



Efectividad del uso combinado de un inhibidor de Rho Kinasa y de un antagonista del receptor de angiotensina II en la prevención de hipertrofia ventricular en ratas hipertensas

Ulises Novoa, María Paz Ocaranza, Italo Mora, Jorge Jalil.

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

Financiamiento: Fondecyt 1085208

Recibido 16 de Noviembre de 2009 / Aceptado 1 de marzo de 2010

Rev Chil Cardiol 2010; 29: 221 - 232

Resumen:

La actividad de Rho kinasa (ROCK) cardíaca en la hipertensión arterial (HTA) y el efecto del tratamiento antihipertensivo conjunto han sido poco estudiados. Hemos planteado que la adición de un inhibidor de ROCK al tratamiento antihipertensivo convencional podría tener efectos preventivos adicionales al uso aislado del antihipertensivo.

Objetivo: Determinar la actividad de ROCK ventricular y parámetros de remodelamiento cardíaco en ratas hipertensas con y sin tratamiento antihipertensivo, adicionando un inhibidor directo de ROCK.

Métodos. Se usaron ratas Sprague Dawley de 150 grs. (n = 12 - 13/grupo) unifrectomizadas tratadas con desoxicorticosterona (DOCA, 100 mg/Kg/sem sbc) durante 6 semanas. Como controles se usaron ratas unifrectomizadas. Otros 3 grupos recibieron DOCA y además el antagonista del receptor de angiotensina II, candesartán (10 mg/kg/día) o el inhibidor de la vía ROCK fasudil (50 mg/Kg/día), o la combinación de ambos (5 y 25 mg/Kg/día, respectivamente), vía gavage desde la tercera semana post cirugía, durante 3 semanas. Al finalizar los tratamientos se determinó la masa corporal (MC), presión arterial sistólica (PAS) y la masa cardíaca relativa (MCR). Además se midió en el ventrículo izquierdo la fosforilación de la fosfatasa de la miosina (MYPT-1) como índice de

activación de ROCK, la infiltración de macrófagos/monocitos (células ED1 positivas), la expresión proteica de colágeno I (por Western blot) y la expresión génica de la subunidad gp91 de NADPH oxidasa y eNOS por RT PCR.

Resultados: Con respecto de las ratas sham, en las ratas hipertensas se observó hipertrofia cardíaca de 63% (p < 0,05), junto a aumento significativo (p < 0,05) de MYPT-1 fosforilado/total (300%), de colágeno miocárdico I (en 14 veces), de células ED1 en 270% y de la expresión génica de la subunidad gp91 de NADPH oxidasa en miocardio en 75%. Además se observó disminución en la expresión génica de eNOS en corazón de 37% (p < 0,05). En las ratas hipertensas DOCA tratadas durante 3 semanas con candesartán, con fasudil o con ambos fármacos en combinación, hubo normalización de la PAS y de MYPT-1 fosforilado/total, regresión significativa de la hipertrofia cardíaca, normalización del colágeno miocárdico I, del número de células ED1 en la pared cardíaca y de la expresión génica de la subunidad gp91 de NADPH oxidasa.

Conclusión: En este modelo experimental de HTA, el uso combinado de un inhibidor de ROCK y de un antagonista del receptor de angiotensina II en dosis bajas fue tan efectivo como cualquiera de ambos fármacos por separado en prevenir el desarrollo de HVI y el remodelado cardíaco hipertensivo. (Fondecyt 1085208).

Correspondencia:

Dr. Jorge Jalil,
Departamento de Enfermedades Cardiovasculares,
Facultad de Medicina.

P. Universidad Católica de Chile.
Tel: +562-3543633, Fax: +562-6321924.
E-mail: jjalil@med.puc.cl



Effectiveness of the combined use of a Rho-kinase inhibitor and an Angiotensin II receptor antagonist in the prevention of left ventricular hypertrophy in hypertensive rats

Background: The effect of cardiac Rho-kinase (ROCK) on hypertension (HT) and cardiac hypertrophy prevention and also the combined anti-hypertensive treatment have been scarcely studied. We hypothesized that the addition of a ROCK inhibitor to conventional anti-hypertensive treatment may have additional beneficial effects.

Aim: to determine ventricular ROCK activity and ventricular remodeling in hypertensive rats treated with Angiotensin II inhibition with the addition of a ROCK inhibitor.

Methods: Sprague-Dawley rats weighing 150 grams had one kidney removed and received deoxycortisterone acetate (DOCA, 100 mg/kg/week, during 6 weeks). Unilaterally nephrectomized rats were used as controls. The other 3 groups received DOCA along with the Angiotensin II receptor blocker candesartan (10 mg/kg/day) or the combination of both agents (5 and 25 mg/kg/day, respectively) and ROCK inhibitor fasudil (50 mg/kg/day) for 3 weeks starting 3 weeks after surgery. Body mass (BM), systolic blood pressure (SBP) and relative cardiac mass (RCM) were measured. In addition, myosin phosphatase (MYPT-1) phosphorylation was measured as an indicator of ROCK activation. Cardiac infiltration of macrophages/monocytes (ED1 positive cells), collagen I protein content (by Western Blot) and also cardiac gene expression of NADPH oxydase GP91 subunit and eNOS were determined by RT-PCR.

Results: In hypertensive rats we observed cardiac hypertrophy by 63% ($p < 0.05$), a 300% increase in cardiac MYPT-1 phosphorylation ($p < 0.05$), 14 times increase in myocardial collagen type I, 270% increase in ED1 cells, a 75% increased gene expression of NADPH oxydase GP91 subunit and a 37% reduction ($p < 0.05$) in the gene expression of cardiac eNOS. In hypertensive DOCA rats treated during 3 week with candesartan, fasudil or the combination of both, we observed a significant reduction in cardiac hypertrophy and normalization of SBP, MYPT-1 phosphorylation, collagen type I, number of ED1 cells, genic expression of NADPH oxydase GP91 subunit and in the genic expression of cardiac eNOS.

Conclusion: The combined use of a ROCK inhibitor and a low dose Angiotensin II receptor blocker was as effective as full doses of both isolated agents in the prevention of cardiac hypertrophy and hypertensive experimental cardiac remodeling (Fondecyt 1085208)

Keywords: Rho-kinase, Angiotensin II receptor antagonist, left ventricular hypertrophy

Introducción:

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en Chile y en el mundo (1), es la tercera causa de invalidez en nuestro país (2) y se estima que su prevalencia continuará en ascenso en el mundo (3). Uno de los principales factores de riesgo cardiovascular es la hipertensión arterial (HTA), que a su vez constituye uno de los factores más relevantes para la enfermedad coronaria y el de mayor importancia para la enfermedad cerebrovascular.

La HTA constituye una de las patologías de mayor impacto en la población mundial, llegando a afectar al 26% de ella (4). En la actualidad se estima que en Chile, la prevalencia de la HTA es de un 33,7% (5),

porcentajes que podrían aumentar de no haber cambio en los perfiles epidemiológicos actuales. La HTA es una enfermedad asintomática y fácil de detectar, pero que se asocia a complicaciones graves y letales si no se trata a tiempo. La HTA produce cambios hemodinámicos macro y microvasculares, causados a su vez por disfunción del mismo endotelio vascular y el remodelado de la pared de las arteriolas de resistencia, responsables de mantener el tono vascular periférico. Estos cambios, anteceden en el tiempo a la elevación de la presión y producen lesiones orgánicas específicas, algunas de ellas definidas clínicamente. Los órganos blancos afectados por la HTA no tratada, incluyen el sistema nervioso central, arterias periféricas, corazón y riñones. En la mayoría de los casos la HTA no tiene una



etiología conocida, por lo que se denomina HTA esencial, cuyos mecanismos se conocen sólo parcialmente. Por esto es necesario dedicar importantes esfuerzos a comprender mejor los mecanismos fisiopatológicos y moleculares que subyacen tras la aparición y complicaciones posteriores de la HTA. Esto reviste un especial interés por sus potenciales aplicaciones clínicas.

El remodelamiento cardiovascular es una respuesta crónica que compromete la funcionalidad de los órganos afectados (6). En el corazón, uno de los efectos más importantes de la sobrecarga crónica producida por la HTA es la hipertrofia cardíaca patológica, que incluye aumento del número de fibroblastos y alteraciones de la matriz extracelular (MEC) (fibrosis). El remodelamiento significativo del corazón por HTA produce deterioro de la función ventricular (inicialmente diastólica y posteriormente sistólica) y disminución de la reserva coronaria.

La contracción y relajación de los vasos sanguíneos se encuentra regulada en forma importante por reacciones de fosforilación y desfosforilación de la cadena liviana de la fosfatasa de la miosina (MLC) en la subunidad reguladora de la proteína blanco 1 de la fosfatasa de la miosina (myosin phosphatase target protein-1 o MYPT1) (7,8). En los últimos años se ha demostrado que la GTPasa pequeña Rho A y su efector Rho kinasa modulan la fosforilación de MYPT1 (7), de manera que al activarse la vía de señalización intracelular RhoA/Rho kinasa aumenta MYPT-1. Esta vía participa en el remodelado cardiovascular patológico y en la regulación de la presión arterial (9), es activada por agonistas de receptores acoplados a proteína G de membrana (angiotensina II, endotelina, noradrenalina, etc.). La activación de Rho kinasa por angiotensina II está además involucrada en el aumento del estrés oxidativo (10, 11) y en la producción de mediadores proinflamatorios y profibróticos (12,13). Sin embargo, la actividad de Rho kinasa (ROCK) cardíaca en la HTA y el efecto del tratamiento antihipertensivo sobre su actividad han sido poco estudiados.

Evidencias experimentales y clínicas indican que los bloqueadores o antagonistas de los receptores AT1 de angiotensina II (ARA II) reducen la mortalidad y modifican el remodelamiento ventricular post-infarto de miocardio (IM) (14-17). En la rata el bloqueo crónico del sistema renina angiotensina reduce la hipertrofia ventricular (19, 20), atenúa la dilatación ventricular (18) y la fibrosis (20,21), tanto en la zona de del infarto como en zonas remotas del mismo. Efectos similares se han observado con el uso de ARA II en la HTA y en la

hipertrofia ventricular hipertensiva.

En el presente estudio hemos planteado que el uso de un inhibidor de ROCK junto con el tratamiento antihipertensivo convencional con un ARA II podría tener efectos preventivos adicionales sobre el remodelado cardíaco patológico con respecto al uso del tratamiento antihipertensivo usado en forma aislada. Por ello, se ha determinado en forma experimental la actividad de ROCK cardíaca junto con parámetros de remodelamiento cardíaco en ratas hipertensas bajo tratamiento antihipertensivo a) con un ARA II, b) con un inhibidor específico de ROCK y c) con el ARA II y el inhibidor directo de ROCK.

Métodos

La presente investigación se realizó de acuerdo a la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, publicado por el National Health Institute (NIH N° 85-23, 1985) y aprobada por la Comisión de Investigación de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

1. Modelo experimental de hipertensión arterial. Se usó el modelo de hipertensión arterial experimental por sobrecarga de volumen por administración del mineralocorticoide deoxicorticosterona (DOCA) y sal (22), en ratas Sprague Dawley machos de (150 ± 10 g). Este modelo se realizó mediante nefrectomía del riñón izquierdo y administración de DOCA (100 mg/Kg de peso, Steraloids. Inc., Newport, RI, USA) 1 vez por semana, partiendo inmediatamente después de efectuada la cirugía. Los animales recibieron en el agua de bebida 1% de NaCl y 0,4% KCl.

Las ratas DOCA-sal fueron divididas en 4 grupos en forma randomizada: 1) Ratas que recibieron suero fisiológico por gavage durante las últimas 3 semanas, (grupo DOCA), 2) Ratas que recibieron el antagonista del receptor de angiotensina II, candesartán (10 mg/kg/día, Laboratorios Saval, Santiago de Chile (grupo DOCA-cand). 3) Ratas que recibieron el inhibidor de la vía RhoA/Rho kinasa fasudil (50 mg/Kg/día, LC Laboratories, Woburn, MA, USA.) (grupo DOCA-fas). 4) Ratas que recibieron la combinación de ambos tratamientos; candesartán y fasudil (5 y 25 mg/Kg/día respectivamente, (grupo DOCA-cand-fas). Los grupos 2, 3 y 4 recibieron los fármacos por gavage durante 3 semanas a partir de la 3° semana post cirugía. 5) Un quinto grupo de ratas se utilizó como control, siendo sometidas sólo a nefrectomía (grupo SHAM) y administración vía gavage del vehículo (suero fisiológico).



Todos los animales fueron mantenidos bajo condiciones controladas de luz y oscuridad y tuvieron libre acceso a agua y comida. Al término del tratamiento, los animales fueron sacrificados.

2. *Determinación de la presión arterial.* La presión arterial sistólica (PAS) se midió por el método pletismográfico en la cola de los animales bajo suave anestesia con éter etílico un vez por semana (23).

3. *Evaluación de la masa relativa del ventrículo izquierdo (MRVI).* El grado de hipertrofia VI (MRVI) se cuantificó como la relación entre la masa del VI (MVI) y la masa (MC) o peso corporal (MVI / 100 g MC; 23).

4. *Obtención de muestras de ventrículo.* Al final de los experimentos los animales recibieron anestesia con Ketamina (35mg/Kg peso) y Xilazina (7mg/Kg peso) vía ip y el corazón se extrajo rápidamente, se lavó en suero fisiológico, se cortó en secciones de 2-3 mm y se congeló en nitrógeno líquido, guardándolo a -80°C hasta su procesamiento.

5. *Fosforilación de la proteína MYPT1 ventricular como estimación de la actividad enzimática de Rho kinasa (Western blot).* Se determinaron los niveles de fosforilación de la proteína blanco 1 de la fosfatasa de la miosina (myosin phosphatase target protein-1 o MYPT1), una proteína blanco de Rho kinasa en ventrículo de rata por western blot (8,8a). Se homogenizó el tejido en 500 µL de tampón de lisis (Tris HCl 50 mmol/L, NP40 1%, NaCl 150 mmol/L, Na-deoxicolato 0.25%, EDTA 1 mmol/L, SDS 0.1%, aprotinina 1 µg/mL, leupeptina 1 µg/mL, PMSF 1mM), se centrifugó a 10.000 g por 30 minutos a 4°C, separando el sobrenadante. Para la determinación de los niveles de MYPT1 por western blot (WB), se separaron 100 µg del extracto proteico por electroforesis en geles SDS-PAGE al 6%. Luego las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 300 mA durante 1 h. La membrana posteriormente se bloqueó en solución PBS+Tween 20 al 0,05% con leche descremada al 7% por 2 h en agitación constante a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados de 10 min c/u con PBS+Tween 20 al 0,05%, conteniendo 0,5% de leche descremada (esta solución se utilizó para todos los lavados posteriores y para la dilución de los anticuerpos), la membrana se incubó con el anticuerpo anti-MYPT1 fosforilado (Thr 696) (upstate Biotechnology) con una dilución de 1:2000

o el anticuerpo anti-MYPT1 total (BD Transduction Laboratories) con una dilución de 1:1000 se incubaron toda la noche con agitación a 4°C. Posteriormente, se continuó con 3 lavados similares a los anteriormente descritos y luego se incubó con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa (anti-IgG de conejo, para MYPT1 fosforilada y anti-IgG de ratón, para MYPT1 total, PIERCE) en una dilución 1:10.000 y 1:5.000 respectivamente durante 2 h a temperatura ambiente con agitación. Se hicieron 3 lavados por 10 minutos c/u y la membrana se incubó con el sustrato de quimioluminiscencia según las instrucciones del proveedor (Western Lightning™ Plus-ECL, Perkin Elmer). La intensidad de cada banda se analizó por densitometría mediante un scanner Hewlett-Packard y el software Image J 1.32j (NIH, USA). Los resultados se expresan como razón MYPT1 fosforilada / MYPT1 total.

6. *Niveles cardíacos de colágeno I (Western blot).* Los niveles cardíacos de colágeno I se cuantificaron por western blot. Para ello se homogenizaron los tejidos en 500 µL de tampón de lisis (PBS 0.5x, NP40 1%, Na-deoxicolato 0.25%, SDS 0.1%, aprotinina 1 µg/mL, leupeptina 1 µg/mL, pestatina 10 µg/mL, ortovanadato de sodio 1mM, PMSF 1mM, pH 7.4), se centrifugó a 3.000 g por 10 minutos a 4°C, separando el sobrenadante. El western blot para colágeno I se realizó con el mismo procedimiento anteriormente descrito para MYPT1. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario contra colágeno I (AB749, Chemicon, Temecula, CA USA) a una dilución de 1:3.000 toda la noche a 4°C, utilizando posteriormente el anticuerpo anti-IgG de conejo- HRP (PIERCE) como secundario. Los resultados se expresan como la razón Colágeno I/β-actina. El anticuerpo primario contra β-actina (clone AC-74, Sigma-Aldrich) se incubó a una concentración de 1:5.000 en las mismas condiciones, usando el anti-IgG-HRP de ratón (PIERCE) como secundario.

7. *Presencia y cuantificación de macrófagos/monocitos (células ED1) cardíacos.* Se fijaron cortes transversales de corazón (ventrículo izquierdo) en solución de Bouin. Posteriormente fueron deshidratados e incluidos en Paraplast® plus (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA.). Para inmunohistoquímica se utilizaron secciones de 6 µm de espesor montadas en portaobjetos.

La inmunotinción fue realizada por el método de peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) descrito por Sternberger (24) con modificaciones. Brevemente, los tejidos



fijados fueron desparafinados, rehidratados y tratados con 3% de peróxido de hidrógeno en metanol absoluto (vol/vol) por 15 min para inhibir la actividad de las pseudo peroxidases endógenas. Se realizó luego una recuperación antigénica, hirviendo las muestras en horno de microondas con una solución de EDTA 1mM pH=8 3 veces de 7 minutos cada una. Luego los cortes se lavaron con tampón Tris fosfato salino (40 mM Tris, 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,6) y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo monoclonal contra el antígeno ED-1 de macrófagos/monocitos (Mouse anti rat CD68, MCA341R, Serotec) a una dilución de 1:200. La inmunotinción se reveló con el kit LSAB+System-HRP (Dako, UK) y las secciones fueron contrastadas con hematoxilina, deshidratadas y aclaradas con xilol, finalmente fueron montadas bajo un cubreobjeto con Permount® (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA.).

Análisis morfométrico. Las secciones inmunoteñidas fueron observadas con un microscopio Nikon Eclipse E400 y las imágenes captadas y digitalizadas con una cámara Nikon Coolpix 4500. Para evaluar la expresión de células ED1 (+), se utilizó un método semicuantitativo (25) utilizando una escala de 0 a 4, donde 0 = no se detecta la presencia de macrófagos/monocitos infiltrados; 1 = escasa cantidad de macrófagos/monocitos localizados a través del ventrículo izquierdo; 2 = número moderado de macrófagos/monocitos localizados a través del ventrículo izquierdo; 3 = gran número de macrófagos/monocitos localizados en grupos a través del ventrículo izquierdo; 4 = gran número de macrófagos/monocitos localizados en grupos a través del ventrículo izquierdo, asociados directamente con áreas de fibrosis.

8. Expresión génica en corazón de la subunidad GP-91phox de NADPH oxidasa y de la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS) por RT-PCR. Brevemente, el RNA total del corazón se aisló por el método del trizol y se cuantificó por espectroscopia a 260nm/280nm. El cDNA se obtuvo por transcripción reversa a partir de 1,5 µg de RNA total tratado con DNAsa. La amplificación para GP-91phox (40 ciclos) fue realizada con 1 min a 94 °C de denaturación, 1 min a 55 °C de hibridación y 1 min a 72 °C de elongación, seguido por una autoextensión de 10 min a 72 °C. Como partidor sentido se usó: 5' AGC-TAG-AGT-GGC-ACC-CAT-TC 3' y antisentido: 5'-TCC-CAG-TTG-GGC-CGT-CCA-TA- 3' (26). La amplificación para eNOS (28 ciclos) fue realizada con 1 min a 94 °C de denaturación,

1,5 min a 52 °C de hibridación y 1,5 min a 72 °C de elongación, seguido por una autoextensión de 10 min a 72 °C. Como partidor sentido se usó: 5'TTC-CGG-CTG-CCA-CCTGAT-CCT-AA 3' y antisentido: 5' AAC-ATG- TGT-CCTTGC-TCG-AGG-CA 3' (27). La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría y se normalizó con respecto a la banda 18 S del RNA ribosomal

9. Análisis estadístico. Los datos obtenidos se expresaron como *promedio ± ES*. Cada grupo experimental estuvo constituido por 12 - 13 animales. Para las comparaciones se usó análisis estadístico con ANOVA seguido de prueba de t de Student- Newman-Keuls. El análisis estadístico se realizó usando el programa estadístico SPSS 10.0. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Resultados:

1. Presión arterial sistólica (PAS). En las ratas Sham, los niveles de PAS estuvieron en los rangos habituales observados en ratas Sprague Downley normotensas (116 ± 2 mmHg) (Tabla 1). En las ratas DOCA-sal no tratadas la PAS aumentó significativamente respecto al grupo control a 172 ± 7 mmHg; $p < 0,05$. La administración de candesartán, del inhibidor de Rho kinasa fasudil o de la combinación de ambos a ratas DOCA, disminuyó significativamente la PAS con respecto al grupo DOCA sin tratamiento. En las dosis y combinaciones utilizadas se observó una reducción mayor de la PAS con candesartán o fasudil utilizados aisladamente más que en combinación (tabla 1).

2. Masa corporal y masa cardíaca relativa. La masa corporal (MC) o peso en las ratas DOCA no tratadas fue 39% menor que en las ratas Sham ($p < 0.05$). Interesantemente, en todos los grupos DOCA con tratamiento la masa corporal fue significativamente mayor que en las ratas DOCA no tratadas, aunque menor que lo observado en las ratas SHAM (tabla 1).

La masa cardíaca relativa (MCR) o grado de hipertrofia cardíaca, aumentó 60% en las ratas DOCA hipertensas no tratadas con respecto de las ratas SHAM ($p < 0.05$). Se observó una disminución estadísticamente significativa de la MCR respecto de las ratas DOCA sin tratamiento al utilizar aisladamente candesartán (en 16%) o fasudil (en 13%) y también con el uso combinado de candesartán y fasudil (en 25%) ($p < 0.05$). (Tabla 1).



Tabla 1: Presión arterial sistólica y masa cardíaca relativa

	SHAM (n = 12)	DOCA (n = 12)	DOCA-Cand (n=13)	DOCA-Fas (n=12)	DOCA-Cand-Fas (n=12)
PAS (mm Hg)	116(2)	172(7)*	108(2)#	99(6)*#	128(3)*#
MC (g)	339(16)	207(15)*	257(13)*#	262(14)*#	297(12)*#
MCR (mg VI/MC*100)	330(8)	528(27)*	445(21)*#	458(26)*#	394(18)*#

Tabla 1. Resultados como promedio(ES). Abreviaciones: MC = masa corporal, PAS = presión arterial sistólica, MCR = masa cardíaca relativa. Símbolos: * = $p < 0.05$ vs SHAM (después de ANOVA significativo); # = $p < 0.05$ vs DOCA (después de ANOVA significativo).

3. Nivel de fosforilación de MYPT1 en ventrículo (Western blot). El nivel de fosforilación de la proteína blanco de Rho kinasa MYPT1 se cuantificó en el corazón usando la razón MYPT1 fosforilado/MYPT1 total. En tal condición, se observó un aumento significativo el nivel de fosforilación en el grupo DOCA de 3

veces, respecto al grupo SHAM ($3,22 \pm 0,93$ vs $1,00 \pm 0,21$, $p < 0,05$). En los grupos DOCA con tratamiento el nivel de fosforilación de MYPT1 disminuyó significativamente respecto del grupo DOCA sin tratamiento, a niveles similares a los observados en las ratas SHAM (figura 1).

Figura 1: Actividad de Rho kinasa en tejido cardíaco (como nivel de fosforilación de MYPT1 por Western Blot)

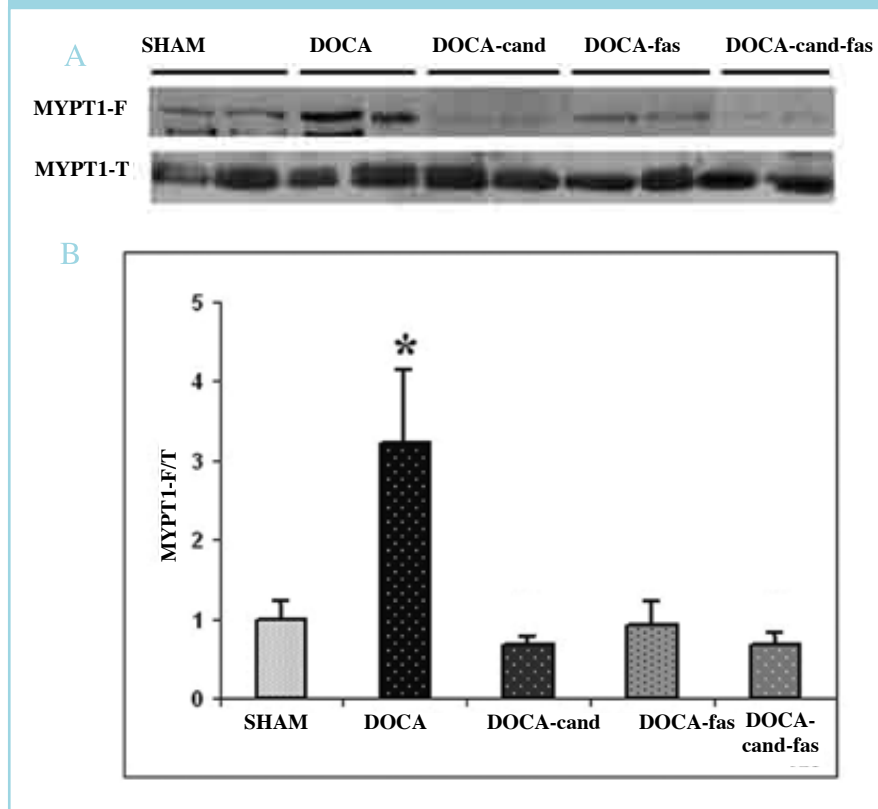


Figura 1. A. Western blots representativos de MYPT1 fosforilada (p) y total (t), 2 por cada uno de los grupos experimentales. B. Niveles de fosforilación de MYPT1 por Western blot como razón MYPT1 fosforilado/total en los grupos SHAM (n=10), DOCA (n=11), DOCA-cand (n=9), DOCA-fas (n=9) y DOCA-cand-fas (n=9); como promedio + ES. Abreviaciones: UDO = unidades de densidad óptica. Símbolos: * = $p < 0.05$ vs SHAM (después de ANOVA significativo).



4. *Niveles de colágeno I cardíaco (Western Blot).* Los niveles de colágeno I cardíaco en relación con los de β -actina, aumentaron significativamente en el grupo DOCA, respecto del grupo SHAM ($4,31 \pm 1,79$ vs $0,29 \pm 0,05$, $p < 0,05$). En 3 los grupos DOCA que recibieron tratamiento farmacológico, los niveles de colágeno I cardíacos se normalizaron (figura 2).

5. *Niveles de mRNA cardíaco de de GP91Phox y de eNOS.* El nivel de mRNA de la subunidad de NADPH oxidasa GP91Phox aumentó significativamente en las ratas DOCA hipertensas no tratadas en 75% respecto

de las ratas Sham normotensas. La administración de candesartan, fasudil o de ambos normalizó la sobreexpresión génica de esta subunidad (figura 3).

Los niveles cardíacos de mRNA de eNOS, disminuyeron significativamente en las ratas de los grupos DOCA sin tratamiento respecto del grupo Sham en 37%. La administración de candesartán, de fasudil o de ambos fármacos en forma combinada redujo significativamente los niveles cardíacos de mRNA de eNOS (figura 4), a niveles menores que los del grupo de ratas hipertensas sin tratamiento.

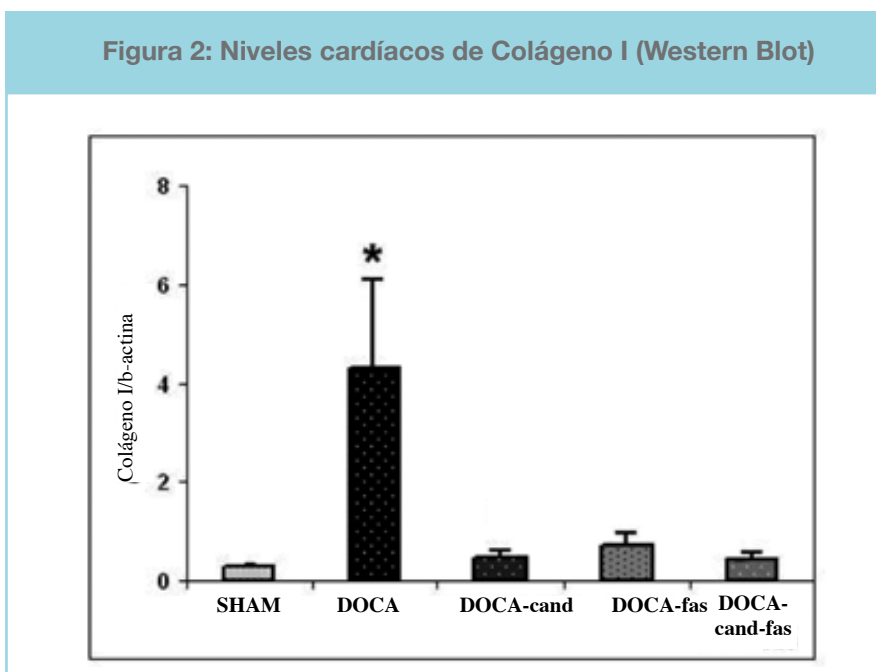


Figura 2. Se determinó la expresión proteica de colágeno I por Western blot en los grupos SHAM ($n=8$), DOCA ($n=7$), DOCA-cand ($n=6$), DOCA-fas ($n=8$) y DOCA-cand-fas ($n=9$). Los valores se normalizaron por β -actina y se expresan como promedio + ES. Símbolos: * = $p < 0,05$ vs SHAM (después de ANOVA significativo).

6. *Células inflamatorias (células ED1+) en el tejido cardíaco (ventrículo izquierdo).* La presencia de macrófagos/monocitos en el tejido cardíaco se determinó por medio de la expresión del antígeno específico ED1 (figura 5 a y b) con inmunohistoquímica. En el grupo DOCA, el score semicuantitativo de células ED1+ (macrófagos y monocitos) aumentó en forma significativa respecto del grupo

control SHAM ($2,37 \pm 0,32$ vs $0,86 \pm 0,14$, $p < 0,05$).

En los grupos DOCA tratados por 3 semanas con candesartán, con fasudil o con la combinación de ambos disminuyó significativamente el número de células inflamatorias, con respecto de las ratas hipertensas no tratadas y a niveles similares a los observados en las ratas controles (figura 5).



Figura 3: Niveles cardíacos de mRNA de la subunidad GP⁹¹Phox de NADPH oxidasa (RT-PCR)

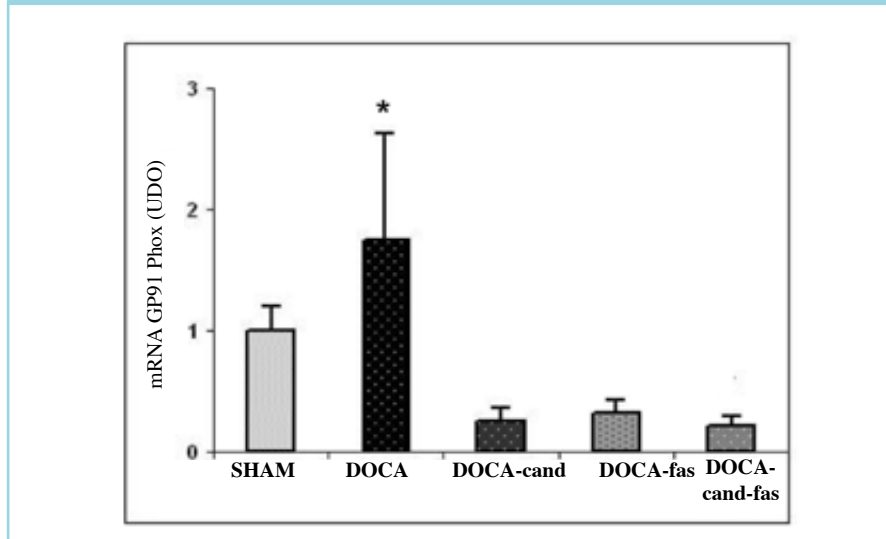


Figura 3. Se determinó la expresión génica de GP91Phox por RT-PCR en los grupos SHAM (n=8), DOCA (n=7), DOCA-cand (n=8), DOCA-fas (n=8) y DOCA-cand-fas (n=8). Los valores se expresan como promedio + ES. Abreviaciones: UDO = unidades de densidad óptica. Símbolos: * = $p < 0.05$ vs SHAM (después de ANOVA significativo).

Figura 4: Niveles cardíacos de mRNA de eNOS (RT-PCR)

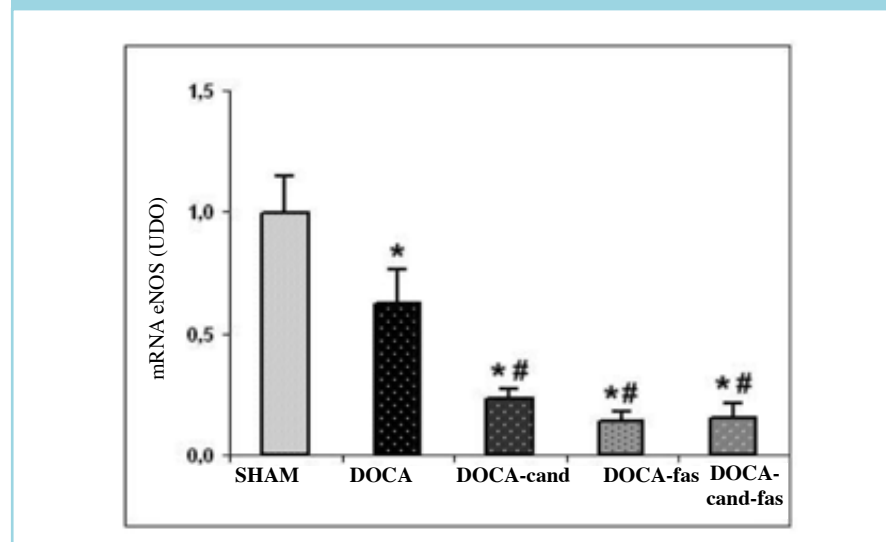


Figura 4. Se determinó la expresión génica de eNOS por RT-PCR (UDO) en los grupos SHAM (n=8), DOCA (n=7), DOCA-cand (n=8), DOCA-fas (n=7) y DOCA-cand-fas (n=8). Los valores se expresan como promedio + ES. Abreviaciones: UDO = unidades de densidad óptica. Símbolos: * = $p < 0.05$ vs SHAM (después de ANOVA significativo); # = $p < 0.05$ vs DOCA (después de ANOVA significativo)

Figura 5: Células inflamatorias (ED1 +) en ventrículo izquierdo (inmunohistoquímica).

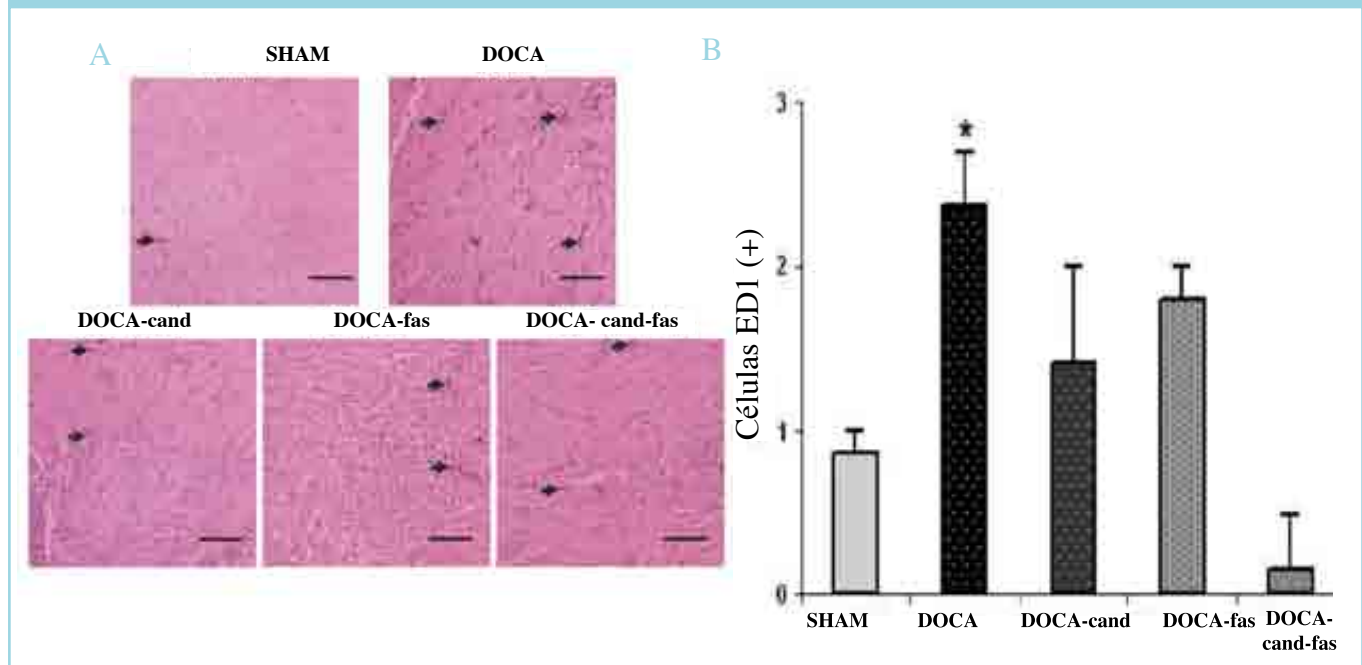


Figura 5. A) Corte de ventrículo izquierdo representativo en una rata de cada grupo experimental (aumento 200x) con inmunotinción para ED1 (hematoxilina y peroxidasa - antiperoxidasa). Las células ED1+ se observan de color café oscuro y aparecen señaladas con flechas. (B) Se determinó la cantidad de macrófagos/monocitos con un score semicuantitativo en escala 0 a 4 (25) en los grupos SHAM (n=8), DOCA (n=7), DOCA-cand (n=8), DOCA-fas (n=7) y DOCA-cand-fas (n=8). Los valores se expresan como promedio + ES. Símbolos: * = $p < 0.05$ vs SHAM (después de ANOVA significativo)

Discusión:

El objetivo del trabajo fue evaluar in vivo la relación entre el tratamiento antihipertensivo con un ARAII y la inhibición de la vía transduccional Rho A/ Rho kinasa (ROCK) ventricular y el modo como esta interacción afecta el desarrollo de hipertrofia cardíaca y el remodelado cardíaco patológico (evaluado como niveles de colágeno, grado de inflamación, estrés oxidativo medido como expresión del mRNA de GP91Phox y expresión de eNOS en los ventrículos). Los resultados muestran a) que en este modelo experimental de HTA dependiente de volumen, la ROCK cardíaca está muy activada, en forma paralela con el desarrollo de HTA, de hipertrofia cardíaca y de remodelado ventricular patológico y b) que el uso conjunto de un ARAII junto con un inhibidor de ROCK combinadamente en dosis bajas tan eficiente como el uso de un ARA II o de un inhibidor de ROCK usados en dosis plena para reducir la presión arterial y prevenir/regresar la hipertrofia ventricular y el remodelado cardíaco patológico.

La vía de señalización intracelular RhoA/ROCK participa en la organización del citoesqueleto de actina, en los procesos de adhesión y movilidad celular, citocinesis y expresión génica (32). En ratas espontáneamente hipertensas el tratamiento prolongado con fasudil reduce el desarrollo de remodelado vascular coronario, específicamente el engrosamiento de la media y fibrosis perivascular (33). Poco es lo que se sabe sobre su rol en el remodelado cardíaco.

En nuestro trabajo, en las ratas hipertensas por sobrecarga de volumen el nivel de fosforilación de MYPT1 en ventrículo aumentó significativamente respecto de las ratas controles normotensas, demostrándose así una importante activación de la vía Rho A/ Rho kinasa cardíaca en este modelo (de 300%). Es muy posible que la activación de ROCK sea secundaria a HTA independientemente del mecanismo. En las ratas DOCA, junto con la activación de ROCK en el tejido cardíaco aumentó la expresión cardíaca de colágeno I (que explica en forma importante el desarrollo de fibrosis miocárdica) así como la infiltración inflamatoria de macrófagos.



En nuestro trabajo, la activación de ROCK en el modelo DOCA, también se correlacionó con un aumento del mRNA de la subunidad GP91Phox de NADPH oxidasa (posible estimador de mayor estrés oxidativo tisular) y con disminución del mRNA mensajero de la eNOS. El efecto de la vía RhoA/ROCK en la activación de genes proinflamatorios y profibróticos y en el aumento del estrés oxidativo en este modelo, de estableció usando el inhibidor específico de ROCK fasudil (28, 29, 30). En las ratas hipertensas tratadas con fasudil la presión arterial se redujo a niveles menores que en el grupo sham, el grado de hipertrofia ventricular fue menor que en las ratas DOCA y todos los parámetros de remodelado cardíaco evaluados fueron similares a los del grupo control. Estos efectos podrían ser consecuencia directa de la inhibición cardíaca de ROCK o ser secundarios al efecto antihipertensivo de fasudil. Para diferenciar ambos mecanismos sería necesario inhibir ROCK sin reducir la presión arterial. Fasudil también ejerce efectos inhibitorios inespecíficos sobre otras kinasas, como la proteína kinasa A y la proteína kinasa C (31). La observación en el presente estudio de una reducción de la actividad de ROCK en las ratas hipertensas tratadas solamente con candesartán sugiere que la inhibición de ROCK podría ser consecuencia del efecto antihipertensivo per se, en este caso mediado por la inhibición del receptor tipo 1 de angiotensina II. En este sentido, sería importante evaluar en este modelo experimental el efecto de antihipertensivos diferentes a los ARA II, ya que ROCK forma parte de la vía de señalización del receptor AT1 (34, 35) y también de dosis de ARA II que no reduzcan la presión arterial. Al respecto, en ratas normotensas Brown Norway, con niveles genéticamente elevados de angiotensina II, hemos observado gran aumento de la actividad de ROCK en la aorta (8a). Los efectos observados en las ratas hipertensas posteriormente a la inhibición directa de ROCK en los grupos tratados con fasudil, solo o en bajas dosis en combinación con candesartán en la prevención/regresión de hipertrofia cardíaca, en los niveles de colágeno miocárdico, en el grado de inflamación y en la expresi-

sión génica de GP91Phox y de eNOS son consistentes con un rol fundamental de esta vía de señalización de estos procesos patológicos. Resulta muy interesante que la combinación en dosis bajas de un inhibidor de ROCK y de un ARA II sea tan efectiva como las dosis plenas de cada uno por separado, sobre todo por la posible mayor seguridad clínica, con menos efectos colaterales y por la posibilidad de que exista sinergia en otros procesos patogénicos propios de la cardiopatía hipertensiva que no se evaluaron en el presente estudio y que representa una limitación que debiera ser más ampliamente evaluada.

Dentro de las limitaciones del estudio están la evaluación de la hipótesis en un sólo modelo experimental de HTA (dependiente de volumen), la utilización de fármacos en dosis antihipertensivas exclusivamente, el uso de una sola familia de antihipertensivos convencionales y la evaluación de sólo algunos parámetros de hipertrofia y remodelado cardíacos, aspectos que a nuestro juicio podrían potenciar los presentes resultados y que algunos estudios al respecto, están en curso.

Las posibles aplicaciones clínicas de estos resultados en pacientes hipertensos son atractivas, toda vez que actualmente existen estudios clínicos disponibles y en curso con el uso de fasudil en pacientes con hipertensión pulmonar (36-38), diabetes mellitus (39) y con insuficiencia cardíaca (40).

En conclusión, en ratas hipertensas por sobrecarga de volumen, la actividad de Rho kinasa cardíaca aumenta significativamente respecto de ratas controles normotensas, lo que demuestra un rol importante de esta vía en el desarrollo de hipertrofia ventricular y de cardiopatía hipertensiva, con mayores niveles de colágeno e inflamación cardíaca mayor expresión génica de por lo menos una subunidad de NADPH oxidasa y menor de eNOS. El efecto de dosis plenas antihipertensivas de un ARAII o del inhibidor de ROCK fasudil en relación con los parámetros evaluados es idéntico al uso de ambos fármacos en menores dosis, lo que podría tener menos efectos colaterales y mayores efectos sinérgicos.



Referencias :

1. The World Health Report 2003: shaping the future. Geneva, Switzerland: WHO 2003.
2. ZAMORA L, ARELLANO M, KUNSTMANN S, MONTENEGRO A, RIVEROS B, SCHLEGEL I, et al. Invalidez en el Sistema Privado de Pensiones. *Rev Med Chil.* 1997; 125: 99-106.
3. VASAN RS, BEISER A, SESHADRI S, LARSON MG, KANNEL WB, D'AGOSTINO RB, et al. Residual Lifetime risk for developing hypertension in middle-aged women and men: The Framingham Heart Study. *JAMA.* 2002; 287: 1003-10.
4. KEARNEY PM, WHELTON M, REYNOLDS K, MUNTNER P, WHELTON PK, HE J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005; 365: 217-23
5. Encuesta Nacional de Salud 2003.
6. WEBER KT, BRILLA CG, JANICKI JS. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 341-8.
7. JIN L, YING Z, WEBB R. Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: 1495-1500.
8. SEKO T, ITO M, KUREISHI Y, OKAMOTO R, MORIKI N, ONISHI K, et al. Activation of RhoA and Inhibition of myosin phosphatase as Important Components in Hypertension in Vascular Smooth Muscle. *Circ Res* 2003; 92:411-418.
9. RIVERA P, OCARANZA P PAZ, LAVANDERO S, JALIL JE. RHO Kinase Activation and Gene Expression Related to Vascular Remodeling in Normotensive Rats With High Angiotensin-I-Converting Enzyme Levels. *Hypertension.* 2007; 50: 792-798.
10. KATAOKA C, EGASHIRA K, INOUE S, TAKEMOTO M, NI W, KOYANAGI M, et al. Important role of Rho-Kinase in the pathogenesis of cardiovascular inflammation and remodeling induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension* 2002; 39: 245-50.
11. 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 Rat in vivo. *Circ Res* 2003; 93:767-775.
12. JALIL JE, PEREZ A, OCARANZA MP, BARGETTO J, GALAZ A, LAVANDERO S. Increased aortic NADPH oxidase activity in rats with genetically high angiotensin-converting enzyme levels. *Hypertension.* 2005; 46:1362-1367.
13. TANIYAMA Y, GRIENDLING K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature. *Hypertension* 2003; 42:1075-1081.
14. MICHEL JB. Systeme renine angiotensine et remodelage vasculaire. *Medecine/Sciences* 2004; 20: 409-413.
15. DICKSTEIN K, KJEKSHUS J. Comparison of baseline data, initial course, and management: losartan versus captopril following acute myocardial infarction (The OPTIMAAL Trial). OPTIMAAL Trial Steering Committee and Investigators. Optimal Trial in Myocardial Infarction with the Angiotensin II Antagonist Losartan. *Am J Cardiol* 2001; 87: 766-71.
16. HU K, GAUDRON P, ANDERS HJ, WEIDEMANN F, TURSCHNER O, NAHRENDORF M, et al. Chronic effects of early started angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin AT1-receptor subtype blockade in rats with myocardial infarction: role of bradykinin. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 401-12.
17. PFEFFER MA, GREAVES SC, ARNOLD JM, GLYNN RJ, LAMOTTE FS, LEE RT, et al. Early versus delayed angiotensin-converting enzyme inhibition therapy in acute myocardial infarction. The healing and early afterload reducing therapy trial. *Circulation* 1997; 95: 2643-51.
18. RICHER C, FORNES P, CAZAUBON C, DOMERGUE V, NISATO D, GIUDICELLI JF. Effects of longterm angiotensin II AT1 receptor blockade on survival, hemodynamics and cardiac remodeling in chronic heart failure in rats. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 100-8.
19. JAIN M, LIAO R, NGOY S, WHITTAKER P, APSTEIN CS, EBERLI FR. Angiotensin II receptor blockade attenuates the deleterious effects of exercise training on post-MI ventricular remodeling in rats. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 66-72.
20. VAN KATS JP, DUNCKER DJ, HAITSMADB, SCHUIJT MP, NIEBUUR R, STUBENITSKY R, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade prevent cardiac remodeling in pigs after myocardial infarction: role of tissue angiotensin II. *Circulation* 2000; 102: 1556-63.
21. THAI HM, VAN HT, GABALLA MA, GOLDMAN S, RAYA TE. Effects of AT1 receptor blockade after myocardial infarct on myocardial fibrosis, stiffness, and contractility. *Am J Physiol* 1999; 276: H873-H80.
22. JU H, ZHAO S, JASSAL DS, DIXON IM. Effect of AT1 receptor blockade on cardiac collagen remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1997; 35: 223-32.
23. GALAZ A. Estudio del polimorfismo de la enzima convertidora de angiotensina, endopeptidasa neutra y sistema del óxido nítrico en la hipertensión arterial independiente de renina. Memoria para optar al título de químico farmacéutico. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2003
24. 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.
25. STERNBERGER LA, STERNBERGER LH. The unla-



- beled antibody method: comparison of peroxidase-anti-peroxidase with avidin-biotin complex by a new method of quantification. *J. Histochem. Cytochem.* 1986; 34: 599-605.
26. ALLAN A, FENNING A, LEVICK S, HOEY A, BROWN L. Reversal of cardiac dysfunction by selective ET-A receptor antagonism. *Br J Pharmacol.* 2005; 146: 846-53.
 27. BOULOUMIÉ A, BAUERSACHS J, LINZ W, SCHÖLKENS BA, WIEMER G, FLEMING I, et al. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension* 1997; 30: 934-941.
 28. KUSAKA I, KUSAKA G, ZHOU C, ISHIKAWA M, NANDA A, GRANGER DN, et al. Role of AT1 receptors and NAD(P)H oxidase in diabetes-aggravated ischemic brain injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286: H2442-51.
 29. JACOBS M, HAYAKAWA K, SWENSON L, BELLON S, FLEMING M, TASLIMI P, et al. The structure of dimeric ROCK I reveals the mechanism for ligand selectivity. *J Biol Chem.* 2006; 281: 260-260.
 30. SHIMOKAWA H, TAKESHITA A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 1767-1775.
 31. 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.
 32. SHIMOKAWA H, RASHID M. Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. *Trends Pharmacol Sci.* 2007; 28: 296-302.
 33. 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.
 34. SHIMOKAWA H, RASHID M. Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. *Trends in Pharm Sciences* 2007; 28: 296-302.
 35. 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. Effects on endothelial NAD(P)H oxidase system. *Circ Res.* 2003; 93: 767-775.
 36. YAMAKAWA T, TANAKA S, NUMAGUCHI K, YAMAKAWA Y, MOTLEY ED, ICHIHARA S, et al. Involvement of Rho-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 2000; 35: 313-318.
 37. LI F, XIA W, YUAN S, SUN R. Acute inhibition of Rho-kinase attenuates pulmonary hypertension in patients with congenital heart disease. *Pediatr Cardiol.* 2009; 30: 363-6.
 38. ISHIKURA K, YAMADA N, ITO M, OTA S, NAKAMURA M, ISAKA N, et al. Beneficial acute effects of rho-kinase inhibitor in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ J.* 2006; 70: 174-8.
 39. FUKUMOTO Y, MATOBA T, ITO A, TANAKA H, KISHI T, HAYASHIDANI S, et al. Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. *Heart.* 2005; 91: 391-2.
 40. KITA T, HATA Y, KANO K, MIURA M, NAKAO S, NODA Y, et al. Transforming growth factor-beta2 and connective tissue growth factor in proliferative vitreoretinal diseases: possible involvement of hyalocytes and therapeutic potential of Rho kinase inhibitor. *Diabetes.* 2007; 56: 231-8.
 41. KISHI T, HIROOKA Y, MASUMOTO A, ITO K, KIMURA Y, INOKUCHI K, et al. Rho-kinase inhibitor improves increased vascular resistance and impaired vasodilation of the forearm in patients with heart failure. *Circulation.* 2005; 111: 2741-7.