La vía de señalización Rho A/ Rho Kinasa se encuentra activada en el miocardio en ratas con fibrosis cardíaca inducida por isoprotenerol

Mónica Vargas*, Paulina Rivera, María Paz Ocaranza, Jorge Jalil

Pontificia Universidad Católica de Chile, Departamento de Enfermedades Cardiovasculares, Laboratorio de Cardiología Molecular.

* Alumna de cuarto año de la carrera de Medicina.

Resumen

En pacientes con insuficiencia cardíaca la actividad adrenérgica está aumentada, lo que induce en el largo plazo, a cardiotoxicidad y mayor deterioro de la función ventricular. La administración experimental de Isoprotenerol, un agonista β -adrenérgico, produce hipertrofia ventricular, daño y fibrosis miocárdica. La vía de señalización intracelular RhoA/Rho-Kinasa (ROCK) participa en el remodelamiento cardiovascular, no estando clara la relación entre la activación de esta vía y el desarrollo de fibrosis miocárdica.

Objetivo: Determinar si existe activación de la vía ROCK en ratas con fibrosis miocárdica inducida experimentalmente por Isoprotenerol, mediante cuantificación de la fosforilación de la proteína blanco 1 de la fosfatasa de la miosina (MYPT1).

Métodos: Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos (100 ± 10 gr.); 10 como grupo control con administración de suero fisiológico y 10 en el grupo experimental con inyección subcutánea de Isoprotenerol Hemisulfato, 5 mg/kilo de peso por día, por un período de 10 días. Se determinó la presión arterial sistólica (PAS), la masa relativa ventricular izquierda (MRVI), la activación de ROCK a través de niveles de MYPT1 por Western Blot y se cuantificó la fibrosis en Ventriculo Izquierdo por análisis morfométrico del colágeno (en tinciones con Rojo de Picrosirio).

Resultados (promedio $\pm$ ES, $*=p<0,05$): Los resultados en Presión Arterial Sistólica fueron $119,6 \pm 8,1$ mmHg en el grupo control y $113,8 \pm 5,2$ mmHg en el grupo tratado con Isoprotenerol, la MRVI fue de $358,3 \pm 10,9$ mg/g en las controles y $495,3 \pm 42,02^*$ mg/g en ratas Iso. La fracción volumétrica de colágeno (FVC) en miocardio y subendocardio fue $3 \pm 0,3$ y $3,3 \pm 0,4$ en ratas control; en ratas Iso fue $5,2 \pm 0,7$ y $7,4 \pm 1,3^*$ respectivamente. Las FVC totales fueron $3,2 \pm 0,4$ para controles y $6,3 \pm 1,6^*$ para ratas Iso. La activación de la vía ROCK, medida como la relación MYPT1 fosforilada/total, en ratas control fue $2,5 \pm 0,8$ y en ratas tratadas con Isoprotenerol fue $4,7 \pm 2,2^*$.

Conclusión: La vía de señalización ROCK se encuentra activada en forma importante en el miocardio en ratas con hipertrofia y fibrosis cardíaca inducida por isoprotenerol. El rol causal de esta vía sobre los mecanismos de daño cardíaco evaluados, así como el efecto preventivo que pudieran tener los antagonistas de ROCK sobre la fibrosis y el daño cardíaco en este modelo experimental, deberían ser estudiados.

RHO A/ RHO kinase pathway is activated in the myocardium of rats with isoprotenerol - induced fibrosis

Background: Patients with heart failure have increased adrenergic activity, which in turn induces cardiotoxicity, and further damage to the myocardium. Isoprotenerol induces ventricular hypertrophy with myocardial fibrosis. RHO A/ RHO Kinase pathway (ROCK) participates in myocardial remodeling, but it is not

Correspondencia: Dr. Jorge Jalil
PUC, Depto de Enfermedades Cardiovasculares,
Lira 85 Piso 2, Santiago
Fax: 6338574
Correo Electrónico: jjalil@med.puc.cl

known whether ROCK is involved in the fibrotic process.

Aim: To ascertain whether ROCK is activated in rats with Isoproterenol -induced myocardial fibrosis, measuring ROCK by phosphorylation of the myosin phosphatase (MYPT1).

Methods: We used male Sprague-Dawley rats (100 ± 10 g); 10 rats were used as controls and received sq saline; 10 rats in the experimental group received sq Isoproterenol (ISO rats) 5 mg/kg body weight/day, during 10 days. We measured systolic blood pressure (SBP), left ventricular mass (LVM) and ROCK, which was measured by phosphorylation of the MYPT1 protein using Western Blot. Myocardial fibrosis was measured by morphometry of collagen in Picrosirius red stained samples, and was expressed as collagen volume fraction (CVF). Results were expressed as average $\pm$ SEM; $^*p < 0,05$.

Results: SBP was $119,6 \pm 8,1$ mmHg in controls and $113,8 \pm 5,2$ mmHg in ISO rats; LVM was $358,3 \pm 10,9$ mg/g in controls and $495,3 \pm 42,02^*$ mg/g in ISO rats. CVF in the myocardium and subendocardium were $3 \pm 0,3$ and $3,3 \pm 0,4$ in control rats; values in ISO rats were $2 \pm 0,7$ y $7,4 \pm 1,3^*$ respectively. Total CVF were $3,2 \pm 0,4$ in controls and $6,3 \pm 1,6^*$ in ISO rats. ROCK, expressed as phosphorylated MYPT1 /total MYPT1 in control rats was $2,5 \pm 0,8$ and $4,7 \pm 2,2^*$ in ISO rats.

Conclusion: ROCK pathway is significantly activated in the myocardium of ISO rats. ROCK antagonists for preventing myocardial fibrosis should be evaluated in this experimental model.

Key Words: Rho Kinase, Myocardium, Fibrosis, Isoproterenol.

Recibido el 26 de diciembre de 2008. Aceptado el 12 de enero de 2009

Rev Chil Cardiol 2009; 28: 81-89

Introducción

La alta prevalencia de hipertensión arterial (HTA) en todos los países, es un problema clínico-epidemiológico importante, debido al alto riesgo cardiovascular que implica. Uno de los principales factores involucrados en el aumento del riesgo cardiovascular, es el remodelado cardíaco patológico y el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda (HVI), que es la adaptación inicial a una sobrecarga mecánica del corazón con crecimiento de los cardiomiocitos^{1,2}. En la hipertrofia ventricular patológica, se observan, además, cambios en la matriz extracelular del miocardio, con fibrosis miocárdica significativa que inicialmente aumentará la rigidez miocárdica y posteriormente puede asociarse a disminución de la función sistólica^{3,4,5}.

Por otro lado, la activación del Sistema Renina Angiotensina (SRA) y del sistema adrenérgico -que puede ocurrir en la HTA y que habitualmente se presenta en la insuficiencia cardíaca- inducen HVI y fibrosis miocárdica in vivo e in vitro⁶⁻⁹. La administración experimental de Isoproterenol (ISO), un agonista β -adrenérgico, lleva a HVI, necrosis y apoptosis cardíaca, proliferación de fibroblastos, fibrosis

miocárdica y desarrollo posterior de falla cardíaca¹⁰⁻¹³; y por esto es un modelo experimental muy utilizado de HVI y de fibrosis miocárdica.

La vía de señalización intracelular RhoA/Rho-kinasa (ROCK) es un mecanismo novedoso, con participación significativa en el remodelado cardiovascular y renal patológico, descubierto en la última década. Esta vía es activada por agonistas de receptores acoplados a la proteína G de membrana, como angiotensina II (Ang II), endotelina o noradrenalina y produce contracción de las células musculares lisas e HTA, activando fosfolipasa C, aumentando la proteinkinasa C y fosforilando la cadena reguladora de miosina II¹⁴⁻¹⁶ Caló 2007. La vía ROCK aumenta la sensibilidad al calcio en la contracción de la célula muscular lisa vascular y modula la fosforilación de la cadena liviana de la miosina al inhibir la fosfatasa de la miosina. La activación de ROCK produce, además, una cadena de eventos celulares como deregulación de la óxido nítrico sintasa, activación de NADPH oxidasa con aumento del estrés oxidativo, lo que lleva a aumento de TGF β , PKC y de MAPK-ERK^{1/2} y activación de NF κ B con aumento de la expresión de PAI-1¹⁴ Caló.

Estos mecanismos promueven remodelado cardiovascular patológico, además de otros procesos

patológicos (aterogénesis, resistencia a insulina y vasoconstricción).

Al activarse ROCK, una de las proteínas que se fosforila es la fosfatasa de la proteína target 1 (MYPT1) de la cadena liviana de la miosina (con lo que se produce vasoconstricción)¹⁴⁻²⁰. Por esta razón la fosforilación de MYPT1 se utiliza como un marcador de la activación de ROCK.

Poco se conoce sobre la relación entre hipertrofia, fibrosis miocárdica y activación de ROCK, y no existe información sobre esta relación en el modelo de HVI y fibrosis miocárdica experimental inducidas por ISO. La **hipótesis** del trabajo fue que la HVI y fibrosis miocárdica experimental inducidas por ISO se asocian a activación miocárdica de ROCK.

Métodos

Diseño del estudio: Se utilizó un modelo experimental de fibrosis miocárdica inducida por Isoprotenerol (ISO) en ratas. Se usaron ratas Sprague-Dawley macho (peso 100 ±10 gr.) obtenidas del Vivero Institucional, en 2 grupos experimentales (grupo ISO y grupo control, 10 ratas por grupo). Los animales se mantuvieron en jaulas individuales en un cuarto controlado con ciclos de 12 h de luz y oscuridad, y con alimento standard para ratas y agua ad-libitum.

Inducción de fibrosis e hipertrofia miocárdica: Las ratas recibieron una inyección subcutánea de Isoprotenerol Hemisulfato, 5 mg/kilo de peso por día, por un período de 10 días, en el mismo horario. El grupo control de ratas recibió inyecciones con suero salino (suero fisiológico al 0,9%). Las ratas se pesaron antes de cada inyección, para el cálculo de la dosis y se fueron sacrificadas al día 11²¹.

Obtención de muestras de ventrículo izquierdo: Una vez sacrificada la rata, se extrajo el corazón, se separaron los ventrículos, se lavaron extensamente con solución salina para remover toda la sangre contaminada y se pesaron. Los ventrículos izquierdos se cortaron en 3 secciones transversales, tomando el anillo central para fijación en formalina, fijación en parafina, tinción con Rojo de Picrosirio y posterior análisis morfométrico. El ápex se conservó para Western

Blot en nitrógeno líquido y se almacenó a -80° hasta su procesamiento y análisis.

Cuantificación de hipertrofia cardíaca: Se determinó el grado de hipertrofia cardíaca en cada animal midiendo masa relativa de ventrículo izquierdo (MRVI = peso VI (mg) *100/ peso corporal (gr))²².

Análisis morfométrico de colágeno miocárdico^{21,22}: Las muestras en parafina (5 µm de espesor) se tiñeron con Rojo de Picrosirio para su evaluación Histológica. Se capturaron en forma sistemática imágenes representativas de dichas muestras con una cámara digital, en la zona miocárdica y subendocárdica, teniendo un total de 40 fotos por VI. Luego se analizaron las fotos con un programa ad hoc previamente validado sobre una plataforma Matlab^{21,22}, con el que se cuantificó el porcentaje de colágeno miocárdico (fracción volumétrica de colágeno, FVC) para las zonas subendocárdica y miocárdica media en cada muestra, lo que se promedió para cada animal con lo que se obtuvo la FVC total del miocardio.

Actividad miocárdica de ROCK evaluando el grado de fosforilación de la Fosfatasa de la Proteína Target 1 (MYPT1)^{17-19, 23}: La vía ROCK modula la fosforilación de MYPT1, por lo que MYPT1 fosforilado es utilizado como marcador de activación de ROCK. Los niveles de MYPT1 (fosforilado, F y total, T) en VI, se midieron por Western Blot. Se homogenizaron los VI en 500 µl de tampón de lisis por muestra y se centrifugaron a 10.000 RPM por 30 min. a 4°C. El contenido de proteínas se midió por el método de Bradford, se tomaron 100 µl del extracto proteico y se separaron por electroforesis en geles SDS-PAGE al 6% a 80V. Dichas proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 300 mA durante 1,5 h.

MYPT1-F: La membrana se incubó en solución PBS 1x-Tween 20 al 0,05% (PBST) en leche descremada (LD) al 7% por 2 h con agitación constante a temperatura ambiente. Después de 3 lavados de 10 min. con PBST, se incubó la membrana con el anticuerpo anti-MYPT1 fosforilado (Thr 696) en una dilución

de 1/2000 en PBST con LD al 5%, durante toda la noche a 4°C, en agitación continua. Se continuó con 3 lavados de 10 min. con PBST, y luego se incubó con el anticuerpo anti-IgG de conejo unido a peroxidasa en una dilución 1/10.000 en PBST con LD al 5%, por 2 h. en agitación. Después de 3 lavados, se incubó con sustrato de quimioluminiscencia²³.

MYPT1-T: Se incubó la membrana por 30 minutos a 50 °C en solución de lavado. Luego se lavó 3 veces (10 min. con PBST 0,05%), y se bloqueó con 7 % LD en PBST por 30 minutos a 37 °C. La incubación del anticuerpo anti-MYPT1 total se realizó a una dilución 1/1000 en solución con 5% de LD en PBST, durante toda la noche a 4°C, en agitación continua. Se continuó con 3 lavados y luego se incubó con anticuerpo anti-IgG de ratón unido a peroxidasa en una dilución 1/10.000 en PBST por 2 h. a temperatura ambiente con agitación continua. Después de 3 lavados (10 min.), la membrana se incubó con el sustrato de quimioluminiscencia²³.

La intensidad de cada banda se analizó por densitometría mediante un scanner Hewlett-Packard y el software Un-Scan-It para análisis densitométrico²³.

Análisis Estadístico: Los datos se analizaron con el programa estadístico SPSS 10.0 y fueron expresados como promedio $\pm$ SEM y se compararon ambos grupos con prueba de t-de Student.

Resultados

1. Presión Arterial sistólica (PAS) y masa cardíaca.

La PAS inicial (97 ± 12 vs 92 ± 10 mm Hg) y final (120 ± 8 vs 114 ± 5 mm Hg) fue similar en ambos grupos (Control e ISO respectivamente).

El peso cardíaco total fue significativamente mayor en el grupo ISO con respecto al grupo control (870 ± 70 vs 640 ± 40 mg, $p < 0.05$, respectivamente). Análogamente, la masa relativa del ventrículo izquierdo (MRVI) fue significativamente mayor en el grupo ISO con respecto del grupo control (495 ± 42 v/s 358 ± 11 mg VI /100 gr peso, $p < 0.05$, respectivamente).

2. Análisis morfométrico del colágeno miocárdico.

La cantidad de colágeno miocárdico se expresa como Fracción Volumétrica de Colágeno (FVC) miocárdico. En el grupo control la FVC fue $3 \pm 0.3\%$ en el miocardio medio, $3.3 \pm 0.4\%$ en el subendocardio y $3.2 \pm 0.4\%$ como promedio miocárdico total (miocardio + subendocardio).

En el grupo ISO se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) de la FVC tanto en el subendocardio (120 %) como en el miocardio medio (74%), respecto del grupo control. Por lo anterior, la FVC miocárdica total (subendocárdico y endocárdico) fue 2 veces mayor en el grupo ISO con respecto de los animales no tratados ($p < 0.05$) (Figuras 1 a 4).

Figura 1. Microfotografías representativas del subendocardio de una rata Control (A) y otra tratada con Isoproterenol (B) con tinción Picrosirio Rojo al microscopio de luz (Aumento 200x).

Figura 2. Fracción volumétrica de colágeno en el subendocardio (FVC, %) en ambos grupos experimentales.

Figura 3. Fracción volumétrica de colágeno en el miocardio medio (FVC, %) en ambos grupos experimentales.

Figura 4. Fracción volumétrica de colágeno miocárdico total (FVC, %) en ambos grupos experimentales.

3. Medición de MYPT1 por Western Blot como expresión de la actividad de Rho Kinasa. Se cuantificaron los niveles de MYPT1 miocárdica total (MYPT1-T) y fosforilada (MYPT1-P). En el grupo Control los niveles de MYPT1-T en el miocardio fueron 4.652 ± 1.132 (unidades de densidad óptica,

UDO), similares al grupo ISO.

Los niveles de MYPT1-F fueron 1.235 ± 411 UDO en el grupo control y aumentaron significativamente un 64% al administrar ISO, por lo cual la relación MYPT1-P/MYPT1-T aumentó significativamente con la administración de ISO en 88% ($p < 0.05$) (Figuras 5 a 7).

Figura 5. Westernblots representativos de MYPT1 fosforilada (MYPT1 - F) y total (MYPT1-T) en VI.

Figura 6. MYPT1 en ventrículo izquierdo fosforilada (MYPT1- F) y total (MYPT1-T) en unidades de densidad óptica (UDO)

Figura 7. Actividad miocárdica de Rho kinasa, medida como relación entre MYPT1 fosforilada/ total (MYPT1 F/T)

Discusión

El principal hallazgo del estudio fue que el desarrollo de fibrosis e hipertrofia cardíaca experimental inducida por Isoproterenol está asociado a un aumento significativo de la actividad cardíaca de Rho Kinasa, cuantificada como niveles de fosforilación de la proteína MYPT1, hallazgo no observado previamente.

Con los resultados observados, se puede afirmar que en las ratas tratadas con Isoproterenol se desarrolló hipertrofia ventricular y fibrosis miocárdica, debidas a mecanismos cardíacos de compensación y reparación, que llevan a incremento del volumen de los cardiomiocitos (Hipertrofia), sumado a aumento de la síntesis de ADN y ARN, con mayor expresión de genes como TGF- β , FGF, IGF, entre otros^{24,25}.

Además se ha descrito que existen receptores β -adrenérgico en los fibroblastos cardíacos²⁶, que al ser estimulados inducen a proliferación celular con liberación de proteínas de matriz extracelular (PME) y metaloproteinasas (MMPs), aumenta el colágeno fibrilar en la matriz extracelular, y se produce fibrosis miocárdica^{10,27}.

La cuantificación de colágeno miocárdico en este modelo como porcentaje de colágeno, en relación a la masa ventricular (fracción volumétrica de colágeno) indica que la magnitud de la fibrosis en este modelo experimental es importante. La mayor cantidad de colágeno observada en la zona subendocárdica, respecto de la zona propiamente tal miocárdica, se debe principalmente a que el Isoproterenol provoca microinfartos a nivel subendocárdico, lo que lleva a la formación de mayor cantidad de tejido fibrótico en esa zona²⁸, además de ser la zona más alejada de las ramas de las arterias coronarias, lo que la hace más susceptible a isquemia, necrosis y fibrosis¹⁰⁻¹³.

Los niveles elevados de MYPT1-F en el miocardio en las ratas tratadas con ISO, indican que existe activación de la vía ROCK en este modelo experimental de fibrosis miocárdica.

El presente hallazgo nos permite plantear a Rho Kinasa como un posible blanco terapéutico en condiciones asociadas a fibrosis y/o HVI -en este caso, inducidas por ISO- usando inhibidores específicos de su actividad. En este sentido, hemos observado

que en ratas con niveles genéticamente elevados de enzima convertidora de angiotensina y también de angiotensina II, la administración del inhibidor específico de Rho Kinasa, Fasudil, redujo los niveles de stress oxidativo y de expresión de genes de remodelado vascular patológico en la pared aórtica de estos animales²³.

Nuestros hallazgos son semejantes a lo observado en otros modelos experimentales de fibrosis, daño e HVI con inhibidores de ROCK. En ratones deficientes en apolipoproteína E tratados crónicamente con Ang II, la inhibición de ROCK con Fasudil disminuyó la hipertrofia cardíaca inducida por Ang II²⁹, previno la fibrosis perivascular, redujo el aumento de ANP y la expresión de colágeno III, y mejoró la función cardíaca sin modificar la PA. En ratones con infarto miocárdico experimental, la inhibición crónica de ROCK con Fasudil, previno el remodelado cardíaco³⁰, específicamente, la mayor expresión de citokinas inflamatorias (TGF- β_2 y TGF- β_3 y el factor inhibidor de la migración de macrófagos) en la zona no infartada del VI fue suprimida en el grupo tratado con Fasudil³⁰. La actividad de ROCK aumentó significativamente en la zona no infartada y fue suprimida por Fasudil lo que indica que ROCK participa en forma importante en la patogenia del remodelado post IAM que produce upregulación de citokinas proinflamatorias y la importancia terapéutica de su inhibición en la prevención de IC post IAM y eventualmente en otros tipos de IC. En un modelo experimental de daño y fibrosis miocárdica inducidos por vasopresina en ratas, la inhibición de ROCK con Fasudil redujo significativamente la depresión del segmento ST y la fibrosis miocárdica inducida por vasopresina³¹. En un modelo de hipertrofia cardiovascular e HTA inducidas por Ang II en ratas, Fasudil previno este proceso. Ang II indujo acumulación perivascular de macrófagos y activación de ROCK, lo que disminuyó significativamente con Fasudil. La expresión vascular de NADPH oxidasa y la producción endotelial de aniones superóxido aumentó marcadamente con Ang II y se inhibió con Fasudil. Esto plantea que ROCK participa en forma importante en la hipertrofia cardiovascular inducida por Ang II en ratas³².

Futuros estudios deberían aclarar los mecanismos asociados a la activación miocárdica de ROCK en este modelo experimental, si ésta es primaria o secundaria y el perfil temporal de activación. También deberá ser evaluado en este modelo el posible efecto preventivo de los inhibidores de ROCK sobre a fibrosis miocárdica y la HVI.

Si esto último se de-muestra, podría pensarse en la utilización a futuro en la inhibición de esta vía de señalización en conjunto con antihipertensivos, vasodilatadores y fármacos antihipertróficos de uso actual (como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas de angiotensina II u otros) para potenciar sus respectivos efectos, sobre todo en términos terapéuticos respecto

de fibrosis miocárdica, de HVI y de remodelado cardíaco patológico.

En conclusión, la vía de señalización ROCK se encuentra activada en forma importante en el miocardio en ratas con hipertrofia y fibrosis cardíaca inducida por isoprotenerol. El rol causal de esta vía sobre los mecanismos de daño cardíaco evaluados, como el efecto preventivo que pudieran tener los antagonistas de ROCK sobre la fibrosis y el daño cardíaco, deberían ser más profundamente evaluados en este modelo experimental.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por Fondecyt 1085208.

Referencias

1. KANNEL WB, CASTELLI WP, MCNAMARA PM, MCKEE PA, FEINLEIB M. Role of blood pressure in the development of congestive heart failure. *N Engl J Med* 1972; 287: 781-7.
2. MCKEE PA, CASTELLI WP, MCNAMARA PM, KANNEL WB. The natural history of congestive heart failure. The Framingham study. *N Engl J Med* 1971; 285: 1441-6.
3. WEBER KT. Cardiac interstitium: extracellular space of the myocardium. In: Fozard HA, ed. *The Heart and Cardiovascular System*, 2nd ed. New York: Raven Press, 1992; 1465-80.
4. WEBER KT, ANVERSA P, ARMSTRONG PW, BRILLA CG, BURNETT JC JR, CRUICKSHANK JM, et al. Remodeling and reparation of the cardiovascular system. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20: 3-16.
5. WEBER KT, BRILLA CG, JANICKI JS. Myocardial remodeling and pathologic hypertrophy. *Hosp Pract* 1991; 26: 73-80.
6. BAKER KM, ACETO JF. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am J Physiol* 1990; 259: H610-8.
7. CHIEN KR, KNOWLTON KU, ZHU H, CHIEN S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J* 1991; 5: 3037-46.
8. HASKING GJ, ESLER MD, JENNINGS GL, DEWAR E, LAMBERT G. Norepinephrine spillover to plasma in patients with chronic congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation* 1986; 73: 615-21.
9. SWEDBERG K, VIQUERAT C, ROULEAU JL, ROIZEN M, ATHERTON B, PARMLEY WW, et al. Comparison of myocardial catecholamine balance in chronic congestive heart failure and in angina pectoris without heart failure. *Am J Cardiol* 1984; 54: 783-6.
10. BENJAMIN IJ, JALIL JE, TAN LB, CHO K, WEBER KT, CLARK WA. Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circ Res* 1989; 65: 657-70.
11. GRIMM D, ELSNER D, SCHUNKERT H, PFEIFER M, GRIESE D, BRUCKSCHLEGEL G, et al. Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res* 1998; 37: 91-100.
12. RONA G. Catecholamine cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17: 291-303.
13. SHIZUKUDA Y, BUTTRICK PM, GEENEN DL, BORCZUK AC, KITSIS RN, SONNENBLICK EH. Beta-adrenergic stimulation causes cardiocyte apoptosis: influence of tachycardia and hypertrophy. *Am J Physiol* 1998; 275: H961-8.
14. CALÒ LA, PESSINA AC. RhoA/Rho-kinase pathway: much more than just a modulation of vascular tone. Evidence from studies in humans. *J Hypertens* 2007; 25: 259-64.
15. SHIMOKAWA H, TAKESHITA A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 1767-1775.
16. JALIL JE, LAVANDERO S, CHIONG M, OCARANZA MP. Rho/Rho kinase signal transduction pathway in cardiovascular disease and cardiovascular remodeling. *Rev Esp Cardiol.* 2005; 58: 951-961.
17. SEKO T, ITO M, KUREISHI Y, OKAMOTO R, MORIKI N, ONISHI K, et al. Activation of Rho A and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Circ Res.* 2003; 92: 411- 418.

18. JIN L, YING Z, WEBB RC. Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287: 1495-1500.
19. LEE DL, CLINTON WEBB R, JIN L. Hypertension and RhoA/Rho kinase signaling in the vasculature. *Hypertension*. 2004; 44: 796 -799.
20. FENG J, ITO M, ICHIKAWA K, ISAKA N, NISHIKAWA M, HARTSHORNE DJ, et al. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*. 1999; 274: 37385-37390.
21. OCARANZA MP, DÍAZ-ARAYA G, CHIONG M, MUÑOZ D, RIVEROS JP, et al. Isoproterenol and Angiotensin I-Converting Enzyme in Lung, Left Ventricle, and Plasma During Myocardial Hypertrophy and Fibrosis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002; 40: 246-54
22. OCARANZA MP, PIDDO AM, FAÚNDEZ P, LAVANDERO S, JALIL JE. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism influences chronic hypertensive response in the rat Goldblatt model. *J Hypertens* 2002; 20: 413-420.
23. RIVERA P, OCARANZA MP, LAVANDERO S, JALIL JE. Rho Kinase Activation and Gene Expression Related to Vascular Remodeling in Normotensive Rats With High Angiotensin I-Converting Enzyme Levels. *Hipertensión* 2007; 50: 792-798.
24. OUDIT GY, SUN H, KERFANT BG, CRACKOWER MA, PENNINGER JM, BACKX PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2004; 37: 449-71.
25. LUPU F, TERWILLIGER JD, LEE K, SEGRE GV, EFSTRATIADIS A. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev Biol*. 2001; 229: 141-62.
26. LONG CS, HARTOGENSIS WE, SIMPSON PC. Beta-adrenergic stimulation of cardiac non-myocytes augments the growth-promoting activity of non-myocyte conditioned medium. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25: 915-925.
27. KNUFMAN NM, VAN DER LAARSE A, VLIEGEN HW, BRINKMAN CJ. Quantification of myocardial necrosis and cardiac hypertrophy in isoproterenol-treated rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1987; 57: 15-32.
28. MEDUGORAC Y. Collagen content in different areas of normal and hypertrophied rat myocardium. *Cardiovasc Res* 1980; 14: 551-4.
29. WANG YX, DA CUNHA V, MARTIN-MCNULTY B, VINCELETTE J, LI W, CHOY DF, et. al. Inhibition of Rho-kinase by fasudil attenuated angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in apolipoprotein E deficient mice. *Eur J Pharmacol*. 2005; 512: 215-22.
30. HATTORI T, SHIMOKAWA H, HIGASHI M, HIROKI J, MUKAI Y, TSUTSUI H, et. al. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2004; 109: 2234-9.
31. SATOH S, YAMAGUCHI T, HITOMI A, SATO N, SHIRAIWA K, Ikegaki I, et. al. Fasudil attenuates interstitial fibrosis in rat kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Eur J Pharmacol*. 2002; 455: 169-74.
32. HIGASHI M, SHIMOKAWA H, HATTORI T, HIROKI J, MUKAI Y, MORIKAWA K, et. al. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system. *Circ Res*. 2003; 93: 767