



Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
Facultad de Ciencias Básicas y Matemáticas
Instituto de Química
Sección Bioquímica

Enzima Convertidora de Angiotensina Homóloga (ECA2)
en la Disfunción Ventricular y remodelamiento miocárdico:
Efecto de la Inhibición de ECA y del Bloqueo de RAT_1

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO

MANUEL ALEJANDRO VARAS GODOY

Diciembre, 2006
Valparaíso-Chile

Director de Tesis: Dra. María Paz Ocaranza J.
Profesor Patrocinante: Dr. Jorge Escobar F

A mi familia con mucho cariño y amor

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. María Paz Ocaranza por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, creer en mí y además por haberme apoyado en los momentos difíciles y ayudarme en mi formación profesional.

También agradezco al Dr. Jorge Escobar por haber patrocinado mi tesis y al Dr. Marco Soto por haber participado en mi comisión.

Los agradecimientos más especiales son dirigidos a mis padres Miguel Varas Aliaga y Maritza Godoy Olivares por apoyarme desde el primer momento que decidí estudiar esta carrera, y por el amor incondicional que me entregaron día a día. A mis hermanos Tamara, Patricio, Pollete y Juan Pablo, por su amistad, preocupación, cariño y apoyo, y en especial a mi abuela Isabel Olivares por comenzar esta aventura y que no alcanzo a terminar conmigo.

Agradezco a mis compañeros y amigos Ricardo Chaura, Alejandro Ramírez, Andrés Gonzáles, Cristian Moscoso, Rodrigo Acuña, Rodrigo Osorio, Christian Cea, Cristian Salinas y a algunos que se pueden quedar en el tintero por su compañía y gran apoyo que me dieron en estos años de estudios.

De muy especial forma quiero agradecer a Marcos Mercado, Cristian Pizarro, Miguel Pizarro, Ricardo Aguilera, Darío Garrido y Edgardo Falcón, amigos que los conocí en otras instancias, pero fueron un gran pilar para mí en los años que estuve fuera de mi hogar y que me acompañaron en los momentos más duros de mi carrera.

A Felipe Apablaza y Juan Eduardo Carreño, personas las cuales logre conocer en mi llegada al laboratorio y que se convirtieron en mis grandes amigos, con los cuales compartí momentos de dulce y de agras en mi proceso, y que fueron mi gran apoyo para lograr terminar con éxito esta tesis. Por ultimo agradezco a todo el laboratorio de cardiología molecular por su apoyo en mi trabajo.

Financiamiento

Esta tesis fue financiada por el Proyecto FONDECYT 1040832; Dra. María Paz Ocaranza y fue realizada en el Laboratorio de Cardiología Molecular del Departamento de Enfermedades Cardiovasculares de la Pontificia Universidad Católica de Chile

INDICE DE CONTENIDOS

<i>Indice de tablas y figuras</i>	6
<i>Resumen</i>	7
<i>Abreviaturas</i>	9
I. INTRODUCCIÓN	11
1. INSUFICIENCIA CARDÍACA, DISFUNCIÓN VENTRICULAR Y REMODELAMIENTO MIOCÁRDICO	11
1.1. Remodelamiento miocárdico	13
2. SRA, VIA CLÁSICA	13
2.1. Vía clásica	13
2.1 ECA	15
2.2 REGULACIÓN DE ECA	16
3. ECA en REMODELAMIENTO MIOCÁRDICO	16
4. SRA, vía paralela	18
4.1 Enzima convertidora de angiotensina I homóloga (ECA2)	19
5. ROL FISIOPATOLÓGICO DE LA ECA2	21
5.1 ECA2 y HTA	21
5.2. ECA-2 Y FUNCIÓN VENTRICULAR	23
6. REGULACIÓN DE ECA	24
II. HIPOTESIS	26
III. OBJETIVOS DEL PROYECTO	26
1. Objetivo general	26
2. Objetivos Especificos	27
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	28
1. Animales	28
2. Reactivos	28
3. Anticuerpos	29
4. Modelo experimental	29
5. Uso de inhibidores	31
6. Determinación no invasiva de la función ventricular izquierda	31
7. Determinación de la presión arterial sistólica (PAS)	31
8. Obtención de muestras y evaluación de la hipertrofia cardiaca	32
9. Evaluación de los niveles proteicos de β -MHC, Fibronectina, ECA y ECA2 en VI por Western blot	32
9.1. Preparación de homogenizado de tejido cardiaco para β -MHC, FN y SKA	32
9.2. Preparación de homogenizado de tejido cardiaco para ECA y ECA2	32
9.3. Western blot	33
10. Evaluación Actividad de MMP-2 por Zimografía	34
11. Análisis morfofométrico de colágeno	34
12. Evaluación de los niveles de mRNA de ECA, RCA2 por transcripción reversa-reacción de polimerización en cadena (RT-PCR)	35

12.1. Aislamiento del RNA total	35
12.2. Transcripción reversa	36
12.3. Partidores	36
12.4. Reacción de polimerización en cadena (PCR) convencional para ECA	36
13. Evaluación de la actividad ECA, ECA2 por fluorimetría	37
13.1. Obtención de plasma para la medición de actividad de ECA, ECA2	37
13.2. Preparación de extractos de membrana de VI para la medición de actividad tisular de ECA y ECA2	37
13.3. Determinación de actividad de ECA plasmática y tisular (VI)	38
13.4. Determinación de actividad de ECA2 plasmática y tisular (VI)	38
14. Expresión de resultados, tamaños muestrales y análisis estadístico	39
V. RESULTADOS	40
1. Parámetros morfológicos, hemodinámicas y de función ventricular	40
1.1. PAS	40
1.2. Masa corporal	40
1.3. Masa Cardíaca Relativa	40
1.4. Contenido de proteínas totales del VI	40
1.5. Función ventricular	41
2. Evaluación de Expresión génica, proteica y actividad de ECA y ECA2	43
2.1 Determinación de niveles de mRNA para ECA, mediante RT-PCR convencional	43
2.2. Determinación de niveles de mRNA para ECA2, mediante RT-PCR convencional	45
2.3. Determinación de niveles proteicos para ECA, mediante western blot	47
2.4. Determinación de actividad enzimática de ECA y ECA2 por fluorimetría	49
2.4.1. Determinación de la actividad plasmática de ECA	49
2.4.2. Determinación de la actividad de ECA en VI	50
2.4.3. Determinación de la actividad plasmática ECA2	51
2.4.4. Determinación de la actividad ECA2 VI	52
3. Evaluación del grado de remodelado miocárdico	53
3.1. Hipertrofia cardíaca	53
3.1.1. Determinación de niveles proteicos para SKA, mediante Western blot	53
3.1.2. Determinación de niveles proteicos para β -MHC, mediante Western blot	55
3.2. Determinación de la actividad MMP-2	57
3.3. Fibrosis	58
3.3.1. Determinación de niveles proteicos para Fibronectina, mediante Western blot	58
3.3.2. Determinación de la fracción volumétrica de colágeno (FVC) en VI	60
VI. DISCUSIÓN	64
VII. PERSPECTIVAS	71
VIII. BIBLIOGRAFÍA	72
IX ANEXOS	81

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<i>Tabla 1: Parámetros Hemodinámicas y ecocardiográficos</i>	<u>39</u>
<i>Figura 1: Fotografías del procedimiento IAM</i>	<u>27</u>
<i>Figura 2: RT-PCR para ECA en muestras de VI de ratas Sham y IAM</i>	<u>41</u>
<i>Figura 3: Niveles génicos de ECA en VI de ratas Sham y IAM</i>	<u>41</u>
<i>Figura 4: RT-PCR para ECA2 en muestras de VI de ratas Sham y IAM</i>	<u>43</u>
<i>Figura 5: Niveles génicos de ECA2 en VI de ratas Sham y IAM</i>	<u>43</u>
<i>Figura 6: Western blot para ECA en muestras de VI de ratas Sham y IAM</i>	<u>45</u>
<i>Figura 7: Niveles proteicos de ECA en VI de ratas Sham y IAM</i>	<u>45</u>
<i>Figura 8: Actividad plasmática de ECA de ratas Sham y IAM</i>	<u>46</u>
<i>Figura 9: Actividad en VI de ECA de ratas Sham y IAM</i>	<u>47</u>
<i>Figura 10: Actividad plasmática de ECA2 de ratas Sham y IAM</i>	<u>48</u>
<i>Figura 11: Actividad en VI de ECA2 de ratas Sham y IAM</i>	<u>49</u>
<i>Figura 12: Western blot para SKA en muestras de VI de ratas Sham y IAM</i>	<u>51</u>
<i>Figura 13: Niveles proteicos de SKA en VI de ratas Sham y IAM</i>	<u>51</u>
<i>Figura 14: Western blot para β-MHC en muestras de VI de ratas Sham y IAM</i>	<u>53</u>
<i>Figura 15: Niveles proteicos de β-MHC en VI de ratas Sham y IAM</i>	<u>53</u>
<i>Figura 16: Actividad MMP-2 de ratas Sham y IAM</i>	<u>54</u>
<i>Figura 17: Western blot para FN en muestras de VI de ratas Sham y IAM</i>	<u>56</u>
<i>Figura 18: Niveles proteicos de FN en VI de ratas Sham y IAM</i>	<u>56</u>
<i>Figura 19: Fracción volumétrica de colágeno total de ratas Sham y IAM</i>	<u>57</u>
<i>Figura 20: FVC en área infartada de VI de ratas IAM</i>	<u>58</u>
<i>Figura 21: FVC en área transición de VI de ratas IAM</i>	<u>59</u>
<i>Figura 22: FVC en área no infartada de VI de ratas IAM</i>	<u>60</u>

RESUMEN

El sistema renina–angiotensina (SRA) es uno de los principales reguladores de la fisiología cardiovascular. En el último tiempo se ha descubierto un nuevo componente del SRA denominado Enzima convertidora de angiotensina II homóloga (ECA2). Recientes evidencias sugieren que ECA2 juega un papel en la función cardiaca, pero hasta la fecha no existen suficientes antecedentes de su rol en la fisiopatología de la disfunción ventricular (DV) y remodelamiento miocárdico (RM) post infarto al miocardio (IAM). En relación a lo anterior se planteó como hipótesis que la inhibición farmacológica de la ECA o bloqueo del receptor de Ang II de tipo 1 (RAT₁) aumentan la actividad y la expresión de la ECA-2, lo que se acompaña de menor desarrollo de disfunción ventricular y menor remodelamiento miocárdico post infarto al miocardio en la rata. Como objetivos específicos de esta tesis se plantearon: 1) Evaluar en un modelo de disfunción ventricular tardío (8 semanas post IAM) tanto la actividad circulante como en ventrículo izquierdo (VI) y los niveles de mRNA y proteína de las enzimas claves del SRA clásico (ECA) y paralelo (ECA2) y su relación con el desarrollo de RM medido como cambios en la masa relativa ventricular izquierda, expresión génica y proteica de genes del programa fetal como α -actina esquelética (SKA) y, la cadena pesada de la miosina tipo (β -MHC), como también por el desarrollo de fibrosis y actividad de metaloproteasa tipo 2 (MMPs-2). 2) Determinar el efecto de un inhibidor de la ECA y un antagonista del receptor tipo 1 de angiotensina (Ang) II (RAT₁) en los parámetros bioquímicos y moleculares descritos en el punto 1.

Como modelos experimentales se usaron ratas machos de 200 gr. normotensas las que se sometieron a IAM o cirugía ficticia (Sham). Los animales fueron randomizados y un grupo de ellos recibieron enalapril (10mg/Kg/día) o candesartán (10mg/Kg/día) por 8 semanas. Los resultados mostraron que a) Las actividades circulantes y en VI de ECA2 como sus niveles de mRNA están disminuidas en la fase tardía de la disfunción ventricular izquierda post IAM, lo que se asoció a mayor RM medido por aumentos de los parámetros de diámetro de fin de sístole del VI (DFSVI), diámetro de fin de diástole del VI (DFDVI), HVI y contenido de colágeno y actividad MMP-2 en el VI no infartado. b) Tanto enalapril como candesartán previnieron la disminución de las actividades circulante y en VI de la ECA2, lo que se asoció a una disminución de los parámetros de DFSVI y DFDVI, HVI y contenido de colágeno y

actividad MMP-2 en área no IAM. C) Sólo candesartán previno un aumento en el perímetro del área infartada del VI.

En conclusión, el RM post IAM se asoció a un aumento de la actividad enzimática de ECA y a una disminución de la actividad enzimática de ECA-2. Estos cambios favorecieron la fibrosis miocárdica y la HVI. **Todos estos antecedentes sugieren una significativa interacción entre ECA y ECA2 en el RM post IAM.**

Abreviaturas

ANG I:	<i>Angiotensina I</i>
ANG II:	<i>Angiotensina II</i>
ANG-(1-5):	<i>Angiotensina 1-5</i>
ANG-(1-7):	<i>Angiotensina 1-7</i>
ANG-(1-9):	<i>Angiotensina 1-9</i>
bFGF:	<i>Factor de crecimiento fibroblástico de bovino</i>
BK:	<i>Bradicinina</i>
β-MHC:	<i>Cadena pesada de la miosina β</i>
cDNA:	<i>Ácido desoxiribonucleico complementario</i>
dNTP:	<i>Dinucleotidos trifosfato</i>
DMSO:	<i>Dimetilsulfóxido</i>
DEPC:	<i>Dietilpirocarbonato</i>
DTT:	<i>Ditiotreitol</i>
ECA:	<i>Enzima convertidora de angiotensina I</i>
ECA2:	<i>Enzima convertidora de angiotensina I Homóloga</i>
EDTA:	<i>Acido etilendiaminotetracético</i>
FN:	<i>Fibronectina</i>
FE:	<i>Fracción de eyección</i>
FM:	<i>Fibrosis miocárdica</i>
FVC:	<i>Fracción volumétrica de colágeno</i>
HC:	<i>Hipertrofia cardiaca</i>
HL:	<i>Histidil leucina</i>
HTA:	<i>Hipertensión arterial</i>
HVI:	<i>Hipertrofia ventricular izquierda</i>
IAM:	<i>Infarto agudo miocárdico</i>
IC:	<i>Insuficiencia cardiaca</i>
IECA:	<i>Inhibidor enzima convertidora de angiotensina I</i>
IgG:	<i>Inmuno globulina G</i>
ISO:	<i>Isoproterenol</i>
kDa:	<i>Kilodalton</i>
Ki:	<i>constante de inhibición</i>

MAPK:	<i>Proteína quinasa activada por mitógenos</i>
MEC:	<i>Matriz extracelular</i>
mmHg:	<i>milímetros de mercurio</i>
mM:	<i>milimolar</i>
MMP-2:	<i>Metaloproteasa 2</i>
mRNA:	<i>Ácido ribonucleico mensajero</i>
MCR:	<i>masa cardiaca relativa</i>
NEP:	<i>Endopeptidasa neutra</i>
NP40:	<i>Nonidet p-40</i>
nM:	<i>nanomolar</i>
LCA:	<i>Ligadura coronaria anterior</i>
OPA:	<i>Ortoftaldehído</i>
PA:	<i>Presión arterial</i>
PAS:	<i>Presión arterial sistólica</i>
PBS:	<i>Tampón fosfato salino</i>
PCR:	<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>
PMSF:	<i>fenilmetil sulfonil fluoruro</i>
PSA:	<i>Persulfato de amonio</i>
RAA:	<i>Renina angiotensina aldosterona</i>
RAT₁:	<i>Receptor de angiotensina II de tipo 1</i>
RAT₂:	<i>Receptor de angiotensina II de tipo 2</i>
RM:	<i>Remodelamiento miocárdico</i>
RNA:	<i>Ácido ribonucleico</i>
RT-PCR:	<i>Trascrición reversa-reacción en cadena de la polimerasa</i>
Sham:	<i>Operación ficticia</i>
SDS:	<i>Dodecil sulfato de sodio</i>
SKA:	<i>α actina esquelética</i>
SNS:	<i>Sistema nervioso simpático</i>
SRA:	<i>Sistema Renina Angiotensina</i>
TGF-β:	<i>factor de crecimiento tumoral β</i>
VI:	<i>Ventrículo izquierdo</i>

I. INTRODUCCIÓN

1. INSUFICIENCIA CARDIACA, DISFUNCIÓN VENTRICULAR Y REMODELAMIENTO MIOCARDICO

De acuerdo a las predicciones de la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades cardiovasculares serán la principal causa de muerte para el año 2020¹. Dentro de ellas la **insuficiencia cardiaca (IC)** continúa siendo un problema de salud pública y representa la principal causa de morbi-mortalidad en la población anciana. Su prevalencia aumenta con la edad, hasta llegar a un 10% en las personas de más de 75 a 80 años. En Chile la distribución etárea ha ido cambiando en las últimas décadas, observándose un aumento significativo de la población añosa. Se estima que la IC da cuenta de un 20% de las admisiones hospitalarias en personas mayores de 65 años².

La IC ha sido objeto de múltiples definiciones que suelen hacer referencia a tres aspectos fisiopatológicos esenciales: a) disfunción mecánica del corazón (se contrae débilmente, se vacía mal o se llena con dificultad); b) incapacidad de bombear sangre en la cantidad que requieren las actividades metabólicas del organismo, en reposo o durante la actividad normal o el esfuerzo, y c) aporte del débito cardiaco con aumento de las presiones de llenado con congestión o hipertensión venosa pulmonar y/o sistémica, retención de agua, sal y función sistólica normal³. Estas definiciones clínicas basadas en criterios diagnósticos, en general, requieren de confirmación mediante ecocardiografía de la disfunción mecánica del corazón⁴.

La disfunción ventricular se objetiva, habitualmente en clínica, por depresión de la fracción de eyección (FE%) y por la alteración de los índices de función diastólica la cual puede ser asintomática (IC latente) o sintomática (IC)⁵. La IC es finalmente, la manifestación clínica de una **disfunción ventricular** sostenida.

Existen una amplia variedad de patologías que llevan a IC. Las causas más comunes de IC (más del 75%) responden a hipertensión arterial (HTA) y a cardiopatía isquémica, especialmente el infarto al miocardio (IAM). En ambas cardiopatías se desarrolla hipertrofia ventricular izquierda (HVI). Esta respuesta, inicialmente adaptativa, cuando se acompaña de dilatación ventricular puede llevar a disfunción sistólica y al establecimiento de la cardiomiopatía dilatada que están en la base de la IC⁶.

En la fisiopatología de la IC intervienen distintos mecanismos neurohormonales, hemodinámicos, endoteliales y celulares. Estos mecanismos aparentemente compensadores, puestos en marcha ante la disminución del volumen minuto, mantenidos en el tiempo, se convierten en mecanismos descompensadores. El eje del cuadro fisiopatológico lo ocupa la vasoconstricción, vinculada con la hiperactividad de los sistemas nervioso simpático (SNS) y del sistema renina angiotensina (SRA). La puesta en marcha de los mecanismos compensadores-descompensadores produce tres modificaciones cardiacas relevantes: 1) hipertrofia cardiaca que se caracteriza por crecimiento anormal de los miocitos (cambio paulatino de su geometría), 2) proliferación de las células en la matriz extracelular (MEC) con fibrosis y 3) pérdida de miocitos (necrosis y apoptosis), lo cual culmina en remodelamiento estructural significativo del corazón con pérdida de la función ventricular y disminución de la reserva coronaria. El aumento de la frecuencia cardiaca y el mayor inotropismo miocárdico secundarios incrementan el gasto energético y la demanda de oxígeno miocárdicas, respectivamente⁷.

Inicialmente el proceso de remodelamiento actúa como un mecanismo compensatorio para mantener la funcionalidad del corazón. Sin embargo, los cambios estructurales contribuyen eventualmente al desarrollo de síntomas congestivos por

sobrecarga y exacerbación de la disfunción del VI⁸. La disfunción diastólica y sistólica ventricular constituye la manifestación funcional del remodelamiento estructural adverso del miocardio.

1.1 Remodelamiento miocárdico

El remodelamiento miocárdico, se produce como consecuencia de la hipertrofia de los cardiomiocitos, hiperplasia de los fibroblastos y las alteraciones en la síntesis y/o degradación de las proteínas de la matriz extracelular cardiaca (MEC) principalmente colágeno tipo I, fibronectina y laminina⁹. El cardiomiocito en respuesta a un estímulo hipertrófico, activa una respuesta celular caracterizada principalmente por un aumento: a) en la síntesis de proteínas contráctiles, tales como la α -actina esquelética (SKA) o la cadena pesada de la β -miosina (β -MHC), b) en el tamaño celular, es decir un aumento del volumen celular, y c) aumento en el número de sarcómeros y reexpresión de genes que codifican para proteínas cardíacas fetales¹⁰. Tanto la hiperplasia de los fibroblastos como la alteración de la MEC contribuyen a la formación de fibrosis intersticial. Estas alteraciones pueden conducir a una severa disfunción ventricular izquierda⁹ afectando profundamente el metabolismo y funcionamiento de los cardiomiocitos y, por ende, la función contráctil ventricular.

2. SRA, VÍA CLÁSICA

El SRA es uno de los principales reguladores de la fisiología humana. Este sistema regula la presión arterial (PA) y el balance de electrolitos y fluidos, a través de acciones coordinadas en el corazón, vasos sanguíneos y riñón.

En la vía clásica del SRA, la renina, proteasa secretada por el aparato yuxtglomerular del riñón, actúa sobre el angiotensinógeno circulante, de origen

hepático, para generar angiotensina (Ang) I¹¹. El precursor inactivo Ang I se convierte en Ang II por acción de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA)¹². Ang II ha demostrado ser un potente vasopresor que actúa en el corazón, riñón y otros tejidos por unión a receptores específicos acoplados a proteína G, denominados receptores de Ang II subtipo 1 (RAT₁) y subtipo 2 (RAT₂). Los RAT₁ median los principales efectos deletéreos de Ang II como vasoconstricción, hipertrofia del corazón como de los vasos sanguíneos y aumento de la síntesis de colágeno I en células intersticiales provenientes de válvulas cardíacas en cultivo¹³. En cambio, el RAT₂ tiene efectos opuestos al RAT₁¹⁴. Además, la ECA inactiva péptidos vasodilatadores como bradicininas (BK)¹⁵, calicreínas¹⁶ y disminuye la liberación de angiotensina-(1,7) (Ang-(1-7))^{17,18}. Este último heptapéptido proviene de la Ang I por la acción de varias endopeptidasas neutras (fundamentalmente NEP, encefalinasa o neprilisina, EC 3.4.24.11). Las acciones de Ang-(1-7) parecen ser contrapuestas a las de Ang II: aumenta la síntesis y liberación de prostaglandinas vasodilatadoras, potencia las acciones de las BKs y libera óxido nítrico, además de estimular la liberación de vasopresina¹⁶.

Las expresiones de los mRNAs y niveles proteicos de los componentes de la vía clásica del SRA se han detectado en el tejido cardíaco, indicando la síntesis local de todos los componentes del SRA o de un sistema de generación de Ang II local¹⁹. Al respecto, se ha propuesto la existencia de un sistema cardíaco mixto formado tanto por elementos cardíacos locales (ECA y RAT₁) como por algunos componentes sistémicos (angiotensinógeno y renina), captados directamente desde la circulación¹⁹. Las evidencias actuales sugieren que la Ang II cardíaca local - más que su homóloga circulante - mediaría el desarrollo de hipertrofia cardíaca (HC)²⁰.

La modulación del SRA por inhibición de la ECA o por bloqueo del receptor de Ang II (RAT₁) han sido las principales estrategias para el tratamiento de la IC¹.

2.1 ECA

En la vía clásica, la ECA ha mostrado ser el modulador central del SRA y ha focalizado el mayor interés por parte de la industria farmacéutica. La ECA (peptidil-dipeptidasa A, EC3.4.15.1), es una metaloproteasa dependiente de zinc²¹ y se ha caracterizado como una glicoproteína de 170 kDa que posee 2 sitios activos homólogos. La ECA hidroliza Ang I para formar Ang II, metaboliza BK-(1-9) activa a BK-(1-7) inactiva y metaboliza Ang-(1-7) en Ang-(1-5).

Esta enzima está localizada preferentemente en el endotelio de los vasos sanguíneos, especialmente en la circulación pulmonar, pero también se encuentra en células epiteliales, mononucleares circulantes, macrófagos, células germinales masculinas, cardiomiocitos y fibroblastos cardiacos, en el túbulo renal proximal, y también en forma circulante en el plasma^{12,19,22}. La ECA circulante probablemente se origina en las células endoteliales vasculares por un mecanismo aún poco aclarado.

En condiciones experimentales se ha observado que la actividad de la ECA circulante y cardíaca aumenta en el IAM, HTA renovascular y por la administración de un agonista α -adrenérgico como isoproterenol (ISO)^{23,24}. Al respecto, se ha observado que la administración crónica de ISO en ratas, induce una expresión diferencial de la ECA en plasma, ventrículo izquierdo y pulmón, durante el desarrollo de HVI y FM²⁵.

La inhibición de la ECA ha sido una de las principales estrategias en el tratamiento de la IC. Estudios básico-clínicos han demostrado que los inhibidores de la ECA previenen la fibrosis miocárdica y el remodelamiento ventricular patológico en la HVI hipertensiva, después del IAM y también en la IC congestiva²⁶.

2.2 REGULACIÓN DE ECA

Muy poco se sabe acerca de la regulación de la expresión de la ECA, desconociéndose en que forma se regula su expresión en tejido cardíaco. Los antecedentes disponibles tienen relación con la regulación de su expresión génica en células endoteliales o en células vasculares musculares lisas. En ellas se ha observado regulación por glucocorticoides dexametasona,²⁷ factor de crecimiento fibroblástico de bovino (bFGF),²⁷ por activación del receptor α -adrenérgico²⁸ y por estrógenos²⁹. En relación a ECA y NEP se ha encontrado, en modelos de ratas hipertensas con niveles altos, normales o bajos de renina, que la inhibición de ECA, NEP o de ambas produce un efecto antihipertensivo independiente de los niveles de renina³⁰. Además, se ha encontrado experimentalmente que existe una regulación genética de los niveles de ECA, lo que determina además diferentes niveles de Ang-(1-7)¹⁹.

3. ECA EN REMODELAMIENTO MIOCÁRDICO

Las evidencias acumuladas en estos últimos años han indicado al SRA, como uno de los principales reguladores del desarrollo de la fibrosis miocárdica en la IC crónica³¹. Al respecto, la importancia de la ECA en el RM ha sido largamente demostrada, especialmente en relación a las acciones profibróticas de la Ang II³². Ang II juega un papel pivotal en el RM a través de la regulación de la proliferación de los fibroblastos cardíacos, producción de proteínas de la MEC y de proteínas de adhesión a la matriz extracelular¹⁴. Los RAT_1 del fibroblasto cardíaco median su proliferación, producción de proteínas de la MEC y secreción de proteínas de adhesión como integrinas y osteopontina. Hay claras evidencias que Ang II estimula el crecimiento celular, la actividad MAPK, expresión de TGF- β y producción de proteínas de la MEC (colágeno I, colágeno III, fibronectina y laminina) en el fibroblasto cardíaco. De

especial interés son las evidencias que demuestran que la interacción *in vivo* de Ang II con sus receptores subtipo AT₁ estimulan la síntesis e inhibe la degradación de las fibras de colágeno de ratas espontáneamente hipertensas³³.

Los IECA como enalapril o lisinopril revierten la fibrosis miocárdica en ratas hipertensas, efecto que se ha asociado a una reducción de arritmias ventriculares y mejoramiento de la función miocárdica, independiente de sus efectos antihipertensivos³⁴. Los mecanismos específicos por los cuales los IECAs ejercen su acción cardioprotectora se desconocen, postulándose efectos directos de estos fármacos sobre el tejido cardíaco, más bien que sus efectos hemodinámicos indirectos³⁵. Adicionalmente, se ha demostrado que espironolactona, en bajas o altas dosis, previene el desarrollo de fibrosis cardíaca pero no el desarrollo de ciertos tipos de HTA o HVI, lo que indica que la normalización de la presión sanguínea no está necesariamente asociada con la regresión o prevención de fibrosis del miocardio y que su regresión puede ocurrir independiente de la presión sanguínea³⁴. Estos antecedentes apoyan la importancia del sistema RAA local y/o sistémico en el remodelamiento de la MEC cardíaca.

La participación de ECA y NEP no es directa sobre el remodelamiento en sí, mas bien ellas participan regulando la síntesis y degradación de factores humorales o péptidos de conocida actividad mitogénica que modulan el remodelamiento cardíaco. La ECA-2 puede funcionar en conjunto con la ECA y la NEP en modular nuevas vías del metabolismo de las angiotensinas que tengan significado fisiológico relevante.

Ang-(1-7) ha demostrado estimular la diuresis y la vasodilatación, lo que finalmente reduce la sobrecarga de presión y de volumen, minimizándose los efectos en el remodelamiento cardíaco. Hasta la fecha se desconoce la participación de Ang-(1-7) en el remodelamiento cardíaco, específicamente sobre el metabolismo del

colágeno y otras proteínas de la MEC ni sobre la actividad de las MMP.

4. SRA, VÍA PARALELA

En los últimos años, el SRA ha mostrado ser más complejo de lo inicialmente presupuestado, encontrándose que a la vía clásica se suma una nueva vía –paralela- cuyo principal componente es la enzima convertidora de angiotensina I homóloga (ECA-2)³⁶.

La segunda vía del SRA también se inicia con el angiotensinógeno, pero es seguida por la hidrólisis de Ang I a angiotensina-(1,9) (Ang-(1-9)) por la acción de la carboxipeptidasa ECA-2³⁶⁻³⁸. Esta enzima también hidroliza Ang II a Ang-(1-7) con alta eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M $1,9 \times 10^6 M^{-1} sec^{-1}$) y su capacidad hidrolítica es 400 veces mayor para Ang II que para Ang I³⁸. Kokkonen *et al.*³⁹ encontraron que Ang-(1-9) inhibe competitivamente a la ECA circulante y tisular. Este grado de inhibición depende de la concentración relativa del inhibidor y del sustrato. En este estudio se encontró que Ang-(1-9) a concentraciones de 1/50 y 2/50, respecto, a la concentración de Ang I inhibió 50 y 100%, respectivamente, la ECA circulante. Los estudios de Donoghue *et al.*³⁷ confirmaron que la Ang-(1-9) es un inhibidor competitivo de la ECA (actúa como sustrato). Adicionalmente, la inhibición prolongada de la actividad de ECA en plasma y riñón de ratas aumenta los niveles de Ang-(1-9)⁴⁰, lo cual puede ser producto de una disminución del catabolismo de la Ang-(1-9) por parte de la ECA. Un aumento en los niveles de Ang-(1-9) puede ser producto de un aumento en su producción por parte de la ECA-2, resultado de una mayor disponibilidad de Ang I. Todo esto indica que existen vías alternativas de hidrólisis de Ang I.

En humanos con IC se demostró un aumento de Ang-(1-7)⁴¹, que podría provenir de la hidrólisis de Ang II por ECA-2 y además de la hidrólisis de Ang I por NEP⁴¹. Esto podría indicar una posible función cardioprotectora de Ang-(1-7) en la IC. Además, estudios realizados por Santos *et al.*⁴² en aortas deficientes del receptor de Ang-(1-7), mostraron una pérdida de la respuesta a relajación inducida por Ang-(1-7)⁴² demostrando que esta segunda vía del SRA, con la ECA-2 como productor de Ang-(1-7), ha emergido como un posible regulador importante en la fisiopatología cardiovascular.

4.1 Enzima convertidora de angiotensina I homóloga (ECA2)

El gen de la ECA2 se identificó a partir de genotecas de cDNA de ventrículos de corazones humanos con IC y su secuencia se encuentra en el banco de genes AF291820³⁷. La comparación de la estructura genómica sugiere que los genes de ECA y ECA-2 provienen de la duplicación de un gen ancestral común⁴³.

La ECA-2 es una metaloproteasa dependiente de Zn que presenta un 42% de identidad y un 61% de similitud con la ECA, lo cual es evidente en el dominio de unión a zinc (HEXXH) 36. Esta secuencia (HEMGH) es idéntica y muy conservada en ambas enzimas. La secuencia proteica de la ECA-2 consiste de 805 aminoácidos que incluyen 17 residuos amino terminales y un anclaje a membrana C-terminal³⁶. La estructura genómica de la ECA-2 muestra una marcada similitud con los primeros 17 exones de la ECA⁴⁴. El gen de la ECA-2 está localizado en el cromosoma X (Xp22) similar a la localización (Xp22.1) de otras metaloproteasas de membrana producto del gen PEX, también ligadas al cromosoma X²⁶. Estas proteínas del gen PEX pertenecen a la familia de las neprisilinas NEP,⁴⁵.

A diferencia de la ECA, la ECA-2 presenta un sólo sitio activo con actividad carboxipeptidasa y no hidroliza a la BK^{37,46}. Al respecto, Vickers *et al.*³⁸ han caracterizado la actividad catalítica de la ECA2, encontrándose que su actividad proteolítica es óptima a pH 6,5, y está aumentada por la presencia de aniones monovalentes al igual que la actividad de la ECA.

ECA2, al producir un precursor de Ang-(1-7) y además Ang-(1-7), podría producir vasodilatación local. Además, la ECA-2 podría alterar el tono vasomotor ya que disminuye la disponibilidad de Ang I, sustrato de la ECA y precursor del vasoconstrictor Ang II. Por lo tanto, en el corazón, la actividad de ECA2 induciría vasodilatación local, aún bajo condiciones de vasoconstricción sistémica generalizada pues previene la formación de Ang II.

Estudios *in vitro* realizados por Donoghue *et al.*³⁷ han mostrado que ECA-2 hidroliza además, otros péptidos vasoactivos como: des-Arg bradicinina, neurotensina y cinetensina. Des-Arg bradicinina está involucrada localmente en la dilatación de los vasos a través de la unión a receptores B₁, que se expresan en condiciones de daño tisular e inflamación⁴⁷.

Los inhibidores de la ECA (IECA) como lisinopril, captopril y enalapril no inhiben a la ECA-2³⁷, aunque captopril a altas concentraciones (1 mM) inhibió la formación de Ang-(1-9)⁴⁸. Agentes quelantes de metales como EDTA muestran ser efectivos inhibidores a concentraciones de 10 mM. Estos antecedentes han reforzado la idea que la ECA-2 es una metaloproteasa con diferente especificidad de sustrato y de inhibidores que la ECA³⁶.

A la fecha sólo se han descrito algunos inhibidores selectivos para ECA-2⁴⁹ basados en un sustrato natural de la ECA-2, como también se ha diseñado un inhibidor específico para ECA2, denominado péptido DX600 (K_i de 2,8 nM)⁵⁰. Este péptido

inhibió a la ECA2, pero no la actividad de la ECA, lo que lo hace atractivo para ser usado en estudios *in vivo*⁵⁰.

En relación a la expresión génica de la ECA-2, se ha encontrado mediante PCR en tiempo real que se expresa en riñón (corteza y médula), ventrículo izquierdo, testículos y sistema gastrointestinal (en particular en ileum, duodeno, yeyuno y colón)⁵¹. Al igual que la ECA, la ECA-2 está presente en el endotelio y puede ser secretada *in vitro* por ruptura proteolítica de la forma unida a membrana³⁷. A nivel celular, la ECA2 se ha encontrado principalmente en epitelio del túbulo renal, macrófagos, cardiomiocitos, endotelio de pequeñas y grandes arterias y musculatura lisa de estos vasos⁵².

ECA2 también ha demostrado ser el receptor funcional para el coronavirus que causa el síndrome respiratorio agudo severo (SARS)^{53,54}, El coronavirus, SARS-CoV, agente causante del SARS, ingresa a las células endoteliales pulmonares, uniéndose a la ECA2 de membrana, vía la interacción con la proteína SARS-CoV⁵⁵. Lo anterior, ha sido apoyado por observaciones recientes⁵⁶ que muestran que las células endoteliales pulmonares expresan elevados niveles de ECA2.

5. ROL FISIOPATOLÓGICO DE LA ECA2

5.1 ECA 2 y HTA

Se ha descrito un **rol potencial de la ECA2 en la HTA esencial** basado en que: **esta enzima está presente en corazón y riñón**^{36,37}, dos órganos que regulan la presión arterial y en una serie de observaciones experimentales realizadas en modelos genéticos de HTA. Al respecto Crackower *et al.*⁵⁷ localizaron el gen de la ECA-2 en el cromosoma humano, en el mismo locus del cromosoma X de 3 cepas de ratas

hipertensas. Además, la expresión génica y proteica de ECA-2 en ratas hipertensas Sabra y espontáneamente hipertensas fue significativamente menor que en ratas normotensas usadas como controles.

A lo anterior se suma lo observado por Allred *et al*⁵⁸, quienes encontraron que la PA basal fue 10 mmHg mayor en ratones deficientes en ECA-2 comparado con ratones normales. Estas observaciones fueron consistentes con las observaciones de Crackower *et al.*⁵⁷ en el modelo de ratas Sabra, en las cuales la menor expresión de ECA-2 se correlacionó con una mayor PA basal.

Para estudiar la hipótesis que la ECA2 cumple un papel en la HTA, Yagil *et al.*⁵⁹ clonaron el gen de la ECA2 en la región del cromosoma X adyacente al sitio QTL asociado a HTA. La expresión génica de la ECA2 fue mayor en el riñón (+4) y menor (+1) en el corazón, aorta, pulmón y retina. No se encontró expresión en el cerebro, suprarrenales, músculo y tejido graso. Además frente al consumo de sal, los niveles de mRNA y proteína de la ECA2 fueron 20-40% mayor en ratas Sabra normotensas (SBN/y) respecto a ratas Sabra hipertensas (SBH/y). Estos resultados muestran un **nuevo mecanismo para la HTA en el cual:**

- 1) la ECA2 regula el tono vascular contrarrestando la actividad de la ECA;
- 2) la menor expresión de ECA2 se asoció con menores niveles de Ang-(1-7) en SBH/y, dejando que la actividad de la ECA2 predomine y aumente el tono vascular y en consecuencia la HTA durante el consumo de sal; y
- 3) viceversa, mayor expresión de ECA2 en SBN/y aumenta los niveles de Ang-(1-7) y disminuye los niveles de Ang II, previniendo el aumento de la presión sanguínea durante el consumo de sal permitiendo un efecto protector el cual mantiene la normotensión.

Por lo tanto, este nuevo mecanismo indicaría que la ECA2 sería una proteína que podría prevenir el desarrollo de HTA.

5.2 ECA-2 Y DISFUNCIÓN VENTRICULAR

Usando modelos genéticos, Crackower *et al.*⁵⁷ demostraron que la ECA-2 cumple un rol en la fisiología cardiovascular regulando la función del corazón. Usando ratones knockout deficientes del gen de la ECA-2, se observó un leve engrosamiento de la pared del VI y una disminución severa de la contractilidad ventricular izquierda, sin fibrosis cardíaca intersticial ni hipertrofia del cardiomiocito. Además, se observó aumento en los niveles de Ang I y II en riñón, corazón y de Ang II en plasma, sin cambios en los niveles de mRNA de ECA en riñón ni corazón. La depresión de la contractibilidad miocárdica se asoció con un aumento en la expresión cardíaca de los genes inducidos por hipoxia como BNIP3 y PAI-1, lo que plantea la existencia de un rol adicional de la ECA-2 en la isquemia cardíaca. Estos mismos investigadores determinaron si los niveles elevados de Ang II mediaron la disfunción cardíaca para lo cual generaron un doble ratón knockout, deficiente simultáneamente en los genes de ECA-2 y ECA. En este modelo genético, la función cardíaca y PA fueron normales, lo que sugirió el rol directo de Ang II y posiblemente también la menor formación de Ang-(1-7) en el fenotipo de disfunción cardíaca⁶⁰.

La participación de la ECA2 en la fisiopatología cardíaca también ha sido apoyada por observaciones en pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática terminal^{41,61}, como en pacientes con cardiopatía isquémica⁶¹, que mostraron mayor actividad de ECA2 cardíaca. **Estas observaciones sugieren que una mayor expresión de ECA2 en tejido dañado puede ser producto de la participación de la ECA2 en mecanismos compensatorios.**

Aunque la mayoría de los antecedentes sugieren que la ECA2 podría tener efectos cardioprotectores post injuria miocárdica, estudios realizados en ratones transgénicos, con mayor expresión de ECA2 cardíaca^{37,62}, mostraron una mayor incidencia de muerte súbita lo cual se correlacionó con los niveles de expresión de la ECA2. Los estudios electrofisiológicos revelaron alteraciones en la conducción y el ritmo cardíaco, con taquicardia ventricular que progresó a fibrilación y muerte.

6.- REGULACIÓN DE ECA-2

En relación a la regulación de ECA-2, los estudios de Crackower *et al*,⁵⁷ sugieren que los niveles de Ang II y de otros péptidos del SRA podrían regular la expresión de ECA-2. Al respecto, Averril *et al*⁶³, demostraron en un modelo experimental de IAM, que el desarrollo de IC post ligadura de la arteria coronaria izquierda, aumentó el contenido miocitario de Ang-(1-7). Mientras que, en este mismo modelo experimental, el tratamiento con antagonistas de RAT₁ por 28 días post IAM, aumentó los niveles de mRNA de ECA-2 y niveles circulantes de Ang I, Ang-II y Ang-(1-7)⁶⁴. Resultados similares fueron obtenidos⁶⁵ al estudiar los mecanismos responsables del aumento de su expresión. Se evaluó si el gen de la ECA2 responde al aumento compensatorio en los niveles circulantes y tisulares de Ang II y Ang-(1-7), producto de la disfunción VI post IAM. Para ello determinaron, en ratas infartadas, el efecto de los antagonistas del RAT1 (ARAI), losartán y/o olmesartan, durante 28 días post IAM. El mRNA para ECA2 aumentó 3 veces en el miocardio viable y se correlacionó con los niveles de Ang-(1-7). También se encontró un aumento del mRNA de ECA2 al usar un ARA II doble que inhibió el RAT1 y el RAT2.

Estos antecedentes nos llevan a pensar que existe un mecanismo de inter-regulación entre ECA y ECA2.

En el sistema cardiovascular, las dos vías enzimáticas del SRA (ECA y ECA-2) parecen determinar un balance interno entre péptidos vasoconstrictores (Ang II) y vasodilatadores (Ang-(1-7)), lo cual normalmente favorecería la homeostasis cardiovascular. Sin embargo, cuando ocurre un desbalance secundario a un proceso patológico, cambios en las expresiones y/o actividades de ECA y ECA-2 podrían desencadenar el desarrollo de disfunción ventricular.

La inhibición de la acción de Ang II juega un rol importante en la prevención de la hipertrofia ventricular y disfunción cardíaca post IAM por lo cual se postula como hipótesis que **la inhibición farmacológica de la ECA y/o el bloqueo de RAT_1 aumentan la actividad y la expresión de la ECA-2, lo que se correlaciona con menor desarrollo de disfunción ventricular y de remodelamiento miocárdico post infarto al miocardio en ratas.**

II. HIPÓTESIS.

La inhibición farmacológica de la ECA y/o el bloqueo de RAT_1 aumentan la actividad y la expresión de la ECA-2, lo que se correlaciona con menor disfunción ventricular y remodelamiento miocárdico tardío post infarto al miocardio en la rata.

III. OBJETIVOS DE LA TESIS.

1. Objetivo General

Evaluar los efectos de la inhibición farmacológica de ECA y del bloqueo de RAT_1 en la dinámica de algunos componentes de la vía clásica y de la vía paralela (ECA-2) del SRA, además de las consecuencias sobre la función y remodelamiento del VI de ratas con IAM experimental en etapa tardía.

2. Objetivos Específicos.

- 1.- Generar los modelos experimentales de IAM tratados farmacológicamente con un IECA o un antagonista de RAT_1 por un período de 8 semanas.

- 2.- Evaluar la función ventricular izquierda por ecocardiografía, y el remodelamiento miocárdico por: a) Desarrollo de HVI, medido como cambios en la masa relativa ventricular izquierda y en la expresión génica y proteica de genes del programa fetal (SKA, β -MHC), y b) Acumulación de proteínas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina) y actividad metaloproteasas, en los modelos experimentales.

- 3: Caracterizar los cambios de algunos componentes del SRA clásico (ECA) y paralelo (ECA-2) como actividades enzimáticas, niveles de mRNAs y expresión proteica, en los modelos experimentales antes mencionados a nivel circulante y en VI

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

La presente investigación se realizó de acuerdo a la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, por el Nacional Health Institute (NIH N° 85-23, 1985) y aprobada por las comisiones de investigación de la Pontificia Universidad Católica de Chile y de la Universidad de Chile. Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley de (190-210 g peso). La mantención de los animales se realizó en el bioterio del Centro de Investigaciones Médicas de la P. Universidad Católica de Chile. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz y oscuridad y tuvieron libre acceso a agua y comida.

2. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron de Sigma Chemical. (ST. Louis, MO, USA): temed, cloruro de potasio, ortovanadato de sodio, deoxicolato, fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF), leupeptina, aprotinina, pepstatina A, dimetilsulfoxido (DMSO), azul de bromofenol y tween-20. De Gibco BRL (Rockville, USA) se adquirieron ácido etilendiaminotetracético (EDTA), bromuro de etidio y glicerol. De Amresco (Ohio, USA) eran persulfato de amonio (PSA), Na_2HPO_4 , dietilpirocarbonato (DEPC) y Nonidet p-40 (NP40). Los reactivos proanálisis se adquirieron en Merck: cloroformo, alcohol etílico, alcohol isopropílico, metanol y ortoftaldehído (OPA). De Invitrogen provenían trizol, kit DNAsa grado amplificación, random primer, dNTP, ditiotreitól (DTT) tampón PCR, cloruro de magnesio inhibidor de RNAsa, transcriptasa reversa y *taq* polimerasa. Los siguientes reactivos se adquirieron en Winkler: Tris base, agarosa, acrilamida, bisacrilamida, glicina y dodecil sulfato de sodio (SDS). La heparina sódica

se adquirió al Laboratorio Chile. Los films de revelados para Western Blot se adquirieron a Kodak. Los partidores para los PCR de ECA, ECA2, fueron sintetizados por Invitrogen (Life Technologies).

3. Anticuerpos

β -MHC de novocastra, dilución 1:10000, SKA de US Biological, dilución 1:5000, ECA. dilución 1:3000, FN de Biodesign, dilución 1:40000.

Conejo anti-ratón (dilución 1:10000) y Cabra anti-conejo de (dilución 1:10000) de Pierce

4. Modelo experimental

Como modelo experimental de disfunción ventricular izquierda tardía se utilizó el modelo de IAM experimental (8 semanas post cirugía) (ver figura 1). El IAM se indujo por ligadura de la rama descendente anterior de la arteria coronaria izquierda^{66,67}. Ratas Sprague Dawley macho de 190-210 gramos de peso fueron anestesiadas con ketamina (50 ug/kg) y xilazina (10 ug/kg) por inyección intraperitoneal, y se procedió a realizar ventilación manual con un dispositivo ambu. Luego de cortar la piel con bisturí se continuó con disección roma divulsionando los músculos pectorales hasta acceder a la parrilla costal. A continuación se realizó toracotomía izquierda por el 4° espacio intercostal izquierdo para acceder a la cara anterior del corazón y se realizó reconocimiento y ligadura de la rama descendente anterior de la arteria coronaria izquierda con sutura de seda 7-0. El tórax fue luego cerrado por planos mediante sutura y luego las ratas fueron dejadas en recuperación. En el caso de las ratas con operación ficticia se procedió de igual manera que en la anterior pero sin realizar la ligadura de la coronaria luego del reconocimiento de ésta.



Figura 1: Imágenes procedimiento ligadura de la arteria coronaria izquierda descendente anterior (IAM) en ratas de 200 gramos aproximadamente.

5. Uso de inhibidores de ECA y RAT₁

Los inhibidores se administraron por un período de 8 semanas post cirugía, comenzando dos días después del procedimiento. Cada inhibidor se comparó con sus respectivos grupos controles (un grupo sham con el inhibidor respectivo, n = 13-14 por grupo). Se utilizaron a) enalapril, inhibidor de la ECA en dosis de 10 mg/Kg/día por gavaje diario, comenzando 2 días después de la cirugía⁶⁸ y , b) candesartán, antagonista de RAT₁ en dosis de 10 mg/Kg/día por gavaje diario comenzando 2 días después de la cirugía⁶⁹.

6. Determinación no invasiva de la función ventricular izquierda

La función del ventrículo izquierdo se evaluó por ecocardiografía transtorácica bidimensional al inicio, 4 y 8 semanas post cirugía, para lo cual se usó un transductor sectorial electrónico de ultra banda S12 Philips con rango de frecuencia de operación de 5-12 MHz 2D, doppler color, doppler pulsado y continuo, adaptable al ecocardiógrafo Sonos 5000. Para la evaluación de la función ventricular los animales IAM y Sham fueron previamente anestesiados con Ketamina (35mg/Kg peso) y Xilacina (7mg/KG peso) y su tórax fue rasurado. Se determinó el diámetro de fin de sístole y diástole del ventrículo izquierdo (VI), la fracción de acortamiento del VI, el grosor de la pared anterior del VI, área miocárdica de fin de sístole y porcentaje del perímetro del VI con IAM⁷⁰.

7. Determinación de la presión arterial sistólica (PAS)

La PAS se determinó mediante el método pletismográfico en la cola de los animales (tail cuff), según lo descrito en la literatura⁷¹.

8. Obtención de muestras y evaluación de la hipertrofia cardiaca

Previa determinación de la función ventricular y de la PAS, los animales fueron pesados y sacrificados al término de 8 semanas post IAM. Una vez sacrificado el animal, se separó el ventrículo el que se lavó con suero fisiológico para remover la sangre contaminante y se determinó su masa. Se utilizó como parámetro de HVI la masa relativa ventricular izquierda (MRVI, mg ventrículos/100 g de peso corporal). Una porción del VI se congeló a -80°C hasta su utilización mientras que la restante se fijó en formalina al 4%. Se tomaron las muestras de tejido y sangre para las determinaciones que a continuación se detallan.

9. Evaluación de los niveles proteicos de β -MHC, SKA, FN, ECA en VI por Western Blot.

9.1. Preparación de homogenizado de tejido cardiaco para β -MHC, FN y SKA.

Las muestras de tejido cardiaco se homogenizaron según protocolo descrito por Ammarguella *et al.*⁷². Para ello se tomaron 70-100 mg de VI que se homogenizaron en 0,5 ml de tampón PBS (0,5% deoxicolato de sodio, 0,1% SDS, 1mM ortovanadato de sodio, 1mM PMSF, 1% NP-40, 1% leupeptina A y 1% pepstatina). Posteriormente, se centrifugó por 10 min a 3000 g a 4°C para la remoción de restos celulares. En el sobrenadante se determinó las proteínas totales por Bradford⁷³ y almacenó a -80°C hasta su utilización.

9.2. Preparación de homogeneizado de tejido cardiaco para ECA .

Se siguió el protocolo descrito por Esther *et.al.*⁷⁴. 70-100 mg de VI que se homogenizaron en 0,5 ml de tampón de homogenización (1mM PMSF, 2,5mM EDTA,

10 % glicerol, 10 ng/ml aprotinina, 0,1% SDS, 20mM Tris pH 7,4, 1% deoxicolato, 1% triton X-100) y se centrifugó por 30 min a 1000 g a 4 °C para la remoción de restos celulares. En el sobrenadante se determinó las proteínas totales por Bradford⁷³ y almacenó a -80 °C hasta su utilización.

9.3. Western blot

Para la medición de los niveles proteicos de β -MHC, SKA , FN y ECA por Inmuno Western blot (IWB) se utilizaron 15 μ g, 30 μ g, 50 μ g y 100 μ g respectivamente de proteína total de VI, y fueron diluídas en tampón reductor SDS 6x, y separadas por electroforesis en geles SDS-PAGE al 8%. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,2 μ m a 350 mA durante 1 hora y la transferencia de las proteínas se verificó por tinción de la nitrocelulosa con Rojo Ponceau. Posteriormente, las membranas se bloquearon en solución PBS-Leche descremada al 7%, durante toda la noche con agitación a 4 °C excepto las membranas para ECA que se bloquearon 2 horas a temperatura ambiente, y después de 3 lavados de 10 minutos con leche 0,5% en PBS-Tween 20 0,05%, se incubaron con el anticuerpo primario (anti- β -MHC dilución 1:10000, anti SKA dilución 1:5000, anti-FN dilución 1:40000) con agitación a temperatura ambiente por 2 horas, y (anti-ECA dilución 1:3000) con agitación a 4 °C durante toda la noche. Después de 3 lavados similares a los anteriormente descritos, se incubó con cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa dilución 1:10000 para ECA y FN o conejo anti-IgG de ratón cojugado a peroxidasa dilución 1:10000 para SKA y β -MHC, por 2 horas a temperatura ambiente, con agitación. Después de 3 lavados, las membranas fueron reveladas con sustrato de quimioluminiscencia según las instrucciones del proveedor comercial. Como control de carga se utilizó tinción con rojo ponceau. La intensidad de cada banda se determinó por

densitometría mediante un scanner Hewlett-Packard y el software image-j de análisis densitométrico.

10. Evaluación de la actividad de MMP-2 por Zimografía

Se utilizó zimografía en geles de gelatina para la determinación de la actividad metaloproteinasa tipo 2^{75,76}. Para esto se utilizó el homogeneizado preparado para IWB según Ammarguella *et al.*⁷². Se utilizaron 100 µg de proteína diluida en tampón no reductor SDS 2x (126 mM Tris-HCl, 20% glicerol, 4% SDS, 0,005% azul de bromofenol, pH 6,8). Las muestras fueron cargadas en geles SDS-PAGE al 8% con 0,1% de gelatina y corridas a 100mV a temperatura ambiente. Posteriormente, el gel fue lavado dos veces con Tritón X-100 2,5% durante 30 minutos a temperatura ambiente, e incubado a 37° por 18 horas con 50 mM de HEPES, pH 7,5, 0,2 M NaCl, 5 mM CaCl y 20 µmol/L de ZnCl. Finalmente los geles se tiñeron con Azul de Coomassie. La actividad se determinó mediante análisis densitométrico mediante un scanner Hewlett-Packard y el software image-j de análisis densitométrico.

11. Análisis morfométrico de colágeno

Con el objetivo de evaluar el grado de fibrosis ventricular, cortes histológicos de corazón de 6 µm grosor se tiñeron con rojo picrosirio^{77,78} y las imágenes se obtuvieron utilizando una cámara digital acoplada al microscopio. Se capturaron imágenes del miocardio a lo largo de la circunferencia del ventrículo con un aumento de 20x, distinguiendo entre la zona de miocardio infartada, la zona de transición y el resto del miocardio (zona no infartada). Las imágenes fueron luego procesadas digitalmente para calcular la fracción volumétrica de colágeno contenido en el miocardio utilizando un programa creado previamente en el laboratorio con plataforma MATLAB⁷⁹. Tanto la

captura de las imágenes como el análisis de éstas fueron realizadas por un observador ciego.

12. Evaluación de los niveles de mRNA de ECA, ECA2 por transcripción reversa y reacción de polimerización en cadena (RT-PCR)

12.1. Aislamiento del RNA total

Se extrajo RNA de muestras de tejido de corazón. Las muestras fueron homogenizadas 4 veces por 20 segundos cada vez en 1 ml de Trizol a 4°C en homogenizador Pro 200 (PRO Scientific Inc.). El lisado obtenido se traspasó a un tubo de 1,5 ml y se agregó 0,2 ml de cloroformo, se mezcló 20 veces por inversión y 20 segundos en vortex, se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos y luego se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa fue traspasada a un tubo de 1,5 ml y el RNA se precipitó con 0,5 ml de isopropanol 100% frío y se separó por centrifugación a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. La pella resultante, se lavó con 1 ml de etanol 75% frío, se agitó en vortex y se centrifugó a 7500 g por 5 minutos a 4°C, El RNA se dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente, el RNA fue resuspendido en 30 µl agua bidestilada tratada con 0,09% de dietilpircarbonato (DEPC). La concentración y pureza del RNA se determinó por espectrometría UV, midiendo las absorbancias a 260 y 280 nm. La integridad del RNA se evaluó a través de la presencia de las bandas 18 y 28S del RNA ribosomal, después de la electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % y tinción con bromuro de etidio (10 mg/ml).

12.2. Transcripción reversa

El RNA (1,25 µg) a ser transcrito se trató con DNAsa, para ello se siguió el protocolo descrito por Ocaranza *et al*⁷⁶. Se mezcló 1 µl tampón DNAsa 10X, 2,75 µl agua DEPC y 1,25 µl DNAsa y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando 1 µl de 25 mM EDTA y calentando por 15 minutos a 65 °C para inactivar la DNAsa.

La reacción de transcripción reversa (RT) se efectuó mezclando: 5 µl tampón RT 5x, 2,5 µl dNTP (5mM), 2,5 µl “random primer” (100 pmol/µl), 1,25 µg RNA total (previamente tratado con DNAsa) y 5 µl H₂O_{DEPC} en un volumen final de 25 µl. La mezcla de reacción se incubó a 72 °C por 3 min, se enfrió a 42 °C por 3 min y luego se agregó : 2.5 µl DTT (0,1 M), 25 U inhibidor de RNAsa diluído en tampón PCR 1x sin Mg⁺² y 125 U transcriptasa reversa. La reacción de transcripción reversa se realizó a 42 °C durante 60 min y posteriormente se calentó a 95 °C por 5 min para inactivar la enzima.

12.3. Partidores

ECA⁷⁶: Oligo sentido 5'-CGC TAC AAC TTC GAC TGG TGG-3'

Oligo antisentido 5'-TAT TTC CGG GAT GTG GCC AT-3'

ECA2⁶⁵: Oligo sentido 5'- GTG CAC AAA GGT GAC AAT TGG-3'

Oligo antisentido 5'-ATG CGG GGT CAC AGT ATG TT-3'

12.4. Reacción de polimerización en cadena (PCR) para ECA y ECA-2.

La reacción de PCR convencional se realizó mezclando en un volumen final de 50 µl, los siguientes reactantes: 6 para ECA o 3 µl para ECA-2 de cDNA, 5 µl tampón

PCR 10x, 32 μ l agua DEPC y se preincubaron por 3 minutos a 94 °C. Posteriormente se agregó 20 pmoles de cada partidor, 0,4 U taq polimerasa y 4,6 μ l tampón PCR.

Para el PCR de ECA se siguió el siguiente programa: 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 60 °C, 3 min a 72 °C y posteriormente 10 min a 72 °C. Mientras que para ECA-2 se siguió el siguiente programa: 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C, 1 min a 72 °C y posteriormente 10 min a 72 °C.

13. Determinación de la actividad de ECA y ECA2

13.1. Obtención de plasma para la medición de actividad de ECA, ECA-2

La sangre obtenida después del sacrificio de los animales, aproximadamente 1 mL, se recolectó en tubos con 50 UI de heparina sódica. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3.500 g por 10 min a 4 °C y el plasma obtenido se guardó a -80 °C hasta su procesamiento.

13.2. Preparación de extractos de membranas de VI para la medición de actividad tisular de ECA y ECA-2

Se siguió la metodología descrita por Cushman *et al.*⁸⁰ con algunas modificaciones²⁵. 100 mg de VI se homogenizaron en tampón TN frío (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; NaCl 1%). El extracto se centrifugó a 1.000 g por 15 min a 4°C y el sobrenadante se recentrifugó a 15.000 g por 30-60 min a 4°C, respectivamente. La pella resultante se lavó con 1 mL de TN frío y se centrifugó a 15.000 g por 15 min. Finalmente, la pella se resuspendió en 250 μ l de tampón TN que contenía 8 mM CHAPS y se almacenaron a -80°C.

13.3. Determinación de actividad de ECA plasmática y tisular (VI)

Se usó la técnica descrita por Piquilloud *et al.*⁸¹, que se basa en la conversión de Z-fenil-L-histidil-L-leucina, un análogo de sustrato para la ECA, en Z-fenil y L-Histidil-leucina (HL). Este último producto se cuantifica por espectrofluorometría, mediante la formación de un aducto fluorescente con ortoftaldehído (OPA), a pH básico. Las determinaciones se realizaron en duplicado y la cantidad de HL producida se interpoló en una curva de calibración.

Se emplearon 10 μ l de plasma heparinizado para la determinación de la actividad plasmática de ECA y 20 μ l de homogenizado de VI para la determinación de la actividad tisular de ECA. Este volumen se adicionó a la siguiente mezcla de reacción: 215 μ l de tampón Tris NaCl pH 7,6 para plasma y 205 μ l tampón para VI y 25 μ l de Z-fenil-L-histidil-L-leucina. Como control se usó la misma mezcla de reacción, pero sin muestra. Una vez que la mezcla se incubó a 37 °C por 45 min para VI esta se deja a -80 °C por 5 minutos, mientras que el plasma se incubaba a 37 °C por 20 min. El producto formado se separa por precipitación de las proteínas plasmáticas con 100 μ l de ácido tricloroacético al 10% frío y centrifugación a 10.000 g por 10 min a 4 °C. El producto fluorescente se forma agregando 100 μ l de OPA (10 mg/ml en metanol) a pH básico y se incubaba por 10 min a 37 °C. La reacción se detiene por adición de 200 μ l de HCl 2 N. La fluorescencia se determinó antes de los 60 min (λ_{ex} 365 nm, λ_{em} 500 nm) . La actividad plasmática de ECA se expresó en U/ml (1U: nmoles HL/min) y la actividad tisular de ECA se expresó en U/mg.

13.4. Determinación de actividad de ECA2 plasmática y tisular (VI)

Este ensayo se basó en el uso del sustrato fluorescente 7- metoxicoumarin- Arg-Pro-Gly-Phe-Ser-Ala-Phe-Lys(Dnp)-OH⁵⁰. En un volumen total de 100 μ L se

adicionaron 12,5 μg de proteína de plasma o tejido, 10 μM de sustrato, 10 mM enalapril y tampón de reacción (100 mM Tris-HCl, pH 7,4). Como control se usó igual mezcla de reacción a la cual se le adicionó 10 mM de EDTA. La mezcla se incubó a 37°C por 30 min y la reacción enzimática fue detenida calentando a 100°C por 5 min. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 10,600 g por 10 min. La fluorescencia en el sobrenadante se midió a 405 nm (λ_{ex} 320 nm). La curva de calibración se realizó agregando concentraciones crecientes de 7 metoxicoumarina-4 acetil-Pro-Leu (49 -245 pmoles).

14. Resultados, tamaños muestrales y análisis estadístico

Los datos obtenidos se expresaron como promedio \pm S.E.M. Cada grupo experimental estuvo constituido por 13-17 animales. Las comparaciones entre los grupo se realizaron mediante el test Kruskal-Wallis seguido de un análisis de Mann-Whitney. Se consideraron diferencias significativas con $p \leq 0,05$.

V. RESULTADOS

1. Parámetros morfométricos, hemodinámicos y de función ventricular

1.1. PAS

No se observaron diferencias en la PAS entre los grupos sham e IAM, siendo ambos normotensos. Sin embargo, enalapril y candesartán disminuyeron significativamente la PAS ($p < 0,05$), respecto a los grupos sin tratamiento. Candesartán mostró mayor efecto hipotensor respecto a enalapril ($p < 0,05$, tabla 1).

1.2 Masa corporal

La tabla 1 muestra que la MC disminuyó en el grupo IAM versus las ratas Sham ($p < 0,05$). El tratamiento con IECA disminuyó significativamente la MC en ratas tanto Sham como IAM ($p < 0,05$). En cambio ARA II disminuyó la MC sólo en el grupo Sham ($p < 0,05$).

1.3. Masa Cardíaca Relativa.

La MCR fue significativamente mayor en las ratas IAM versus las ratas Sham ($p < 0,05$). El tratamiento con IECA o ARA II, disminuyó la MCR en ambos grupos experimentales ($p < 0,05$ tabla 1).

1.4. Contenido de proteínas totales del VI.

La tabla 1 muestra que el contenido de proteínas totales del VI en ratas IAM aumentó respecto a su control ($p < 0,05$). Enalapril y candesartán previnieron este aumento en el grupo IAM, sin efecto en las ratas sham.

1.5. Función ventricular

La evaluación ecocardiográfica de la función ventricular de los corazones de los grupos experimentales mostraron un aumento significativo ($p < 0,05$) del DFSVI y del DFDVI en los grupos IAM comparado con los grupos Sham, con una concomitante disminución de la FAVI y del GPAVI. Enalapril y Candesartán previnieron el efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda en el DFSVI y DFDVI pero no en la FAVI como en el GPAVI. El tamaño del infarto fue similar en ratas IAM como IAM E. Sin embargo el tratamiento con candesartán disminuyó significadamente el porcentaje del VI con infarto (tabla 1).

	Sham	IAM	Sham E	IAM E	Sham C	IAM C
N	17	16	14	13	13	13
PAS (mmHg)	121±2	119±2	101±2€	106±2€	84 ± 4¶€	88 ± 4¶€
MC (g)	389±9	370±9*	341±7€	344±9€	343±11€	357±10*
MCR (mg/100g)	312±9	345±11*	255±7€	286±10€	266±9€	275±8€
Cont. PVI (mg)	10.4±0.1	32±5.7*	13.6±1.3†	14.6±2†	11.6±1.1†	12.3±1.4†
DFSVI (mm)	5.2 ± 0.1	6.6 ± 0.3*	5.0 ± 0.1†	5.6 ± 0.5†	4.5 ± 0.1†	5.3 ± 0.2 †
DFDVI (mm)	7.4 ± 0.2	8.5 ± 0.2*	7.1 ± 0.1†	6.7 ± 0.7†	5.4 ± 0.3	6.8 ± 0.3 †
FAVI (%)	30 ± 2	22 ± 2*	28 ± 2	24 ± 1*	30 ± 4	22 ± 1*
GPAVI (mm)	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1*	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1*	1.0 ± 0.4	0.6 ± 0.4*
% VI infartado	NA	29 ± 1	NA	28 ± 1	NA	18 ± 5**

Tabla 1: Efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda, de enalapril y candesartán en los parámetros hemodinámicos, morfométricos y funcionales del VI. Los resultados representan el promedio ± SEM. PAS : presión arterial sistólica, MC: masa corporal, MCR: masa cardiaca relativa, Cont. PVI: contenido de proteínas del VI. DFSVI: diámetro de fin de sístole del VI, DFDVI: diámetro de fin de diástole del VI, FAVI: fracción de acortamiento del VI, GPAVI: grosor de la pared anterior del VI. * p<0,05 vs sham, ** p<0,05 vs IAM e IAM E, †p<0,05 vs IAM, ¶p<0,05 vs Sham E y IAM E, €p<0,05 vs Sham e IAM.

2. Evaluación de la expresión génica, proteica y actividad de ECA y ECA2.

2.1. Determinación de niveles de mRNA para ECA, mediante RT-PCR convencional

Los niveles de mRNA para ECA mostraron un aumento del 372% en las ratas IAM respecto a su grupo control. Enalapril previno completamente los cambios inducidos por el IAM (fig. 2-3).

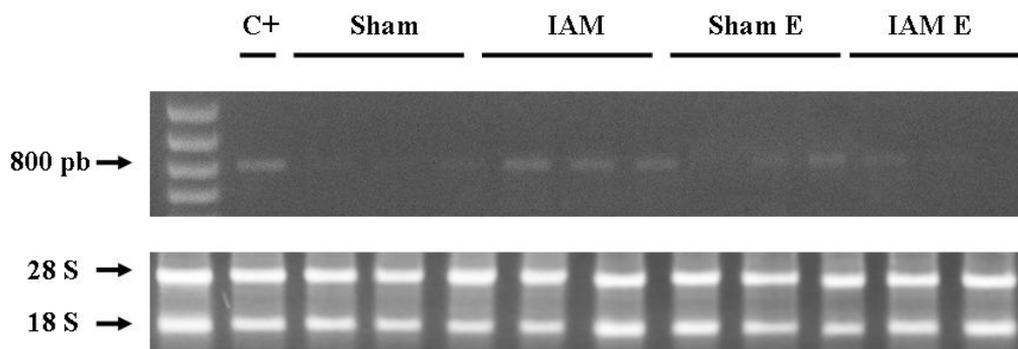


Figura 2: Efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda del VI y de enalapril en los niveles de mRNA para ECA en VI no infartado, medido por RT-PCR.

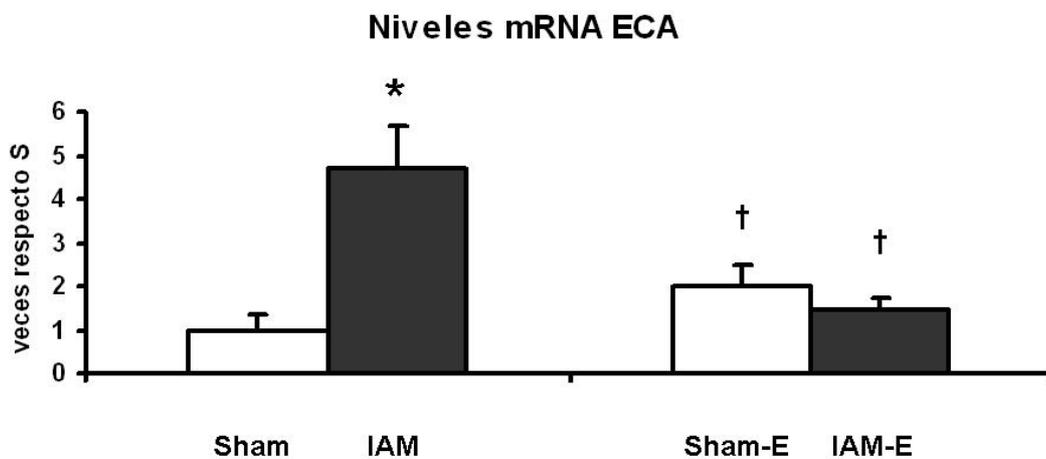


Figura 3: Cuantificación de los niveles de mRNA para ECA en animales IAM y con enalapril. Los resultados representan el promedio \pm SEM. (N=6 por grupo). *p < 0,05 vs Sham, †p < 0,05 vs IAM

2.2. Determinación de niveles de mRNA para ECA2, mediante RT-PCR convencional

En el IAM los niveles del mensajero para ECA2 disminuyeron un 32% en el grupo IAM vs su grupo control. El tratamiento de las ratas IAM con IECA o con ARA II previno la disminución de la expresión génica para esta enzima (fig. 4-5).

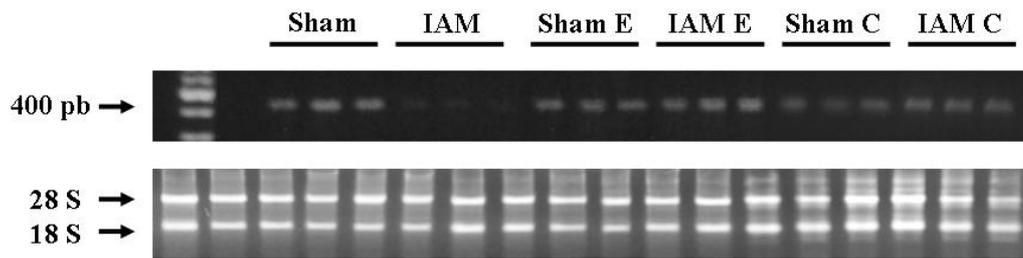


Figura 4: Efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda del VI y de enalapril y candesartán en los niveles de mRNA para ECA2 en VI no infartado, medido por RT-PCR.

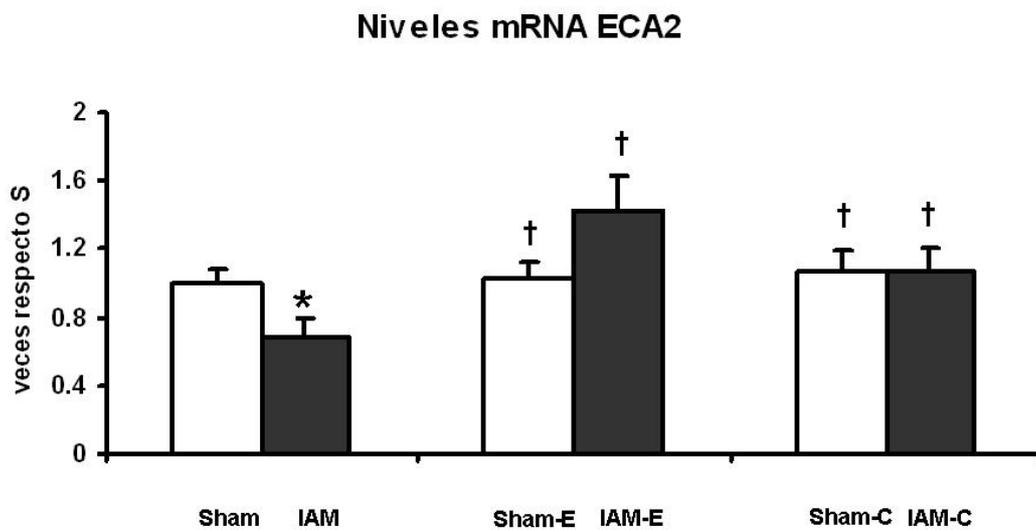


Figura 5: Cuantificación de los niveles de mRNA para ECA2 en VI no infartado de animales IAM con o sin enalapril o Candesartán. Los resultados representan el promedio \pm SEM. (N=6-11 por grupo). * $p < 0,05$ vs Sham, † $p < 0,05$ vs IAM

2.3. Determinación de niveles proteicos para ECA, mediante western blot.

Las figuras 6 y 7, muestran la expresión proteica de la ECA en los grupos IAM con y sin tratamiento. La proteína para ECA aumentó un 80% en el grupo IAM, respecto al grupo Sham. Tanto enalapril y candesartán previnieron el aumento en los niveles proteicos de esta enzima por IAM

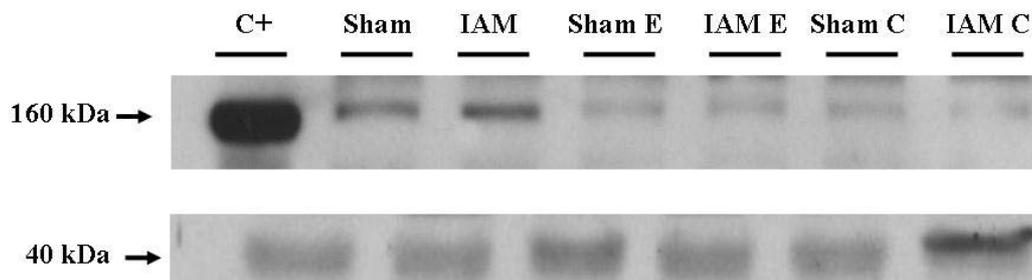


Figura 6: Efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda y de enalapril y candesartán en los niveles proteicos de ECA en VI no infartado, medidos por Western blot

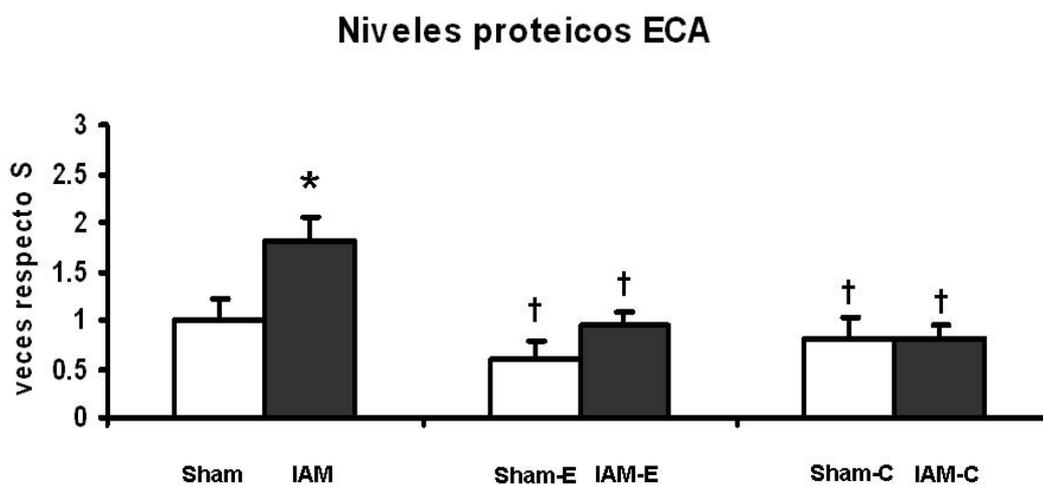


Figura 7: Cuantificación de los niveles proteicos de ECA en animales IAM con o sin enalapril o Candesartán. Los resultados representan el promedio \pm SEM.(N=4 por grupo) . *p<0,05 vs Sham, †p<0,05 vs IAM

2.4. Determinación de actividad enzimática de ECA y ECA2 por fluorimetría.

2.4.1. Determinación de la actividad plasmática de ECA.

La actividad de la ECA plasmática no mostró diferencias respecto a sus controles en las ratas IAM e IAM C. Sin embargo, el tratamiento con enalapril disminuyó en un 100% la actividad circulante de la enzima (fig. 8).

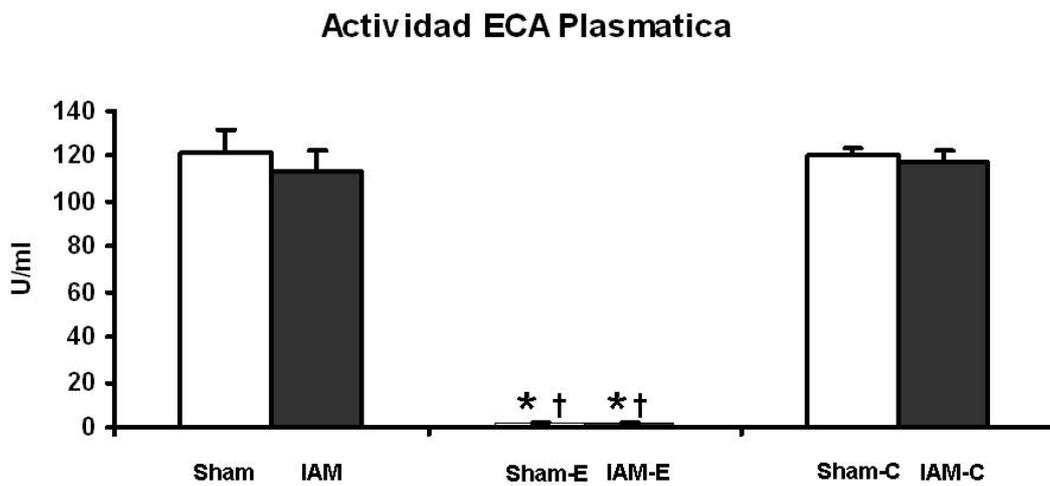


Figura 8: Efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda, de enalapril y candesartán en la actividad plasmática de ECA medida por fluorimetría. Los resultados representan el promedio \pm SEM. (N=11-14 por grupo). * $p < 0,05$ vs Sham, † $p < 0,05$ vs IAM.

2.4.2. Determinación de la actividad de ECA en VI.

La actividad de la ECA en VI aumentó un 100% en el grupo IAM respecto a ratas Sham ($6,8 \pm 1$ vs $3,3 \pm 0,5$, $p < 0,0005$, respectivamente, Figura 9). El aumento del diámetro de fin de sístole del VI se correlacionó directamente con el aumento de la actividad de ECA ventricular ($R=0,501$, $p < 0,04$). Enalapril y candesartán previnieron completamente los cambios inducidos por el IAM como también disminuyeron actividad de ECA en VI en las ratas Sham.

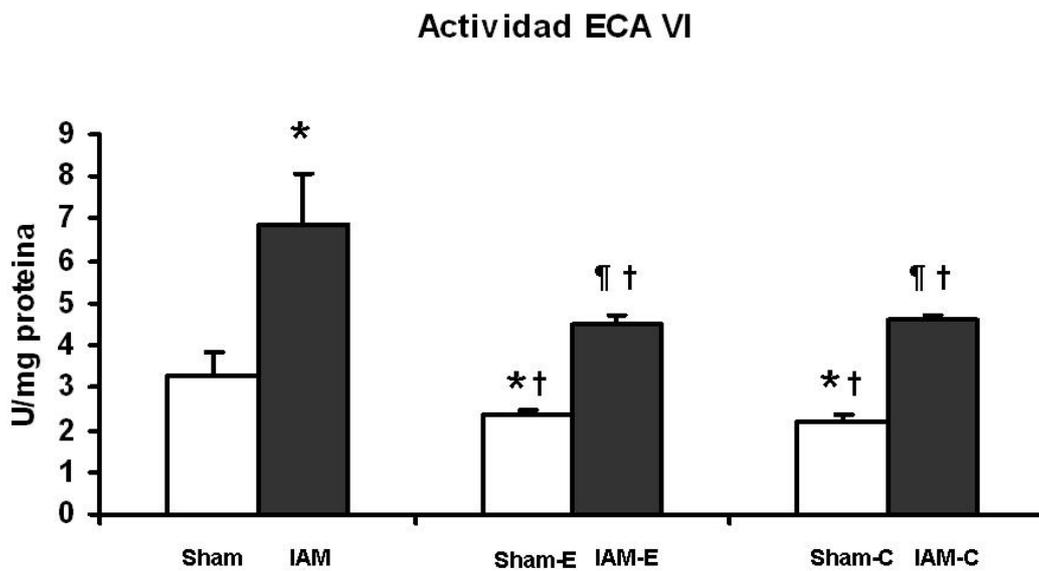


Figura 9: Efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda, de enalapril y candesartán en la actividad en VI no infartado de ECA, medida por fluorimetría. Los resultados representan el promedio \pm SEM. (N=11-14 por grupo). * $p < 0,05$ vs Sham, † $p < 0,05$ vs IAM, ¶ $p < 0,05$ vs Sham E y Sham C.

2.4.3. Determinación de la actividad plasmática de ECA2.

La figura 10 muestra una disminución significativa del 45% en la actividad de la ECA2 plasmática en las ratas con IAM respecto a las ratas Sham ($0,123 \pm 0,034$ vs $0,273 \pm 0,007$, $p < 0,001$). Enalapril y candesartán previnieron completamente los cambios inducidos por el IAM como también aumentaron la actividad circulante de ECA2 en los grupos Sham con tratamiento respecto a su control Sham sin tratamiento.

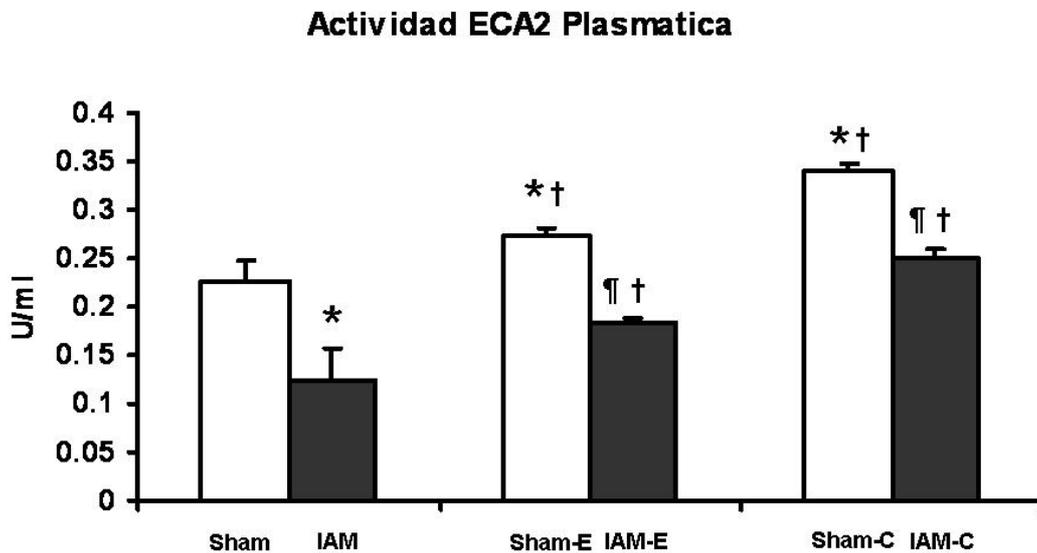


Figura 10: Efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda, de enalapril y candesartán en la actividad plasmática de ECA2 medida por fluorimetría. Los resultados representan el promedio \pm SEM. (N=11-14 por grupo). * $p < 0,05$ vs Sham, † $p < 0,05$ vs IAM, ¶ $p < 0,05$ vs SE-SC.

2.4.4. Determinación de la actividad ECA2 VI.

La actividad de la ECA-2 en VI disminuyó un 27% en ratas IAM vs ratas Sham ($1,17 \pm 0,03$ vs $1,54 \pm 0,1$, $p < 0,0005$, respectivamente, Figura 11). Las actividades de ECA y ECA2 en el VI se correlacionaron inversamente ($R = -0,896$, $p < 0,0005$). El tratamiento con enalapril o candesartán aumentaron significativamente la actividad ECA2 del VI tanto en ratas Sham como IAM, sin diferencias entre ambos tratamientos. (fig. 11).

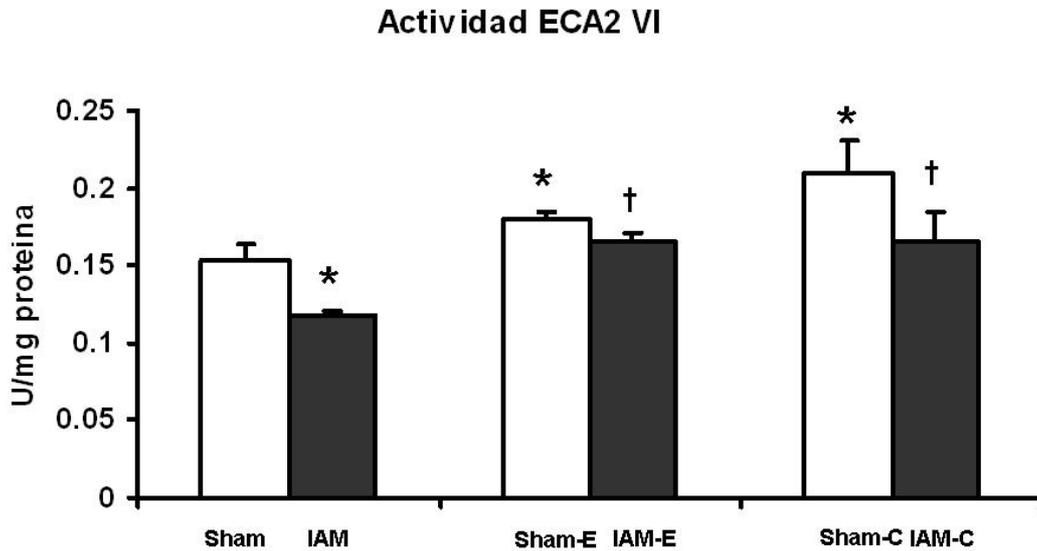


Figura 11: Efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda, de enalapril y candesartán en la actividad en VI no infartado de ECA2, medida por fluorimetría. Los resultados representan el promedio \pm SEM. (N=11-14 por grupo). * $p < 0,05$ vs Sham, † $p < 0,05$ vs IAM.

3. Evaluación de parámetros de remodelado miocárdico

3.1. Hipertrofia cardiaca

3.1.1. Determinación de niveles proteicos para SKA, mediante Western blot

No se observaron diferencias en los niveles proteicos de SKA (fig. 12 y 13) en los grupos experimentales analizados.

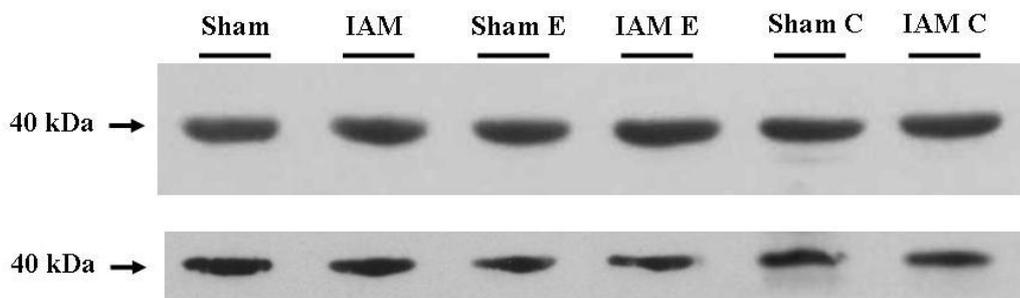


Figura 12: Efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda, de enalapril y candesartán en los niveles proteicos de SKA en VI no infartado medidos por Western blot

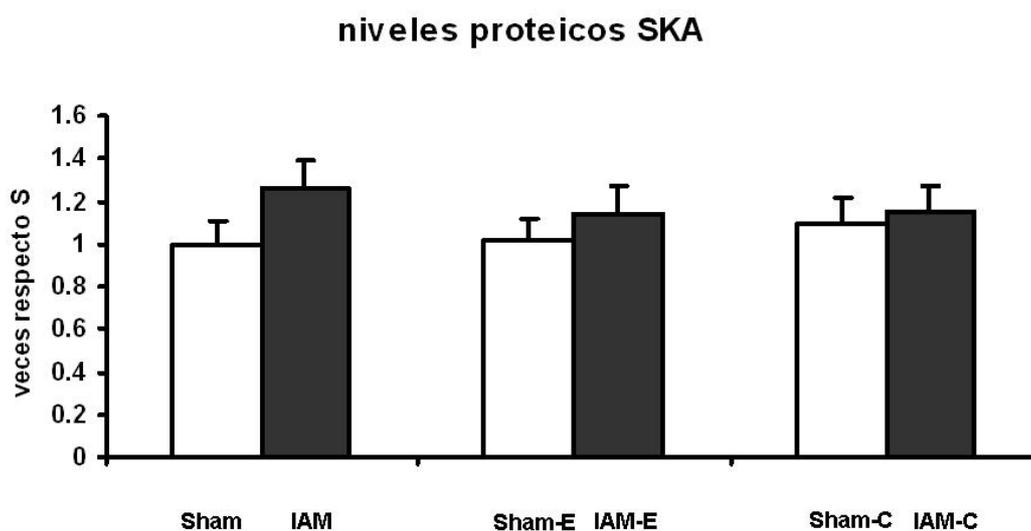


Figura 13: Cuantificación de los niveles proteicos de SKA en VI de animales IAM con o sin enalapril o Candesartán. Los resultados representan el promedio \pm SEM. (N=8 por grupo)

3.1.2. Determinación de niveles proteicos para β -MHC, mediante Western blot

Las figuras 14 y 15 muestran un aumento en un 90% en la expresión proteica de β -MHC en las ratas IAM respecto a los grupos Sham. El tratamiento con enalapril o candesartán previnieron el aumento de la expresión de esta proteína en los grupos IAM. Ambos fármacos no afectaron la expresión de β -MHC en los grupos Sham tratados.

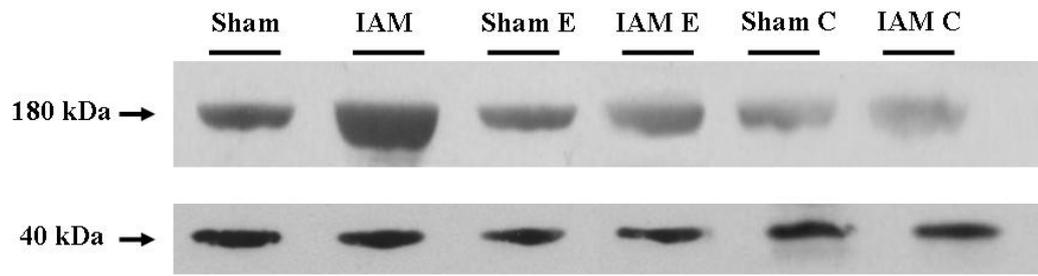


Figura 14: Efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda, de enalapril y candesartán en los niveles proteicos de β -MHC en VI no infartado, medidos por Western blot

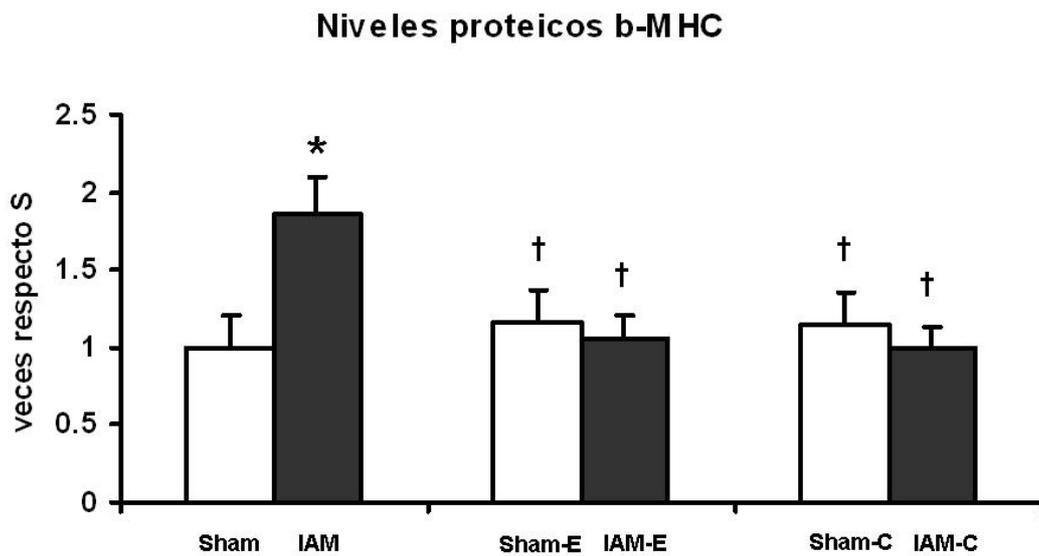


Figura 15: Cuantificación de los niveles proteicos de β -MHC en VI de animales IAM con o sin enalapril o Candesartán. Los resultados representan el promedio \pm SEM.(N =8 por grupo). * $p < 0,05$ vs Sham, † $p < 0,05$ vs IAM.

3.2. Determinación de la actividad MMP-2 en VI

Las ratas IAM sin tratamiento presentaron un aumento significativo de la actividad MMP-2 (57%), respecto al grupo Sham. El tratamiento con enalapril y candesartán disminuyeron significativamente la actividad MMP-2 en un 24% y 36 % respectivamente, respecto a las ratas IAM sin tratamiento (fig. 16).

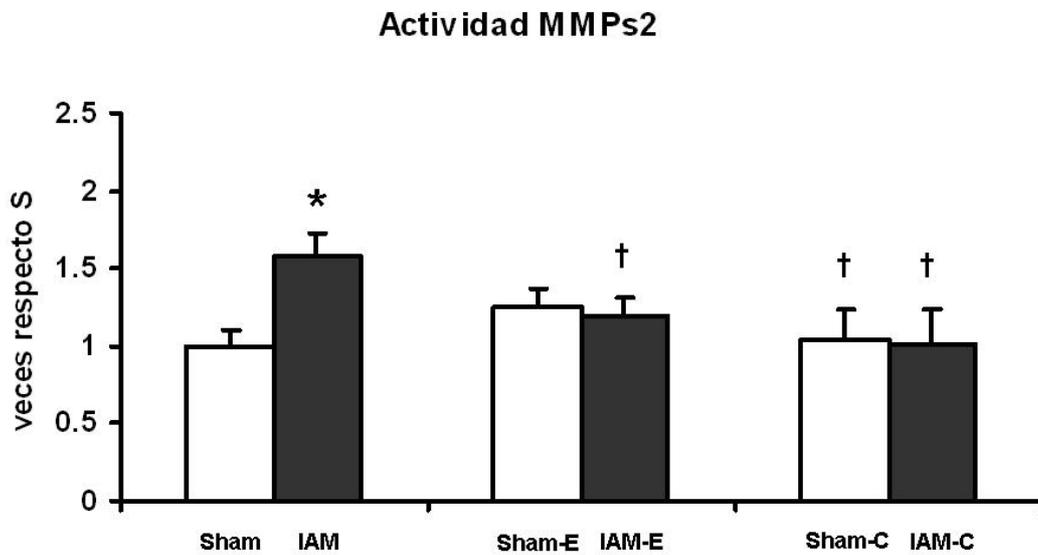


Figura 16: Efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda, de enalapril y candesartán en actividad MMPs2 medidos por Zimografía en VI no infartado. Los resultados representan el promedio \pm SEM.(N =8 por grupo). * $p < 0,05$ vs Sham, † $p < 0,05$ vs IAM.

3.3. Fibrosis

3.3.1. Determinación de niveles proteicos para Fibronectina, mediante Western blot

No se observaron diferencias en los niveles proteicos de FN en ventrículo izquierdo no infartado (fig. 17). La cuantificación del ensayo de Western blot mostró una tendencia al aumento de esta proteína en el grupo IAM respecto de los otros grupos experimentales sin diferencias significativas (fig. 18).

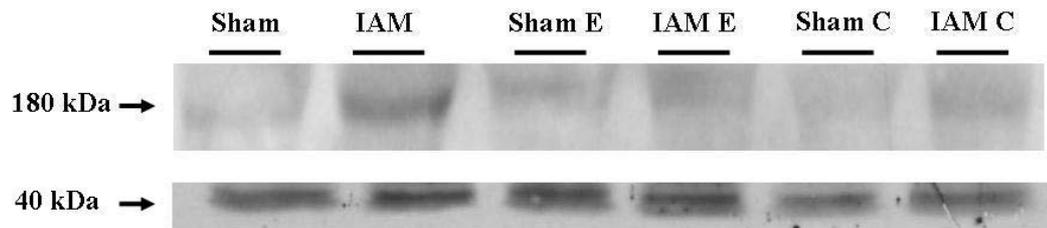


Figura 17: Efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda, de enalapril y candesartán en los niveles proteicos de FN en VI no infartado, medidos por Western blot

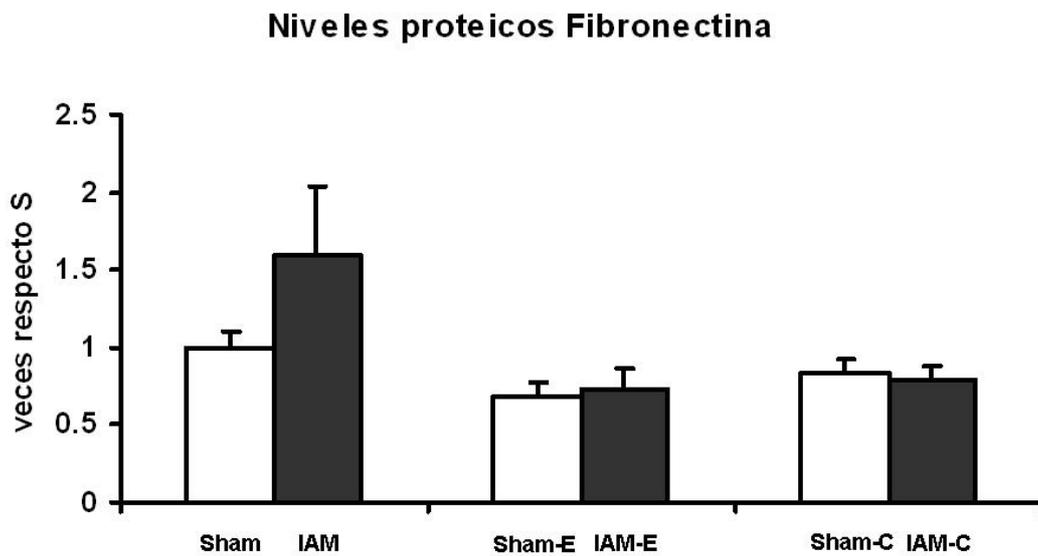


Figura 18: Efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda, de enalapril y candesartán en los niveles proteicos de FN, medidos Western blot. Los resultados representan el promedio \pm SEM.(N=6 por grupo).

3.3.2. Determinación de la fracción volumétrica de colágeno (FVC) en VI

La figura 19, muestra un aumento significativo de la FVC total de aproximadamente un 233 % en las ratas IAM respecto al grupo Sham ($p < 0,05$) con y sin tratamiento. El análisis del contenido de colágeno por área mostró que el tratamiento con enalapril o candesartán no disminuyeron la FVC en el área infartada o de transición (figs 20 y 21, respectivamente). Sin embargo, sólo en el área no infartada, el tratamiento con enalapril o candesartán disminuyeron en un 12% y 8% la FVC (fig 22)

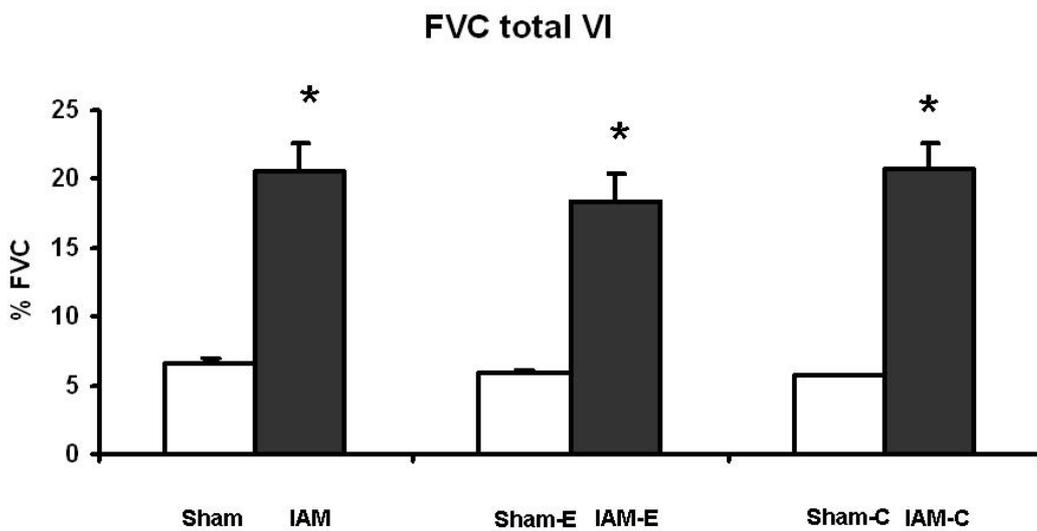


Figura 19: Efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda, de enalapril y candesartán en la FVC. Los resultados representan el promedio \pm SEM. (N=10 por grupo) * $p < 0,05$ vs Sham, Sham E y Sham C.

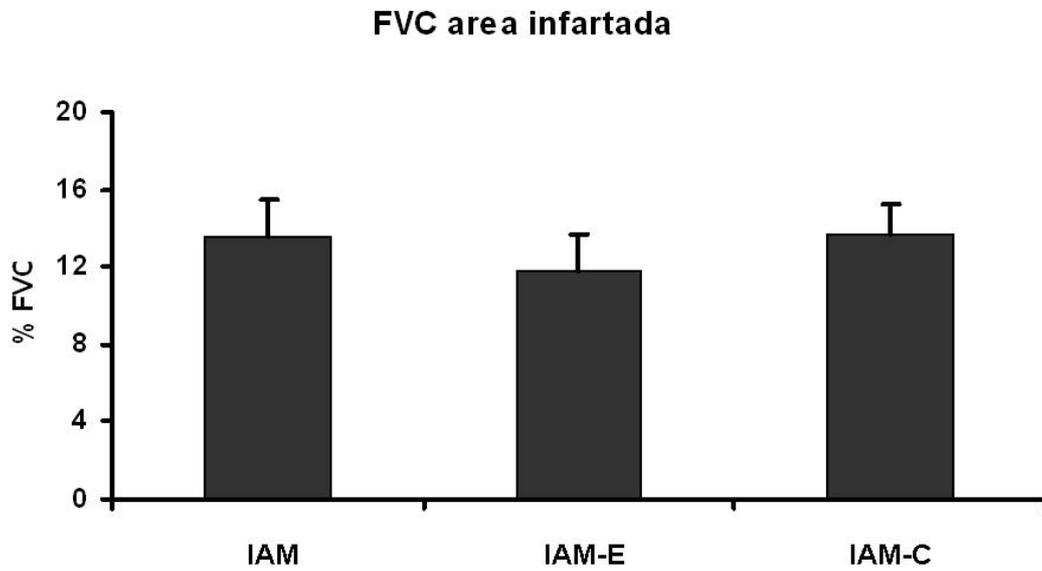


Figura 20: Efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda, de enalapril y candesartán en la FVC en el área infartada. Los resultados representan el promedio \pm SEM.(N=10 por grupo)

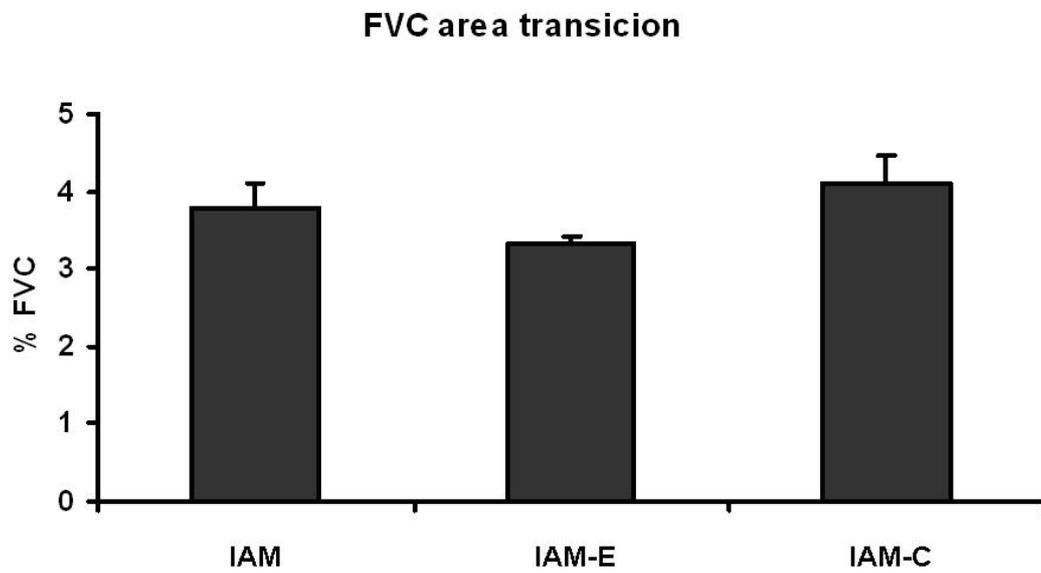


Figura 21: Efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda, de enalapril y candesartán en la FVC en el área de transición. Los resultados representan el promedio \pm SEM.(N=10 por grupo)

FVC area no infartada

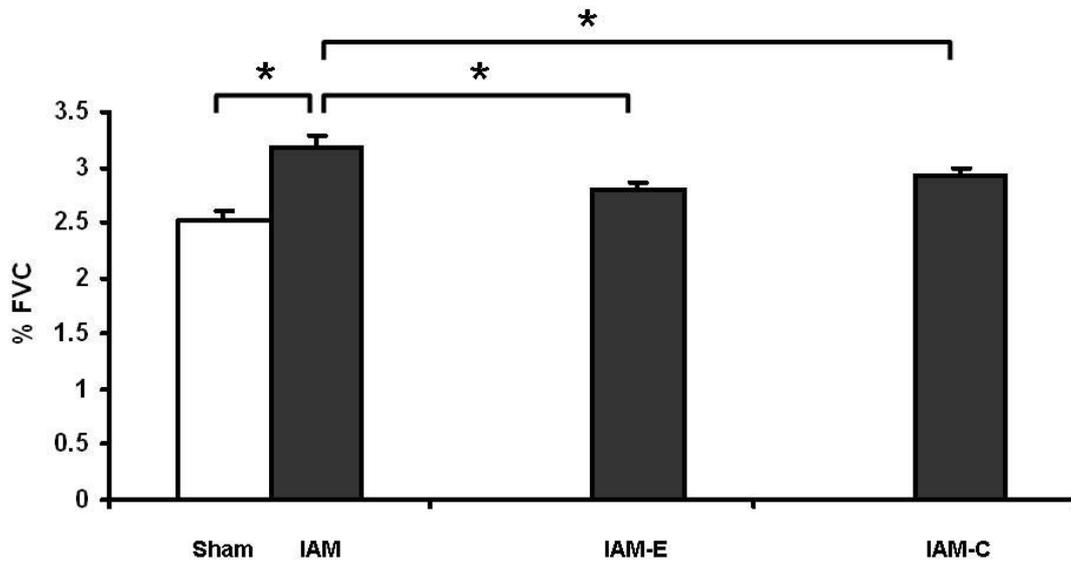


Figura 22: Efecto de la ligadura de la arteria coronaria izquierda, de enalapril y candesartán en la FVC en el área no infartada. Los resultados representan el promedio \pm SEM.(N=10 por grupo) * $p < 0,05$ vs IAM.

VI. DISCUSIÓN

El estudio realizado anteriormente se ha llevado a cabo para tratar de contestar la pregunta que nos formulamos en nuestra hipótesis la cual se puede resumir de la siguiente manera: La inhibición farmacológica de ECA, o bloqueo de RAT1 aumentan la actividad y la expresión de ECA-2, lo que se correlaciona con un menor desarrollo de disfunción ventricular y de remodelamiento miocárdico tardío post infarto al miocardio en ratas. Por lo tanto en las siguientes páginas se discutirán los resultados obtenidos y se contrastarán con reportes de la literatura, para así avanzar en la búsqueda del papel que podría tener ECA2 en el proceso fisiopatológico de disfunción ventricular izquierda y remodelamiento miocárdico. Además se analizarán las fortalezas y debilidades del presente trabajo para así concluir con las posibles proyecciones que se puedan desprender de éste.

Nuestros resultados mostraron que: a) Las actividades circulantes y en VI de ECA2 como sus niveles de mRNA están disminuidas en la fase tardía de la disfunción ventricular izquierda post IAM, lo que se asoció a mayor RM medido por aumentos de los parámetros de DFSVI, DFDVI, HVI, contenido de colágeno y actividad MMP-2 en el VI no infartado. b) Tanto enalapril como candesartán previnieron la disminución de las actividades circulante y en VI de la ECA2, lo que se asoció a una disminución de los parámetros de DFSVI, DFDVI, HVI, contenido de colágeno y actividad MMP-2 en área no IAM. c) Sólo candesartán previno un aumento en el % de área infartada del VI. **Todos estos antecedentes sugieren una significativa interacción entre ECA y ECA2 en el RM post IAM**

El RM ocurre en respuesta a una amplia variedad de estímulos bioquímicos y morfológicos-estructurales. El RM es un mecanismo de adaptación asociado al desarrollo de disfunción ventricular y que en etapas tardías progresa a IC, arritmias e

isquemia⁸². Se ha demostrado que los componentes del SRA, tales como ECA y Ang II están activados post IAM⁸³. Como también que el SRA participa en la acumulación de colágeno y por ende del desarrollo de fibrosis en el corazón⁸⁴. Ang II estimula la secreción y producción de colágeno en fibroblastos cardíacos vía el receptor 1 de Ang II (RAT1)³¹. Además, varias evidencias sugieren que la Ang II juega un rol crítico en mediar la hipertrofia miocárdica a través de efectos directos en la contractilidad, inducción de genes que promueven el crecimiento, aumento de la síntesis de proteínas, y crecimiento celular^{14,85,86}. En el corazón, la Ang II causa hipertrofia cardíaca independiente de su efecto en la presión arterial, mientras que el bloqueo del SRA atenúa o revierte las adaptaciones celulares a la sobrecarga de presión⁸⁶. En cambio, la Ang-(1-7) atenúa el desarrollo de IC post IAM y actúa como un factor antiarrítmico durante la isquemia miocárdica con reperfusión⁸⁷.

Nuestros resultados muestran que después de 8 semanas post IAM, la disfunción cardíaca se caracterizó por un aumento del DFSVI y DFDVI y desarrollo de HVI patológica (medida por aumento del contenido de proteínas totales y niveles proteicos de β -MHC), una disminución significativa de la fracción de acortamiento como del grosor de la pared infartada y área miocárdica de fin de sístole, donde el % del perímetro del VI con IAM correspondió a un 29 %. Estos efectos detectados en la fase tardía del RM post IAM son similares a los observados por Johnston *et al.*⁸⁸. Aunque la actividad ECA del VI aumentó significativamente y se correlacionó con el diámetro VI de fin de sístole, la actividad plasmática de la ECA no cambió lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Hirsch *et al.*²³, quienes no encontraron cambios en la actividad circulante en ratas controles versus IAM, 85 días después de la cirugía. La activación del SRA post IAM, se asoció con una disminución significativa de la actividad enzimática circulante y en VI de ECA-2. Estos cambios favorecieron la

fibrosis miocárdica en el área no infartada medida por la fracción volumétrica de colágeno y la actividad de MMP-2. No se observaron diferencias en la razón peso pulmón/peso corporal entre ratas IAM y sham, lo cual demostró la presencia de IC crónica no congestiva (dato no mostrado). Además, la actividad miocárdica de la ECA2 se correlacionó con su expresión génica y con la fracción de acortamiento⁸⁹. Antecedentes adicionales obtenidos por nuestro grupo de trabajo en el modelo disfunción ventricular temprano y tardío (1 y 8 semanas post IAM), muestran que el desarrollo de IC afectó la razón entre ECA y ECA2, pues la actividad de la ECA2 disminuyó progresivamente, mientras la actividad de la ECA y niveles de Ang II aumentaron⁸⁹. La razón Ang II/Ang I fue consistente con esta observación, sin cambios en los niveles de Ang-(1-7) y Ang-(1-9)⁸⁹, como tampoco en los niveles de Bks-(1-7) y (1-9). Resultados similares fueron encontrados en un modelo experimental de IC por sobrecarga de volumen, donde elevados niveles cardíacos de ECA se asociaron a bajos niveles de ECA2 y por consiguiente a mayores niveles de Ang II⁸³.

Las evidencias que se han ido acumulando desde el descubrimiento de la ECA2, muestran que esta enzima cumple un papel crítico en el control de la fisiología cardíaca y que su expresión alterada se vincula a importantes cambios fisiopatológicos del sistema cardiovascular^{62,65}. Por un lado, Crackower *et al*⁵⁷ encontraron que ratones carentes del gen que codifica para la ECA2 presentaron menor función cardíaca, observándose un leve engrosamiento de la pared del VI y una disminución severa de su contractilidad lo que se asoció con un aumento en la expresión cardíaca de los genes inducidos por hipoxia como BNIP3 y PAI-1. Esto plantea un rol adicional de la ECA-2 en la isquemia cardíaca. En el mismo modelo, además se detectaron aumentos en los niveles de las Ang I y II en riñón, corazón y plasma. Por el contrario, ratones transgénicos para la ECA2 mostraron mayor incidencia de muerte súbita lo cual se

correlacionó con el nivel de expresión de la ECA²⁶². Sin embargo los roles relativo de la ECA y ECA2 deben ser estudiados en condiciones fisiológicas donde se emulen desórdenes patológicos, tales como hipertensión, IC e isquemia cardiaca.

Los efectos beneficiosos de los inhibidores de la ECA y ARA II en la IC son atribuibles, al menos en parte, porque disminuyen los eventos gatillados por Ang II como la elevación del tono vascular, remodelamiento cardiovascular y retención de sodio y agua⁸⁶. Nuestros resultados son consistentes con trabajo previos⁹⁰ que muestran que los inhibidores de la ECA no tienen efecto en la fracción de acortamiento pero si disminuyen la HVI como también el remodelamiento en este modelo experimental^{91,92}. Además, claramente demuestran la influencia de enalapril en la actividad circulante y en VI de ECA2, lo cual no fue encontrado por Burrell *et al*⁵², usando ramipril. En el área no infartada este aumento en la actividad de la ECA2 se asoció a una disminución significativa en los parámetros de RM como contenido de colágeno, actividad de MMP-2 e HVI. Estos resultados sugieren una interacción entre ECA y ECA-2 en el remodelamiento miocárdico post IAM. Recientemente, se ha propuesto un nuevo mecanismo de acción farmacológica de los inhibidores de la ECA, basado en las observaciones que la ECA degrada Ang-(1-7)^{93,94}. Los efectos beneficiosos de los IECAs puede ser atribuída a la activación de diferentes vías de señalización de la ECA más que a cambios en los niveles de Ang-(1-7)²³. Un mecanismo alternativo que podría explicar el efecto del enalapril en la actividad y expresión génica de ECA2 podría ser por efecto directo de los IECAs en la ECA⁹⁵, lo cual explicaría porqué el enalapril no produce el mismo efecto que ramipril.

La primera demostración del papel modulador del RAT1 en los niveles del mRNA de la ECA2 cardíaco, fue realizada por Ishiyama *et al.*⁶⁵, al estudiar los mecanismos

responsables del aumento de su expresión. Se evaluó si el gen de la ECA2 responde al aumento compensatorio en los niveles circulantes y tisulares de Ang II y Ang-(1-7), producto de la disfunción VI post IAM. Para ello determinaron en ratas infartadas el efecto de los antagonistas del RAT1 (ARAI), losartán y/o olmesartán, durante 28 días post IAM. El mRNA para ECA2 aumentó 3 veces en el miocardio viable y se correlacionó con los niveles de Ang-(1-7). También se encontró un aumento del mRNA de ECA2 al usar un ARA II doble que inhibió el RAT1 y el RAT2. Nuestros resultados muestran que candesartán aumentó la actividad y expresión génica de ECA2 lo cual se asoció a menor actividad de ECA y menor RM disminuyendo en forma significativa el área del VI con infarto respecto al tratamiento con enalapril. Estudios recientes del laboratorio muestran que el tratamiento con candesartán a diferencia del enalapril, favorece la activación de la vía paralela y vasodilatadora del SRA, ya que aumentó en forma significativa tanto los niveles de Angs -(1-9) y (1-7) producto de la activación de la ECA2.

Las señales regulatorias de la ECA2 se han evaluado en **ratas normotensas** que han recibido durante 12 días lisinopril, losartán, o ambos (Ferrario *et al.*, 2005)⁹⁴. Ambos tratamientos aumentaron el mRNA para ECA2 cardiaco, mientras que su actividad enzimática medida como la velocidad de formación de Ang-(1-7) a partir de Ang II, en membranas de corazón, aumentó sólo cuando se usó losartán (solo o en combinación). A nivel circulante, con lisinopril disminuyeron los niveles de Ang II y aumentaron los de Ang-(1-7), mientras que losartán aumentaron los niveles de ambos péptidos. Estos datos sugieren que Ang II podría ser el estímulo determinante de la expresión cardiaca de la ECA2, ya que la disminución de los niveles de Ang II o la prevención de su unión a los RAT1 aumentó los niveles del mRNA para ECA2.

La ECA hidroliza más fácilmente Bk, potente agente cardioprotector y vasodilatador, que Ang I⁹⁶, por lo cual el efecto terapéutico de los IECA puede reflejarse en una disminución de los niveles de Ang II como un aumento en los niveles de Bk-(1-9). Al respecto, resultados de nuestro grupo disponibles recientemente (no publicados aún), muestran, a nivel circulante, un aumento significativo en los niveles plasmáticos de BK-(1-9) y disminución de BK-(1-7) en las ratas tratadas con enalapril. Estos resultados se suman a nuestros estudios previos⁸⁹ en el mismo modelo experimental donde enalapril aumentó los niveles de Ang I y (1-9) y disminuyó Ang II sin cambios en los niveles de Ang-(1-7). Por largo tiempo la atención se ha enfocado en la Ang-(1-7) y como este péptido puede contrarrestar los efectos de Ang II a través de la estimulación de la óxido nítrico sintasa y de los niveles de BKs⁹⁷. Nuestros resultados *in vivo* muestran por primera vez que el aumento en la actividad de la ECA2 por enalapril se asocia a un aumento en los niveles de Bk-(1-9) y no de Ang-(1-7), a diferencia de lo encontrado con losartán que aumentó los niveles de Ang-(1-7) y el mRNA para ECA2⁹⁴.

Nuestros resultados también muestran que la actividad plasmática y en VI puede ser regulada a nivel transcripcional. Experimentos adicionales deben realizarse para clarificar si este efecto es una consecuencia de menor transcripción o aumento en la degradación del mRNA para ECA2.

Existe un sólo reporte en la literatura sobre la **participación de ECA2 en la protección de la hipertrofia y fibrosis miocárdica**⁹⁸ en ratas a las que se administró un vector lentiviral (intramiocárdico) que sobrepresaba ECA2 (Rlenti ECA2+) y que posteriormente se les administró Ang II o suero salino por 4 semanas. Como controles se usaron ratas sometidas a un procedimiento experimental similar pero infectadas con

un vector lentiviral que sobreexpresaba la proteína fluorescente verde (GFP, Rlenti GFP). La administración de Ang II aumentó significativamente la presión arterial tanto en Rlenti ECA2 y en Rlenti GFP, mientras que, la sobreexpresión de ECA2 disminuyó significativamente el desarrollo de HVI y de fibrosis miocárdica inducidas por Ang II. **Estos resultados apuntan al efecto protector local de ECA2 en este contexto. Sin embargo, se desconoce si este efecto protector se relaciona con mejoría de la función ventricular. Tampoco se conocen las señales celulares gatilladas por la sobreexpresión de ECA2 miocárdica que previenen la HVI y la fibrosis hipertensiva.**

En conclusión, el RM post IAM se asoció a un aumento de la actividad enzimática de ECA y a una disminución de la actividad enzimática de ECA-2. Estos cambios favorecieron la fibrosis miocárdica y la HVI. El aumento de la actividad y expresión de la ECA2 por enalapril y candesartán previnieron estos efectos. Los mecanismos que probablemente usan ambos fármacos son diferentes. Los resultados que actualmente disponemos nos hacen pensar que los efectos benéficos del enalapril se asocian a un aumento de la expresión de la ECA2 y niveles de BK-(1-9). Mientras que el aumento de la expresión de ECA2 por candesartán se asociaría a mayores niveles de los péptidos de la vía vasodilatadora del SRA como Ang-(1-9) y (1-7). Por lo tanto, la interregulación de la ECA y ECA2 observada en este estudio podría ser la clave para entender el mecanismo que afecta la producción de Ang II y sus consecuencias patofisiológicas.

VII. PERSPECTIVAS

Nuestros resultados entregan antecedentes *in vivo* del papel la ECA2 en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares como blanco para el desarrollo de terapias farmacológicas y en un futuro de terapia génica que aumenten la expresión de la ECA2. La determinación de la actividad de la ECA2 podría representar un importante marcador clínico para determinar el grado de disfunción ventricular, RM y el efecto de agentes terapéuticos en estos procesos patológicos.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Danilczyk U, Eriksson U, Crackower MA, Penninger JM. A story of two ACEs. *J Mol Med.* 2003;81:227-34.
2. Medina E, Kaempffer AM. [Adult mortality in Chile]. *Rev Med Chil.* 2000;128:1144-9.
3. Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med.* 2003;348:2007-18.
4. McMurray J, Pfeffer MA. New therapeutic options in congestive heart failure. *Circulation.* 2002;105:2099-106.
5. Otsuji Y, Gilon D, Jiang L, He S, Leavitt M, Roy MJ, Birmingham MJ, Levine RA. Restricted diastolic opening of the mitral leaflets in patients with left ventricular dysfunction: evidence for increased valve tethering. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:398-404.
6. Valdes F, Morales J. Factores de riesgo y enfermedad cardiovascular en el paciente urémico. *NEFROLOGIA Vol XXII.* 2002;suplemento 4.
7. Piano MR, Kim SD, Jarvis C. Cellular events linked to cardiac remodeling in heart failure: targets for pharmacologic intervention. *J Cardiovasc Nurs.* 2000;14:1-23; quiz 119-20.
8. Davis DG, Nelson KR, Markesbery WR. Congenital myopathy and cardiomyopathy with identical ultrastructural changes. *Arch Neurol.* 1990;47:1141-4.
9. Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, Quaini F, Sonnenblick EH, Olivetti G, Anversa P. Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation.* 1994;89:151-63.
10. Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *Faseb J.* 1991;5:3037-46.
11. Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln SE, Kusumi K, Bunker RK, Mao YP, Ganten D, Dzau VJ, Lander ES. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell.* 1991;67:213-24.
12. Erdos EG. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. *Hypertension.* 1990;16:363-370.

13. Katwa LC, Ratajska A, Cleutjens JP, Sun Y, Zhou G, Lee SJ, Weber KT. Angiotensin converting enzyme and kininase-II-like activities in cultured valvular interstitial cells of the rat heart. *Cardiovasc Res.* 1995;29:57-64.
14. De Mello WC, Danser AH. Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension.* 2000;35:1183-8.
15. Chappell MC, Millsted A, Diz DI, Brosnihan KB, Ferrario CM. Evidence for an intrinsic angiotensin system in the canine pancreas. *J Hypertens.* 1991;9:751-9.
16. Iyer SN, Chappell MC, Averill DB, Diz DI, Ferrario CM. Vasodepressor actions of angiotensin-(1-7) unmasked during combined treatment with lisinopril and losartan. *Hypertension.* 1998;31:699-705.
17. Yamada K, Iyer SN, Chappell MC, Ganten D, Ferrario CM. Converting enzyme determines plasma clearance of angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 1998;32:496-502.
18. Ferrario CM, Chappell MC, Dean RH, Iyer SN. Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9:1716-22.
19. Danser AH, Saris JJ, Schuijt MP, van Kats JP. Is there a local renin-angiotensin system in the heart? *Cardiovasc Res.* 1999;44:252-65.
20. Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Hohle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ. Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl.* 1996;14:S95-103.
21. Corvol P, Michaud A, Soubrier F, Williams TA. Recent advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin I converting enzyme. *J Hypertens Suppl.* 1995;13:S3-10.
22. Sun Y, Weber KT. Angiotensin-converting enzyme and wound healing in diverse tissues of the rat. *J Lab Clin Med.* 1996;127:94-101.
23. Hirsch AT, Talsness CE, Schunkert H, Paul M, Dzau VJ. Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. *Circ Res.* 1991;69:475-82.
24. Challah M, Nicoletti A, Arnal JF, Philippe M, Laboulandine I, Allegrini J, Alhenc-Gelas F, Danilov S, Michel JB. Cardiac angiotensin converting enzyme overproduction indicates interstitial activation in renovascular hypertension. *Cardiovasc Res.* 1995;30:231-9.

25. Ocaranza MP, Piddo AM, Faundez P, Lavandero S, Jalil JE. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism influences chronic hypertensive response in the rat Goldblatt model. *J Hypertens*. 2002a;20:413-20.
26. Francis DP. Low-cost shuttle walk test for assessing exercise capacity in chronic heart failure. *Int J Cardiol*. 2000;76:105-6.
27. Fishel RS, Thourani V, Eisenberg SJ, Shai SY, Corson MA, Nabel EG, Bernstein KE, Berk BC. Fibroblast growth factor stimulates angiotensin converting enzyme expression in vascular smooth muscle cells. Possible mediator of the response to vascular injury. *J Clin Invest*. 1995;95:377-87.
28. Xavier-Neto J, Pereira AC, Junqueira ML, Carmona R, Krieger JE. Rat angiotensin-converting enzyme promoter regulation by beta-adrenergics and cAMP in endothelium. *Hypertension*. 1999;34:31-8.
29. Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chappell MC, Brosnihan KB. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension*. 1999;33:323-8.
30. French JF, Anderson BA, Downs TR, Dage RC. Dual inhibition of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase in rats with hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;26:107-13.
31. Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol*. 2000;15:264-72.
32. Dostal DE, Baker KM. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res*. 1999;85:643-50.
33. Varo N, Etayo JC, Zalba G, Beaumont J, Iraburu MJ, Montiel C, Gil MJ, Monreal I, Diez J. Losartan inhibits the post-transcriptional synthesis of collagen type I and reverses left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1999;17:107-14.
34. Brilla CG. Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis. *Cardiovasc Res*. 2000;47:1-3.
35. Schnee JM, Hsueh WA. Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res*. 2000;46:264-8.
36. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2000;275:33238-43.

37. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000;87:E1-9.
38. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2002;277:14838-43.
39. Kokkonen JO, Kuoppala A, Saarinen J, Lindstedt KA, Kovanen PT. Kallidin- and bradykinin-degrading pathways in human heart: degradation of kallidin by aminopeptidase M-like activity and bradykinin by neutral endopeptidase. *Circulation.* 1999;99:1984-90.
40. Drummer OH, Kourtis S, Johnson H. Effect of chronic enalapril treatment on enzymes responsible for the catabolism of angiotensin I and formation of angiotensin II. *Biochem Pharmacol.* 1990;39:513-8.
41. Zisman LS, Keller RS, Weaver B, Lin Q, Speth R, Bristow MR, Canver CC. Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme Homologue ACE2. *Circulation.* 2003;108:1707-12.
42. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:8258-63.
43. Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem.* 1991;266:15377-83.
44. Stock P, Liefeldt L, Paul M, Ganten D. Local renin-angiotensin systems in cardiovascular tissues: localization and functional role. *Cardiology.* 1995;86 Suppl 1:2-8.
45. Turner AJ, Tanzawa K. Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *Faseb J.* 1997;11:355-64.

46. Vendrall J, Querol E, Avilés F. Metalloprotease inhibitors and their protein inhibitors. Structure, function and biochemical properties. *Biochim. Biophys.* 2000;1477:284-298.
47. Marceau F. Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology.* 1995;30:1-26.
48. Cushman DW, Cheung HS, Sabo EF, Ondetti MA. Design of new antihypertensive drugs: potent and specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Prog Cardiovasc Dis.* 1978;21:176-82.
49. Dales NA, Gould AE, Brown JA, Calderwood EF, Guan B, Minor CA, Gavin JM, Hales P, Kaushik VK, Stewart M, Tummino PJ, Vickers CS, Ocain TD, Patane MA. Substrate-based design of the first class of angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) inhibitors. *J Am Chem Soc.* 2002;124:11852-3.
50. Huang L, Sexton DJ, Skogerson K, Devlin M, Smith R, Sanyal I, Parry T, Kent R, Enright J, Wu QL, Conley G, DeOliveira D, Morganelli L, Ducar M, Wescott CR, Ladner RC. Novel peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem.* 2003;278:15532-40.
51. Harmer D, Gilbert M, Borman R, Clark KL. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett.* 2002;532:107-10.
52. Burrell LM, Risvanis J, Kubota E, Dean RG, MacDonald PS, Lu S, Tikellis C, Grant SL, Lew RA, Smith AI, Cooper ME, Johnston CI. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart J.* 2005;26:369-75; discussion 322-4.
53. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 2003;426:450-4.
54. Prabakaran P, Xiao X, Dimitrov DS. A model of the ACE2 structure and function as a SARS-CoV receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;314:235-41.
55. Wong SK, Li W, Moore MJ, Choe H, Farzan M. A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem.* 2004;279:3197-201.

56. Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, Lely AT, Navis GJ, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol.* 2004;203:631-7.
57. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.* 2002;417:822-8.
58. Alrred A, Donoghue M, Acton S, Coffman T. Regulation of blood pressure by angiotensin converting enzyme homologue ACE2. *35th annual meeting of the American Society of Nephrology.* 2002.
59. Yagil Y, Yagil C. Hypothesis: ACE2 modulates blood pressure in the mammalian organism. *Hypertension.* 2003;41:871-3.
60. Ferrario CM. Commentary on Tikellis et al: There is more to discover about angiotensin-converting enzyme. *Hypertension.* 2003;41:390-1.
61. Goulter AB, Goddard MJ, Allen JC, Clark KL. ACE2 gene expression is up-regulated in the human failing heart. *BMC Med.* 2004;2:19.
62. Donoghue M, Wakimoto H, Maguire CT, Acton S, Hales P, Stagliano N, Fairchild-Huntress V, Xu J, Lorenz JN, Kadambi V, Berul CI, Breitbart RE. Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35:1043-53.
63. Averril D. 2003.
64. Ishiyama Y, Averril D, Gallagher P, Tallant A, Ferrario C. Expression of the renin-angiotensin system in a rat model of myocardial infarction. *Inter-american Soc. Hypertension.* 2003:233.
65. Ishiyama Y, Gallagher PE, Averill DB, Tallant EA, Brosnihan KB, Ferrario CM. Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors. *Hypertension.* 2004;43:970-6.
66. Piddo AM, Sanchez MI, Sapag-Hagar M, Corbalan R, Foncea R, Ebensperger R, Godoy I, Melendez J, Jalil JE, Lavandero S. Cyclic AMP-dependent protein kinase and mechanical heart function in ventricular hypertrophy induced by pressure overload or secondary to myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:1073-83.

67. Hu K, Gaudron P, Bahner U, Palkovits M, Ertl G. Changes of atrial natriuretic peptide in brain areas of rats with chronic myocardial infarction. *Am J Physiol.* 1996;270:H312-6.
68. Wang J, Guo X, Dhalla NS. Modification of myosin protein and gene expression in failing hearts due to myocardial infarction by enalapril or losartan. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1690:177-84.
69. Sato H, Yaoita H, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of heart failure due to coronary stenosis by ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H359-68.
70. Ocaranza MP, Godoy I, Ramirez C, Jalil JE. Enzima convertidora de Angiotensina I Homologa en la disfuncion Ventricular Izquierda Post infarto al miocardio en la rata. *Revista Chilena de Cardiologia.* 2004;23:291.
71. Lim WC, Park JB, Lee YJ. Analysis of angiotensin II mediated COX-2 downregulation in angiotensin II- or aldosterone-infused hypertensive rat. *Biol Pharm Bull.* 2003;26:1086-8.
72. Ammarguellat FZ, Gannon PO, Amiri F, Schiffrin EL. Fibrosis, matrix metalloproteinases, and inflammation in the heart of DOCA-salt hypertensive rats: role of ET(A) receptors. *Hypertension.* 2002;39:679-84.
73. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
74. Esther CR, Marino EM, Howard TE, Machaud A, Corvol P, Capecchi MR, Bernstein KE. The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest.* 1997;99:2375-85.
75. Peterson JT, Li H, Dillon L, Bryant JW. Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. *Cardiovasc Res.* 2000;46:307-15.
76. Ocaranza MP, Diaz-Araya G, Carreno JE, Munoz D, Riveros JP, Jalil JE, Lavandero S. Polymorphism in gene coding for ACE determines different development of myocardial fibrosis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H498-506.
77. Dussailant G, Jalil JE, Cespedes C. Amiodarone protection against myocardial injury and fibrosis induced by isoprenaline is abolished by thyroid hormone. *Cardiovasc Res.* 1994;28:1008-13.

78. Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Weber KT. Coronary vascular remodeling and myocardial fibrosis in the rat with renovascular hypertension. Response to captopril. *Am J Hypertens*. 1991;4:51-5.
79. Ocaranza MP, Diaz-Araya G, Chiong M, Munoz D, Riveros JP, Ebensperger R, Sabat S, Irarrazaval P, Jalil JE, Lavandero S. Isoproterenol and angiotensin I-converting enzyme in lung, left ventricle, and plasma during myocardial hypertrophy and fibrosis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;40:246-54.
80. Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol*. 1971;20:1637-48.
81. Piquilloud Y, Reinharz A, Roth M. [Action of converting enzyme on synthetic substrates]. *Helv Physiol Pharmacol Acta*. 1968;26:CR 231-2.
82. Friehs I, del Nido PJ. Increased susceptibility of hypertrophied hearts to ischemic injury. *Ann Thorac Surg*. 2003;75:S678-84.
83. Stumpe KO, Solle H, Klein H, Kruck F. Mechanism of sodium and water retention in rats with experimental heart failure. *Kidney Int*. 1973;4:309-17.
84. Suzuki G, Morita H, Mishima T, Sharov VG, Todor A, Tanhehco EJ, Rudolph AE, McMahon EG, Goldstein S, Sabbah HN. Effects of long-term monotherapy with eplerenone, a novel aldosterone blocker, on progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure. *Circulation*. 2002;106:2967-72.
85. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. 2000;52:11-34.
86. Schieffer B, Wirger A, Meybrunn M, Seitz S, Holtz J, Riede UN, Drexler H. Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circulation*. 1994;89:2273-82.
87. Ferreira AJ, Santos RA, Almeida AP. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*. 2001;38:665-8.
88. Johnston CI. Tissue angiotensin converting enzyme in cardiac and vascular hypertrophy, repair, and remodeling. *Hypertension*. 1994;23:258-68.
89. Ocaranza MP, Godoy I, Jalil JE, Varas M, Collantes P, Pinto M, Roman M, Ramirez C, Copaja M, Diaz-Araya G, Castro P, Lavandero S. Enalapril attenuates downregulation of Angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase

- of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. *Hypertension*. 2006;48:572-8.
90. Patten RD, Aronovitz MJ, Einstein M, Lambert M, Pandian NG, Mendelsohn ME, Konstam MA. Effects of angiotensin II receptor blockade versus angiotensin-converting-enzyme inhibition on ventricular remodelling following myocardial infarction in the mouse. *Clin Sci (Lond)*. 2003;104:109-18.
 91. Burrell LM, Farina NK, Balding LC, Johnston CI. Beneficial renal and cardiac effects of vasopeptidase inhibition with S21402 in heart failure. *Hypertension*. 2000;36:1105-11.
 92. Chappell MC, Allred AJ, Ferrario CM. Pathways of angiotensin-(1-7) metabolism in the kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16 Suppl 1:22-6.
 93. Tom B, Dendorfer A, Danser AH. Bradykinin, angiotensin-(1-7), and ACE inhibitors: how do they interact? *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35:792-801.
 94. Ferrario CM, Jessup J, Chappell MC, Averill DB, Brosnihan KB, Tallant EA, Diz DI, Gallagher PE. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. *Circulation*. 2005;111:2605-10.
 95. Deten A, Marx G, Briest W, Christian Volz H, Zimmer HG. Heart function and molecular biological parameters are comparable in young adult and aged rats after chronic myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2005;66:364-73.
 96. Liu YH, Yang XP, Sharov VG, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *J Clin Invest*. 1997;99:1926-35.
 97. Li P, Chappell MC, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension*. 1997;29:394-400.
 98. Huentelman MJ, Grobe JL, Vazquez J, Stewart JM, Mecca AP, Katovich MJ, Ferrario CM, Raizada MK. Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats. *Exp Physiol*. 2005;90:783-90.

IX. ANEXOS

Presentaciones a congresos

Nacionales

María Paz Ocaranza, Iván Godoy, **Manuel Varas**, Sergio Lavandero y Jorge Jalil. **Enalapril previene la disminución de la actividad de la ECA2 (Enzima Convertidora de Angiotensina I Homóloga) en la disfunción Ventricular Izquierda post infarto al miocardio en la Rata.** XLII Congreso Chileno de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Pucón, Chile; Noviembre 2005.

Manuel Varas, Jorge Jalil, María Paz Ocaranza. **Disminución de la masa cardiaca por administración de inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina en ratas normales.** XLII Congreso Chileno de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Pucón, Chile; Noviembre 2005

Alex Bittner, María Paz Ocaranza, Felipe Apablaza, Juan Eduardo Carreño, Camila Hevia, Alejandro Ramírez, **Manuel Varas**, Jorge Jalil. **Aumento importante de la Actividad Quimasa Miocárdica durante el desarrollo de fibrosis cardiaca inducida por Isoproterenol.** XLII Congreso Chileno de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Pucón, Chile; Noviembre 2005

María Paz Ocaranza, **Manuel Varas**, Ivan Godoy, Flavia Nilo, Denisse Mackenzie, Miguel Alarcón, Melissa Pinto, Maritza Román, Sergio Lavandero y Jorge Jalil. **El aumento de la Actividad y Expresión de la Enzima Convertidora de Angiotensina I Homologa (ECA2) inducido por Enalapril se asocia a menor fibrosis e hipertrofia ventricular izquierda post infarto al miocardio en la rata.** XLIII Congreso Chileno de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Viña del Mar, Chile; Noviembre 2006.

María Paz Ocaranza, Iván Godoy, Melissa Pinto, Maritza Román, **Manuel Varas**, Sergio Lavandero y Jorge Jalil. **El Bloqueo del Receptor de Angiotensina II AT1 activa la vía vasodilatadora y paralela del sistema renina angiotensina en la disfunción ventricular izquierda post infarto al miocardio en la rata.** XLIII

Congreso Chileno de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Viña del Mar, Chile; Noviembre 2006

Manuel Varas, Felipe Apablaza, Juan Eduardo Carreño, Jorge Jalil y María Paz Ocaranza. **La inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) disminuye el tamaño de los cardiomiocitos en ratas sanas.** XLIII Congreso Chileno de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Viña del Mar, Chile; Noviembre 2006

Juan Eduardo Carreño, Felipe Apablaza, **Manuel Varas**, Benjamín García, Denisse Mackenzie, Flavia Nilo, Iván Godoy, María Paz Ocaranza y Jorge Jalil. **Efecto de Miocardina en el corazón de ratas normotensas y ratas hipertensas *in vivo*.** XLIII Congreso Chileno de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Viña del Mar, Chile; Noviembre 2006

Felipe Apablaza, Juan Eduardo Carreño, **Manuel Varas**, Iván Godoy, Patricia Luz, Flavio Nilo, Denisse Mackenzie, María Paz Ocaranza y Jorge Jalil, **Efecto del factor estimulador de colonias de granulocitos sobre la función y el remodelamiento ventricular post infarto al miocardio en ratas.** XLIII Congreso Chileno de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Viña del Mar, Chile; Noviembre 2006

Internacionales

Juan Eduardo Carreño, Felipe Apablaza, **Manuel Varas**, Benjamín García, Denisse Mackenzie, Flavia Nilo, Iván Godoy, María Paz Ocaranza y Jorge Jalil **Effect of myocardin in the heart of normotensive and hypertensive rats *in vivo*.** AHA Scientific Sessions. Chicago, EEUU; Noviembre 2006

Publicaciones

María Paz Ocaranza, Iván Godoy, Jorge E. Jalil, **Manuel Varas**, Patricia Collantes, Melissa Pinto, Maritza Román, Cristian Ramírez, Miguel Copaja, Guillermo Diaz-Araya, Pablo Castro and Sergio Lavandero. **Enalapril Attenuates Downregulation of Angiotensin-Converting Enzyme 2 in the Late Phase of Ventricular Dysfunction in Myocardial Infarcted Rat.** Hypertension 48, 572-8 (2006)