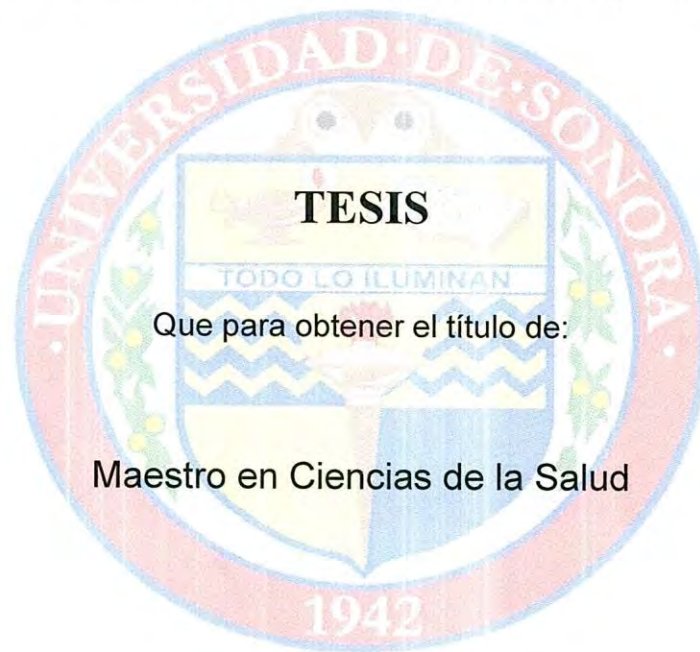


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

Expresión de Metaloproteinasas de la Matriz y su Inhibidor Tisular
En Hipertrofia Cardíaca Durante la Preñez y el Posparto



TESIS

Que para obtener el título de:

Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta:
Saraí Limón Miranda

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2013

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



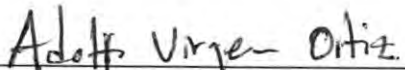
"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Forma de Aprobación

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Saraí Limón Miranda**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



Dr. Adolfo Virgen Ortiz
Director Académico



Dr. Eduardo Ruiz Bustos
Secretario

Dr. J. Jesús Muñiz Murguía
Vocal



Dr. Carlos Velázquez Contreras

Suplente

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por ser ese lugar donde se hace historia, donde se materializan sueños y se aprende a vivir la vida con gratitud.

Gracias al coordinador del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud al Dr. Eduardo Ruiz Bustos, por su asesoría y apoyo desde el inicio de este proyecto, sobre todo por el tiempo y la atención dedicados a mi trabajo de tesis.

Mi sincero agradecimiento a los Dr. J. Jesús Muñiz Murguía y al Dr. Carlos Velázquez por su asesoría, sus observaciones así como por la disposición y apoyo para la realización del presente proyecto de tesis.

A la Universidad de Colima y a sus dignos representantes quienes nos brindaron todas las facilidades técnicas y de asesoría para el cumplimiento de esta meta, especialmente al Dr. J. Jesús Muñiz Murguía y al Biólogo Víctor Gutiérrez del laboratorio de Fisiología Muscular del Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas de la UCOL.

Gracias a mis compañeros de laboratorio por su compañía y apoyo con tantas horas de trabajo en el laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de la Universidad de Sonora Unidad Regional Sur, para alcanzar nuestras metas. ¡Gracias!

Agradezco al Dr. Adolfo Virgen Ortiz por su paciencia, su guía y asesoría para iniciar y desarrollar este proyecto pero sobre todo, GRACIAS por su habilidad para mostrarnos que la ciencia es la nobleza de los hombres educados encaminados a construir un mejor mundo.

Este proyecto fue financiado por Conacyt-México gracias al proyecto CB- 155238 otorgado al Dr. Adolfo Virgen Ortiz.

DEDICATORIAS

A los hombres de mi vida, mis hijos Maximiliano y Alexander.

INDICE

LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
OBJETIVOS	vii
Objetivo General	vii
Objetivos Específicos	vii
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
La Hipertrofia Cardíaca	3
El Corazón y la Preñez	5
Colagéna en Hipertrofia Cardíaca	9
Vías de Señalización en Hipertrofia Cardíaca Funcional	11
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Población de Estudio	14
Manejo de los Animales y Obtención de Muestras de Tejido Ventricular	14
Determinación de la Concentración de MMP-1	15
Extracción de RNA y PCR en Tiempo Real	15
Cuantificación de la expresión proteica de TIMP-1, MMP-1, MMP-2, MMP-9, Col I y Col III	16
Análisis Estadístico	17
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34

LISTA DE TABLAS

	Página
I Cambios en el corazón observados durante el embarazo y posparto de mujeres sanas	7
II Valores hemodinámicos en la preñez de rata	8

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Cortes histológicos teñidos con hematoxilina eosina.	4
2 Morfología del corazón durante la preñez (P) y no preñez (NP) de ratón.	6
3 Curso temporal del perfil hormonal plasmático durante la preñez de rata.	10
4 Peso del corazón.	19
5 Imagen ilustrativa de western blot para TIMP-1 y GAPDH revelado por quimioluminiscencia.	20
6 Nivel de expresión relativa de TIMP-1 en ventrículo izquierdo de rata.	21
7 Expresión del gen de TIMP-1 en ventrículo izquierdo de rata.	22
8 Niveles de concentración de MMP-1 en ventrículo izquierdo de rata.	23
9 Nivel de expresión relativa de MMP-2 en ventrículo izquierdo de rata.	24
10 Nivel de expresión relativa de MMP-9 en ventrículo izquierdo de rata.	25
11 Nivel de expresión relativa de COL-I en ventrículo izquierdo de rata.	27
12 Nivel de expresión relativa de COL-III en ventrículo izquierdo de rata.	28
13 Regulación del sistema de metaloproteinasas de la matriz en hipertrofia cardíaca funcional inducida por preñez.	32

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la expresión proteica del sistema de metaloproteinasas de la matriz y su inhibidor tisular endógeno así como su impacto en la expresión de Colágenas tipo I y tipo III en el ventrículo izquierdo del corazón de ratas preñadas y en posparto.

Objetivos Específicos

1. Cuantificar la expresión del gen de TIMP-1 y su expresión proteica en ventrículo izquierdo de ratas no preñadas, preñadas y en posparto.
2. Determinar la concentración de MMP-1 en ventrículo izquierdo de ratas no preñadas, preñadas y en posparto.
3. Cuantificar la expresión proteica de colágena tipo I, colágena tipo III, MMP-2 y MMP-9 en ventrículo izquierdo de ratas no preñadas, preñadas y en posparto.

RESUMEN

A nivel mundial y en México las enfermedades cardíacas representan una de las principales causas de muerte en el ser humano. La hipertrofia cardíaca y la fibrosis intersticial son determinantes en la morbilidad y mortalidad por enfermedades cardíacas. Existen investigaciones para conocer los mecanismos moleculares implicados en las alteraciones cardíacas, principalmente en modelos experimentales patológicos, y poca atención se ha prestado a fenómenos como la hipertrofia cardíaca funcional que se manifiesta en el embarazo y es reversible en el posparto. Algunos reportes previos indican que hay una supresión en la expresión de factores antihipertróficos durante la preñez que se revierten en posparto, sin embargo no se han identificado los factores prohipertróficos ni los mecanismos asociados a la disfunción cardíaca presente en el posparto. Estudios preliminares nuestros muestran un aumento en el contenido de colágena de la matriz extracelular en el corazón durante la preñez, que disminuye en el posparto. Estas evidencias nos despertaron el interés por explorar la participación que tiene el sistema de las metaloproteinasas (MMPs) y sus inhibidores endógenos (TIMPs), en la hipertrofia cardíaca inducida por la preñez y su papel en el posparto de rata. Usando metodologías como PCR en tiempo real, ELISA y Western blot, encontramos que en el ventrículo izquierdo aumenta la expresión de TIMP-1 durante la preñez, y disminuyen la concentración de MMP-1, así como disminuye la expresión de MMP-2 y MMP-9. Al analizar las colágenas más importantes de la matriz extracelular, se encontró que la colágena tipo I disminuye en el ventrículo izquierdo en la preñez, y la colágena tipo III aumenta su expresión. En general, los datos obtenidos en esta investigación hacen sugerir que TIMP-1 inhibe MMP-1, MMP-2 y MMP-9, modulando la expresión diferencial, de colágenas tipo I y III en la matriz extracelular en hipertrofia cardíaca inducida durante la preñez de rata.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la hipertrofia cardíaca ha sido ampliamente estudiada en modelos patológicos, pero aunque existen muchas vías de señalización exploradas y estudios terapéuticos, todavía no están esclarecidos por completo los mecanismos de señalización implicados en el desarrollo de la hipertrofia y fenómenos asociados a ella. En este aspecto, la hipertrofia cardíaca funcional que se desarrolla en la preñez y se revierte después del parto, parece ser un modelo muy interesante de estudio en la búsqueda de mecanismos fisiológicos que reviertan la hipertrofia cardíaca. La información reportada en la bibliografía relacionada al tema es mínima. Por otra parte, el incremento en la tasa metabólica de la hembra preñada demanda un corazón más eficiente, con capacidad para expulsar un mayor volumen sistólico. El llenado diastólico, durante la relajación muscular, es un factor importante para asegurar el aumento del gasto cardíaco. Por tanto, dos eventos son fundamentales para favorecer el manejo de un mayor volumen sanguíneo; por una parte la hipertrofia cardíaca excéntrica que se desarrolla durante la preñez, y por la otra una mayor distensibilidad de las paredes miocárdicas previamente demostrada en experimentos realizados por Virgen y col. (2004). En estos dos eventos importantes que ocurren durante la preñez, podría estar participando de forma relevante la colágena (proteína de la matriz extracelular), las metaloproteinasas de la matriz (MMPs; enzimas claves en el balance de síntesis y degradación de las colágenas), y los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs). De lo anterior, consideramos de suma importancia realizar estudios en hipertrofia cardíaca usando modelos reversibles, que a futuro nos permitan conocer en detalle todos los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la misma, de tal forma que nos permita diseñar mejores estrategias terapéuticas para revertirla y de esta manera, reducir la mortalidad que se presenta en la actualidad por este tipo de disfunciones cardíacas. En el presente trabajo se

encontró que en la preñez, el inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP-1) aumenta su expresión en el tejido cardíaco para atenuar la actividad de metaloproteinasas de la matriz (MMPs) favoreciendo la expresión de colágenas, que contribuirán al desarrollo de la hipertrofia cardíaca durante la preñez.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La Hipertrofia Cardíaca

Las enfermedades cardíacas son de las principales causas de muerte en todo el mundo. La hipertrofia cardíaca y la fibrosis intersticial son respuestas del corazón a todas las formas de daño, y son las principales determinantes de la morbilidad y mortalidad por enfermedades cardíacas (Assayag y col., 1997; Haider y col., 1998). La hipertrofia cardíaca, se define como el incremento en el tamaño del corazón y/o volumen miofibrilar sin un cambio en el número de miocitos. La hipertrofia le permite al miocardio adaptarse ante alteraciones funcionales por sobrecarga asociada a un desafío fisiológico (por ejemplo, un incremento en la demanda de volumen sanguíneo como ocurre en el embarazo y en atletas de alto rendimiento) o un daño (Wilkins y Molkentin, 2002). Está ampliamente validado que el entrenamiento físico incrementa la capacidad cardiovascular y la calidad de vida de los individuos, y reduce la mortalidad en pacientes con falla cardíaca (Belardinelli y col., 1999; Willenheimer y col., 1998). Estos efectos pueden obtenerse sin un crecimiento importante en el tamaño del corazón como se ha demostrado en animales experimentales (Mokelke y col., 1997; Moore y col., 1993). También se sabe que la hipertrofia cardíaca observada en los atletas profesionales es reversible (Shepard, 1996; Longhurst y Stebbins, 1997).

Se han caracterizado dos tipos de hipertrofia cardíaca, una ocasionada por la sobrecarga de presión, y otra por la sobrecarga de volumen. La hipertrofia por la sobrecarga de presión es de forma concéntrica, hay alargamiento del ápex, y engrosamiento de las paredes miocárdicas (Shimoyama y col., 1999; Van Eickels y col., 2001). Este tipo de hipertrofia es muy común en situaciones como la hipertensión arterial (Figura 1).

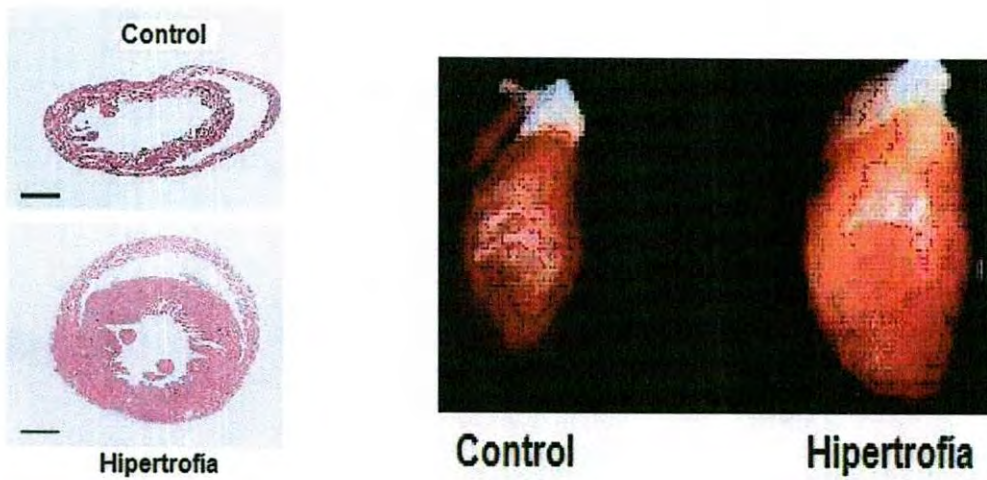


Figura 1. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina eosina donde se aprecia el engrosamiento de las paredes miocárdicas durante la hipertrofia por sobrecarga de presión (panel izquierda), y en el panel de la derecha se observa el alargamiento del ápex.

Fuente: Shimoyama y col., 1999; Van Eickels y col., 2001.

En la hipertrofia por sobrecarga de volumen, como se puede apreciar en la figura 2, el corazón tiene un crecimiento excéntrico con un incremento en el diámetro transversal y se observa un ápex redondeado (Brower y Janicki, 2001; Eghbali y col., 2005). Este tipo de hipertrofia está presente en algunas alteraciones como en las insuficiencias valvulares cardíacas, y en casos fisiológicos adaptativos reversibles como el embarazo y en atletas de alto rendimiento.

El Corazón y la Preñez

Tanto en humanos como en ratas, durante la preñez se presenta (Tabla I y II): desarrollo de hipertrofia cardíaca, aumento del 30-40% en el gasto cardíaco, disminución de la resistencia vascular periférica, incremento del volumen por latido, incremento de un 40% en el volumen sanguíneo, aumento de la frecuencia cardíaca, disminución de la presión sanguínea media durante el segundo y tercer trimestre, disminución del tiempo de eyección del ventrículo izquierdo a lo largo de todo el periodo de gestación y también, aumento en la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona, flujo sanguíneo renal y tasa de filtración glomerular (Katz y col., 1978; Capeless y Clapp, 1989; Gilson y col., 1992; Mabie y col., 1994; Slangen y col., 1997; Chapman y col., 1997; Spaanderman y col., 2000).

Se acepta que la hipertrofia es iniciada por el estrés sobre las paredes miocárdicas (Grossman y col., 1975; Nagatomo y col., 1999); en el caso de la preñez, la distensión durante el llenado ventricular es una de las señales que inicia la hipertrofia. La hipertrofia por sobrecarga de volumen generalmente es menor que la producida por sobrecarga de presión (Nagamoto y col., 1999; Spaanderman y col., 2000). Otros factores, entre ellos las hormonas esteroideas, cuya tasa de secreción se incrementa notablemente en la preñez

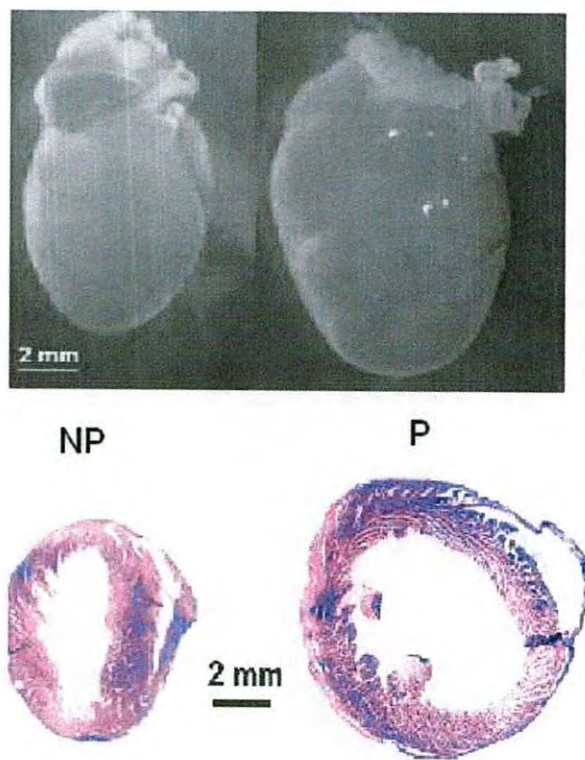


Figura 2. Morfología del corazón durante la preñez (P) y no preñez (NP) de ratón. Se aprecian las diferencias tanto en la fotografía tomada como en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina.

Fuente: Brower y Janicki, 2001; Eghbali y col., 2005.

Tabla I. Cambios en el corazón, observados durante el embarazo y posparto de mujeres sanas.

	1er. Trimestre	2do. Trimestre	3er. Trimestre	Posparto
Tiempo de eyección del LV (ms)	302 ± 2.0	290 ± 5.0	281 ± 4.0	310 ± 5.0
Dimensión de LA (mm)	35.4 ± 0.8	38.3 ± 0.9	40.3 ± 0.9	36.1 ± 0.8
Masa del LV (g)	167 ± 8.2	150 ± 8.5	162 ± 8.3	142 ± 6.2

LV = Ventrículo izquierdo, LA = Aurícula izquierda (Katz y col., 1978).

Tabla II. Valores hemodinámicos en la preñez de rata.

	día 4	día 6	día 8	día 10	día 18
HR, latidos / min					
P	373 ± 21	375 ± 9	377 ± 10	374 ± 16	408 ± 24
NP	358 ± 21	369 ± 26	365 ± 21	359 ± 11	368 ± 25
MAP, mmHg					
P	125 ± 12	112 ± 8	107 ± 9	110 ± 7	101 ± 10
NP	121 ± 8	112 ± 7	109 ± 3	113 ± 6	117 ± 7

Frecuencia cardíaca (HR, pulsos / min) y presión arterial media (MAP, mmHg) en ratas no preñadas (NP) y preñadas (P) a lo largo del periodo de preñez (Slangen y col., 1997).

(Figura 3), podrían ser señales relevantes en el proceso cardíaco, pero aún no han sido esclarecidas.

En resumen, aun cuando la hipertrofia cardíaca durante la preñez esté bien documentada, los mecanismos moleculares que la producen o asociados a ella, se desconocen.

Colagéna en Hipertrofia Cardíaca

La matriz extracelular del miocardio está compuesta de una red compleja de proteínas estructurales, principalmente colágena de los tipos I y III, las cuales proveen un soporte a la arquitectura de las células musculares del corazón y por lo tanto juegan una función importante en el desempeño del mismo. En varios estudios de hipertrofia cardíaca patológica inducida por diferentes modelos, se han reportado cambios importantes en el contenido de colágena, principalmente incremento en la expresión de colágena tipo I, mientras que los cambios en colágena tipo III son más controversiales ocasionados quizás por los diferentes modelos de estudio (Lapierre y col., 1977; Borg y Caulfield, 1981; Weber, 1989; Bishop y col., 1990; Marijjanowski y col., 1995; Yoshikane y col., 1992).

El cociente de expresión de isoformas de colágena en el corazón (Col I / Col III) ha tomado gran significancia porque contribuye a la regulación de las propiedades mecánicas pasivas del miocardio. Por ejemplo, tejidos que expresan una gran cantidad de colágena I son duros y se resisten a la distensión, mientras aquellos que poseen en su estructura una gran cantidad de colágena tipo III se caracterizan por tener una gran elasticidad (Pauschinger y col., 1999). De esta forma en las hipertrofias cardíacas de origen patológico, un incremento en el contenido de colágena (fibrosis), principalmente del tipo I, compromete la función mecánica del corazón ya que al disminuir la distensibilidad de las paredes miocárdicas, limita el llenado sanguíneo en el

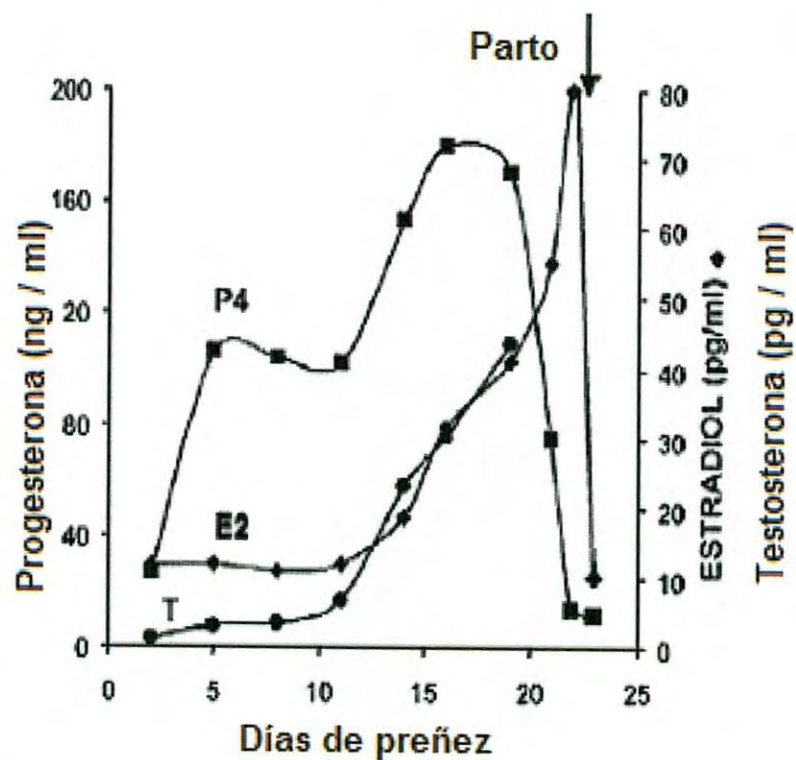


Figura 3. Curso temporal del perfil hormonal plasmático durante la preñez de rata. Se midieron los niveles de estradiol (E2), progesterona (P4) y testosterona (T) durante la preñez y un día después del parto (LaPolt y col., 1986).

Ventrículo durante la diástole y reduce el volumen de eyección, entre las alteraciones que ocasiona.

En este punto las metaloproteinasas de la matriz (MMP), una familia de enzimas proteolíticas dependientes del Ca^{++} como cofactor para su activación, juegan una función muy importante para el remodelamiento de la matriz extracelular y la degradación de sus componentes. Dentro de la clasificación de las MMPs se encuentra la MMP-1, enzima responsable de la degradación de las colágenas de tipo intersticial como son la colágena tipo I, II y III (McDonnell y col., 1999). Estudios de la actividad enzimática de la MMP-1 resultan interesantes, ya que son cruciales en regular la arquitectura de la matriz extracelular que al modificarse tiene, implicaciones directas en la funcionalidad del corazón.

Vías de Señalización en Hipertrofia Cardíaca Funcional

En el posparto la función sistólica y la masa ventricular retornan a sus valores normales; algunos estudios reportan que cambios en la geometría y volumen ventricular, gasto cardíaco, y resistencia sistémica, pueden prevalecer hasta por un año después del parto a pesar de remover la carga de volumen. Los mecanismos que subyacen a la rápida reversión de la hipertrofia cardíaca fisiológica no están bien estudiados. Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), son factores de transducción de señales intracelulares que promueven hipertrofia cardíaca a través de activación de proteínas como PI3K y Akt (conocida como proteína cinasa B). Las 3 MAPKs mejor caracterizadas incluyen a p38, JNK (Cinasa NH_2 terminal de c-Jun) y ERK1/2 (Cinasa señal regulada extracelular). Las ERK1/2 han sido propuestas para regular la contracción del músculo liso y promover hipertrofia. Es activada por estiramiento mecánico y estímulo mitogénico, están asociadas a crecimiento de la vasculatura uterina y un dramático incremento del flujo sanguíneo de la

arteria uterina durante el embarazo. Recientes reportes demostraron que la activación persistente de p38 y JNK, puede promover apoptosis resultando en dilatación cardíaca y disfunción. Linke y col. (2002) demostraron que la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) está aumentada en el miocardio de ratas preñadas y retorna a niveles control 4 días después del parto. La enzima eNOS miocárdica parece incrementar la expresión en varios lechos vasculares en el embarazo, y recientes estudios sugieren a NO como un mediador de la caída en la resistencia vascular. Un mediador importante en la activación del eNOS es Akt, el cual fosforila a eNOS. Akt puede también inducir apoptosis. La activación de la ERK puede tener un efecto inhibitorio sobre la activación de eNOS mediada por Akt en algunos lechos vasculares. Resultados de Gonzalez y col. (2007), muestran que durante el embarazo el aumento de la masa de ventrículo izquierdo y la disminución de la fracción de eyección, ocurren de forma paralela con una disminución de factores antihipertróficos (p38 y JNK). También observaron una reversión de la hipertrofia cardíaca en el posparto, acompañada de un aumento en la expresión de factores antihipertróficos (p38 y JNK). Adicionalmente, González y col. (2007) reportaron que Akt disminuye su expresión en el miocardio durante la preñez, y que eNOS no se modifica durante la preñez (mismo hallazgo encontrado por Jankowski y col., 2005) pero aumenta su expresión el día 14 posparto.

Los estrógenos estimulan la sintasa de óxido nítrico en varios órganos incluyendo el corazón, en asociación con un aumento de guanosina monofosfato cíclico (cGMP), el segundo mensajero del NO. Existen reportes que hacen sugerir que eNOS está involucrado en hipertrofia cardíaca; ratones "nockout" de eNOS desarrollan fenotipo hipertrófico a los 5 meses de edad, manifestación que es acompañada por un aumento del péptido natriurético atrial (ANP). El ANP y el péptido natriurético de cerebro (BNP) se producen principalmente en aurícula cardíaca y ventrículos, respectivamente, ambos se liberan a circulación e influyen sobre el volumen sanguíneo y la presión. La

expresión cardíaca de ANP está influenciada por los niveles elevados de estradiol en la preñez. Brown y col. (1993), mostraron que un aumento en la expresión transcripcional del receptor del péptido natriurético en el corazón, está asociado a hipertrofia cardíaca patológica en la rata, sin embargo en hipertrofia funcional sus modificaciones no están correlacionadas directamente a la expresión del ANP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de Estudio

Se utilizó un total de 30 ratas hembra jóvenes, de la cepa Sprague-Dawley, de dos meses de edad (200 - 250 g), donadas por el bioterio del Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Colima. El diseño para el estudio consistió en 3 grupos experimentales: Un grupo control de ratas no preñadas (NP, n=10), un grupo de ratas preñadas de 18 días (P18, n=10) y un grupo de ratas en posparto (PP, n= 10).

Manejo de los Animales y Obtención de Muestras de Tejido Ventricular

Las ratas fueron tratadas de acuerdo con la "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (US Department of Health, NIH)". Se mantuvieron en jaulas individuales en un cuarto con humedad y temperatura controlada, con ciclos de 12 hrs luz- 12 hrs oscuridad. Se alimentaron con Nutricubos para roedores (Purina) y agua siguiendo una dieta *ad limitum*.

Para la obtención de muestras las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de anestésico (Pentobarbital sódico). Posteriormente el corazón fue extirpado rápidamente por medio de una toracotomía medial y sumergido en solución de Tyrode normal oxigenado con una mezcla de 95% O₂ + 5% CO₂ a temperatura ambiente (24°C). Después de obtener el peso húmedo en una balanza de pesada rápida (Sartorius Corporation, Edgewood, NY, USA), se procedió a la disección del ventrículo izquierdo con el corazón sumergido en la solución de Tyrode normal en una caja de Petri. Finalmente, el ventrículo izquierdo fue congelado y almacenado a -80°C hasta su análisis.

Determinación de la Concentración de MMP-1

La cantidad de MMP-1 en el ventrículo izquierdo de los tres grupos experimentales (NP, P18 y PP) fue medida mediante la técnica de ELISA siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (MMP-1, Biotrak Amersham Pharmacia Biotech, United Kingdom). La concentración de MMP-1 fue expresada en ng/mL.

Extracción de RNA y PCR en Tiempo Real

El RNA fue extraído a partir de ventrículo izquierdo congelado usando el reactivo Trizol y el procedimiento recomendado por su fabricante (Invitrogen, Life Technologies). Se adquirieron "primers" específicos para estudiar la expresión del gen TIMP-1 (gen problema, F: 5'-GCAAAAGGCCTTCGTAAAGA-3' y R: 5'-ATGGCTGAACAGGGAAACAC-3') y de un gen constitutivo como control (gen de GAPDH, F: 5'-GCATCTTCTTGTGCAGTGCCA-3' y R: 5'-CCACCCTGTTGCTGTAGCC-3').

Se realizó una transcripción reversa seguida de una amplificación del cDNA usando el kit One-Step RT-PCR y sondas Taqman de Roche. La reacción se llevó a cabo en un termociclador de tiempo real Light Cycler 2.0 de Roche.

La expresión relativa del gen de TIMP-1 fue analizada siguiendo el método descrito por Michael W. Pfaffl (2001), el cual calcula la expresión relativa de un gen problema en una condición control vs experimental en comparación con un gen de referencia:

$$\text{Expresión relativa} = (E_{\text{problema}})^{\Delta CP(\text{Control-experimental})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta CP(\text{Control-experimental})}$$

Donde “*E*” representa la eficiencia de amplificación de la PCR en tiempo real, y la variación de “*CP*” representa la diferencia de amplificación entre el grupo control y el grupo experimental.

Cuantificación de la Expresión Proteica de TIMP-1, MMP-1, MMP-2, MMP-9, Col I y Col III

Cuantificación de Proteínas Totales en los Extractos por el Método de Bradford

Se realizó una curva estándar de proteína, para lo cual se preparó una solución patrón de 1 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA); a partir de ésta se preparó una serie de diluciones adicionando 1, 2, 4, 6, 8 y 10 μ L de la solución patrón, las cuales contenían 1, 2, 4, 6, 8 y 10 μ g de proteína, respectivamente. Las diluciones fueron preparadas adicionando el volumen indicado de la solución patrón más agua desionizada, hasta alcanzar un volumen de 50 μ L y finalmente se adicionaron 200 μ L del reactivo de Bradford (Azul de Coomassie 0.1%, etanol 5% y ácido fosfórico 10 %), se mezcló suavemente y se procedió a medir la absorbancia de las diluciones a 595 nm en un espectrofotometro para microplacas. Las absorbancias obtenidas fueron graficadas para obtener la curva estándar de proteína (Ausubel y col., 2003). Las diluciones fueron preparadas por duplicado. Con la curva estándar se determinó la concentración de proteínas totales en los extractos experimentales de ventrículo izquierdo.

Electroforesis

Se prepararon geles SDS-PAGE al 10% de acuerdo al sistema de Laemmli. Se cargaron 50 μ g de proteína total en cada carril y un marcador de masa molecular. Se realizó el corrimiento a 100 volts durante 3 horas, y posteriormente se revisó la calidad de las bandas y la separación electroforética con la tinción de Coomassie.

Western-blot

Se realizó una electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa a 110 mA durante 2 horas usando un sistema de transferencia semiseco. Posteriormente se corroboró la eficiencia de la transferencia con la tinción de Ponceau; posteriormente se procedió a bloquear las membranas con solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario (anti-TIMP1, anti-MMP-2, anti-MMP-9, anti-Col I, anti-col III y anti-GAPDH) a diferentes diluciones (1:200, 1:500, 1:500, 1:500, 1:500 y 1:2000) durante toda la noche a 4 °C. Después, la membrana se incubó con anticuerpo secundario anti-especie conjugado a peroxidasa de rábano durante 2 hrs a 25°C. Finalmente, se realizó el revelado de las membranas en placas fotográficas, usando la técnica quimioluminiscente de Amersham y soluciones de revelado de Kodak. Las imágenes fueron adquiridas usando un sistema digital de Kodak Science y posteriormente se realizó un análisis densitométrico de las bandas de expresión con el programa Image J (NIH, Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos).

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron expresados como la media \pm error estándar, y los grupos experimentales fueron comparados con un análisis de varianza de un factor usando pruebas pos hoc adecuadas. Se usó un nivel de significancia de la prueba del 95%. Se determinó Sesgo y Curtosis para determinar si son datos de tipo paramétrico o no paramétrico. Para los datos que siguieron una distribución semejante a la curva normal, se utilizó una prueba pos hoc de Tukey para comparar más de 2 grupos independientes de igual tamaño (como es nuestro caso con una $n= 10$ para cada grupo), mientras que los datos con una distribución no paramétrica se utilizó una prueba pos hoc Kruskal Wallis.

RESULTADOS

Primero se evaluó el cambio en la masa del corazón para determinar el desarrollo de hipertrofia cardíaca por preñez, y como se muestra en la figura 4 a los 18 días de preñez hay hipertrofia cardíaca significativa que se revierte a los 7 días posparto.

Se determinó la expresión del inhibidor tisular de metaloproteinasa 1 (TIMP-1) mediante western blot, y como se aprecia en las figuras 5 y 6, la expresión de TIMP-1 aumentó significativamente ($p < 0.05$) en el ventrículo izquierdo de ratas preñadas, y durante el posparto se observa una disminución de la expresión respecto al grupo de ratas preñadas.

También se determinó el nivel de expresión del gen de TIMP-1 por PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos (figura 7) muestran un incremento significativo ($p < 0.05$) en la expresión en ventrículo izquierdo a los 18 días de preñez que se revierte a los 7 días posparto.

Como se muestra en la figura 8, la concentración de la metaloproteinasa de la matriz-1 (MMP-1) cuantificada por la técnica de ELISA, nos indica una disminución significativa ($p < 0.05$) en el ventrículo izquierdo durante la preñez y una reversión a niveles normales a los 7 días posparto.

Al cuantificar los niveles de expresión de las proteínas MMP-2 y MMP-9 usando western-blot se encontró que la expresión de MMP-2 disminuye significativamente durante la preñez y se mantiene disminuida a los 7 días posparto ($p < 0.05$) (Figura 9), mientras que la MMP-9 disminuye significativamente durante la preñez y se revierte a los 7 días posparto ($p < 0.05$) (Figura 10).

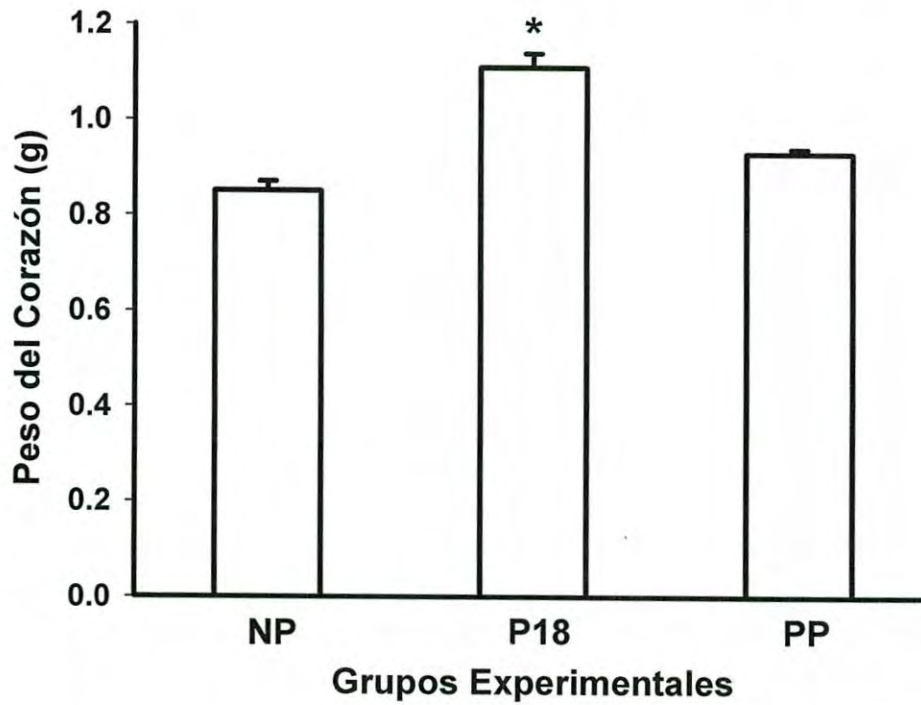


Figura 4. Peso del corazón. Los grupos experimentales están representados como no preñadas (NP), preñadas de 18 días (P18), y posparto de 7 días (PP). n=10, *Diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo NP. Significancia $p \leq 0.05$.

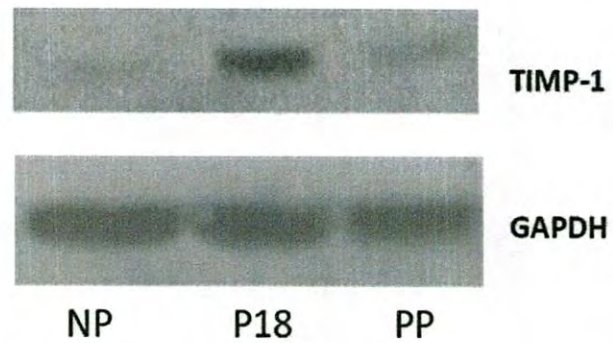


Figura 5. Imagen ilustrativa de western blot para TIMP-1 y GAPDH revelado por quimioluminiscencia. Los grupos experimentales están representados como no preñadas (NP), preñadas (P18), y posparto (PP).

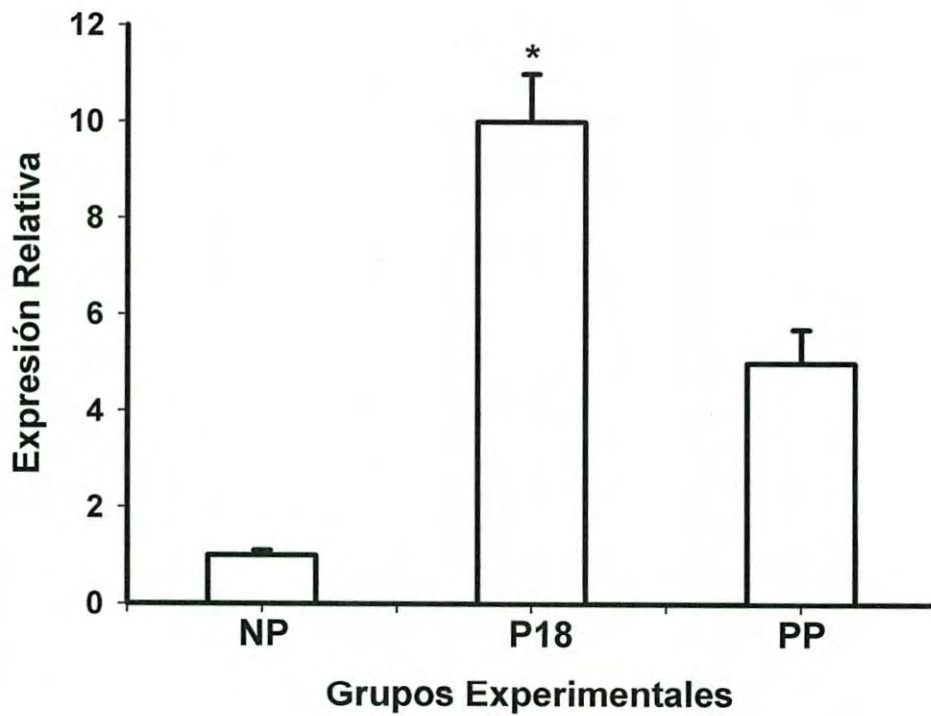


Figura 6. Nivel de expresión relativa de TIMP-1 en ventrículo izquierdo de rata. NP, no preñada; P18, preñada de 18 días; PP, posparto de 7 días. n=10, *Diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo NP. Significancia $p \leq 0.05$.

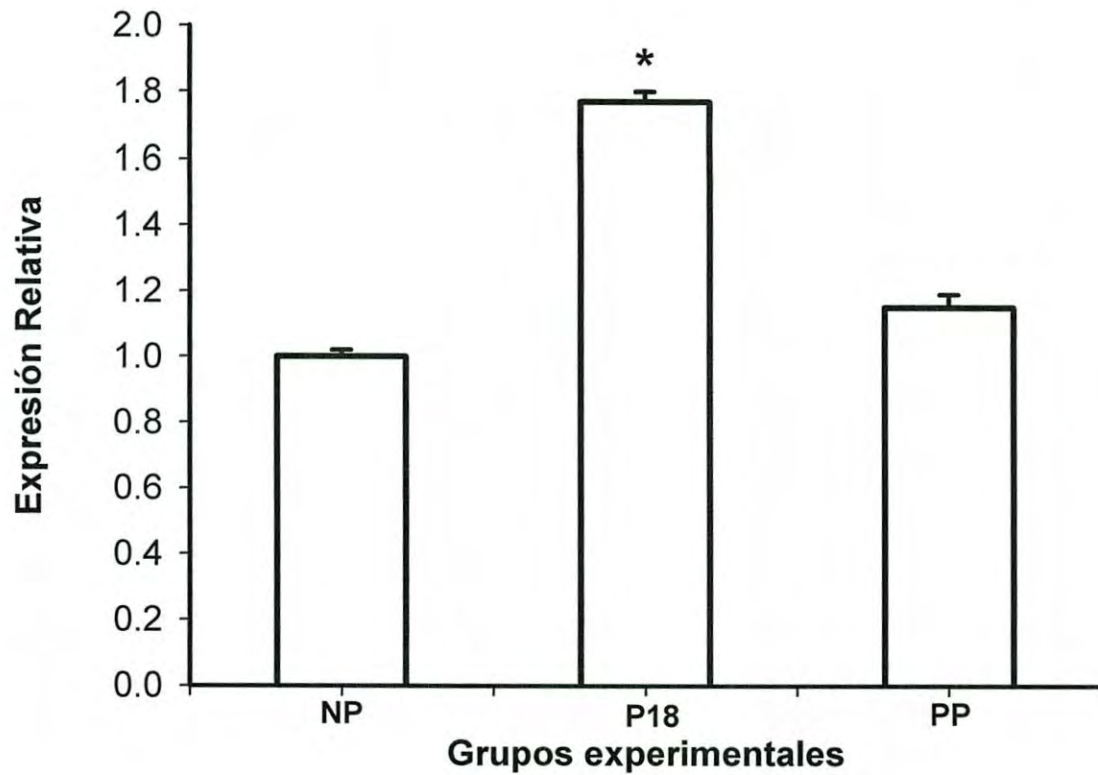


Figura 7. Expresión del gen de TIMP-1 en ventrículo izquierdo de rata. NP, no preñada; P18, preñada de 18 días; PP, posparto de 7 días. n=10, *Diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo NP. Significancia $p \leq 0.05$.

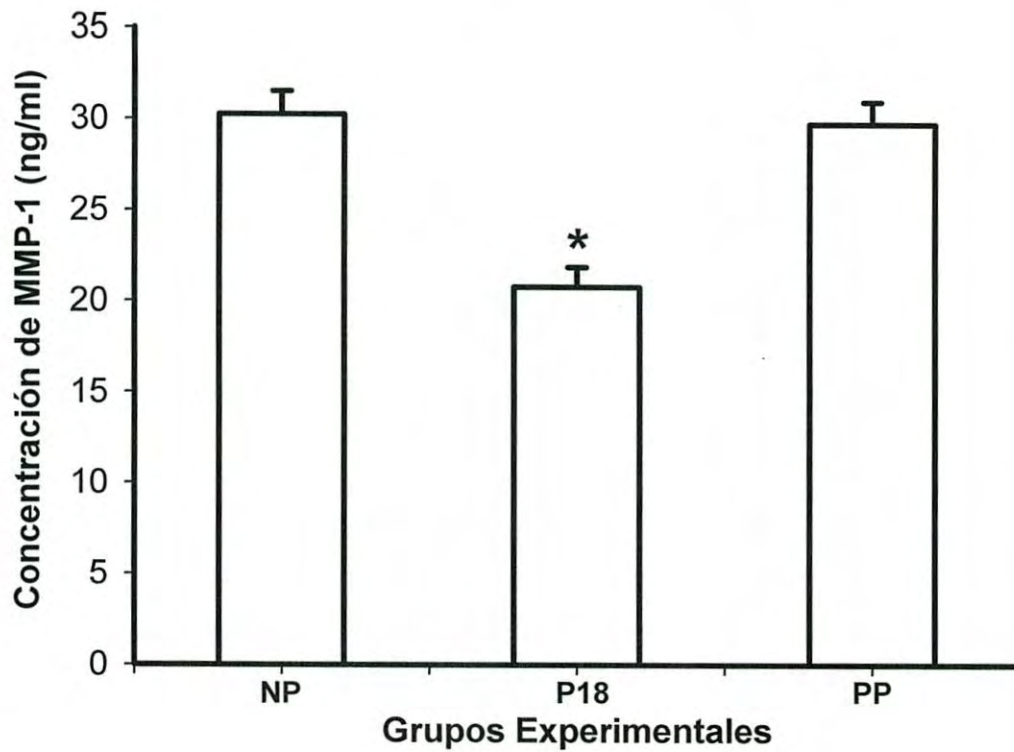


Figura 8. Niveles de concentración de MMP-1 en ventrículo izquierdo de rata. NP, no preñada; P18, preñada de 18 días; PP, posparto de 7 días. n=10, *Diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo NP. Significancia $p \leq 0.05$.

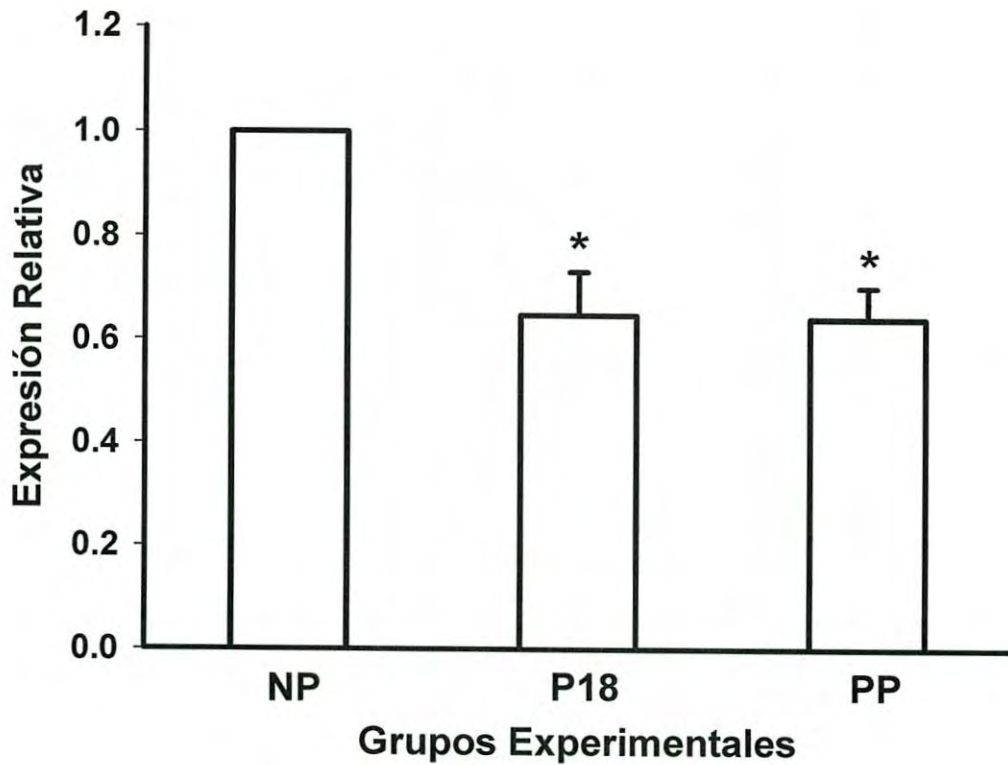


Figura 9. Nivel de expresión relativa de MMP-2 en ventrículo izquierdo de rata. NP, no preñada; P18, preñada de 18 días; PP, posparto de 7 días. n=10, *Diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo NP. Significancia $p \leq 0.05$.

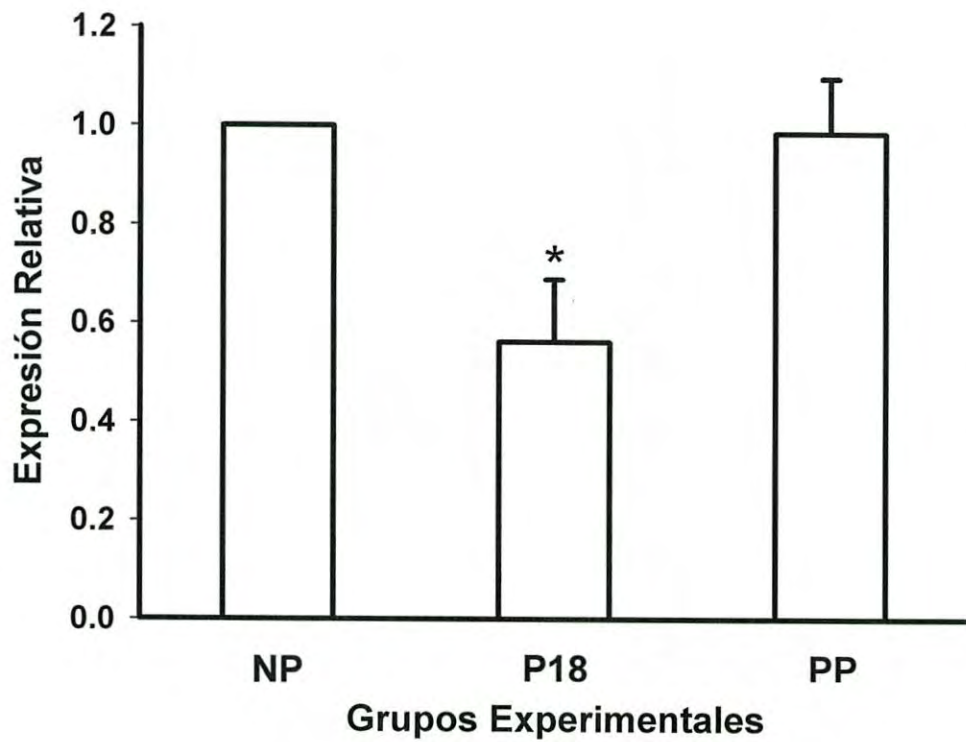


Figura 10. Nivel de expresión relativa de MMP-9 en ventrículo izquierdo de rata. NP, no preñada; P18, preñada de 18 días; PP, posparto de 7 días. n=10, *Diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo NP. Significancia $p \leq 0.05$.

Después de evaluar la expresión de metaloproteinasas de la matriz y su inhibidor tisular, se cuantificó su influencia sobre la expresión de colágenas tipo I y tipo III. Los datos obtenidos en los experimentos muestran que la Col I disminuye su expresión en el ventrículo izquierdo durante la preñez y se mantiene disminuida significativamente a los 7 días posparto ($p < 0.05$) (Figura 11). Por otra parte, la Col tipo III aumentó significativamente su expresión en el ventrículo izquierdo a los 18 días de la preñez, y mostró una reversión a los 7 días posparto ($p < 0.05$) (Figura 12).

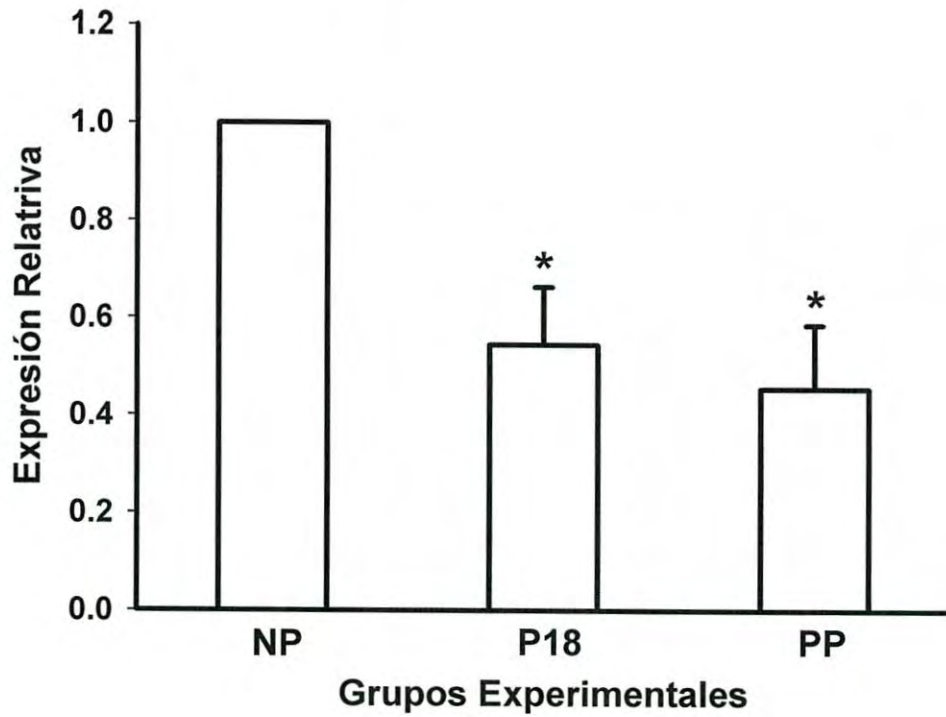


Figura 11. Nivel de expresión relativa de COL-I en ventrículo izquierdo de rata. NP, no preñada; P18, preñada de 18 días; PP, posparto de 7 días. n=10, *Diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo NP. Significancia $p \leq 0.05$.

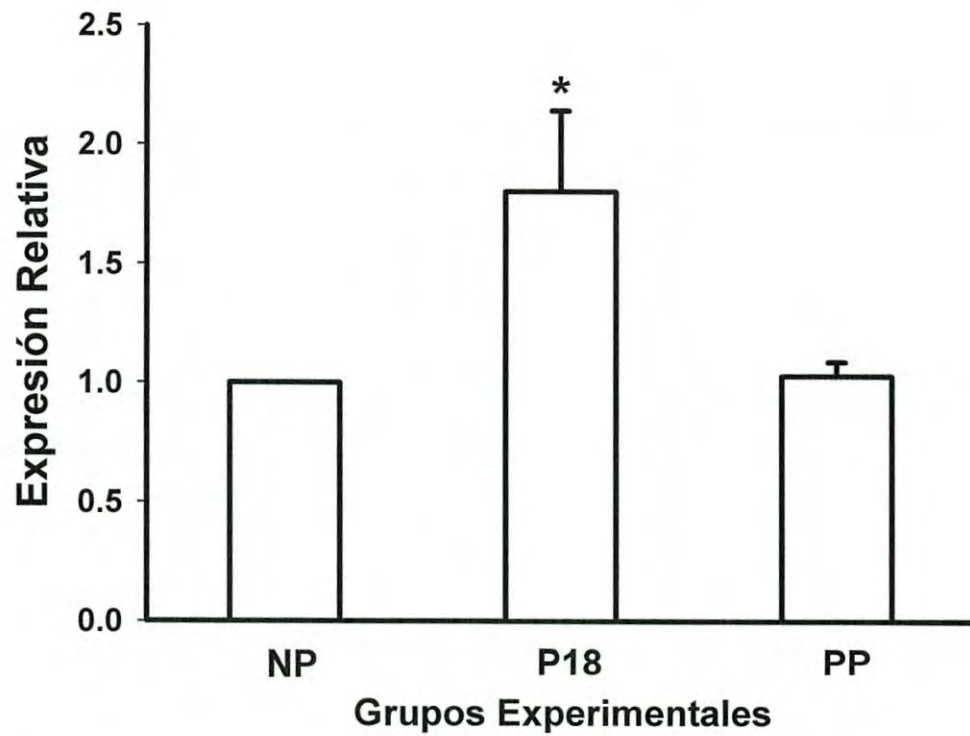


Figura 12. Nivel de expresión relativa de COL-III en ventrículo izquierdo de rata. NP, no preñada; P18, preñada de 18 días; PP, posparto de 7 días. n=10, *Diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo NP. Significancia $p \leq 0.05$.

DISCUSIÓN

La preñez de rata se caracteriza por marcados cambios en el sistema cardiovascular y desarrollo de hipertrofia cardíaca excéntrica de tipo fisiológica que se revierten en el posparto (Eghbali y col., 2005, Virgen-Ortiz y col., 2009). La hipertrofia cardíaca que se desarrolla en la preñez no es acompañada por una hiperplasia celular (Ciulla y col., 2013). Recientemente se han estado estudiando marcadores moleculares para entender el mecanismo de señalización que regula el desarrollo de hipertrofia cardíaca durante la preñez, los modelos empleados han sido principalmente en rata y ratón. Durante la fase tardía de la preñez en ratón no se observaron cambios en la expresión de α -MHC, β -MHC, ANP, fosfolambano, SERCA, BNP, actina alfa esquelética, Hsf1 y C/EBP β (Eghbali y col., 2005; Chung y col., 2012). Por otra lado, en rata no se observaron cambios en la expresión de ANF, BNP, β -MHC, Ankrd-1, PKC, P53 y Casp3 en el corazón durante la preñez; sin embargo, se ha observado una disminución en la expresión de α -MHC, TNF- α , iNOS, eNOS y VEGF (Aljabri y col., 2011). Otra vía molecular de señalización estudiada como un modulador del desarrollo de hipertrofia cardíaca es Akt. En ratones se ha reportado que Akt aumenta su expresión en corazón durante la preñez (Chung y col., 2012); mientras que en rata existen discrepancias, algunos autores reportan una disminución en la expresión de Akt (Gonzalez y col., 2007) y otros un aumento en la expresión de Akt (Lemmens y col., 2011).

Una estructura fundamental para la función cardíaca y poco estudiada durante la hipertrofia cardíaca que se desarrolla en la preñez es la matriz extracelular. Virgen-Ortiz en el 2006, encontró un aumento en el contenido de colágena total en corazones de ratas durante la etapa tardía de la preñez, lo cual se revirtió en el posparto. En nuestro estudio encontramos que durante la preñez aumenta la expresión de colágena tipo III y disminuye la colágena tipo I, es decir el incremento de colágena observado en el corazón durante la preñez,

es por un aumento en la colágena III lo cual da como resultado una mayor distensibilidad de las paredes miocárdicas facilitando el llenado diastólico; esto en el caso de la preñez representa una ventaja fisiológica, mientras que cuando se acumula colágena tipo I las paredes miocárdicas se hacen menos distensibles lo que compromete la función diastólica, como suele ocurrir en hipertrofias de tipo patológico como la ocasionada por la hipertensión arterial.

Las colágenas son reguladas por metaloproteinasas de matriz (Spinale, 2007). En el presente trabajo se estudió la participación que tienen MMP1, MMP2 y MMP9 sobre la expresión de colágenas en ventrículo izquierdo hipertrofiado durante la preñez. Se observaron cambios contundentes en la expresión de MMP2 y MMP9 y en la concentración de MMP1. MMP2 disminuyó su expresión durante la etapa tardía de la preñez y continuó disminuida durante el posparto; en cambio, la expresión de MMP9 disminuyó durante la preñez pero se revirtió durante el posparto. La concentración de MMP1 disminuyó en la preñez y se revirtió en el posparto. La disminución de las metaloproteinasas MMP1, 2 y 9 durante la preñez fue acompañada por un incremento en la expresión del inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP-1). Con estos datos estamos describiendo cambios moleculares a nivel de matriz extracelular que contribuyen a las adaptaciones funcionales que se presentan en hipertrofia cardíaca inducida por la preñez y que no habían sido reportados anteriormente.

Es importante dilucidar la participación que tienen los estrógenos en regular los cambios moleculares que se presentan en el desarrollo de hipertrófica cardíaca inducida por preñez. Algunas vías de señalización que podrían estar involucradas se discuten a continuación. El embarazo se caracteriza por hiperestrogenismo. Mahmoodzadeh y col. en el 2010, trabajando con ratones machos y hembras sometidos a una sobrecarga de presión, demostraron que los ratones macho expresaban mayor cantidad de MMP2 que los ratones hembra. El 17β -estradiol (E2) inhibe a MMP2 por la vía de receptores de estrógeno y MAPK-ERK1/2 en fibroblastos cardíacos. Cuando se activan los

receptores de estrógeno se activan la vía de las MAPK, que lleva a la fosforilación del factor Elk-1, el cual recluta al co-represor que se encuentra en el promotor hMMP2 e impide la transcripción de MMP2. Se sabe que IL-1 β activa a la vía de ERK1/2, demostrado por Xie y col. en el 2004, quienes usando fibroblastos cardíacos inhibieron la vía de ERK1/2 (inducida por IL-1 β), lo que inhibió el aumento en la expresión y actividad de MMP9 pero no de MMP2; esto puede ser porque MMP2 no contiene sitios de unión a AP-1 en su promotor, el cual es formado por dimerización de diferentes miembros de la familia de proteínas Fos y Jun. La expresión de Fos y Jun es regulada por la activación de la vía ERK1/2, lo que muestra que la activación de ERK1/2 es importante para la activación de MMP2. Estos mecanismos requieren de más investigación durante la preñez.

Finalmente, con los datos obtenidos en este proyecto de tesis podemos resumir en la figura 13 la participación del sistema de las metaloproteinasas y su inhibidor endógeno (TIMP-1) durante la hipertrofia cardíaca que se desarrolla en la preñez de rata.

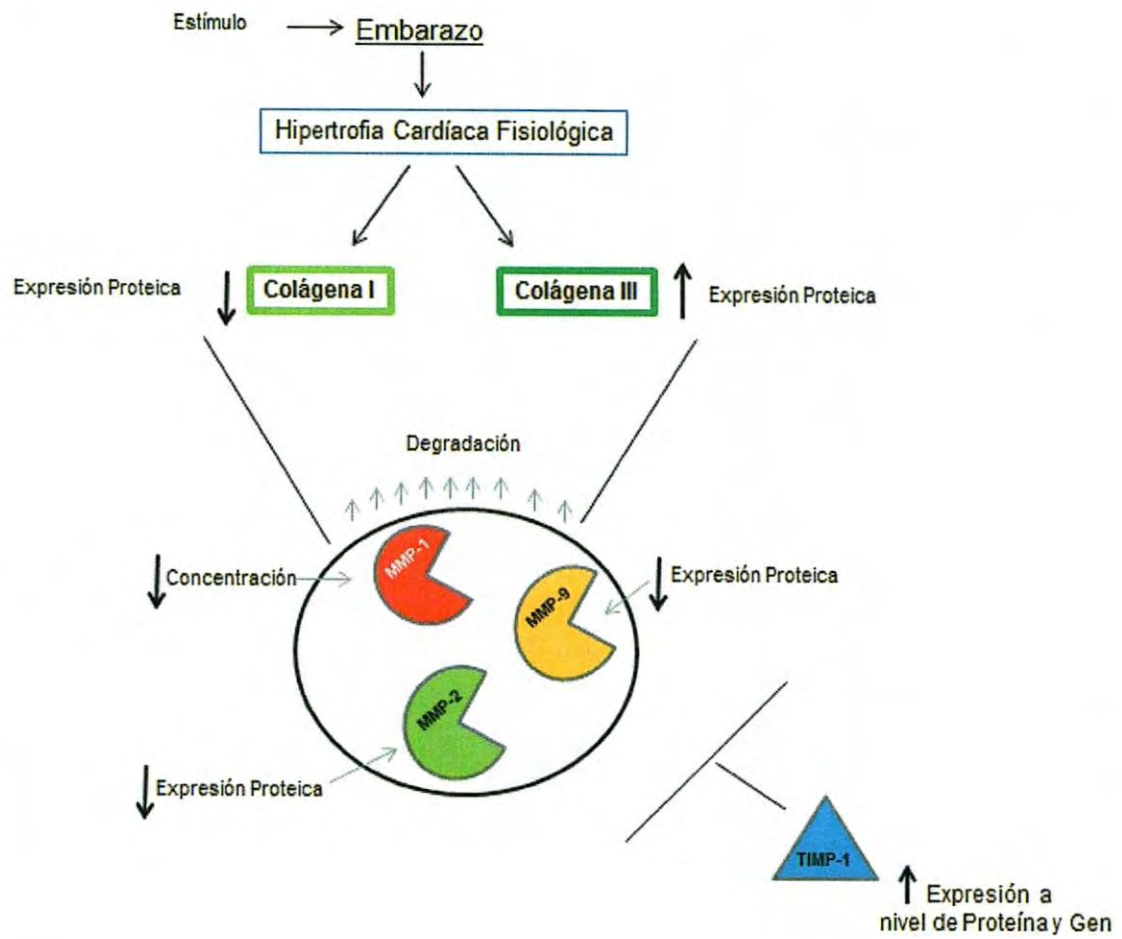


Figura 13. Regulación del sistema de metaloproteinasas de la matriz en hipertrofia cardíaca funcional inducida por preñez.

CONCLUSIONES

A nivel del gen y de la proteína, el inhibidor tisular de metaloproteinasas TIMP-1 presenta un aumento significativo en su expresión en el ventrículo izquierdo a los 18 días de preñez que disminuye a los 7 días posparto. Este aumento provocó una disminución en la concentración de MMP-1 y una disminución en la expresión de las metaloproteinasas de la matriz, MMP-2 y MMP-9 durante la preñez, lo que disminuyó la expresión de la colágena tipo I e incrementó la expresión de colágena tipo III, contribuyendo al remodelamiento de la matriz extracelular en hipertrofia cardíaca inducida por preñez.

BIBLIOGRAFÍA

- Aljabri, M.B., Songstad, N.T., Lund, T., Serrano, M.C., Andreasen, T.V., Al-Saad, S., Lindal S, Sitras V, Acharya G, Ytrehus K. 2011. Pregnancy protects against antiangiogenic and fibrogenic effects of angiotensin II in rat hearts. *Acta Physiol (Oxf)*. 201(4):445-56.
- Assayag, P., Carre, F., Chevalier, B., Delcayre, C., Mansier, P., y Swynghedauw, B. 1997. Compensated cardiac hypertrophy: Arrhythmogenicity and the new myocardial phenotype. I. Fibrosis. *Cardiovasc Res*. 34 (3): 439-44.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., y Struhl, K. 2003. Current protocols in molecular biology. Vol. 2 (Cap. 4, 10 y 14), New York, USA: John Wiley & Sons, In.
- Belardinelli, R., Georgiou, D., Cianci, G., y Purcaro, A. 1999. Randomized, controlled trial of long-term moderate exercise training in chronic heart failure: Effects on functional capacity, quality of life, and clinical outcome. *Circulation*. 99:1173–82.
- Bishop, J.E., Greenbaum, R., Gibson, D.G., Yacoub, M., Laurent, G.J. 1990. Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease. *J Mol Cell Cardiol*. 22:1157–65.
- Borg, T.K., Caulfield, J.B. 1981. The collagen matrix of the heart. *Fed Proc*. 40: 2037–41.
- Brower, G.L., Janicki, J.S. 2001. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 280 (2): H674-83.

- Brown, L.A., Nunez, D.J., Wilkins, M.R. 1993. Differential regulation of natriuretic peptide receptor messenger RNAs during the development of cardiac hypertrophy in the rat. *Journal of Clinical Investigation*. 92: 2702–12.
- Capeless, E.L., Clapp, J.F. 1989. Cardiovascular changes in early phase of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 161:1449–53.
- Chapman, A.B., Zamudio, S., Woodmansee, W., Merouani, A., Osorio, F., Johnson, A., Moore, L.G., Dahms, T., Coffin, C., Abraham, W.T., Schrier, R.W. 1997. Systemic and renal hemodynamic changes in the luteal phase of the menstrual cycle mimic early pregnancy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 273: F777–F782.
- Chung, E., Yeung, F., Leslie, A. Leinwand. 2012. Akt and MAPK signaling mediate pregnancy-induced cardiac adaptation. *Journal of Applied Physiology*. 112:1564-75.
- Ciulla, M.M., Acquistapace, G., Perrucci, G.L., Nicolini, P., Toffetti, L., Braidotti, P., Ferrero, S., Zucca, I., Aquino, D., Busca, G., Magrini, F. 2013. Immunohistochemical expression of oncological proliferation markers in the hearts of rats during normal pregnancy. *Biomark Med*. 7(1):119-29.
- Eghbali, M., Deva, R., Alioua, A., Minosyan, T.Y., Ruan, H., Wang, Y., Toro, L., Stefani, E. 2005. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res*. 96(11):1208-16.
- Gilson, G.J., Mosher, M.D., y Conrad, K.P. 1992. Systemic hemodynamics and oxygen transport during pregnancy in chronically instrumented, conscious rats. *Am J Physiol*. 263 (6 Pt 2): H1911-8.
- Gonzalez, M.D., Osorio, J.C., Manlihot, C., Gruber, D., Homma, S., Mital, S. 2007. Hypertrophy signaling during peripartum cardiac remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293: 3008-13.

- Grossman, W., Jones, D., McLaurin, L.P. 1975. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest.* 56: 56-64.
- Haider, A.W., Larson, M.G., Benjamin, E.J., y Levy, D. 1998. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *J Am Coll Cardiol.* 32 (5): 1454-9.
- Jankowski, M., Wang, D., Mukaddam-Daher, S., Gutkowska, J. 2005. Pregnancy alters nitric oxide synthase and natriuretic peptide systems in the rat left ventricle. *J Endocrinol.* 184: 209-17.
- Katz, R., Karliner, J.S., Resnik, R. 1978. Effects of a natural volume overload state (pregnancy) on left ventricular performance in normal human subjects. *Circulation.* 58 (3): 434-41.
- Lapiere, C.M., Nusgens, B., Pierard, G.E. 1977. Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization. *Connect Tissue Res.* 5:21-29.
- LaPolt, P.S., Matt, D.W., Judd, H.L., Lu, J.K.H. 1986. The relation of ovarian steroid levels in young female rats to subsequent estrous cyclicity and reproductive function during aging. *Biol Reprod.* 35: 1131-39.
- Lemmens, K., Doggen, K., Gilles, W. De Keulenaer. 2011. Activation of the neuregulin/ErbB system during physiological ventricular remodeling in pregnancy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 300: H931-H942.
- Linke, A., Li, W., Huang, H., Wang, Z., Hintze, T.H. 2002. Role of cardiac eNOS expression during pregnancy in the coupling of myocardial oxygen consumption to cardiac work. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1208-H1214.
- Longhurst, J.C., Stebbins, C.L. 1997. The power athlete. *Cardiol Clin.* 15: 413-429.

- Mabie, W.C., DiSessa, T.G., Crocker, L.G., Sibai, B.M., y Arheart, K.L. 1994. A longitudinal study of cardiac output in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 170 (3): 849-56.
- Mahmoodzadeh, S., Dworatzek, E., Fritschka, S., Pham, T.H., Regitz-Zagrosek, V. 2010. 17beta-Estradiol inhibits matrix metalloproteinase-2 transcription via MAP kinase in fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 85(4): 719-28.
- Marijianowski, M.M., Teeling, P., Mann, J., Becke,r A. 1995. Dilated cardiomyopathy is associated with an increase in the type I/type III collagen ratio: a quantitative assessment. *J Am Col Cardiol.* 25:1263-72.
- McDonnell, S., Morgan, M., Lynch C. 1999. Role of matrix metalloproteinases in normal and disease processes. *Biochem Soc Trans.* 27: 734–40.
- Mokelke, E.A., Palmer, B.M., Cheung, J.Y., Moore, R.L. 1997. Endurance training does not affect intrinsic calcium current characteristics in rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 273: H1193–H1197.
- Moore, R.L., Musch, T.I., Yelamarty, R.V., Scaduto-RC, J., Se-manchick, A.M., Elensky, M., Cheung, J.Y. 1993. Chronic exercise alters contractility and morphology of isolated rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 264: C1180–C1189.
- Nagatomo, Y., Carabello, B.A., Hamawaki, M., Nemoto, S., Matsuo, T., McDermott, P.J. 1999. Translational mechanisms accelerate the rate of protein synthesis during canine pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol.* 277: H2176–H2184.
- Pauschinger, M., Knopf, D., Petschauer, S., Doerner, A., Poller, W., Schwimmbeck, P.L, Kühl, U., Schultheiss, HP. 1999. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation.* 99(21): 2750-56.

- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9): e45.
- Shepard, R.J. 1996. The athlete's heart: is big beautiful? *Br J Sports Med.* 30: 5-10.
- Shimoyama, M., Hayashi, D., Takimoto, E., Zou, Y., Oka, T., Uozumi, H., Kudoh, S., Shibasaki, F., Yazaki, Y., Nagai, R., Komuro, I. 1999. Calcineurin plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation.* 100 (24): 2449-54.
- Slangen, B.F., Out, I.C., Janssen, B.J., Peeters, L.L. 1997. Blood pressure and heart rate variability in early pregnancy in rats. *Am J Physiol.* 273 (4 Pt 2), H1794-9.
- Spaanderman, M.E., Meertens, M., van Bussel, M., Ekhart, T.H., Peeters, L.L. 2000. Cardiac output increases independently of basal metabolic rate in early human pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278: H1585-H1588.
- Spinale, F.G. 2007. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 87(4): 1285-342.
- Van Eickels, M., Grohe, C., Cleutjens, J.P., Janssen, B.J., Wellens, H.J., Doevendans, P.A. 2001. 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation.* 104 (12): 1419-23.
- Virgen, A., Peraza, A.L., Stefani, E., Toro, L. Muñiz, J. 2004. Changes in Cardiac Tissue Stiffness Associated to Functional Hypertrophy During Pregnancy. 48th Annual Meeting of Biophysical Society, Baltimore, Maryland E.U.

- Virgen-Ortiz, A. 2006. Propiedades mecánicas y moleculares de tejidos cardíacos en hipertrofia funcional durante la preñez. Doctorado en Ciencias Fisiológicas. Universidad de Colima, Colima, Col. Méx.
- Virgen-Ortiz, A., Marin, J.L., Elizalde, A., Castro, E., Stefani, E., Toro, L., Muñiz, J. 2009. Passive mechanical properties of cardiac tissues in heart hypertrophy during pregnancy. *J Physiol Sci.* 59(5):391-6.
- Weber, K.T. 1989. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol.* 13:1637-1652.
- Wilkins, B.J., Molkentin, J.D. 2002. Calcineurin and cardiac hypertrophy: Where have we been? Where are we going? *J Physiol.* 15, 541 (Pt 1): 1-8.
- Willenheimer, R., Erhardt, L., Cline, C., Rydberg, E., Is-raelsson, B. 1998. Exercise training in heart failure improves quality of life and exercise capacity. *Eur Heart J.* 19: 774-81.
- Xie, Z, Singh, M., Singh, K. 2004. Differential regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression and activity in adult rat cardiac fibroblasts in response to interleukin-1beta. *J Biol Chem.* 279(38): 39513-9
- Yoshikane, H., Honda, M., Goto, Y., Morioka, S., Ooshima, A., Moriyama, K. 1992. Collagen in dilated cardiomyopathy: scanning electron microscopic and immunohistochemical observations. *Jpn Circ J.* 56:899-910.

Reg T140007