. Effect of sildenafil on right ventricular performance in an experimental large-animal model of postcapillary pulmonary hypertension. *Transl Res.* 228:64-75. 2021.

Shah MS, Brownlee M. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. *Circ Res.* 18, 1808-29. 2016.

Shamah-Levy T, Vielma-Orozco E, Heredia-Hernández O, Romero-Martínez M, Mojica-Cuevas J, Cuevas-Nasu L, Santaella-Castell JA, Rivera-Dommarco J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2020.

Sharma M, Suero-Abreu GA, Neupane R, Kim B. Role of Phosphodiesterase-5 Inhibitors in Acute Right Ventricular Failure Due to Pulmonary Embolism. *Am J Case Rep.* 20:1144-1147. 2019.

Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, Williams PG, Souza R. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, 53, 1801913. 2019.

Singh JSS, Mordi IR, Vickneson K, Fathi A, Donnan PT, Mohan M, Choy AMJ, Gandy S, George J, Khan F, Pearson ER, Houston JG, Struthers AD, Lang CC. Dapagliflozin Versus Placebo on Left Ventricular Remodeling in Patients With Diabetes and Heart Failure: The REFORM Trial. *Diabetes Care.* 43:1356-1359. 2020.

Smiljić S, Nestorović V, Savić S. Modulatory role of nitric oxide in cardiac performance. *Med Pregl.* 67:345-52. 2014.

Su Jb, Yang Xh, Zhang Xi, Cai HI, Huang HY, Zhao LH. The association of long-term glycaemic variability versus sustained chronic hyperglycaemia with heart rate-corrected QT interval in patients with type 2 diabetes. *PLoS ONE* 12(8): e0183055. 2017.

Sui DX, Zhou HM, Wang F, Zhong M, Zhang W, Ti Y. Cell death-inducing DFF45-like effector C gene silencing alleviates pulmonary vascular remodeling in a type 2 diabetic rat model. *J Diabetes Investig.* 9:741-752. 2018.

Tadic M, Cuspidi C. Left atrial function in diabetes: does it help? *Acta Diabetol.* 58:131-137. 2021.

Takahashi T, Yoshihisa A, Sugimoto K, Yokokawa T, Misaka T, Kaneshiro T, Oikawa M, Kobayashi A, Nakazato K, Ishida T, Takeishi Y. Associations between diabetes mellitus and pulmonary hypertension in chronic respiratory disease patients. *PLoS One.* 9;13:e0205008. 2018.

Thenappan T, Chan SY, Weir EK. Role of extracellular matrix in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 315:H1322-H1331. 2018-B.

Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, Archer SL. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ.* 360:j5492. 2018.

Thenappan T, Weir EK. Pulmonary arterial hypertension and sex in the right ventricle: it is an interesting picture! *Am J Respir Crit Care Med.* 202:928–29. 2020.

Tian L, Potus F, Wu D, Dasgupta A, Chen KH, Mewburn J, Lima P, Archer SL. Increased Drp1-Mediated Mitochondrial Fission Promotes Proliferation and Collagen Production by Right Ventricular Fibroblasts in Experimental Pulmonary Arterial Hypertension. *Front Physiol.* 9:828. 2018.

Touyz RM, Montezano AC. Angiotensin-(1-7) and Vascular Function: The Clinical Context. *Hypertension.* 71:68-69. 2018. Erratum in: *Hypertension.* 71:e9. 2018.

Trammell AW, Hemnes AR, Tseng V, Shah AJ, Phillips LS, Hart CM. Influence of Body Weight and Diabetes Mellitus in Patients With Pulmonary Hypertension. *Am J Cardiol.* 134:130-137. 2020.

U.S. Food and Drug Administration (FDA). Highlights of prescribing information. VIAGRA® (sildenafil citrate) tablets, for oral use Initial U.S. Approval: 1998. ID: 3466301. 2014.

Uniprot. cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase. UniProtKB-O76074 (PDE5A_HUMAN). Acceso en septiembre del 2022. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprot/O76074>. 2022.

Vázquez Garza E, Bernal Ramírez J, Jerjes Sánchez C. Resveratrol Prevents Right Ventricle Remodeling and Dysfunction in Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension with a Limited Improvement in the Lung Vasculature. *Oxid Med Cell Longev.* 2020: 1841527. 2020.

Veneri MA, Barbagallo F, Fiore D, De Gaetano R, Giannetta E, Sbardella E, Pozza C, Campolo F, Naro F, Lenzi A, Isidori AM. PDE5 Inhibition Stimulates Tie2-Expressing Monocytes and Angiopoietin-1 Restoring Angiogenic Homeostasis in Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 104(7):2623-2636. 2019.

Vizza CD, Sastry BK, Safdar Z, Harnisch L, Gao X, Zhang M, Lamba M, Jing ZC. Efficacy of 1, 5, and 20 mg oral sildenafil in the treatment of adults with pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind study with open-label extension. *BMC Pulm Med.* 17(1):44. 2017.

Vlassara H, Palace M. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med.* 251:87–101. 2002.

Vonk Noordegraaf A, Westerhof BE, Westerhof N. The relation ship between the right ventricle and its load in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 69:236–43. 2017.

Wallis RM. The pharmacology of sildenafil, a novel and selective inhibitor of phosphodiesterase (PDE) type 5. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 114 Suppl 1:22P-26P. 1999.

Wang H, Robinson H, Ke H. Conformation changes, N-terminal involvement, and cGMP signal relay in the phosphodiesterase-5 GAF domain. *J Biol Chem.* 3;285:38149-56. 2010.

Weber KT, Brilla CG, Campbell SE, Zhou G, Matsubara L, Guarda E. Pathologic hypertrophy with fibrosis: the structural basis for myocardial failure. *Blood Press.* 1:75–85. 1992.

Whitaker ME, Nair V, Sinari S, Dherange PA, Natarajan B, Trutter L, Brittain EL, Hemnes AR, Austin ED, Patel K. Diabetes mellitus associates with increased right ventricular afterload and remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am J Med.* 131, 702.e7-702.e13. 2018.

Widya RL, van der Meer RW, Smit JW, Rijzewijk LJ, Diamant M, Bax JJ, de Roos A, Lamb HJ. Right ventricular involvement in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care.* 36:457-62. 2013.

Wilkins MR, Wharton J, Grimminger F. Phosphodiesterase inhibitors for the treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 32: 198–209. 2008.

Wilkins MR. Pulmonary hypertension: the science behind the disease spectrum. *Eur Respir Rev.* 21,19-26. 2012.

Wortel RC, Mizrahi A, Li H, Markovsky E, Enyedi B, Jacobi J, Brodsky O, Cao J, Lippert AR, Incrocci L, Mulhall JP, Haimovitz-Friedman A. Sildenafil Protects Endothelial Cells From Radiation-Induced Oxidative Stress. *J Sex Med.* 16:1721-1733. 2019.

Yan LJ. The Nicotinamide/Streptozotocin Rodent Model of Type 2 Diabetes: Renal Pathophysiology and Redox Imbalance Features. *Biomolecules.* 12:1225. 2022.

Yang J, Li X, Al-Lamki RS, Wu C, Weiss A, Berk J, Schermuly RT, Morrell NW. Sildenafil potentiates bone morphogenetic protein signaling in pulmonary arterial smooth muscle cells and in experimental pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 33:34-42. 2013.

Yoshiyuki R, Tanaka R, Fukushima R, Machida N. Preventive effect of sildenafil on right ventricular function in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Exp Anim.* 65:215–22. 2016.

Yu Q, Chan SY. Mitochondrial and Metabolic Drivers of Pulmonary Vascular Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension. *Adv Exp Med Biol.* 967:373-383. 2017.

Zhang W, Liu CY, Ji LN, Wang JG; ATTEND investigators. Blood pressure and glucose control and the prevalence of albuminuria and left ventricular hypertrophy in patients with hypertension and diabetes. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 22:212-220. 2020.

Apéndice A

Protocolo para tinción con hematoxilina y eosina

1. Hidratación

- Xileno 3 cambios de 10 min c/u.
- Etanol absoluto 3 cambios de 5 min c/u.
- Etanol al 96% 3 cambios de 5 min c/u.
- Etanol al 80% por 1.5 min.

2. Tinción

- Colocar laminillas en hematoxilina por 1.5 min.
- Sumergir en agua por 2.5 min para eliminar el exceso de colorante y virar.
- Colocar laminillas en eosina por 15 segundos.
- Eliminar el exceso de colorante en agua corriente.

3. Deshidratación

- Etanol al 80% (7 segundos).
- Etanol al 96% (7 segundos).
- Etanol absoluto (7 segundos).
- Etanol-Xilol (7 segundos).
- Xilol (7 segundos).
- Cubrir con resina y colocar el cubreobjetos.

Protocolo para tinción con Rojo 80

1. Hidratación

- Xileno 3 cambios de 10 min c/u.
- Etanol absoluto 3 cambios de 5 min c/u.
- Etanol al 96% 3 cambios de 5 min c/u.
- Etanol al 80% por 1.5 min.

2. Tinción

- Colocar laminillas en rojo 80 al 0.1% en una solución saturada con ácido pícrico por 1 hora.
- Dar dos lavados en agua acidificada al 0.5% con ácido acético.
- Cubrir con resina y colocar el cubreobjetos.

Apéndice B

Artículos publicados durante el periodo doctoral

Sildenafil prevents right ventricular hypertrophy and improves heart rate variability in rats with pulmonary hypertension secondary to experimental diabetes

Miguel Angel Garcia-Gonzalez, Veronica Vallejo-Ruiz, Fausto Atonal-Flores, Jorge Flores-Hernandez, Oswaldo Torres-Ramírez, Alfonso Diaz-Fonsecae, Francisco Perez Vizcaino & Jose Gustavo Lopez-Lopez

To cite this article: Miguel Angel Garcia-Gonzalez, Veronica Vallejo-Ruiz, Fausto Atonal-Flores, Jorge Flores-Hernandez, Oswaldo Torres-Ramírez, Alfonso Diaz-Fonsecae, Francisco Perez Vizcaino & Jose Gustavo Lopez-Lopez (2022): Sildenafil prevents right ventricular hypertrophy and improves heart rate variability in rats with pulmonary hypertension secondary to experimental diabetes, *Clinical and Experimental Hypertension*, DOI: [10.1080/10641963.2022.2050743](https://doi.org/10.1080/10641963.2022.2050743)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10641963.2022.2050743>



Published online: 20 Mar 2022.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 61



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

RESEARCH ARTICLE



Sildenafil prevents right ventricular hypertrophy and improves heart rate variability in rats with pulmonary hypertension secondary to experimental diabetes

Miguel Angel Garcia-Gonzalez^a, Veronica Vallejo-Ruiz^b, Fausto Atonal-Flores^c, Jorge Flores-Hernandez^d, Oswaldo Torres-Ramírez^e, Alfonso Diaz-Fonsecae^f, Francisco Perez Vizcaino^f, and Jose Gustavo Lopez-Lopez^a

^aDepartamento de Farmacia, Benemerita Universidad Autonoma de Puebla, Laboratorio de Farmacia Clinica, Edificio FCQ10, Ciudad Universitaria, Col. Jardines de San Manuel, Puebla, Mexico; ^bInstituto Mexicano del Seguro Social, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Laboratorio de Biología Molecular, Puebla, Mexico; ^cDepartamento de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Medicina, Metepec, Mexico; ^dLaboratorio de Neuromodulación, Benemerita Universidad Autonoma de Puebla, Fisiología, Puebla, Mexico; ^eDepartamento de Farmacia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Químicas, Puebla, Mexico; ^fDepartamento de Farmacología y Toxicología, Universidad Complutense de Madrid, Escuela de Medicina, Puebla, Mexico

ABSTRACT

Chronic treatment with sildenafil (SILD) is an effective protector on the development of cardiovascular complications of pulmonary hypertension (PH) and diabetes. However, to date, no studies have evaluated the effect of SILD on cardiopulmonary pathophysiology during PH secondary to type 1 diabetes. Aim: The present study aimed to evaluate the beneficial effects of chronic SILD treatment on pulmonary arterial pressure, right ventricular hypertrophy (RVH) and cardiac autonomic dysfunction in rats with PH secondary to diabetes. Methodology: Male Sprague Dawley rats were randomly distributed into the control group (saline), diabetic group (60 mg/kg with streptozotocin), SILD-treated control group (20 mg/kg) and SILD-treated diabetic group. Results: After 8 weeks the type 1 diabetic animals presented PH, endothelial dysfunction of the pulmonary arteries, electrocardiographic alterations, RVH and overexpression of phosphodiesterase type 5 in the heart. In type 1 diabetic animals, SILD treatment prevented the development of PH, endothelial dysfunction and RVH. SILD treatment also prevented alterations in the corrected QT period and heart rate variability and prevented overexpression of phosphodiesterase type 5. Conclusion: Our results indicate for the first time that SILD treatment prevents pulmonary arterial endothelial dysfunction, pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy and improves heart rate variability in type 1 diabetic rats.

ARTICLE HISTORY

Received 18 January 2022
Revised 15 February 2022
Accepted 2 March 2022

KEYWORDS

Sildenafil; diabetes mellitus; pulmonary hypertension; right ventricular hypertrophy; cardiac autonomic neuropathy

Introduction

Sildenafil (SILD) is an inhibitor of phosphodiesterase type 5 (PDE5), an enzyme that catalyzes the degradation of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) (1). Inhibition of PDE5 is an effective pharmacological strategy to relax the pulmonary arterial vasculature, through enhancing nitric oxide (NO) signaling and increasing the availability of cGMP (2,3). Therefore, chronic SILD treatment is currently used to reduce pulmonary pressure and to improve the physical capacity of patients with pulmonary hypertension (PH) (4,5). In addition, SILD has shown effectiveness in reducing right ventricular hypertrophy (RVH) and improving cardiac autonomic dysfunction (6,7), which are cardiac complications frequently induced by PH.

On the other hand, in patients with diabetes, SILD has shown effectiveness in reducing infarct size (8), improving cardiac function, and increasing heart rate variability (HRV) (9–11). It is now accepted that patients with diabetes have a higher risk factor for developing PH (12) and aggravation of cardiovascular problems (13). Type 2 diabetes is more prevalent in the population; however, all types of diabetes are associated with cardiovascular problems. The results of our research group have shown

that type 1 diabetic rats induced with streptozotocin develop pulmonary endothelial dysfunction, PH, DVH (14,15), and right ventricular failure (16).

To date, the beneficial effects of chronic SILD treatment on cardiopulmonary complications during PH secondary to type 1 diabetes have not been explored. Therefore, the present study was designed to evaluate the effect of chronic SILD treatment on pulmonary arterial pressure (PAP), RVH and cardiac autonomic dysfunction of rats with PH secondary to type 1 diabetes. Here we demonstrate for first time that chronic SILD treatment prevents the increase in PAP, RVH and cardiac autonomic dysfunction of rats with PH secondary to type 1 diabetes.

Materials and methods

Animals were provided by the vivarium “Claude Bernard,” at the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. The protocol was approved by the Committee for the Care and Use of Laboratory Animals of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (100003977-UALVIEP-19/2) and the study was performed according to the guidelines of the Mexican Official Standard NOM-062-ZOO-1999 (17). Male Sprague Dawley

rats (200–250 g) maintained with food and water *ad libitum*. Four groups were formed from the random distributed of the animals; the control group (CTRL), the control group treated with sildenafil (CTRL/SILD), the diabetic group (DM) and the diabetic group treated with sildenafil (DM/SILD).

Diabetes induction and sildenafil treatment

The blood glucose concentration of all animal groups was determined before the induction of experimental diabetes by the tail-tip prick of the rats and a clinical glucometer (ACCU-CHEK Active, Roche Lab.). Induction of experimental diabetes in the DM and DM/SILD groups was performed by intraperitoneal (i.p.) administration of streptozotocin (STZ) (single dose, 60 mg/kg, Sigma-Aldrich). The CTRL and CTRL/SILD groups were treated with administration of 200 μ L of saline (0.9%, NaCl, i.p.). Rats with blood glucose values ≥ 350 mg/dL 48 h after STZ administration were considered to have experimental diabetes. Additionally, the CTRL/SILD and DM/SILD groups were treated with a daily dose of SILD (20 mg/kg, Pfizer) orally (via a metal ball-tipped gavage), while the CTRL group was treated with a daily dose of 500 μ L of saline (0.9%, NaCl) orally. After the eighth week of treatment, the four experimental groups were employed to obtain the following determinations:

Evaluation of pulmonary arterial pressure

The animals were anesthetized by administration of Ketamine-Xylazine mixture (60 and 4 mg/kg, respectively) via i.p. To obtain PAP, a catheter (polyurethane lumen 3 Fr (1 mm) x 30 cm) was introduced into the right jugular vein until it reached the pulmonary artery. The catheter was connected to a pressure transducer (AD INSTRUMENTS MLT0380/A) and the generated signal was amplified (CIDES AMPLIFIER DCT001) displayed and stored in a computer using LabChart 7.0 software (ADInstruments).

Evaluation of systemic blood pressure

Rats were kept at rest 10 min before and during the determination in a warm and quiet room. Systolic arterial pressure was determined by plethysmographic recording (noninvasive method). The transducer (MLT125/R; ADInstruments) was placed at the base of the rat tail, while the signal was amplified (ML132; ADInstruments), displayed and stored in a computer using LabChart 7.0 software (ADInstruments).

Determination of endothelial function

After PAP determination, the lungs were removed and deposited in Krebs-Henselleit solution (NaCl 118 mM, KCl 4.75 mM, NaHCO₃ 25 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.0 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM and Glucose 11 mM). Pulmonary arteries (PA) were cut into 3 mm long rings without removing the endothelium. The rings were placed inside Ahllin cups with 5 mL of Krebs-Henselleit solution at 37°C and bubbled with carbogen (95% O₂, 5% CO₂) for isometric tension recording. Tension was obtained using a transducer

(GRASS FT-03) coupled to an amplifier (GRASS 7-DAJK) and the signal was observed on a computer with LabChart 7.0 software (ADInstruments). Before drug administration, the preparations were subjected to a basal tension of 0.75 g and a stabilization period of 15 min.

Endothelial function was assessed by acetylcholine (ACh) relaxant capacity and serotonin (5-HT) contractile capacity. One group of rings (of the 4 groups of rats) was given phenylephrine (Phe) (1×10^{-7} M) for the elicitation of a stable 10 min contraction. To obtain the relaxing effect, cumulative concentrations of ACh (1×10^{-9} – 3×10^{-5} M) were applied. To another group of rings (of the 4 groups of rats) 80 mM potassium chloride (KCl) was applied to obtain a stable contraction of 45 min After this period the preparations were washed with Krebs-Henselleit solution to obtain the basal tension. To obtain the contractile effect, cumulative concentrations of 5-HT (1×10^{-9} – 3×10^{-5} M) were applied.

Evaluation of right ventricular hypertrophy

RVH was obtained by the determination of the Fulton index (FI) (18). After PAP determination, the heart was removed, right ventricle (RV), and left ventricle (LV) plus septum (S) were dissected. The two portions were weighed to obtain the ratio of RV wet weight over LV wet weight plus septum (Fulton Index = RV/ LV+S).

Determination of phosphodiesterase type 5 expression

After PAP determination of the animals in the 4 groups, their hearts were extracted for PDE5 detection by western blotting. Total heart protein extracts (30 mg) were separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide) using the Laemmli method on a mini-gel system (Bio-Rad, Mini-Protein). Total proteins were transferred to PVDF membranes at 90 mA for 16 hours. PVDF membranes were blocked with 5% BSA in TBS-T for two hours at room temperature and washed 5 times with TBS-T for 5 min each. They were then incubated with rabbit polyclonal anti-PDE5 antibody (Abcam, ab14672) (1:1000 in TBS-T) overnight at 4°C. Incubation with horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-IgG secondary antibody (Abcam, ab205718) (1:2000 in TBS-T) was performed for two hours at room temperature and washed 10 times for 3 min each with TBS-T. Finally, the bands corresponding to PDE5 were visualized by chemiluminescence (Luminol; Millipore, Western Chemiluminescent HRP Substrate (ECL)) and identified concerning the molecular weight marker with the image obtained with image analysis software (Li-COR, C-Digit blot scanner).

The corresponding bands to PDE5 were quantified by densitometric analysis using image analysis software (Li-COR, C-Digit blot scanner). Endogenous β -actin detected with primary mouse anti- β -actin antibody (mAbcam 8226) (1:2000) and secondary mouse anti-IgG coupled to horseradish peroxidase (Abcam, ab6789) (1:4000) was used as endogenous protein under the same conditions as PDE5. The results for PDE5 were expressed as a percentage concerning the relative expression of β -actin obtained as the average of the quotient of the division of the chemiluminescence value of PDE5 over the same parameter of β -actin.

Table 1. Effect of sildenafil on plasma glucose and body weight before and after 8 weeks of STZ administration.

Parameters	Group	Before the administration of STZ	48 hours after STZ	8 weeks after STZ
BG (mg/dL)	CTRL	98.4 ± 3.0	98 ± 3.9	101.0 ± 2.7
	CTRL/SILD	100.2 ± 4.1	95 ± 3.4	91.8 ± 4.9
	DM	108.8 ± 6.3	427.4 ± 20.5 * ⁺	535.2 ± 17.7 * ⁺
	DM/SILD	102.6 ± 5.5	475.6 ± 48.17 * ⁺	509 ± 24.9 * ⁺
BW (g)	CTRL	277.2 ± 10.7	258.8 ± 8.5	344.0 ± 15.2
	CTRL/SILD	278.2 ± 3.7	232.7 ± 11.9	319.6 ± 16.4
	DM	272.2 ± 9.7	273.0 ± 10.7	213.2 ± 9.7 * ⁺
	DM/SILD	270.6 ± 11.0	272.7 ± 8.5	214.2 ± 15.6 * ⁺

STZ: Streptozotocin; BG: Blood Glucose; BW: Body weight. Results are expressed as the mean ± SEM (n = 9). * indicates P < 0.05 vs CTRL; ⁺ indicates P < 0.05 vs CTRL/SILD. The p-value was calculated using one-way ANOVA test with Bonferroni post hoc.

Obtention of electrocardiographic parameters

Animals were anesthetized by administration of a Ketamine-Xylazine mixture (60 and 4 mg/kg, respectively) via i.p. Three bipolar electrodes oriented according to Einthoven's frontal plane derivative II were used. The signal was amplified with an amplifier (ML132; ADInstruments) and digitized with a data acquisition system (Powerlab 4/35; ADInstruments) using LabChart 7.0 software (ADInstruments). Each recording lasted approximately 60 min, of which the 5 most stable min were analyzed. The RR intervals, heart rate (HR) and QTc period (corrected QT period) were obtained from the electrocardiographic recordings. The RR interval was obtained by determining the time of appearance of the maximum peak of the R wave of the QRS complex minus the time of appearance of the maximum peak of the R wave of the immediately preceding QRS complex. HR was obtained through the inverse of the RR period. The QT period was obtained by determining the time of the end of the T wave minus the onset of the Q wave of the electrocardiogram and was corrected using the RR interval by applying Bazett's formula, where $QTc(\text{ms}) = QT/\sqrt{RR(\text{s})}$.

HRV was obtained by calculating in the time domain and in the frequency domain, as well as by the nonlinear method of electrocardiographic recordings with Kubios-HRV version 2.1 software. 5 min without artifacts (abnormal R-R intervals) was analyzed and HRV was obtained in the time domain, which was determined by calculating the standard deviation of R-R intervals (SDRR), HRV in the frequency domain by obtaining the high oscillations (HF; 0.75 to 2.5 Hz) and low frequency (LF; 0.2 to 0.75 Hz) of the fast Fourier transform and the HRV by a nonlinear method through obtaining the parameters SD1 and SD2 of the Poincaré plot.

Statistical analysis

The results are expressed as the mean ± SEM. A one-way ANOVA test was used and subsequently a Bonferroni post hoc test was applied. P < .05 was considered a significant difference. The maximum effect (Emax) of the drug and the drug concentration producing 50% of Emax (pD₂) was calculated by fitting the individual curves with the logistic equation $E = E_{\text{max}}/1 + e^{-k \cdot ([\text{drug}] - \text{pD}_2)}$. Data processing was performed with Origin Lab 8.5 software.

Results

Effect of streptozotocin administration on blood glucose and body weight in rats

We found that after STZ administration (48 hours), rats in the DM and DM/SILD groups presented blood glucose values above 400 mg/dL. While after the same period, the rats of the CTRL and CTRL/SILD groups did not present significant changes in blood glucose concentration. After STZ administration (48 hours), the body weight of rats in the DM and DM/SILD groups did not show a significant change compared to the body weight of rats in the CTRL and CTRL/SILD groups (Table 1).

Effect of sildenafil treatment on blood glucose concentration and body weight in the diabetic rats

After 8 weeks of SILD treatment, the blood glucose values of rats in the DM/SILD group showed no significant difference with the blood glucose values of rats in the DM group. In the same period of SILD treatment, the blood glucose values of the rats in the CTRL/SILD group also showed no significant difference with the blood glucose values of the rats in the CTRL group, furthermore, we found that the blood glucose value of the rats in the DM group was significantly higher concerning the blood glucose value in the rats in the CTRL group. The blood glucose value in the DM/SILD group rats was significantly higher concerning the blood glucose value in the CTRL/SILD group rats. On the other hand, after 8 weeks of SILD treatment, the body weight of rats in the DM/SILD group did not differ significantly from the body weight of rats in the DM group. In addition, the body weight of rats in the CTRL/SILD group showed no significant difference with the body weight of rats in the CTRL group, while the body weight of rats in the DM group was significantly lower than the body weight of rats in the CTRL group. We also found that the body weight of rats in the DM/SILD group presented a significantly lower value concerning the body weight of rats in the CTRL/SILD group (Table 1).

Effect of sildenafil treatment on pulmonary arterial pressure in diabetic rats

We found that after 8 weeks of SILD treatment the PAP value of rats in the DM/SILD group was significantly lower concerning the PAP value of rats in the DM group, whereas the PAP

value of rats in the CTRL/SILD group was not significantly different concerning the PAP value of the CTRL group. In addition, we found that the PAP value of the rats in the DM group was significantly higher concerning the PAP value of the rats in the CTRL group. We did not find significant changes when comparing the PAP value of rats in the DM/SILD versus CTRL/SILD groups (Figure 1).

Effect of sildenafil treatment on systemic blood pressure of diabetic rats

We found that with 8 weeks of SILD treatment, the systemic blood pressure (SBP) value of rats in the DM/SILD group showed no significant difference concerning the SBP value of rats in the DM group. Also, no significant difference was found in the SBP value of rats in the CTRL/SILD group concerning the SBP value of rats in the CTRL group. No significant difference was found in the SBP value of rats in the DM groups compared to the SBP value of

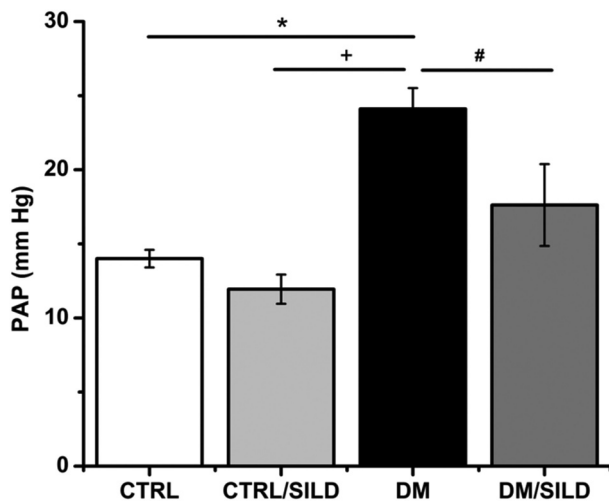


Figure 1. Sildenafil prevents pulmonary arterial hypertension in diabetic rats. Sildenafil treatment prevented the increase in pulmonary arterial pressure during diabetes (DM/SILD) without causing changes in control conditions (CTRL/SILD). Results are expressed as the mean \pm SEM ($n = 9$). * indicates $P < .05$ vs CTRL; + indicates $P < .05$ vs CTRL/SILD; # indicates $P < .05$ vs DM/SILD. The p-value was calculated using a one-way ANOVA test with Bonferroni post hoc.

rats in the CTRL group nor the SBP value of rats in the DM/SILD group compared to the SBP value of rats in the CTRL/SILD group (Table 2).

Effect of sildenafil treatment on the endothelium-dependent vascular tone of pulmonary arteries of diabetic rats

Regarding Ach-induced PA relaxation capacity, we found that after 8 weeks of SILD treatment, the relaxation of the DM/SILD group was significantly greater concerning the relaxation capacity of the DM group and that the relaxation of the CTRL/SILD group showed no significant change concerning the relaxation capacity of the CTRL group. The relaxation of the PA of the rats in the DM group was significantly lower than the relaxation capacity in the PA of the rats in the CTRL group. Furthermore, we found no significant difference between the relaxation of the PA of rats in the DM/SILD versus CTRL/SILD groups (Figure 2).

As for 5-HT-induced contraction of PA (with the same period of SILD treatment), we found that the contractile capacity of the DM/SILD group was significantly lower concerning the contractile capacity of the DM group and that the contractile response of the CTRL/SILD group showed no significant change concerning the contractile response of the CTRL group. We also found that PA contraction of rats in the DM group was significantly higher when compared against PA contraction of rats in the CTRL group, whereas we found no significant difference between PA contraction of rats in the DM/SILD versus CTRL/SILD groups (Figure 2).

With 8 weeks of SILD treatment, the maximum effect (E_{max}) of the relaxation curve in the PA of rats in the DM/SILD group was significantly higher than the E_{max} of the relaxation curve in the PA of rats in the DM group. There were no significant changes in the E_{max} of the relaxation curve in the PA of the rats of the CTRL/SILD group concerning the E_{max} of the relaxation curve in the PA of the rats of the CTRL groups, but there was a significantly lower value in the E_{max} of the relaxation curve in the PA of the DM group concerning the E_{max} of the relaxation curve in the PA of the rats of the CTRL group. We also found no significant changes in the E_{max} of the relaxation curve in the PA of the DM/SILD group rats concerning the E_{max} of the relaxation curve of the CTRL/SILD group. As for the pD_2 of the

Table 2. Sildenafil prevents alterations in electrocardiographic intervals without altering systemic blood pressure in diabetic rats and prevents alteration of heart rate variability.

Parameters	CTRL	CTRL/SILD	DM	DM/SILD
HR (beats/min)	400.14 \pm 5.35	392.82 \pm 9.44	302.59 \pm 4.02*##	368.36 \pm 21.07
RR (ms)	150.36 \pm 2.00	153.54 \pm 3.57	198.80 \pm 2.71*##	166.74 \pm 10.22
QTc (ms)	202.63 \pm 4.6	208.88 \pm 2.5	261.73 \pm 3.5*##	214.49 \pm 3.7
SBP (mmHg)	107.3 \pm 4.4	103.0 \pm 4.8	104.3 \pm 3.1	101.6 \pm 5.0
SDRR (time domain)	7.07 \pm 1.29	6.32 \pm 0.63	3.32 \pm 0.32*##	6.37 \pm 0.59
RMSSD (time domain)	3.73 \pm 0.18	4.12 \pm 0.59	2.52 \pm 0.23*##	4.11 \pm 0.41
LF (frequency domain)	28.45 \pm 4.3	28.12 \pm 3.4	33.43 \pm 4.0*##	20.2 \pm 2.2
HF (frequency domain)	70.83 \pm 4.2	70.72 \pm 3.3	65.63 \pm 4.4*##	78.53 \pm 2.3
LF/HF (frequency domain)	0.32 \pm 0.04	0.4 \pm 0.07	0.61 \pm 0.08*##	0.3 \pm 0.03
SD1 (nonlinear method)	2.67 \pm 0.20	3.00 \pm 0.42	1.21 \pm 0.15*##	2.84 \pm 0.37
SD2 (nonlinear method)	8.73 \pm 0.49	8.90 \pm 0.97	5.08 \pm 0.21*##	8.81 \pm 1.32

HR: Heart Rate; RR: R-R Interval; QTc: QT interval corrected for heart rate; SBP: Systemic Blood Pressure; SDRR: Standard Deviation of RR Intervals; RMSSD: Variance of the RR Intervals; LF: Low-Frequency Oscillations; HF: High-Frequency Oscillations; LF/HF: Ratio of the Two Types of Oscillations; SD1: HRV Short-Term; SD2: HRV Long-Term. Results are expressed as the mean \pm SEM ($n = 9$). * indicates $P < 0.05$ vs. CTRL; # indicates $P < 0.05$ vs DM/SILD; + indicates $P < 0.05$ vs CTRL/SILD. The p-value was calculated using a one-way ANOVA test with Bonferroni post hoc.

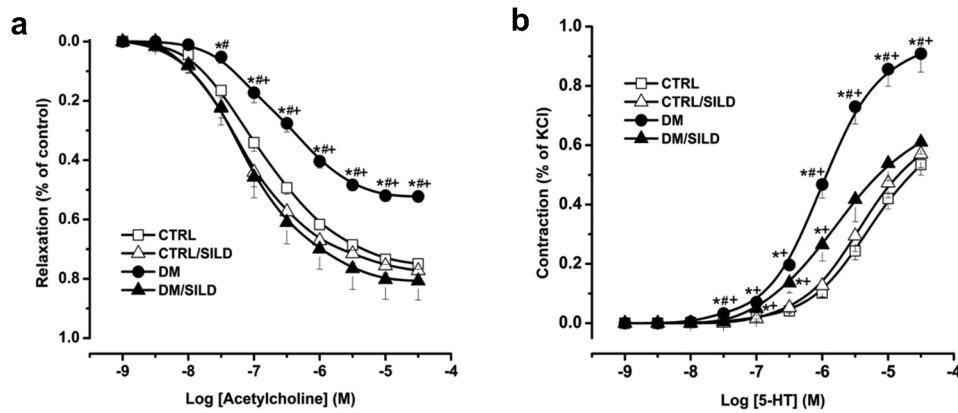


Figure 2. Sildenafil prevents endothelial dysfunction. (A) Endothelium-dependent relaxant effect induced by cumulative concentrations of acetylcholine in pulmonary arteries. (B) Contractile effect of pulmonary arteries induced by cumulative concentrations of serotonin (5-HT). Results are expressed as mean \pm SEM and (n = 9). * indicates $p < .05$ vs CTRL; + indicates $p < .05$ vs CTRL/SILD; # indicates $p < .05$ vs DM/SILD. The p-value was calculated using a one-way ANOVA test with Bonferroni post hoc.

relaxation curve in the PA of the DM/SILD group rats, we found no significant differences concerning the pD_2 of the relaxation curve in the PA of the rats of the DM group. We also did not find significant changes in the pD_2 of the relaxation curve in the PA of the rats of the CTRL/SILD group concerning the pD_2 of the relaxation curve in the PA of the CTRL groups. However, if we found a significantly lower value of the pD_2 of the relaxation curve for the PA of the rats of the DM group concerning the pD_2 of the relaxation curve of the PA of the rats of the CTRL group. When comparing the pD_2 value of the relaxation curves of the PA relaxation curves of rats from the DM/SILD versus CTRL/SILD groups, we found no significant differences (Table 3).

Concerning the 5-HT contraction-response curve (after 8 weeks of SILD treatment), we found that the E_{max} of the contractile curve in the PA of rats in the DM/SILD group was significantly lower than the E_{max} of the contractile curve in the PA of rats in the DM group. Concerning the E_{max} of the 5-HT contractile-response curve in the PA of rats from the CTRL/SILD group, we found no significant changes concerning the E_{max} of the 5-HT contractile-response curve in the PA of rats from the CTRL groups. In the PA of the rats of the DM group, we found that the E_{max} of the contractile curve in the PA of the rats of the CTRL group was significantly higher concerning the E_{max} of the contractile curve in the PA of the rats of the DM/SILD group concerning the E_{max} of the contractile curve

in the PA of the rats of the CTRL/SILD group. Also, we did not find significant changes in the pD_2 of the contractile curve of the PA of the rats in the DM/SILD group concerning the pD_2 of the contractile curve of the PA of the rats in the DM group. We did not find significant changes in the pD_2 of the contractile curve of the PA of rats in the CTRL/SILD group concerning the pD_2 of the contractile curve of the PA of rats in the CTRL group. However, we found a significantly higher value of pD_2 in the contractile curve of the PA of rats in the DM group concerning the pD_2 of the contractile curve of the PA of the rats in the CTRL group. When comparing the pD_2 value of the contractile curves of the PA of rats in the DM/SILD versus CTRL/SILD groups, we found no significant differences (Table 3).

Effect of sildenafil treatment on the Fulton index of diabetic rats

We found that after 8 weeks of SILD treatment, the IF value of the heart of rats in the DM/SILD group was significantly lower concerning the IF value of the heart of rats in the DM group, whereas with the same period of SILD treatment, the IF value of the heart of rats in the CTRL/SILD group was not significantly different concerning the IF value of the hearts of rats in the CTRL group. In addition, we found that the IF value of the heart of the rats in the DM group was significantly higher concerning the IF value of the heart of the rats in the CTRL group, furthermore we found that the IF value of the heart of the rats in the DM/SILD group showed no significant difference concerning the IF value of the hearts of the rats in the CTRL/SILD group (Figure 3).

Effect of sildenafil treatment on phosphodiesterase type 5 expression in diabetic rat hearts

At 8 weeks of SILD treatment, we found that the expression value of PDE5 in the heart of rats in the DM/SILD group was significantly lower concerning the expression value of

Table 3. Effect of sildenafil on affinity and maximum effect of vasomodulators used in the evaluation of pulmonary arterial of diabetic rats.

Drug agonist	Parameter	CTRL	CTRL/SILD	DM	DM/SILD
Ach	E_{max}	0.74 \pm 0.01	0.75 \pm 0.03	0.53 \pm 0.02 ^{*#}	0.81 \pm 0.07
	pD_2	6.92 \pm 0.07	6.64 \pm 0.12	6.12 \pm 0.14 ^{*#}	6.61 \pm 0.07
5-HT	E_{max}	0.59 \pm 0.04	0.58 \pm 0.05	0.92 \pm 0.05 ^{*#}	0.69 \pm 0.01
	pD_2	5.4 \pm 0.07	5.4 \pm 0.08	6.00 \pm 0.03 [*]	5.7 \pm 0.22

Ach: acetylcholine; 5-HT: 5-hydroxytryptamine; E_{max} : maximum effect; pD_2 : log ED_{50} . E_{max} and pD_2 values was calculated with data from the cumulative dose-response curves of the pulmonary arteries. Results are expressed as the mean \pm SEM (n = 9). * indicates $P < 0.05$ vs CTRL, + indicates $P < 0.05$ vs CTRL/SILD, # indicates $P < 0.05$ vs DM/SILD. The p-value was calculated using one-way ANOVA test with Bonferroni post hoc.

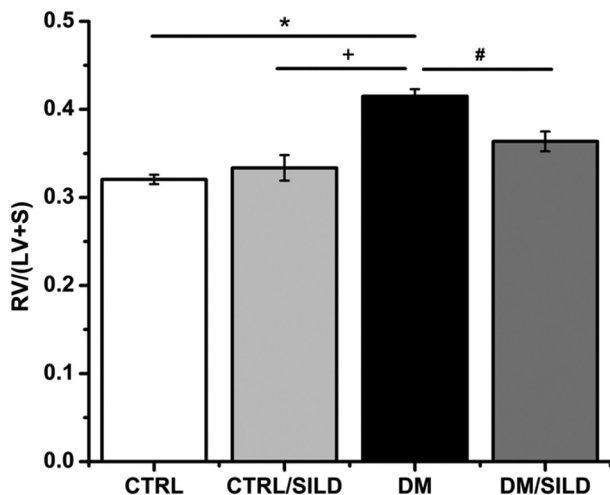


Figure 3. Sildenafil prevents right ventricular hypertrophy in diabetic rats. The DM/SILD group shows that treating diabetic rats with sildenafil prevents right ventricular hypertrophy (evaluated with Fulton Index; ratio: RV/LV+S) and that the treatment does not modify ventricular mass under control conditions (CTRL/SILD). Results are expressed as the mean \pm SEM (n = 5). * indicates $P < .05$ vs CTRL; + indicates $P < .05$ vs CTRL/SILD; # indicates $P < .05$ vs DM/SILD. The p-value was calculated using one-way ANOVA test with Bonferroni post hoc.

PDE5 in the heart of rats in the DM group, whereas the expression value of PDE5 in the heart of rats in the CTRL/SILD group was not significantly different concerning the expression of PDE5 in the heart of rats in the CTRL group. Furthermore, we found that the PDE5 expression value in the heart of rats in the DM group is significantly higher concerning the PDE5 expression of the heart of rats in the CTRL group, whereas the PDE5 expression value in the heart of rats in the DM/SILD group showed no significant difference concerning the PDE5 expression values in the heart of rats in the CTRL/SILD group (Figure 4).

Effect of sildenafil treatment on electrocardiographic parameters in diabetic rats

We found that after 8 weeks of SILD treatment, the HR value of rats in the DM/SILD group was significantly higher compared to the HR value of rats in the DM group, while the HR value of rats in the CTRL/SILD group, showed no significant difference from the HR of rats in the CTRL group. In addition, we found that the HR value of the rats in the DM group was significantly lower concerning the HR value of the rats in the CTRL group, while the HR value of the rats in the DM/SILD group showed no significant difference concerning the HR values of the rats in the CTRL/SILD groups (Table 2).

At 8 weeks of SILD treatment, we found that the RR interval duration of the rats in the DM/SILD group was significantly shorter concerning the RR interval duration of the rats in the DM group, whereas the RR interval duration of the rats in the CTRL/SILD group showed no significant difference concerning the RR interval duration of the rats in the CTRL group. Additionally, we found that the RR interval duration of rats in the DM group was longer relative to the RR interval duration of rats in the CTRL group. The RR interval duration of the rats in the DM/

SILD group also showed no significant difference with the RR interval value of the rats in the CTRL/SILD group. We also found that the QTc period of the rats in the DM/SILD group was significantly shorter than the QTc period of the rats in the DM groups and that the QTc period of the rats in the CTRL/SILD group was not significantly different from the QTc period of the rats in the CTRL group. In addition, the QTc period of rats in the DM group was longer than the QTc period of rats in the CTRL group and we found no significant difference in the QTc period of rats in the DM/SILD group concerning the QTc period of rats in the CTRL/SILD groups (Table 2).

Effect of sildenafil treatment on heart rate variability in diabetic rats

After 8 weeks of SILD treatment, we found that HRV (in the time domain, in the frequency domain and by the nonlinear method) of rats in the DM/SILD group is significantly higher concerning the HRV value of rats in the DM group. The HRV values of the CTRL/SILD groups were not significantly different concerning the HRV values of the CTRL group rats. We also found that the HRV of the DM group rats was significantly lower concerning the HRV value of the CTRL group rats and that the HRV value of the DM/SILD group rats was not significantly different concerning the HRV values of the CTRL/SILD group rats (Table 2).

Discussion

SILD does not modify blood glucose or body weight in rats with pulmonary hypertension secondary to diabetes

The high blood glucose values of the DM group as a result of STZ administration are in agreement with other studies using a type 1 diabetes model (19,20). The mechanism of STZ on pancreatic β -cells is still controversial, but it is proposed that selective cytotoxicity occurs when it enters the cells through the GLUT-2 transporter generating DNA alkylation and apoptosis (21). As a consequence, insulin production is inhibited resulting in increased blood glucose. Therefore, the cardiopulmonary changes described in this work are a consequence of chronic hyperglycemia (20,22). The blood glucose values of the diabetic group treated with SILD agree with the results obtained in a rat model of type 2 diabetes (23), indicating that SILD does not modify the processes of blood glucose regulation during diabetes. On the other hand, animals in the DM group presented decreased weight gain capacity, resemble to other studies using STZ to generate type 1 diabetes (19,20). Body weight loss has been attributed to decreased skeletal muscle regeneration when insulin levels are low (24,25). We found that treatment with the DM group SILD did not modify the effects of hyperglycemia on body weight loss, indicating that SILD is also not involved in body weight regulation processes during type 1 diabetes (23).

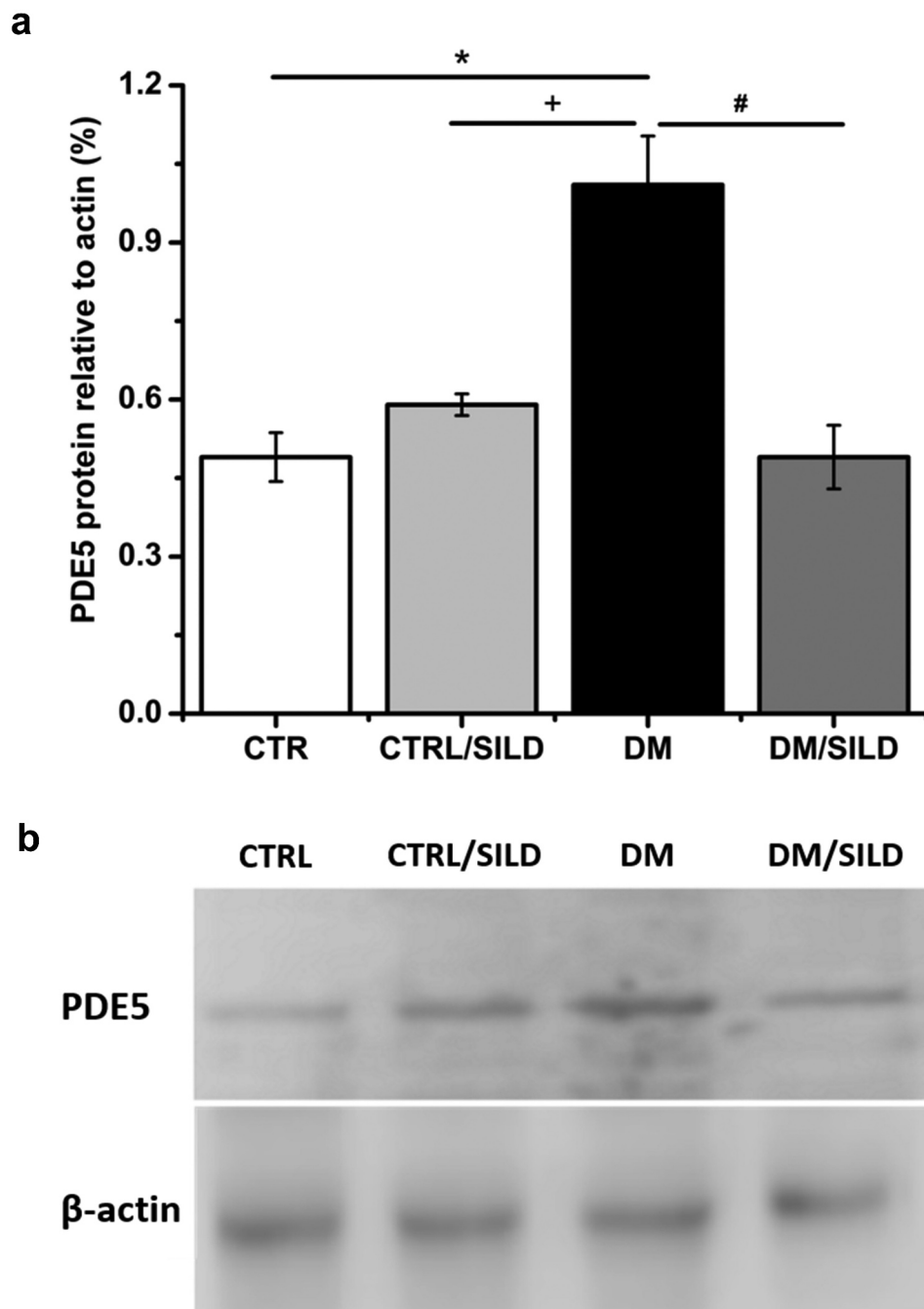


Figure 4. Sildenafil prevents phosphodiesterase type 5 overexpression in diabetic rats. (a) Densitometric western blot analysis for phosphodiesterase type 5 (PDE5) expression. (b) Representative western blots are shown for PDE5 and β -actin of total heart protein extracts. Results are expressed as the mean \pm SEM (n = 4). * indicates $P < .05$ vs CTRL; + indicates $P < .05$ vs CTRL/SILD; # indicates $P < .05$ vs DM/SILD. The p-value was calculated using one-way ANOVA test with Bonferroni post hoc.

Sildenafil prevents endothelial dysfunction and the development of pulmonary arterial hypertension without modifying systemic blood pressure in diabetic rats

The rats in the DM group presented PH resemble the study performed by our working group with type 1 diabetic rats (16). It has been reported that diabetic patients are more than twice as resemble to develop PH concerning nondiabetic subjects (12) and that diabetes is an important risk factor for mortality in patients with PH (13,26). In the present study, we found that SILD treatment prevented the development of PH in animals in the DM group. SILD reduces PAP and clinical symptoms of

PH patients without diabetes (5) and it is widely known that SILD prevents vascular cGMP degradation by inhibition of PDE5 (27) and increases the bioavailability of pulmonary vascular NO (3). In animals with PH without diabetes, SILD was shown to decrease collagen deposition in pulmonary arterioles, reduce vascular muscularization and reduce vascular fibroblast procollagen and TGF- β gene expression (28). The result we obtained is novel because although SILD is widely used for the treatment of PH, for the first time we demonstrated that its chronic administration is beneficial in the prevention of PH secondary to type 1 diabetes.

On the other hand, we found that rats with PH secondary to type 1 diabetes did not develop systemic arterial hypertension. This result is in agreement with what has been reported previously in rats with STZ-induced experimental diabetes, where at 6 weeks of follow-up no changes in systemic systolic or diastolic blood pressure were found (15). Although systemic arterial hypertension during diabetes is very common in humans (29) and animal models with gestational DM (30), no systemic arterial hypertension has been detected in some type 1 diabetic animals (31). Treatment with SILD did not modify SBP in any group, indicating that SILD does not participate in the processes of SBP regulation (32).

Concerning changes in pulmonary vascular reactivity in rats with PH secondary to type 1 diabetes, we found decreased endothelium-dependent relaxant capacity and contractile hyperresponsiveness to 5-HT. These effects have been previously reported in STZ-induced diabetic rats, where NADPH oxidase upregulation and increased superoxide radical concentration in the pulmonary vascular wall were shown to play an important role in the pathophysiological mechanism of PH secondary to type 1 diabetes (15,33). Our results show that SILD treatment was able to prevent endothelial dysfunction by enhancing endothelium-dependent relaxant capacity and preventing contractile hyperresponsiveness to 5-HT. In nondiabetic patients with PH, SILD treatment has been reported to improve vasodilator response, reduce pulmonary arterial resistance (34) and restore vascular reactivity under conditions of increased pulmonary resistance due to metabolic problems (35). In addition, it has been found that during diabetes (without PH), chronic SILD treatment was able to improve endothelial function (2), reduce vascular superoxide radical and increase NO bioavailability (36). All of the above effects have been attributed to PDE5 inhibition and increased cGMP at the pulmonary vascular level (37).

Sildenafil prevents right ventricular hypertrophy and PDE5 overexpression in the heart of diabetic rats

We found that rats with PH secondary to type 1 diabetes developed RVH. In both humans and animal models, it has been widely described that PH is a factor that commonly leads to the development of RVH (38–42). The changes that occur in the RV during nondiabetic PH are presented as an adaptive mechanism to increased pulmonary vascular resistance (39,43), thereby increasing ventricular mass and RV contractility to match the increase in afterload (44). Recently our research group reported that in rats with PH secondary to type 1 diabetes, RV overload leads to eccentric RVH and systolic dysfunction (16). Furthermore, in rats with PH without diabetes, SILD prevents RVH and reduces RV systolic pressure (45), achieving avoidance of structural remodeling (42) and improvement of RV diastolic function (46). In patients with PH (without DM), SILD has been reported to improve clinical symptoms and prevent heart failure (47) by reducing pulmonary arterial wedge pressure and RV afterload (48). The beneficial effect of SILD treatment that we found in the rats of the DM group on the RV may be due to the absence of PH and therefore to the reduction in RV overload and remodeling.

However, we cannot rule out a possible direct effect of SILD on the RV through improved contractile, biochemical, and hemodynamic function.

In the hearts of rats with PH secondary to type 1 diabetes, we found overexpression of PDE5. It is known that under physiological conditions PDE5 expression is low, however, PDE5 expression is elevated in patients with RVH (49–51). In our experimental conditions, such overexpression could be linked to the RVH, which we described in the previous section and to the ventricular failure reported by our group (16). Treatment with SILD prevented PDE5 overexpression in type 1 diabetic rat hearts. It has already been reported that SILD treatment could reduce the expression of PDE5 from the RV of PH patients without diabetes (51). In addition, SILD has been shown to protect from heart failure and reduce PDE5 expression in overloaded hearts through decreased RVH (52). We believe that SILD treatment reduces PAP without RVH and thus PDE5 overexpression is prevented. A disadvantage of this study was that the evaluation of PDE5 expression was in the whole heart, however, there is evidence demonstrating localized cardiac chamber dependent PDE5 overexpression, in other words, PDE5 may be overexpressed only in the RV when developing RVH (49,53,54).

Sildenafil prevents the development of cardiac autonomic neuropathy in diabetic rats

Rats with PH secondary to type 1 diabetes presented reduced HR and increased RR period. These effects are resembling the results of other authors using different types of diabetes (55–57), as well as in studies of diabetic patients with cardiovascular complications (58,59). The reduction in HR during diabetes is attributed to the development of neuropathy (60,61) and loss of cardiac control (62). On the other hand, the DM group treated with SILD did not present a reduction in HR or lengthening of the RR interval, indicating a protective effect on the autonomic nervous system as described by other authors (10,63).

The decrease in HRV that occurred in the rats of the DM group with PH resemble the results of other authors (57,58,64). The decrease in HRV is considered a marker of sympathovagal imbalance (61,65) and corresponds with the reduction of cardiac autonomic innervation (64,66), which explains the development of cardiac autonomic neuropathy, presence of arrhythmias and myocardial infarction (67,68). Treatment with SILD increased HRV of rats in the DM group. This effect has already been reported in humans and animal models of PH (6). SILD was described to restore HRV and improve cardiac function (6) by restoring sympathovagal balance (63), through neurohumoral activation, which was also associated with improved pulmonary hemodynamics (7). SILD has also been described to exhibit antioxidant, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects on the nervous system (69). On the other hand, during diabetes, it has been reported that SILD, in addition to increasing HRV (11), increases the density of peripheral nerve fibers, the number of myelinated axons and the electrical conduction velocity of the peripheral nervous system (70). Some of these mechanisms could explain the effectiveness of SILD against type 1 diabetic peripheral neuropathy (70).

The lengthening of the QTc period presented by rats with PH secondary to type 1 diabetes has also been described in animal models and patients with PH without diabetes (71–73). In rats with non-diabetic PH, it has been described that the changes in the QT period are due to changes in the action potential, arrhythmogenesis and ventricular electrical remodeling, where it has been described that the reduction of connexin-43 protein (74) and the reduction of voltage-dependent potassium channels Kv1.2, Kv1.5 and Kv4.2 participate (75). Both these changes, as well as the lengthening of the QT period, are a consequence of the RVH generated by overload (75). The prolongation of the QT period generates ventricular arrhythmias and has been taken as a predictor of cardiovascular mortality (76). Our study demonstrates that SILD administration during type 1 diabetes prevented QTc period lengthening. In a rat model with monocrotaline, SILD combined with bosentan or beraprostol has been described to prevent QTc period prolongation (74,77). Furthermore, during diabetes, SILD has been found to restore electrocardiogram abnormalities (10). In our experimental conditions, SILD treatment exerts a protective effect on QTc interval lengthening, which may be related to beneficial effects on the RV.

Conclusion

Our results indicate for the first time, that chronic SILD treatment prevents pulmonary arterial endothelial dysfunction and the development of PH in type 1 diabetic rats, with a consequent beneficial effect on right ventricular muscular and electrical remodeling.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This work was supported by the CONACYT under grant Infraestructura-2019-300379; VIEP-BUAP under grant Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla 100317188-VIEP-2021.

ORCID

Alfonso Diaz-Fonsecae  <http://orcid.org/0000-0003-4092-6636>

References

- Ala M, Mohammad JR, Dehpour AR. 2021. Sildenafil beyond erectile dysfunction and pulmonary arterial hypertension: Thinking about new indications. *Fundam Clin Pharmacol*. 35(2):235–59. doi:10.1111/fcp.12633
- Aversa A, Vitale C, Volterrani M, Fabbri A, Spera G, Fini M, Rosano GM. 2008. Chronic administration of Sildenafil improves markers of endothelial function in men with type 2 diabetes. *Diabet Med*. 25(1):37–44. doi:10.1111/j.1464-5491.2007.02298.x
- Rashid J, Patel B, Nozik-Grayck E, McMurtry IF, Stenmark KR, Ahsan F. Inhaled sildenafil as an alternative to oral sildenafil in the treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH). *J Control Release*. 2017;250:96–106. doi:10.1016/j.jconrel.2017.02.003
- Galiè N, McLaughlin VV, Rubin LJ, Simonneau G. 2019. An overview of the 6th world symposium on pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 53(1):1802148. doi:10.1183/13993003.02148-2018
- Ren Z, Li J, Shen J, Yu H, Mei X, Zhao P, Xiao Z, Wu W. 2020. Therapeutic sildenafil inhibits pulmonary damage induced by cigarette smoke exposure and bacterial inhalation in rats. *Pharm Biol*. 58(1):116–23. doi:10.1080/13880209.2019.1711135
- Ogawa M, Ishizaka M, Akabane R, Sakatani A, Nagakawa M, Miyakawa H, Miyagawa Y, Takemura N. 2020. Evaluation of the autonomic nervous system in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension. *Vet Res Commun*. 44(2):73–81. doi:10.1007/s11259-020-09774-z
- Semen K, Yelisyeyeva O, Jarocka-Karpowicz I, Kaminsky D, Solovey L, Skrzydlewska E, Yavorskiy O. Sildenafil reduces signs of oxidative stress in pulmonary arterial hypertension: Evaluation by fatty acid composition, level of hydroxynonenal and heart rate variability. *Redox Biol*. 2016;7:48–57. doi:10.1016/j.redox.2015.11.009
- Das A, Durrant D, Salloum FN, Xi L, Kukreja RC. PDE5 inhibitors as therapeutics for heart disease, diabetes and cancer. *Pharmacol Ther*. 2015;147:12–21. doi:10.1016/j.cjap.2015.01.080
- Zimmermann LM, Baptista MS, Tardivo JP, Pinhal MA. Type II diabetes patients under sildenafil citrate: case series showing benefits and a side effect. *Case Reports in Medicine*. 2020;2020:4065452. Published 2020 May 9. doi:10.1016/j.athoracsur.2006.08.051
- Roberts TJ, Burns AT, MacIsaac RJ, MacIsaac AI, Prior DL, La Gerche A. 2019. Sildenafil enhances central hemodynamic responses to exercise, but not V o 2peak, in people with diabetes mellitus. *J Appl Physiol*. 127(1):1–10. doi:10.1152/jappphysiol.00947.2018
- Stirban A, Laude D, Elghozi JL, Sander D, Agelink MW, Hilz MJ, Ziegler D. Acute effects of sildenafil on flow mediated dilatation and cardiovascular autonomic nerve function in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009 Feb;25(2):136–43. doi:10.1002/dmrr.921. PMID: 19116943.
- Lang IM, Simonneau G, Pepke-Zaba JW, Mayer E, Ambrož D, Blanco I, Torbicki A, Mellekjaer S, Yaici A, Delcroix M. 2013. Factors associated with diagnosis and operability of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. A case-control study. *Thromb Haemost*. 110(1):83–91. doi:10.1160/TH13-02-0097
- Khateeb J, Fuchs E, Khamaisi M. 2019. Diabetes and lung disease: A neglected relationship. *Rev Diabet Stud*. 15(1):1–15. doi:10.1900/RDS.2019.15.1
- Moral SJ, Lopez LJG, Menendez C, Moreno E, Barreira B, Morales CD, Escolano L, Fernandez SP, Villamor E, Cogolludo A, et al. Different patterns of pulmonary vascular disease induced by type 1 diabetes and moderate hypoxia in rats. *Exp Physiol*. 2012;97(5):676–86. doi:10.1113/expphysiol.2011.062257
- Lopez LJG, Moral SJ, Frazziano G, Gomez VMJ, Moreno L, Menendez C, Flores HJ, Lorente JA, Cogolludo A, Perez VF. 2011. Type 1 diabetes-induced hyper-responsiveness to 5-hydroxytryptamine in rat pulmonary arteries via oxidative stress and induction of cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther*. 338(1):400–07. doi:10.1124/jpet.111.179515
- López LG, Tepox GAY, Atonal FF, Flores HJ, Pérez VF, Villa MAE, Miguél GG, Reynoso PA. 2021. Echocardiographic follow-up to right ventricular modifications in secondary pulmonary hypertension to diabetes in rats. *Clin Exp Hypertens*. 43(3):242–53. doi:10.1080/10641963.2020.1860077
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (technical specifications for the production, care and use of laboratory animals). DOF; 2001. México.
- Itoh T, Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Nakanishi N, Hamada K, Kangawa K, Kimura H. 2004. A combination of oral sildenafil and beraprost ameliorates pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 169(1):34–38. doi:10.1164/rccm.200303-346OC
- Alsahali A, Alshawsh MA, Chik Z, Mohamed Z. Effect of catha edulis (khat) on pancreatic functions in streptozotocin-induced diabetes in male sprague-Dawley rats. *Exp Anim*. 2018 [Nov 1];67(4):517–26. doi:10.1538/expanim.18-0057.

20. Dhaliwal J, Dhaliwal N, Akhtar A, Kuhad A, Chopra K. Beneficial effects of ferulic acid alone and in combination with insulin in streptozotocin induced diabetic neuropathy in Sprague Dawley rats. *Life Sci.* 2020;255:117856. Aug 15. doi:10.1016/j.lfs.2020.117856.
21. Lenzen S. 2007. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 51(2):216–26. doi:10.1007/s00125-007-0886-7
22. Wang X, Pan J, Liu D, Zhang, M, Li, X, Tian, J, Liu, M, Jin, T, An, F. Nicorandil alleviates apoptosis in diabetic cardiomyopathy through PI3K/Akt pathway. *J Cell Mol Med.* 2019;23(8):5349–59. doi:10.1111/jcmm.14413.
23. Kuno Y, Iyoda M, Shibata T, Hirai Y, Akizawa T. 2011. Sildenafil, a phosphodiesterase type 5 inhibitor, attenuates diabetic nephropathy in non-insulin-dependent otsuka long-evans tokushima fatty rats. *Br J Pharmacol.* 162(6):1389–400. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01149.x
24. Baumeier C, Schlüter L, Sausenthaler S, Laeger T, Rödiger M, Alaze SA, Fritsche L, Häring HU, Stefan N, Fritsche A, et al. 2017. Elevated hepatic DPP4 activity promotes insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Metab.* 6(10):1254–63. doi:10.1016/j.molmet.2017.07.016
25. Lopez-Mejia IC, Lagarrigue S, Giralt A, Martinez-Carreres L, Zano N, Denechaud PD, Castillo-Armengol J, Chavey C, Orpinell M, Delacuisine B, et al. 2017. CDK4 phosphorylates ampka2 to inhibit its activity and repress fatty acid oxidation. *Mol Cell.* 68(2):336–349.e6. doi:10.1016/j.molcel.2017.09.034
26. Trammell AW, Hennes AR, Tseng V, Shah AJ, Phillips LS, Hart CM. Influence of body weight and diabetes mellitus in patients with pulmonary hypertension. *Am J Cardiol.* 2020;134:130–37. doi:10.1016/j.amjcard.2020.07.062.
27. Cohen JL, Nees SN, Valencia GA, Rosenzweig EB, Krishnan US. Sildenafil use in children with Pulmonary Hypertension. *J Pediatr.* 2019;205:29–34.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2018.09.067.
28. Felix NS, de Mendonça L, Braga CL, da Silva JS, Samary CDS, Vieira JB, Cruz F, Rocha NN, Zapata-Sudo G, Rocco PRM, et al. 2019. Effects of the FGF receptor-1 inhibitor, infigratinib, with or without sildenafil, in experimental pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol.* 176(23):4462–73. doi:10.1111/bph.14807
29. Sharma JN, Narayanan P. The kallikrein-kinin pathways in hypertension and diabetes. *Prog Drug Res.* 2014;69:15–36.
30. Yu C, Chen S, Wang X, Wu G, Zhang Y, Fu C, Hu C, Liu Z, Luo X, Wang J, et al. Exposure to maternal diabetes induces endothelial dysfunction and hypertension in adult male rat offspring. *Microvasc Res.* 2021;133:104076. doi:10.1016/j.mvr.2020.104076.
31. Huang JX, Chen ZS, Zhang Y, Zhang K, Chen YY, Chen LM, Zhou WW. 2017. Establishment of rat model of type 2 diabetes complicated with hypertension. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 33(4):329–33. doi:10.12047/j.cjap.5501.2017.080
32. CT K Jr, Morey TE, Lobato EB, Jm A Jr, Staples ED, Schofield RS, Hess PJ, Martin TD, Beaver TM. Effect of sildenafil on pulmonary artery pressure, systemic pressure, and nitric oxide utilization in patients with left ventricular assist devices. *Ann Thorac Surg.* 2007;83(1):68–71. doi:10.1016/j.athoracsur.2006.08.051. discussion 71.
33. Lopez-Lopez JG, Moral-Sanz J, Frazziano G, Gomez-Villalobos MJ, Flores-Hernandez J, Monjaraz E, Cogolludo A, Perez-Vizcaino F. 2008. Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 295(5):L727–32. doi:10.1152/ajplung.90354.2008
34. Rosengarten B, Schermuly RT, Voswinckel R, Kohstall MG, Olschewski H, Weissmann N, Seeger W, Kaps M, Grimminger F, Ghofrani HA. 2006. Sildenafil improves dynamic vascular function in the brain: studies in patients with pulmonary hypertension. *Cerebrovasc Dis.* 21(3):194–200. doi:10.1159/000090555
35. Sheng M, Lu H, Liu P, Li Y, Ravi H, Peng SL, Diaz-Arrastia R, Devous MD, Womack KB. 2017. Sildenafil improves vascular and metabolic function in patients with alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 60(4):1351–64. doi:10.3233/JAD-161006
36. Wortel RC, Mizrachi A, Li H, Markovsky E, Enyedi B, Jacobi J, Brodsky O, Cao J, Lippert AR, Incrocci L, et al. 2019. Sildenafil protects endothelial cells from radiation-induced oxidative stress. *J Sex Med.* 16(11):1721–33. doi:10.1016/j.jsxm.2019.08.015
37. Schultz J, Andersen A, Gade IL, Kjaergaard B, Nielsen-Kudsk JE. 2020. Riociguat, sildenafil and inhaled nitric oxide reduces pulmonary vascular resistance and improves right ventricular function in a porcine model of acute pulmonary embolism. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.* 9(4):293–301. doi:10.1177/2048872619840772
38. Voelkel NF, Natarajan R, Drake JJ, Bogaard HJ. 2011. Right ventricle in pulmonary hypertension. *Compr Physiol.* 1(1):525–40. doi:10.1002/cphy.c090008
39. Guazzi M. 2018. Pulmonary hypertension and heart failure: a dangerous liaison. *Heart Fail Clin.* 14(3):297–309. doi:10.1016/j.hfc.2018.02.006
40. Hiram R, Naud P, Xiong F, Al-u'datt D, Algalarrondo V, Sirois MG, Tanguay JF, Tardif JC, Nattel S. 2019. Right atrial mechanisms of atrial fibrillation in a rat model of right heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 74(10):1332–47. doi:10.1016/j.jacc.2019.06.066
41. Pinsky MR. 2016. The right ventricle: interaction with the pulmonary circulation [published correction appears in Crit Care. 2016 Nov 10;20(1):364]. *Crit Care.* 20(1):266. doi:10.1186/s13054-016-1440-0
42. Li YL, Li YQ, Zeng FQ, Lin XY, Li XT, Ren XQ, Yang DL. 2021. Sildenafil improves right ventricular remodelling in monocrotaline-induced rats by decreasing myocardial apoptosis and activating peroxisome proliferator-activated receptors. *J Pharm Pharmacol.* 73(2):145–51. doi:10.1093/jpp/rgaa017
43. Vonk Noordegraaf A, Westerhof BE, Westerhof N. The relationship between the right ventricle and its load in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(2):236–43. doi:10.1016/j.jacc.2016.10.047. PMID: 28081831.
44. Thenappan T, Weir EK. 2020. Pulmonary arterial hypertension and sex in the right ventricle: it is an interesting picture! *Am J Respir Crit Care Med.* 202(7):928–29. doi:10.1164/rccm.202006-2147ED
45. Jasińska-Stroschein M, Owczarek J, Wesołowska A, Orszulak-Michalak D. 2014. Rosuvastatin, sildenafil and their combination in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat. *Acta Pharm.* 64(3):345–53. doi:10.2478/acph-2014-0029
46. Yoshiyuki R, Tanaka R, Fukushima R, Machida N. 2016. Preventive effect of sildenafil on right ventricular function in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Exp Anim.* 65(3):215–22. doi:10.1538/expanim.15-0070
47. Belyavskiy E, Ovchinnikov A, Potekhina A, Ageev F, Edelmann F. 2020. Phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil in patients with heart failure with preserved ejection fraction and combined pre- and postcapillary pulmonary hypertension: a randomized open-label pilot study. *BMC Cardiovasc Disord.* 20(1):408. doi:10.1186/s12872-020-01671-2
48. Monzo L, Reichenbach A, Al-Hiti H, Borlaug BA, Havlenova T, Solar N, Tupy M, Ters J, Kautzner J, Melenovsky V. 2021. Acute unloading effects of sildenafil enhance right ventricular-pulmonary artery coupling in heart failure. *J Card Fail.* 27(2):224–32. doi:10.1016/j.cardfail.2020.11.007
49. Nagendran J, Archer SL, Soliman D, Gurtu V, Moudgil R, Haromy A, St Aubin C, Webster L, Rebeyka IM, Ross DB, et al. 2007. Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation.* 116(3):238–48. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655266
50. Andersson KE. 2018. PDE5 inhibitors - pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery. *Br J Pharmacol.* 175(13):2554–65. doi:10.1111/bph.14205

51. Sharma M, Suero-Abreu GA, Neupane R, Kim B. Role of phosphodiesterase-5 inhibitors in acute right ventricular failure due to pulmonary embolism. *Am J Case Rep.* 2019;20:1144–47. doi:10.12659/AJCR.915832.
52. Lu Z, Xu X, Hu X, Lee S, Traverse JH, Zhu G, Fassett J, Tao Y, Zhang P, Dos Remedios C, et al. 2010. Oxidative stress regulates left ventricular PDE5 expression in the failing heart. *Circulation.* 121(13):1474–83. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.906818
53. Shan X, Margulies KB. 2011. Differential regulation of PDE5 expression in left and right ventricles of feline hypertrophy models. *PLoS One.* 6(5):e19922. doi:10.1371/journal.pone.0019922
54. Garcia AM, Nakano SJ, Karimpour-Fard A, Nunley K, Blain-Nelson P, Stafford NM, Stauffer BL, Sucharov CC, Miyamoto SD. 2018. Phosphodiesterase-5 is elevated in failing single ventricle myocardium and affects cardiomyocyte remodeling in vitro. *Circ Heart Fail.* 11(9):e004571. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004571
55. Howarth FC, Jacobson M, Shafiqullah M, Adeghate E. 2008. Long-term effects of type 2 diabetes mellitus on heart rhythm in the Goto-Kakizaki rat. *Exp Physiol.* 93(3):362–69. doi:10.1113/expphysiol.2007.040055
56. Howarth FC, Jacobson M, Shafiqullah M, Ljubisavljevic M, Adeghate E. 2011. Heart rate, body temperature and physical activity are variously affected during insulin treatment in alloxan-induced type 1 diabetic rat. *Physiol Res.* 60(1):65–73. doi:10.33549/physiolres.931984
57. Aggarwal Y, Das J, Mazumder PM, Kumar R, Sinha RK. 2021. Heart rate variability time domain features in automated prediction of diabetes in rat. *Phys Eng Sci Med.* 44(1):45–52. doi:10.1007/s13246-020-00950-8
58. Turker Y, Aslantas Y, Aydin Y, Demirin H, Kutlucan A, Tibilli H, Turker Y, Ozhan H. 2013. Heart rate variability and heart rate recovery in patients with type 1 diabetes mellitus. *Acta Cardiol.* 68(2):145–50. doi:10.1080/ac.68.2.2967271
59. Wang XD, Zhou L, Zhu CY, Chen B, Chen Z, Wei L. Autonomic function as indicated by heart rate deceleration capacity and deceleration runs in type 2 diabetes patients with or without essential hypertension. *Clin Interv Aging.* 2018;13:1169–76. doi:10.2147/CIA.S149920.
60. Sydó N, Sydó T, Merkely B, Carta KG, Murphy JG, Lopez-Jimenez F, Allison TG. 2016. Impaired heart rate response to exercise in diabetes and its long-term significance. *Mayo Clin Proc.* 91(2):157–65. doi:10.1016/j.mayocp.2015.10.028
61. Martinez PF, Okoshi MP. 2018. Heart rate variability in coexisting diabetes and hypertension. *Arq Bras Cardiol.* 111(1):73–74. doi:10.5935/abc.20180118
62. Cassidy S, Vaidya V, Houghton D, Zalewski P, Seferovic JP, Hallsworth K, MacGowan GA, Trenell MI, Jakovljevic DG. 2019. Unsupervised high-intensity interval training improves glycaemic control but not cardiovascular autonomic function in type 2 diabetes patients: a randomised controlled trial. *Diab Vasc Dis Res.* 16(1):69–76. doi:10.1177/1479164118816223
63. Pirintr P, Saengklub N, Limprasutr V, Sawangkoon S, Kijtaornrat A. 2017. Sildenafil improves heart rate variability in dogs with asymptomatic myxomatous mitral valve degeneration. *J Vet Med Sci.* 79(9):1480–88. doi:10.1292/jvms.17-0016
64. Akinlade OM, Owoyele BV, Soladoye OA. 2020. Heart rate variability indices, biomarkers, and cardiac nerve density: independent surrogate markers for diagnosis of diabetic cardiac autonomic neuropathy in type 2 diabetes mellitus animal model. *Int J Health Sci.* 14(6):24–30.
65. Gardim CB, de Oliveira BA, Bernardo AF, Gomes RL, Pacagnelli FL, Lorençon RM, Vanderlei LC. 2014. Heart rate variability in children with type 1 diabetes mellitus. *Rev Paul Pediatr.* 32(2):279–85. doi:10.1590/0103-0582201432215513
66. Li X, Jiang YH, Jiang P, Lin HQ, Yang JL, Ma DF, Wang X, Yang CH. 2015. Analysis of heart rate variability and cardiac autonomic nerve remodeling in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 123(5):272–81. doi:10.1055/s-0035-1547258
67. Kristiansen E, Wanby P, Åkesson K, Blomstrand P, Brudin L, Thegerström J. 2020. Assessing heart rate variability in type 1 diabetes mellitus-Psychosocial stress a possible confounder. *Ann Noninvasive Electrocardiol.* 25(5):e12760. doi:10.1111/anec.12760
68. Eckstein ML, Moser O, Tripolt NJ, Pferschy, PN, Obermayer, AAM, Kojzar, H, Mueller, A, Abbas, F, Sourij, C, Sourij, H. Rapid glucose rise reduces heart rate variability in adults with type 1 diabetes: a prospective secondary outcome analysis. *Diabetes Obes Metab.* 2021;23(7):1681–84. doi:10.1111/dom.14287.
69. Saberi FS, Namazi SN, Bakhtiarian A, Ghazi KM, Karimi MY, Ranjbar A, Safa M, Hosseini A. 2018. Sildenafil protective effects on high glucose-induced neurotoxicity in PC12 cells: the role of oxidative stress, apoptosis, and inflammation pathways in an in vitro cellular model for diabetic neuropathy. *Neurol Res.* 40(8):624–36. doi:10.1080/01616412.2018.1458813
70. Wang L, Chopp M, Szalad A, Jia L, Lu X, Lu M, Zhang L, Zhang Y, Zhang R, Zhang ZG. 2015. Sildenafil ameliorates long term peripheral neuropathy in type II diabetic mice. *PLoS One.* 10(2):e0118134. doi:10.1160/TH13-02-0097
71. Hong-liang Z, Qin L, Zhi-hong L, Zhi-hui Z, Chang-ming X, Xin-hai N, Jian-guo H, Ying-jie W, Shu Z. 2009. Heart rate-corrected QT interval and QT dispersion in patients with pulmonary hypertension. *Wien Klin Wochenschr.* 121(9–10):330–33. doi:10.1007/s00508-009-1184-9
72. Rich JD, Thenappan T, Freed B, Patel AR, Thisted RA, Childers R, Archer SL. 2013. QTc prolongation is associated with impaired right ventricular function and predicts mortality in pulmonary hypertension. *Int J Cardiol.* 167(3):669–76. doi:10.1016/j.ijcard.2012.03.071
73. Zaky A, Zafar I, Masjoan-Juncos JX, Husain M, Mariappan N, Morgan CJ, Hamid T, Frölich MA, Ahmad S, Ahmad A. Echocardiographic, biochemical, and electrocardiographic correlates associated with progressive pulmonary arterial hypertension. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:705666. doi:10.1538/expanim.18-0057.
74. Tanaka Y, Takase B, Yao T, Ishihara M. 2013. Right ventricular electrical remodeling and arrhythmogenic substrate in rat pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 49(3):426–36. doi:10.1165/rcmb.2012-0089OC
75. Piao L, Fang YH, Cadete VJ, Wietholt C, Urboniene D, Toth PT, Marsboom G, Zhang HJ, Haber I, Rehman J, et al. 2010. The inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase improves impaired cardiac function and electrical remodeling in two models of right ventricular hypertrophy: resuscitating the hibernating right ventricle. *J Mol Med (Berl).* 88(1):47–60. doi:10.1007/s00125-007-0886-7
76. Ninkovic VM, Ninkovic SM, Miloradovic V, Stanojevic D, Babic M, Giga V, Dobric M, Trenell MI, Lalic N, Seferovic PM, et al. 2016. Prevalence and risk factors for prolonged QT interval and QT dispersion in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* 53(5):737–44. doi:10.1007/s00592-016-0864-y
77. Karpuz D, Hallioglu O, Toros F, Tasdelen B. 2017. The effect of metilpheniydate, risperidone and combination therapy on ECG in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Journal of Electrocardiology.* 50(4):410–15. doi:10.1016/j.jelectrocard.2017.02.012

La hipertensión pulmonar: una complicación de la diabetes mellitus

Miguel **García-González**
Verónica **Vallejo-Ruíz**
Gustavo **López-López**

La diabetes mellitus (DM) ocupa los primeros lugares de morbilidad y mortalidad en nuestro país, por lo tanto es considerada un problema de salud pública. Los pacientes con DM que no controlan la hiperglucemia tienen un mayor riesgo de desarrollar complicaciones cardiovasculares, como la cardiopatía y el accidente cerebral vascular. En la última década se han publicado estudios que indican que la hipertensión pulmonar (HP) puede incluirse en la lista de complicaciones de la DM. Por esta razón es importante que se estudien las bases fisiopatológicas que presenta la comorbilidad DM-hipertensión pulmonar (DM-HP), y de esta forma aportar información para la mejora de las estrategias terapéuticas. En el presente trabajo proporcionamos información reciente de estudios con pacientes que padecen la comorbilidad DM-HP y de reportes sobre el avance en la propuesta del mecanismo fisiopatológico que vincula la DM con la HP.

DIABETES MELLITUS COMO UNA EPIDEMIA SIN RESOLVER EN MÉXICO

La DM es una enfermedad que se presenta por la incapacidad de las células beta pancreáticas para producir insulina, o por la baja capacidad de reconocimiento de

dicha hormona por parte de las células diana. Independientemente del mecanismo de la enfermedad, se reduce el ingreso celular de glucosa, resultando en hiperglucemia crónica. La DM tipo 1 se caracteriza por la absoluta deficiencia en la producción de insulina causada por la activación de una respuesta autoinmune mediada por células de tipo T que conducen a la destrucción de las células beta pancreáticas. La DM tipo 2 es una enfermedad metabólica compleja que se origina en la resistencia celular a la insulina y un deterioro celular progresivo.

La DM es una de las mayores emergencias mundiales de salud del siglo XXI, debido a que actualmente hay más de 463 millones de diabéticos en el mundo y se estima que para el año 2045 habrá más de 700 millones. Nuestro país ocupa el sexto lugar mundial en prevalencia de adultos diabéticos con 12.8 millones y el décimo lugar en DM infantil con 14,800 (FID, 2019). En 2016 se reportó que el 9.4 % de los adultos (10.3 % de las mujeres y 8.4 % de los hombres) fueron diagnosticados con DM (ENSANUT MC, 2016). La mayor prevalencia de DM se reportó en los hombres de 60 a 69 años de edad y en las mujeres con 60 o más años de edad. Otro dato importante es que la mayoría de los pacientes diabéticos de 60 a 79 años de edad viven en comunidades urbanas.

LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES SON LAS PRINCIPALES COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS

La DM es una de las principales causas de macroangiopatías y microangiopatías, que causan ceguera, enfermedad renal, amputación de las extremidades inferiores y enfermedad cerebrovascular. Además, la DM no tratada adecuadamente puede aumentar el riesgo de cardiopatía coronaria, hipertensión arterial sistémica e insuficiencia cardíaca. Los estadios tempranos de la miocardiopatía diabética se caracterizan por las anomalías en la señalización celular, la hipertrofia ventricular izquierda y la fibrosis, que a su vez dan lugar a

una disfunción sistólica, falla cardíaca y disminución de la fracción de eyección (Jia y cols., 2018).

LA HIPERTENSIÓN PULMONAR COMO COMPLICACIÓN CARDIOVASCULAR DE LA DIABETES MELLITUS

La HP es una enfermedad incurable y fulminante, que se caracteriza por el aumento de la presión sanguínea de la arteria pulmonar (≥ 25 mm de Hg). La incidencia de esta enfermedad en lo general es baja y muy variable dependiendo del país (4.5 a 97 casos por millón de habitantes), con mayor predominancia en mujeres. En México hay pocos estudios epidemiológicos sobre la HP. El Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en su *Guía de práctica clínica (GPC) para el diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar primaria en el adulto*, menciona una prevalencia de 2.4 casos por millón de habitantes. Por otra parte, en un estudio ecocardiográfico con 4,579 pacientes ambulatorios, se describe una prevalencia del 10.4 % (GPC, 2010). Recientemente, en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez se creó el registro prospectivo y multicéntrico de HP, donde se espera que en un periodo de cinco años se tendrá la identificación del perfil clínico, el tipo de atención médica idónea, las tendencias terapéuticas y demás información de los pacientes

Tabla 1. Medicamentos para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar (Modificada de la GPC, 2010).

Fármaco	Mecanismo de acción farmacológico
Ambrisestan	Antagonista selectivo del receptor tipo A de endotelina.
Bosentán	Antagonista de receptores de endotelina
Bosentán	Inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa tipo 5
Nifedipino	Inhibidor de canales de calcio muscular liso y cardíaco
Amlodipino	Inhibidor de canales de calcio muscular liso y cardíaco
Warfarina	Anticoagulante
Sulfato ferroso	Facilita el transporte de oxígeno

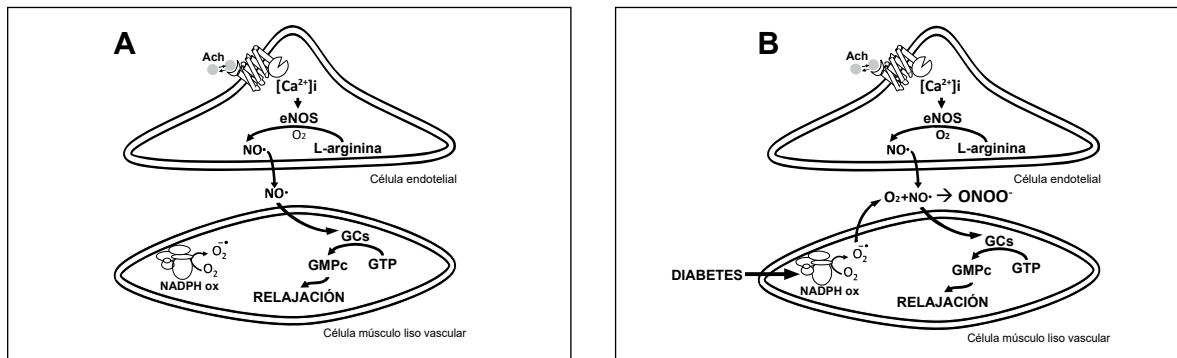


Figura 1. Mecanismo de la disfunción endotelial durante la hipertensión pulmonar y diabetes. En (A) se muestra el mecanismo por el cual se genera vasodilatación dependiente del endotelio vascular en condiciones no diabéticas. En (B) la diabetes aumenta el superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que reacciona con el NO y disminuye la capacidad relajante de las células de músculo liso vasculares pulmonares.

mexicanos (adultos y pediátricos) con HP. Actualmente, en nuestro país, la GPC recomienda el uso de medicamentos vasodilatadores con diferentes mecanismos farmacológicos para tratamiento de la HP (Tabla 1). Desafortunadamente, en México no hay información epidemiológica de la comorbilidad DM-HP. Por lo tanto, no hay propuestas consensuadas sobre el tratamiento farmacológico que tomen en cuenta la comorbilidad de ambos mecanismos fisiopatológicos. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la HP debida a otras enfermedades crónicas que afectan al corazón y los pulmones (como podría ser la DM), refleja una epidemiología similar a la enfermedad asociada (Oldroyd y Bhardwaj, 2020).

Ya hemos comentado que una complicación de la DM es el desarrollo de una disfunción ventricular izquierda; pero se ha encontrado que algunos pacientes diabéticos cursan con disfunción diastólica del ventrículo derecho caracterizada por el incremento del tiempo de relajación isovolumétrica. Se ha descrito también que los cambios adaptativos que ocurren en el ventrículo derecho (VD) se producen por varios eventos, como cambios en la resistencia vascular pulmonar, aumento en la tensión de la pared vascular y el consecuente aumento de la poscarga ventricular derecha. La sobrecarga ventricular conduce a falla mitocondrial de los fibroblastos que en conjunto con la sobreproducción de colágeno tipo III probablemente son la principal determinante de la fibrosis del VD que se produce en la hipertrofia de esta cámara

cardiaca (Tian y cols., 2018). Al mismo tiempo, la presencia del radical superóxido disminuye la capacidad del óxido nítrico (NO) para activar la enzima guanilato ciclasa soluble y generar guanósil monofosfato cíclico (GMPc); de esta forma, este proceso actúa como un modulador positivo de la fibrosis y la hipertrofia cardiaca. Los mecanismos involucrados incluyen rarefacción capilar y aumento concomitante de la actividad metabólica para tratar de mantener la producción de energía. Finalmente, el VD remodelado no puede resistir el aumento de la poscarga, lo que lleva a insuficiencia ventricular derecha. Esta serie de cambios en los cardiomiocitos aumentan la rigidez del VD. Por lo tanto, el aumento de las dimensiones del VD y la fracción de eyección disminuida se asocian con una disminución de la supervivencia en la HP grave.

Actualmente se acepta que la DM es un factor de riesgo para el desarrollo de HP. Los desórdenes metabólicos generados por la hiperglucemia sostenida están caracterizados por pérdida de funciones moleculares en las células endoteliales como la disminución de la producción e inactivación del NO. Estas son generadas por el aumento de la liberación de especies reactivas de oxígeno, secundarias al aumento de la expresión de sus enzimas productoras, incluida la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH), las ciclooxigenasas (COX) y la xantina oxidasa (XO) (Takeda y cols., 2020). El aumento del estatus oxidativo, acompañado de

inflamación local, la obliteración arteriopulmonar con lesiones plexiformes asociadas con intensa vasoconstricción, la proliferación anormal de las células del músculo liso vascular (CMLV) y la formación aberrante de la trombosis intravascular, conducen al colapso circulatorio. Otro conjunto de evidencias describe que desórdenes metabólicos como la resistencia a la insulina provocan la disrupción del receptor tipo 2 de la proteína morfogenética de hueso (BMPRII) que es responsable de un número considerable de HP hereditaria, ya que esta mutación modifica la vía de señalización intracelular que conduce a la proliferación de las células músculo liso vasculares (CMLV). Debido a estos procesos es que se ha descrito que la DM podría incrementar hasta en más del doble la probabilidad para el desarrollo de HP (Movahed y cols., 2005).

BUSCANDO EL MECANISMO FISIOPATOLÓGICO DE LA HIPERTENSIÓN PULMONAR SECUNDARIA A DIABETES MELLITUS

Los cambios de la pared vascular durante la DM han sido descritos ampliamente e incluyen a la disfunción endotelial de los vasos que controlan la resistencia periférica. El daño en las células endoteliales vasculares provoca una reducción de su capacidad vasodilatadora y el aumento de la capacidad vasoconstrictora de la endotelina-1 y de la angiotensina II. Al mismo tiempo, la hiperglucemia activa a la proteína cinasa C (PKC) y reduce la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), dando lugar a la reducción de la producción de NO (principal vasodilatador endotelial). Otra consecuencia de la hiperglucemia crónica es el incremento del estrés oxidativo. La sobreproducción de radicales superóxido por parte de la enzima NADPH oxidasa, reduce la biodisponibilidad del NO y, por lo tanto, una baja capacidad vasodilatadora por parte del endotelio. Por estas razones, se ha propuesto que la hipertensión arterial sistémica y el daño del ventrículo izquierdo son consecuencia de la disfunción endotelial de los vasos sanguíneos.

Cambio en la:	Efecto
Relajación a acetilcolina	Disminución
Relajación a un donador de óxido nítrico (NTS)	Sin cambio
Contracción a 5-HT	Aumento
Expresión de la óxido nítrico sintasa	Sin cambio
Expresión de la superóxido dismutasa (SOD-1)	Aumento
Expresión de la NADPH oxidasa (proteína P47 ^{PHOX})	Aumento
Expresión de la COX-2	Aumento
Concentración de radicales superóxido	Aumento

Tabla 2. Cambios vasculares pulmonares en ratas diabéticas (Recopilada de López-López y cols., 2001, 2008 y 2011).

Por otra parte, los mecanismos fisiopatológicos durante la HP están relacionados con el aumento de las acciones de la endotelina-1, el tromboxano A2, la serotonina, el factor de crecimiento vascular y el factor de crecimiento de fibroblastos. Estas sustancias dan lugar a la fibrogénesis, la remodelación vascular y la vasoconstricción de los vasos arteriales pulmonares. También se ha propuesto que la biodisponibilidad del NO está reducida debido al incremento de la actividad de la NADPH oxidasa de la capa adventicia de la pared vascular. Además, se ha descrito que la inflamación mediada por fibroblastos, monocitos, células dendríticas, linfocitos T y B se suma al mecanismo fisiopatológico de la HP (Wilkins, 2012).

La descripción del mecanismo fisiopatológico de la HP durante la DM aún está en estudio. Se han desarrollado modelos animales para observar los cambios en el tejido pulmonar durante la DM, donde se ha encontrado que las ratas Sprague-Dawley diabéticas tipo 1 desarrollan HP e hipertrofia ventricular derecha y que las ratas Wistar-Kyoto con DM tipo 1 presentan aumento de presión pulmonar (en presencia de hipoxia moderada) y remodelación del ventrículo derecho (Moral-Sanz y cols., 2012). En las ratas diabéticas con HP, se encontró que las arterias pulmonares presentaron un aumento en el estrés oxidativo y la consecuente disfunción endotelial. Además, se encontró que el incremento

en la expresión de la ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2) y/o de la NADPH oxidasa correspondía con el incremento de los radicales superóxido. Con estos resultados se propuso que el aumento del estrés oxidativo es el mecanismo celular de la disfunción endotelial y, por lo tanto, del desarrollo de HP y la consecuente remodelación ventricular derecha (López-López y cols., 2008).

Estos hallazgos (Tabla 2) implican un avance en la descripción del mecanismo fisiopatológico, pero es necesario continuar con las investigaciones para completar la descripción de los procesos que ocurren en la génesis de la HP diabética. El descubrimiento de este mecanismo dará una oportunidad para encontrar nuevas estrategias farmacoterapéuticas para el tratamiento de la HP en comorbilidad con la DM.

REFERENCIAS

Guía de Práctica Clínica GPC (2010). *Diagnóstico y Tratamiento de la Hipertensión arterial Pulmonar Primaria en el Adulto*. México: Secretaría de Salud.

Instituto Nacional de Salud Pública (2016). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016* (ENSANUT MC 2016).

Internacional Diabetes Federation (2019). *Atlas de Diabetes de la FID*. Novena edición Bruselas Bélgica.

Jia G, Hill MA and Sowers JR (2018). Diabetic Cardiomyopathy. An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circulation Research* 122:624-638.

López-López JG, Moral J, Frazziano G, Gómez MJ, Flores J, Monjaraz E, Cogolludo A and Pérez-Vizcaino F (2008). Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 295:L727-L732.

López-López JG, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A, Ibarra M, Zaragoza-Arnez F and Tamargo J (2001). Nitric oxide-and nitric oxide donors- induced relaxation and its modulation by oxidative stress in piglet pulmonary arteries. *British Journal of Pharmacology* 133:615-624.

López-López JG, Moral-Sanz J, Frazziano G, Gomez-Villalobos MJ, Moreno L, Menendez C, Flores-Hernandez J, Lorente JA, Cogolludo A and Perez-Vizcaino F (2011). Type 1 Diabetes-Induced Hyper-Responsiveness to 5-Hydroxytryptamine in Rat Pulmonary Arteries via Oxidative Stress and Induction of Cyclooxygenase-2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 359:123-145.

Oldroyd SH and Bhardwaj A (2020). Pulmonary Hypertension. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Takeda Y, Matoba K, Sekiguchi K, Nagai Y, Yokota T, Utsunomiya K and Nishimura R (2020). Endothelial Dysfunction in Diabetes. *Bio-medicians* 8:182.

Tian L, Potus F, Wu D, Dasgupta A, Chen KH, Mewburn J, Lima P and Archer SL (2018). Increased Drp1-Mediated Mitochondrial Fission Promotes Proliferation and Collagen Production by Right Ventricular Fibroblasts in Experimental Pulmonary Arterial Hypertension. *Frontiers in Physiology* 10:9:828.

Wilkins MR (2012). Pulmonary hypertension: the science behind the disease spectrum. *European Respiratory Journal* 21:19-26.

GLOSARIO

Disfunción diastólica: Disminución de la capacidad de relajación del corazón.

Disfunción sistólica: Disminución de la capacidad contráctil del corazón.

Falla mitocondrial de los fibroblastos: Cuando falla la mitocondria de estas células, tienen deficiencia de energía, provocando daño celular y como respuesta una sobre producción de colágeno que favorece la fibrosis ventricular.

Fibroblasto: Tipo más común de célula que se encuentran en el tejido conectivo. Segregan proteínas de colágeno que se utilizan para mantener un marco estructural para muchos tejidos.

Fibrosis: Formación patológica de tejido fibroso (principalmente colágeno y matriz extracelular).

Fracción de eyección: Porcentaje de sangre expulsada de un ventrículo con cada latido, se obtiene por ecocardiografía y es considerada la prueba ideal para evaluar la función del corazón.

Hipertrofia ventricular: Aumento de la masa muscular del ventrículo en respuesta a estímulos mecánicos (presión anormal o cargas de volumen sostenidas).

Obliteración arteriopulmonar: Oclusión de la arteria pulmonar.

Poscarga ventricular: Presión que se debe ejercer para vencer la resistencia que se opone a la eyección de la sangre durante la contracción cardiaca.

Rarefacción capilar: Disminución en la densidad de las arteriolas por cantidad de masa muscular. Los capilares se alejan entre ellos y disminuye la irrigación sanguínea.

Relajación isovolumétrica: Primera etapa de la relajación cardiaca. Aquí se aumenta la presión ventricular sin vaciamiento del mismo, manteniendo el volumen.

Resistencia vascular pulmonar: Grado de oposición al flujo sanguíneo por parte de la vasculatura pulmonar.

Sobrecarga ventricular: Condición patológica dada por el aumento de presión y volumen en el ventrículo que conduce al desarrollo de hipertrofia y fibrosis ventricular.

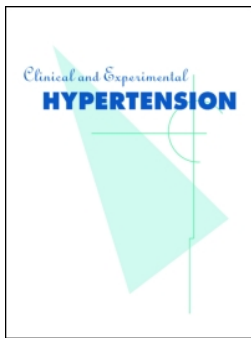
Miguel García-González
Posgrado en Ciencias Químicas, FCQ., BUAP
Verónica Vallejo-Ruiz
Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS
Gustavo López-López
Facultad de Ciencias Químicas, BUAP
jose.lopez@correo.buap.mx



© **Aída Ortega**. *iQue ya viví!*, 2016.



© **Aída Ortega**. *Safínea*, 2021.



Echocardiographic follow-up to right ventricular modifications in secondary pulmonary hypertension to diabetes in rats

Gustavo López y López , Ana Yessica Tepox Galicia , Fausto Atonal Flores , Jorge Flores Hernández , Francisco Pérez Vizcaino , Abel E. Villa Mancera , García González Miguél & Alejandro Reynoso Palomar

To cite this article: Gustavo López y López , Ana Yessica Tepox Galicia , Fausto Atonal Flores , Jorge Flores Hernández , Francisco Pérez Vizcaino , Abel E. Villa Mancera , García González Miguél & Alejandro Reynoso Palomar (2020): Echocardiographic follow-up to right ventricular modifications in secondary pulmonary hypertension to diabetes in rats, Clinical and Experimental Hypertension, DOI: [10.1080/10641963.2020.1860077](https://doi.org/10.1080/10641963.2020.1860077)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10641963.2020.1860077>



Published online: 21 Dec 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Echocardiographic follow-up to right ventricular modifications in secondary pulmonary hypertension to diabetes in rats

Gustavo López y López^a, Ana Yessica Tepox Galicia^a, Fausto Atonal Flores^b, Jorge Flores Hernández^c, Francisco Pérez Vizcaino^d, Abel E. Villa Mancera^e, García González Miguél^a, and Alejandro Reynoso Palomar^{id}^e

^aClinical Pharmacy Laboratory, Faculty of Chemical Sciences, University City, Autonomous University of Puebla, Mexico; ^bDepartment of Physiology, Faculty of Medicine, Autonomous University of Puebla, Mexico; ^cPhysiology Institute, Autonomous University of Puebla, México; ^dComplutense University of Madrid, Madrid, Spain.; ^eResearch Laboratory in Physiology and Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, Autonomous University of Puebla, Mexico

ABSTRACT

Clinical studies suggest that diabetes is a risk factor in the development of pulmonary arterial hypertension. The increase in blood pressure in the pulmonary area is characterized by the increase in the afterload and hypertrophy of the right ventricle. The objective of this study was to conduct a longitudinal follow-up of the morphological and functional changes in the right ventricle in a rat model with pulmonary arterial hypertension secondary to diabetes. Male Sprague Dawley rats were randomly divided into a control group (saline solution) and a diabetic group (60 mg/kg with streptozotocin). For 12 weeks, an echocardiography for longitudinal (*in vivo*) image analysis of the pulmonary pressure was performed at the same time as the evaluation of myocardial remodeling and right ventricular. After this period, the pulmonary pressure was measured by means of a pulmonary artery catheterization, and the presence of hypertrophy was determined by means of the Fulton index. The plasma concentration of brain natriuretic peptide was measured by means of the ELISA technique. It was found that the diabetic rats showed an increase in pressure in the pulmonary arteries, an increase in the Fulton index, and an increase in brain natriuretic peptide. The echocardiographic follow-up showed that the diabetic rats presented an increase in the pulmonary artery from the fourth week, while hypertrophy and right ventricular systolic dysfunction occurred until the twelfth week. In conclusion, pulmonary arterial hypertension induced by experimental diabetes generated hypertrophy and systolic dysfunction of the right ventricle.

ARTICLE HISTORY

Received 16 June 2020
Revised 27 July 2020
Accepted 2 December 2020

KEYWORDS

Diabetes; secondary pulmonary hypertension; longitudinal echocardiographic analysis; right ventricular hypertrophy

Introduction

Diabetes mellitus is associated with an increased risk of microvascular and macrovascular complications, including nephropathy, retinopathy, atherosclerosis, and systemic arterial hypertension (1). Despite this association with systemic cardiovascular disease, until recently, diabetes had not been implicated as a risk factor in pulmonary arterial hypertension (PAH), a syndrome that leads to progressive right heart failure and death (2). It has been found that type 2 diabetic patients have a higher prevalence of PAH independently of coronary artery disease, systemic hypertension, congestive heart failure, or smoking (3). Our laboratory results with rats treated with streptozotocin for 6 weeks showed endothelial pulmonary artery dysfunction (4,5) and an increase in pulmonary artery pressure when they underwent moderate hypoxia (6).

The development of the changes in the right ventricle that occurs during diabetes is largely unexplored; however, there are studies that have found right ventricular dysfunction in diabetic patients (3,7–10), as well as a greater right ventricular wall thickness in patients with PAH and diabetes (11). Moreover, right ventricular hypertrophy has been found in rats treated with streptozotocin (6,12). The possibility that

PAH is the direct consequence of right ventricular hypertrophy secondary to diabetes would be an interesting idea to explore. Therefore, the present study was designed to analyze the morphological and functional changes of the right ventricle of rats with pulmonary hypertension and type 1 diabetes. We demonstrate for the first time that hyperglycemia first induces pulmonary hypertension and, subsequently, morpho-functional changes in the right ventricle.

Materials and methods

Animals and experimental groups

The animals were provided, housed, and maintained in the “Claude Bernard” bioterium of the Autonomous Benemérita University of Puebla. The protocol was approved by the Institutional Committee of Animal Care and Use of the University and the study was carried out in accordance with the Official Mexican Standard NOM-062-ZOO-1999 (13). Male rats of the Sprague Dawley strain of ~200 g (2 months old) were used, randomly divided into a control group and a diabetic group. The glucose concentration was determined before the induction of diabetes through perforation of the coccygeal vein and a clinical

glucometer (from Roche Laboratories). For the induction of diabetes, streptozotocin (60 mg/kg, Sigma-Aldrich, Mexico) was administered intraperitoneally in a single dose, while the control group was administered 200 µl of physiological saline (0.9% NaCl). Subsequently, the blood glucose concentration of both groups was determined at 48 hours, and 4, 8, and 12 weeks after the administration of streptozotocin (STZ) or saline.

Determination of parameters at week zero and after week 12

In order to assess the condition before the administration of STZ, as well as after week 12 of the induction of diabetes, some animals from both lots were used to obtain the following determinations:

Heart rate

An electrocardiographic record was used with electrode placement according to lead II of the Einthoven frontal plane. The signal was recorded with a bioamplifier (ML132-ADInstruments). The signal obtained was digitized with the Powerlab model 4/35 (ADInstruments), using LabChart 7 software (ADInstruments). Records were made for rats from 8:00 am to 1:00 pm, to avoid fluctuations generated by circadian rhythms.

Systemic blood pressure

Systolic blood pressure was determined using the noninvasive tail method, using a transducer (ADInstruments MLT125/R) coupled to an amplifier (ADInstruments). The conscious rats were kept at rest for 5–10 min in a warm and quiet room before the pressure determination.

Pulmonary arterial pressure

Some animals of both groups were anesthetized intraperitoneally with a mixture of Ketamine-Xylazine (60 and 4 mg/Kg, respectively), and cannulation of the jugular vein was performed until the pulmonary artery was reached. The catheter remained connected to a pressure transducer (ADInstruments MLT0380) coupled to an amplifier (ADInstruments DCT001). The generated signal was sent to and stored on a computer with the help of LabChart 7.0 software. Once the lung pressure measurement was performed, the heart was removed to determine the Fulton index. The rest of the animals (both groups) were continuously evaluated with echocardiography (ECHO), and at the end of the study (after week 12), their heart rate, systemic blood pressure, pulmonary blood pressure, as well as the Fulton index were determined.

Fulton index determination

The animals of both groups were sacrificed, and the heart was removed, the atria, and large vessels were removed; the right ventricle was separated from the left ventricle and the septum, and subsequently weighed. The weight ratio in grams of the right ventricle to the left ventricle and septum ($RV \div VI + S$) was obtained.

Determination of the plasma concentration of brain natriuretic peptide

Blood samples were obtained from the rats (control and diabetic) and were subjected to ELISA tests according to the instructions of the manufacturer, MyBioSource (Rat BNP ELISA Kit #MBS764880).

Echocardiographic determinations

These studies were performed under anesthesia with intraperitoneal administration of the Ketamine-Xylazine combination (60–4 mg/Kg, PISA, Mexico) using an ultrasound machine (M7V) equipped with a phase array cardiac transducer (P12-4s) operating at 6–10 MHz (Mindray Medical, Mexico). Standard echocardiography tests were taken before administering the STZ or saline solution, giving rise to the experimental day zero, while subsequent ECHO evaluations were performed at 4, 8, and 12 weeks.

Determination of pulmonary systolic blood pressure (PASP)

A transverse echocardiographic section was used in the left parasternal window (at the base level in mode B by a pulsed Doppler) to obtain the period of time between the onset of pulmonary flow and the maximum velocity (ATPA). PASP was determined by the method described by Thibault (14), while the morphological analysis of blood flow was classified as follows: Type I (normal), Type II (notched in the protosystole), Type III (with notches in the mesosystole).

Determination of the direction of pulmonary artery blood flow, and the diameter and circumference of the pulmonary valve

A color Doppler was used in the valve of the artery by means of an echocardiographic cross-section at the base level (mode B).

Determination of ventricular wall thickness

A transverse echocardiographic section at the level of the papillary muscles (M mode) was used to obtain: the thickness of the posterior wall of the right ventricle in systole and diastole (PWRVs and PWRVd), as well as the thickness of the posterior wall of the left ventricle in systole and diastole (PWLVs, and PWLVd), the thickness of the interventricular septum in the systole and diastole (TIVs, γ TIVd) and the internal diameter of the ventricular cavities in the systole and diastole (IDRV, IDRVd, IDLV and IDLVd). Using the formula $(TIVSd + PWRVd) \div IDRVd$, the relative parietal index (h/r) was determined. With this same echocardiographic section, the heart rate was determined.

Determination of the eccentricity index (EI)

A transverse echocardiographic section was used at the level of the papillary muscles (M mode), as described by Von et al. (15).

Determination of the right ventricle area in systole and diastole

A four-chamber longitudinal echocardiographic section was used in mode B, while for the determination of the right ventricular final diastolic volume (RVEDV) and the right ventricular ejection fraction (RVEF) the Simpson method was used (formulas described in Table 1). The Teichholz formula was used to determine the right ventricular annotation fraction (15).

Final systolic and diastolic volume (FSV and FDV) determination of the left ventricle (LV)

To assess changes in FSVLV and FDVLV during diabetes, we used a transverse echocardiographic section at the level of the papillary muscles in M mode with the application of the Teichholz method. For the determination of cardiac output (CO), the left ventricular ejection fraction, and the left ventricular shortening fraction, the following formulas were used: $(SV \div FDV) \times 100$ and $(VIDd - VIDs) \times 100 \div VIDd$ (16).

Determination of the risk of heart failure

A longitudinal echocardiographic section of four chambers in mode B and a pulsed Doppler in the mitral valve were used to obtain the Tei index (17).

Statistical analysis

With the results obtained, a two-way ANOVA test was performed. Values are presented as the mean \pm SE, * $P < .05$, ** $P < .03$, *** $P < .01$.

Results

Evaluation of blood glucose, body weight, blood pressure, and heart rate of diabetic rats

We found that the group of diabetic rats presented an increase in blood glucose 48 h after the administration of streptozotocin and sustained the increase through weeks 4, 8, and 12, while the rats in the control group showed no significant changes in blood glucose during the same periods of time (Table 1). However, the diabetic rats showed a significant reduction in body weight from week 4, which continued through weeks 8 and 12, while the control rats presented a gradual increase in body weight.

Evaluation of pulmonary arterial pressure (catheterization), systolic arterial pressure, heart rate, Fulton index, and BNP before and after week 12 of STZ administration

The diabetic group showed a significant increase in pulmonary arterial pressure, Fulton index, and BNP compared with the control group (Table 2). After week 12 of the administration of STZ, we observed a significant reduction in heart rate, but without significant changes in the systemic blood pressure of the diabetic group with respect to the control group.

Echocardiographic evaluation of changes in pulmonary arterial pressure and right ventricle in diabetic rats

We observed that the diabetic group presented a significant increase in pulmonary arterial pressure at weeks 4, 8, and 12, while the control group did not show any significant changes (Figure 2). In addition, the diabetic group presented a protosystolic

Table 1. Evaluation of blood glucose, body weight before and after week 12 of STZ administration. before and after week 12 of STZ administration.

Parameters	Group	Before the administration of STZ (n = 10)	Hours after STZ (n = 6)		Weeks after STZ (n = 6)		
			48	4	4	8	12
BG (mg/dL)	CTRL	107.33 \pm 5.5	106.93 \pm 6.4	108.5 \pm 6.5	112.39 \pm 7.6	112 \pm 3.6	
	DM	119.3 \pm 6.4	404.7 \pm 17.6**	434.7 \pm 20.6**	480.6 \pm 27.9**	504.3 \pm 68.9**	
W (g)	CTRL	263.5 \pm 14.4	303.0 \pm 14.4	342.7 \pm 14.4	406.3 \pm 14.5	423.2 \pm 14.1	
	DM	302.0 \pm 10.1	283.9 \pm 10.1	260.8 \pm 10.2*	264.5 \pm 10.2**	264.0 \pm 10.3**	

BG: Blood Glucose; W: Weight. The result values show in mean \pm S.E.M. * and ** indicate significant different to control group $P < 0.05$, $P < 0.01$ respectively.

Table 2. Evaluation of pulmonary arterial pressure (catheterization), systolic arterial pressure, heart rate, Fulton index and BNP before and after week 12 of STZ administration.

Parameters	Weeks after STZ	CTRL	DM
PASP (mm Hg)	0	11.32 \pm 0.94 (n = 4)	12.11 \pm 1.98 (n = 4)
	12	14.20 \pm 4.64 (n = 6)	48.6 \pm 2.08 (n = 6)**
SBP (mm Hg)	0	98.4 \pm 4.3 (n = 10)	108.4 \pm 7.0 (n = 10)
	12	103.5 \pm 5.6 (n = 6)	109.6 \pm 4.6 (n = 6)
HR (b/min)	0	369.7 \pm 8.0 (n = 10)	387.5 \pm 10.3 (n = 10)
	12	363.8 \pm 9.8 (n = 6)	315.7 \pm 6.2 (n = 6)*
FI	0	0.32 \pm 0.009 (n = 4)	0.30 \pm 0.010 (n = 4)
	12	0.29 \pm 0.014 (n = 6)	0.47 \pm 0.077 (n = 6)*
BMP (μ g/mL)	0	47.48 \pm 7.04 (n = 4)	47.48 \pm 7.04 (n = 4)
	12	47 \pm 0.05 (n = 6)	89 \pm 0.06 (n = 6)**

PASP: pulmonary artery systolic pressure; SBP: systolic blood pressure; HR: heart rate. FI: Fulton Index; BNP: Brain Natriuretic Peptide. The result values show in mean \pm S.E.M. * and ** indicate significant different to control group $P < 0.05$, $P < 0.01$ respectively.

notch (type II flow pattern) in the flow after the opening of the valve, and the control group presented type I flow (Figure 1). Furthermore, the diabetic group showed the presence of

regurgitation in the direction of pulmonary flow from week 4, in contrast to the absence of this change in the control group (Figure 2).

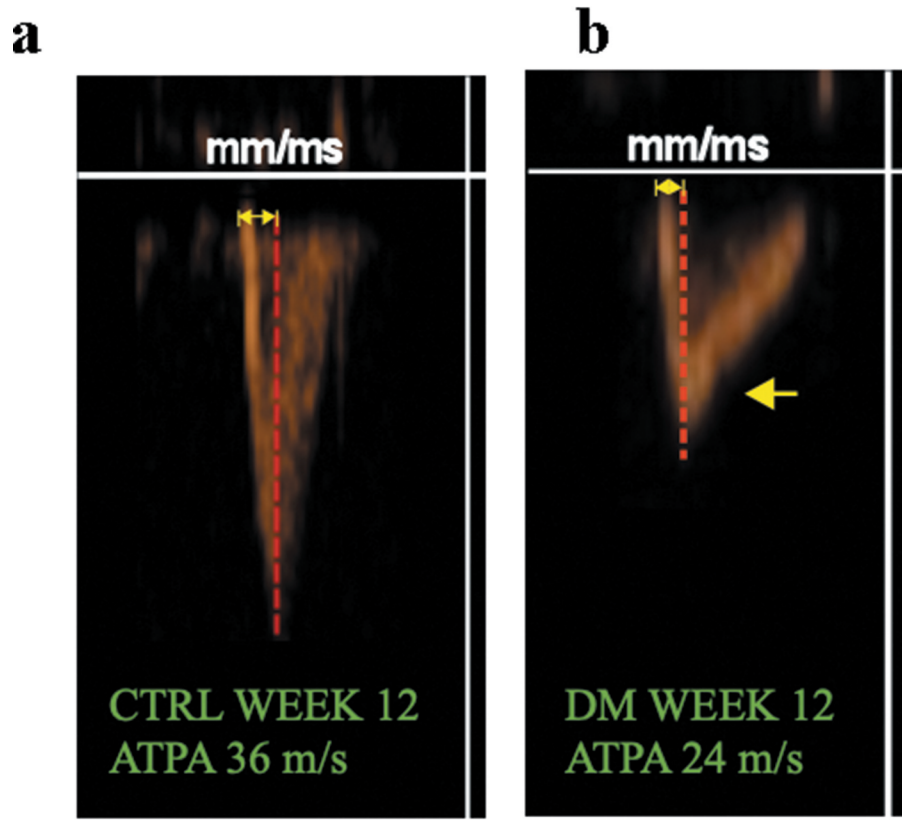


Figure 1. Representative image of the morphological analysis of pulmonary artery (PA) flow and the Acceleration Time of the Pulmonary Artery (ATPA). (a) Type I flow pattern and normal ATPA in the control group at week 12 (CTRL SEM12). (b) Protosystolic notch (yellow arrow), which coincides with a Type II flow pattern and decrease in ATPA indicating an increase in systolic blood pressure of the pulmonary artery in the DM group at week 12 (DM SEM12).

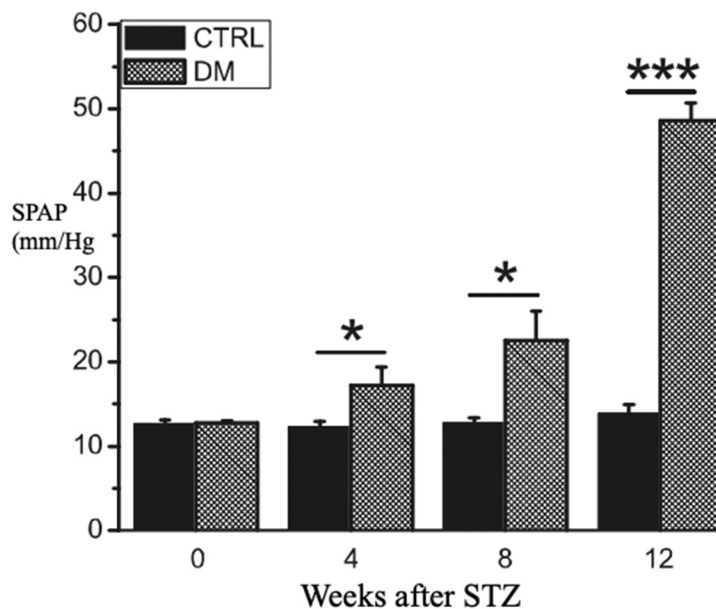


Figure 2. Gradual increase in the Pulmonary Arterial Systolic Pressure (PASP) in the DM group. The values are presented as the mean \pm SE, * $P < .05$, ** $P < .03$, *** $P < .01$, $n = 7$ rats per group.

Until week 12 of STZ administration, the diabetic group showed an increase in PWRV thickness (during systole and diastole), without significant changes in PWLV thickness (Figure 3b), while the ventricular walls and the interventricular septum of the control group did not show changes in thickness during systole and diastole (3A). The thickness of the posterior ventricular walls (free) of diabetic rats shows hypertrophy of the free wall of the right ventricle and atrophy of the free wall of the left ventricle until week 12, while no change was observed in the control group (Figure 4). It can be observed that RV shows an increase in the internal diameter and, conversely, the

VI shows a decrease in internal diameter in the diabetic group during systole and diastole, while the control group shows no changes (Figure 5).

The diabetic group showed a significant increase in the diameter of the RV at week 12 compared with the control group. However, it was observed that the diabetic group showed a decrease in the diameter of the LV during diastole from week 4 (6 C and 6D).

The eccentricity index of LV in the rats of the control group was 0.953 in systole and 1.02 during diastole, while the eccentricity index in diabetic rats was 1.5 during systole and 1.17 during

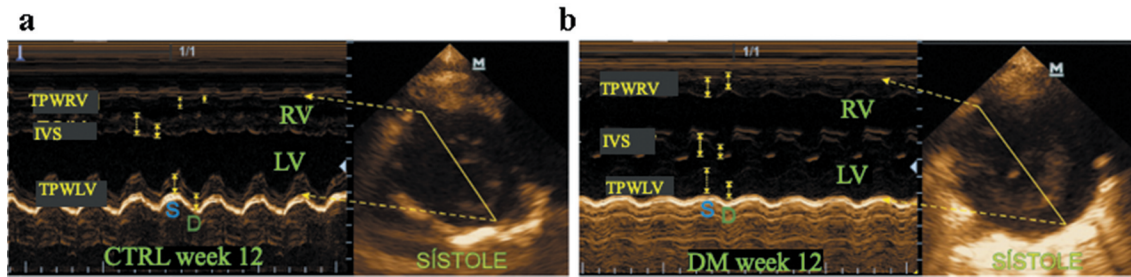


Figure 3. Cross-section of the heart at papillary muscle level, in M- mode (left) and in B- mode (right). (a) Representative M-mode image of the control group at 12 weeks, where the ventricular walls and the thickness of the SIV in systole and in diastole can be observed. (b) Representative M-mode image of the DM group at week 12, in which the thickness increase of the PWRV can be observed, and the thickness of the PWLV and the IVS can be observed without modification in systole and in diastole.

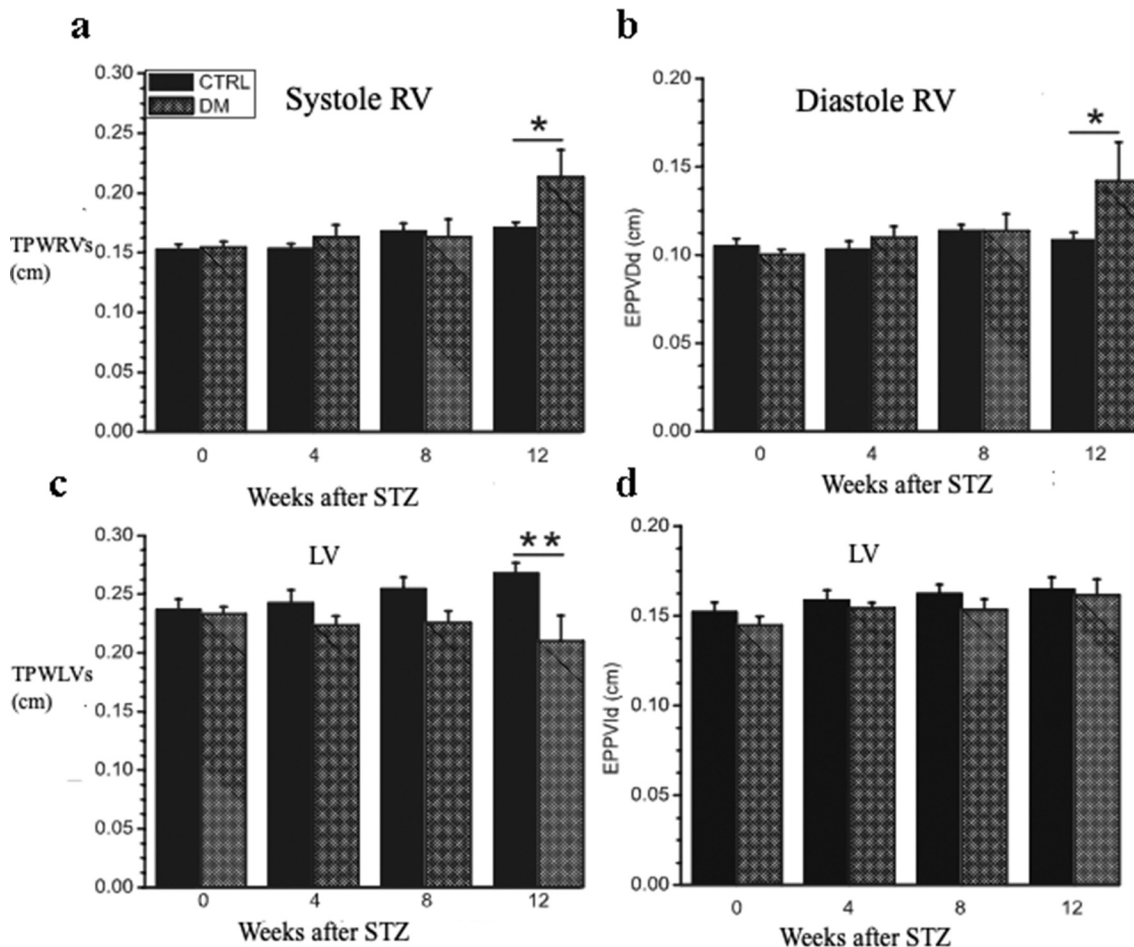


Figure 4. Biventricular parietal remodeling in the DM group. (a) Thickness of the posterior wall of the RV in systole. (b) Thickness of the posterior wall of the RV in diastole. (c) Thickness of the posterior wall of the LV in systole. (d) Thickness of the posterior wall of the LV in diastole. The values are presented as the mean \pm SE, * $P < .05$, ** $P < .03$, *** $P < .01$.

diastole (Figure 7). The eccentricity index of the control group did not show any relevant modifications during the period evaluated, either in systole or diastole (Figure 8a), while the diabetic group showed a significant increase at weeks 4, 8, and 12 (1.2 ± 0.05 , 1.3 ± 0.11 and 1.2 ± 0.09 , respectively) compared with the control group (0.97 ± 0.01 , 1.01 ± 0.02 and 1.01 ± 0.03 , respectively). Figure 8b shows the eccentricity index during diastole.

At week 12, the diabetic group presented an increase in FSV RV and FDV RV, as well as a decrease in the difference between these two parameters, which provides evidence for the decrease in SVRV, RVEF, and RVSF. Figure 9a,b represent the final RV volume for the rats in the control group, where it can be seen that the RV-LV and VI-RV ratios are adequate. However, the RV and LV relationship is affected in the diabetic group, as the RV increased its volume during systole (Figure 9c). In addition, it can be seen that the RV and LV ratio is affected, because the RV shows increased volume during diastole (Figure 9d).

Right ventricle systolic dysfunction in diabetic rats

There was an increase both in the final stroke of the RV and in the diastolic volume; this increase is significant only in the FEV of week 12 (Table 2 and Figure 10). Contrary to this, at the end of the study, there was a decrease in the systolic volume of the RV of the diabetic group, which did not occur in the control group (Figures 9b and 10). However, the systolic dysfunction of the RV was evident in week 12 in the diabetic group, but absent in the control group when the ejection fraction of the RV, the shortening fraction of the RV, and the shortening fraction of the RV area were evaluated (Figures 9a,c,d and 10).

The final RV systolic and diastolic volume for the diabetic rats evaluated at different weeks (0, 4, 8, and 12) after STZ treatment showed that the control group did not present any significant changes in these volumes throughout the evaluation period compared with the control group (Table 2). On the contrary, the diabetic group showed an increase in the final volume of the systolic and diastolic RV stroke from week 8, which remained significant until week 12 only for RV FSV (0.076 ± 0.076 ml) compared with the control group (0.034 ± 0.002 ml). This increase was very high, as it was 123.5%. However, although both the RV of the FSV and the RV of the FDV increased, their difference decreased, which could be interpreted as a decrease in the VSRV.

The ejection fraction detected for the RV was reduced in diabetic rats from week 4 compared with the control group (Figure 10). We also found that the diabetic group showed a decrease in the RVEF, and one of the RV systolic functions from week 8, and it became statistically significant at week 12 ($28.74 \pm 4.57\%$) compared with the control group ($62.17 \pm 2.22\%$).

The diabetic group showed a decrease in VSRV from week 4, and it was significant at week 12 (0.028 ± 0.004 ml) compared with the control group (0.056 ± 0.003 ml) (Figure 10b). In addition, we found that the diabetic group showed a decrease in VFR from week 4, and it was significant at week 12 ($29.45 \pm 4.97\%$) of the study compared with the control group ($43.15 \pm 1.64\%$) (Figure 11c). We also observed that the diabetic group showed a decrease in the shortening fraction of the RV area (SFRVA) from week 8, and it became significant at week 12 ($22.60 \pm 2.56\%$) of the study compared with the control group ($49.32 \pm 0.99\%$).

When we quantitatively assessed ventricular interdependence, we found that the diabetic group showed a significant decrease in the final diastolic volume of LV from week 4 (week 4, 0.558 ± 0.079 ml; week 8, 0.615 ± 0.088 ml; and week 12, 0.521 ± 0.094 ml) compared with the control group (week 4, 0.784 ± 0.029 ml; week 8, 0.83 ± 0.04 ml; and week 12, 0.958 ± 0.071 ml). This decrease was moderate at weeks 4 and 8 (28.87% and 25.9%, respectively) and severe in week 12 (45.54%). However, the final stroke volume was decreased significantly in the diabetic group only at week 4 (0.105 ± 0.023 ml), possibly due to a compensatory mechanism of the heart, compared with the control group (0.185 ± 0.012 ml).

The mitral valve flow can be seen in Figure 11, obtained using a pulsed Doppler on the diabetic group (Figure 11b) and the control group (Figure 11a) during week 12. In both images, we can distinguish the isovolumetric contraction time (IVCT), isovolumetric relaxation time (IVRT), and ejection time (ET). We can observe that for the diabetic group, the IVCT is null, the IVRT is increased, and the ET is decreased and has lost its shape. These changes were not shown by the control group. The changes in myocardial performance time for the diabetic group, evaluated using the Tei index, showed an increase from week 8 that became significant at week 12 (0.644 ± 0.058) of the study, compared with the control group (0.451 ± 0.027). This increase in the group of diabetics is very high, as it was 42.72% and is parallel to the risk of heart failure, because it reflects low myocardial performance. These modifications coincide with the qualitative evaluation of the Tei index (Figure 11).

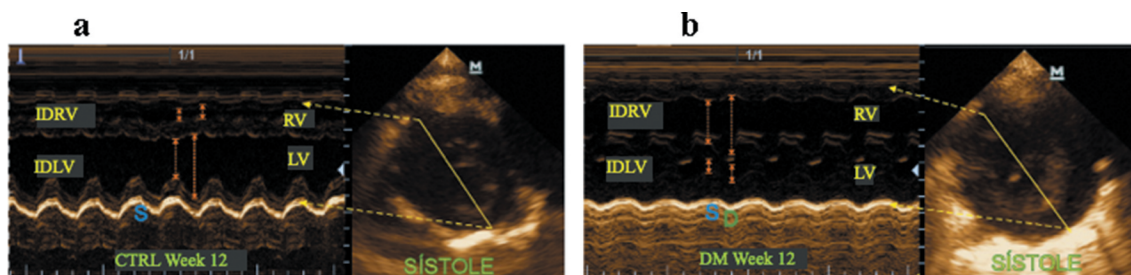


Figure 5. Cross-section of the heart at papillary muscle level in M-mode (left) and in B-mode (right). (a) Representative M-mode image of the control group at week 12, in which the internal ventricular diameters can be observed in systole and in diastole. (b) Representative M-mode image of the DM group at week 12, in which the internal diameter increase of the RV and internal diameter reduction of the LV in systole and in diastole can be observed.

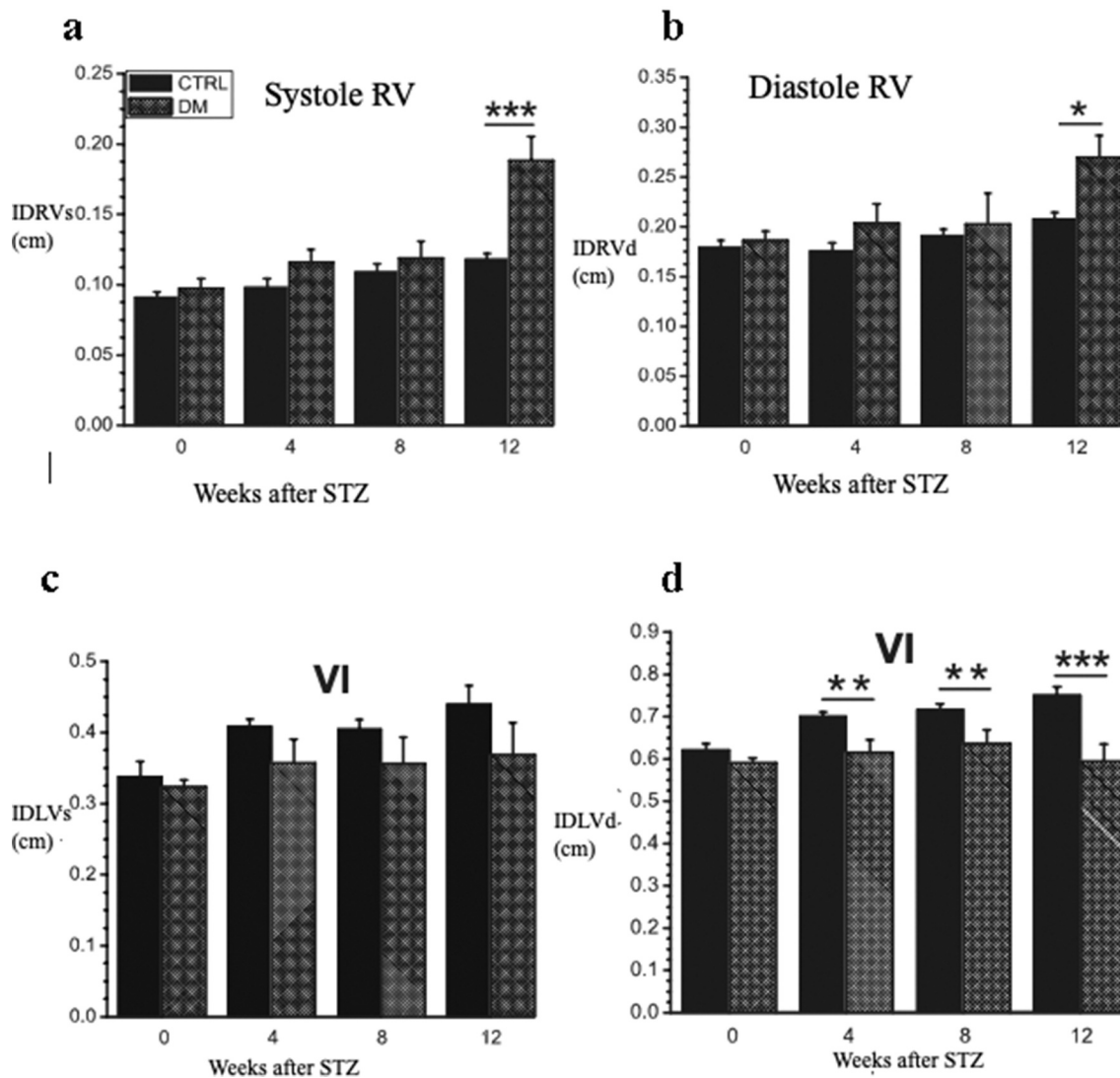


Figure 6. Biventricular diameter remodeling in the DM group. (a) RV internal diameter in systole. (b) RV internal diameter in diastole. (c) LV internal diameter in systole. (d) LV internal diameter in diastole. (e) (1) Longitudinal axis (2), Transverse axis, A; sagittal plane, B; transverse plane, C; frontal plane, (modified image by García 2004). (f) Cross-section of the heart, and diameters of the ventricles of the control group and the DM group. The values are presented as the mean \pm SE, * $P < .05$, ** $P < .03$, *** $P < .01$.

Discussion

Despite the well-known link between diabetes and cardiovascular disease, its relationship with right ventricular hypertrophy has been largely overlooked. It is widely known that diabetic patients have left ventricular hypertrophy, but right ventricular dysfunction has also been found (3,18). Previously, we found that type 1 diabetic rats presented right ventricular hypertrophy and endothelial dysfunction of the pulmonary arteries, a characteristic feature of pulmonary hypertension (4). Here we show that streptozotocin treatment, an established model for type 1 diabetes, induced hypertrophy, and dysfunction of the right ventricle as a consequence of increased pressure in the pulmonary artery.

After administration of streptozotocin, rats showed an increase in blood glucose after the first 48 hours and a gradual reduction in weight gain as reported by other authors for the type 1 diabetes model (19–22). We also showed that after 12 weeks, diabetic rats presented an increase in pulmonary arterial pressure (due to catheterization), right ventricular

hypertrophy, and an increase in plasma BMP, all characteristics of pulmonary hypertension (23,24). BNP quantification in diabetic groups was more than double that of controls.

Echocardiographic monitoring allowed us to observe an increase in pulmonary pressure and the appearance of regurgitation of the pulmonary artery at week 4, a change related to RV volume overload. These data coincide with the HAP models (14,23). We also found that until week 12, there was moderate hypertrophy of the right ventricular posterior wall, as well as moderate left ventricular wall atrophy in the diabetic group of the STZ-treated rats (6,21) and in the hypertensive rats induced with monocrotaline (24). The increase in RV internal diameter, both in systole and diastole at week 12, resulted in ventricular dilatation associated with a moderate increase in wall thickness (24).

The reduction of the LV lumen in diabetic rats can be explained by the pressure exerted by the dilated RV on the LV, as reported by Von et al. (15), who also reported a decrease in LV septolateral diameter evidenced by an increase in IE. We

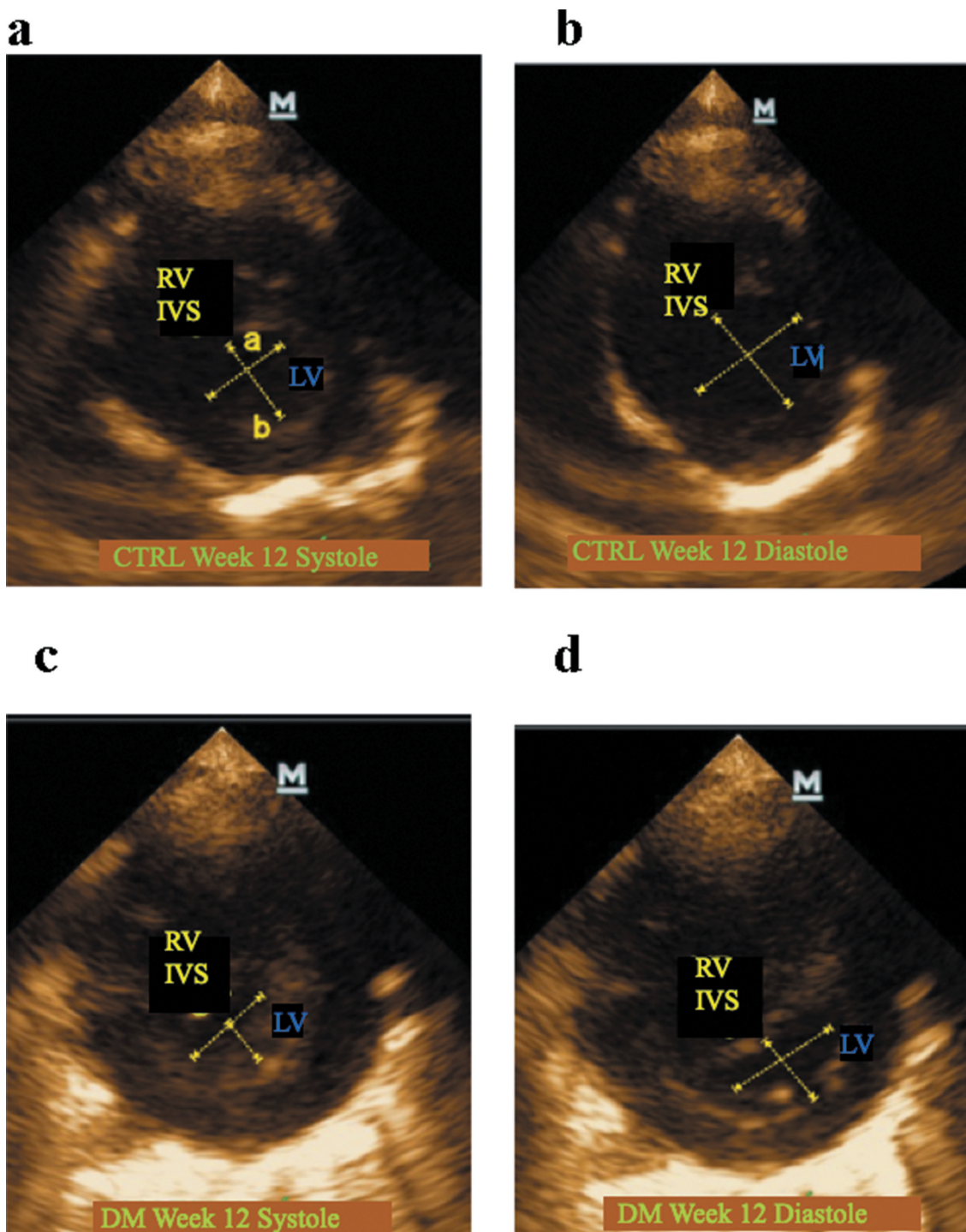


Figure 7. Superior, transverse section of the heart at papillary muscle level in mode- B. Representative image in B-mode of the control group at week 12, in systole (a) and in diastole (b). Concave RV (crescent shape), IVS concave to RV and convex to LV, and finally convex LV (mushroom shape), and an EI (a/b) ratio of approximately 1. Lower, transverse section of the heart at papillary muscle level in B-mode. Representative image in B-mode of the DM group at week 12, in systole (c) and in diastole (d). The RV has lost its concave characteristic (crescent shape), the IVS is straight, and the LV has lost its convex characteristic (mushroom shape), in addition to an EI ratio greater than 1.

believe that eccentric RV hypertrophy exerts pressure on the LV, which is reflected in an abnormal flattening of the ventricular septum and LV deformation. Decreased IDLVd suggests chronic PAH, as suggested by PAH models (25).

The reduction in the ejection fraction and the area shortening fraction at week 12 of the study would indicate the existence of severe RV systolic (contractile) dysfunction.

Hypertrophied RV is subject to ischemia associated with RV dysfunction, which could be related to increased myocardial density without a compensatory increase in angiogenesis (26) or to volume overload (27).

The decrease in LVSV and HR mentioned above led to a decrease in CO in the diabetic group compared with the control group. The change in these parameters has already

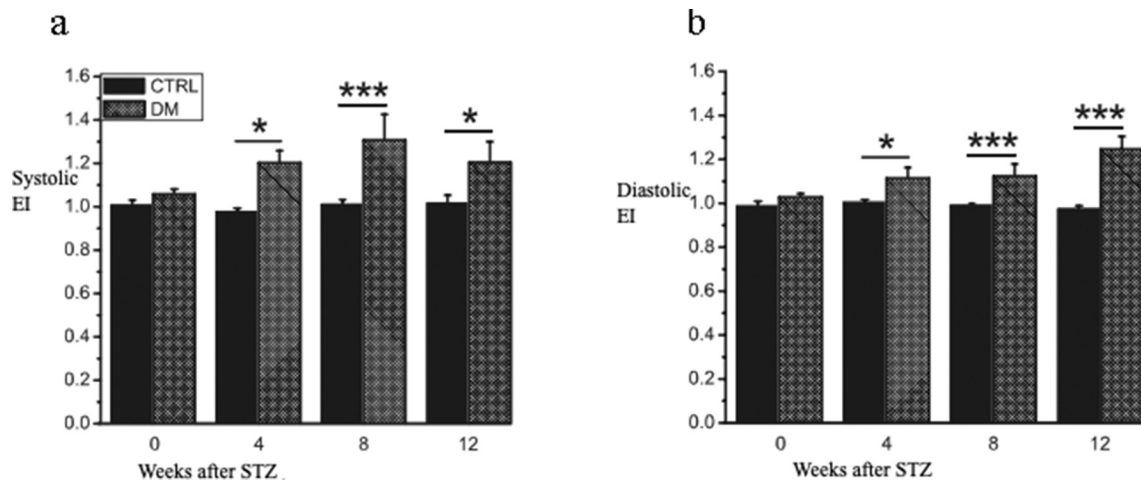


Figure 8. The systolic and diastolic EI increased in the DM group due to IVS rectification. (a) Systolic eccentricity index and (b) Diastolic eccentricity index. The values are presented as the mean \pm SE, * $P < .05$, ** $P < .03$, *** $P < .01$.

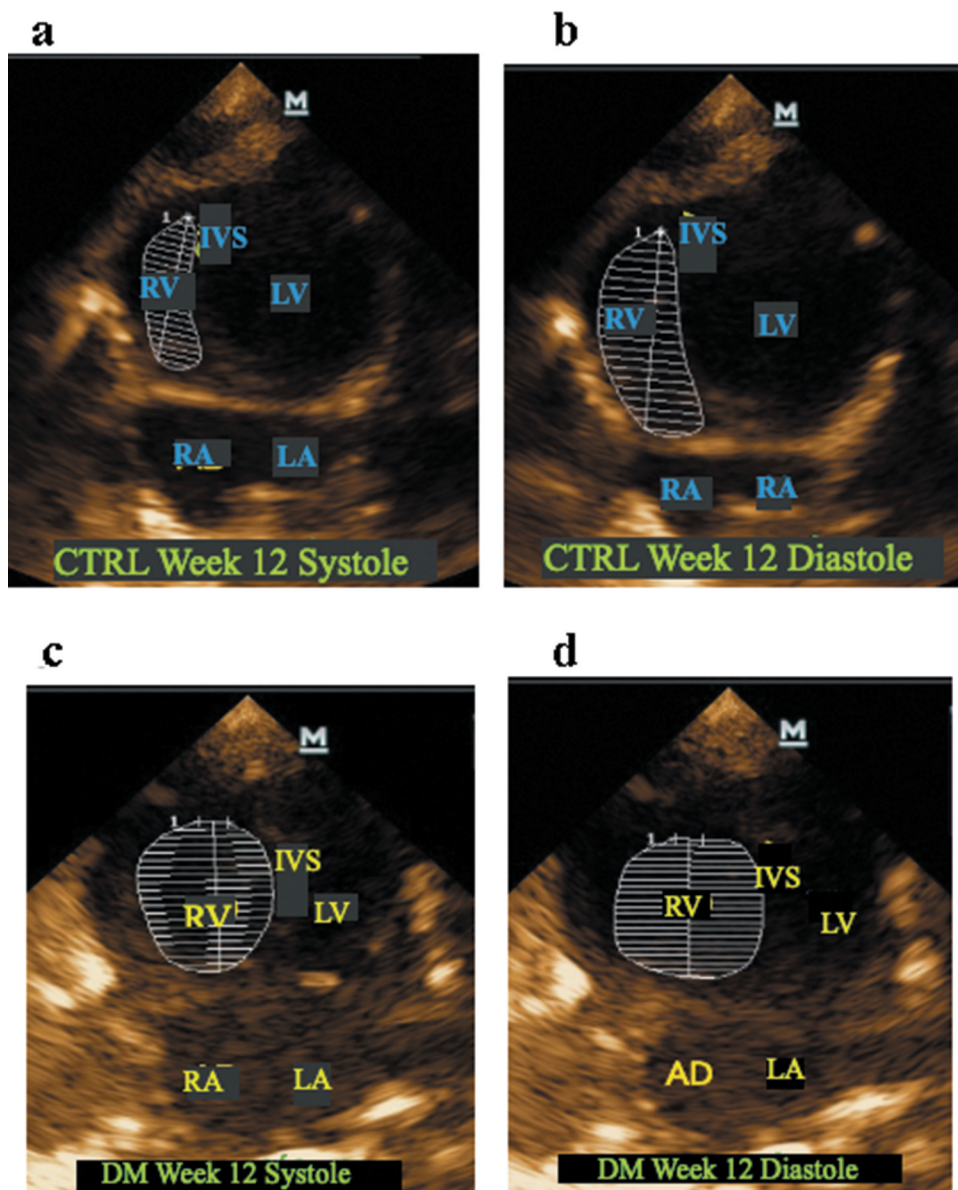


Figure 9. Superior, longitudinal section of the heart showing four chambers in B-mode. Representative image in B-mode of the control group at week 12, in systole (a) and in diastole (b). An adequate shortening of the RV and, therefore, unchanged systolic volume and ejection fraction. Lower, longitudinal section of the heart showing four chambers in B-mode. Representative image in B-mode of the DM group at week 12, in systole (c) and in diastole (d). A contractile dysfunction of the RV can be observed and, therefore, a decrease in the stroke volume and ejection fraction.

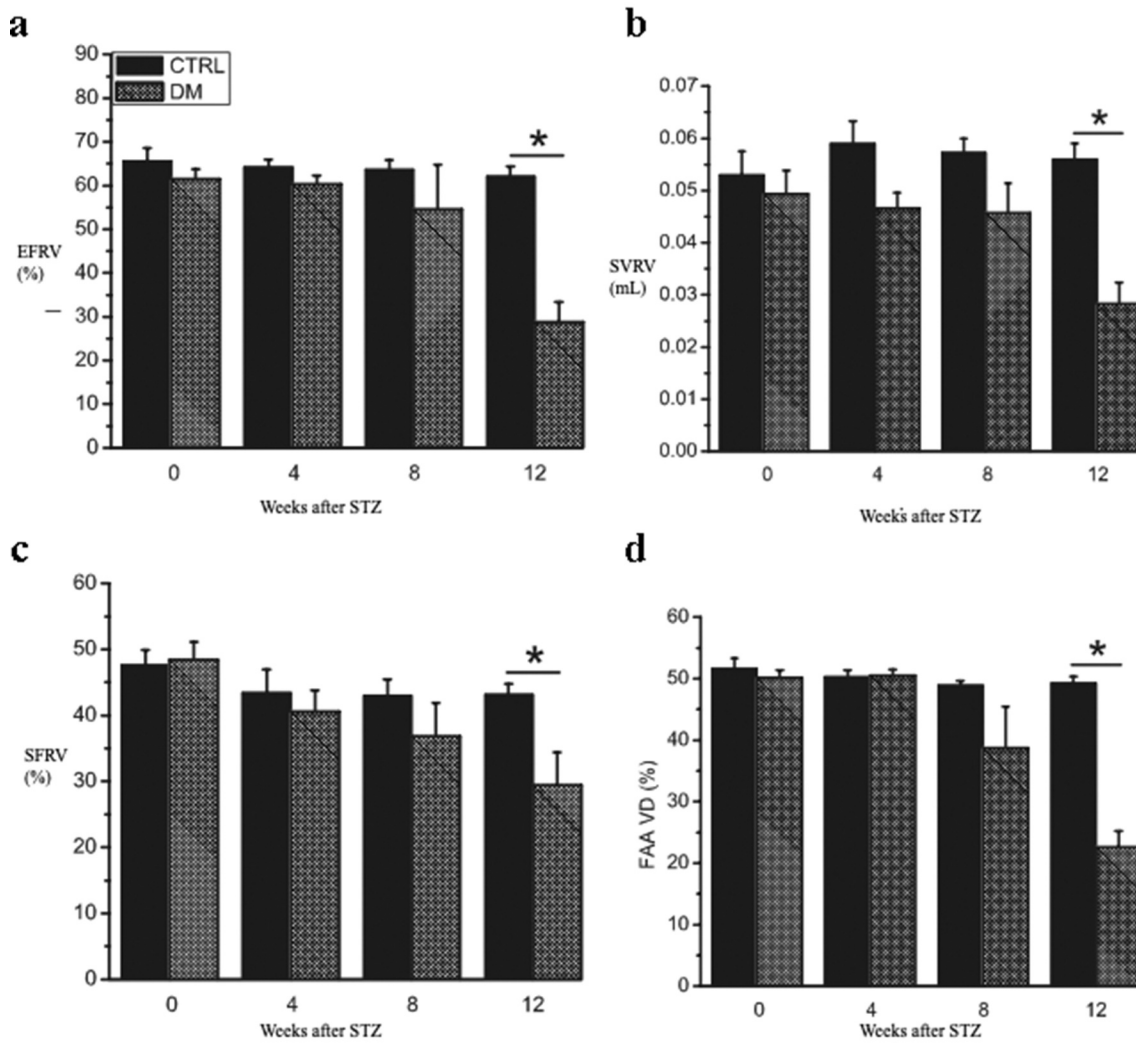


Figure 10. Determination of RV systolic function. (a) RV ejection fraction. (b) RV systolic volume. (c) RV shortening fraction. (d) RV area shortening fraction. The values are presented as the mean ± SE, * $P < .05$, ** $P < .03$, *** $P < .01$.

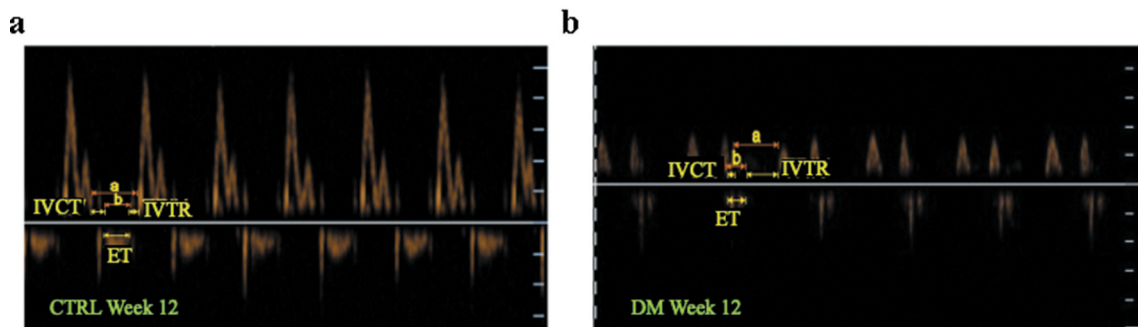


Figure 11. Mitral valve flow obtained by pulsed Doppler and Tei index. Representative image at week 12 of the control group (a) and the diabetic group (b). We observed an increase in the Tei index in the DM group, which was absent in the control group.

been reported in the PAH models mentioned above (14). Although the CO is the same for both ventricles and the RV normally performs a quarter of the systolic work, the CG of the RV decreased, mainly because the pulmonary vascular

resistance is one-tenth of the systemic vascular resistance, and this was reflected in the decrease in LV GC due to ventricular interdependence (28). However, the significant increase in the Tei index of the diabetic group at week 12

reflects an increased risk of developing heart failure (29); therefore, the association of MD and PAH may increase the risk of heart failure and a poor prognosis of the disease.

Conclusions

PAH induced by experimental diabetes generates an increase in right ventricular afterload with the consequent eccentric hypertrophy, systolic dysfunction, and a high risk of heart failure.

Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [0]; VIEP-BUAP [0]; PRODEP-SEP [0].

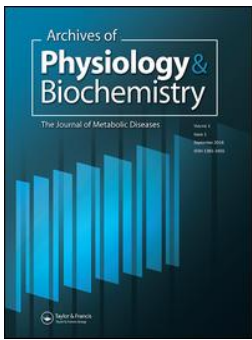
ORCID

Alejandro Reynoso Palomar  <http://orcid.org/0000-0002-0321-2573>

References

- Rutter MK, Meigs JB, Sullivan LM, D'Agostino RBS, Wilson PW. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and incident cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. *Diabetes*. 2005;54(11):3252–57. doi:10.2337/diabetes.54.11.3252.
- Humbert M. Update in pulmonary arterial hypertension 2007. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:574–79. doi:10.1164/rccm.200801-029UP.
- Mohammad RM, Norah M. Presence of biventricular dysfunction in patients with type ii diabetes mellitus. *Congest Heart Fail*. 2007;13(2):78–80. doi:10.1111/j.1527-5299.2007.888138.x.
- Lopez LJG, Moral SJ, Frazziano G, Gomez VMJ, Flores HJ, Monjaraz E, Cogolludo A, Perez VF. Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295:727–32. doi:10.1152/ajplung.90354.2008.
- Lopez LJG, Moral SJ, Frazziano G, Gomez VMJ, Moreno L, Menendez C, Flores HJ, Lorente JA, Cogolludo A, Perez VF. Type 1 Diabetes-induced hyper-responsiveness to 5-hydroxytryptamine in rat pulmonary arteries via oxidative stress and induction of cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;338(1):400–07. doi:10.1124/jpet.111.179515.
- Moral SJ, Lopez LJG, Menendez C, Moreno E, Barreira B, Morales CD, Escolano L, Fernandez SP, Villamor E, Cogolludo A, et al. Different patterns of pulmonary vascular disease induced by type 1 diabetes and moderate hypoxia in rats. *Exp Physiol*. 2012;97(5):676–86. doi:10.1113/expphysiol.2011.062257.
- Widya RL, Van DMRW, Smit JWA, Rijzewijk LJ, Diamant M, Bax JJ, De RA, Lamb HJ. Right ventricular involvement in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care*. 2013;36(2):457–62. doi:10.2337/dc12-0474.
- Ammar W, Abdallah S, Hossary HEL, Abdel GM. Right ventricular function in asymptomatic type 2 diabetic patients: A conventional and tissue doppler echocardiographic imaging study. *Egypt Heart J*. 2014;66(1):21. doi:10.1016/j.ehj.2013.12.058.
- Roifman I, Ghugre N, Zia MI, Farkouh ME, Zavodni A, Wright GA, Connelly KA. Diabetes is an independent predictor of right ventricular dysfunction post STElevation myocardial infarction. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15:34. doi:10.1186/s12933-016-0352-2.
- Tadic M, Cuspidi C, Vukomanovic V, Ilic S, Celic V, Obert P, Kocijancic V. The influence of type 2 diabetes and arterial hypertension on right ventricular layer-specific mechanics. *Acta Diabetol*. 2016;53(5):791–97. doi:10.1007/s00592-016-0874-9.
- Whitaker ME, Vineet NB, Sinari S, Dherange PA, Natarajan B, Trutter L, Brittain EL, Hemnes AR, Austin ED, Patel K, et al. Diabetes mellitus associates with increased right ventricular afterload and remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am J Med*. 2018;131(6):702.e7–702.e13. doi:10.1016/j.amjmed.2017.12.046.
- Al-Shafei AIM, Wise RG, Gresham GA, Carpenter TA, Hall LD, Huang CLH. Magnetic resonance imaging analysis of cardiac cycle events in diabetic rats: the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition. *J Physiol*. 2002;538(2):555–72. doi:10.1113/jphysiol.2001.012857.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Technical specifications for the production, care and use of laboratory animals. DOF; 2001. México.
- Thibault HB, Kurtz B, Raheer MJ, Shaik RS, Waxman A, Derumeaux G, Halpern EF, Bloch KD, Scherrer CM. Non-invasive assessment of murine pulmonary arterial pressure: validation and application to models of pulmonary hypertension. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2010;3(2):157–63. doi:10.1161/CIRCIMAGING.109.887109.
- Von SC, Aubert JD, Mitsakis P, Yerly P, Prior JO, Pierre NL. Pulmonary hypertension and indicators of right ventricular function. *Front Med*. 2016;3:23.
- Watson LE, Sheth M, Denyer RF, Dostal DE. Baseline echocardiographic values for adult male rats. *J Am Soc Echocardiogr*. 2004;17:161–67. doi:10.1016/j.echo.2003.10.010.
- Arora G, Morss AM, Piazza G, Ryan JW, Dinwoodey DL, Rofsky N, Manning WJ, Chuang ML. Differences in left ventricular ejection fraction using Teichholz formula and volumetric methods by CMR: implications for patient stratification and selection of therapy. *J Cardio Mag Reso*. 2010;12(1):202. doi:10.1186/1532-429X-12-S1-P202.
- Kosmala W, Colonna P, Przewlocka-Kosmala M, Mazurek W. Right ventricular dysfunction in asymptomatic diabetic patients. *Diabetes Care*. 2004;27(11):2736–38. doi:10.2337/diacare.27.11.2736.
- Marangoni MN, Brady ST, Chowdhury SA. The co-occurrence of myocardial dysfunction and perihareal insensate neuropathy a streptozotocin-induced rat model of diabetes. *Cardiovasc Diabet*. 2014;13:11. doi:10.1186/1475-2840-13-11.
- Howarth F, Jacobson M, Shafiqullah M, Eadegate E. 2005. Long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. *Exp Physiol*. 90(6):827–35. doi:10.1113/expphysiol.2005.031252
- Bequer L, Gómez T, Molina JL, Artilés D, Bermúdez R, Clapés S. 2016. Acción de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal de la diabetes. *Biomed*. 36(2):230–38. doi:10.7705/biomedica.v36i2.2686
- Pang A, Hu Y, Zhou P, Long G, Tian X, Men L, Shen Y, Liu Y, Cui Y. Corin is down-regulated and exerts cardioprotective action via activating pro-atrial natriuretic peptide pathway in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Diabetol*. 2015;14:134. doi:10.1186/s12933-015-0298-9.
- Jones JR, Mendes L, Rudd MA, Russo G, Loscalzo J, Zhang YY. Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(1):H364–H371. doi:10.1152/ajpheart.00979.2001.
- Escudero EM, Pinilla OA, Ennis IL. Remodelamiento Ventricular Izquierdo: conceptos y Utilidad del Ecocardiograma. *Rev Bras Ecocardiogr Imagem Cardiovasc*. 2010;23(4):55–68.
- Luitel H, Sydykov A, Schymura Y, Mamazhakypov A, Janssen W, Pradhan K, Wietelmann A, Kosanovic D, Dahal BK, Weissmann N, et al. Pressure overload leads to an increased accumulation and activity of mast cells in the right ventricle. *Physiol Rep*. 2017;5(6):e13146. doi:10.14814/phy2.13146.
- Grinnan D, Farr G, Fox A, Sweeney L. The role of hyperglycemia and insulin resistance in the development and progression of

- pulmonary arterial hypertension. *J Diabetes Res.* 2016;2481659. doi: [10.1155/2016/2481659](https://doi.org/10.1155/2016/2481659). Epub 2016 Jun 8
27. Dvorkin MA, Cardinali DP. Best & Taylor. In: *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica* 14 ed. Ed. Buenos Aires (Argentina): Médica Panamericana; 2010.
28. O'Rourke RA, Dell'Italia LJ. Diagnosis and management of right ventricular myocardial infarction. *Curr Probl Cardiol.* 2004;29(1):6-47. doi:[10.1016/j.cpcardiol.2003.08.003](https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2003.08.003).
29. Thierer J. Insuficiencia cardíaca y diabetes. *Rev Argent Cardiol.* 2006;74:60-67.



Aortic dysfunction by chronic cadmium exposure is linked to multiple metabolic risk factors that converge in anion superoxide production

Celeste Santamaria-Juarez, Fausto Atonal-Flores, Alfonso Diaz, Victor E. Sarmiento-Ortega, Miguel Garcia-Gonzalez, Patricia Aguilar-Alonso, Gustavo Lopez-Lopez, Eduardo Brambila & Samuel Treviño

To cite this article: Celeste Santamaria-Juarez, Fausto Atonal-Flores, Alfonso Diaz, Victor E. Sarmiento-Ortega, Miguel Garcia-Gonzalez, Patricia Aguilar-Alonso, Gustavo Lopez-Lopez, Eduardo Brambila & Samuel Treviño (2020): Aortic dysfunction by chronic cadmium exposure is linked to multiple metabolic risk factors that converge in anion superoxide production, Archives of Physiology and Biochemistry, DOI: [10.1080/13813455.2020.1726403](https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1726403)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1726403>



Published online: 18 Feb 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 24



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Aortic dysfunction by chronic cadmium exposure is linked to multiple metabolic risk factors that converge in anion superoxide production

Celeste Santamaria-Juarez^a, Fausto Atonal-Flores^b, Alfonso Diaz^a, Victor E. Sarmiento-Ortega^c, Miguel Garcia-Gonzalez^a, Patricia Aguilar-Alonso^c, Gustavo Lopez-Lopez^a, Eduardo Brambila^c and Samuel Treviño^c

^aDepartment of Pharmacy, Faculty of Chemistry Science, University Autonomous of Puebla, Puebla, Mexico; ^bDepartment of Physiology, Faculty of Medicine, University Autonomous of Puebla, The Volcano, Mexico; ^cLaboratory of Chemical-Clinical Investigations, Department of Clinical Chemistry, Faculty of Chemistry Science, University Autonomous of Puebla, Puebla, Mexico

ABSTRACT

Context: The chronic exposure to Cadmium (Cd) constitute an risk to develop hypertension and cardiovascular diseases associated with the increase of oxidative stress.

Objective: In this study, we investigate the role of metabolic changes produced by exposure to Cd on the endothelial dysfunction via oxidative stress.

Methods: Male Wistar rats were exposed to Cd (32.5-ppm) for 2-months. The zoometry and blood pressure were evaluated, also glucose and lipids profiles in serum and vascular reactivity evaluated in isolated aorta rings.

Results: Rats exposed to Cd showed an increase of blood pressure and biochemical parameters similar to metabolic syndrome. Additionally, rats exposed to Cd showed a reduced relaxation in aortic rings, which was reversed after the addition of SOD and apocynin an inhibitor of NADPH.

Conclusion: The Cd-exposition induced hypertension and endothelial injury by that modifying the vascular relaxation and develop oxidative stress via NADPH oxidase, superoxide and loss nitric oxide bioavailability.

ARTICLE HISTORY

Received 30 October 2019
Revised 28 January 2020
Accepted 29 January 2020
Published online 14 February 2020

KEYWORDS

Hypertension; superoxide dismutase; apocynin; vascular reactivity; NADPH oxidase

Introduction

Cadmium (Cd) is a toxic heavy metal, which has been classified between the 7th most hazardous environmental contaminants by the Agency for Toxic Substances and Disease Registry. This metal is widely distributed in the environment, constituting an important risk to the population (ATSDR 2012). Low Cd concentration is currently present in several foods, drinking water, ambient air and tobacco smoke (Cuypers *et al.* 2010, Wang *et al.* 2019). However, although its specific adverse effects have been described, Cd toxicodynamic is yet poorly understood.

Acquisition of Cd by organisms frequently occurs by ingestion and inhalation. Liver, kidney, heart, and vascular tissue are affected after low to moderate Cd-exposures, as has been reported in humans and animal models (Rani 2006, Nzungue *et al.* 2008). After an acute exposure of Cd, the liver is the primary organ of accumulation (Messner and Bernhard 2010, Sarmiento-Ortega *et al.* 2017); meanwhile, the kidney is the target organ after an occupational or environmental chronic exposure (Zhang *et al.* 2016, Rafati Rahimzadeh *et al.* 2017). During a chronic exposure with Cd exist a major interaction of the metal with vascular endothelium. A number of studies have suggested a possible link between Cd exposure and the development of atherosclerosis and hypertension

(Caciari *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2016, Rafati Rahimzadeh *et al.* 2017). Epidemiologic studies show that in general population chronically exposed to Cd, there is an increased risk to develop hypertension and cardiovascular diseases (CVD) (Peters *et al.* 2010, Almenara *et al.* 2013, Tellez-Plaza *et al.* 2013; Ruiz-Hernandez *et al.* 2017).

Currently, 17.5 million people die each year from CVD (31% of all deaths worldwide), more than 75% of these deaths occur in low-income and middle-income countries; 80% of all CVD deaths are due to heart attacks and strokes (Van Heerebeek *et al.* 2002). Atherosclerosis is the leading cause of most CVDs, being molecular, cellular, physiological and pathological changes in vessels wall the most notable events. Atherosclerosis and hypertension are known to be associated with endothelial dysfunction. Several studies have suggested that exposure to relatively high doses of Cd, vascular endothelium may be one of the primary targets of toxicity, because the interaction of Cd with the vascular endothelium result in a loss of the endothelial barrier integrity, and the increase of endothelial permeability results in oedema, haemorrhage, hypoxia, and inflammation leading to the development of the atherosclerotic process (Lassegue and Griending 2010, Chen *et al.* 2018). Also, Cd can inhibit the release and/or the actions of endothelium-derived

vasodilator substances such as prostanoids and nitric oxide (NO) (Lopez-Lopez *et al.* 2008, Almenara *et al.* 2013, Angeli *et al.* 2013), increasing vascular oxidative stress.

Previous studies suggest that Cd alters the vascular conductance by mechanisms that include antioxidant response deprivation and increases of oxidative stress, mainly by the production of reactive oxygen species (ROS) and superoxide ion ($^{\circ}\text{O}_2^-$), probably associated with the activity of cyclooxygenase-2 (COX-2) and NADPH oxidase (Almenara *et al.* 2013, Nwokocha *et al.* 2013). Therefore, radical production by Cd could be mediated through an indirect mechanism. On the other hand, Cd exposure has been related with an increase of free fatty acids (FFA), triglycerides and small and dense LDL, which produce insulin resistance in vascular endothelium, and together are associated with an increase of oxidative stress (Takahashi *et al.* 2004, Sarmiento-Ortega *et al.* 2017, Deering *et al.* 2018). Oxidative stress promotes continuous oxidation of low-density lipoprotein and consequently, induce atherosclerosis (Eum *et al.* 2008). Indeed, reactive nitrogen intermediates derived from NO, such as peroxy-nitrite, promote LDL oxidation in the artery wall contributing to the development of atherosclerotic plaque, being aorta the major site of these alterations.

Therefore, in the present study, we investigate if a chronic Cd exposure could generate risk factors associated to metabolic changes that can carry out to the development of endothelial dysfunction in the aorta of Wistar rat, and whether these can be linked to the superoxide.

Material and methods

Animals and treatment

A total of 50 male Wistar rats, weighing 70–80 g were used, animals were obtained from the “Claude Bernard” vivarium of the Universidad Autonoma de Puebla. Rats were maintained under controlled light cycles of 12 h, and temperature of 19–26 °C in polycarbonate boxes with a sawdust bed and availability of food and water “*ad libitum*”. Before the study, animals were conditioned with a normocaloric diet up to obtain 100 g weight post-weaning. LabDiet 5001 standard diet (LabDiet, St. Louis, USA) was used; the composition diet corresponded to carbohydrates (57.99%), fat (13.5%), and protein (28.51%). Whenever rats reached the desired weight, these were randomly separated into two groups; Control $n = 20$ (drinking water “*ad libitum*”) and Cd $n = 30$ (32.5 ppm Cd in drinking water “*ad libitum*”). LOAEL calculation: during the Cd-exposure rats consumed a mean of 6.5 mg Cd/kg/day; taking account water average consumption and the weight of each rat and time exposure. After 2 months of Cd-administration, rats from control and Cd groups were evaluated to determine zoometric indices, blood Cd level, insulin resistance panel, lipids profile, atherogenic indices, and blood pressure. Then, the rats were carefully prepared for aorta dissection. Each procedure was followed according to the “Citizen’s Guide for Care and Use of Laboratory Animals of Mexico NOM-062-ZOO-1999” and approved by the Institutional Committee for Care and Use of Animals. An

effort was made to minimise the number of animals used, and to ensure minimal animal pain and/or discomfort.

Zoometry

Weight, abdominal perimeter, body mass index and body fat percentage index were monitored. The weight was measured using a digital balance (Torrey, model: LPCR-20/40). The size of each animal was obtained by measuring the length from the base of the tail to the tip of the nose; both weight and length were used to calculate body mass index (BMI): $\text{weight}/\text{size}^2$. The abdomen diameter was estimated using the diaphragm zone as an upper limit and the fold of the legs as the bottom limit. Finally, the fat percentage was calculated according to Lee index for rodent models, with the formula: $[\text{weight in g}^{(0.33)}/\text{size in mm}]^*100$ (Rogers and Webb 1980, Treviño *et al.* 2015).

Blood pressure measurement

Blood pressure was measured in all animals. Systolic and diastolic blood pressure were determined using the non-invasive tail-cuff method (XBP1001 Rat tail, Blood Pressure system, Kent Scientific Corporation). Conscious rats were restrained for 5–10 min in a warm and quiet room and conditioned to cuff inflation-deflation cycles prior to the recordings. Systolic and diastolic blood pressure were measured, and the mean of six measurements was taken as representative.

Blood samples and assays

Blood samples were obtained under fasting conditions: Food and water were suspended 4–5 h before the punctures were made. Then animals were anaesthetised with an intraperitoneal dose of Ketamine + Xylazine (20/137 mg/kg) 0.2 mL/100 g. Samples were collected by intra-cardiac puncture, and 1 mL of blood was allowed clot at room temperature in the processing of serum in three different tubes, then samples were centrifuged at $500 \times g$ for 5 min, and serum separated and frozen at -70°C . Each tube was used for the determination of Cd level, lipid profile, and insulin resistance panel, respectively.

Cadmium and biochemical determinations

Once serum was thawed at room temperature, Cd level was determined in triplicate using a flame atomic absorption (Perkin Elmer PinAAcle 900F). Glucose and lipids profile including triglycerides (TG), total cholesterol (Chol) and its fractions: HDL, LDL, and VLDL were assayed with commercial kits and using a BTS-350 BioSystems analyser. Serum free fatty acids (FFA) concentration was determined according to the method described by Brunk and Swansson (Sarmiento-Ortega *et al.* 2018). Insulin resistance panel: Plasma insulin concentration was determined by an ELISA immunoassay (Cat. No. CT-600101A, Diagnostica International Company, Guadalajara, Mex). The Insulin ELISA kit recognise and

quantitates the human or rat insulin in serum or plasma by a solid-phase sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), which is designed to measure the amount of the hormone bound between a matched antibody pair. Samples, standards, and controls have used that bind to the immobilised (capture) antibody, the kit sensitivity is 5 μ UI/mL. The sandwich is formed by the addition of the second (detector) antibody, a substrate solution is added that reacts with the enzyme-antibody-target complex to produce measurable signal. The intensity of this signal is directly proportional to the concentration of the target present in the original specimen. The resulting antibody-antigen complex assessed at 415 nm in a Stat fax 2600 plate reader (WinerLab Group, Buenos Aires, Arg), insulin concentrations were obtained from a standard curve with a range of 0–200 μ UI/mL. Glucose and insulin levels were used to calculate the Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance (HOMA-IR) for rodent: [fasting glucose (mg/dL)*fasting insulin (μ UI/mL)]/2430; Homeostasis Model Assessment Sensitive Percentage (HOMA-S%), [1/HOMA-IR]*100, and Cardiovascular Insulin Resistance Index (IRCV): HOMA-IR*[TG (mg/dL)/HDL(mg/dL)] (Treviño *et al.* 2015).

Atherogenic indices

Atherogenic indices were determined according to the formulas described by Millán *et al.* 2009. Atherogenic or Castelli index: Total Chol/HDL ratio and the LDL/HDL ratio were used as indicators of vascular risk. Non-HDL cholesterol/HDL ratio as a coronary risk predictor: Total Chol–HDL/HDL. Logarithmic transformation of the TG/HDL cholesterol molar concentration ratio: log (TG/HDL cholesterol), known as the atherogenic plasma index, was used to show a positive correlation between the percentage of small HDL and small-dense LDL particles.

Isolated rat aorta preparation and vascular reactivity determinations

The descending thoracic aorta was quickly obtained and placed in Krebs-Henseleit solution (118 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄ and 11 mM glucose) at pH 7.4. After removal the fat excess and connective tissue, the aorta was cut into rings (2 \pm 3 mm). Rings were suspended horizontally by means of two parallel steel supports inserted in thoracic aorta lumen, maintained in 5 mL chambers filled with a Krebs-Henseleit solution at 37 °C and bubbled with a mixture of gas contained 95% O₂ and 5% CO₂. Support was used as an anchorage, and another one was coupled with an isometric tension transducer system GRAS SFT-03 coupled to a pre-amplifier GRASS-7-DAJK (BioAmp, AD Instruments). Signal obtained from the experiments was recorded by means of an analogic-digital converter (PowerLab, BioAmp, AD Instruments), and data were analysed with the Chart 5.0 software. In each aorta ring, first was applied a rest tension of 2 g and equilibrated for 60 min. All the experiments were performed with rings containing endothelium to evaluate the integrity of endothelial layer, thus

was measured using the relaxing effect with 10⁻⁷ M acetylcholine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in pre-contracted rings with 10⁻⁶ M phenylephrine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After an equilibrium period, aorta rings obtained from both: control and Cd-treated animals were placed in an 80 mM KCl solution, until tension reach stability, and immediately were washed with a Krebs-Henseleit solution. When rings returned to rest tension, phenylephrine (1 \times 10⁻⁹ to 1 \times 10⁻⁵ M) concentration-response curves were performed.

Rings obtained from control and experimental animals were pre-contracted with 10⁻⁶ M phenylephrine and after these rings reach a stable state, immediately were performed concentration-response curves to acetylcholine (1 \times 10⁻⁹ to 1 \times 10⁻⁵ M) and sodium nitroprusside (0.1 \times 10⁻⁹ to 3 \times 10⁻⁵ M in the dark). Concentration-response curves were performed by the accumulative addition in absence or presence of superoxide dismutase (SOD) that catalyses the superoxide dismutation ($\text{O}_2^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) or apocynin (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA), as NADPH oxidase inhibitors.

Statistical analysis

Zoometry, Cd level, biochemical assay, lipid profile, insulin resistance profile, atherogenic indexes, and blood pressure measurement are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of control and Cd-treated rats; differences were analysed using Student *t*-test, *p* \leq .05 was considered as significance level (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA).

Contractile responses are expressed as the percentage of the maximal response induced by 80 mM KCl (mean \pm SE of tension measures). Relaxation responses to acetylcholine or sodium nitroprusside are expressed as the percentage of relaxation in relation to the maximal contractile response. For each concentration-response curve, the maximal effect (Emax) and the concentration of agonist that produced 50% of the maximal response (pD₂) were calculated using nonlinear regression analysis (GraphPad Prism GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Sensitivities of the agonists are expressed as pD₂ (log EC₅₀). The effects of apocynin and superoxide dismutase were analysed after relaxation responses to acetylcholine and are expressed as the percentage of relaxation of the maximal contractile response, Emax and pD₂ were determinate as above are indicated.

Results

Effect of cadmium exposure on blood cadmium levels and blood pressure

Results obtained in this work showed that rats administered with 32.5 ppm of Cd in drinking water for 2 months, had an average of 52.1 \pm 1.35 ppm of Cd in serum, meanwhile, non-exposed rats showed 0.52 \pm 0.07 ppm of Cd in serum (Figure 1). Administration of Cd also produced a hypertensive effect, results showed a significant increase of 28% in systolic blood pressure (*p* = .0015), and 17% in diastolic blood pressure

($p = .0050$), as compared against the rats of the control group (Figure 2).

Effect of cadmium exposure on zoometric and biochemical parameters

Zoometric parameters such as weight, abdominal perimeter, BMI and body fat percentage index did not show changes. Meanwhile, the insulin resistance profile exhibited significant increases: 87.5% fasting insulin ($p = .0031$), 80% fasting

glucose ($p = .0018$), 235% HOMA-IR ($p = .0001$), 70% HOMA-5% ($p = .0001$) and 1178% Cardiovascular Insulin Resistance Index (IRCV) ($p = .0005$, (see Table 1).

The Cd-exposed rats showed an increase of FFA levels (479%; $p = .0001$), triglycerides (59%; $p = .0114$), total cholesterol (30%; $p = .0001$), VLDL (165%; $p = .0005$), LDL (85%; $p = .0005$), and a HDL decrease (59%; $p = .0008$). In regard to atherogenic indices rats showed increases TC/HDL ratio (220%; $p = .0001$), LDL/HDL ratio (358%; $p = .0014$), coronary risk predictor: Non-cholesterol-HDL/HDL ratio (448%; $p = .0012$) and the atherogenic index (986%; $p = .0002$) (see Table 2).

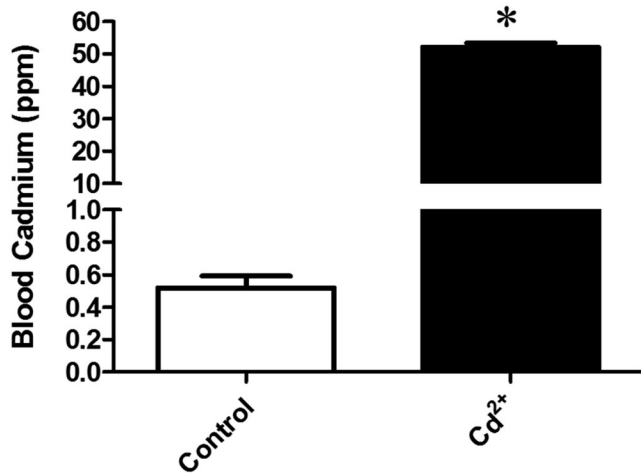


Figure 1. Blood cadmium concentration. Cadmium concentration in plasma of rats non-exposed ($n = 20$) and rats exposed to 32.5 ppm of Cd at 2 months ($n = 30$). The results shown are the mean \pm SEM. (*) Indicates significant difference from control group $p \leq .05$ by Student "t" test.

Effect of cadmium exposure on vascular reactivity

Once the rats exposed to Cd developed vascular, coronary and atherogenic risk factors, we investigated if these animals also showed alterations in aorta contractility. The contractile effect of phenylephrine in aortic rings obtained from non-exposed and exposed animals to Cd did not show significant differences (Figure 3(A)). However, aortic rings obtained from animals exposed to Cd showed a reduced acetylcholine concentration-dependent relaxation and decreases in E_{max} (62 ± 3 and $77 \pm 3\%$), but not in pD_2 (6.8 ± 0.06 and 7.03 ± 0.07 , Figure 3(B)). On the other hand, E_{max} and pD_2 in response to nitroprusside did not show relaxation differences between the groups ($E_{max} = 105 \pm 2$ and $99 \pm 1\%$; $pD_2 = 8.2 \pm 0.2$ and $7.9 \pm 0.13\%$; Figure 3(C)).

Finally, the relaxing response in aortic rings treated with superoxide dismutase in Cd-exposed rats (Figure 4(A))

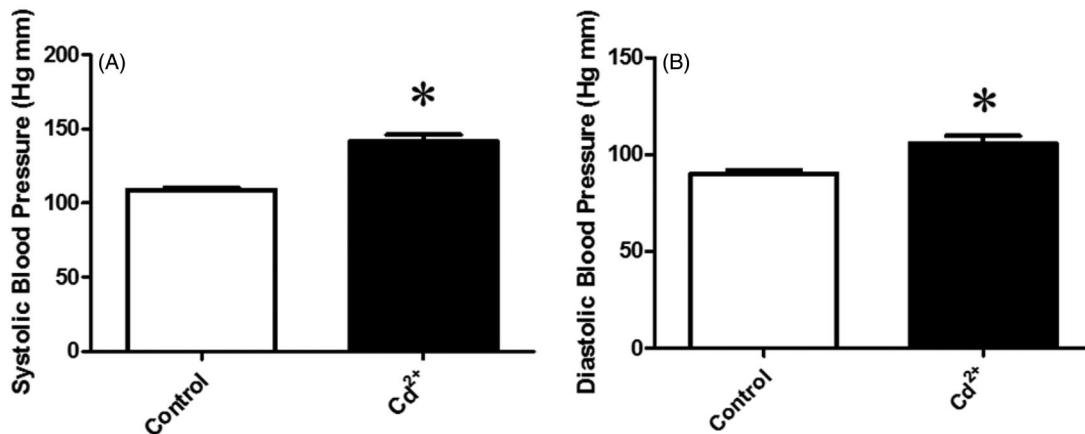


Figure 2. Cadmium produces hypertension. Systolic and diastolic blood pressure in rats non-exposed ($n = 20$) and rats exposed to 32.5 ppm of Cd at 2 months ($n = 30$). The results shown are the mean of six measurements per animal \pm SEM. (*) Indicates significant difference from control group $p \leq .05$ by Student "t" test.

Table 1. Zoometric parameters and insulin resistance profile exhibited by rats 2 months exposed to Cd in drinking water.

Parameter	Zoometry		Insulin resistance profile		
	Control	Cadmium	Parameter	Control	Cadmium
<i>n</i>	20	30	<i>n</i>	20	30
Weight (g)	246.1 \pm 2.7	238.4 \pm 4.7	Fasting Insulin (μ U/mL)	11.54 \pm 0.59	21.64 \pm 1.14*
Abdominal perimeter (cm)	18.5 \pm 0.19	17.9 \pm 0.09	Fasting Glucose (mg/dL)	90.2 \pm 1.53	162 \pm 8.77*
BMI	0.53 \pm 0.04	0.52 \pm 0.03	HOMA-IR	0.42 \pm .02	1.43 \pm 0.7*
Body fat %	2.89 \pm 0.01	2.92 \pm 0.01	HOMA-5%	235.8 \pm 10.8	70.5 \pm 3.7*
			IRCV	0.47 \pm 0.07	5.99 \pm 0.6*

The results shown are the mean \pm SEM.

*Indicates significant difference from control group $p \leq .05$ by Student "t" test.

Table 2. Lipids profile and atherogenic indexes exhibited by rats 2 months exposed to Cd in drinking water.

Lipids profile			Atherogenic Indexes		
Metabolite (mg/dL)	Control	Cadmium	Index	Control	Cadmium
<i>n</i>	20	30	<i>n</i>	20	30
Free fatty acids	2.80 ± 0.05	10.44 ± 0.66*	TC/HDL	2.45 ± 0.18	4.27 ± 0.62*
Triglycerides	56.2 ± 5.95	106.6 ± 4.7*	LDL/HDL	0.65 ± 0.03	1.42 ± 0.21*
Total Cholesterol	82.4 ± 2.6	93.6 ± 3.6*	Non-HDL/HDL	0.96 ± 0.18	4.29 ± 0.62*
VLDL	23.6 ± 5.8	39.6 ± 4.6*	Log(TG/HDL)	0.22 ± 0.01	0.68 ± 0.03*
LDL	22.1 ± 0.8	31.1 ± 2.1*			
HDL	33.6 ± 4.2	21.9 ± 1.8*			

*Indicates significant difference from control group $p \leq .05$ by Student "t" test.

showed significant improvement in response to acetylcholine. Animals exposed to Cd showed an E_{max} of $77 \pm 3\%$, as compared with $81 \pm 3\%$ in control, meanwhile, pD_2 results in the rats Cd-exposed, as well as non-exposed were 7.03 ± 0.07 and 7.04 ± 0.02 , respectively. Likewise, apocynin treatment in Cd-exposed rats improved the relaxation response ($E_{max} = 76 \pm 2\%$ and $75 \pm 3\%$; $pD_2 = 7.0 \pm 0.05$ and 7.1 ± 0.04) in comparison with the control group (Figure 4(B)).

Discussion

Previously, we and other groups have reported that Cd exposure in rats induces dysglycemia, insulin resistance, and dyslipidemia (Martynowicz *et al.* 2004, Yoopan *et al.* 2008, Treviño *et al.* 2015, Franceschini *et al.* 2017, Satarug *et al.* 2017), which are factors related to the development of oxidative stress in multiple tissues. Therefore, the aim of this work was to study if the metabolic risk factors induced in rats by a chronic Cd exposure in drinking water can produce alterations in aortic endothelium.

A number of researchers have reported the relation between Cd exposure and the development of hypertension. However, the information is not completely conclusive (Skoczynska and Martynowicz 2005, Nzengue *et al.* 2008). Results obtained in this study showed that rats exposed to Cd exhibit an elevation in systolic and diastolic blood pressure (Figure 2), that coexist with significant levels of Cd in the blood (Figure 1), similar results have been reported in animal models (Gokalp *et al.* 2009, Oliveira *et al.* 2019). These results are comparable with levels of Cd in workers exposed occupationally to metal that develop hypertension, peripheral arterial alterations, and cardiovascular diseases. In blood, Cd levels between $1.87\text{--}5.52 \mu\text{g/L}$ have shown a positive association with the increase of systolic and diastolic pressure among adults (Gamoh *et al.* 2013, Fraer and Kilic 2015, Oliveira *et al.* 2019).

Previously, we also reported that Cd exposure in drinking water in a LOAEL dose produces hyperglycaemia, insulin resistance and low sensitivity to this hormone (Sarmiento-Ortega *et al.* 2018, Treviño *et al.* 2015). In this work, after a Cd-exposure, we confirm that rats develop fasting hyperglycaemia and hyperinsulinemia, which is translated to insulin resistance (HOMA-IR), low insulin sensitivity (HOMA-S%), and high endothelial insulin resistance demonstrated by IRCV index (Table 1). Under physiological conditions, in the endothelium, insulin signalling induces vascular relaxation via nitric oxide (NO). However, when the endothelium develops

insulin resistance, increases the endothelin 1 (ET-1) expression and hypertension risk (Wang *et al.* 2006, Muniyappa and Sowers 2013, Posner 2017). Additionally, our results showed others risk factors to hypertension and cardiovascular dysfunctions in rats exposed to Cd, such as the increase of levels of TG, FFA, cholesterol, and lipoprotein fractions: VLDL and LDL, as well as an important reduction of HDL level (Table 2). The elevated serum levels of FFA and TG being key for the development of insulin resistance and hypertension (Steinberg *et al.* 2000, Thijssen and Mensink 2005). The FFA is responsible for inducing inflammation in endothelial cells, which is cause and effect to insulin resistance develop and endothelial damage (Kempe *et al.* 2005, Wang *et al.* 2007, Pierce *et al.* 2009). Both, endothelial inflammation and insulin resistance being related to an increase of oxidative stress, leading to endothelial damage by means of increased NADPH oxidase-mediated ROS upregulation, affecting the vascular relaxation mechanisms (Muniyappa and Sowers 2013). Additionally, Cd exposition is associated with triglyceride-rich lipoproteins, resulting in the generation of both LDL and HDL small and dense. These are particles highly atherogenic, exacerbating inflammation and reduces endothelial NO bioavailability (Woodman *et al.* 2005, Sarmiento-Ortega *et al.* 2018). Based on these findings in rats chronically exposed to Cd, is reasonably considered high cardiovascular risk.

In order to get a more direct relationship between Cd-exposure and atherogenic risk, atherogenic indexes were calculated. The results showed an increase in the atherogenic indices in rats Cd-exposed, corroborating a higher vascular risk (Table 2). These indexes have a better predictive value as compared with isolated parameters, besides, information on atherogenic risk is significantly higher when coexisting with the presence of hypertriglyceridaemia (Tran-Dinh *et al.* 2013, Lubrano and Balzan 2014, Subedi *et al.* 2014). Particularly, when small and dense LDL binds to LOX-1 (the main LDLox receptor in endothelial cells), NADPH oxidase activates the production of superoxide and hydrogen peroxide, as well as peroxynitrite radical (ONOO-), leading to a decrease in NO availability (Pirillo *et al.* 2013, Lubrano and Balzan 2014, Mollace *et al.* 2015).

Despite that Cd by itself do not generates the production of ROS, this metal produces an environment highly oxidative and an imbalance in the cellular redox state, impairing the vasoconstrictor response (Almenara *et al.* 2013, Kukongviriyapan *et al.* 2014). It has been described that Cd increase blood pressure because NO react more quickly with

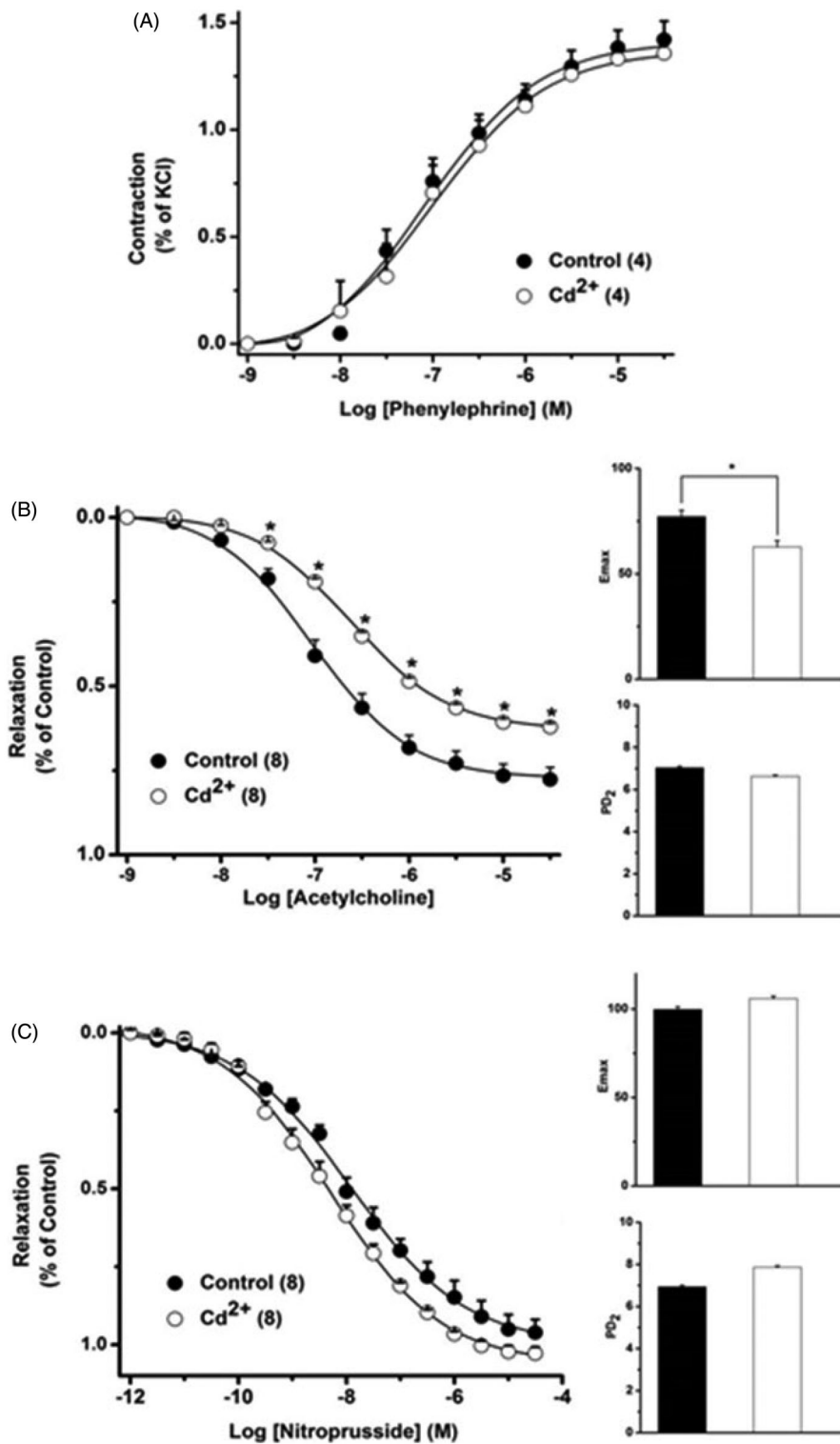


Figure 3. The effects of cadmium exposure on concentration-response curves. (A) phenylephrine, (B) acetylcholine and (C) sodium nitroprusside in aortic rings of control and Cd-exposure rats. The results shown are the mean \pm SEM. (*) Indicates significant difference from control group $p \leq .05$ by Student "t" test.

O_2^- in comparison with SOD (O_2^- ; $k = 6.7 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ seg}^{-1}$), which results in high levels of ONOO⁻ (Gaubin *et al.* 2000). According to this, rats exposed to Cd showed a decrease in vascular relaxation to acetylcholine and sodium nitroprusside (Figure 3(B,C)), these data suggest a decrease in the bioavailability of NO, strengthening the idea of the ONOO⁻ production by Cd. Decreases in vascular relaxation found in rats exposed to Cd could be due to a lack of eNOS

activity, probably due to a displacement of calcium by Cd (Gaubin *et al.* 2000, Tandon *et al.* 2003, Messner and Bernhard 2010). In the same way, Almenara *et al.* (2013) have found that rats administered with Cd (100 mg/L) in drinking water did not modify pD₂ but produce a significant increase of E_{max} (Mitra *et al.* 2011). Other studies have shown that acute Cd exposure induces endothelial dysfunction by a mechanism that involves an increased release of

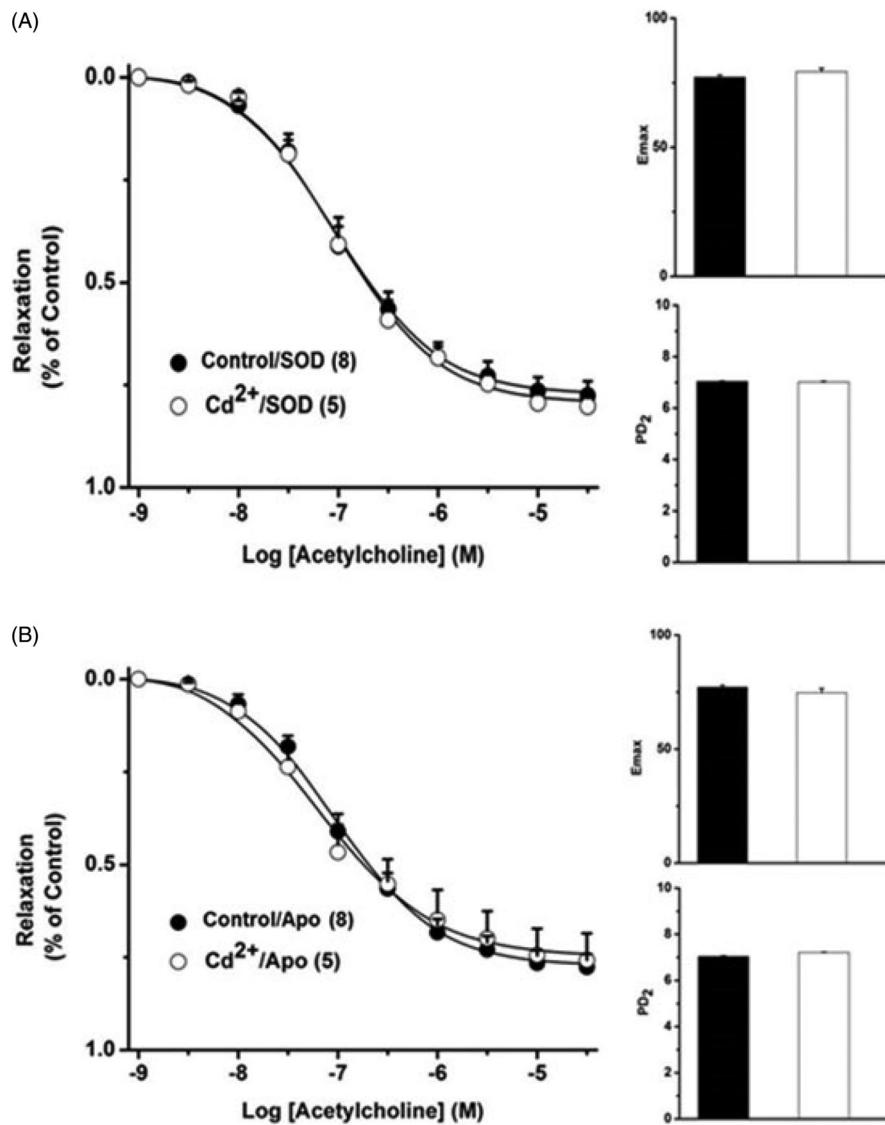


Figure 4. The acetylcholine concentration-response curves after SOD and Apocynin incubation. (A) Aortic rings of control ($n=8$) and Cd-exposure rats ($n=5$) incubated with SOD, (B) Aortic rings of control ($n=8$) and Cd-exposure rats ($n=5$) incubated with Apo. The results shown are the mean \pm SEM. Student "t" test.

angiotensin II, the increase of COX-2 and NADPH oxidase activity, thus a high rate of production of $\cdot\text{O}_2^-$, which could contribute to the establishment of atherosclerosis and hypertension (Angeli *et al.* 2013).

In order to determine the superoxide participation, we investigated the relaxation response in Cd-exposed rats. SOD treatment improved the relaxation at the control group level, suggesting that Cd exposure cause an extracellular increase of $\cdot\text{O}_2^-$ (Figure 4(A)) (Bienert *et al.* 2006, Forstermann 2010, Forstermann and Sessa 2012, Perez Diaz *et al.* 2013, Nauseef 2014). The NADPH (often in milliseconds) can increase intracellular $\cdot\text{O}_2^-$ levels, augmenting the oxidant species and modifying intracellular signalling (Frey *et al.* 2009).

In order to corroborate the participation of NADPH, in this work was used apocynin as a non-selective NADPH oxidase-inhibitor. Aortic rings of rats exposed to Cd and treated with apocynin showed the same relaxation pattern as aortic rings from rats without Cd-exposure (Emax and pD₂; Figure 4(B)). This finding suggested that Cd is linked to an increase of NADPH oxidase activity, and that oxidative stress induced by

this enzyme would reduce NO bioavailability (Berk 2007, Weseler and Bast 2010, Kukongviriyapan *et al.* 2014). Apocynin inhibits NADPH oxidase (NOX) by binding to essential thiol groups of NADPH oxidase subunits, preventing the transfer of the soluble cytosolic subunits p47phox and p67phox to the cellular membrane, which is essential for $\cdot\text{O}_2^-$ production. Apocynin has been used in the administration of Cd acute or toxic, in the aorta (Beswick *et al.* 2001, Nwokocha *et al.* 2013, Rizzetti *et al.* 2013, Oostwoud *et al.* 2016). Similar treatment has been applied in vascular alterations induced by mercury, in which the co-treatment with apocynin restore the response to phenylephrine (Oostwoud *et al.* 2016).

In summary, Wistar rats exposed to a LOAEL dose of Cd (32.5 ppm) in drinking water develop a metabolic disorder similar to metabolic syndrome. This pathological condition constitutes a risk factor which has been related to hypertension and vascular damage. Metabolic changes developed by Cd administration produces insulin resistance and atherosclerotic environment that increase oxidative stress in the

endothelium. Oxidative stress associated with high levels of superoxide produced by the NADPH oxidase complex activity, diminish NO availability, which could be part of the mechanism by which rats exposed to Cd develop hypertension. This hypothesis is supported by the fact that both apocynin and SOD produce the relaxation of aortic rings in rats exposed to Cd, at the same level as rats non-exposed to Cd. Therefore, the reduction of superoxide could be an exploring strategy to reduce the risk of endothelial damage and cardiovascular diseases, at least in situations of Cd exposure.

Acknowledgements

Authors thanks Dr. Francisco Ramos Collazo. (Bioterio "Claude Bernard", BUAP) for his assistance and the donation of the animals used in this work. We express our gratitude to Clinical Laboratory "Los Angeles" by the facilities to realise the biochemical determinations. Thanks to Professor Thomas Edwards PhD., for editing the English language text.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This work was supported by the Vicerrectoria de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP-BUAP) through Dr. Ygnacio Martínez Laguna for the financial support of this research project 00027.

Reference

Almenara, C.C., *et al.*, 2013. Chronic cadmium treatment promotes oxidative stress and endothelial damage in isolated rat aorta. *PLoS One*, 8 (7), e68418.

Angeli, J.K., *et al.*, 2013. Cadmium exposure induces vascular injury due to endothelial oxidative stress: the role of local angiotensin II and COX-2. *Free radical biology and medicine*, 65, 838–848.

ATSDR. Agency for Toxic Substance and Disease Registry. 2012. *U.S. Toxicological Profile for Cadmium*. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=48&tid=15> [Accessed 6 January 2020].

Berk, B.C., 2007. Novel approaches to treat oxidative stress and cardiovascular diseases. *Transactions of the American clinical and climatological association*, 118, 209–214.

Beswick, R.A., *et al.*, 2001. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension*, 38 (5), 1107–1111.

Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., and Jahn, T.P., 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et biophysica acta*, 1758 (8), 994–1003.

Caciari, T., *et al.*, 2013. Cadmium and hypertension in exposed workers: a meta-analysis. *International journal of occupational medicine and environmental health*, 26 (3), 440–456.

Chen, Q., *et al.*, 2018. Reactive oxygen species: key regulators in vascular health and diseases. *British journal of pharmacology*, 175 (8), 1279–1292.

Cuyper, A., *et al.*, 2010. Cadmium stress: an oxidative challenge. *BioMetals*, 23 (5), 927–940.

Deering, K.E., *et al.*, 2018. Low-level cadmium exposure and cardiovascular outcomes in elderly Australian women: a cohort study. *International journal of hygiene and environmental health*, 221 (2), 347–354.

Eum, K.D., Lee, M.S., and Paek, D., 2008. Cadmium in blood and hypertension. *Science of the total environment*, 407 (1), 147–153.

Forstermann, U. and Sessa, W.C., 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, 33 (7), 829–837.

Forstermann, U., 2010. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers arch*, 459, 923–939.

Fraer, M. and Kilic, F., 2015. Serotonin: a different player in hypertension-associated thrombosis. *Hypertension*, 65 (5), 942–948.

Franceschini, N., *et al.*, 2017. Cadmium body burden and increased blood pressure in middle-aged American Indians: the strong heart study. *Journal of human hypertension*, 31 (3), 225–230.

Frey, R.S., Ushio-Fukai, M., and Malik, A.B., 2009. NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology. *Antioxidants and redox signaling*, 11 (4), 791–810.

Gamoh, S., Hisa, H., and Yamamoto, R., 2013. 5-hydroxytryptamine receptors as targets for drug therapies of vascular-related diseases. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 36, 1410–1415.

Gaubin, Y., *et al.*, 2000. Implication of free radicals and glutathione in the mechanism of cadmium-induced expression of stress proteins in the A549 human lung cell-line. *Biochimica et biophysica acta*, 1495 (1), 4–13.

Gokalp, O., *et al.*, 2009. Impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in cadmium-hypertensive rats. *Toxicology and industrial health*, 25, 447–453.

Kempe, S., *et al.*, 2005. NF-kappaB controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. *Nucleic acids research*, 33 (16), 5308–5319.

Kukongviriyapan, U., *et al.*, 2014. Curcumin protects against cadmium-induced vascular dysfunction, hypertension and tissue cadmium accumulation in mice. *Nutrients*, 6 (3), 1194–1208.

Lassegue, B., and Griendling, K.K., 2010. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30, 653–661.

Lopez-Lopez, J.G., *et al.*, 2008. Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. *American journal of physiology-lung cellular and molecular physiology*, 295 (5), L727–32.

Lubrano, V., and Balzan, S., 2014. LOX-1 and ROS, inseparable factors in the process of endothelial damage. *Free radical research*, 48 (8), 841–848.

Martynowicz, H., *et al.*, 2004. Serum vasoactive agents in rats poisoned with cadmium. *International journal of occupational medicine and environmental health*, 17 (4), 479–485.

Messner, B., and Bernhard, D., 2010. Cadmium and cardiovascular diseases: cell biology, pathophysiology, and epidemiological relevance. *BioMetals*, 23 (5), 811–822.

Millán, J., *et al.*, 2009. Lipoprotein ratios: physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vascular health risk management*, 5, 757–765.

Mitra, S., *et al.*, 2011. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy. *The American journal of the medical sciences*, 342 (2), 135–142.

Mollace, V., *et al.*, 2015. Oxidized LDL attenuates protective autophagy and induces apoptotic cell death of endothelial cells: role of oxidative stress and LOX-1 receptor expression. *International journal of cardiology*, 184, 152–158.

Muniyappa, R. and Sowers, J.R., 2013. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Reviews in endocrine and metabolic disorders*, 14 (1), 5–12.

Nauseef, W.M., 2014. Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases. *Biochimica et biophysica acta*, 1840 (2), 757–767.

Nwokocha, C.R., *et al.*, 2013. Apocynin ameliorates cadmium-induced hypertension through elevation of endothelium nitric oxide synthase. *Cardiovascular Toxicology*, 13 (4), 357–363.

Nzengue, Y., *et al.*, 2008. Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line: role of glutathione in the resistance to cadmium. *Toxicology*, 243 (1–2), 193–206.

Oliveira, T.F., *et al.*, 2019. Chronic cadmium exposure accelerates the development of atherosclerosis and induces vascular dysfunction in

- the Aorta of ApoE(-/-) Mice. *Biological trace element research*, 187 (1), 163–171.
- Oostwoud, L.C., et al., 2016. Apocynin and ebselen reduce influenza A virus-induced lung inflammation in cigarette smoke-exposed mice. *Scientific reports*, 6 (1), 20983.
- Perez Diaz, M.F., et al., 2013. Protective effect of soybeans as protein source in the diet against cadmium-aorta redox and morphological alteration. *Toxicology and applied pharmacology*, 272, 806–815.
- Peters, J.L., et al., 2010. Cadmium exposure in association with history of stroke and heart failure. *Environmental research*, 110 (2), 199–206.
- Pierce, G.L., et al., 2009. Nuclear factor- κ B activation contributes to vascular endothelial dysfunction via oxidative stress in overweight/obese middle-aged and older humans. *Circulation*, 119 (9), 1284–1292.
- Pirillo, A., Norata, G.D., and Catapano, A.L., 2013. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators of inflammation*, 2013, 1–12.
- Posner, B.I., 2017. Insulin signalling: the inside story. *Canadian journal of diabetes*, 41 (1), 108–113.
- Rafati Rahimzadeh, M., et al., 2017. Cadmium toxicity and treatment: an update. *Caspian journal of internal medicine*, 8 (3), 135–145.
- Rani, A.U., 2006. Cadmium-induced bioaccumulation in the selected tissues of a freshwater teleost, *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Annals of the New York academy of sciences*, 919 (1), 318–320.
- Rizzetti, D.A., et al., 2013. Apocynin prevents vascular effects caused by chronic exposure to low concentrations of mercury. *PLoS one*, 8 (2), e55806.
- Rogers, P. and Webb, G.P., 1980. Estimation of body fat in normal and obese mice. *British journal of nutrition*, 43 (1), 83–86.
- Ruiz-Hernandez, A., et al., 2017. Declining exposures to lead and cadmium contribute to explaining the reduction of cardiovascular mortality in the US population, 1988–2004. *International journal of epidemiology*, 46 (6), 1903–1912.
- Sarmiento-Ortega, V.E., et al., 2018. The NOAEL Metformin dose is ineffective against metabolic disruption induced by chronic cadmium exposure in Wistar rats. *Toxics*, 6 (3), 55.
- Sarmiento-Ortega, V.E., et al., 2017. Changes on serum and hepatic lipids after a chronic cadmium exposure in Wistar rats. *Archives of biochemistry and biophysics*, 635, 52–59.
- Satarug, S., Vesey, D.A., and Gobe, G.C., 2017. Kidney cadmium toxicity, diabetes and high blood pressure: the perfect storm. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 241 (1), 65–87.
- Skoczynska, A., and Martynowicz, H., 2005. The impact of subchronic cadmium poisoning on the vascular effect of nitric oxide in rats. *Human and experimental toxicology*, 24 (7), 353–361.
- Steinberg, H.O., et al., 2000. Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production. *Diabetes*, 49 (7), 1231–1238.
- Subedi, B.H., et al., 2014. Current guidelines for high-density lipoprotein cholesterol in therapy and future directions. *Vascular health and risk management*, 10, 205–216.
- Takahashi, Y., et al., 2004. Effects of cadmium in vitro on contractile and relaxant responses of isolated rat aortas. *Environmental health and preventive medicine*, 9 (6), 251–256.
- Tandon, S.K., et al., 2003. Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. *Toxicology letters*, 145 (3), 211–217.
- Tellez-Plaza, M., et al., 2013. Cadmium exposure and clinical cardiovascular disease: a systematic review. *Current atherosclerosis reports*, 15 (10), 356.
- Thijssen, M.A., and Mensink, R.P., 2005. Fatty acids and atherosclerotic risk. *Handbook of experimental pharmacology*, 170, 165–194.
- Tran-Dinh, A., et al., 2013. HDL and endothelial protection. *British journal of pharmacology*, 169 (3), 493–511.
- Treviño, S., et al., 2015. Chronic cadmium exposure in rats produces pancreatic impairment and insulin resistance in multiple peripheral tissues. *Archives of biochemistry and biophysics*, 583, 27–35.
- Van Heerebeek, L., et al., 2002. NADPH oxidase(s): new source(s) of reactive oxygen species in the vascular system? *Journal of clinical pathology*, 55 (8), 561–568.
- Wang, M., et al., 2007. Proinflammatory profile within the grossly normal aged human aortic wall. *Hypertension*, 50 (1), 219–227.
- Wang, P., et al., 2019. Cadmium contamination in agricultural soils of China and the impact on food safety. *Environmental pollution*, 249, 1038–1048.
- Wang, X.L., et al., 2006. Free fatty acids inhibit insulin signaling-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation through upregulating PTEN or inhibiting Akt kinase. *Diabetes*, 55 (8), 2301–2310.
- Weseler, A.R., and Bast, A., 2010. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. *Current hypertension reports*, 12 (3), 154–161.
- Woodman, R.J., et al., 2005. Oxidized LDL and small LDL particle size are independently predictive of a selective defect in microcirculatory endothelial function in type 2 diabetes. *Diabetes, obesity and metabolism*, 7 (5), 612–617.
- Yoopan, N., et al., 2008. Attenuation of eNOS expression in cadmium-induced hypertensive rats. *Toxicology letters*, 176 (2), 157–161.
- Zhang, R., et al., 2016. A blood pressure-associated variant of the SLC39A8 gene influences cellular cadmium accumulation and toxicity. *Human molecular genetics*, 25 (18), 4117–4126.