



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CAMPUS IZTACALA

CAMBIOS EN LA PRODUCCIÓN DE GELATINASAS DURANTE
EL DESARROLLO DE LA HIPERTROFIA CARDIACA EN RATAS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Biol. REYES MENDIETA GISELA

DIRECTOR DE TESIS: Dr. BAIZA GUTMAN LUIS ARTURO

LOS REYES IZTACALA EDO. DE MEX.

ABRIL, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología del Desarrollo, de la Unidad de Morfofisiología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, bajo la dirección del Dr. Luis Arturo Baiza Gutman y la supervisión del comité tutorial conformado de la siguiente manera:

PRESIDENTE: Dr. Rafael Villalobos Molina
VOCAL: Dr. Maximiliano Ibarra Barajas
SECRETARIO: Luis Arturo Baiza Gutman
SUPLENTE: Dr. Carlos Ramos Abraham
SUPLENTE: Dr. Jorge Meléndez Zajgla

Durante la realización de este estudio se contó con el apoyo económico del CONACYT con número de registro 189832

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, por el apoyo material, profesional y los consejos brindados para la realización de este trabajo, por su confianza y amistad.

Al Dr. Maximiliano Ibarra Barajas, por sus consejos, por apoyarme con material y sobre todo por dedicarle tiempo a mí trabajo de investigación.

Al Dr. Jorge Melendez Zajgla por su asesoramiento y consejos durante el desarrollo de este trabajo.

A los doctores Rafael Villalobos Molina y Carlos Ramos Abraham, por sus contribuciones al mejoramiento del trabajo escrito.

A la M. C Guadalupe Martínez Hernández por su amistad, sus enseñanzas y apoyo en el trabajo del laboratorio

A mis amigos y compañeros de laboratorio Alejandro, Sócrates y Jaime por el excelente ambiente de trabajo, por compartir conocimientos, por el apoyo brindado.

A mis amigos América, Gaby, Xochilt, Gustavo, Luis, Ana y Rocío por los momentos compartidos.

A Clara por tu amistad, tu tiempo, las charlas en fin.

A todas las personas que de alguna manera hayan contribuido para la realización de este trabajo gracias.

DEDICATORIA

*A ti Erick, por el amor y tiempo compartido, por creer en mí,
por los días felices y los difíciles; por simplemente estar ahí para mí.*

*A mi hijo quien ilumina todos los momentos de mi vida,
por quien vale la pena vivir, luchar y soñar.*

*A mis padres
(Especialmente a ti mamá) por que han sido pilares fundamentales en mi vida,
de quienes estoy muy orgullosa y admiro profundamente,
ya que solo han sabido amarme.*

*A Miriam, Miguel, Raymundo y Laura, por su cariño y
apoyarme en los momentos difíciles*

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
Ao	Aorta
APMA	Acetato π -aminofenilmercúrico
AT ₁	Receptor subtipo 1 para la Angiotensina II
Au	Aurícula
AU	Unidades arbitrarias
BSA	Albúmina sérica de bovino
cNOS	Óxido nítrico sintasa constitutiva
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK	Cinasa regulada extracelularmente
ERO	Especies reactivas del oxígeno
g	Gravedades
HNE	4-Hidroxinonal
IMP-1	Inhibidor pequeño de metaloproteinasas 1
IMP-2	Inhibidor pequeño de metaloproteinasas 2
IMP-3	Inhibidor pequeño de metaloproteinasas 3
IMPs	Inhibidores pequeños de las metaloproteinasas
In	Fracción insoluble en Triton X-100
MEC	Matriz extracelular
MMP- 3	Estromelisina 1
MMP-10	Estromelisina 2
MMP-1	Colagenasa1
MMP-8	Colagenasa 2
MMP-2	Gelatinasa A

MMP-7	Matrilisina 1
MMP-12	Metaloelastasa
MMP-19	Sin nombre trivial
MMP20	Enamelisina
MMP-9	Gelatinasa B
MMPs	Metaloproteinasas
MT1-MMP a MT6-MMP	Metaloproteinasas tipo membrana
N	Normal
PBS	Salina amortiguada con fosfatos
PM	Peso molecular
RAS	Sistema renina-angiotensina
RT-PCR	Transcripción en reversa- reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
Sol	Fracción soluble en Tritón X-100
TFG- β	Factor de crecimiento tumoral β
TIMP-1	Inhibidor tisular de metaloproteinasas 1
TIMP-2	Inhibidor tisular de metaloproteinasas 2
TIMP-4	Inhibidor tisular de metaloproteinasas 4
TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas
VD	Ventrículo derecho
VI	Ventrículo izquierdo
WKY	Wistar Kioto

NDICE

	Pagina
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Papel de la angiotensina II en la hipertrofia cardiaca	4
Matriz extracelular	5
Matriz extracelular del corazón	5
Metaloproteinasas de la matriz extracelular	6
Fig 1. Estructura de las metaloproteinasas	7
Regulación de las metaloproteinasas	8
Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas	8
Fig. 2 Mecanismos de activación y regulación de las metaloproteinasas	9
ANTECEDENTES	10
HIPOTESIS	12
OBJETIVOS	13
General	13
Particulares	13
METODOLOGÍA	14
Valoración de la presión arterial	14
Preparación de los tejidos	14
Zimografía para gelatinasas	15
Activación de las gelatinasas con APMA	16
Análisis densitométrico	16

Análisis estadístico	16
RESULTADOS	17
Presión sanguínea	17
Figura 3. Aumento de la presión sanguínea en las ratas SHR en relación a la edad	17
Cambios en el peso cardiaco	18
Tabla 1: comparación de los pesos cardiacos entre las ratas WKY y SHR	18
Tabla 2. Pesos de distintas zonas cardiacas de ratas SHR y WKY a diferentes edades	19
Cambios en la concentración de gelatinasas con la edad en ratas SHR y WKY	20
Diferencias en la expresión de la gelatinasas entre las ratas SHY y WKY	21
Figura 4. Detección de gelatinasas por zimografía en el ventrículo derecho de ratas SHR	21
Figura 5. Detección de gelatinasas por zimografía en el ventrículo izquierdo de ratas SHR	22
Aurículas	23
Figura 6. Detección de gelatinasas por zimografía en las aurículas de ratas SHR	23
Expresión de gelatinasa en la aorta	24
Figura 7. Detección de gelatinasas por zimografía en las aortas de ratas SHR	24
Caracterización de las bandas gelatinolíticas	25
Figura 8. Caracterización de las bandas gelatinolíticas análisis densitométrico	25
Análisis densitométrico	26
Figura 9. Evaluación densitométrica de la MMP-2 en el ventrículo derecho de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas Wistar kioto (WKY)	26

Figura 10. Evaluación densitométrica de la MMP-2 en el ventrículo izquierdo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas Wistar Kioto (WKY)	27
Figura 11. Evaluación densitométrica de la MMP-2 en las aurículas de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas Wistar Kioto (WKY)	28
Figura 12. Evaluación densitométrica de la MMP-2 en la aorta de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas Wistar Kioto (WKY)	29
DISCUSIÓN	30
Presión arterial	30
Desarrollo de hipertrofia cardiaca	31
Cambios de las gelatinasas durante el crecimiento y desarrollo posnatal del corazón y aorta	32
Cambios de las gelatinasas asociados con la hipertensión e hipertrofia cardiaca	33
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	38

RESUMEN

Durante el desarrollo de la hipertrofia cardiaca existen diversos cambios en la expresión de proteínas de la matriz extracelular y en la producción de enzimas que intervienen en su degradación. Se estudiaron los cambios en las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 durante el desarrollo de la hipertrofia cardiaca asociada con hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Se obtuvieron corazones de ratas WKY y SHR de 1, 3 y 6 meses de edad. Evaluándose el contenido de MMP-2 y MMP-9 mediante zimografía utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida co-polimerizados con gelatina. Las ratas SHR presentaron hipertensión desde el tercer mes e hipertrofia cardiaca al sexto mes. La mayor concentración de MMP-2 en aurículas y ventrículos se encontró al primer mes relacionándose con un rápido crecimiento cardiaco y alta remodelación tisular al inicio de la vida postnatal. Al primer mes se observó una mayor activación de la MMP-2 en aurículas y aorta de las ratas SHR comparadas con las WKY. La concentración de MMP-9 fue mayor transitoriamente en los ventrículos de las ratas WKY de 1 mes y prácticamente desaparece al sexto, mientras que en las SHR la concentración de MMP-9 en ellos fue muy baja del primero al sexto mes. El desarrollo de hipertrofia cardiaca en las ratas SHR fue precedido de un aumento en la activación de MMP-2 y una baja en la producción de MMP-9 en diferentes zonas del corazón, lo que sugiere la participación de estas enzimas en eventos que conducen a hipertensión e hipertrofia cardiaca.

ABSTRACT

During the development of cardiac hypertrophy diverse changes occur in the expression of extracellular matrix proteins and in the production of enzymes that take part in their degradation. Changes in gelatinases MMP-2 and MMP-9 were studied during the development of cardiac hypertrophy associated with hypertension in spontaneously hypertensive rats (SHR). There were obtained hearts of rats WKY and SHR of 1, 3 and 6 months of age. The content of MMP-2 and MMP-9 were evaluated by zymography using gelatin copolymerized SDS-polyacrilamide gel electrophoresis. SHR rats presented hypertension since the third month and cardiac hypertrophy at sixth month. The higher concentration of MMP-2 in auricles and ventricles was found on first month being related with fast cardiac growth and high tissular remodeling at the beginning of postnatal life. At the first month a major activation of the MMP-2 was observed in auricles and aorta of SHR rats compared with WKY. The concentration of MMP-9 was transitorily higher in ventricles of WKY rats of 1 month and practically almost disappear on sixth month, whereas in ventricles of SHR the concentration of MMP-9 was very low from the first to the sixth month. The development of cardiac hypertrophy in SHR rats was preceded of an increase in MMP-2 activation and diminished production of MMP-9 in different areas of the heart, which suggests the participation of these enzymes in some events that lead to hypertension and cardiac hypertrophy.

INTRODUCCIÓN

En México existen más de 15 millones de personas con hipertensión arterial (comunicado de prensa SSA No. 181, 2004), siendo ésta una enfermedad sistémica y un factor de riesgo para el desarrollo de múltiples enfermedades cardiovasculares, entre ellas la aterosclerosis, infarto al miocardio, isquemia cerebral, aneurismas e hipertrofia cardiaca (Bashey y col., 1989; Cowie y col., 1997; Peterson y Li, 2002).

La hipertrofia cardiaca es resultado de la respuesta compensadora del miocardio al aumento de trabajo y puede ser fisiológica o patológica. Cuando se presenta un aumento de demanda se ponen en marcha una serie de mecanismos compensadores que llevan a ella. La hiperfunción miocárdica induce un aumento del tamaño de los cardiocitos y subsecuentemente de la masa y el tamaño del corazón; el diámetro de los miocitos cardiacos puede aumentar desde 15 a 25 μm o más, lo que ocasiona la disminución de la densidad capilar, esto contribuye a la insuficiencia cardiaca. Con la prolongada sobrecarga hemodinámica se altera el patrón de expresión de síntesis de proteínas a uno análogo al que se observa en el desarrollo cardiaco fetal. Así, el acoplamiento de excitación-contracción y la utilización de energía pueden estar significativamente alteradas por la producción de diferentes isoformas de las proteínas relacionadas con los elementos contráctiles, que pueden ser menos funcionales que lo normal o bien estar reducidas o aumentadas en cantidad (Kedes, 1994). Esta condición puede contribuir a la insuficiencia cardiaca que junto con el aumento en la carga hemodinámica conducen al agravamiento de la enfermedad y la falla cardiaca congestiva, misma que sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. La insuficiencia cardiaca congestiva se debe a la incapacidad de las cámaras del corazón para expandirse lo suficiente durante la diástole y acomodar un volumen sanguíneo ventricular adecuado.

La hipertrofia cardiaca se debe en parte a alteraciones en la remodelación tisular, la que abarca la síntesis y degradación de matriz extracelular (MEC). Se presentan dos mecanismos de acumulación de la MEC; el primero se relaciona con la oxidación y acumulación de matriz oxidada entre el endotelio y los miocitos, en el segundo los fibroblastos cardiacos regulan los niveles de MEC.

PAPEL DE LA ANGIOTENSINA II EN LA HIPERTROFIA CARDIACA.

La hipertrofia cardiaca se desarrolla como resultado de la influencia de fuerzas mecánicas, factores hormonales locales (péptidos vasoactivos, catecolaminas) citocinas y factores de crecimiento, los cuales conducen a un aumento en la síntesis de proteínas y el crecimiento celular, resultante de la activación de una cascada de señales bioquímicas intracelulares (Rouet-Benzineb y col., 2000). El estrés mecánico causado por el aumento en la presión hidrodinámica induce la activación de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK, extracellular regulated kinase), reprogramando la expresión de genes y conduciendo a la hipertrofia de los cardiomiocitos en cultivo.

El sistema renina-angiotensina (RAS) es activado por la presión hemodinámica alta y diversas evidencias indican que la angiotensina II activa de manera temprana la expresión de los genes que conducen a la hipertrofia de los cardiomiocitos y contribuye a la modulación de la matriz extracelular por la vía de su receptor de subtipo 1 (AT₁).

El bloqueo del receptor AT₁ de la angiotensina II atenúa significativamente todos los eventos inducidos por el estrés mecánico en cardiomiocitos en cultivo, también revierte la hipertrofia cardiaca y previene el daño cardiaco (Zou y col., 2004), La angiotensina II no solo aumenta el estrés hemodinámico en las paredes de los vasos mediante la constricción, sino que también estimula la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), mediante la activación de la NAD(P)H oxidasa vascular (Luchtefeld y col., 2005)

MATRIZ EXTRACELULAR.

La MEC esta compuesta por una mezcla de proteínas y polisacáridos, que además de proporcionar una malla de sostén a los tejidos, regula las propiedades características de las células de acuerdo al tejido al que pertenecen. Los materiales que la constituyen corresponden a un número relativamente pequeño de familias de proteínas, encontrándose entre ellas: diversas formas de fibras elásticas, colágenas, laminina, fibronectina, proteoglicanos y diversas glicoproteínas. Estas macromoléculas son de gran importancia para los procesos de desarrollo y morfogénesis.

MATRIZ EXTRACELULAR DEL CORAZÓN.

Los componentes de la matriz del tejido conectivo se distribuyen alrededor de los vasos y los miocitos en el miocardio. La matriz extracelular del miocardio esta formada por colágena, laminina, fibronectina y condroitin sulfato, siendo las colágenas I, III y IV las predominantes, pero la primera es la más abundante. La colágena es importante en el mantenimiento del soporte de la arquitectura miocárdica y en la transmisión de la fuerza contráctil.

Los fibroblastos juegan un papel importante en la síntesis de los diversos componentes de la matriz extracelular cardiaca, así como de las enzimas que la remodelan. El comportamiento y función de los fibroblastos son determinantes críticos de los cambios estructurales asociados con la remodelación en el miocardio. La acumulación anormal de proteínas de la MEC en el intersticio, está asociada con el desarrollo de la hipertrofia cardiaca patológica. Estos cambios estructurales en la MEC del miocardio conducen a alteraciones en las propiedades físicas del tejido cardiaco y puede contribuir potencialmente a la alteración de la función ventricular y al desarrollo de la falla cardiaca (Kim y col., 1999; Manabe y col., 2002).

METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.

Las metaloproteínas de matriz extracelular (MMPs) o matricinas son una familia de endoproteinasas neutras, responsables de la degradación de la matriz extracelular que desempeñan un papel central en diversos procesos fisiológicos, como la morfogénesis, angiogénesis e inflamación (Nagase y Visse., 2006); son reguladas a nivel de transcripción, traducción, activación de zimógenos e interacción con componentes específicos de la matriz extracelular. Asimismo, por la inhibición diferencial mediante sus principales inhibidores endógenos, los inhibidores tisulares de metaloproteinasas o TIMPs. Se han observado alteraciones en los niveles de metaloproteínas en enfermedades como la artritis reumatoide, metástasis e invasión tumoral, fibrosis pulmonar, enfisema, neuroinflamación, diabetes, hipertrofia cardíaca, aneurismas y nefritis, entre otras (Crawford y Matrisian, 1994; Malay y col., 2003; Nagase y Visse., 2006).

Las MMPs comparten diferentes dominios (figura 1), entre los que se encuentran (Matrisian, 1992., Tzong- Luen y col., 2004):

- a. Un dominio propeptídico, responsable de la falta de actividad de las proenzimas, en el existe un residuo de cisteína que forma un enlace coordinado con el Zn^{2+} presente en el dominio catalítico y enmascara de esta manera el sitio activo de las proenzimas o zimógenos.
- b. El dominio catalítico, esencial para la actividad enzimática y que contiene el sitio de unión a Zn^{2+} y a Ca^{2+} .
- c. Una secuencia rica en prolina que funciona como bisagra.
- d. Un dominio tipo hemopexina, frecuentemente localizado en la porción carboxilo terminal

Hasta ahora han sido clonadas y caracterizadas 20 metaloproteinasas que fueron clasificadas de acuerdo a la similitud de sus estructuras y su afinidad a los sustratos, en cinco grupos, entre ellos: las colagenasas (MMP-1 y MMP-8), porque degradan las colágenas tipo I y III); las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) porque son particularmente eficientes en la degradación de gelatina, colágenas IV y V y elastina; las estromelisininas (MMP- 3 y MMP-10) que actúan sobre proteoglicanos, fibronectinas, laminina y colágenas; las MMPs tipo membrana (MT1-MMP a MT6-MMP), que se asocian a la membrana y juegan un importante papel en la tubulogénesis endotelial y la neovascularización; y por último un subgrupo diverso (MMP-7, MMP-12, MMP-19 y MMP20) (Visse y Nagase. 2003).

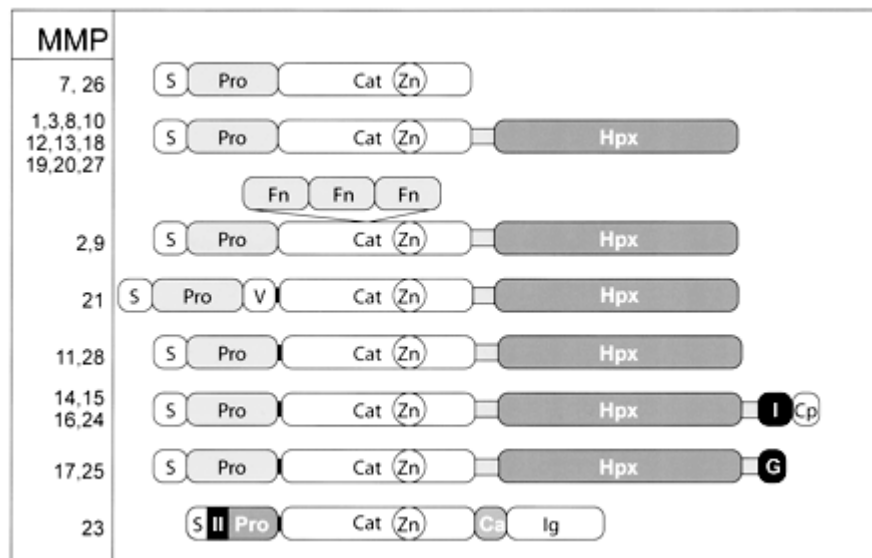


Fig 1. Estructura de las metaloproteinasas: (S) péptido señal; (Pro) propéptido; (Cat) dominio catalítico; (Zn) sitio de unión a zinc; (Fn) dominio tipo III de fibronectina; (Hpx) dominio de hemopexina; (Ca) calcio; (Ig) dominio de inmunoglobulina ; (I) dominio transmembrana tipo I; (Cp) dominio citoplasmático; (G) ancla de glicosilfosfatidilinositol; (II) dominio de transmembrana tipo II; (V) vitronectina (tomada de Visse y Nagase., 2003).

REGULACIÓN DE LAS METALOPROTEINASAS.

Las MMPs son reguladas a nivel transcripcional (figura 2) por hormonas, factores de crecimiento, citocinas, interacción entre células y con la matriz extracelular. Como muchas de ellas son secretadas en forma de precursores no activos, su actividad se regula mediante su activación (figura 2) y pueden ser activadas por proteinasas o in vitro por agentes químicos, como el acetato 4-aminofenilmercúrico y especies reactivas de oxígeno. In vivo se ha encontrado que el óxido nítrico (NO) es activador de la MMP- 9 durante la isquemia cerebral porque reacciona con el grupo tiol formando un derivado S-nitrosilado, por lo que el átomo de Zn^{2+} es liberado y se permite el acceso del sustrato al sitio activo (Gu y col., 2002).

La activación de MMPs mediante la plasmina es un mecanismo importante in vivo. La plasmina se genera a partir del plasminógeno por las enzimas activadoras del plasminógeno, tipos uroquinasa y tisular. Una vez unida a la membrana la uroquinasa, transforma al plasminógeno en plasmina y ésta activa a los zimógenos de las MMPs, conduciendo a la remodelación de la MEC. En el caso de la activación intracelular como ocurre con el precursor de MMP-11, la activación es mediada por furina (Vise y Nagase, 2003., Lemaitre y D'Ármiento., 2006).

INHIBIDORES TISULARES DE LAS METALOPROTEINASAS.

Las formas activas de las MMPs son inhibidas principalmente por los TIMPs, de los que se conocen 4 tipos (figura 2). El TIMP- 1 es una glicoproteína de 28.5 kDa, sintetizada por células del tejido conectivo como fibroblastos y macrófagos. El TIMP-2 es una proteína glicosilada de 23 kDa. Otros dos tipos de inhibidores son los pequeños inhibidores de metaloproteinasas (IMPs) y los grandes inhibidores de metaloproteinasas. Los IMPs tienden a ser más pequeños que los TIMPs. La masa molecular de IMP-1 es de 26 kDa, IMP-2 es de 21 kDa e IMP-3 es de 18kDa. Los grandes inhibidores están formados de TIMP-2 y progelatinasa A. Este

complejo inhibe collagenasas, gelatinasa A y estromelisin, lo que indica que el sitio inhibitorio de la molécula de TIMP-2 está expuesto en él. Los TIMPs son importantes en el control de numerosos procesos fisiológicos. Estos incluyen angiogénesis, implantación del trofoblasto, invasión de células tumorales y reparación de heridas, etc. (Malay y col., 2003). Sin embargo el TIMP-4 es el más abundante de los TIMPs en el corazón (Hunt y col., 2002)

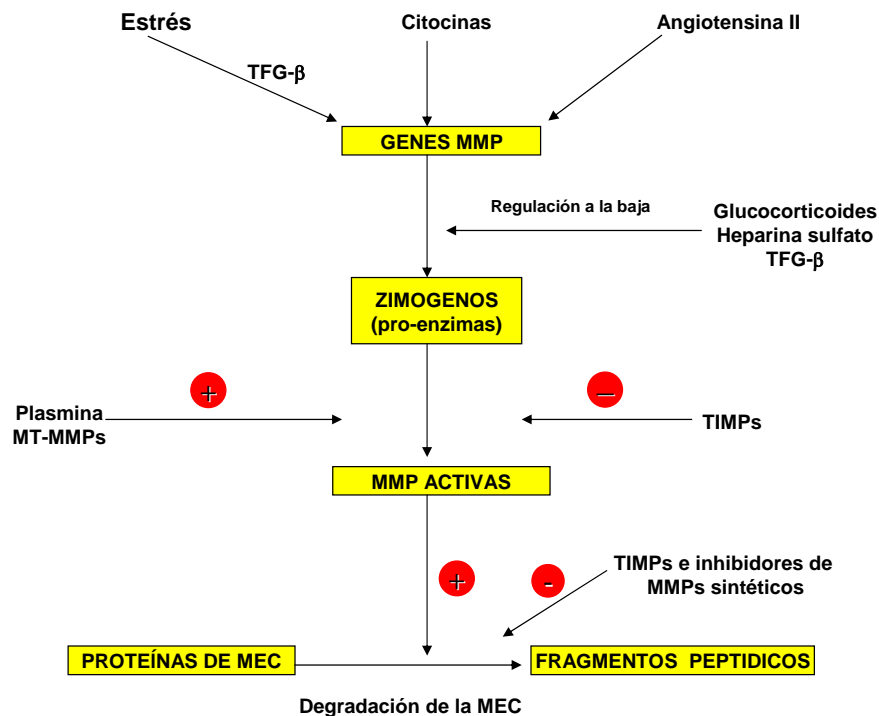


Fig. 2 Mecanismos de activación y regulación de las metaloproteinasas (Modificado de Donelly y col., 2003)

ANTECEDENTES

Las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) constituyen un modelo de hipertensión con una base genética que tiene un gran parecido con aquella que se desarrolla en los humanos. Además permite el estudio de los mecanismos biológicos relacionados con el desarrollo de la hipertrofia, falla cardíaca y alteraciones vasculares durante la hipertensión. Muchos de los individuos de esta cepa desarrollan hipertensión a edades tempranas, detectándose desde la semana 6 de edad, esta sigue elevándose progresivamente hasta alcanzar el nivel más alto alrededor de la vigésima semana y se mantiene estable posteriormente (Uyehara y Gellai, 1993) La hipertrofia cardíaca se desarrolla entre la novena y doceava semana de edad (Shimamoto y col., 1982). Ambas condiciones se asocian y son precedidas por el aumento en el estrés oxidativo y alteraciones en el metabolismo energético en el corazón (Blasig y col., 1995; Eaton y col., 1999; Veronneau y col., 2002; Bendendour y col., 2003). El aumento en la producción del anión superóxido se ha detectado desde la cuarta semana de edad y se ha atribuido a la óxido nítrico sintasa constitutiva (cNOS) y a la estimulación de la NAD(P)H oxidasa por la angiotensina II (Cosentino y col., 1998; McIntyre y col., 1999; Zalba y col., 2001 y Reckelhoff , 2003). Como consecuencia del incremento en las especies reactivas de oxígeno, se encuentran aumentados los productos de lipoperoxidación como el 4-hidroxinonenal (HNE); estos modifican postraduccionalmente a diversas proteínas incluyendo enzimas del ciclo de Krebs (Humphries y Szweda 1998; Humphries y col., 1998, Bendendour y col., 2003) y de la cadena de transporte de electrones (Ide y col., 1999; Chen y col., 2001; Sadek y col., 2002), lo que conduce a fallas en el metabolismo energético y disfunción mitocondrial (Humphries y Szweda, 1998; Humphries y col., 1998). Por lo que se ocasiona en el corazón un disturbio en el ritmo y contracciones del miocardio (Chen y col., 2001, Lucas y Szweda, 1999), conduciendo a respuestas adaptativas o apoptóticas (Eaton y col., 1999; Uchida y col., 1999; Uchida, 2000; Leonarduzzi y col., 2000).

Como parte del desarrollo de la hipertrofia cardiaca hay cambios en la remodelación de la matriz extracelular, acumulándose ésta en el corazón hipertrofiado. Alrededor de la semana 32 el contenido de colágena tipo I y elastina en la membrana basal del endotelio de los capilares aumenta, acumulándose la matriz oxidada entre el endotelio y los miocitos, además hay una glicosilación anormal de la colágena. La mayor rigidez de los tejidos disminuye la fuerza ténsil del corazón; alterándose las propiedades contráctiles de este órgano (Tyagi y Hayden, 2003). Cuando la hipertrofia ya esta establecida, lejos de lo que podría esperarse, hay también un incremento en la producción de algunas enzimas que intervienen en la degradación de la MEC, así como cambios en la concentración de sus inhibidores endógenos, los TIMPs (Mujundar y col., 2001).

En el corazón hipertrofiado de ratas SHR se ha encontrado un aumento de la producción de MMPs y del TIMP-4, predominando la acción inhibitoria de este último, sin embargo con la evolución de la falla cardiaca congestiva disminuye la producción de TIMP-4 y aumenta la de estas enzimas (Mujumbar y Tyagi, 1999; Mujumdar y col., 2001). Adicionalmente, las ERO aumentan la actividad de las metaloproteasas, especialmente la MMP-2 y MMP-9 a través de diferentes mecanismos (Siwik y Colucci, 2004; Grote, 2003). Sin embargo, los cambios en la actividad de MMPs durante el desarrollo de la hipertensión y la hipertrofia cardiaca, en los primeros meses de vida de las ratas SHR, no han sido estudiados y como se mencionó antes, el estrés oxidativo aumenta en el corazón en ellas aun antes de que la hipertensión aparezca.

HIPÓTESIS

La expresión y activación de la MMP 9 y MMP 2 en el corazón de las ratas SHR se altera de manera paralela al desarrollo de la hipertensión y de la hipertrofia cardíaca, ya que antes de estos procesos, se han detectado: aumento en el estrés oxidativo y en la actividad de la angiotensina II.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el nivel de las proenzimas y enzimas activas de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) durante el desarrollo de la hipertensión e hipertrofia cardiaca en ratas espontáneamente hipertensas.

2. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Evaluar los cambios morfológicos (tamaño, peso) de diferentes zonas del corazón en diferentes etapas de la hipertensión arterial.
- Analizar los tipos y concentración de gelatinasas en distintas zonas del corazón de ratas WKY y SHR a las edades de 1, 3 y 6 meses por zimografía en gelatina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 30 ratas de las cuales 15 fueron de la cepa WKY y 15 SHR, que se agruparon de la siguiente manera 1) SHR de 1 mes; 2) SHR de 3 meses; 3)SHR de 6 meses ; 4)WKY de 1 mes; 5) WKY de 3 meses y 6) WKY de 6 meses.Las cuales fueron mantenidas en un cuarto a una temperatura entre 23- 26 °C, con un fotoperiodo de 12 horas luz-12 horas oscuridad y con libre acceso a la comida estándar y agua.

Las ratas WKY fueron usadas para determinar los cambios de la concentración de metaloproteinasas en ausencia de la hipertensión e hipertrofia.

VALORACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL

Para determinar la presencia de hipertensión se utilizó un medidor de presión automático LE 5007, (LSi, LETICA scientific Instruments)se pusieron las ratas en inmovilizadores de acrílico, dejando libre la cola para así colocarles un manómetro, posteriormente se introdujeron a un ambientador y registrador LE 565016, a una temperatura de 37° C para que las ratas se relajaran, y se dilataran los vasos y así poder medir la presión; los valores fueron determinados con el software Chart 4 para Windows.

Se consideró que las ratas SHR que presentaron una presión sistólica superior a 150 mm Hg eran hipertensas.

PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS:

Los animales fueron anestesiados con 50 mg/Kg de pentobarbital sódico intraperitonealmente, se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con PBS cortando la aorta, posteriormente se obtuvieron los corazones, se enjuagaron con PBS y limpiaron de tejidos externos, separando la porción de arterias del resto del corazón. Los ventrículos, aurículas y aorta se pesaron, fragmentaron y se extrajeron por 24 h a 4 °C en salina amortiguada con fosfatos

(PBS) conteniendo Triton X-100 al 0.1%, empleando una parte de tejido por 19 partes de amortiguador para los ventrículos izquierdo (VI) y derecho (VD) y las aurículas (Au); pero en aorta se utilizó una parte por 49 partes de PBS debido a la pequeña cantidad de muestra que se tomó. Posteriormente se centrifugaron a 4 192 g, el sobrenadante constituyó la fracción soluble en Tritón X-100 y el sedimento a la fracción insoluble en él, ambas se mezclaron por separado con amortiguador de muestra para electroforesis agitando en un vórtex durante 15 segundos 5 veces por intervalos de 15 segundos de descanso, las muestras se centrifugaron a 8 793 g en una centrífuga Eppendorff, se recuperaron los sobrenadantes y se congelaron a -70 °C hasta su uso (menos de 2 semanas), se determinaron proteínas por el método de Bradford realizando una curva de referencia con albúmina sérica de bovino (BSA) conteniendo una cantidad de Tritón X-100 equivalente al presente en las alícuotas del extracto en este detergente, mientras que en la fracción insoluble en el mismo las proteínas se evaluaron después de resuspenderlo en NaOH 1 N. La cantidad de Tritón presente aunque aumento el color basal permitió la determinación adecuada de las proteínas.

ZIMOGRAFÍA PARA GELATINASAS:

Las muestras se separaron por electroforesis en condiciones no reductoras en geles de poliacrilamida al 10% SDS conteniendo 1 mg/ml de gelatina de piel de porcino (G2625; Sigma Chemical Co. St.Louis, Mo). La electroforesis se corrió a 4° C, aplicando 15 mA/gel durante dos horas. Posteriormente los geles se lavaron dos veces por 30 minutos a 37° C en Tritón X-100 al 2.5% (v/v) para remover el SDS; la actividad enzimática se reveló incubando durante 48 horas a 37 °C en amortiguador revelador (50 mM Tris HCl pH 7.5 conteniendo 10 mM CaCl₂, 150 mM de NaCl y 0.5% Tritón X-100), simultáneamente se corrieron estándares de peso molecular de referencia. Después se tiñeron con azul de Coomassie R-250 al

0.5%, las proteínas que degradan gelatina fueron identificadas como zonas blancas de lisis en un fondo azul.

Activación de las gelatinasas con APMA.

Se empleó acetato π -aminofenilmercúrico (APMA) (Nagase y col., 1997). Para ello se preparó en fresco una solución de APMA 10 mM en etanol al 20%, se agregó a las muestras del ventrículo izquierdo en amortiguador de Tris-HCl 50 mM pH de 7.5 conteniendo CaCl_2 1 mM, para dar una concentración final de APMA de 1 mM. La mezcla se incubó a 37°C en un periodo de 00:00 a 02:00 horas.

ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO:

Los zimogramas fueron captados en un analizador de geles de Alpha Innotech Corporation con un gabinete Multi-ImageTM y la zona de actividad enzimática fue valorada por densitometría, usando el software del aparato (alpha-Imager 2000). La cantidad de enzima fue expresada en unidades arbitrarias (AU) proporcionadas automáticamente por el mismo (Kleiner y Stetler-Stevenson, 1994).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se les realizó a los datos la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov siendo esta ($p > 0.050$) por lo que se decidió realizar una ANOVA para comparar si las condiciones experimentales presentan diferencias significativas, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, empleando el programa Sigma Stat.

RESULTADOS

PRESIÓN SANGUÍNEA.

Al primer mes ambas cepas de rata WKY y SHR tuvieron la misma presión arterial, al tercer mes las ratas SHR presentaron un aumento de la presión sanguínea, alcanzando un valor de 157.58 ± 4.93 mm Hg, mientras que en las Wistar-Kioto de la misma edad fue de 101.46 ± 10.64 mm Hg; para el sexto mes en las ratas SHR la presión arterial continuó aumentando hasta 203.3 ± 14.5 mm Hg, mientras que en las WKY no aumentó la presión a los 6 meses (114 ± 3.0 mm Hg) en relación a la que presentaron a los 3 meses (figura 3).

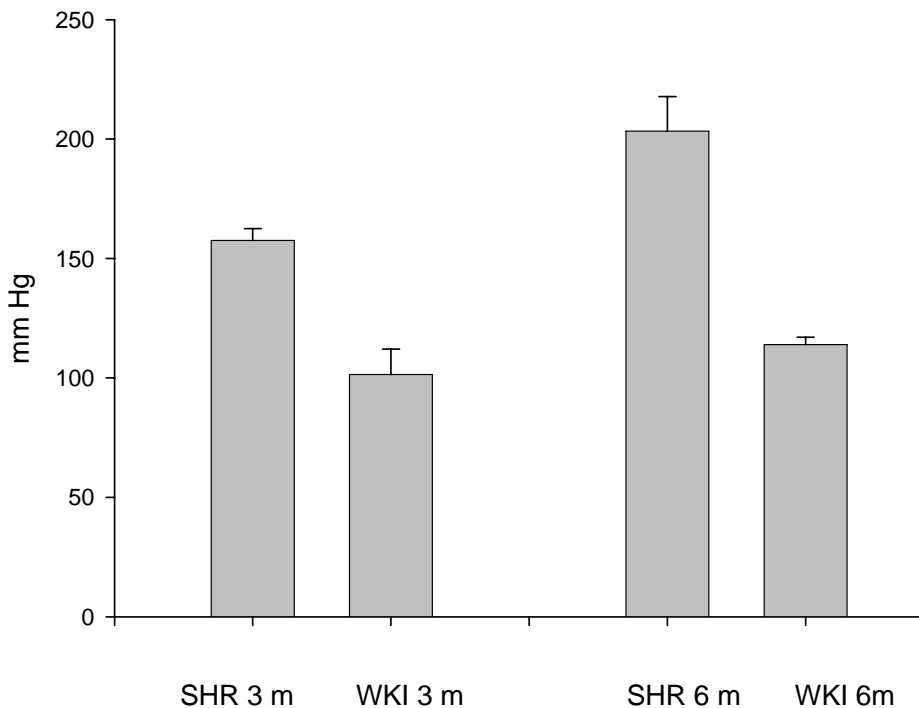


Figura 3. Aumento de la presión sanguínea en las ratas SHR en relación a la edad. Se observó hipertensión en las ratas SHR a los 3 y 6 meses. Al primer mes no hubo diferencias en la presión entre las ratas WKY y las SHR. Se presenta la media y desviación estándar ($\bar{X} \pm \sigma$) de 3 determinaciones.

CAMBIOS EN EL PESO CARDIACO.

Los pesos de los organismos fueron similares en ambas cepas de rata en el primero y tercer mes, sin embargo al sexto mes se observó que las ratas WKY pesan un 20% más que las SHR (tabla 1). El peso cardiaco aumento con la edad, siendo al menos 3 veces mayor en el tercer mes con relación al primero en ambos grupos. Para el sexto mes siguió aumentando pero en una menor proporción, a esta edad el peso cardiaco en las ratas SHR fue mayor en un 15 % que el de las WKY, como las primeras crecieron menos, la relación peso cardiaco/peso corporal fue mayor en un 29 % en ellas con respecto a la de las ratas WKY, siendo ésta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$, tabla 1). Es de señalarse que al primer mes tanto el peso cardiaco como su proporción con el peso corporal son mayores en las ratas WKY que en las SHR ($p < 0.05$, tabla 1).

TABLA 1: COMPARACIÓN DE LOS PESOS CARDIACOS ENTRE LAS RATAS WKY Y SHR

CEPA/ EDAD (MESES)	PESO CORPORAL (g)	PESO CARDIACO (g)	PESO CARDIACO/ PESO CORPORAL (mg/g)
WKY /1	77.3±4.2	0.45±0.04	6±0.6
WKY /3	296.4±33.2	1.4±0.05	5±0.45
WKY /6	370.2±21.3	1.4±0.23	4±0.85
SHR /1	67.7±5.1	0.314±0.02	4.7±0.14*
SHR /3	259.6±21.9	1.16±0.2	4.5±0.5
SHR /6	296.3±32	1.64±0.15	5.6±1*

Se presenta la $\bar{X} \pm \sigma$ de 3 determinaciones, * $p \leq 0.05$ con relación a las ratas WKY de la misma edad.

En cuanto a los pesos por área se observó que el ventrículo derecho en las ratas WKY alcanzó un máximo a los 3 meses, mientras que en las SHR sigue aumentado de peso llegando a ser mayor en las ratas SHR de 6 meses con respecto a las WKY. Los ventrículos izquierdos alcanzan a los seis meses un peso similar en ambos tipos de rata (tabla 2).

TABLA 2. PESOS DE DISTINTAS ZONAS CARDIACAS DE RATAS SHR Y WKY A DIFERENTES EDADES.

ZONA	CEPA/EDAD (meses)	PESO DE LA ZONA (g)	PESO DE ZONA/PESO CORPORAL (mg/g)
Ventrículo derecho	WKY/1	0.16±0.007	2±0.2
	WKY/3	0.35±0.17	1.2±0.7
	WKY/6	0.36±0.09	1±0.2
	SHR/1	0.095± 0.04	1.4±0.6
	SHR/3	0.28±0.07	1±0.3
	SHR/6	0.5±0.08*	1.7±0.4
Ventrículo izquierdo	WKY/1	0.24±0.03	3±0.4
	WKY/3	0.72±0.09	2.4±0.5
	WKY/6	0.95±0.05	2.8±0.4
	SHR/1	0.25±0.05	3.6±0.43
	SHR/3	0.8±0.12	3±0.5
	SHR/6	0.9±0.03	3.2±0.4
Aurículas	WKY/1	0.04±0.005	0.5±0.08
	WKY/3	0.12±0.06	0.4±0.15
	WKY/6	0.11±0.031	0.3±0.07
	SHR/1	0.03±0.004	0.5±0.04
	SHR/3	0.075±0.02	0.3±0.1
	SHR/6	0.14±0.08	0.5±0.3

VD, Ventrículo derecho, VI, ventrículo izquierdo, AU, aurículas.

CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE GELATINASAS CON LA EDAD EN RATAS SHR Y WKY.

Se detectaron en los zimogramas de las fracciones soluble e insoluble en Tritón X-100 bandas de actividad con pesos de 72, 68 Y 59 kDa, las dos últimas corresponden a la pro-MMP-2 y la MMP-2 y una banda de 92 kDa correspondiente a la MMP-9, así como una banda de bajo peso molecular de menos de 29 kDa, solo esta última no se inhibe con EDTA (figuras 4-10). Las bandas correspondientes a la MMP-2 siempre fueron mas intensas que la de la MMP-9.

La expresión de MMP-2 cambia significativamente en el ventrículo derecho ($P < 0.05$), ventrículo izquierdo ($P < 0.05$) y aurícula ($P \leq 0.001$); en relación con la edad; ya que tanto en el grupo control como en las ratas SHR se encontró una mayor cantidad de MMP-2 en los ventrículos y aurículas al mes de edad y una disminución estadísticamente significativa a los 3 meses, manteniéndose relativamente constante entre los 3 y 6 meses, este comportamiento se observó en ambas fracciones, aunque la enzima se encuentra en mayor cantidad en la fracción soluble en Tritón X-100. Por su parte, la MMP-9 también fue observada en mayor cantidad en los ventrículos y aurículas de ratas WKY de un mes de edad y disminuye, casi desapareciendo, al tercero. En primer mes se observó en los ventrículos en una proporción similar en ambas fracciones, sin embargo, a los 3 y 6 meses y en las aurículas de todas las edades, se encontró principalmente en la fracción insoluble en Tritón X-100, lo cual sugiere que la enzima esta más fuertemente unida a la matriz extracelular, y solo con la acción de un detergente aniónico como el SDS se puede extraer mejor (figura 4-B).

DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE LA GELATINASAS ENTRE LAS RATAS SHR Y WKY.

En las ratas SHR los cambios en la MMP-2 entre 1 y 6 meses de edad fueron similares a los observados en las WKY, excepto que la caída en la cantidad de la enzima en los ventrículos al tercer mes fue mayor. El patrón de expresión de la MMP-9 fue aún mas afectado en las ratas SHR, siendo su cantidad menor en sus ventrículos y aurículas a 1 y 3 meses de edad en relación a las ratas WKY (figuras 4-7).

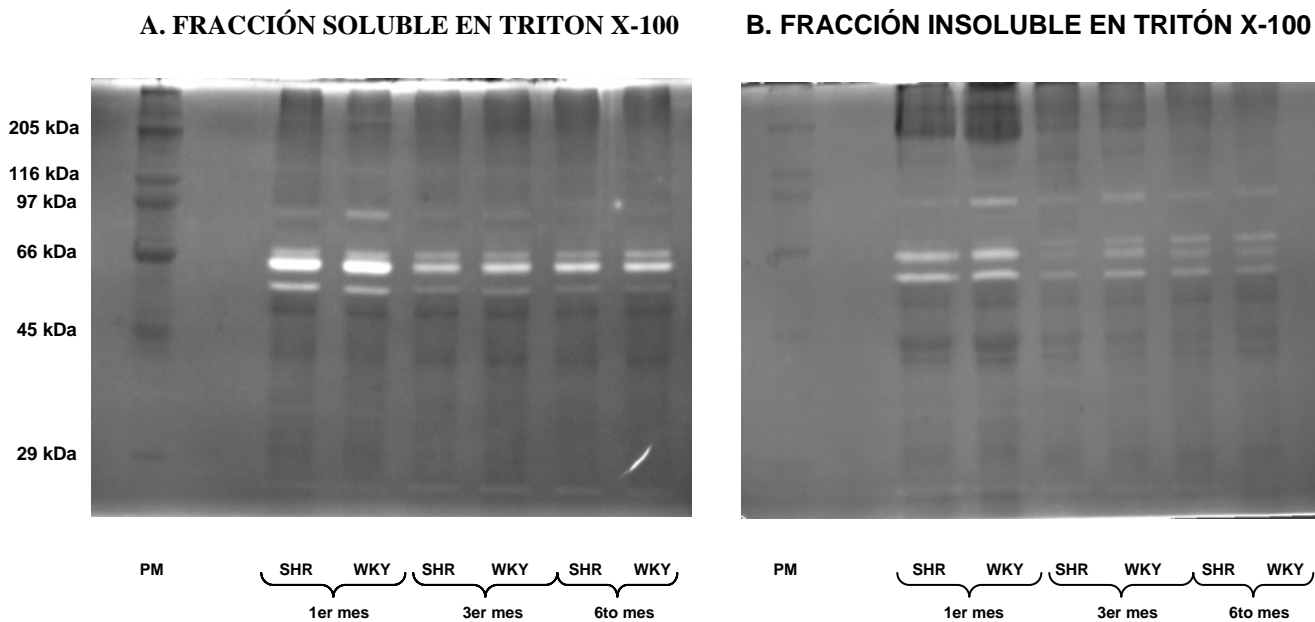


Figura 4. Detección de gelatinasas por zimografía en el ventrículo derecho de ratas SHR. Se realizaron geles de poliacrilamida–SDS al 10%, copolimerizados con gelatina de la fracción soluble (A) e insoluble (B) en Tritón X100 del ventrículo derecho. Simultáneamente se procesaron estándares de peso molecular (PM). Se presenta un zimograma representativo de al menos 3 experimentos.

VENTRÍCULOS

En los ventrículos derecho e izquierdo se observó una diferencia en la expresión de las bandas gelatinolíticas en WKY y SHR, ya que la MMP-2 cae hacia el tercer y sexto mes de edad en ambos grupos de ratas; pero se detecta una mayor cantidad de enzima en la WKY de 3 meses que en la SHR de la misma edad, de la misma manera se observa una mayor abundancia de la MMP-9 en las ratas WKY de 1 mes con respecto a las SHR de la misma edad.

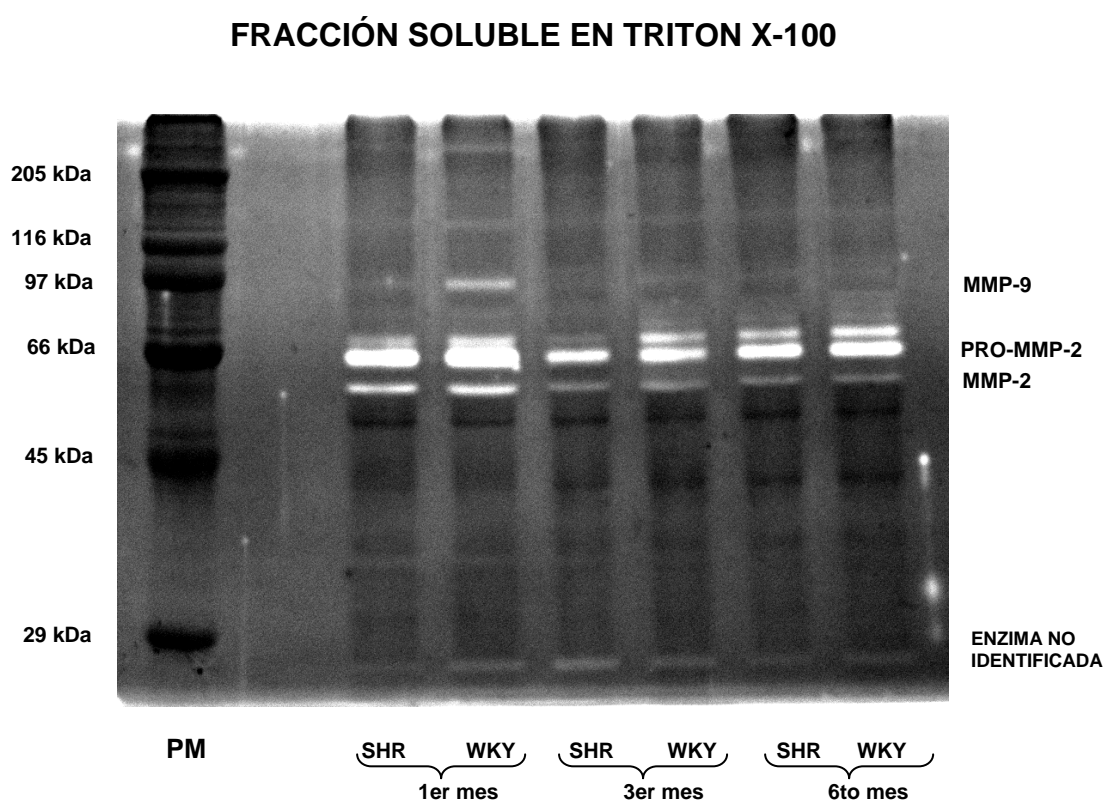


Figura 5. Detección de gelatinasas por zimografía en el ventrículo izquierdo de ratas SHR. Se realizaron geles de poliacrilamida–SDS al 10%, copolimerizados con gelatina de la fracción soluble en Tritón X100 del ventrículo izquierdo. Simultáneamente se procesaron estándares de peso molecular (PM). Se presenta un zimograma representativo de al menos 3 experimentos.

AURÍCULAS

A diferencia de los ventrículos, en las aurículas hay muy poca MMP-9, por otro lado se observó una mayor proporción de MMP-2 activa en las aurículas de ratas SHR de un mes respecto a las WKY de la misma edad. Aquí a diferencia de los ventrículos, la enzima de bajo peso es más abundante en las SHR de 1 y 3 meses

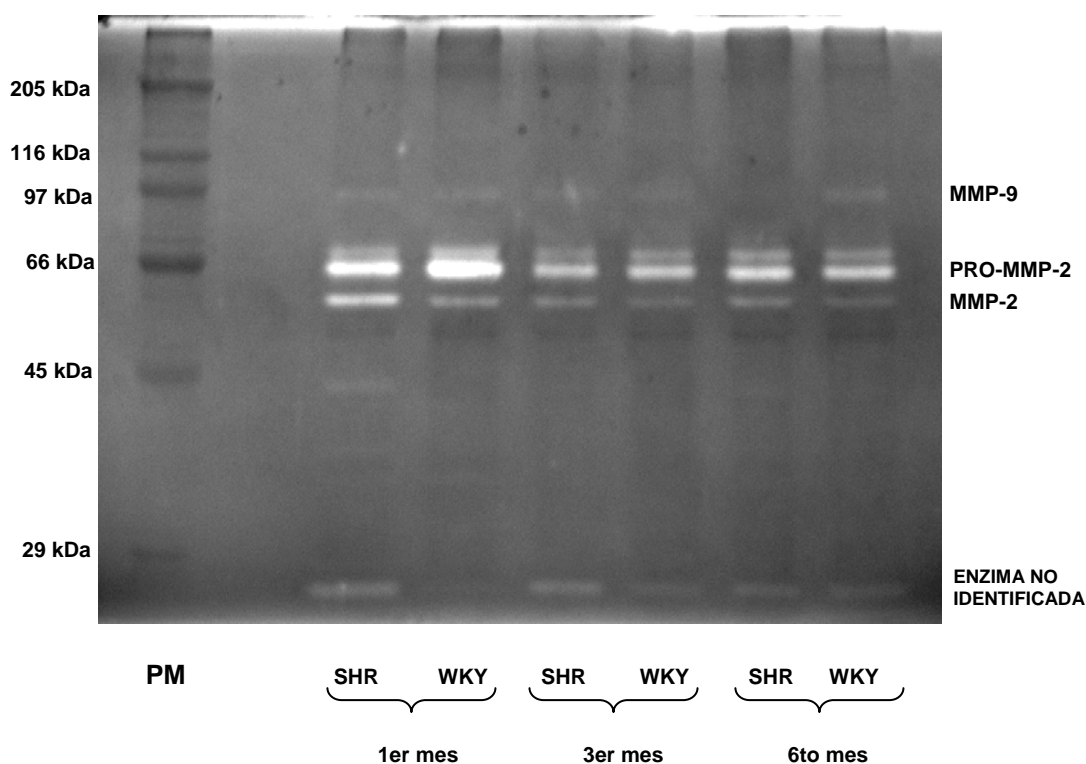


Figura 6. Detección de gelatinasas por zimografía en las aurículas de ratas SHR. Se realizaron geles de poliacrilamida–SDS al 10%, copolimerizados con gelatina de la fracción soluble en Tritón X100 de las aurículas. Simultáneamente se procesaron estándares de peso molecular (PM). Se presenta un zimograma representativo de al menos 3 experimentos.

EXPRESIÓN DE GELATINASA EN LA AORTA.

Se encontró siempre una mayor cantidad de MMP-2 en aorta que en ventrículo derecho e izquierdo y aurículas, en ellas se observó una disminución del primer al tercer mes y un aumento en el sexto mes sobrepasando el contenido de la enzima presente en el primer mes, sin embargo esto no fue estadísticamente significativo cuando se compararon los valores obtenidos por densitometría. La proporción de MMP-2 activa es mayor en las ratas SHR de 1 y 6 meses en relación a la presentada por las WKY de edades similares. En las ratas SHR de 3 meses la cantidad de la MMP-2 fue cualitativamente menor con respecto a las WKY de la misma edad (figura 7). Prácticamente no se detectó la presencia de la MMP-9. El patrón zimográfico y los cambios de las gelatinasas asociados con la hipertensión que se presentaron en la aorta fueron más parecidos a los que se presentaron en las aurículas que aquellos de los ventrículos.

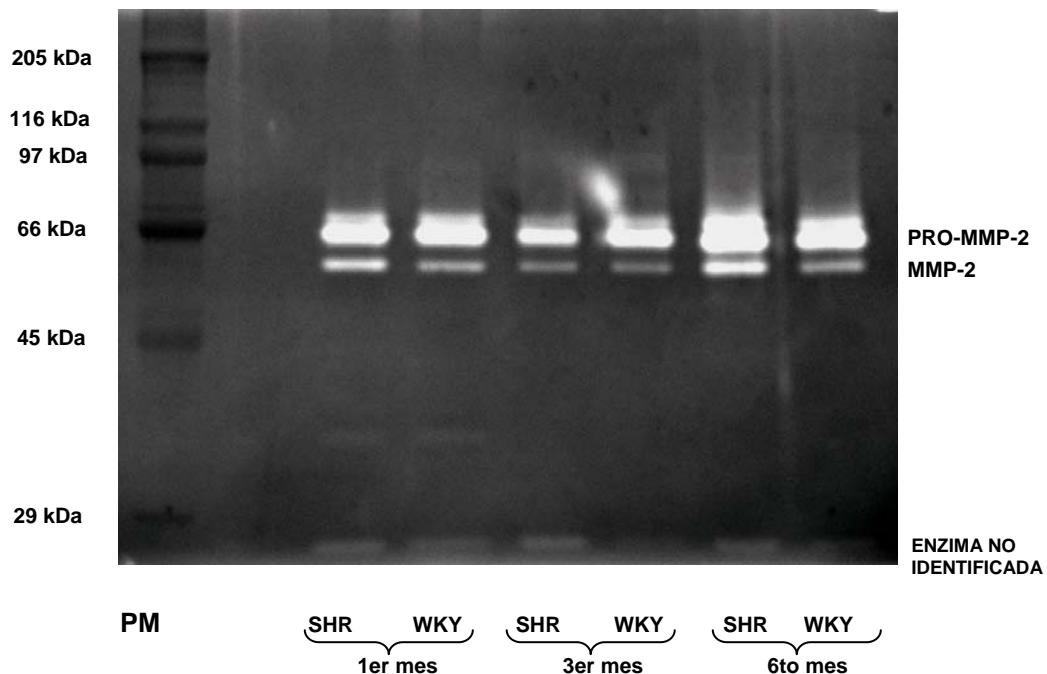


Figura 7. Detección de gelatinasas por zimografía en las aortas de ratas SHR. La cantidad de MMP-2 activa al primer y sexto mes de edad es mayor en SHR. En este caso al igual que en la aorta la proteasa de bajo peso molecular también se presenta más en las SHR. Se presenta un zimograma representativo de al menos 3 experimentos.

CARACTERIZACIÓN DE LAS BANDAS GELATINOLÍTICAS.

Durante la activación con APMA de extractos del ventrículo izquierdo de rata SHR de seis meses, la banda de pro-MMP-2 de 68 kDa tendió a disminuir de intensidad, mientras que la de 59 kDa aumentó y surgió una banda de peso molecular intermedio. La cantidad de MMP-9 fue poca por lo que no pudimos observar claramente su activación. Se incubaron los zimogramas en presencia de EDTA para determinar cuales de las bandad de actividad correspondían a metaloproteinasas confirmando que las bandas encontradas de 92, 72, 68 y 59 kDa si corresponden a ellas, mientras que la banda menor de 29 kDa no fue inhibida por lo que no se trata de una metaloproteasa.

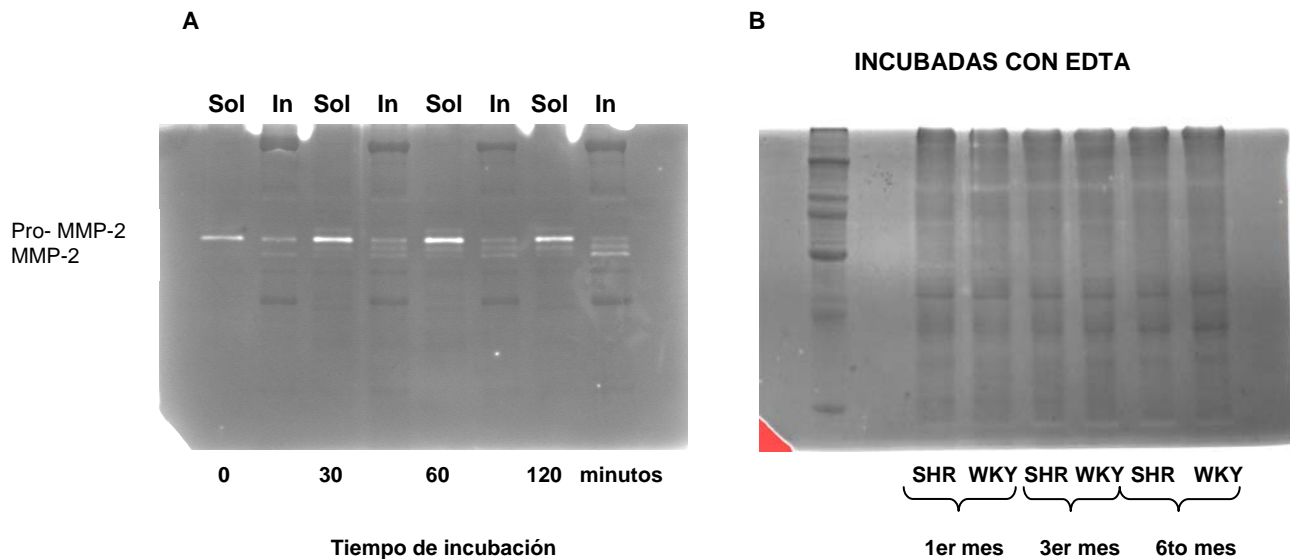


Figura 8. Caracterización de las bandas gelatinolíticas. A. Zimogramas de muestras de ventrículo izquierdo activadas con APMA a diferentes tiempos, se activaron tanto la fracción soluble en TRITON X -100 (Sol) como la fracción no soluble (In), se observa como resultado de la activación de la MMP-2 el enriquecimiento de la banda de 59 kDa. (MMP-2 activa). En B zimogramas de la fracción soluble fueron incubadas en presencia de EDTA. Solo la banda gelatinolítica con peso molecular menor a 29 kDa no fue inhibida. Se presenta un zimograma representativo de al menos 3 experimentos.

ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores densitométricos de la expresión de MMP-2 entre los dos grupos de ratas, pero si existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) en relación a las edades y es debida a la disminución de la expresión de la MMP-2 en el tercer y sexto mes de edad tanto en ventrículo derecho, ventrículo izquierdo y aurículas.

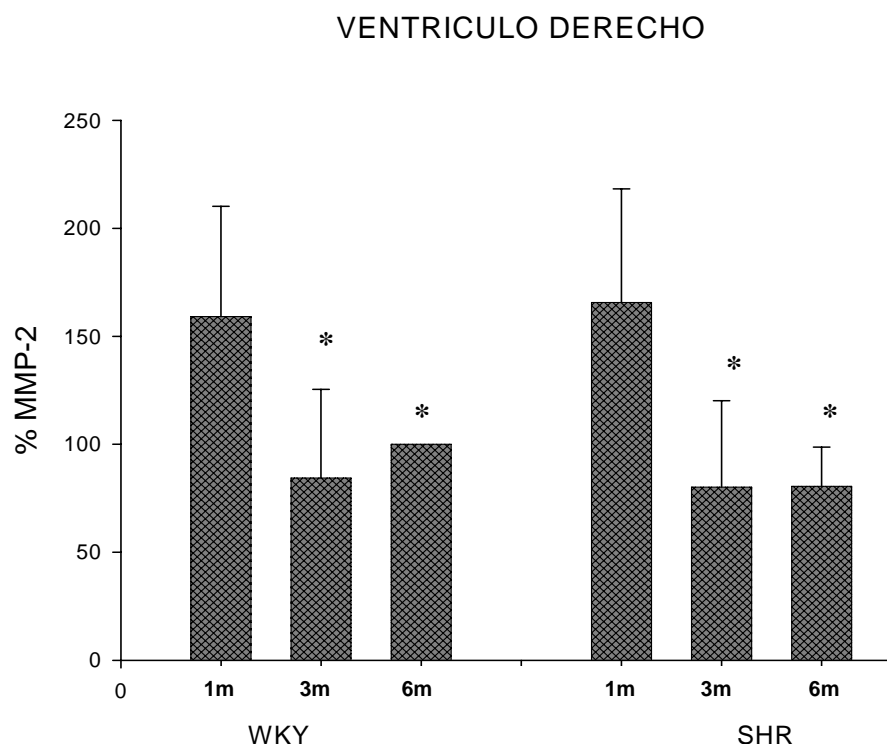


Figura 9. Evaluación densitométrica de la MMP-2 en el ventrículo derecho de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas Wistar Kioto (WKY). Se evaluaron densitométricamente las bandas correspondientes al zimógeno y la forma activa de MMP-2 de la fracción soluble en Tritón X-100 de muestras de ratas de 1, 3 y 6 meses (1m, 2m y 3m). El contenido de la enzima se expresa como porcentaje tomando como 100 % a la enzima presente en las ratas WKY de 6 meses. Se presenta la $\bar{X} \pm \sigma$ de 3 determinaciones, * $p < 0.05$ comparado con las ratas de 1 mes de la misma cepa.

VENTRICULO IZQUIERDO

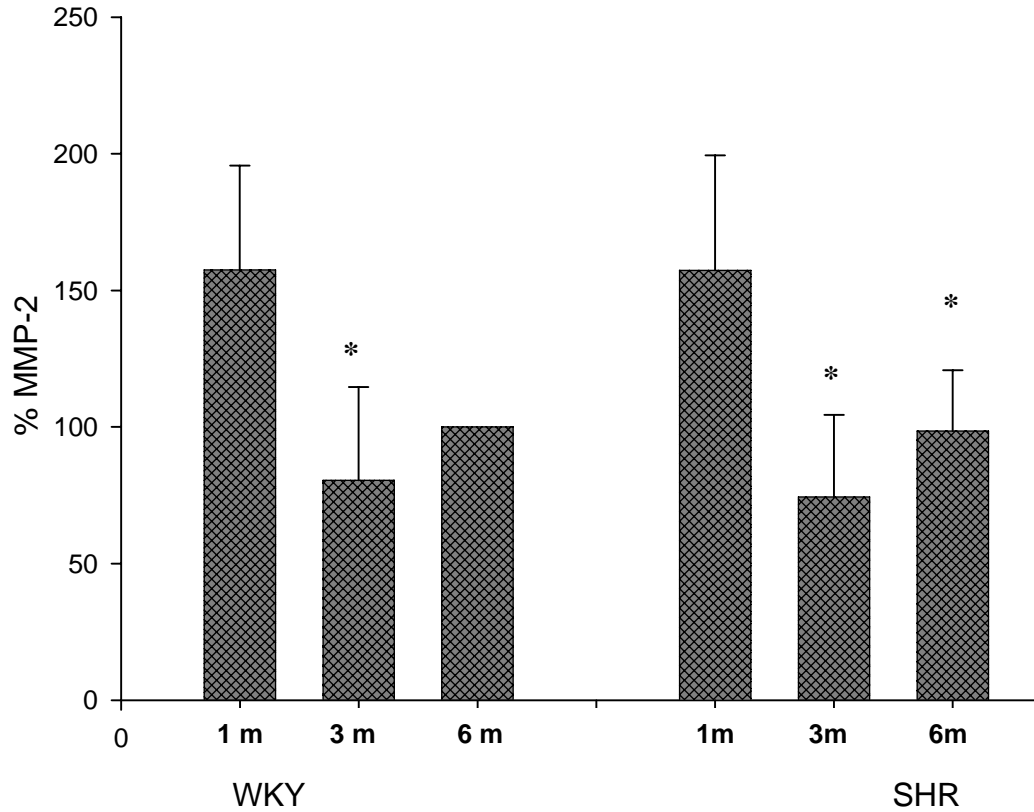


Figura 10. Evaluación densitométrica de la MMP-2 en el ventrículo Izquierdo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas Wistar Kioto (WKY). Se evaluaron densitométricamente las bandas correspondientes al zimógeno y la forma activa de MMP-2 de la fracción soluble en Tritón X-100 de muestras de ratas de 1, 3 y 6 meses (1m, 2m y 3m). El contenido de la enzima se expresa como porcentaje tomando como 100 % a la enzima presente en las ratas WKY de 6 meses. Se presenta la $\bar{X} \pm \sigma$ de 3 determinaciones. * $p < 0.05$ comparado con las ratas de 1 mes de la misma cepa.

AURICULAS

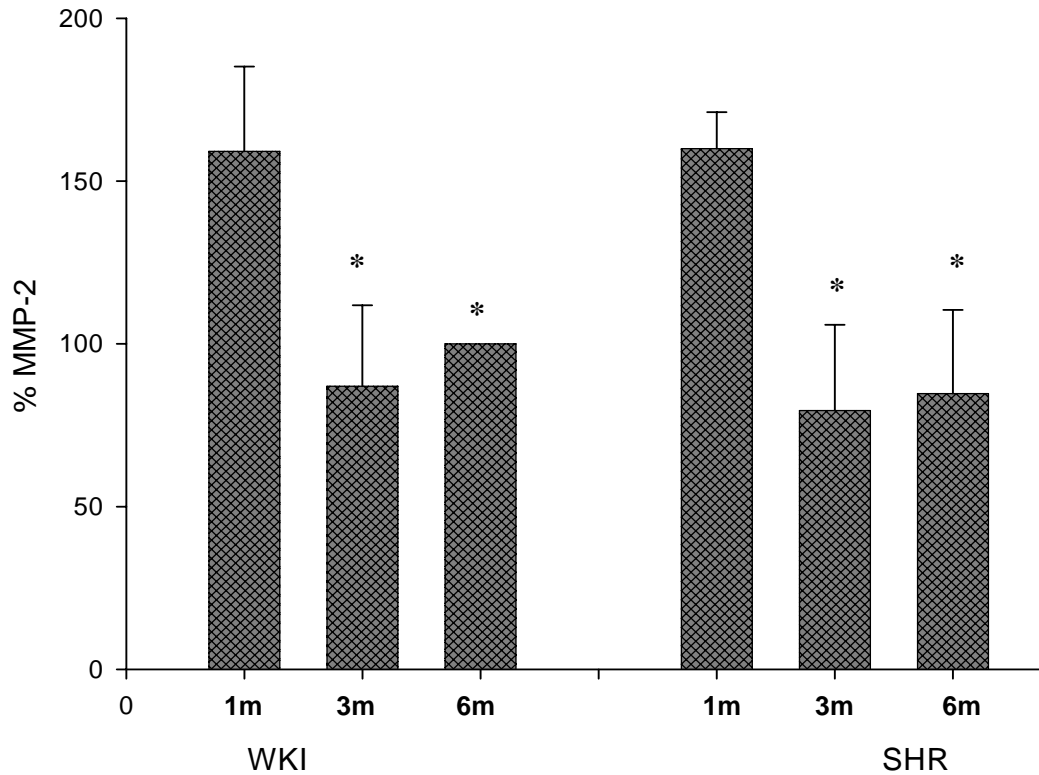


Figura 11. Evaluación densitométrica de la MMP-2 en las aurículas de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas Wistar Kioto (WKY). Se evaluaron densitométricamente las bandas correspondientes al zimógeno y la forma activa de MMP-2 de la fracción soluble en Tritón X-100 de muestras de ratas de 1, 3 y 6 meses (1m, 2m y 3m). El contenido de la enzima se expresa como porcentaje tomando como 100 % a la enzima presente en las ratas WKY de 6 meses. Se presenta la $\bar{X} \pm \sigma$ de 3 determinaciones. * $p < 0.05$ comparado con las ratas de 1 mes de la misma cepa.

Sin embargo en aorta no se encontró diferencias significativas entre los dos grupos de ratas ni tampoco en relación a las distintas edades.

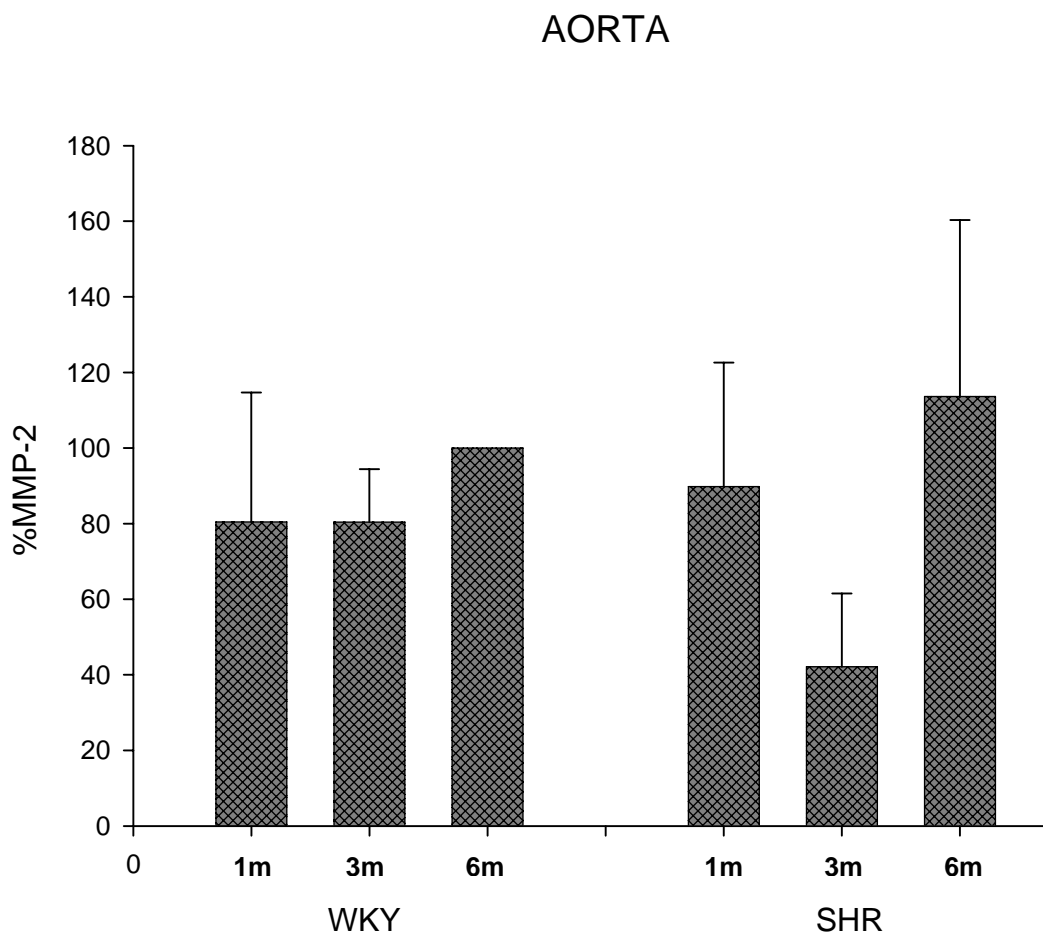


Figura 12. Evaluación densitométrica de la MMP-2 en la aorta de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas Wistar Kioto (WKY). Se evaluaron densitométricamente las bandas correspondientes al zimógeno y la forma activa de MMP-2 de la fracción soluble en Tritón X-100 de muestras de ratas de 1, 3 y 6 meses (1m, 2m y 3m). El contenido de la enzima se expresa como porcentaje tomando como 100 % a la enzima presente en las ratas WKY de 6 meses. Se presenta la $\bar{X} \pm \sigma$ de 3 determinaciones.

DISCUSIÓN

En este trabajo se encontraron variaciones en la expresión de gelatinasas en el corazón y aorta relacionadas con la edad y con la susceptibilidad genética a desarrollar hipertensión, esto último en las ratas SHR. Durante el crecimiento postnatal del corazón se encontró que en los ventrículos y aurículas la concentración de MMP-2 fue siempre mayor en el primer mes, cayendo al tercero y manteniéndose baja en el sexto. Mientras que en la aorta se comporta prácticamente igual en el primer y tercer mes, pero la caída en actividad es menos pronunciada y al sexto mes su concentración se eleva de nuevo. Por su parte, la MMP-9 se expresa principalmente en los ventrículos al primer y tercer mes disminuyendo al sexto.

El surgimiento de la hipertensión arterial se encontró en las ratas SHR desde el tercer mes de edad, lo que se asoció con hipertrofia cardiaca al sexto mes, siendo la hipertrofia principalmente en el ventrículo derecho. En las ratas SHR no se observó la mayor expresión de MMP-9 característica de los ventrículos al primer mes y se detectó una mayor proporción de MMP-2 activa al primer mes en las aurículas y al primer y sexto mes en la aorta. Adicionalmente, tanto en las aurículas como en la aorta es mayor la cantidad de una proteasa menor de 29 kDa con actividad gelatinolítica insensible a EDTA al primer y tercer mes.

PRESIÓN ARTERIAL

El aumento de la presión arterial al tercer mes en las ratas SHR corrobora las observaciones hechas por Ikeda en 1999 y Sicard y col., en 2006, de que esta cepa de ratas presentan una persistente hipertensión al final del segundo mes de edad, el aumento en la tensión arterial en las ratas SHR se ha asociado con una mayor actividad de angiotensina II y con aumento en el estrés oxidativo.

DESARROLLO DE HIPERTROFIA CARDIACA.

Los cambios en la relación peso cardíaco/peso corporal de las ratas SHR de 6 meses, nos indica el desarrollo de hipertrofia subsiguiente a la hipertensión por lo tanto como resultado de factores hemodinámicos, a los que se pueden sumar factores humorales y de regulación local. Baltatu y col.,(2000) encontraron que la administración de angiotensina II induce alteraciones fisiopatológicas cardiovasculares, asociadas con la hipertensión, junto con un aumento en la expresión de colágenas I, III, IV y fibronectina, en este estudio los niveles de mRNA de colágena III fueron considerados como un indicador de una posible fibrosis.

Acorde con nuestros resultados, en 1979, Pfeffer y col., encontraron que ratas SHR de 12 a 21 meses de edad, desarrollaron hipertrofia tanto del ventrículo izquierdo como del derecho. Brilla (2000) menciona que el aumento de peso en ambos ventrículos en las ratas hipertensas, esta relacionado con un incremento del porcentaje de colágena, triplicándose en ventrículo izquierdo y multiplicándose en el ventrículo derecho, lo que puede causar una hipertrofia bilateral.

Los trabajos señalados indican que la hipertrofia se asocia con alteraciones en el recambio y remodelación de la matriz extracelular relacionados con una mayor síntesis de sus componentes, los que pueden complementarse con alteraciones en su degradación, por lo que el estudio de las variaciones y participación de proteasas extracelulares nos llevaran a entender mejor los mecanismos de la hipertrofia cardíaca.

Por otro lado Aiello y col., (2004) encontraron que las ratas WKY presentan una hipertrofia intermedia entre las ratas SHR y Wistar de la misma edad, lo que indica que presentan ya cierta susceptibilidad genética para desarrollar hipertensión e hipertrofia, pero menor que la de las SHR, de ahí que algunos cambios bioquímicos debidos a este tipo de susceptibilidad pueden no detectarse fácilmente si estudiamos ambas cepas.

CAMBIOS DE LAS GELATINASAS DURANTE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO POSNATAL DEL CORAZÓN Y AORTA.

Durante el crecimiento embrionario la actividad de las MMPs, especialmente la MMP-2, se asocia con la coordinación de la organogénesis temprana durante el cierre ventral del corazón (Linask., 2005). En el feto la masa del miocardio ventricular incrementa principalmente por la proliferación celular (hiperplasia), después del nacimiento el aumento en el número de miocitos continúa en la rata hasta el tercer día, a partir de ahí, empiezan a observarse cardiomiocitos binucleares, y el crecimiento cardíaco se debe principalmente a hipertrofia. La transición de crecimiento hiperplásico a hipertrófico ocurre tempranamente durante el periodo neonatal, siendo en la rata del tercer al cuarto día (Li y col., 1996). En nuestro estudio encontramos mayor velocidad de crecimiento del corazón del primero al tercer mes, siendo menos rápido del tercero al sexto, es posible que la mayor concentración de las gelatinasas en el corazón al primer mes puede estar asociada con una mayor velocidad de crecimiento debido a hipertrofia y por consiguiente con una mayor remodelación tisular. El aumento transitorio en la expresión de MMP-9 durante el primer mes debe de estar relacionado con algún evento propio de ese periodo como la alta velocidad de crecimiento, pero se requieren más estudios para poder establecerlo.

Prácticamente no encontramos estudios de la participación de las metaloproteinasas en el desarrollo postnatal del corazón.

CAMBIOS DE LAS GELATINASAS ASOCIADOS CON LA HIPERTENSIÓN E HIPERTROFIA CARDIACA.

Al igual que en los trabajos realizados por Lekgabe y col. (2005) detectamos una mayor expresión de la MMP-2, en comparación con la MMP-9 en los ventrículos de las dos cepas de ratas. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos realizados

en corazón con insuficiencia cardiaca miocárdica mas severa se menciona un incremento en la expresión de la MMP-2 y MMP-9, que se ha relacionado con los cambios en la función y geometría cardiaca en diferentes modelos de sobrecarga en ratas (Moshal y col., 2005; Brower y Janicki, 2001). La MMP-2 y la MMP-9 participan en los procesos de remodelación después del infarto al miocardio o daño cardiaco en diversas cardiomiopatías y enfermedades coronarias (Kameda y col., 2003).

Aunque mediante el análisis densitométrico de la MMP-2 no pudimos encontrar diferencias significativas entre los niveles de la enzima entre las ratas SHR y WKY a las edades estudiadas, si se observaron diferencias cualitativas importantes desde el primer mes tanto en el corazón como en la aorta, aún antes de que se presentara hipertensión o hipertrofia, lo que indica que en éstos órganos en las ratas SHR, hay cambios celulares y bioquímicos previos a estas alteraciones y que posiblemente conduzcan a ellas, por lo que pueden estar asociados con la mayor susceptibilidad de éstas ratas a desarrollar hipertensión. En parte el desarrollo de la hipertensión por las ratas SHR se ha atribuido a que presentan una mayor cantidad el receptor adrenérgico α_{1D} , con respecto a las WKY, lo cual favorece el aumento y persistencia de la presión sanguínea (Villalobos-Molina y col., 1999), deben de efectuarse mas estudios con el fin de analizar si la expresión y activación de metaloproteinases puede ser regulada a través de estos receptores.

Las principales diferencias encontradas fueron un menor nivel de la MMP-9 en ambos ventrículos de las ratas SHR al primer mes de edad y un aumento en la proporción de MMP-2 activa en la aorta y las aurículas de las mismas ratas, presente en ambos al primer mes y en la aorta también al sexto.

La etapa transitoria de mayor expresión de MMP-9 observada en los ventrículos de las ratas WKY no estuvo presente en las ratas SHR, lo anterior implica que la matriz extracelular pueda acumularse en los ventrículos aún antes de que la hipertensión se presente y explicar en parte porque el peso del corazón fue menor

en las ratas SHR de 1 mes que en las WKY de la misma edad, indicando un inicio muy temprano de la fibrosis del miocardio, para corroborar si esta suposición es correcta, evaluaremos y compararemos el contenido de colágena del corazón a esta edad entre ambas cepas de ratas.

La mayor activación de la MMP-2 en las aurículas y aorta de las ratas SHR posiblemente esta relacionada con un incremento en el estrés oxidativo, mismo que se ha descrito que ocurre en el corazón de organismos de esta cepa desde la cuarta semana de edad (Cosentino y col., 1998; McIntyre y col., 1999; Zalba y col., 2001; Reckelhoff; 2003). Las especies reactivas de oxígeno se han involucrado en regular la expresión y/o activación de MMPs (Galis y col., 1998), por ejemplo; se ha detectado que en arterias ilíacas de cerdos con arterosclerosis, al disminuir el estrés oxidativo, se reduce la actividad de éstas enzimas (Orbe y col., 2003).

Los cambios en la aorta pueden ser importantes en influir la funcionalidad del corazón o viceversa, en las aortas de las ratas SHR de 6 a 20 semanas de edad se ha detectado un incremento en la expresión de fibronectina y colágena tipo V, favoreciendo el endurecimiento de las mismas (Intengan y Schiffrin, 1999), el aumento en la rigidez de la pared de la aorta puede alterar sus propiedades mecánicas aumentando la carga de trabajo del corazón y así conducir a la hipertrofia. Las propiedades mecánicas de la aorta son un componente crítico en la función cardiovascular en los sistemas de desarrollo y maduros. La aorta madura es relativamente flexible y elástica, y sus características son dadas por el alto porcentaje de elastina en comparación con otras arterias (Sedmera y col., 2003)

Los productos secretorios del endotelio son centrales para regular el comportamiento de las células vasculares, los cambios en la producción o activación de la gelatinasa A pueden tener importantes consecuencias en la

proliferación o migración de las células musculares lisas alterando la estructura y función vascular.

Por otro lado el desbalance proteolítico entre las metaloproteinasas (MMPs) y los inhibidores TIMPs puede ser una base común para la fibrosis patológica; ya que se ha visto una alta expresión del TIMP 1 y TIMP 2 en la fibrosis renal propia de la diabetes (Peters y col., 1997). En el corazón el TIMP-4 es el que mas se produce y es de esperar que su producción se este modificando y participe en regular la remodelación tisular controlando la actividad de la MMP-2 y MMP-9 durante el crecimiento postnatal del corazón y el desarrollo de fibrosis e hipertrofia cardiaca. La cuantificación de los TIMPs en nuestro modelo de estudio nos permitirá comprender mejor los procesos señalados.

CONCLUSIONES

- Las ratas SHR presentaron hipertensión desde el tercer mes de edad, subsiguiente a ello se observó hipertrofia cardiaca al sexto mes, siendo ésta mas marcada en el ventrículo derecho.
- La concentración de MMP-2 en las aurículas y los ventrículos es mayor al primer mes de edad que en el tercero y sexto, lo que se relaciona con una alta remodelación tisular asociada al crecimiento mas rápido del corazón al inicio de la vida postnatal.
- No se encontró diferencia estadística significativa en la concentración de MMP-2 total en el corazón y la aorta entre las ratas SHR y WKY; sin embargo, en las aurículas y la aorta de las ratas SHR se observó una mayor activación de ésta enzima al primer mes en ambas y en la aorta también en el sexto mes.
- La cantidad de MMP-9 es mayor en forma transitoria en los ventrículos de las ratas WKY al primer mes de edad, tendiendo después a prácticamente no expresarse. En las ratas SHR la etapa de mayor expresión de MMP-9 al primer mes no se observa.
- Se observó la presencia de una banda gelatinolítica menor de 29 kDa insensible a EDTA, por lo que se descarta que corresponda a una metaloproteinasa y sería importante su caracterización.

- La matriz extracelular es una compleja red que determina la integridad estructural del corazón, la alteración de la formación y degradación de la matriz extracelular causada por mediadores inflamatorios, especies reactivas de oxígeno y factores neurohumorales y deversas condiciones fisiológicas y patológicas, es en parte mediada por cambios en la expresión de MMPs o sus inhibidores y la activación de las primeras y en muchas ocasiones promueven la acumulación patológica de colágena y otra moléculas de la MEC, ocasionando la pérdida de la correcta función del corazón al favorecer el desarrollo de la fibrosis e hipertrofia cardiaca.

- La técnica de zimografía nos aporato datos importantes sobre los cambios de las gelatinasas en la aorta y el corazón asociados con el crecimiento postnatal, la susceptibilidad a desarrollar hipertensión y con el inicio de la hipertensión e hipertrofia, pero es importante complementarlos con otros procedimientos con mayor aceptación cuantitativa como “Western blot”, RT-PCR o "Northern blot", además de histoquímica o ensayos de actividad enzimática. La cuantificación de colágena y TIMPs en el modelo de estudio nos dará una mayor comprensión de los procesos fisiopatológicos estudiados.

BIBLIOGRAFIA

- Aiello E. A., Villa-Abrille M. C., Escudero E. M., Portiansky E. L., Perez N. G., de Hurtado M. C., Cingolani H. E., 2004. Myocardial hypertrophy of normotensive Wistar-Kyoto rats. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 286(4):H1229-H1235.
- Baltatu O., Silva J. A., Jr., Ganten D., Bader M. 2000. The brain renin-angiotensin system modulates angiotensin II-induced hypertension and cardiac hypertrophy. *Hypertension*, 35:409-412.
- Bashey R.I., Cox R., McCann J., Jimenez S.A. 1989. Changes in collagen biosynthesis, types, and mechanics of aorta in hypertensive rats. *J Lab Clin Med.* 113(5):604-11.
- Benderdour M., Charron G., deBlois D., Comte B., Des Rosiers C. 2003. Cardiac mitochondrial NADP⁺-isocitrate dehydrogenase is inactivated through 4-Hydroxynonenal adduct formation. *J. Biol. Chem.* 278(46): 45154-45159.
- Blasing I. E., Grune T., Schonheit K., Rohde E., Jakstadt M., Haseloff R.F., Siems W. G. 1995. 4-Hydroxynonenal, a novel indicator of lipid peroxidation for reperfusion injury of the myocardium. *Am. J. Physiol.* 269, H14-H22.
- Bottles K. D., Bullen E. C., Updike D. L., Vu T-K. H., Phelps E., Grammas P., Howard E. W. 1999. Gelatinase A expression in endothelial cells is regulated by at least two cis-acting promoter elements. *Biochim. Biophys. Acta.* 1428:147-160
- Brilla C.G., Funck R.C., Rupp H. 2000. Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis in patients with hypertensive heart disease. *Circulation.* 102(12):1388-93.

- Brower G. L., Janicki J. S. 2001. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *Am. J. Physiol.* 280: H674-H683.
- Camp T. M., Smiley L. M., Hayden M. R., Tyagi S. C. 2003. Mechanism of matrix accumulation and glomerulosclerosis in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 21:1719-1727
- Chen J., Henderson G.I., Freeman, G.L. 2001. Role of 4 hydroxynonenal in modification of cytochrome C oxidase in ischemia/ reperfused rat heart. *J. Mol. Cardiol.* 33(11): 1919-1927.
- Cosentino F.F., Patton S., d'Uscio L.V., Werner E. R., Werner-Felmayer G., Moreau P., Malinski T., Luscher T. F. 1998. Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J. Clin. Invest.* 101(7): 1530-1537.
- Cowie M. R., Mosterd A., Wood D. A., Deckers J. W., Poole Wilson P. A., Sutton G. C., Grobbee D. E. 1997. The epidemiology of heart failure. *Eur. Heart J.* 18: 208-225.
- Crawford H.C., Matrisian L.M. 1994. Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *14(1-6):234-45*
- Donnelly R., Collinson D. J., Manning G. 2003. Hypertension, matrix metalloproteinases and target organ damage. *J. Hypertens.* 21 (9): 1627-1630.
- Eaton P., Li J. M., Hearse D. J., Shattock M. J. 1999. Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in ischemic rat heart. *Am. J. Physiol.* 276. H935- H943.

- Ellis V., Murphy G. 2001. Cellular strategies for proteolytic targeting during migration and invasion. *FEBS Lett.* 506(1) : 1-5
- Galis Z.S., Asanuma K., Godin D., Meng X. 1998 N-acetyl-cysteine decreases the matrix-degrading capacity of macrophage- derived foam cells: new target for antioxidant therapy? *Circulation.* 97:2445-2453.
- Grote K., Flach I., Luchtefeld M., Akin E., Holland S.M., Drexler H., Schieffer B. 2003. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ. Res.*92: e80-86.
- Gu Z., Kaul M., Yan B.,Kridel S. J., Cui J., Strongin A., Smith J. W., Liddington R. C., Lipton S.A.2002. S-Nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science.* 297:116-1190.
- Hattori S., Fujisaki H., Kiriya T., Yokohama T. 2002. Real-Time zymography and reverse zymography: a method for detecting activities of matrix metalloproteinases and their inhibitors using FITC-Labeled collagen and casein as substrates. *Anal. Biochem.* 301: 27-34.
- Humphries K. M., Szweda L. I. 1998. Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* 37(45): 15835-15841.
- Humphries K. M., Yoo Y., Szweda L. I. 1998. Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal. [Biochemistry.](#) 37(2):552-7.

- Hunt M. J., Aru G. M., Hayden M. R., Moore C. K., Hoit B. D., Tyagi S. C. 2002 Induction of oxidative stress and disintegrin metalloproteinase in human heart end-stage failure. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283: L239-L245.
- Ide T., Tsutsui H., Kinugawa S., Utsumi H., Kang D., Hattori N., Uchida K, Arimura K., Egashira K., Takeshita, A. 1999. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ. Res.* 85,357-363.
- Ikeda S., Hamada M., Hiwada K. 1999. Contribution of non-cardiomyocyte apoptosis to cardiac remodeling that occurs in the transition from compensated hypertrophy to heart failure in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci.* 97:239-246.
- Intengan H.D., Schiffrin E. L. 2000. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension. Role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*; 36:312-318.
- Intengan H.D. Schiffrin E. L. 1999. Collagen degradation is diminished in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats after hypertension is established. *Hypertension.* 34:329
- Janicki J., Broker G., Gardner J., Chancey A., Stewart J., 2004. The dynamic interaction between matrix metalloproteinase activity and adverse myocardial remodeling. *Heart Fail. Rev.*9,33-42.
- Jiménez G., Merchant L., H. 2003. *Biología celular y molecular.* Prentice Hall. México.

- Kameda K., Matsunaga T., Abe N., Hanada H., Ishizaka H., Ono H., Sayito M., Fukui K., Fukuda I., Osanai T., Okumura K., 2003. Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinases in patients with coronary artery disease. Possible role for left ventricular remodeling. *Eur. Heart J.* 24(24):2180-2185.
- Karp G. 1998. *Biología celular y molecular*. McGraw-Hill Interamericana. México.
- Kedes L. 1994. Regulation of myocardial adaptation. *Scientific American. Science and Medicine.* 1(3):34-43.
- Kim N. N., Villegas S., Summerour S. R., Villareal F. J. 1999. Regulation of cardiac fibroblast extracellular matrix production by bradykinin and nitric oxide. *J. Mol. Cell Cardiol.* 31, 457-466.
- Kleiner D. E., Stetler-Stevenson G. 1994. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal. Biochem.* 218,325-329.
- Lekgabe E. D., Kiriazis H., Zhao C., Xu Q., Moore X. L., Su Y., Bathgate R. A. D., Du X. Samuel C. S. 2005. Relaxin reverses cardiac and renal fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 46:412-418.
- Lemaitre V., D'Armiento J. 2006 Matrix metalloproteinases in development and disease. *Birth Defects Research.* 78(1):1-10.
- Leonarduzzi G., Arkan M.C., Basaga H., Chiarpotto E., Sevanian A., Poli G. 2000. Lipid oxidation products in cell signaling. [Free Radic. Biol. Med.](#) 28(9):1370-8.

- Li F., Wang X., Capasso J. M., Gerdes A.M.1996. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28, 1737–1746
- Linask K. K., Han M., Cai D. C., Braurer P. R., Maisastry S. M. 2005. Cardiac morphogenesis : matrix metalloproteinase coordination of cellular mechanisms underlying heart tube formation and directionally of looping. *Dev. Dyn.* 2005. 233:739-753.
- Lindsey M. L., 2004. MMP induction and inhibition in myocardial infarction. *Heart Fail. Rev.* 9,(1) 7-19.
- Luchtefeld M., Grote K., Grothusen C., Bley S., Bandlow N., Selle T., Strubert M., Haverich A., Bavendiek U., Drexler H., Schieffer B. 2005. Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 238:183-188
- Lucas D.T., Szweda L.I. 1999. Declines in mitochondrial respiration during cardiac reperfusion: age-dependent inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6689-6693.
- Malay M., Amrithlat M., Sudip D., Tapati C., Sajal C. 2003. Clinical implications of matrix metalloproteinases. *Mol. Cell Biochem.* 252:305-329
- Manabe I., Takayuki S., Ryozo N. 2002. Gene expression in fibroblasts and fibrosis. Involvement in cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 91:1103-1113.
- Matrisian L.M. 1992 The matrix-degrading metalloproteases, *Bioassays.*14:455-463

- McIntyre M., Bohr D. F., Dominiczak A. F. 1999 Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension* 34, 539-545.
- Montaner V. J. 2001. Papel de las metaloproteinasas en la fase aguda del ictus isquémico. Tesis Doctoral. Departamento de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona. España, pp.118.
- Moshal K. S., Tyagi N., Moss V., Henderson B., Steed M., Oveckin A., Aru G. M. Tyagi S.C. 2005. Early induction of matrix metalloproteinase-9 transduces signaling in human heart end stage failure.. *J. Cell. Mol. Med.* 9(3): 704-713.
- Mujumdar V. S., Smiley L. M., Tyagi S. C. 2001. Activation of matrix metalloproteinase dilates and decreases cardiac tensile strength. *Int. J. Cardiol.* 79(2-3): 277-286
- Mujumdar V. S., Tyagi S. C. 1999. Temporal regulation of extracellular matrix components in transition from compensatory hypertrophy to decompensatory heart failure. *J. Hypertens.* 17(2):261-270.
- Nagase H., Visse R., Murphy G. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs . *Cardiovasc. Res.* 69(3): 562-573
- Orbe J., Rodríguez J. A., Arias R., Belzunce M., Nespereira B., Pérez-Illzarbe M., Roncal C., Paramo J. A. 2003. Antioxidant vitamins increase the collagen content and reduce MMP-1 in a porcine model of atherosclerosis: implications for plaque stabilization. *Atherosclerosis.* 167:45-53.
- Peters C. A., Freeman M.R., Fernandez C., Shepard J., Wiederschain D. G., Moses M.A. 1997. Dysregulated proteolytic balance as the basis of

excess extracellular matrix in fibrotic disease. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 272:1960-1965

- Peterson J. T., Li H. 2002. Matrix metalloproteinase inhibitor development for the treatment of heart failure. *Drug Dev. Res.*55:29-44.
- Pfeffer J.M., Pfeffer M.A. Fishbein M. C., Frohlich E.D. 1979. Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. *Am. J. Physiol.* 237(4): H461-H468.
- Radomski A., Sawicki G., Olson D.M, Radomski M. W. 1998. The role of nitric oxide and metalloproteinases in the pathogenesis of hyperoxia-induced lung injury in newborn rats. *Br. J. Pharmacol.* 125 (7):1455-1462
- Reckelhoff J. F., Romero J. C. 2003. Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, R893-R912.
- Rouet-Benzineb P, Gontero B, Dreyfus P, Lafuma C.2000. Angiotensin II induces nuclear factor-kappa B activation in cultured neonatal rat cardiomyocytes through protein kinase C signaling pathway.*J. Mol. Cell Cardiol.* 32(10):1767-78.
- Sadek H. A., Humphries K. M., Szweda P. A., Szweda L. I. 2002. Selective inactivation of redox-sensitive mitochondrial enzymes during cardiac reperfusion. *Arch. Biochem. Biophys.* 406, 222-228.
- Sedmera D., Thompson R. P., Kolar F. 2003. Effect of increased pressure loading on heart growth in neonatal rats. *J. Moll. Cell Cardiol.* 35(3):301-309.

- Shimamoto N., Goto N., Tanabe M., Imamoto T., Fujiwara S., Hitara M. 1982. Myocardial energy metabolism in the hypertrophied hearts of spontaneously hypertensive rats. *Basic. Res. Cardiol.* 77 (4): 359-367.
- Sicard P., Oudot A., Gulland J-C., Moreau D. Vargely C., Rchette L. 2006. Dissociation between vascular oxidative stress and cardiovascular function in Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Vascul. Pharmacol.* 45(2):112-121.
- Siwik D. A., Colucci W. S. 2004. Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Fail. Rev.* 9: 43-51.
- Trippodo N.C., Frohlich E. D. 1981. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension man and rat. *Circulation Res.* 8(3)309-319.
- Tyagi S. C., Hayden M. 2003. Role of nitric oxide in matrix remodeling in diabetes and heart failure. *Heart Fail. Rev.* 8, 23-28
- Tzong- Lueng W., Yu-Hui Y., Hang C., Chi-Ren H. 2004. Angiotensin II signals mechanical stretch-induced cardiac matrix metalloproteinase expression via JAK-STAT pathway. *J. Mol. Cell Cardiol.* 37: 785-794.
- Uchida K., Shiraishi M., Naito Y., Torii Y., Nakamura Y., Osawa T. 1999. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J. Biol. Chem.* 274, 2234-2242.
- Uchida K. 2000. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1685-1696.

- Umemura S., Iiri T., Fujita T., Komuro I. 2004. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nature Cell Biol.* (6)6: 499-506.
- Uyehara C.F., Gellai M. 1993. Impairment of renal function precedes establishment of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 265: R943-R950.
- Veronneau M., Comte B., Des Rosiers C. 2002. Quantitative gas chromatographic-mass spectrometric assay of 4-hydroxynonenal bound to thiol proteins in ischemic/reperfused rat hearts. *Free Radic. Biol. Med.* 33. 1380-1388.
- Villalobos-Molina R., López-Guerrero J. J., Ibarra M. 1999. Functional evidence of α_{1D} – adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 126:1534-1536.
- Visse R., Nagase H. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* 92(8): 827-839.
- Wall S. J., Bevan D., Thomas D. W., Harding K. G., Edwards Dylan R., Murphy Gillian. 2002. Differential expression of matrix metalloproteinases during impaired wound healing of the diabetes mouse. *J. Invest. Dermatol.* 119: 91-98
- Yang Y., Sharma R., Sharma A., Awasthi S., Awasthi Y. C. 2003. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochim. Pol.* 50, 319-336.

- Yokokawa K., Johnson J., Kohno M., Mandal A.K., Yanagisawa M., Horio T., Yasunari K., Takeda T. 1994. Phosphoinositide turnover signaling stimulated by ET-3 in endothelial cells from spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 267(3 Pt 2):R635-44.

- Zalba, G., San Jose, G., Moreno, M.U., Fortuno, M.A., Fortuno, A., Beaumont, F.J., Diez, J. 2001. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension.* 38, 1395-1399.

- Zou Y., Akasawa H., Qin Y., Sano M. Takano H., Minamino T., Makita N., Iwanaga K., Zhu W., Kudoh S. Toko H., Tamura K., Kihara M., Nagai T., Fukamizu A., Umemura S., Iiri T., Fujita T., Komuro I., 2004. Mechanical stress activates angiotensin II type I receptor without the involvement of angiotensin II. *Nature Cell Biol.* 6(6):499-506.