



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**Caracterización morfológica y estructural de los diferentes grados de  
lesión de la enfermedad valvular degenerativa en perros mestizos.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTAN:**

**ELSA VERA GÓMEZ**

**IVÁN JESÚS GUERRERO ALMARAZ**

**ASESOR: Dr. CARLOS IGNACIO SOTO ZÁRATE**

**COASESOR: MVZ. EPA. HUGO CÉSAR LÓPEZ FARÍAS**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



U. N. A. M.  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**  
**UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**  
**DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO**  
**DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN**  
**PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ**  
**Jefa del Departamento de Exámenes**  
**Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos **LA TESIS**:

Caracterización morfológica y estructural de los diferentes grados de lesión de la enfermedad valvular degenerativa en perros mestizos.

Que presenta el pasante: **Iván Jesús Guerrero Almaraz**  
 Con número de cuenta: **30113091-2** para obtener el Título de: **Médico Veterinario Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”**  
 Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Febrero de 2012.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate	
<b>VOCAL</b>	MC. Gerardo Garza Malacara	
<b>SECRETARIO</b>	MVZ. Teresa Ortiz Bastida	
<b>1er SUPLENTE</b>	MVZ. Alejandro Sánchez Pacheco	
<b>2do SUPLENTE</b>	MVZ. Luis Hernández Madrigal	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).  
 HH: \*/pm



UNAM  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**  
**UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**  
**DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO**  
**DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN**  
**PRESENTE**

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
**Jefa del Departamento de Exámenes**  
**Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos **LA TESIS**:

Caracterización morfológica y estructural de los diferentes grados de lesión de la enfermedad valvular degenerativa en perros mestizos.

Que presenta la pasante: Elsa Vera Gómez

Con número de cuenta: 30004391-6 para obtener el Título de: Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Febrero de 2012.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate	
<b>VOCAL</b>	MC. Gerardo Garza Malacara	
<b>SECRETARIO</b>	MVZ. Teresa Ortíz Bastida	
<b>1er SUPLENTE</b>	MVZ. Alejandro Sánchez Pacheco	
<b>2do SUPLENTE</b>	MVZ. Luis Hernández Madrigal	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).

HHA/pm

# GRACIAS...

A papá y mamá  
A Elizabeth y Eduardo

Elsa Vera Gómez

A mis padres y Carmina.

Iván Jesús Guerrero Almaraz.

# Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Justificación.....	8
Objetivos.....	9
Material y Métodos.....	10
Resultados.....	12
Discusión.....	25
Conclusiones.....	28
Bibliografía.....	29

## Resumen

La enfermedad valvular degenerativa del canino es una enfermedad adquirida que se caracteriza por el engrosamiento nodular de las cúspides de las válvulas atrioventriculares cardíacas, sobre todo en sus bordes libres. La válvula afectada con mayor frecuencia es la válvula mitral o bicúspide VM, debido a que está sometida a una mayor presión. La incidencia de este padecimiento aumenta con la edad, talla, raza, sexo. Para este trabajo se utilizaron 41 caninos provenientes del antirrábico de Cuautitlán, México, y sólo se estudió la válvula atrioventricular izquierda (bicúspide o mitral). Se colectaron las muestras suficientes para tener válvulas afectadas con diferentes grados de lesión y correspondientes a animales de diferentes edades y sexo. Inmediatamente después de ser colectadas, las válvulas fueron fotografiadas, sometidas a una revisión meticulosa y se anotaron los hallazgos. Con el fin de realizar la descripción de los cambios microscópicos, de cada válvula, se tomó una porción, la cual fue fijada en Bouin y procesada por los procedimientos histológicos de rutina. De cada muestra se elaboraron cortes semiseriados, que fueron teñidos con H-E, tricrómica de Gomori y azul de Alciano, estas tinciones fueron adecuadas para realizar la descripción de la apariencia microscópica de las válvulas afectadas. Macroscópicamente se encontró la presencia de nódulos, áreas opacas, cúspides retraídas y cuerdas tendinosas que, en una fase inicial, se engrosan y al final se adelgazan. Microscópicamente, en las válvulas afectadas se tuvo dificultad para señalar el límite entre la capa fibrosa y la esponjosa, se encontraron depósitos de proteoglicanos e hiperproliferación de las células intersticiales. Para realizar la clasificación de las válvulas afectadas se utilizaron los criterios propuestos por Kogure (1980) y Aupperle (2009). Se logró determinar que el número de células intersticiales aumenta con el grado de degeneración, así como los depósitos de proteoglicanos en las áreas lesionadas. Sin embargo, no fue posible detectar la presencia de actividad gelatinolítica en las válvulas afectadas.

## **Introducción**

La degeneración valvular en caninos es una enfermedad adquirida que se caracteriza por el engrosamiento nodular de las valvas de las válvulas cardíacas, sobre todo en sus bordes libres. La válvula afectada con mayor frecuencia es la válvula mitral (VM) o bicúspide, debido a que está sometida a una mayor presión.<sup>22</sup>

### **Anatomía de las válvulas atrioventriculares del corazón**

Son cúspides aserradas, irregulares que están localizadas en los orificios atrioventriculares. Evitan el retorno de la sangre a los atrios durante la fase sistólica del latido cardíaco. Periféricamente, están unidas al anillo fibroso que separa la musculatura del atrio de la de los ventrículos. Cuando los ventrículos se contraen, las cuerdas tendinosas evitan que las válvulas atrioventriculares sean empujadas dentro del atrio.<sup>31</sup>

### **Válvula Atrioventricular Izquierda (Bicúspide, Mitral)**

Es básicamente similar a la tricúspide en forma y estructura, pero está hecha sobre una escala más fuerte. Tanto las cuerdas tendinosas como los músculos papilares son varias veces más grandes en el ventrículo izquierdo que en el derecho. Esta construcción más fuerte de la válvula izquierda que la derecha es necesaria ya que la sangre abandona el ventrículo izquierdo a través de la aorta a casi cuatro veces más presión que aquella a la cual abandona al ventrículo derecho vía el tronco pulmonar. La división de la válvula atrioventricular izquierda en cúspides es indistinta. La parte que se origina del anillo fibroso adyacente al tabique interventricular es más ancha que aquella que viene del resto del anillo, así cuando la válvula está abierta y vista desde el lado atrial es tricúspide en apariencia.<sup>31</sup>

### **Apariencia microscópica de las válvulas atrioventriculares del corazón**

Histológicamente cada válvula atrioventricular se compone de las siguientes capas<sup>39</sup>

1. Capa atrial. Capa compuesta principalmente de fibras elásticas y algunas de colágeno y fibroцитos.

2. Capa esponjosa. Se extiende desde el anillo fibroso al borde libre, consiste de fibras colágenas y elásticas de disposición laxa separadas por pequeñas cantidades de proteoglicanos, también se encuentran algunas células estromales de forma alargada o estrellada. Esta capa actúa como un amortiguador ya que reduce las vibraciones asociadas con el cierre de las válvulas, además de que también confiere flexibilidad y plasticidad a las hojas valvulares.<sup>39</sup>

3. Capa fibrosa. Está compuesta predominantemente de fibras de colágeno densamente empaquetadas y algunas fibras elásticas, incluyendo algunas células estromales alargadas.<sup>39</sup>

4. Capa ventricular. Se localiza al lado de la pared ventricular y es una delgada capa rica en colágeno situada entre el endotelio ventricular y la capa fibrosa. En las válvulas atrioventriculares la superficie ventricular se continúa con las cuerdas tendinosas.<sup>16</sup>

Es importante señalar que toda la superficie de las válvulas atrioventriculares está cubierta por endotelio. En el tercio proximal de estas válvulas, la capa esponjosa también puede contener adipocitos y algunos cardiomiocitos interpuestos entre las capas atrial y esponjosa.<sup>2</sup>

Formando la matriz extracelular de las válvulas atrioventriculares se encuentran fibras compuestas de colágena, fibras elásticas y otras moléculas como proteoglicanos y glicoproteínas. Asimismo contiene grupos organizados y dispersos de células, las células intersticiales valvulares.<sup>3</sup>

### **Las Células Intersticiales de las Válvulas Cardíacas**

Las células intersticiales (CI) son una población heterogénea y dinámica de tipos celulares específicos que son fenotípicamente diferentes de los fibroblastos dérmicos y poseen muchas características únicas.<sup>2</sup> Se ha demostrado la presencia de dos poblaciones celulares fenotípicamente distintas por microscopia electrónica e inmunohistoquímica, tanto *in situ* como en cultivo. El primer fenotipo, “los miofibroblastos”, se caracteriza por la presencia de prominentes fibras de tensión asociadas con la expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso.<sup>31</sup> Este fenotipo, de características contráctiles, se piensa que es proliferativo, migratorio y capaz de remodelar la matriz extracelular (MEC) como una respuesta adaptativa a su microambiente, dictado por la misma MEC, fuerzas mecánicas y factores solubles.<sup>1</sup> Los miofibroblastos son células mesenquimales que poseen marcadores fenotípicos de células

musculares y no musculares. Los miofibroblastos se diferencian a partir de fibroblastos en respuesta a una lesión en varios tejidos del organismo, un proceso conocido como activación. Éste puede ser modelado a nivel de cultivo celular por varios agentes como la endotelina-1, por lo que la caracterización de los marcadores fenotípicos moleculares de las CI de las válvulas cardíacas es crucial si queremos entender cómo estas células contribuyen a la función valvular.<sup>3</sup>

El segundo fenotipo se caracteriza por sus prominentes organélos de síntesis y de secreción y está involucrado en la regulación y producción de la MEC. Este fenotipo se asocia con la expresión de prolil-4-hidroxilasa, una enzima esencial para la estabilización de la triple hélice de la colágena, lo cual indica que estas células están sintetizando colágena en forma activa.<sup>19</sup>

La capacidad de las CI para secretar factores de crecimiento o estimular su liberación desde la MEC vía la acción de las metaloproteasas puede jugar un papel vital en la regulación del fenotipo celular dentro de las cúspides. Se ha mostrado que en varias patologías valvulares está incrementada la expresión y la actividad de las enzimas remodeladoras de la MEC y de la secreción de citocinas.<sup>27</sup> Por otra parte, el papel de las CI en la orquestación de las respuestas inflamatorias en las cúspides no ha sido dilucidado. Parece que las CI tienen la capacidad de secretar citocinas pro- y anti-inflamatorias bajo condiciones basales (IL-6, IL-8, IL-12, IL-10 y TNF- $\alpha$ ).<sup>6</sup>

### **Enfermedad valvular degenerativa (EVD) o Endocardiosis**

La válvula mitral (VM) lesionada muestra una apariencia gruesa, densa y distorsionada por la presencia de nódulos, sus cúspides están retraídas bajo el borde libre por lo que comprometen a las cuerdas tendinosas. Estas alteraciones pueden causar regurgitación de sangre del ventrículo izquierdo al atrio izquierdo, por lo que está frecuentemente dilatado.<sup>41</sup>

En esta enfermedad se encuentra una mayor incidencia conforme aumenta la edad (calculada conforme la dentición), y la raza, en relación con animales de talla pequeña. Hay también una ligera predisposición en perros machos de determinadas razas, tales como Poodle, Schnauzer, Chihuahueño, Doberman pinscher, Fox terrier, Boston terrier y Cocker spaniel.<sup>28</sup> La incidencia de la enfermedad aumenta con la edad, desde aproximadamente un 5% en animales menores de 1 año de edad, hasta un 75% en perros de 16 años de edad.<sup>41</sup>

Los animales afectados son principalmente perros de talla pequeña y mayores de 6 ó 7 años.<sup>13</sup>

La VM es la más frecuentemente afectada, en alrededor del 60% de los casos es la única válvula afectada, mientras que la tricúspide se ve afectada en forma exclusiva sólo en un 10% y en el 30% restante están alteradas las dos válvulas.<sup>23</sup> Actualmente no se conoce con precisión la causa específica de la enfermedad valvular degenerativa, aunque parece deberse a una degeneración del tejido conectivo, particularmente el colágeno, determinada genéticamente. Esta consideración se basa en la observación de que las razas afectadas con más frecuencia son del tipo acondroplásico.<sup>23, 28</sup>

También aparecen la intolerancia al ejercicio, el aumento de la frecuencia respiratoria, la dificultad respiratoria y la tos. La insuficiencia de la VM da lugar a un flujo turbulento sistólico. Esta regurgitación de sangre dentro del atrio izquierdo da lugar a un aumento de presión dentro de esta cámara, provocando una mayor presión capilar en los pulmones y, finalmente, edema pulmonar. La muerte súbita es rara, pero puede ocurrir de manera secundaria a la ruptura del atrio izquierdo provocada por una regurgitación mitral severa y crónica. Las cuerdas tendinosas se pueden romper y las valvas de la VM pueden prolapsarse a la cavidad atrial durante la contracción ventricular.<sup>22, 15</sup> Después, con la evolución del proceso hay una falla en la coaptación de las valvas y comienza el reflujo de sangre del ventrículo hacia el atrio izquierdo, que producirá el signo cardinal de esta enfermedad, el soplo.<sup>16</sup>

Es importante señalar que al tratarse de un padecimiento degenerativo muestra un progreso gradual asociado al tiempo, de tal forma que se pueden identificar diferentes grados de degeneración en relación con ciertos signos macroscópicos y microscópicos.<sup>33</sup>

Microscópicamente se puede encontrar una hiperproliferación de las células intersticiales valvulares y la presencia de proteoglicanos en las áreas de lesión.

Encontramos separación de los componentes de la capa fibrosa con hiperproliferación celular. El endotelio está engrosado por la proliferación de tejido conectivo colágeno laxo y el depósito de proteoglicanos, formados por ácido hialurónico y condroitín sulfato.<sup>34, 20, 37</sup>

Las válvulas cardíacas experimentan diversas condiciones hemodinámicas durante el transcurso de la vida de un individuo y se considera que las CI son vitales para mantener el funcionamiento adecuado de las válvulas.<sup>43, 42</sup>

La enfermedad valvular degenerativa, es la anomalía cardíaca más común en perros y corresponde a una valvulopatía que se caracteriza por una degeneración mixomatosa que afecta a las porciones subendocárdicas de las cúspides de las válvulas atrioventriculares.<sup>14</sup>

### **Clasificación de la EVD en base a lesiones macroscópicas**

Esta enfermedad se caracteriza por un engrosamiento difuso o nodular de las cúspides cardíacas.<sup>15, 38</sup>

La EVD en canino tiene características en común con el prolapso mitral del humano,<sup>13</sup> dentro de las cuales se incluyen modificaciones funcionales y morfológicas de las células del estroma y un arreglo alterado de los componentes de la matriz extracelular.<sup>1, 25</sup> Sin embargo, en contraste al prolapso mitral humano, los defectos endoteliales en las válvulas caninas afectadas son cubiertos por trombocitos,<sup>14</sup> pero no hay una formación extensa de trombos o inflamación.<sup>16</sup>

- **Clasificación grado medio (Aupperle 2009)**

Es importante señalar que las lesiones agrupadas en este grupo están asociadas con evidencia clínica de insuficiencia cardíaca, y son de dos subtipos:

**Subtipo I.** Comprende unas pocas áreas, pequeñas y discretas de opacidad o nódulos en el sitio de aposición valvular.

**Subtipo II.** Se caracterizan por la presencia de un mayor número de nódulos y, adicionalmente, son más grandes y pueden coalescer. En la clasificación grado medio de esta enfermedad no están afectadas las cuerdas tendinosas.

- **Clasificación grado moderado**

La EVD grado moderado es caracterizada por la presencia de grandes nódulos o deformidades en forma de placas resultado de una mayor coalescencia de las lesiones. En la EVD grado moderado las cuerdas tendinosas están engrosadas.

- **Clasificación grado marcado**

La EVD grado marcado se caracteriza por cúspides contraídas y distorsionadas en las cuales los bordes libres pueden estar enrollados. En la EVD grado marcado las cuerdas tendinosas están engrosadas proximalmente, alargadas y, en ocasiones, rotas.

### **Clasificación con base a lesiones histopatológicas**

Las lesiones de la VM fueron graduadas en base a una modificación del esquema propuesto por Kogure (1980). En este sistema, las lesiones de la clasificación **grado medio** están caracterizadas por proliferación del endotelio y del tejido fibroelástico subyacente a la capa atrial, separación de las fibras elásticas y el engrosamiento nodular principalmente debido al depósito de proteoglicanos. En esta clasificación los haces de colágeno de la capa fibrosa están intactos.

Las lesiones de la EVD **grado moderado** se caracterizan por un ligero incremento en la presencia de proteoglicanos dentro de la mitad distal de la capa esponjosa y una degeneración media de los haces de colágeno en la fibrosa. La mitad proximal de la cúspide permanece histológicamente normal.

Las lesiones de la EVD **grado marcado** se caracterizan por una mayor presencia de proteoglicanos, interrupción de los haces de colágeno en la mitad distal de la cúspide, desplazamiento completo de la fibrosa normal por proteoglicanos y proliferación fibroelástica en la atrial y la fibrosa.<sup>27</sup>

## **Justificación**

La etiología de esta enfermedad no se encuentra clara y existen varias teorías al respecto. Algunos autores sugieren la participación de un factor poligenético hereditario, en el sentido que es más frecuente en ciertas razas. Otros sugieren una anomalía bioquímica en la composición del colágeno ya que se desarrolla con más frecuencia en razas acondroplásicas. También se sospecha de un defecto de la MEC debido al desequilibrio de las metaloproteasas y sus inhibidores.<sup>32</sup> Actualmente, los mecanismos precisos que subyacen a la patogénesis molecular de la enfermedad valvular degenerativa son desconocidos<sup>26</sup> por lo que es necesario realizar estudios que aporten datos adicionales con el fin de tener una mejor comprensión de esta patología.

## **Objetivos**

### **Objetivo General:**

Describir las características macroscópicas y microscópicas de la válvula mitral con el fin de relacionar el grado de degeneración valvular de acuerdo a las lesiones encontradas.

### **Objetivos particulares:**

- a) Describir los hallazgos macroscópicos y microscópicos de las válvulas afectadas.
- b) Determinar el grado de degeneración de las válvulas afectadas tomando en consideración sus características macroscópicas y microscópicas.
- c) Determinar si el número de células intersticiales aumenta con el grado de lesión.
- d) Detectar la presencia de actividad gelatinolítica en las válvulas afectadas.

## **Materiales y Métodos**

### **a. Animales y obtención de muestras.**

Para la realización de este trabajo se utilizaron 41 cadáveres caninos provenientes del antirrábico de Cuautitlán, México. Se realizó el registro del sexo y edad de cada uno de los animales y se obtuvieron fotografías de las válvulas exploradas. En todos los animales se obtuvo la válvula bicúspide, la cual fue dividida en dos partes; una de ellas se utilizó para el procesamiento histológico y la otra fue mantenida en congelación hasta su utilización en la detección de metaloproteasas por medio de zimografía (ver más adelante).

### **b. Procesamiento histológico de las válvulas.**

Las válvulas obtenidas fueron fijadas en una solución de Bouin durante 24 horas y posteriormente las muestras fueron mantenidas en alcohol al 70%.

1. Las muestras se lavaron con agua corriente por 10 min.
2. Las muestras se deshidrataron con inmersiones crecientes de alcohol etílico (70%, 80%, 90%, 96%, y 100)%, con dos cambios en cada uno de los alcoholes. Las muestras se dejaron 15 min. en cada graduación; en cada cambio el alcohol se calentó en un horno de microondas (45° a 55° durante 2 min. y medio) y, posteriormente, 12 min. y medio, a temperatura ambiente.
3. Las muestras se sumergieron en monómero de estireno (Poliformas MR) por 2 horas a temperatura ambiente hasta que las muestras se volvieran transparentes.
4. Las muestras se infiltraron en parafina a 60° C durante 2 horas, 2 cambios.
5. Las muestras se incluyeron en parafina a 60°C, mediante uso de rejillas de aluminio que sirvieron como molde para formar los cubos de parafina.
6. A partir de los bloques obtenidos después de la infiltración y la inclusión de las muestras se obtuvieron cortes de 8 µm de espesor con un micrótopo. Se realizaron cortes semiseriados de cada cubo de muestra.
7. Los cortes se montaron en portaobjetos con ayuda del baño de flotación para tejidos, el cual contenía grenetina para pegarse con el fin de facilitar el pegado de corte al portaobjetos. También se contó con una platina térmica, en la cual se realizó el secado.
8. Para la coloración de los preparados permanentes se emplearon diferentes técnicas.

### **c. Tinciones.**

Se emplearon los métodos y técnicas de la tinción hematoxilina- eosina (HE), Tricrómica de Gomori (TG) y Azul de Alciano (AA).

### **d. Determinación de la actividad proteolítica de las metaloproteasas.**

La actividad gelatinolítica de las metaloproteasas se determinó por zimografía mediante un gel de acrilamida con gelatina, para esto se realizaron los siguientes pasos:

1. Obtención de proteínas. Se pesaron de 60-70 mg de cada una de las muestras en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 400  $\mu$ l de buffer de lisis (tris -HCl 125  $\mu$ M pH 7.4, glicerol 10%, SDS 10%, 2-Mercaptoetanol 5%) e inhibidor de proteasas (Complete, Roche) a una proporción de 1:30, se aplicaron de 5-7 pulsos de 30 seg. con el sonicador con el fin de lisar el tejido de la muestra. Posteriormente, se agregaron otros 400  $\mu$ l de buffer de lisis, se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

2. Cuantificación de proteínas. Las proteínas de cada muestra fueron cuantificadas por el método de microBradford y se estandarizó su contenido a la concentración de 60 mg por 100  $\mu$ l.

3. Preparación del gel de acrilamida. Se preparó el gel de acrilamida al 15% con 1.5 ml de gelatina al 1%, se cargaron las muestras en los pozos correspondientes y se realizó la electroforesis a 90 v por 30 min y, posteriormente, a 120 v por 3 horas.

4. Zimografía. El gel de poli(acrilamida) fue lavado en triton-X-100 durante 20 min a temperatura ambiente (TA) en un agitador orbital y, con el fin de activar a las proteasas, se incubó en el amortiguador correspondiente (Tris 250 mM pH 7.6, ClCa 50 mM) durante 12 horas a 37°C. Finalmente, fue teñido con azul de Coomassie durante 40 min a TA y desteñido con una solución de ácido acético y metanol (solución desteñidora) durante 12 horas a TA. La actividad gelatinolítica se manifiesta por la presencia de bandas claras sobre el fondo azul del gel.<sup>19</sup>

## Resultados

### 1. Animales de estudio y características generales

Para desarrollar este trabajo se utilizaron 41 animales que provenían del antirrábico de Cuautitlán, México, se buscó obtener la cantidad suficiente de muestras con el fin de tener válvulas afectadas con diferentes grados de lesión y sólo se realizó la extracción de la válvula atrioventricular izquierda (bicúspide, mitral). Asimismo se buscó obtener muestras de diferentes edades y sexo (Tabla 1). Así, nuestro grupo experimental quedó conformado por animales que comprenden desde 1 a los 11 años de edad, de los cuales 11 fueron hembras y 30 machos.

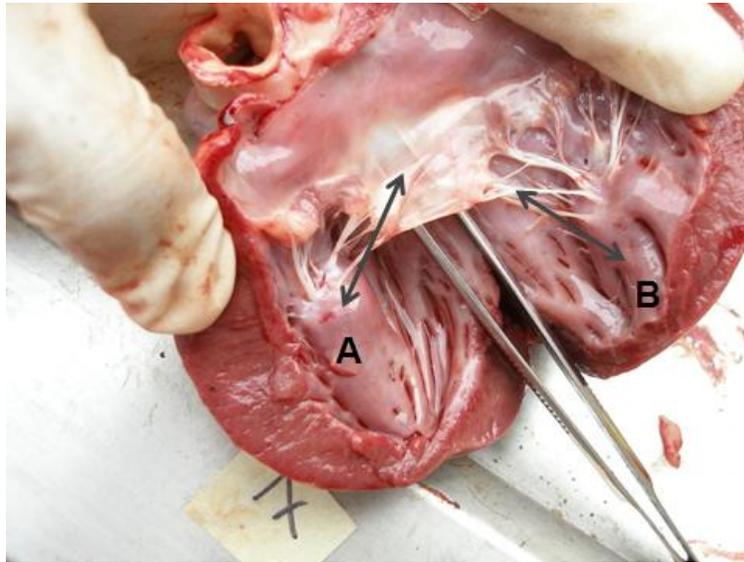
**Tabla 1. Número de animales estudiados (ordenados por edad y sexo).**

<b>Edad</b>	<b>No. de muestras</b>	<b>Machos</b>	<b>Hembras</b>
<b>1 año</b>	1	0	1
<b>2 años</b>	2	2	0
<b>3 años</b>	14	11	3
<b>4 años</b>	8	5	3
<b>5 años</b>	2	0	2
<b>6 años</b>	4	3	1
<b>7 años</b>	3	3	0
<b>8 años</b>	3	2	1
<b>9 años</b>	1	1	0
<b>10 años</b>	1	1	0
<b>11 años</b>	2	2	0
<b>Total</b>	41	30	11

## **2. Apariencia macroscópica de una válvula bicúspide sana.**

En todas las muestras utilizadas sólo se encontró una válvula sana y proviene de una hembra de 1 año de edad.

En una válvula mitral sana las cúspides tienen una apariencia delgada, casi transparente y las cuerdas tendinosas son finas y regulares (Fig. 1).



**Figura 1. Apariencia macroscópica de una válvula bicúspide sana. A. Cúspide y B. Cuerdas tendinosas.**

## **3.- Apariencia macroscópica de las válvulas bicúspides afectadas.**

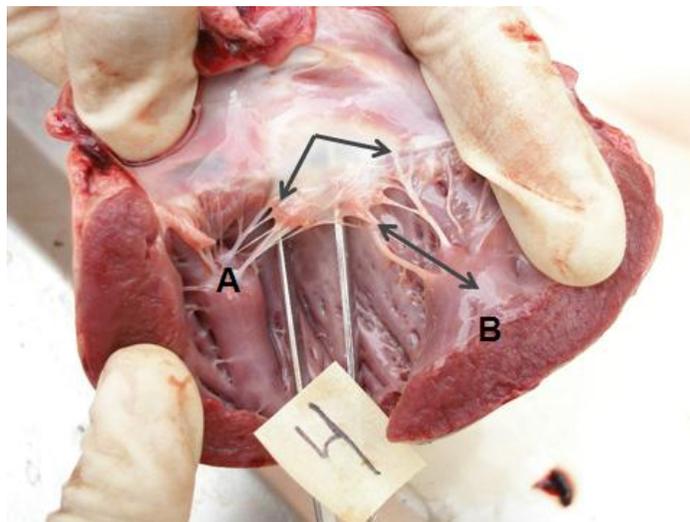
Con el fin de señalar las principales características relacionadas con las lesiones degenerativas se realizó la descripción de la apariencia macroscópica de las válvulas afectadas. Inmediatamente después de la extracción del corazón se revisó minuciosamente la válvula bicúspide (VB) en cada uno de los cadáveres estudiados. Se encontraron diversos cambios degenerativos como son; engrosamiento de las cúspides, nódulos, opacidad, cuerdas tendinosas adelgazadas y/o retracción de las mismas.

### **Válvula bicúspide con lesiones degenerativas grado medio.**

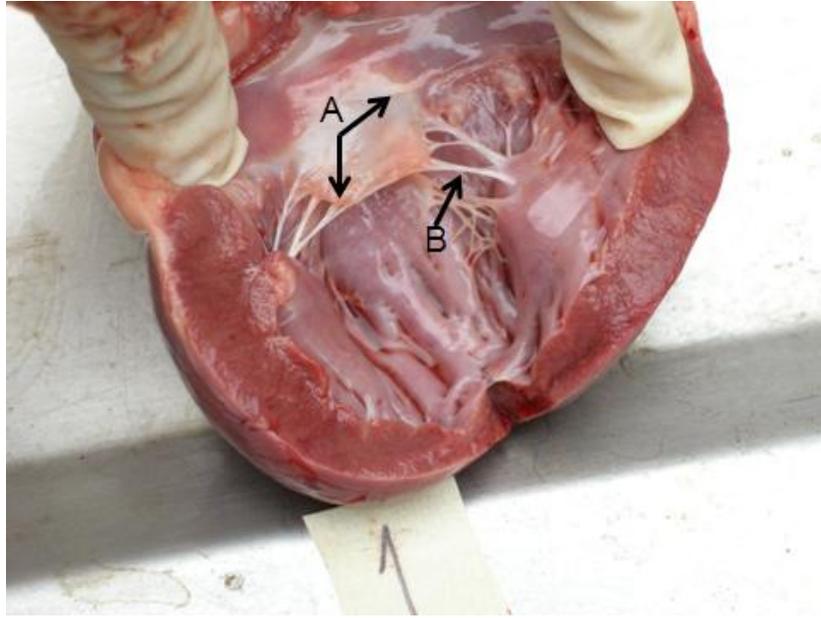
De todas las muestras sólo se encontró una válvula que correspondió por sus lesiones al grado medio y proviene de una hembra de 3 años de edad.

Las VB con lesiones que las ubican en el grado medio de la enfermedad valvular degenerativa (EVD) subtipo I, se caracterizan por tener una apariencia opaca, estar engrosada de tal forma que toma una coloración blanquecina, la superficie es lisa, dura, hay presencia de pequeños nódulos sin afectación de las cuerdas tendinosas (Fig. 2).

Las VB con lesiones de subtipo II, presentan zonas más amplias con opacidad y blanquecinas, nódulos más grandes debido a una coalición de un número mayor de lesiones, sin embargo las cuerdas tendinosas siguen sin estar afectadas (Fig. 3)



**Figura 2. Apariencia macroscópica de una válvula bicúspide afectada con lesiones grado medio subtipo I. A. Cúspide engrosada, dura y de coloración blanquecina y B. Cuerdas tendinosas sin afección.**

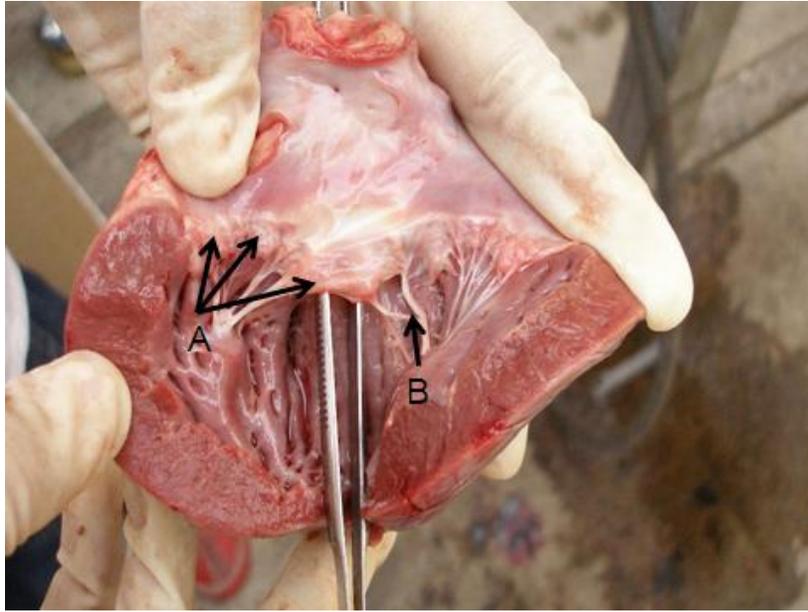


**Figura 3. Apariencia macroscópica de una válvula bicúspide afectada con lesiones grado medio Subtipo II. A. Cúspide opaca y nodulaciones grandes. B. Cuerdas tendinosas sin lesiones.**

#### **Válvula bicúspide con lesiones degenerativas grado moderado.**

De las muestras obtenidas se encontraron 16 válvulas con lesiones de grado moderado, dichas válvulas correspondían a 13 machos con edades de 2 a 11 años y a 3 hembras de entre 3 y 6 años de edad.

Las válvulas con este grado de degeneración se caracterizan por presentar cúspides engrosadas con deformidades, de color blanco, aparecen un mayor número de nodulaciones, además de que son más grandes. Por su parte, las cuerdas tendinosas tienen una apariencia más fibrosa, así; son de color blanco y gruesas.

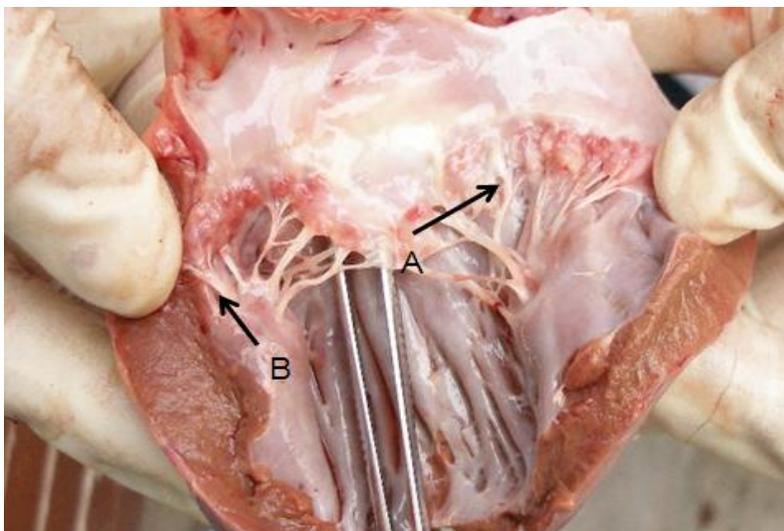


**Figura 4. Apariencia macroscópica de una válvula bicúspide con lesiones grado moderado. A.** Cúspides con presencia de nodulaciones. **B.** Cuerdas tendinosas engrosadas, con apariencia fibrosa.

#### **Válvulas con lesiones degenerativas grado marcado.**

Con grado marcado se encontraron 23 válvulas que provienen de 17 machos con edades de 3 a 11 años y a 6 hembras de entre 3 y 8 años de edad.

Las válvulas con EVD grado marcado presentan cúspides retraídas y distorsionadas, sus bordes libres están engrosados. Las cuerdas tendinosas aparecen engrosadas en la parte proximal, holgadas y muy delgadas en la parte distal.



**Figura 5. Apariencia macroscópica de una válvula bicúspide con lesiones grado marcado. A.** Cúspide engrosada y con grandes nodulaciones que coalescen y la distorsionan. **B.** Cuerdas tendinosas engrosadas en la parte proximal.

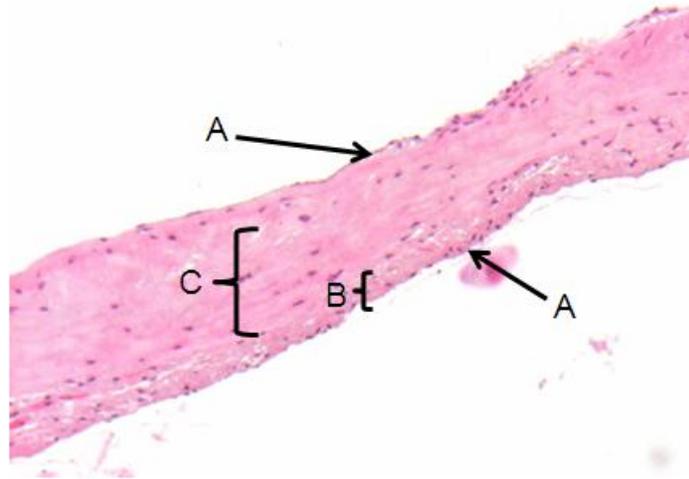
#### **4. Apariencia microscópica de las válvulas afectadas por la EVD.**

Con el fin de realizar la descripción de los hallazgos microscópicos de las válvulas afectadas por la EVD, se tomó una muestra de cada válvula, se fijó en Bouin y se sometió a los procedimientos histológicos de rutina. De cada muestra se elaboraron cortes seriados que fueron teñidos con H-E, TG y AA, se revisaron al microscopio óptico y se realizó la descripción de la apariencia microscópica de las válvulas afectadas.

#### **Válvula Bicúspide sana.**

De todas las muestras sólo se encontraron 2 válvulas sanas que provienen de una hembra de 1 y 3 años de edad.

En la válvula bicúspide sana el endotelio que, es un epitelio simple escamoso, recubre toda la superficie de la válvula, está bien definido y continuo (Fig. 6 A). La capa fibrosa compuesta por tejido colágeno compacto irregular está bien definida y se delimita de manera evidente (Fig. 6 C). La capa esponjosa está compuesta por fibras de colágeno laxo separadas por la presencia de proteoglicanos y también se aprecia bien definida (Fig. 6 B). El subendotelio contiene tejido conectivo colágeno compacto con varias capas de fibras elásticas.<sup>19</sup>

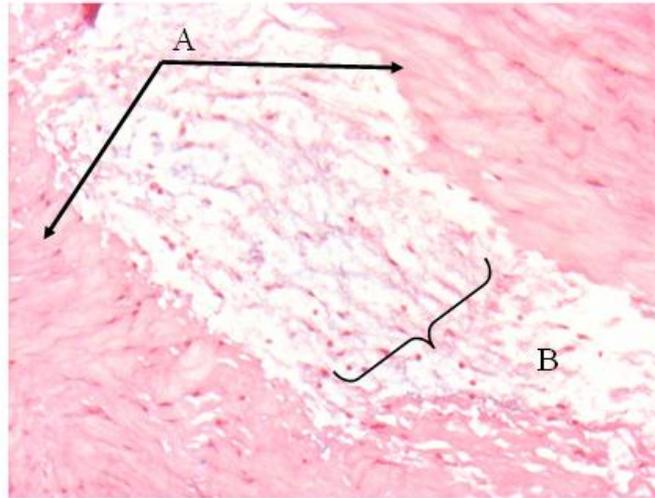


**Figura 6. Características estructurales de una válvula mitral sana. A. Endotelio. B. Capa esponjosa. C. Capa fibrosa. (Microscopio óptico, 100×, HE).**

#### **Válvulas con lesiones microscópicas grado medio.**

De todas las muestras sólo se encontró una válvula que correspondió por sus lesiones al grado medio y proviene de un macho de 9 años de edad.

No se pueden distinguir la capa fibrosa de la esponjosa (Fig. 7 A), dentro de la capa fibrosa hay una zona de tejido laxo que muestra parecido con la capa esponjosa, también se observa proliferación celular en la parte media de la capa fibrosa (Fig. 7 B).

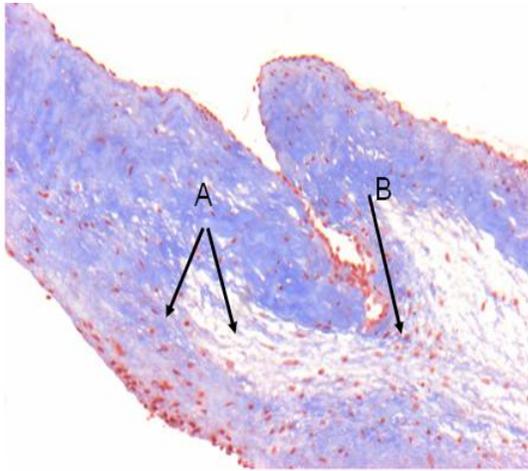


**Figura 7. Válvula bicúspide con lesiones de grado medio. A.** Las capas fibrosa y esponjosa parecen estar mezcladas. **B.** Presencia de proliferación celular en la zona esponjosa. (Microscopio óptico, 400×, Azul Alciano).

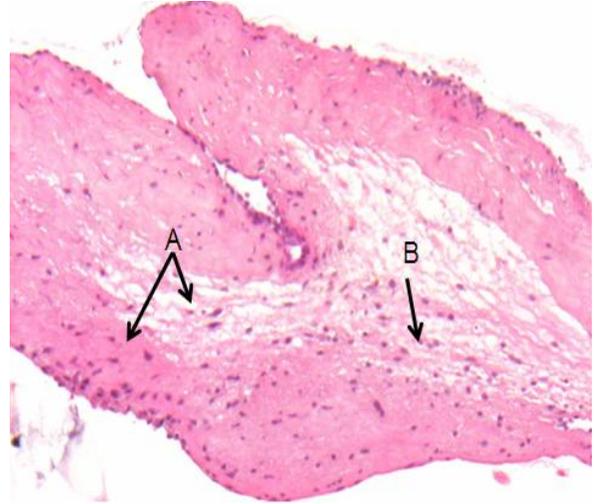
#### **Válvulas con lesiones microscópicas grado moderado.**

De las muestras obtenidas se encontraron 14 válvulas con lesiones de grado moderado, dichas válvulas correspondían a 10 machos con edades de 3 a 11 años y 3 hembras de entre 3 y 6 años de edad.

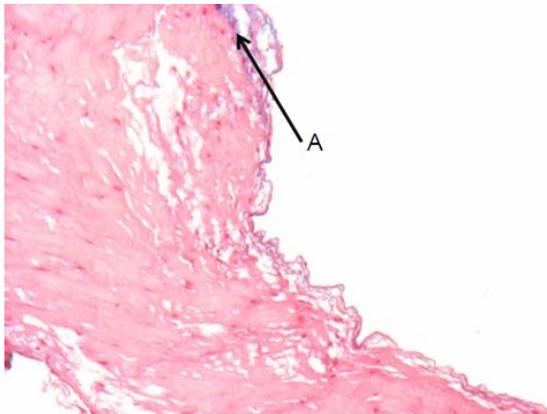
No es posible distinguir los límites entre la capa fibrosa y la esponjosa. Adicionalmente, dentro de la capa fibrosa hay una zona intermedia de tejido conectivo laxo que da un cierto parecido con la capa esponjosa, también se aprecia una mayor proliferación celular y el depósito de proteoglicano.



**Figura 8**



**Figura 9**



**Figura 10**

**Figura 8. Válvula bicúspide con lesiones degenerativas grado moderado. A.** No hay diferenciación entre las capas fibrosa y esponjosa. **B.** Presencia de una mayor cantidad de células. (Microscopio óptico, Tricrómica de Gomori, 100×).

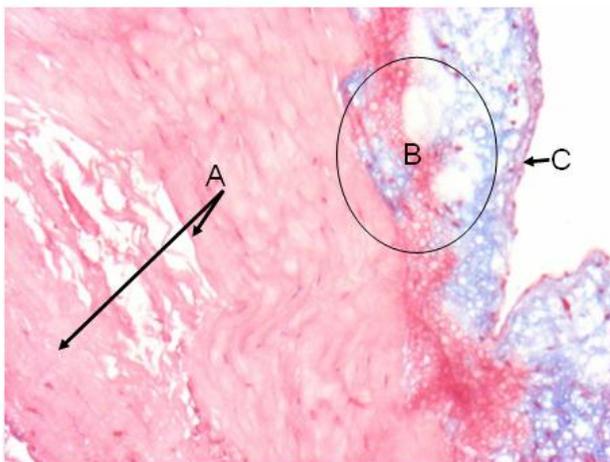
**Figura 9. Válvula bicúspide con lesiones degenerativas grado moderado. A.** No hay diferencia entre capa fibrosa y esponjosa **B.** presencia de una mayor cantidad de células. . (Microscopio óptico, H-E, 100×).

**Figura 10. Válvula bicúspide con lesiones degenerativas grado moderado. A.** Presencia de proteoglicanos. (Microscopio óptico, Azul Alciano, 100×).

### **Válvulas con lesiones microscópicas grado marcado.**

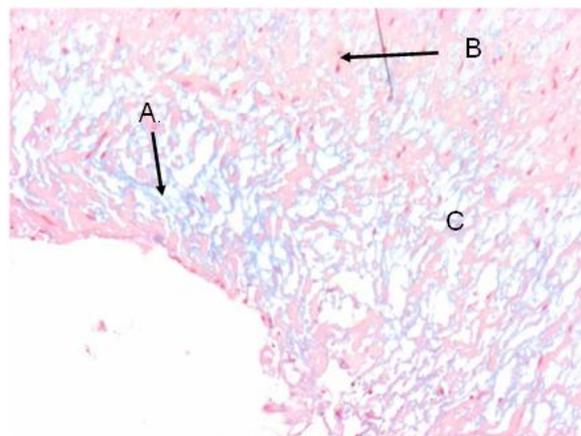
Con grado marcado se encontraron 24 válvulas que provienen de 19 machos con edades de 2 a 11 años y a 5 hembras de entre 4 y 8 años de edad.

No se distingue el límite entre la capa fibrosa y la esponjosa, y pareciera que la imagen corresponde sólo a la capa fibrosa. Se observa una hiperproliferación de las células intersticiales y la presencia de proteoglicanos por debajo del endotelio. Es importante señalar que el área de la fotografía corresponde a las partes engrosadas apreciadas macroscópicamente en las válvulas.



**Figura 11**

**Figura 11. Válvula bicúspide con lesiones degenerativas grado marcado. A.** Toda la válvula pareciera estar formada sólo por la capa fibrosa. **B.** Presencia de proteoglicanos por debajo del endotelio. **C.** Endotelio. (Microscopio óptico, Azul Alciano, 400×).



**Figura 12**

**Figura 12. Válvula bicúspide con lesiones degenerativas grado marcado. A.** Presencia de proteoglicanos. **B.** Hiperproliferación celular. **C.** No hay límite entre capa fibrosa y esponjosa. (Microscopio óptico, Azul Alciano, 100×).

### **3. Valoración de la proliferación celular**

Durante la evaluación microscópica fue evidente la presencia de una mayor cantidad de células intersticiales valvulares conforme aumentaba el grado de degeneración. Con el fin de correlacionar el grado de afectación con la proliferación celular observada se agrupó a

las válvulas afectadas de acuerdo con el grado de degeneración y se contaron las células intersticiales presentes en 10 campos observados con el objetivo 40× siguiendo un patrón de zig-zag y, finalmente, se obtuvo el número promedio de células observadas por campo. Los valores promedio de proliferación celular encontrados se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Número promedio de células presentes por campo (objetivo 40×).**

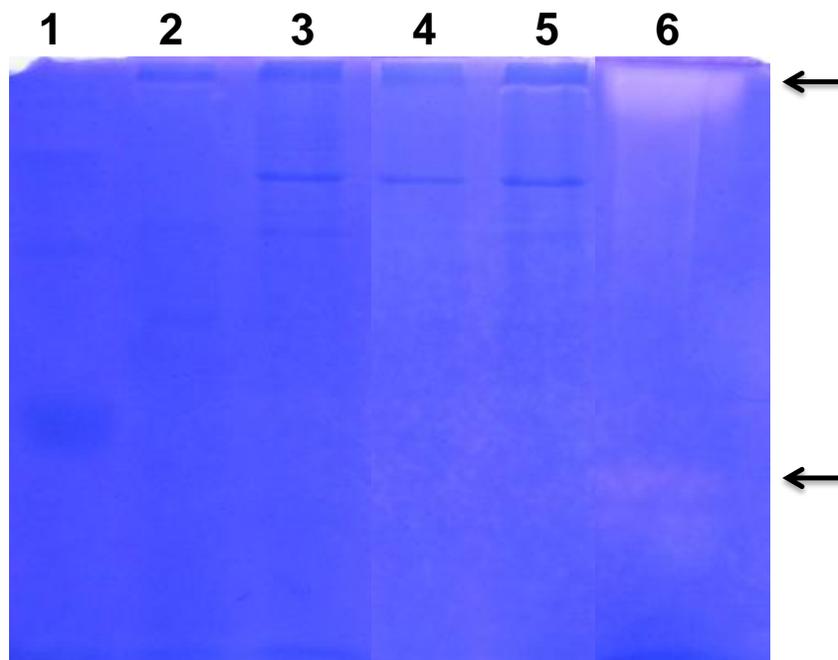
<b>Grado de lesión</b>	<b>Muestras</b>	<b>Promedio</b>	<b>Porcentaje relativo de proliferación</b>
<b>Sana</b>	2	116.3	100.0 %
<b>Media</b>	1	120.4	103.5 %
<b>Moderada</b>	15	157.9	135.7 %
<b>Marcada</b>	21	176.4	151.7 %

**Tabla 3. Características generales de los animales estudiados y las lesiones microscópicas encontradas en las válvulas mitrales afectadas.**

<b>Muestra</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Microscópico Kogure</b>	<b>Macroscópico Auperle</b>
259	Hembra	1	Sana	Sana
260 <sup>a</sup>	Macho	2	Marcado	Moderado
260b	Macho	2	Marcado	Moderado
261 <sup>a</sup>	Hembra	3	Sana	Medio
261b	Hembra	3	Moderado	Marcado
261c	Hembra	3	Moderado	Moderado
262	Macho	3	Marcado	Marcado
263	Macho	3	Moderado	Moderado
264	Macho	3	Marcado	Moderado
265	Macho	3	Marcado	Marcado
266	Macho	3	Marcado	Marcado
267	Macho	3	Marcado	Marcado
268	Macho	3	Marcado	Marcado
269	Macho	3	Marcado	Moderado
270	Macho	3	Moderado	Moderado
271	Macho	3	Marcado	Marcado
272	Macho	3	Moderado	Marcado
273	Macho	4	Marcado	Marcado
274	Macho	4	Moderado	Moderado
275	Macho	4	Marcado	Marcado
276	Macho	4	Marcado	Marcado
277	Macho	4	Marcado	Marcado
278	Hembra	4	Marcado	Marcado
279	Hembra	4	Marcado	Marcado
280	Hembra	4	Moderado	Moderado
281	Hembra	5	Marcado	Marcado
282	Hembra	5	Marcado	Marcado
283	Hembra	6	Moderado	Moderado
284	Macho	6	Marcado	Marcado
285	Macho	6	Moderado	Moderado
286	Macho	6	Marcado	Marcado
287	Macho	7	Moderado	Moderado
288	Macho	7	Moderado	Moderado
289	Macho	7	Moderado	Marcado
290	Hembra	8	Marcado	Marcado
291	Macho	8	Marcado	Marcado
292	Macho	8	Marcado	Marcado
293	Macho	9	Medio	Moderado
294	Macho	10	Moderado	Moderado
295	Macho	11	Moderada	Moderado
296	Macho	11	Marcada	Marcado

#### 4. Actividad proteolítica de las metaloproteasas en las válvulas afectadas.

Con el fin de determinar la presencia de metaloproteasas en las válvulas afectadas se realizó una zimografía, para lo cual se usaron muestras de válvulas sanas y con diferentes grados de degeneración (media, moderada y marcada). Como control positivo se utilizó una muestra de adenoma mamario. No fue posible detectar la presencia de actividad proteolítica en ninguna de las válvulas procesadas y sólo se detectó en la muestra de adenoma mamario, dicha actividad, resulta evidente por la presencia de dos bandas blancas bien definidas sobre el fondo del gel teñido con azul de Coomasie (Fig. 13).



**Figura 13. Zimografía en la que se manifiesta la presencia de actividad gelatinolítica.**  
1. Albúmina sérica de bovino. 2. Válvula sana. 3. Válvula afectada grado medio. 4. Válvula afectada grado moderado. 5. Válvula afectada grado marcado. 6. Adenoma mamario. Las flechas señalan los sitios en donde se hizo evidente la presencia de actividad gelatinolítica.

## Discusión

Para definir los criterios aplicados para seleccionar a los sujetos utilizados en este trabajo se tomaron en cuenta las características particulares de la enfermedad valvular degenerativa, esto es; las lesiones son progresivas y hay una mayor incidencia conforme aumenta la edad, asimismo los perros machos y de talla pequeña presentan una mayor predisposición.<sup>28</sup> Así tenemos que la incidencia de la enfermedad aumenta, desde un 5% en animales de menos de 1 año de edad, hasta un 75% en perros de 16 años de edad.<sup>41</sup> Con el fin de contar con válvulas afectadas con diferentes grados de degeneración se muestrearon animales de ambos sexos y se abarcó un amplio rango de edad. Los hallazgos realizados permitieron corroborar las características señaladas previamente.<sup>41, 36, 20, 13</sup>

Para este estudio se utilizaron tres diferentes tinciones, a saber; Hematoxilina-Eosina (H-E), Azul de alciano y tricrómica de Gomori. La tinción H-E fue utilizada porque es una tinción bicrómica cuyos componentes tiñen de manera diferencial al núcleo y al citoplasma, con la ayuda de esta tinción fue posible identificar los diferentes componentes histológicos de las válvulas. La tinción tricrómica de Gomori proporciona coloración nuclear por la hematoxilina directa progresiva. Así tenemos que las fibras musculares se tiñen de rojo, las fibras de colágena de verde y los núcleos de azul a negro. Con la tinción Azul de Alciano, los mucopolisacáridos como el ácido hialurónico y las sialomucinas se colorean de color azul turquesa, los núcleos de color rosa y el citoplasma de color rosa pálido. Con ella pudimos identificar fehacientemente los depósitos de proteoglicanos dentro de las válvulas, a diferencia de otras tinciones como PAS (Ácido peryódico de Schiff) y Rojo Congo con las cuales no fue posible evidenciar estos hallazgos. De manera independiente, cada tinción permitió apreciar alguna de las lesiones y en conjunto ofrecieron un panorama completo con el cual se pudieron evaluar las lesiones microscópicas con lo que fue posible determinar el grado de degeneración valvular.

En cuanto a las características que se deben tomar en cuenta para determinar el nivel de degeneración de las válvulas, existen diferentes propuestas de clasificación, tanto a nivel macroscópico, como microscópico. La clasificación macroscópica propuesta por Aupperle en 2009, considera el tamaño y la cantidad de nódulos, áreas opacas, coalescencia de las lesiones, cúspides retraídas, etc., y delimita con claridad los diferentes grados de

degeneración.<sup>30</sup> Por el contrario, la propuesta de Olsen (2003), sólo se basa en el engrosamiento de las cúspides (medido en mm).<sup>33</sup> Otra situación que complica la aplicación de esta clasificación es que dentro de una misma válvula suelen existir áreas que muestran un cierto engrosamiento y otras que no lo presentan en la misma magnitud o que no lo presentan y esto representa una mayor dificultad para determinar con certeza el grado de degeneración de cada válvula.

En este trabajo, se utilizó la clasificación de Aupperle (2009) para determinar el grado de degeneración en base a lesiones macroscópicas debido a que se apega más a las lesiones encontradas y coincide con los hallazgos realizados.

De la misma manera, debido a las múltiples alteraciones que se presentan a nivel microscópico, fue necesario elegir la clasificación más adecuada. Aunque la mayoría de las clasificaciones consideran las mismas lesiones, algunas son más específicas que otras, en este caso Olsen (2003) y Kogure (1980), toman en cuenta para su clasificación los mismos elementos. Sin embargo, Olsen (2003) para su clasificación los toma por separado lo cual dificulta su comprensión y, por ende, la determinación correcta del grado de lesión. La clasificación de Kogure (1980), nos pareció más adecuada debido a que integra todos los hallazgos; tanto las lesiones proliferativas como el depósito de proteoglicanos<sup>27, 24</sup> lo cual facilitó la determinación del grado de degeneración.

Aunque los criterios de clasificación que utilizamos en este estudio fueron de autores diferentes, su utilización fue adecuada. De tal manera que se puede apreciar una coincidencia entre los grado de clasificación macro- y microscópica para cada una de las válvulas estudiadas (Tabla 1).<sup>2, 24</sup>

La determinación del grado de degeneración para las válvulas estudiadas se hizo de acuerdo con las características morfológicas y estructurales encontradas, sin embargo, no siempre coincidieron entre sí debido a la subjetividad que prevalece según el criterio utilizado al mirar las lesiones, ya que en ninguna de las clasificaciones se utilizan métodos cuantitativos. Para poder reducir estas discordancias es necesario proponer mejores criterios de clasificación.

Las células intersticiales parecen desempeñar un papel importante en el origen y desarrollo de la EVD, ya que están involucradas en la producción y regulación de la cantidad de matriz extracelular (MEC) por su capacidad para secretar factores de crecimiento o

estimular su liberación desde la misma MEC. La activación de las CI se produce en respuesta a una lesión (patología valvular) y su papel en la EVD parece ser de particular importancia, ya que en las revisiones microscópicas se encontró un aumento en el número de estas células (hiperproliferación) y dicho aumento fue progresivo coincidiendo con el grado de degeneración. Es probable que el factor que desencadena la EVD, también estimule la activación de las CI, provocando así la degeneración en las zonas en que estas células se modifican de manera inapropiada. El cambio constante y progresivo de estas células significa que el factor que desencadena esta patología se mantiene afectando el medio interno de manera constante.<sup>1, 25, 30, 3</sup>

La acción de las metaloproteasas parece desempeñar un papel vital en la regulación del fenotipo celular dentro de las cúspides.<sup>27, 40, 21, 10</sup> Se ha mostrado que en diversas patologías valvulares está incrementada la expresión y la actividad de las metaloproteasas de la matriz extracelular<sup>1</sup> ya que son capaces de remodelar la matriz extracelular como una respuesta adaptativa. La zimografía es un ensayo mediante el cual se determina la presencia de actividad gelatinolítica en los tejidos por lo que permite determinar la presencia de metaloproteasas. Esto es muy importante ya que de acuerdo con diferentes autores, el origen de la EVD es debido a la actividad gelatinolítica de las metaloproteasas liberadas por las CI. Así, muchos autores consideran a las metaloproteasas y sus inhibidores como las moléculas centrales de esta patología.<sup>5, 7, 8, 4</sup>

En este trabajo no fuimos capaces de detectar la presencia de actividad gelatinolítica en las válvulas afectadas por la EVD, mientras que en los controles positivos (tumores mamarios de ratón y perro)<sup>26, 33</sup> si se detectó dicha actividad por lo que será necesario realizar estudios adicionales que permitan aclarar este hallazgo. Asimismo se recomienda la aplicación de nuevas metodologías como la Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR), que es una prueba más sensible.<sup>26</sup>

## Conclusiones

- A la revisión macroscópica se encontró la presencia de nódulos en el borde libre de las cúspides, áreas opacas, cúspides retraídas y cambios en el grosor de las cuerdas tendinosas.
- Al microscopio se encontró que las capas fibrosa y esponjosa estaban desorganizadas por lo que fue difícil determinar sus límites, hubo depósitos de proteoglicanos e hiperproliferación de las células intersticiales.
- Para realizar la clasificación de las válvulas afectadas se utilizaron los criterios propuestos por Kogure (1980) y Aupperle (2009).
- Se determinó que el número de células intersticiales de la válvula mitral aumentó con el grado de degeneración valvular.
- No se pudo detectar actividad gelatinolítica en las válvulas estudiadas, será necesario realizar pruebas más específicas para su detección y cuantificación.

## Bibliografia

1. Arora PD, McCulloch CA. Dependence of collagen remodeling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts. 1994 *J Cell Physiol* 159:161-175.
2. Auperle y col. 2009. Distribution of extracellular matrix components in normal and degenerated canine tricuspid valve leaflets. *J Comparative Pathology* 141: 41-51.
3. Brand NJ, Roy A, Hoare G, Chester A, Yacoub MH. Cultured interstitial cells from human heart valves express both specific skeletal muscle and non-muscle markers. 2006 *Int J Biochem Cell Biol* 38:30-42
4. Bryan D. Crawford, David B. Pilgrim. Ontogeny and regulation of matrix metalloproteinase activity in the zebrafish embryo by in vitro and in vivo zymography. 2005
5. Cesare Achilli , Annarita Ciana , Cesare Balduini , Angela Risso , Giampaolo Minetti . Application of gelatin zymography for evaluating low levels of contaminating neutrophils in red blood cell samples 2010.
6. Chester AH, Taylor PM. Molecular and functional characteristics of Heart-valve interstitial cells. 2007 *Phil Trans R Soc Brit* 362:1437-1443.
7. Choon-Mee Kim, Sang-Mee Kang, Ho-Jong Jeon, Sung-Heui Shin. Production of *Vibrio vulnificus* metalloprotease VvpE begins during the early 2007.
8. Dan Hu, Xuan Tan, Toshinori Sato, Sadako Yamagata, Tatsuya Yamagata. Apparent suppression of MMP-9 activity by GD1a as determined by gelatin zymography 2006.
9. Devereux RB, Brown WT, Kramer-Fox R, Sachs I. Inheritance of mitral valve prolapse: effect of age and sex on gene expression. 1982 *Annals of Internal Medicine* 97: 826-832.
10. Fondard O. Extracellular matrix remodeling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. 2005 *Eur Heart J* 26:1333-1341.
11. Gagna C, Meier D, Ru G, Pospischil A, Guarda F. Pathology of mitral valve in regularly slaughtered pigs: an abattoir survey on the occurrence of myxoid degeneration (endocardiosis), fibrosis and valvulitis. 1998 *J Vet Med Series A* 45: 383-395.
12. Guilherme L. Rheumatic heart disease: proinflammatory cytokines play a role in the progression and maintenance of valvular lesions. 2004 *Am J Pathol* 165:1583-1591.

13. Häggström J. Chronic valvular disease in Cavalier King Charles Spaniels epidemiology, inheritance and pathophysiology (Thesis) Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 1996.
14. Häggström J, Pedersen HD, Kvarn C. New insights into degenerative mitral valve disease in dogs. *Veterinary Clinics Small Animal* 2004; 34:1209-1226.
15. Häggström J, Duelund H, Kvarn C. New insights into degenerative mitral valve disease in dogs. *Veterinary Clinics Small Animal Practice* (2004) 34: 1209-1226.
16. Hayek E, Gring CN, Griffin BP. Mitral valve prolapse. 2005 *Lancet* 365:507-518.  
House AK, Catchpole B, Gregory SP. Matrix metalloproteinase mRNA expression in canine anal furunculosis lesions. 2007 *Vet Immunology & Immunopathology* 115: 68-75.
17. Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I, Inoue S, Billingham R, Wu W, Chrysovergis K, Yamada S, Birkedal-Hansen H, Poole A. The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *J Cell Sci* (2005) 118: 147-156.
18. House A, Catchpole B, Gregory S. Matrix metalloproteinase mRNA expression in canine anal furunculosis lesions. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2007) 115: 68-75.
19. Janin A, Kontinen YT, Gronblad M, Karhunen P, Gosset D, Malmstrom M. Fibroblast markers in labial salivary gland biopsies in progressive systemic sclerosis. 1990 *Clin Exp Rheumatol* 8:237-242.
20. Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. Patología de los animales domésticos. 3ª ed. Uruguay: Hemisferio Sur, 1991:17-20.
21. Kaden JJ. Expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in calcific aortic stenosis. 2004 *Z kardiol* 93:124-130.
22. Kahn CM, Line S. Manual Merck de Veterinaria. Edit. Oceano/Centrum, Barcelona, 2007, Cap. 1. Cardiopulmonar: 87-89.
23. Kittleson M. Myxomatous atriocentric valvular degeneration. In: Kittleson M, Kienle R, editors. *Small animal cardiovascular medicine*. St. Louis: Mosby, 1998:297-318.
24. Kogure K (1980) Pathology of chronic mitral valvular disease in the dog. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 42,323,325.

25. Komuro T. Re-evaluation of fibroblasts and fibroblast-like cells. 1990 *Anat Embryol* 182:103-112.
26. Kugler A, Hemmerlein B, Thelen P, Kallerhoff M, Radzun H, Ringert R. Expression of metalloproteinase 2 and 9 and their inhibitors in renal cell carcinoma. *Journal of Urology* (1998) 160: 1914-1917.
27. Kupai K, G Szucs, S Cseh, I Hajdu, C Csonka, T Csont, P Ferdinandy. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. 2010
28. Kwart C, Häggström J. Acquired valvular heart disease. In: Ettinger S, Feldman E, editors. *Textbook of veterinary internal medicine. Diseases of dogs and cats. 5th edition.* Philadelphia:WB Saunders, 2000:787-800..
29. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (2004) 49: 187-198.
30. Mayer GD, Leinwand LA. Sarcomeric gene expression and contractility in myofibroblasts. 1997 *J Cell Biol* 139:1477-1484.
31. Miller's Anatomy of the dog, 3rd Edition, Evans HE. 1993, WB Saunders, Philadelphia, pp. 586-601.
32. Mucha J. Degeneración valvular mixomatosa. *Redvet* (2007) 8: 3-4  
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070707.html>  
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>
33. Olsen LH, Mortensen K, Martinussen T, Larsson LI, Baanndrup U, Pedersen HD. Increased NADPH-Diaphorase activity in canine myxomatous mitral valve leaflets. *Journal of Comparative Pathology* (2003) 129: 120-130.
34. Pomerance A. Pathogenesis of "senile" nodular sclerosis of atrio-ventricular valves. 1966 *British Heart Journal* 28: 815-823.
35. Patel B, Shah P, Rawal U, Desai A, Shah S, Rawal R, Patel P. Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma. *Journal Surgical Oncol* (2005) 90: 81-88.
36. Patrick TL, Owens MJ. *Manual de Cardiología de los pequeños animales. 1ª edición.* España:Salvat, 1987:109-113.
37. Pedersen HD, Häggström J. Mitral valve prolapse in the dog: a model of mitral valve prolapse in man. 2000 *Card Res* 47: 234-243.

38. Puente X, Sánchez L, Overall C, López-Otin C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* (2003) 4: 544-558.
39. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histología texto y atlas color con biología celular y molecular*. 2005, 4ª. ed, Médica Panamericana, Argentina.
40. Segura AM, Luna RE, Horiba K, Stetler-Stevenson WG, McAllister HA, Willerson JT, Ferrans VJ. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases and their inhibitors in thoracic aortic aneurysms and aortic valves of patients with Marfan's syndrome. 1998 *Circulation* 98:II331-II337.
41. Swenson L., Häggström J., Kwart C., Juneja R.K. Relationship between parental cardiac status in Cavalier King Charles spaniel and prevalence and severity of chronic valvular disease in offspring. 1996 *J Am Vet Med Ass* 208: 2009-2012.
42. Taylor PM, Allen SP, Yacoub MH. Phenotypic and functional characterization of interstitial cells from human heart valves, pericardium and skin. 2000 *J Heart Valve Dis* 9: 150-158.
43. Taylor PM, Batten P, Brand NJ, Thomas PS, Yacoub MH. The cardiac valve interstitial cell. 2003 *Int J Biochem Cell Biol* 35: 113-118.
44. Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie* (2005) 87: 287-297.