

ORIGINAL

Papel de la quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1 en las alteraciones cardiacas producidas por la aldosterona en ratas

Beatriz Martín-Fernández*, Natalia de las Heras, María Valero-Muñoz,
Sandra Ballesteros, Victoria Cachofeiro y Vicente Lahera

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

Recibido el 24 de septiembre de 2012; aceptado el 26 de septiembre de 2012
Disponible en Internet el 4 de noviembre de 2012

PALABRAS CLAVE

Aldosterona;
Quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1;
Hipertrofia cardiaca;
Fibrosis;
Inflamación;
Oxidación

Resumen

Introducción: La aldosterona contribuye al desarrollo de la hipertrofia cardiaca. La quinasa regulada por suero y glucocorticoides 1 (SGK-1) desempeña un papel central en el mecanismo de acción de la aldosterona.

Objetivo: Analizar las alteraciones cardiacas estructurales, funcionales, inflamatorias y oxidativas, así como la expresión del SGK-1, producidas por la administración de aldosterona + sal en ratas.

Material y métodos: Se utilizaron ratas macho Wistar (250 g). Un grupo de animales recibió una dosis diaria de aldosterona 1 mg/kg/día subcutánea (s.c.) + NaCl al 1% en el agua de bebida. Otro grupo de animales con hiperaldosteronismo inducido fue tratado con un antagonista de los receptores de mineralocorticoides, la espironolactona (200 mg/kg/día, s.c.). Como controles se utilizaron animales a los que se les administró el vehículo (s.c.) y animales a los que se les administró espironolactona (200 mg/kg/día, s.c.). El periodo de evolución fue de 21 días. Se tomaron las siguientes medidas hemodinámicas: PAS, PAD, FC, pDfVI, PSVI, dP/dt+ y dP/dt-. Como índice de hipertrofia cardiaca se calculó el peso relativo del corazón. Se valoró la expresión génica de: TGF-β, CTGF, TNF-α, IL-1α, p22phox, eNOS y SGK-1 y se valoró el contenido de colágeno cardiaco mediante técnicas histológicas.

Resultados: PAS, PAD, pDfVI, PSVI, peso relativo del corazón y el contenido de colágeno aumentaron ($p < 0,05$) en las ratas tratadas con aldosterona + sal. La expresión génica de todos los factores analizados aumentó ($p < 0,05$) con la aldosterona + sal. El tratamiento con espironolactona normalizó los parámetros modificados por la aldosterona + sal.

Conclusiones: El efecto de la espironolactona disminuyendo el aumento de la expresión incrementada del SGK-1 inducida por la aldosterona indica que la participación de este mediador en las alteraciones cardiacas observadas está relacionada con la activación de los receptores de mineralocorticoides.

© 2012 Elsevier España, S.L. y SEA. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: bmartinfernandez@med.ucm.es (B. Martín-Fernández).

KEYWORDS

Aldosterone;
Serum and
glucocorticoid
regulated kinase 1;
Cardiac hypertrophy;
Fibrosis;
Inflammation;
Oxidation

Role of serum and glucocorticoid regulated kinase 1 in cardiac alterations induced by aldosterone in rats**Abstract**

Introduction: Aldosterone induces cardiac hypertrophy and it is known to induce serum and glucocorticoid regulated kinase 1 (SGK-1) gene expression.

Aim: We aimed to evaluate structural, functional, inflammatory and oxidative alterations, as well as serum and glucocorticoid regulated kinase1 (SGK-1) expression, produced in rat heart by aldosterone + salt administration. Treatment with spironolactone was evaluated to prove mineralocorticoids mediation.

Material and methods: Male Wistar rats received aldosterone (1 mg/kg/day) + 1% NaCl for 3 weeks. Half of the animals were treated with spironolactone (200 mg/kg/day). At the end of treatment hemodynamics were measured: SBP, DBP, LVEDP, LVSP, +dP/dt and -dP/dt. Heart relative weight was measured as cardiac hypertrophy index. mRNA expression of TGF- β , CTGF, MMP2, TIMP2, TNF- α , IL-1 β , p22phox, eNOS and SGK-1 were measured. Cardiac collagen content was measured by histological techniques.

Results: SBP and DBP, LVSP and LVEDP were elevated ($P < .05$) in aldosterone + salt-treated rats. -dP/dt decreased ($P < .05$) in aldosterone + salt-treated rats, but +dP/dt was similar in all groups. Spironolactone normalized ($P < .05$) SBP, DBP, LVSP, LVEDP and -dP/dt. Relative heart weight, collagen content, mRNA expression of TGF- β , CTGF, MMP2, TIMP2, TNF- α , IL-1 β , p22phox, eNOS and SGK-1 were increased ($P < .05$) in aldosterone + salt-treated rats, being reduced by spironolactone ($P < .05$).

Conclusions: SGK-1 might be a key mediator in the structural, functional and molecular cardiac alterations induced by aldosterone + salt in rats. All the observed changes and mediators are related with activation of mineralocorticoid receptors.

© 2012 Elsevier España, S.L. and SEA. All rights reserved.

Introducción

El desarrollo de hipertrofia cardiaca se considera inicialmente una respuesta adaptativa del miocardio al estrés parietal^{1,2}. Los factores que determinan el desarrollo de la hipertrofia cardiaca pueden ser factores hemodinámicos, como la presión arterial, la precarga y la esclerosis de las grandes arterias^{3,4}, o factores no hemodinámicos, como el sistema renina-angiotensina-aldosterona, los factores de crecimiento y las citocinas, entre otros^{4,5}.

La aldosterona contribuye al desarrollo de la hipertrofia cardiaca mediante su efecto hemodinámico. A su vez, se ha demostrado que la aldosterona es uno de los factores mediadores más importantes en el desarrollo de hipertrofia cardiaca, independientemente de los niveles de presión arterial⁶. La síntesis de colágeno cardiaco está estimulada por la aldosterona y es una de las características principales de la hipertrofia cardiaca producida por el hiperaldosteronismo^{7,8}. Aunque varios estudios se han centrado en el papel del estrés oxidativo y la inflamación en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca y la fibrosis producidas por la aldosterona, aún no se conocen todos los mecanismos implicados en su desarrollo. Se ha demostrado que el tratamiento con aldosterona + sal aumenta la expresión de factores profibróticos como el factor de crecimiento transformante (TGF- β) a través mecanismos transcripcionales dependientes del receptor de mineralocorticoides. Además, se han obtenido resultados contradictorios referentes a la

participación de otros mediadores de fibrosis cardiaca, como el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), las metaloproteasas (MMP) y los inhibidores de metaloproteasas (TIMP) en animales tratados con aldosterona + sal.

La quinasa regulada por suero y glucocorticoides (SGK, *serum and glucocorticoid regulated kinase*) fue identificada inicialmente como una enzima serina-treonina cinasa inducida de manera rápida por los glucocorticoides en una línea celular de tumor mamario. Se ha comprobado que la aldosterona es capaz de estimular la expresión de SGK-1 a nivel renal de manera precoz (30 min) y que esta, a su vez, estimula la actividad del canal epitelial de Na⁺ (ENaC) y de la Na⁺/K⁺ ATPasa en ensayos de coexpresión en oocitos de *Xenopus laevis*⁹⁻¹². El estudio del mecanismo de acción de esta cinasa mostró que el SGK-1 desempeña un papel central no solo en el mecanismo de acción de la aldosterona sino también de otros estímulos antinatriuréticos como la insulina¹³.

Por otra parte, las alteraciones cardíacas producidas por la aldosterona + sal en ratas y su relación con la expresión de SGK-1 incrementada no han sido descritas. El objetivo de nuestro estudio fue analizar las alteraciones cardíacas estructurales, funcionales, inflamatorias y oxidativas, así como la expresión del SGK-1, producidas por la administración de aldosterona+sal en ratas. También se estudió la participación de mediadores profibróticos como el CTGF, MMP-2 y TIMP-2. Como antagonista del receptor de mineralocorticoides se trató a los animales con espironolactona.

Material y métodos

Diseño experimental y animales

Se utilizaron 40 ratas macho Wistar (Harlan Ibérica, S.L., Barcelona, España) con un peso inicial medio de 250 g. Todos los experimentos se realizaron según las normas de la Universidad Complutense de Madrid y de la Unión Europea para el tratamiento ético de los animales de experimentación. Los animales utilizados en el presente trabajo se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h, bajo condiciones controladas de temperatura (20-22 °C) y humedad (50-60%) y con acceso libre al agua. Un grupo de animales recibió una dosis diaria de aldosterona de 1.000 µg/kg/día. Otro grupo de animales con hiperaldosteronismo fue tratado con un antagonista de los receptores de mineralocorticoïdes, espironolactona (200 mg/kg/día), disuelta en aceite de girasol y mediante una inyección subcutánea. Tanto el grupo de los animales con hiperaldosteronismo como el de los tratados con espironolactona recibieron simultáneamente NaCl al 1% en el agua de bebida. Como controles se utilizaron animales a los que se les administró una inyección subcutánea diaria del vehículo (aceite de girasol) y animales a los que se les administró espironolactona (200 mg/kg/día) mediante una inyección diaria. El periodo de evolución fue de 21 días.

Medida de la presión arterial y hemodinámica cardiaca

Cada animal fue pesado y anestesiado intraperitonealmente con ketamina (Imalgene 1.000) 0,07 mg/kg y xilacina (Rompun 2%) 0,024 mg/kg. A continuación se introdujo un catéter Sciense FT211B de 1,6F de diámetro (SciSento, Canadá) por la carótida derecha. Dicho catéter se encontraba acoplado a un sistema de adquisición de datos (PowerLab/800, ADInstruments, Castle Hill, Australia), y este a su vez acoplado a un computador (PC Pentium). Las señales fueron monitorizadas durante 10 min a través del programa Chart para Windows v4.2. En primer lugar se registró la presión arterial y a continuación se avanzó el catéter hasta el interior del ventrículo izquierdo, donde se dejó un tiempo de estabilización de 10 min. A continuación se comprobó la integridad de la válvula aórtica retirando el catéter del ventrículo y registrando nuevamente la presión arterial. Se tomaron medidas de los siguientes parámetros: presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD), frecuencia cardiaca (FC), presión diastólica final del ventrículo izquierdo (pDfVI), presión sistólica máxima del ventrículo izquierdo (PSVI), derivada positiva de la presión con respecto al tiempo (dP/dt+) y derivada negativa de la presión con respecto al tiempo (dP/dt-). El registro de las señales quedó almacenado para su posterior análisis. Como índice de hipertrofia cardiaca se calculó el peso relativo del corazón: peso corazón/100 g peso corporal.

Cuantificación del contenido de colágeno cardíaco

Se utilizaron muestras de corazón que se fijaron en etanol al 70% y posteriormente se incluyeron en parafina formando bloques para su tallado en secciones de 4 micras de grosor

con un microtomo de rotación (Leitz 1512, IMEB INC, Ch, EE. UU.). A continuación se tiñeron los cortes con rojo picrossirius. El contenido de colágeno se calculó con un analizador de imagen LEICA Q 500IW (Leica, España). Los cortes teñidos se captaron con una videocámara conectada a un microscopio, se digitalizaron y se valoró el colágeno de la muestra.

Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real

Extracción de ARN mensajero

Los corazones se extrajeron en condiciones estériles y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Para la extracción del ARN mensajero (ARNm) se utilizó un kit de extracción de ARN comercial (Qiagen, Sciences, Maryland, EE. UU.). El ARNm se cuantificó midiendo la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf, Alemania).

Síntesis de ADN complementario

La reacción de la transcriptasa reversa se realizó mediante un kit de síntesis de ADNc (Qiagen Sciences, Maryland, EE. UU.): 1 µg del ARN total se utilizó en la reacción de retrotranscripción. Se eliminó el ADN genómico incubando durante 2 min a 42 °C el ARN junto con el agua libre de ARNasa y el tampón de lavado del ADN genómico. A continuación se preparó en hielo la mezcla de la transcriptasa reversa, se añadió la muestra de ARN y se incubó durante 15 min a 42 °C.

Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real

Para cuantificar los niveles de ARN mensajero se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas y en tiempo real utilizando un termociclador Real Time PCR Smart Cycler (Cepheid, Sunnyvale, California, EE. UU.). Para este análisis se utilizaron sondas TaqMan. En las condiciones de anillamiento la sonda hibridó con el ADN molde. En la extensión de las sondas, la actividad exonucleasa de la Taq ADN polimerasa degradó el cebador resultando en la emisión de fluorescencia. La intensidad de fluorescencia correspondió con la cantidad de producto amplificado. Los valores obtenidos se normalizaron con la expresión del 18S utilizado como gen constitutivo y se analizaron mediante el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. La tabla 1 recoge las secuencias de los cebadores utilizados.

Ánalisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó un test ANOVA de una vía, seguido de un test Newman-Keuls, mediante la utilización de un programa estadístico GraphPad Prism 4. Todos los resultados se consideraron significativos cuando el valor de la p fue menor de 0,05.

Resultados

Parámetros hemodinámicos y morfométricos

La PAS, la PAD y la PSVI aumentaron significativamente en las ratas tratadas con aldosterona + sal comparado con los controles. La pDfVI aumentó y la dP/dt- disminuyó ($p < 0,05$)

Tabla 1 Secuencias de los cebadores utilizados

	Sentido	Antisentido
18S	5'CGCAAATTACCCACTCCCGACCC3'	5'GGCTTACACATCCAAGGAAG3'
CTGF	5'-TGGCCCTGACCCAACACTATGAT3'	5'GCACTTTTGCCCTTCTTAATGTT3'
TGF-β	5' GGGTTTCGCTTCAGTGT3'	5' TCGGTTCATGTCATGGATGGT3'
MMP-2	5'CGTGGTGAGATCTTCTTCTCAAGGA3'	5'CCTCATACACAGCGTCAATCTTTC3'
TIMP-2	5'GGAGGAAAGAAGGAATATCTAATTGAG3'	5'CCAGGGCACAATAAAGTCACAGA3'
IL-1β	5'TCTTCGAGGCACAAGGCAC3'	5'CAGAGGTCCAGGTCTGGAA3'
TNF-α	5' GGTGATCGGTCCCAACAAGGA3'	5' CACGCTGGCTCAGCCACTC 3'
eNOS	5'AAGACGCTGCTTGGGATCC3'	5' AGCCTGGGAACCACCTCCTT3'
p22phox	5'GGACAGAAGTACCTGACCGCT3'	5'CAGGCACGGACAGCAGTAAG3'
SGK-1	5'GCACGCCCTGAGTATCTCGC3'	5'AGGCCATAGAGCATCTCATACAAGAC3

en las ratas tratadas con aldosterona + sal comparado con los controles, indicando la existencia de disfunción diastólica acompañada por una menor capacidad de relajación del ventrículo izquierdo. El tratamiento con espironolactona redujo ($p < 0,05$) los valores elevados de PAS y PAD y normalizó la pDfVI y la dP/dt-. El tratamiento con espironolactona en ratas a las que no se les administró aldosterona + sal no afectó a ninguno de estos parámetros, excepto a la pDfVI, que fue mayor que la de los controles pero menor que la de las ratas tratadas con aldosterona + sal. La frecuencia cardíaca y la dP/dt- no se modificaron en ninguno de los grupos experimentales estudiados (tabla 2).

Hipertrofia y fibrosis cardiaca

El peso relativo del corazón fue mayor ($p < 0,05$) en las ratas tratadas con aldosterona + sal (tabla 2). Estos animales presentaron también un incremento del contenido de colágeno cardíaco ($p < 0,05$) y un aumento ($p < 0,05$) de la expresión génica de los mediadores fibróticos TGF-β y CTGF comparado con los controles (figs. 1A y B). La expresión génica de MMP-2 y TIMP-2 fue mayor en las ratas tratadas con aldosterona + sal comparado con los controles. La espironolactona redujo ($p < 0,05$) la expresión génica aumentada de todos estos parámetros. La relación MMP-2/TIMP-2 fue menor ($p < 0,05$) en las ratas tratadas con aldosterona + sal

comparado con los controles (fig. 1C). El tratamiento con espironolactona aumentó ($p < 0,05$) el valor de esta relación. La espironolactona no afectó a ninguno de estos parámetros en las ratas no tratadas con aldosterona + sal.

Inflamación y oxidación

Los niveles de ARNm de TNF-α e IL-1β fueron mayores ($p < 0,05$) en las ratas tratadas con aldosterona + sal que en los controles (figs. 2A y B). De manera similar, las ratas tratadas con aldosterona + sal presentaron niveles de ARNm de p22phox y eNOS incrementados ($p < 0,05$) comparado con los controles (figs. 3A y B). El tratamiento con espironolactona también redujo ($p < 0,05$) estos valores aumentados y no tuvo ningún efecto en las ratas no tratadas con aldosterona + sal.

Cinasa regulada por suero y glucocorticoides 1

Todos los cambios anteriormente mencionados producidos por la aldosterona + sal estuvieron acompañados por un aumento significativo ($p < 0,05$) de la expresión génica del SGK-1, el cual disminuyó ($p < 0,05$) notablemente con el tratamiento con espironolactona. La espironolactona no modificó la expresión del SGK-1 en las ratas no tratadas con aldosterona + sal (fig. 4).

Tabla 2 Parámetros hemodinámicos y morfométricos

	CT	AL	ES	AL + ES
PAS (mmHg)	121 ± 2,15	147 ± 5	114 ± 6*	113 ± 6**
PAD (mmHg)	88 ± 3	105 ± 4	83 ± 5*	91 ± 4**
pDfVI (mmHg)	3,5 ± 0,36	8,7 ± 0,47	6,1 ± 0,21*	3,8 ± 0,71*
PSVI (mmHg)	123,50 ± 3,18	148,00 ± 3,4	115 ± 6	116 ± 5
dP/dt+ (mmHg/s)	8.796 ± 547	8.921 ± 357	8.013 ± 484	8.210 ± 283
dP/dt- (mmHg/s)	-6.282,5 ± 166	-5.423 ± 224	-5.989 ± 78*	-60.185 ± 215*
PRC (mg/g)	2,2 ± 0,5	3,5 ± 0,1	2,4 ± 0,3	2,3 ± 0,2
Contenido de colágeno (%)	0,051 ± 0,01	0,195 ± 0,01	0,042 ± 0,02	0,064 ± 0,01

AL: aldosterona + sal; AL + ES: aldosterona + sal + espironolactona; CT: control; dP/dt-: derivada negativa de la presión con respecto al tiempo; dP/dt+: derivada positiva de la presión con respecto al tiempo; ES: espironolactona; PAD: presión arterial diastólica; PAS: presión arterial sistólica; pDfVI: presión diastólica final del ventrículo izquierdo; PRC: peso relativo del corazón; PSVI: presión sistólica máxima del ventrículo izquierdo.

* $p < 0,05$ vs. CT; ** $p < 0,05$ vs. ALDO.

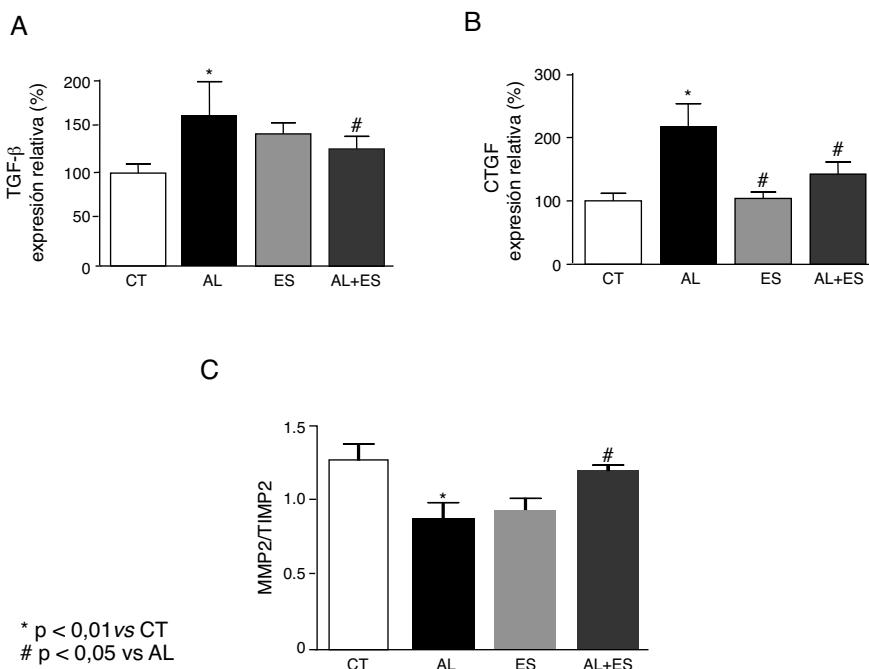


Figura 1 Efecto de la administración de aldosterona + sal y tratamiento con espironolactona sobre la expresión génica del TGF- β (A) y el CTGF (B) y la relación MMP-2/TIMP-2. AL: aldosterona + sal; AL + ES: aldosterona + sal + espironolactona; CT: control; ES: espironolactona. * p < 0,01 vs. CT; # p < 0,05 vs. AL.

Discusión

En el presente estudio la administración de aldosterona más 1% de sal a ratas normotensas indujo hipertensión, disfunción diastólica, hipertrofia cardiaca, fibrosis, inflamación, estrés oxidativo y un aumento de la expresión génica del SGK-1 a nivel cardiaco. El tratamiento con el antagonista de los receptores de mineralocorticoides espironolactona bloqueó todos estos efectos.

Las ratas tratadas con aldosterona presentaron niveles aumentados de TNF- α e IL-1 β . Numerosas enfermedades cardíacas están asociadas con la expresión de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , la IL-6 y el TNF- α , las cuales a través de receptores específicos median en la

expresión de determinados genes implicados en el crecimiento celular y en la apoptosis¹⁴. En estudios previos se ha demostrado que el tratamiento con aldosterona induce un proceso inflamatorio en las arterias coronarias caracterizado por infiltrado celular de monocitos y macrófagos y por un incremento de la expresión de marcadores inflamatorios como la ciclooxigenasa 2, la osteopontina, la proteína quimiotáctica de macrófagos tipo 1 y la molécula de adhesión intracelular tipo 1¹⁵. A su vez, la inflamación cardíaca caracterizada en nuestro modelo parece estar relacionada con el aumento del estrés oxidativo cardiaco, como indica el incremento de los niveles del ARNm de la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa y de la eNOS que podrían estar induciendo la producción de aniones superóxido.

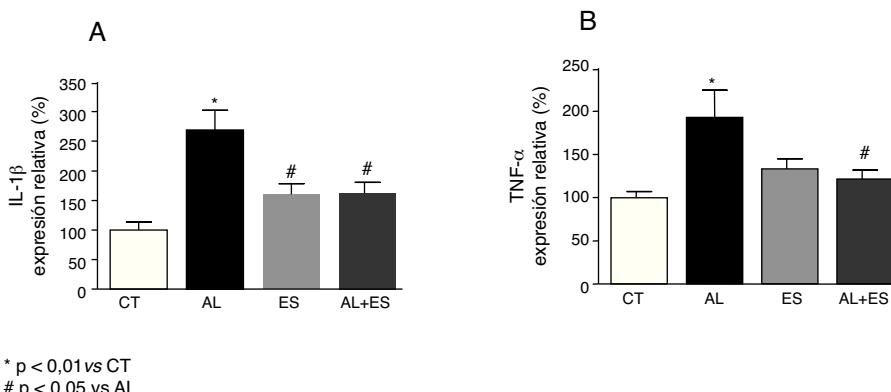


Figura 2 Efecto de la administración de aldosterona + sal y tratamiento con espironolactona sobre la expresión génica del TNF- α (A) y la IL-1 β (B). AL: aldosterona + sal; AL + ES: aldosterona + sal + espironolactona; CT: control; ES: espironolactona. * p < 0,01 vs. CT; # p < 0,05 vs. AL.

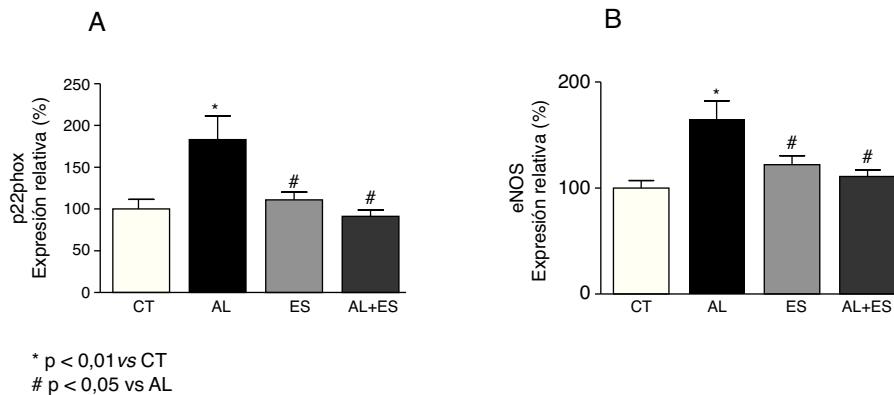


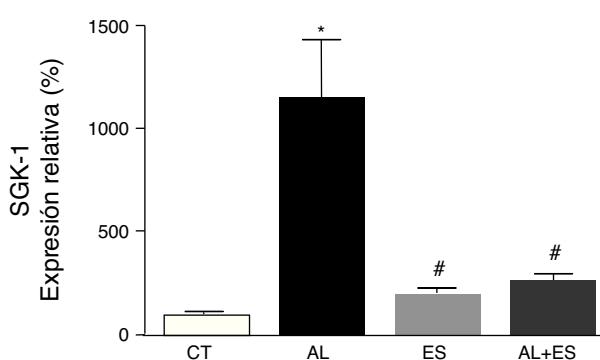
Figura 3 Efecto de la administración de aldosterona + sal y tratamiento con espironolactona sobre la expresión génica del p22phox (A) y la eNOS (B). AL: aldosterona + sal; AL + ES: aldosterona + sal + espironolactona; CT: control; ES: espironolactona. * p < 0,01 vs. CT; # p < 0,05 vs. AL.

Numerosos estudios han descrito una relación muy estrecha entre la inflamación y el desarrollo del proceso fibrótico. En el presente estudio, el tratamiento con aldosterona + sal incrementó el peso relativo del corazón y el contenido de colágeno cardíaco relacionados con la disfunción diastólica observada. A través de varios segundos mensajeros (PKC, cAMP, IP3), la aldosterona activa la vía de señalización de la MAPK, la cual promueve la proliferación de fibroblastos¹⁶⁻²⁰. Aunque se ha propuesto que el incremento de colágeno inducido por la aldosterona y secretado por los cardiófibroblastos es independiente de la elevación de la presión arterial, bajo las condiciones experimentales de este estudio no se puede excluir la participación de la hipertensión¹⁸. En nuestro estudio encontramos valores aumentados de la expresión génica del mediador de fibrosis TGF-β. Se ha demostrado que el TGF-β también induce fibrosis y remodelado en el corazón, estimulando la transformación de fibroblastos e incrementando la síntesis de las proteínas de matriz extracelular y de integrinas²¹. En el presente trabajo se demuestra que además del TGF-β, la aldosterona también incrementa la

expresión génica del CTGF en corazones de rata. El CTGF ha sido descrito como un factor profibrótico que media algunas de las respuestas del TGF-β, incluidas la apoptosis y la fibrosis²². La sobreexpresión de este factor de crecimiento está asociada a una acumulación de matriz extracelular según se ha descrito en lesiones ateroscleróticas humanas, tras infarto de miocardio y en tejidos vasculares y cardíacos en modelos de hipertensión²³⁻²⁷. En estudios previos se demostró que tanto la aldosterona como el TGF-β inducían preferentemente la expresión del CTGF en cardiomiositos a través de la activación de las vías ERK1/2, p38 MAPK, y JNK^{28,29}. Se ha demostrado que el CTGF posee efectos pro-hipertróficos en cardiomiositos al actuar a través de la vía Akt³⁰. En ratas SHR tratadas con eplerenona, la expresión aórtica y renal del CTGF estaba incrementada, sugiriendo la participación de este factor profibrótico en las alteraciones inducidas por la aldosterona asociadas a un estado hipertensivo^{27,31}. El CTGF parece estar mediando en el desarrollo de hipertrofia cardíaca en el presente estudio, a través de la activación del receptor de mineralocorticoides, como sugiere la disminución de estos factores tras el tratamiento con espironolactona.

Así mismo, en el presente trabajo observamos un aumento de la MMP-2. Esta metaloproteasa está expresada ubíquamente en cardiomiositos y fibroblastos³² y es estimulada también por la IL-1β a través de la vía de la ERK1/2, como se ha sugerido en un estudio previo realizado en cardiófibroblastos³³. Nuestros resultados muestran una reducción en la relación MMP-2/TIMP-2 en las ratas tratadas con aldosterona comparado con los controles, sugiriendo una atenuación de la acción de las MMP-2, y consecuentemente una menor degradación de colágeno y un incremento de la fibrosis. Este hecho podría mediar el aumento de colágeno mediante la activación del receptor de mineralocorticoides, como sugiere la disminución de estos factores tras el tratamiento con espironolactona. La participación de las MMP en el remodelado cardíaco a través de los receptores de mineralocorticoides se observó recientemente, en un estudio en el que el tratamiento con espironolactona en ratas SHR con hipertrofia cardíaca disminuía la actividad cardiaca de la MMP-2³⁴.

Un mecanismo adicional a los mencionados anteriormente podría ser la expresión aumentada del SGK-1 por



* p < 0,01 vs CT
p < 0,05 vs AL

Figura 4 Efecto de la administración de aldosterona + sal y tratamiento con espironolactona sobre la expresión génica del SGK-1. AL: aldosterona + sal; AL+ES: aldosterona + sal + espironolactona; CT: control; ES: espironolactona. * p < 0,01 vs. CT, # p < 0,05 vs. AL.

el tratamiento con aldosterona + sal y su reducción con el tratamiento con espironolactona. Debido a su efecto dual sobre el incremento de Na^+ citosólico y la disminución en la excreción del mismo a nivel renal, cabría esperar un aumento de los niveles de presión arterial³⁵. Por otra parte, se ha demostrado que el SGK-1 induce un incremento de Na^+ en el citosol de los cardiomiositos y los cardíofibroblastos debido principalmente a un incremento en la densidad de sus canales³⁶. Como consecuencia, se producirá un incremento de Ca^{2+} a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ estimulando la activación de la cascada hipertrófica y los diferentes factores pro-fibróticos, incluidas varias MAPK^{28,29}. Así mismo, el incremento de Na^+ citosólico inducido por el SGK-1 puede dar lugar al crecimiento de los cardiomiositos y por tanto a un incremento del tamaño celular y alteración de sus funciones.

A su vez, el SGK-1 estimula la capacidad del IKK β para fosforilar al $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, dando lugar a la degradación del $\text{I}\kappa\text{B}$ y por tanto activando al NF κB ³⁷. La transcripción de este factor podría estimular el CTGF y la producción de citocinas proinflamatorias a través de las vías explicadas previamente. A la vista de los datos propuestos, podríamos proponer que el SGK-1, a través de la vía del NF κB , estaría incrementando la expresión del CTGF y estimulando el desarrollo de fibrosis cardiaca. Previamente, en un estudio realizado en un modelo DOCA con ratones transgénicos para el SGK-1 y una dieta suplementada con 1% NaCl, se observó un incremento en la síntesis cardiaca de CTGF asociado con un aumento en la expresión del SGK-1³⁸. Apoyándonos en esta hipótesis, podríamos proponer también que el SGK-1 podría estar interfiriendo con las MMP y los TIMP, basándonos en el descenso del equilibrio MMP-2/TIMP-2 observado en nuestros resultados, y en el consecuente incremento de colágeno.

Determinados factores, como el TGF- β ³⁹⁻⁴¹, el óxido nítrico y las especies reactivas de oxígeno (ERO), también estimulan la expresión del SGK-1. La activación del SGK-1 se produce mediante fosforilación cuando las células se encuentran bajo diferentes estímulos, como puede ser el estrés oxidativo^{42,43}. Como se describió en un estudio previo en el que se analizaba la relación entre el estrés oxidativo y el SGK-1 en un modelo de hipertensión pulmonar, las ERO participan activamente en la regulación de esta cinasa. En dicho estudio se observó que tanto la depleción de la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa como el silenciamiento del gen para la proteína Rac inhibían la formación de ERO y prevenían la sobreexpresión del SGK-1⁴⁴. Dado que en el presente estudio hemos observado un incremento en la expresión cardiaca del ARNm del TGF- β , la eNOS, y la NADPH oxidasa, la expresión incrementada del SGK-1 que observamos podría estar a su vez estimulando la expresión de dichos factores (TGF- β , NO y ERO). La reabsorción de Na^+ inducida por el SGK-1 estaría incrementando el volumen celular, estimulando así la expresión del TGF- β ⁴⁵.

Por tanto, a la vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que el SGK-1 forma parte de un proceso de señalización celular complejo que comprende vías tanto fibróticas como inflamatorias y oxidativas, que estimulan el desarrollo de hipertrofia y fibrosis cardiaca inducida por la aldosterona. Por ello, el SGK-1 parece ser un mediador clave en las alteraciones cardíacas estructurales,

funcionales y moleculares inducidas por la aldosterona en ratas. El efecto de la espironolactona disminuyendo el aumento de la expresión incrementada del SGK-1 inducida por la aldosterona indica que la participación de este mediador en las alteraciones cardíacas observadas está relacionada con la activación de los receptores de mineralocorticoides.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Horstkotte D, Schulte HD, Niehues R, Klein RM, Piper C, Strauer BE. Diagnostic and therapeutic considerations in acute, severe mitral regurgitation: experience in 42 consecutive patients entering the intensive care unit with pulmonary edema. *J Heart Valve Dis.* 1993;2:512-22.
- Prisant LM. Hypertensive heart disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2005;7:231-8.
- Frohlich ED. State of the art lecture. Risk mechanisms in hypertensive heart disease. *Hypertension*. 1999;34:782-9.
- Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet*. 2006;367:356-67.
- Weber KT. The what, why and how of hypertensive heart disease. *J Hum Hypertens*. 1994;8:665-75.
- Holmer SR, Schunkert H. Adaptive and genetic alterations of the renin angiotensin system in cardiac hypertrophy and failure. *Basic Res Cardiol*. 1996;91 Suppl 2:65-71.
- Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res*. 1990;67:1355-64.
- Weber KT, Brilla CG. Structural basis for pathologic left ventricular hypertrophy. *Clin Cardiol*. 1993;16:II10-4.
- Gonzalez-Nunez D, Morales-Ruiz M, Leivas A, Hebert SC, Poch E. In vitro characterization of aldosterone and cAMP effects in mouse distal convoluted tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286:F936-44.
- Naray-Fejes-Toth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G, Fejes-Toth G. Sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial Na^+ channels. *J Biol Chem*. 1999;274:16973-8.
- Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, et al. Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:2514-9.
- Zecevic M, Heitzmann D, Camargo SM, Verrey F. SGK1 increases Na K-ATP cell-surface expression and function in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflugers Arch*. 2004;448:29-35.

13. Wang J, Barbry P, Maiyar AC, Rozansky DJ, Bhargava A, Leong M, et al. SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280:F303-13.
14. Paulus WJ. Cytokines and heart failure. *Heart Fail Monit.* 2000;1:50-6.
15. Rocha R, Martin-Berger CL, Yang P, Scherrer R, Delyani J, McMahon E. Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart. *Endocrinology.* 2002;143:4828-36.
16. Liu SL, Schmuck S, Chorazyczewski JZ, Gros R, Feldman RD. Aldosterone regulates vascular reactivity: short-term effects mediated by phosphatidyl-inositol 3-kinase-dependent nitric oxide synthase activation. *Circulation.* 2003;108:2400-6.
17. Wehling M, Ulsenheimer A, Schneider M, Neylon C, Christ M. Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;204:475-81.
18. Zhou G, Kandala JC, Tyagi SC, Katwa LC, Weber KT. Effects of angiotensin II and aldosterone on collagen gene expression and protein turnover in car-diac fibroblasts. *Mol Cell Biochem.* 1996;154:171-8.
19. Stockand JD, Meszaros JG. Aldosterone stimulates proliferation of cardiac fibroblasts by activating Ki-RasA and MAPK1/2 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:H176-84.
20. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol.* 1994;26:809-20.
21. Ma LJ, Yang H, Gaspert A, Carlesso G, Barty MM, Davidson JM, et al. Transforming growth factor-beta-dependent and -independent pathways of induction of tubulointerstitial fibrosis in beta6(-/-) mice. *Am J Pathol.* 2003;163:1261-73.
22. Perbal B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet.* 2004;363:62-4.
23. Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH. CTGF expression is induced by TGF-beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:1805-19.
24. Finckenberg P, Lassila M, Inkinen K, Pere AK, Krogerus L, Lindgren L, et al. Cyclosporine induces myocardial connective tissue growth factor in spontaneously hypertensive rats on high-sodium diet. *Transplantation.* 2001;71:951-8.
25. Oemar BS, Werner A, Garnier JM, Do DD, Godoy N, Nauck M, et al. Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. *Circulation.* 1997;95:831-9.
26. Ruperez M, Lorenzo O, Blanco-Colio LM, Esteban V, Egido J, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation.* 2003;108:1499-505.
27. De las Heras N, Ruiz-Ortega M, Miana M, Ruperez M, Sanz-Rosa D, Aragoncillo P, et al. Interactions between aldosterone and connective tissue growth factor in vascular and renal damage in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2007;25:629-38.
28. Koitabashi N, Arai M, Kogure S, Niwano K, Watanabe A, Aoki Y, et al. Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis. *Hypertension.* 2007;49:1120-7.
29. Lee YS, Kim JA, Kim KL, Jang HS, Kim JM, Lee JY, et al. Aldosterone upregulates connective tissue growth factor gene expression via p38 MAPK pathway and mineralocorticoid receptor in ventricular myocytes. *J Korean Med Sci.* 2004;19:805-11.
30. Hayata N, Fujio Y, Yamamoto Y, Iwakura T, Obana M, Takai M, et al. Connective tissue growth factor induces cardiac hypertrophy through Akt signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;370:274-8.
31. Martin-Fernandez B, Miana M, de las Heras N, Ruiz-Hurtado G, Fernandez-Velasco M, Bas M, et al. Cardiac L-type calcium current is increased in a model of hyperaldosteronism in the rat. *Exp Physiol.* 2009;94:675-83.
32. Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation.* 2000;101:1833-9.
33. Mountain DJ, Singh M, Menon B, Singh K. Interleukin-1beta increases expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in cardiac microvascular endothelial cells: role of PKCalpha/beta1 and MAPKs. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292:C867-75.
34. Velotes DG, Norton GR, Correia RJ, Strijdom H, Badenhorst D, Brooksbank R, et al. Impact of aldosterone receptor blockade on the deleterious cardiac effects of adrenergic activation in hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010;56: 203-11.
35. Lang F, Bohmer C, Palmada M, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Vallon V. (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev.* 2006;86: 1151-78.
36. Alvarez de la Rosa D, Gimenez I, Forbush B, Canessa CM. SGK1 activates Na+-K+-ATPase in amphibian renal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290:492-8.
37. Zhang L, Cui R, Cheng X, Du J. Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating I{Kappa}B kinase. *Cancer Res.* 2005;65:457-64.
38. Vallon V, Wyatt AW, Klingel K, Huang DY, Hussain A, Berchtold S, et al. SGK1-dependent cardiac CTGF formation and fibrosis following DOCA treatment. *J Mol Med.* 2006;84:396-404.
39. Lang F, Cohen P. Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci STKE.* 2001;108:re17.
40. Firestone GL, Giampaolo JR, O'Keeffe BA. Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity. *Cell Physiol Biochem.* 2003;13:1-12.
41. Leong ML, Maiyar AC, Kim B, O'Keeffe BA, Firestone GL. Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase Skg, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* 2003;278:5871-82.
42. Kobayashi T, Cohen P. Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J.* 1999;339:319-28.
43. Park J, Leong ML, Buse P, Maiyar AC, Firestone GL, Hemmings BA. Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J.* 1999;18:3024-33.
44. BelAiba RS, Djordjevic T, Bonello S, Artunc F, Lang F, Hess J, et al. The serum- and glucocorticoid-inducible kinase Skg-1 is involved in pulmonary vascular remodeling: role in redox-sensitive regulation of tissue factor by thrombin. *Circ Res.* 2006;98:828-36.
45. Fillon S, Warntges S, Matskevitch J, Moschen I, Setiawan I, Gamper N, et al. Serum- and glucocorticoid-dependent kinase, cell volume, and the regulation of epithelial transport. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001;130:367-76.