



UNIVERSIDAD DE CHILE  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

SOBRE-EXPRESIÓN DE RECEPTORES TIPO AT1 Y AT2 DE ANGIOTENSINA II EN  
FIBROBLASTOS CARDIACOS ADULTOS DE RATA: PARTICIPACIÓN EN EL  
EQUILIBRIO SOBREVIVENCIA / MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II.

**Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico**

**PABLO DANIEL ARÁNGUIZ URROZ**

Profesor patrocinante: Dr. Guillermo Díaz-Araya.

Directores de tesis: Dr. Guillermo Díaz-Araya.

BQ. Dagoberto Soto Muñoz.

Santiago, Chile

2006

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<i>ÍNDICE GENERAL</i> .....	2
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i> .....	4
<i>ABREVIATURAS</i> .....	5
<i>RESUMEN</i> .....	7
<i>SUMMARY</i> .....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. HIPÓTESIS.....	14
3. OBJETIVO GENERAL.....	14
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1. Reactivos.....	15
5.2. Modelo animal.....	15
5.3. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardiacos ventriculares de rata adulta.....	15
5.4. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardiacos ventriculares de rata neonata...	16
5.5. Transducción adenoviral.....	17
5.6. Preparación de extractos celulares totales.....	17
5.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	18
5.8. Electrotransferencia de proteínas.....	18
5.9. Western blot.....	18

5.10.	Ensayo de radioligando para FCA transducidos ATxR y desplazamiento por antagonistas específicos.....	19
5.11.	Viabilidad celular.....	20
5.12.	Fotografía de transmisión y epifluorescencia.....	20
5.13.	Purificación del DNA.....	20
5.14.	Electroforesis en gel de agarosa.....	21
5.15.	Medición del calcio intracelular.....	21
5.16.	Análisis estadístico.....	21
6.	RESULTADOS.....	22
6.1.	Sobre-expresión de los receptores de Ang II del subtipo AT1 y AT2 en FCA...22	
6.2.	Ensayos de unión de radioligando ( <sup>131</sup> I- Ang II) a los receptores de angiotensina II del subtipo AT1 y AT2 en FCA.....	24
6.3.	Viabilidad de FCA transducidos ATxR estimulados con Angiotensina II.....	27
6.4.	Dependencia de la viabilidad de FCA AdAT1R estimulados con Ang II según el estadio de desarrollo.....	30
6.5.	Caracterización de la muerte de FCA AdAT1R estimulados con Ang II.....	32
6.6.	Activación de la vía ERK en FCA transducidos ATxR estimulados con Ang II..	35
6.7.	Movimientos rápidos y transitorios de calcio en FCA AdAT1R estimulados con Ang II.....	39
7.	DISCUSIÓN.....	42
8.	CONCLUSIONES.....	49
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1: Caracterización de la sobre-expresión de los receptores de Ang II del subtipo AT1 y AT2 en FCA.....	23
Figura 2: Ensayos de unión de radioligando ( <sup>131</sup> I- Ang II) a los receptores de angiotensina II del subtipo AT1 y AT2 en FCA.....	25
Figura 3: Viabilidad de FCA transducidos ATxR estimulados con Ang II 100nM.....	28
Figura 4: Dependencia de la viabilidad de fibroblastos cardiacos transducidos con AdAT1R y estimulados con Ang II según el estadio de desarrollo.....	31
Figura 5: Caracterización de la muerte de FCA AdAT1R estimulados con Ang II..	33
Figura 6: Activación de la vía ERK en FCA transducidos ATxR estimulados con Ang II.....	36
Figura 7: Movimientos rápidos y transitorios de calcio en FCA AdAT1R estimulados con Ang II.....	41

## ABREVIATURAS

AdAT1R	: Adenovirus receptor AT1
AdAT2R	: Adenovirus receptor AT2
AdGFP	: Adenovirus GFP
Ang II	: Angiotensina II
APS	: Persulfato de amonio
AT1R	: Receptor de angiotensina II subtipo 1
AT2R	: Receptor de angiotensina II subtipo 2
ATxR	: Receptor de angiotensina II donde "x" puede ser 1 o 2
Bmáx	: Número total de receptores expresado en cpm
BSA	: Albúmina de suero de bovino
C3	: Caspasa 3
Ca <sup>2+</sup>	: Calcio
Ca <sup>2+</sup> i	: Calcio intracelular
Ca <sup>2+</sup> ext	: Calcio extracelular
cAMP	: Adenosina monofosfato cíclico
cél	: Célula
cm	: Centímetro
CMV	: Citomegalovirus
cpm	: Cuentas por minuto
DNA	: Acido desoxirribonucleico
DMSO	: Dimetil sulfóxido
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético
EGTA	: Ácido etilén glicol-bis( $\gamma$ -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetracético
ERK	: Proteína quinasa regulada extracelularmente
ERK-p	: ERK fosforilada
ERK-t	: ERK total
FBS	: Suero fetal de bovino
FCS	: Suero fetal de ternero
FC	: Fibroblastos cardiacos
FCA	: Fibroblastos cardiacos adultos
FCN	: Fibroblastos cardiacos neonatos
Fig	: Figura
GFP	: Proteína fluorescente verde
h	: Hora
HÁ	: Hematoaglutinina
HEPES	: Acido N-2-hidroietilpiperazina N-2-etanosulfónico
JNK	: Kinasa N-terminal de <i>c-Jun</i>
Kd	: Constante de disociación
kDa	: Kilo dalton
Los	: Losartán
M199	: Medio 199
MAPK	: Proteína quinasa activada por mitógenos
MEC	: Matriz extracelular

min	: Minuto
mg	: Miligramo
ml	: Mililitro
mM	: Milimolar
mm	: Milímetro
MOI	: Multiplicidad de infección
mOsm	: Miliosmolar
MTT	: Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio
NaCl	: Cloruro de Sodio
NaOH	: Hidróxido de sodio
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	: Ortovanadato de sodio
nm	: nanómetros
nM	: nanomolar
nmoles	: nanomoles
PBS	: Tampón fosfato salino
PC3	: Pro-caspasa 3
PLC	: Fosfolipasa C
pmoles	: picomoles
PMSF	: Fenilmetilsulfonifluoruro
PKC	: Proteína quinasa C
p/v	: Porcentaje peso volumen
rpm	: Revoluciones por minuto
s	: Segundos
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	: Gel de poliacrilamida desnaturante
SEM	: Error estándar de la media
Sor	: Sorbitol
TBE	: Tampón Tris-Borato-EDTA
TBS	: Tampón tris salino
TCA	: Acido tricloro acético
TE	: Tampón Tris-EDTA
TEMED	: <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etilendiamina
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminoetano
Tpo	: Tiempo
µg	: Microgramo
µl	: Microlitro
µM	: Micromolar
µm	: Micrómetro
V	: Volt
v/s	: Versus
v/v	: Porcentaje volumen volumen
WB	: Western blot

## RESUMEN

Está reportado que Angiotensina II (Ang II) conduce a hiperplasia en fibroblastos cardiacos y apoptosis sobre cardiomiocitos “*in vitro*”, sin embargo, estas respuestas son aún materia de controversia, siendo el bajo número de receptores para este péptido en estos tipos celulares, una de las principales limitaciones para la obtención de resultados concluyentes. Mediante la sobre-expresión con adenovirus de receptores de Ang II del subtipo AT1 y AT2, evaluamos los efectos de Ang II sobre cultivos primarios de fibroblastos cardiacos adultos (FCA). Sorprendentemente, Ang II condujo a la pérdida de viabilidad en FCA transducidos con AdAT1R, por otro lado, la viabilidad de FCA transducidos que sobre-expresaron GFP ó AT2R no fue alterada por Ang II. La muerte celular mediada por AT1 presentó características tipo apoptosis tales como compactación celular, “blebbing”, activación de caspasa 3 y DNA laddering. Se demostró que la estimulación por Ang II produce en estas células un rápido aumento en la concentración de calcio intracelular, y paralelamente la activación de la vía ERK aunque con distinta temporalidad. Interesantemente, solo se observó apoptosis de los FCA transducidos con AdAT1R y estimulados con Ang II en presencia de calcio externo. Por contraparte, la activación de ERK en ausencia de calcio en el medio de incubación, condujo a una mejora en la viabilidad celular. Por tanto, se concluye que en FCA transducidos AdAT1R, la Ang II activa un patrón de señales intracelulares asociados tanto a muerte como a sobrevivencia, y que dependiendo de las condiciones de cultivo ausencia/presencia de calcio externo será la manifestación celular que primará.

## SUMMARY

It is reported that Angiotensin II (Ang II) leads to hyperplasia in cardiac fibroblasts and apoptosis on cardiomyocytes "in vitro". Nevertheless, these answers are still controversy matter. Between the main argumentations for obtain definitive results, the low number of these receptors for Ang II in these cells is a crucial step. By means of adenoviral transduction to over-express the receptors of Ang II subtype AT1 and AT2, we evaluated the Ang II effects on primary cultures of adult cardiac fibroblasts (ACF). Surprisingly, Ang II lead to the loss of viability in ACF transduced with AdAT1R, meanwhile, the viability of transduced ACF that over-expressed GFP or AT2 was not altered by Ang II. The cellular death mediated by AT1R displayed apoptotic characteristics such as cellular compaction, "blebbing", caspase-3 activation and DNA laddering. We demonstrated that Ang II stimulated in these cells cause a rapid intracellular calcium increase, and in a parallel manner the ERK pathway signaling activation, although with a distinct temporality. Interestingly, apoptosis was observed only in ACF transduced with AdAT1R in presence of external calcium in the medium culture. By contrast part, the activation of ERK in calcium absence in incubation medium, lead to an improvement in the cellular viability. Therefore, we conclude that ACF AdAT1R transduced, have capacity of answer to Ang II activating a pattern of signals associate to cellular death or survival, which will depend of presence or absence of calcium in the extracellular culture media.

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, las enfermedades cardiovasculares dan cuenta del 27% de la mortalidad en los países desarrollados y se prevé que para el año 2020 estas enfermedades serán la causa del 37% de los fallecimientos y del 60% de la morbilidad <sup>1</sup>. Por ello es de primera importancia conocer sus causalidades a un nivel molecular.

Desde el punto de vista celular, el corazón está compuesto principalmente por cardiomiocitos y fibroblastos, éstos últimos constituyen dos tercios de la población celular del corazón <sup>2</sup>. Inicialmente se pensó que los fibroblastos tenían una función meramente estructural, sin embargo, hoy se sabe que son un elemento celular muy activo, pues los fibroblastos pueden migrar, proliferar y des-diferenciarse <sup>3</sup>. Además, poseen una amplia variedad de receptores, secretan diversos factores de crecimiento y citoquinas, los que pueden actuar en forma autocrina y/o paracrina, y finalmente son blanco para una amplia variedad de estímulos tanto mecánicos como químicos <sup>4</sup>. En condiciones normales, la principal función del fibroblasto es producir proteínas de la matriz extracelular (MEC), la que sustenta a los cardiomiocitos, mientras que en estados patológicos o de daño tisular participan activamente en el proceso de cicatrización <sup>2,5</sup>.

En el corazón, el tamaño de la población de fibroblastos cardiacos se regula por un balance entre proliferación y muerte celular, esta última principalmente por apoptosis o muerte celular programada. Los fibroblastos pueden proliferar bajo ciertas circunstancias tales como infarto, hipertensión e insuficiencia cardiaca. Esta proliferación está acompañada de un depósito excesivo de proteínas de la MEC conocida como fibrosis cardiaca, la que conduce a disfunción ventricular <sup>2</sup>. Contrariamente, una insuficiente proliferación del fibroblasto y depósito de proteínas de la matriz extracelular, después de un daño cardiaco, resulta en un adelgazamiento anormal de la pared del ventrículo con riesgo de ruptura.

La apoptosis corresponde a un fenómeno biológico fundamental, permanente, dinámico e interactivo, en el que existen mecanismos pro o anti apoptóticos, regulados genéticamente, los que actúan en forma activa para mantener un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular. Recientes evidencias indican que el fibroblasto cardiaco es más resistente a la apoptosis que los correspondientes de pulmón y piel <sup>6</sup>.

Esta última evidencia nos indicaría que en condiciones normales, el balance proliferación / muerte celular, se podría orientar a la producción excesiva de proteínas de la MEC conduciendo a fibrosis patológica. Por lo tanto, la identificación de los factores que regulan el tamaño de la población de los fibroblastos es importante para comprender e intervenir farmacológicamente modulando los mecanismos que mantienen la función fisiológica normal y el remodelamiento patológico del ventrículo izquierdo.

Uno de los principales sistemas neurohumorales que regulan el tamaño de la población celular cardíaca es el sistema renina-angiotensina-aldosterona, siendo la Angiotensina II (Ang II) su principal efector. La principal función conocida de éste octapéptido es la acción vasopresora en respuesta a la caída de la volemia o de presión arterial <sup>37</sup>. Su administración crónica, aun en dosis sub-presoras <sup>26</sup>, conduce al remodelamiento cardíaco manifestado en la disminución del número y la hipertrofia de los cardiomiocitos, además del aumento de depósitos de colágeno e hiperplasia de los fibroblastos. Por contraparte, la administración de antagonistas del receptor de angiotensina II del subtipo AT1, por ejemplo losartán, o inhibidores de la ECA, por ejemplo lisinopril, conducen a un retardo y/o mejora en los parámetros celulares cardíacos antes mencionados. Por otra parte, se sabe que la Ang II estimula la proliferación de fibroblastos cardíacos y producción de MEC durante el desarrollo de hipertrofia patológica ventricular causada por daño isquémico o sobrecarga dinámica, a través de la síntesis de factores de crecimiento o citoquinas <sup>7</sup>, sin embargo, el efecto de la Ang II en el proceso de muerte celular por apoptosis en el fibroblasto cardíaco no ha sido dilucidado completamente y existen en la literatura reportes no concluyentes del todo. De lo anterior, se concluye que existen varias interrogantes aún por resolver respecto del efecto de la Ang II en el equilibrio proliferación / muerte celular del fibroblasto, entre ellas la participación que les cabe a los subtipos de receptores de este ligando, las vías transduccionales que se activan y que factores pro o anti-apoptóticos son desequilibrantes.

A nivel celular la Ang II modula la contracción, regula el crecimiento, apoptosis y diferenciación celular, influencia la migración celular y el depósito de proteínas de la MEC, estimula la síntesis de otros factores de crecimiento, y agentes

vasoconstrictores, y transactiva otros tipos de receptores de factores de crecimiento <sup>8,9</sup>. La Ang II se une con la misma afinidad a dos distintos subtipos de receptores acoplados a proteínas G llamados AT1 y AT2 <sup>10</sup>. Sin embargo, esos receptores se distinguen por su selectividad a distintos antagonistas no peptídicos, siendo losartán, valsartán, telmisartán, entre otros, específicos para AT1 y el PD 123319 específico para AT2 <sup>10</sup>. Del mismo modo, las vías de transducción de señales intracelulares activadas por cada receptor también son diferentes. La unión de Ang II al receptor subtipo AT1 conduce a la activación de las fosfolipasas C, D, A2 e induce la apertura de canales de Ca<sup>+2</sup>, mientras que inhibe a la adenilato ciclasa <sup>8, 10</sup>. Adicional a esas vías clásicas, la activación del receptor subtipo AT1 también estimula la fosforilación en tirosina de ciertas proteínas, lo que conduce a la activación de MAP kinasas como ERK 1/2 y JNK; la activación de estas vías conduce a los efectos mitogénicos <sup>11</sup>. Contrariamente, la unión de Ang II al receptor subtipo AT2 conduce a la defosforilación de ciertas proteínas regulatorias, mecanismo que se cree es importante en la diferenciación, apoptosis, y efectos antiproliferativos inducidos tras su activación <sup>12</sup>.

La mayoría de las acciones de la Ang II son mediadas por AT1R y en corazón este receptor se encuentra expresado en cardiomiocitos y fibroblastos <sup>13</sup>. En humanos existe un solo subtipo de receptor AT1R (AT1a), mientras que en ratones existen los subtipos AT1a y AT1b <sup>10</sup>. A su vez, AT2R también se expresa en corazón y esta más involucrado en el desarrollo fetal y desaparece prontamente después del nacimiento <sup>10</sup>. En el adulto, la mayoría de los receptores de Ang II son del subtipo AT1, mientras que el subtipo AT2 es re-expresado después de un daño vascular y cardiaco y durante la cicatrización de las heridas <sup>14</sup>. Por otro lado, se ha encontrado que bajo ciertas condiciones patológicas y específicamente en corazones humanos con cardiomiopatía dilatada, y en las zonas lejanas al infarto cardiaco aumenta la expresión de receptores tipo AT1, expresión que estuvo asociada a hipertrofia y fibrosis cardiaca <sup>15</sup>, mientras que a nivel vascular la sobre expresión del receptores se ve favorecida por la hipercolesterolemia <sup>16</sup>. Del mismo modo, los niveles de expresión de AT2R también aumentan en estados patológicos. Se ha demostrado que la expresión de AT2R aumenta en corazones con insuficiencia cardiaca dilatada y los fibroblastos presentes en regiones intersticiales son el principal tipo celular donde se expresan esos receptores, y al mismo tiempo que la activación de dicho receptor se opone a las

acciones mitogénicas de Ang II al estimular AT1R<sup>17</sup>. Finalmente, se ha encontrado también que mRNA que codifica para los receptores AT1 y AT2 aumentan significativamente después de 4 días de coartación aórtica, y solo los niveles proteicos de AT2R fueron aumentados<sup>18</sup>. Por lo anterior, otra interrogante aún no resuelta corresponde a los efectos de Ang II sobre el equilibrio proliferación / muerte celular, en condiciones patológicas donde se expresan en alta cantidad los receptores AT1 y AT2.

Actualmente existe cierta controversia acerca de la participación de los receptores AT1 y AT2 en la apoptosis, debido a que los efectos de Ang II en la apoptosis son específicos tanto del tipo celular como de las condiciones patológicas estudiadas<sup>19</sup>. En el corazón se ha visto que Ang II induce apoptosis en cardiomiocitos de ratas a través de la activación de ambos tipos de receptores de Ang II<sup>20</sup>. Sin embargo, en células del músculo liso vascular Ang II ejerce un efecto antiproliferativo y proapoptótico a través del receptor tipo AT2, contrarrestando los efectos de AT1R, específicamente en el proceso de formación de la neoíntima<sup>21</sup>. Por otro lado, Jugdutt y Menon et al, han indicado que la apoptosis de los cardiomiocitos es mediada por receptores tipo AT1 y no por tipo AT2<sup>22</sup>. Del mismo modo, Miura et al., han demostrado que la sobre-expresión de AT2R en células del músculo liso vascular y fibroblastos epiteliales es suficiente para inducir apoptosis y que ella no es mediada por la presencia del agonista, pero el nivel del receptor es crítico<sup>23</sup>. Finalmente Li et al., han demostrado que la delección del receptor tipo AT2 suprime la apoptosis inducida por Ang II, indicando que este receptor media la apoptosis<sup>24</sup>. De los antecedentes indicados no se podría concluir con certeza y menos sugerir si la apoptosis es mediada por los receptores tipos AT1 o por AT2 en fibroblastos cardiacos.

A causa de que en el adulto los receptores AT1 son expresados en mayor número que los AT2, los efectos de la estimulación del receptor AT1 sobrepasa la actividad del receptor AT2, así, a menos que el receptor AT1 este bloqueado, es difícil investigar el efecto de Ang II en el receptor tipo AT2. Esto aumenta la posibilidad de que un AT2R no bloqueado, cuando es estimulado por un aumento reactivo en la Ang II circulante, puede contribuir a las acciones benéficas del bloqueo del AT1R.

Estos antecedentes nos condujeron a dilucidar las acciones que Ang II tiene sobre cultivos primarios de células cardíacas, obtenidos desde ratas adultas y los mecanismos involucrados. Nuestra aproximación consideró el uso de adenovirus para la sobre expresión de los 2 subtipos de receptores, AT1 y AT2.

## **2. HIPÓTESIS**

Los fibroblastos cardíacos adultos (FCA) con sobreexpresión adenoviral del receptor AT1 mueren por apoptosis, mientras que la sobreexpresión adenoviral del receptor tipo AT2 media sobrevida celular tras la estimulación por Ang II.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Determinar in vitro la muerte celular por apoptosis de los fibroblastos cardiacos adultos por la estimulación de AT1 con Ang II.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Caracterizar la sobreexpresión de los receptores de Angiotensina II tipo AT1 y AT2 en fibroblastos cardiacos adultos, mediante ensayos de western blot, microscopía epifluorescente y ensayos de unión a radioligando.
- 2.- Evaluar los parámetros asociados a sobrevida y/o muerte del fibroblasto cardiaco adulto estimulados con Ang II, mediante ensayo de viabilidad.
- 3.- Evaluar los parámetros asociados a la apoptosis del fibroblasto cardiaco adulto estimulados con Ang II, tales como fragmentación del DNA y actividad de caspasa 3.
- 4.- Determinar vías de transducción de señales de importancia en la apoptosis, como por ejemplo fosforilación de ERK  $\frac{1}{2}$  y niveles de calcio intracelular.

## **5. MATERIALES Y METODOS**

### **5.1. Reactivos**

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): Medio M-199, pancreatina, MTT, Tritón X-100, EGTA, azul de tripán, anticuerpos para ERK1/2, HA y GFP. En Gibco BRL (Carlsbad, California EEUU) se adquirieron colagenasa II, tripsina-EDTA, estándar para masas moleculares de proteínas pre-teñido, suero fetal de bovino (FBS) y suero fetal de ternero (FCS). Los compuestos inorgánicos y orgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en MERCK (Darmstadt, Alemania). El reactivo quimioluminiscente para western blot (Western Lightning) fue adquirido en PerKinElmer Life Sciences, Inc. El material de plástico estéril para la obtención y cultivo de fibroblastos cardíacos se obtuvieron en Falcon. Los anticuerpos para procaspasa/caspasa-3, se adquirieron en Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EEUU). Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo y ratón conjugado a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU).

### **5.2. Modelo animal**

Se utilizaron como modelo de estudio ratas macho adultas Sprague-Dawley de 250g y ratas neonatas (2 a 3 días de edad), provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, en cumplimiento de todas las normas éticas referidas a la utilización de animales.

### **5.3. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos ventriculares de rata adulta**

Para el aislamiento de FCA, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina y xilazina (66 mg/Kg y 1.6 mg/Kg respectivamente) vía intraperitoneal. El corazón fue removido por toracotomía y perfundido según la técnica de Langendorff<sup>25</sup> Los corazones fueron lavados (4mL/min) por 5 minutos con tampón Gerard con CaCl 2mM, luego se cambió por Gerard con EGTA 2mM para detener la contracción

espontánea del corazón. Los corazones fueron perfundidos por 30 min con Gerard conteniendo 0.05 % hialuronidasa, 0.05 % colagenasa tipo II. Luego se separó el ventrículo izquierdo, se disgregó mecánicamente y se incubó por 20 minutos a 37 °C con agitación. La suspensión celular se centrifugó a 500 rpm por 1min. El sedimento se descartó y el sobrenadante se centrifugó a 1000 rpm por 10min. El sedimento se resuspendió en M199 + 10% FBS. Las células se sembraron en M199 10% FBS sobre placas de cultivo de 100mm e incubadas por 2h a 37°C en una atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5% y 95% de aire. Las células no adheridas fueron removidas y se agregó M199 10% FBS nuevo. Los FCA se dejaron proliferar hasta confluencia y los cambios de pasaje fueron realizados mediante tripsinización (hasta pasaje 2 como máximo). La concentración celular se determinó por microscopía usando como colorante azul de tripán para visualizar las células vivas y muertas. Conocida su concentración, las células se sembraron en M199 a distintas densidades, según las necesidades experimentales, sobre placas de cultivo mantenidas a 37°C en una atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5% y 95% de aire.

#### **5.4. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos ventriculares de rata neonata**

Se utilizó el procedimiento descrito por Foncea y cols en 1997 <sup>26</sup>. Las ratas se decapitaron e inmediatamente se les removió el corazón bajo condiciones de asepsia, se retiraron las aurículas y los ventrículos se cortaron en pequeños pedazos para facilitar las sucesivas digestiones posteriores con pancreatina y colagenasa II. El producto de las digestiones se sometió a un preplaqueo por 2h a 37°C en medio de cultivo conteniendo 5% FBS y 10% FCS en frascos para cultivo de plástico. Por adhesión diferencial al plástico se separaron fibroblastos de cardiomiocitos. Luego de las 2h, se cambió el medio por M199 + 10% FBS, los fibroblastos se dejaron proliferar hasta confluencia y los cambios de pasaje fueron realizados mediante tripsinización (hasta pasaje 2 como máximo).

## 5.5. Transducción adenoviral

Se utilizó la construcción Ad-GFP-NHA-ATx. Este co-expresa el receptor de Ang II del subtipo ATx de rata (x es 1 ó 2, con epítoto HA en extremo N-terminal) con GFP como marcador de infección, dirigidos por el promotor CMV. Para el control de actividad biológica se utilizó el adenovirus AdGFP que conduce la expresión de la proteína GFP bajo el control del mismo promotor. Las células fueron sembradas en placas de cultivo, según necesidad, en M199 y fueron transducidas con los adenovirus por 24 horas a una multiplicidad de infección (MOI) de 300. En esas condiciones más del 90% de los fibroblastos fueron transducidos, definidos por la fluorescencia de GFP.

## 5.6. Preparación de extractos celulares totales

Se prepararon extractos de proteínas totales para:

- Evaluar las formas inactiva y activa de la caspasa-3 en respuesta a la estimulación con Ang II por distintos tiempos.
- Evaluar la presencia del epítoto HA y de GFP luego de la transducción adenoviral.
- Evaluar la activación de la MAPK ERK, de manera dosis dependiente y tiempo dependiente a Ang II.

Las células se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de  $3.2 \times 10^5$  células/placa. Una vez estimuladas, las células se lavaron tres veces con PBS frío y luego se lisaron con 100  $\mu$ L de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,2; EDTA 5 mM; NaCl 150 mM; Tritón X-100 1% v/v; SDS 0.1% v/v; Deoxicolato 1% v/v; leupeptina 2  $\mu$ g/mL; Benzamidina 10mM; PMSF 1 mM y  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  100  $\mu$ M). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante o extracto de proteínas se recuperó en un tubo nuevo, se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay) y se desnaturó en tampón SDS-PAGE 4X, para ser almacenado (el extracto) a -20°C.

### **5.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida**

La separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Para la detección se cargaron 30 µg de extracto proteico. Los geles concentrador y separador fueron al 5 y 12%, respectivamente para ERK, GFP y caspasa-3. Para HA el gel separador fue al 8%. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 Volt en tampón de electroforesis.

### **5.8. Electrotransferencia de proteínas**

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) de 0,2 µm a 0,45 Amperes durante 90min en tampón de transferencia.

### **5.9. Western blot**

Una vez transferidas, la membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (PBS 1X; Tween-20 0,1%; leche sin grasa 5% p/v) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes según ensayo. Procaspasa/caspasa-3 en tampón de incubación (TBS 1X; Tween-20 0,1%) a una dilución 1:1000 toda la noche a 4°C con agitación suave. Tanto para ERK y GFP se usó tampón de incubación (PBS 1X; Tween-20 0.1%) a una dilución 1:1000 durante 4 h a temperatura ambiente con agitación suave. Para HA se incubó en tampón de incubación (TBS 1X; Tween-20 0,1%) a una dilución 1:500 por 2 h a temperatura ambiente con agitación suave.

Posterior a la incubación, las membranas se lavaron 3 veces por 10 min en TBS 1X o PBS 1X / Tween-20 al 0,1%, e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo o ratón conjugado con peroxidasa, a un título de 1:5000 en tampón de bloqueo TBS 1X o PBS 1X / Tween-20 al 0,1%.

Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1min en la reacción “Western Lightning” y se expusieron a la película de fotografía Kodak-Biomax. Las películas se digitalizaron y las imágenes fueron

sometidas a densitometría con ayuda de los programas computacionales Photoshop 7.0 y USI.

Después de realizar los ensayos de inmunowestern blot, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 1h en una solución de rojo ponceau (rojo ponceau 2%, TCA 30%, ácido sulfosalicílico 30%) para desprender los anticuerpos. Luego de este tratamiento, las membranas pudieron ser reutilizadas para nuevos ensayos de western blot.

#### **5.10. Ensayo de radioligando para FCA transducidos ATxR y desplazamiento por antagonistas específicos**

El marcaje de Ang II con yodo radiactivo ( $^{131}\text{I}$ ) se realizó mediante el procedimiento con cloramina T, y el péptido monoiodado fue purificado mediante cromatografía de intercambio iónico, para lo cual se utilizó una columna con resina DOWEX AGI-X8.

FCA ATxR fueron lisados con buffer de lisis frío (1mM Tris-HCl pH 7.5 2mM EGTA), removidos de las placas y centrifugadas a 15000 rpm por 20 min a 4 °C. Las muestras fueron resuspendidas en buffer SET (0.25 M sacarosa, 1 mM EDTA, 5 mM Tris-HCl) y almacenadas a -20 °C hasta el momento del ensayo.

Para los ensayos de desplazamiento, Las membranas descongeladas fueron resuspendidas en tampón de ensayo (Tris-HCl pH 7.4, 120 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.25% BSA) y fueron sonicadas. Para determinar especificidad de estos subtipos de receptores para Ang II, las membranas fueron incubadas a temperatura ambiente por 1h con 1nM Ang II [ $^{131}\text{I}$ ] en un volumen total de 250 uL conteniendo, según el caso, 10 uM losartán (antagonista no peptídico selectivo para AT1), 1uM PD123319 (antagonista no peptídico selectivo para AT2) o 10 mM Ang II. Para determinar la Kd y el Bmax de FCA ATxR, se realizaron ensayos de desplazamiento con una concentración fija de Ang II (10 nM) y concentraciones variables de AngII [ $^{131}\text{I}$ ] 0.1, 1, 5, 10 nM.

### **5.11. Viabilidad celular**

Se realizaron estudios de viabilidad para:

- Estudiar el equilibrio sobrevivencia/muerte de FCA estimulados con Ang II.
- Estudiar la participación del  $\text{Ca}^{+2}$  externo y los cambios de medio en FCA estimulados con Ang II.

El reactivo bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) fue usado para estimar el número celular en cultivo. FCA fueron sembrados en placas de 35 mm cultivadas en medio M199 transducidos con adenovirus ATxR y GFP por 24h, luego fueron lavados 3 veces con PBS y se reemplazó por medio fresco M199 o medio sin calcio externo (Gerard) para ser estimulados con Ang II (100nM) por distintos tiempos. Entonces el medio fue cambiado por M199 o Gerard conteniendo MTT (0.5 mg/mL) y se continuó la incubación a 37 °C por 4h. A este punto el producto formado (Azul de formazán) fue resuspendido en 2-propanol y la absorbancia fue leída a 570 nm en espectrofotómetro.

### **5.12. Fotografía de transmisión y epifluorescencia**

Se fotografió el estado celular, la confluencia y el registro de la transducción (GFP) con una cámara digital Olympus C-4000, de 4.0 megapíxeles, asociada a un microscopio epifluorescente Axiovert, Carl Zeiss a un objetivo 40X.

### **5.13. Purificación del DNA**

Alrededor de  $2 \times 10^6$  FCA AdAT1R (cantidad correspondiente a una placa de 100 mm confluyente) fueron estimulados con Ang II (100nM) por 24h. Luego el total de las células fueron recolectadas y centrifugadas a 1000 rpm por 5min. El sedimento fue resuspendido en 300  $\mu\text{L}$  de tampón TE/Tritón 1% y se incubó la muestra en hielo por 10min. Luego la muestra se resuspendió nuevamente y se centrifugó a 13000 rpm por 15min a 4 °C y el sobrenadante (que contiene DNA de bajo peso molecular) se transfirió a un tubo eppendorf nuevo, el sedimento fue descartado. Se agregó 1,5  $\mu\text{L}$  de

RNAse (10 mg/mL) y se incubó la muestra por 1h a 37 °C. Pasado ese tiempo se adicionó 12,5 µL de SDS al 10% y 2 µL de proteinasa K (20 mg/mL) y se volvió a incubar por 1h esta vez a 50 °C. Luego se agregó 30 µL NaCl 5M y 300 µL de isopropanol -20 ° C y se incubó la muestra en hielo por 10min, después ésta se centrifugó a 13000 rpm por 15min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se disolvió el sedimento de DNA en 10 µL de buffer TE 1X. El DNA fue cuantificado y su pureza evaluada por la razón de absorbancias 260/280 nm mediante espectrofotometría.

#### **5.14. Electroforesis en gel de agarosa**

Para apreciar fragmentación del DNA (laddering) característica de apoptosis, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 3% (3g de agarosa, 10 mL de TBE 0.5X, 4 uL de bromuro de etidio y 90 mL de agua destilada). Para la detección se cargaron alrededor de 20 uL de DNA. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 60 V en tampón de electroforesis.

#### **5.15. Medición del calcio intracelular**

FCA sin transducir y transducidos con AdAT1R, fueron sembrados sobre cubre objetos de vidrio en placas de 35mm a una densidad de  $1.8 \times 10^5$  células/placa. Previo a la estimulación fueron lavadas e incubadas con los fluoróforos de calcio Fluo 3-AM por 30 min o Rhod-2 por 15 min. Luego estas fueron montadas en un microscopio confocal (Zeiss LSM 5 PASCAL), con un objetivo 40x, donde se registró por 1-2 minutos la señal base para posterior al estímulo con Ang II registrar las variaciones de fluorescencia. Los resultados corresponden a la fluorescencia relativa a la señal base y son el promedio de al menos 3 determinaciones. En cada determinación se promedió 3-4 campos y en cada campo se encontraron y promediaron los registros de 7-9 células.

#### **5.16 Análisis estadístico.**

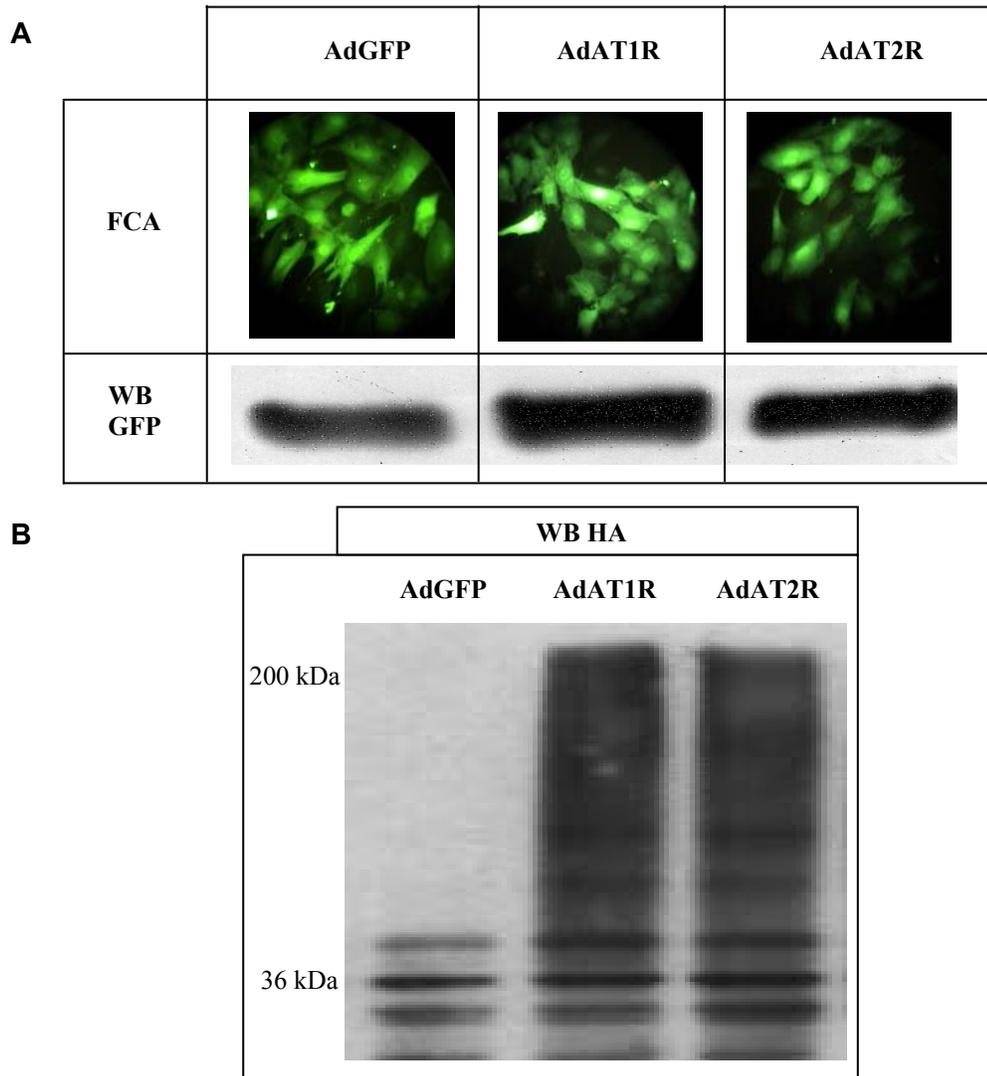
Los resultados mostrados corresponden al promedio  $\pm$  SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA y la prueba Tuckey para determinar la significancia estadística de los resultados.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Sobre-expresión de los receptores de Ang II del subtipo AT1 y AT2 en FCA.**

FCA fueron transducidos con AdGFP, AdAT1R o AdAT2R usando un MOI 300. 24h post infección se evaluó la expresión de GFP por microscopia de epifluorescencia e inmunodetección en extractos de proteínas de FCA, siendo GFP positivas sobre el 90% de las células en cultivo (Fig.1A). Para confirmar que en las células transducidas ATxR además del registro GFP expresaban su correspondiente receptor se inmunodetectó el epítotope HA en extractos de FCA. Este mostró una banda amplia en el rango de 36 a 200 kDa, ausentes en células no transducidas (Fig 1B). Está reportado que los receptores para Ang II poseen sitios sensibles de glicosilación, que esta tiene un rol para la expresión en membranas y que la magnitud de la modificación es dependiente del modelo celular que los exprese. Por tanto, demostramos que cultivos primarios de fibroblastos cardiacos poseen la capacidad de modificar los receptores y que la modificación es semejante e independiente del subtipo de receptor.

**Figura 1. Caracterización de la sobre-expresión de los receptores de Ang II del subtipo AT1 y AT2 en FCA.**



**Fig 1.- Caracterización de la transducción de FCA con adenovirus ATxR.**

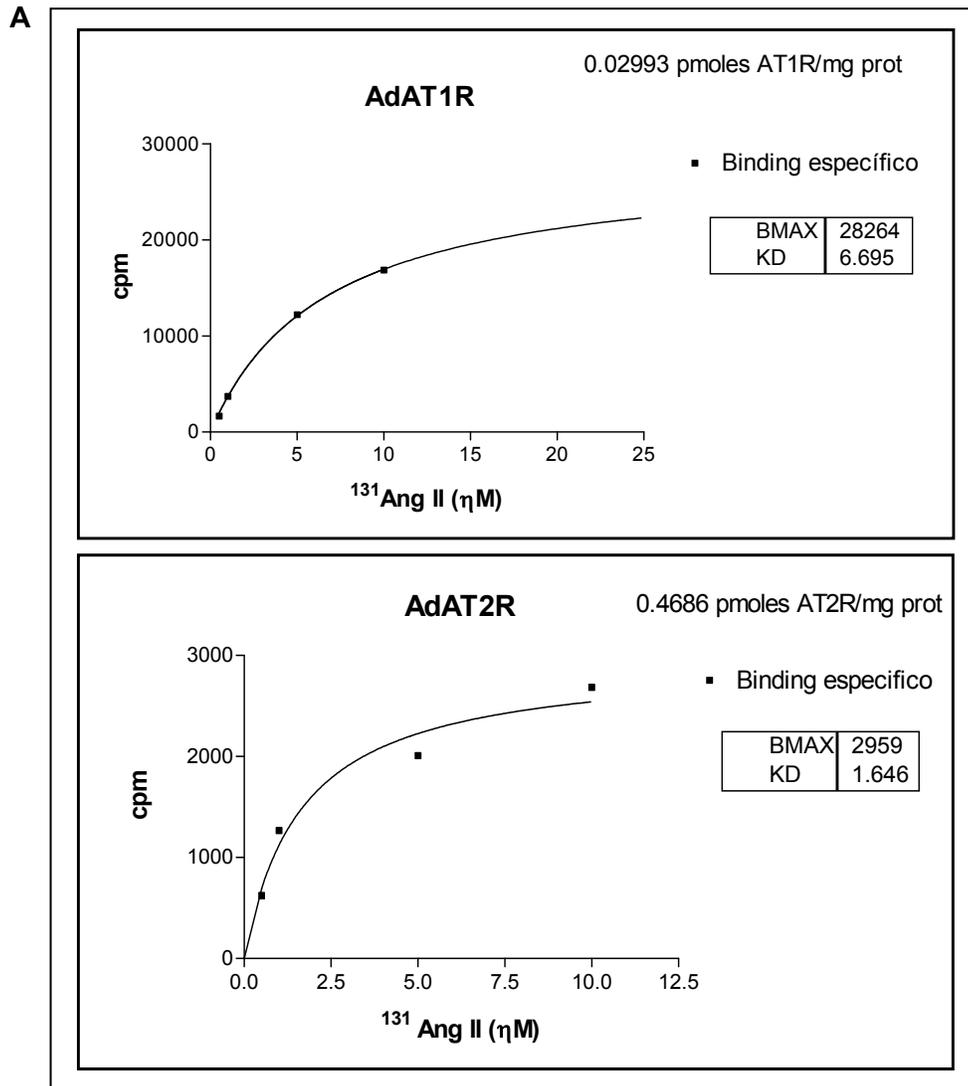
FCA sembrados en una densidad de  $3.2 \times 10^5$  cel/ placa de 35mm, fueron privados de suero y transducidos con AdGFP, AdAT1R y AdAT2R por 24h con un MOI 300 antes de realizar los ensayos. A) En panel superior, epifluorescencia de FCA transducidos para GFP o los receptores AT1 o AT2. En panel inferior inmunodetección de GFP desde los mismos cultivos. B) Inmunodetección de epítotope HA en extracto de proteína total resuelta en SDS-PAGE al 8%.

## **6.2. Ensayos de unión de radioligando (<sup>131</sup>I- Ang II) a los receptores de angiotensina II del subtipo AT1 y AT2 en FCA.**

Se realizaron ensayos de unión específica, con el objeto de determinar los parámetros farmacocinéticos para Ang II en este modelo. Para este ensayo se utilizaron las siguientes concentraciones de <sup>131</sup>I-Ang II: 0.1 – 1 – 5 y 10 nM, y se desplazó con una concentración fija de Ang II (10mM). Este resultado permitió la determinación de una Kd de 6.7nM y 1.6nM, además de la cuantificación de receptores de 0.03 pmoles/mg proteína y 0.47 pmoles/mg de proteína para AT1R y AT2R, respectivamente, similar al descrito en otros reportes<sup>27, 30</sup> (Fig 2A).

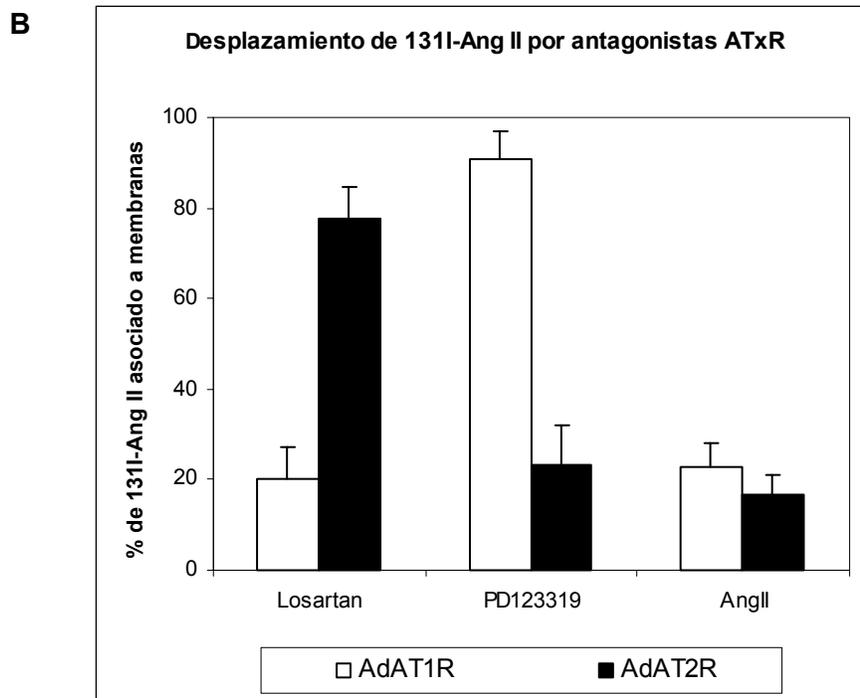
Con el objeto de demostrar la especificidad de los receptores AT1R y AT2R, se determinó mediante ensayos de radioligando el porcentaje de <sup>131</sup>I-Ang II asociado a membranas de FCA en presencia o ausencia de los antagonistas específicos Losartán y PD123319 para AT1R y AT2R, respectivamente. Esto resultó en un desplazamiento selectivo de la radioactividad asociada a membranas de FCA AdAT1R con Losartán y en FCA AdAT2R con PD123319 de 78% ± 7 y 77% ± 9, respectivamente. Estos desplazamientos fueron semejantes al que logró Ang II sin marca radioactiva, tanto en membranas de FCA AdAT1R como en AdAT2R de 77% ± 6 y 83% ± 4, respectivamente (Fig 2B).

**Figura 2. Ensayos de unión de radioligando ( $^{131}\text{I}$ - Ang II) a los receptores de angiotensina II del subtipo AT1 y AT2 en FCA.**



**Fig 2 A. Ensayos de unión de radioligando ( $^{131}\text{I}$ - Ang II) a los receptores de angiotensina II del subtipo AT1 y AT2 en FCA.**

FCA sembrados en una densidad de  $3.2 \times 10^5$  cel/ placa de 35mm, fueron privados de suero y transducidos con AdAT1R y AdAT2R por 24h con un MOI 300 antes de realizar el ensayo de radioligando para cada subtipo de receptor. Se utilizaron las siguientes concentraciones de  $^{131}\text{I}$ -Ang II: 0.1 – 1 – 5 y 10 nM, y se desplazó con una concentración fija de Ang II (10nM)



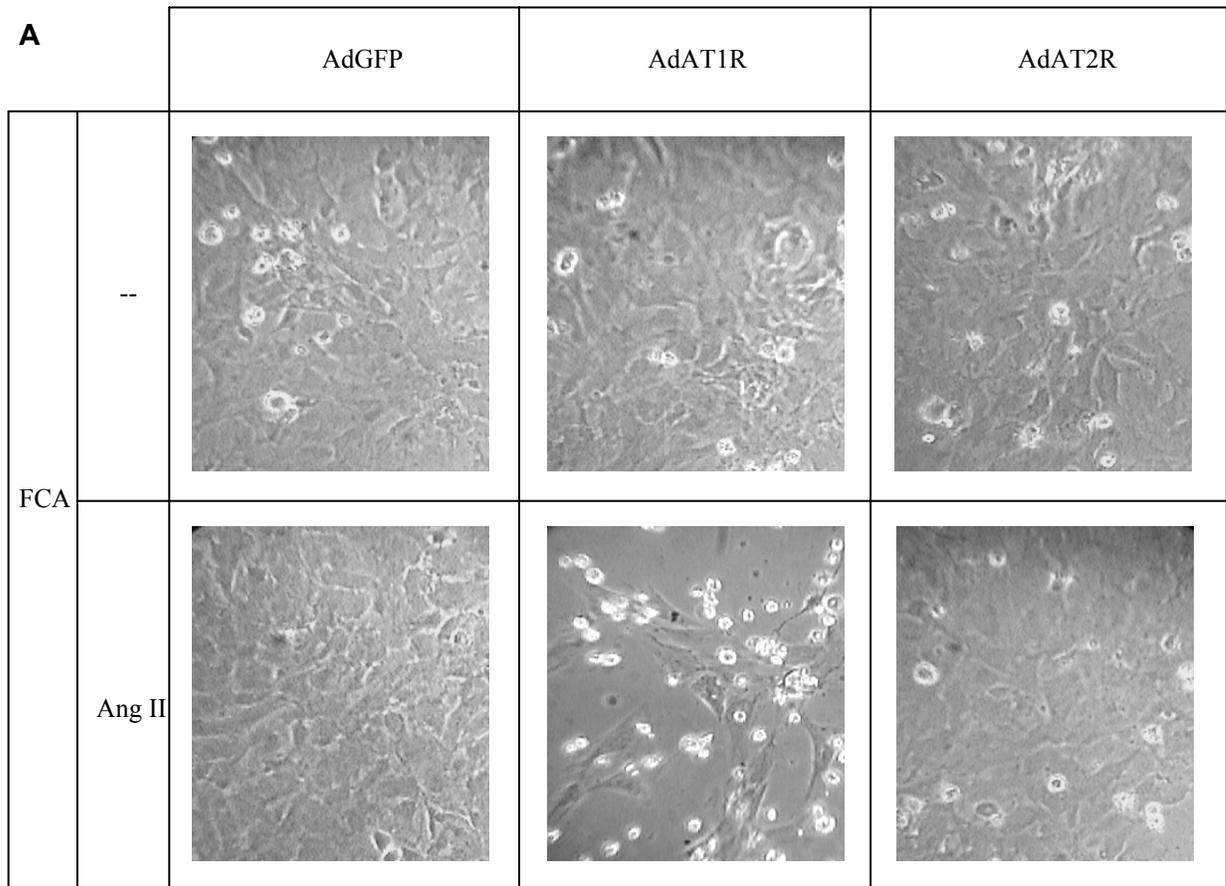
**Fig 2 B. Identidad de los receptores de angiotensina II del subtipo AT1 y AT2 en FCA.**

FCA sembrados en una densidad de  $3.2 \times 10^5$  cel/ placa de 35mm, fueron privados de suero y transducidos 24h con un MOI 300 de AdAT1R y AdAT2R. Luego se realizó el ensayo de desplazamiento por antagonistas específicos de los receptores de angiotensina II para el subtipo AT1 (Losartán 10uM) y el subtipo AT2 (PD123319 1uM) tal y como se describe en materiales y métodos.

### **6.3. Viabilidad de FCA transducidos ATxR estimulados con Angiotensina II.**

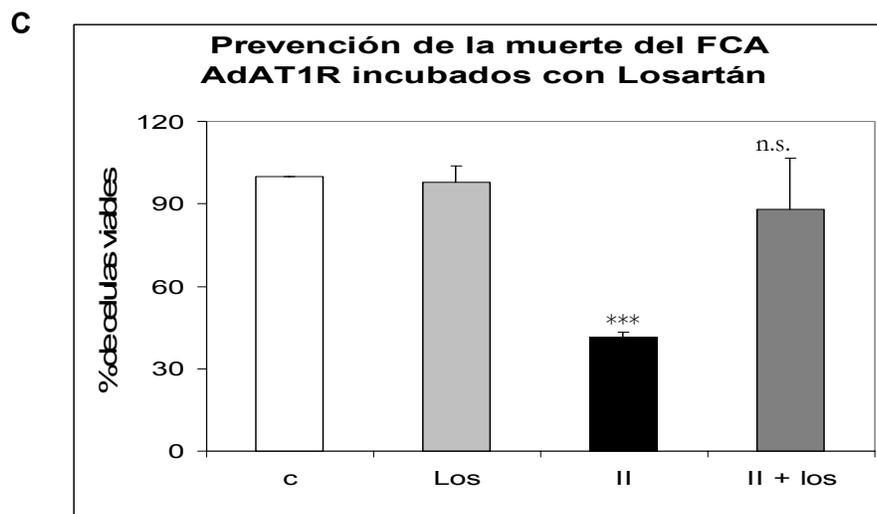
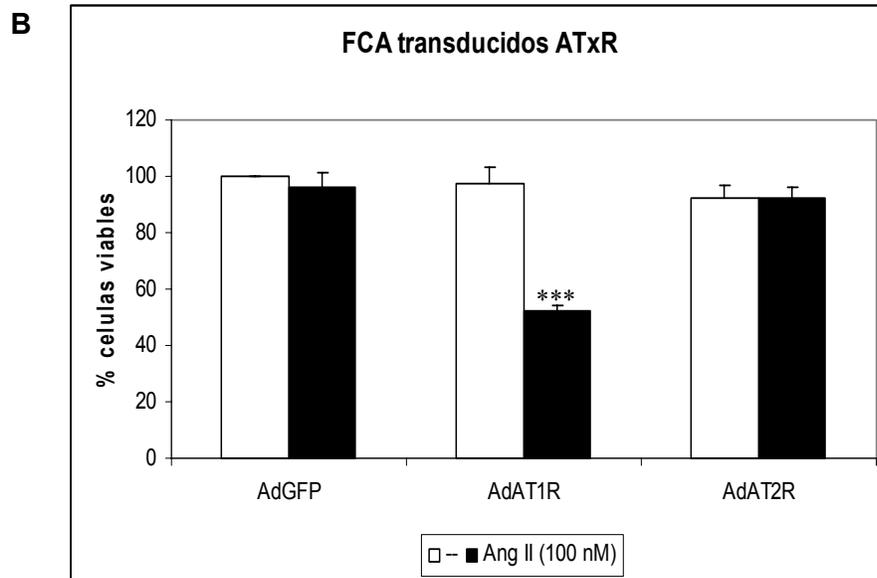
FCA fueron privados de suero y transducidos para expresar GFP, AT1R o AT2R, 24h antes de ser estimulados, como se describe en materiales y métodos. Se evaluó la viabilidad de FCA mediante la técnica de bio-reducción de MTT estimulados con Ang II 100 nM por 24hrs. Se observó que ni los FCA AdGFP ni los AdAT2R mostraron diferencias entre los estimulados y sus respectivos controles sin estimular. Sorprendentemente y contrario a lo esperado FCA AdAT1R presentaron una fuerte caída en su viabilidad, encontrándose sólo un  $54 \pm 4$  % de células viables para esta condición (Fig 3B). La pérdida de viabilidad de los FCA AdAT1R observado por MTT fue confirmado mediante fotografías de microscopía de contraste de fase (Fig 3A). Se probó prevenir la muerte de los FCA AdAT1R mediante la preincubación del antagonista específico del receptor AT1, losartán, para confirmar que la muerte celular era dependiente de la activación de este receptor. Este antagonismo resultó ser total, de tal manera que no se encontraron diferencias significativas entre los FCA AdAT1R estimulados con Ang II previa incubación con losartán y los FCA AdAT1R sin estimular (Fig 3C).

**Figura 3. Viabilidad de FCA transducidos ATxR estimulados con Ang II 100nM.**



**Figura 3 A. Viabilidad de FCA transducido ATxR estimulados con Ang II 100nM.**

FCA sembrados en una densidad de  $3.2 \times 10^5$  cel/cm<sup>2</sup>, fueron privados de suero y transducidos a un MOI 300 con AdGFP, AdAT1R y AdAT2R por 24h. Luego las células fueron estimuladas con Ang II 100nM por otras 24h en M199 para registrar la pérdida de viabilidad para FCA AdAT1R mediante microfotografía en contraste de fase.



**Figura 3 B y C. Viabilidad de FCA transducidos ATxR, estimulados con Ang II.**

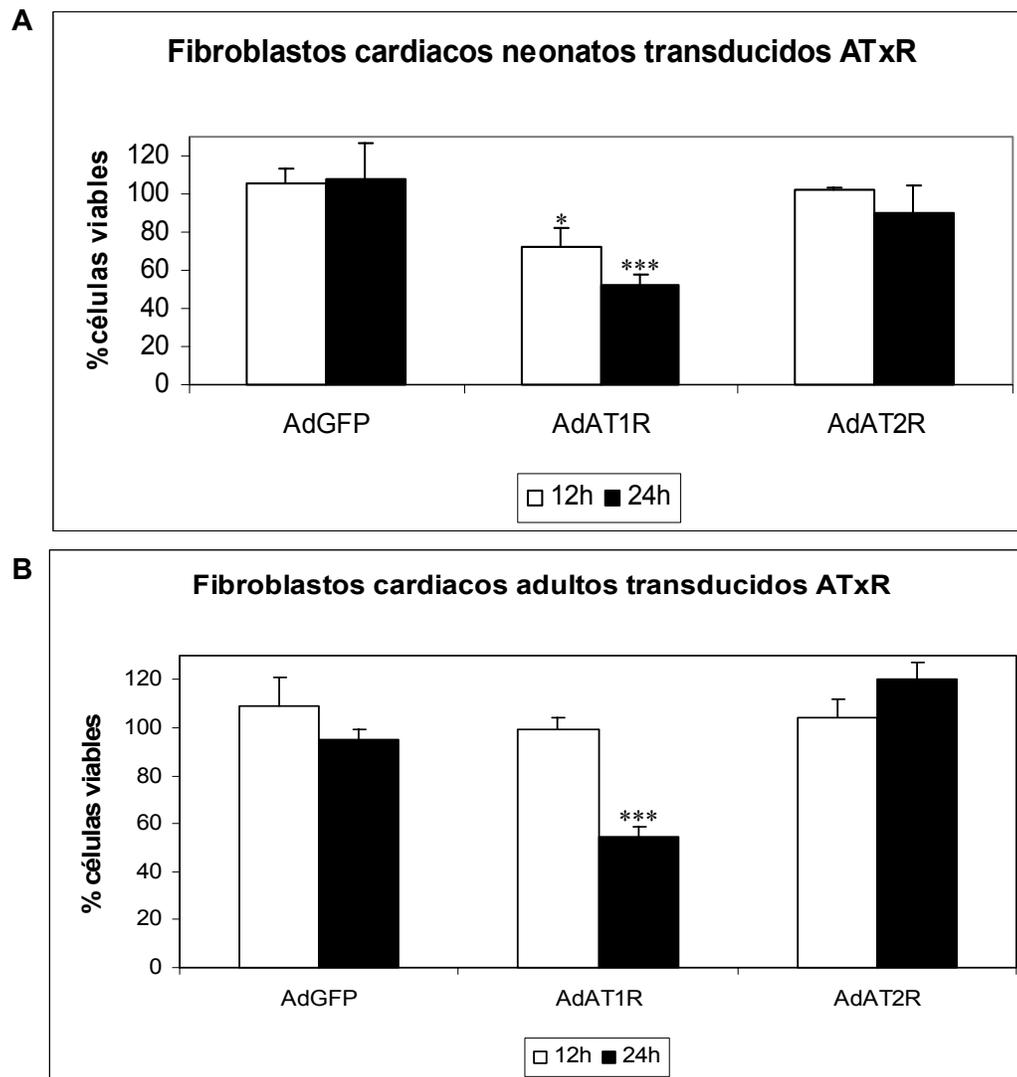
FCA sembrados en una densidad de  $3.2 \times 10^5$  cel/ placa de 35mm, fueron privados de suero y transducidos a un MOI de 300 con AdGFP, AdAT1R y AdAT2R por 24h. Luego las células fueron estimuladas con Ang II 100nM por otras 24h en M199 para realizar los siguientes ensayos: En B), se cuantifica éste fenómeno mediante MTT y se expresa el resultado como el porcentaje de células viables normalizadas al control AdGFP sin estimular. En C) se demuestra la prevención del efecto de Ang II vía AT1R mediante el uso de losartán (antagonista específico de este receptor) en cuanto a viabilidad celular determinada por MTT. Los resultados muestran la media  $\pm$  SEM para al menos tres experimentos independientes.

\*\*\*  $p < 0.001$

#### **6.4. Dependencia de la viabilidad de FCA AdAT1R estimulados con Ang II según el estadio de desarrollo.**

Se evaluó la dependencia de la muerte observada en FC AT1R según el estadio de desarrollo (neonato o adulto). Por esto se comparó la viabilidad mediante MTT de fibroblastos cardiacos neonatos (FCN) versus FCA, ambos modelos fueron transducidos con AdGFP, AdAT1R o AdAT2R, y estimulados con Ang II 100 nM a distintos tiempos. Se observó que la pérdida de viabilidad 24h post estímulo, expresada como % de células viables del cultivo estimulado versus su control sin estimular, fue consistente en ambos modelos para la condición AdAT1R ( $52 \pm 5$  y  $54 \pm 4$  para neonatos y adultos, respectivamente) (Fig 4A y 4B), y no presentó diferencias significativas para el control AdGFP o AdAT2R, ( $108 \pm 18$  (AdGFP),  $90 \pm 14$  (AdAT2R) y  $95 \pm 5$  (AdGFP),  $119 \pm 7$  (AdAT2R) para neonatos y adultos, respectivamente). Sin embargo, el modelo AT1R neonato resultó más precoz que el adulto en manifestar la pérdida de viabilidad al compararse los resultados a las 12 h post estímulo ( $72 \pm 10$  y  $104 \pm 5$  para neonatos y adultos respectivamente).

**Figura 4. Dependencia de la viabilidad de fibroblastos cardiacos transducidos ATxR y estimulados con Ang II según el estadio de desarrollo.**



**Fig 4. Dependencia de la viabilidad de fibroblastos cardiacos transducidos con AdATxR y estimulados con Ang II según el estadio de desarrollo.**

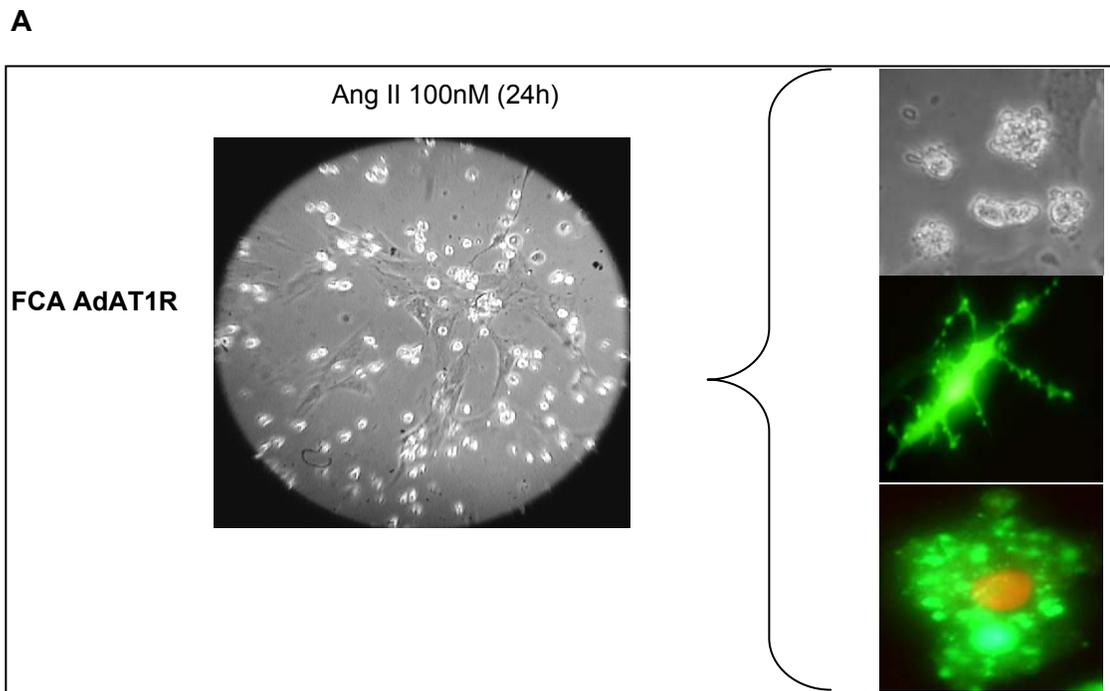
FCA y FCN sembrados en una densidad de  $3.2 \times 10^5$  cel/ placa de 35mm, fueron privados de suero y transducidos a un MOI de 300 con AdGFP, AdAT1R y AdAT2R por 24h. Luego las células fueron estimuladas con Ang II 100nM por 12 o 24h en M199 para determinar viabilidad celular mediante MTT tanto para FCN (A) como para FCA (B). La grafica muestra el % de celulas viables normalizadas al control (AdGFP) sin estimular. Además, los resultados muestran la media  $\pm$  SEM para al menos tres experimentos independientes.

\*  $p < 0.05$  \*\*\*  $p < 0.001$

## **6.5. Caracterización de la muerte de FCA AdAT1R estimulados con Angiotensina II 100nM.**

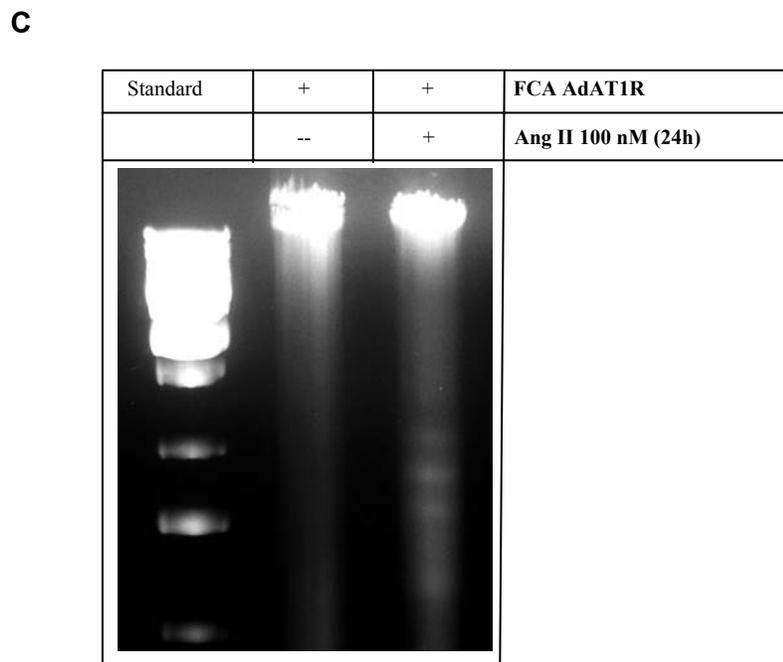
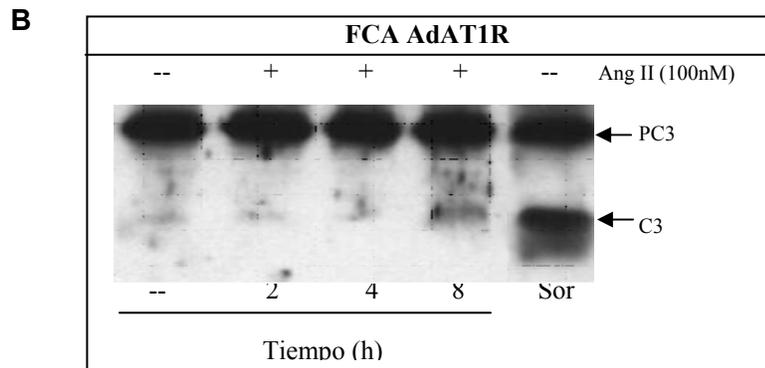
Mediante microscopia de contraste de fase, y luego de una magnificación de las fotografías, se apreció la presencia de cuerpos apoptóticos, que sugieren apoptosis (fig 5A). Por tanto, se evaluó la activación de caspasa-3 mediante inmunodetección en extractos totales de proteína de FCA AdAT1R estimulados con 100 nM de Ang II a distintos tiempos, y se utilizó sorbitol 300 mOsm como control positivo de la activación de caspasa-3. En este experimento se observó la banda correspondiente al fragmento activo de la caspasa-3 a las 8 h en FCA AT1R estimulados con Ang II (Fig 5B). Con el mismo propósito se realizaron ensayos de DNA laddering para FCA AdAT1R en presencia o ausencia de Ang II 100nM. El DNA fue resuelto en gel de agarosa al 2% y se observó la presencia del patrón de bandeo típico para apoptosis sólo en las células estimuladas (Fig 5C).

**Figura 5. Caracterización de la muerte de FCA AdAT1R estimulados con Ang II.**



**Fig 5 A. Caracterización de la muerte de FCA AdAT1R estimulados con Ang II 100nM.**

FCA sembrados en una densidad de  $3.2 \times 10^5$  cel/ placa de 35mm, fueron privados de suero y transducidos a un MOI de 300 con AdAT1R por 24h. Luego las células fueron estimuladas con Ang II 100nM por 24h en M199 y se registró mediante microfotografía en contraste de fase y epifluorescente la aparición de cuerpos apoptóticos característicos.



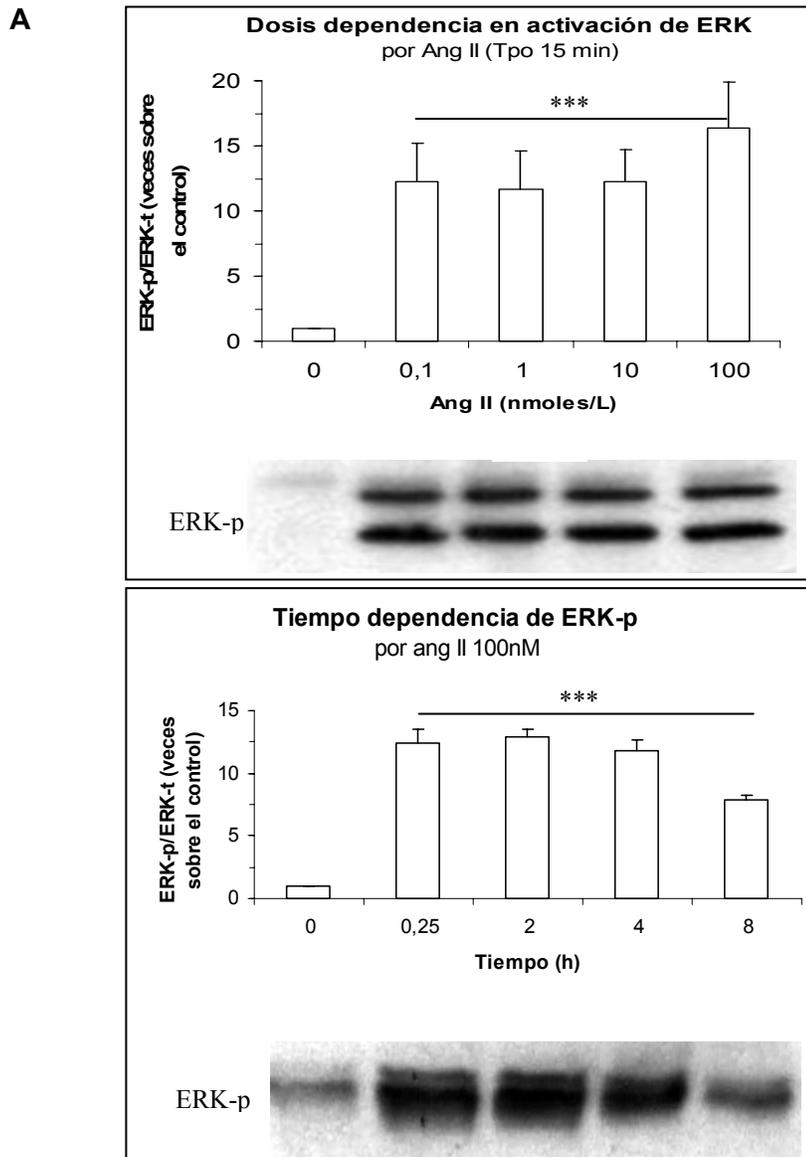
**Fig 5 B y C. Caracterización de la muerte de FCA AdAT1R estimulados con Ang II.**

FCA sembrados en una densidad de  $3.2 \times 10^5$  cel/ placa de 35mm, fueron privados de suero y transducidos a un MOI de 300 con AdAT1R por 24h. Luego las células fueron estimuladas con Ang II 100nM por 24h en M199 para realizar los siguientes ensayos. B) Activación de caspasa-3 a las 8 horas post estímulo mediante WB, se utilizó como control positivo la estimulación de sorbitol (300 mOsm) por 5h en FCA sin transducción adenoviral. C) DNA laddering para FCA AdAT1R estimulados por 24h con Ang II 100nM.

## **6.6. Activación de la vía ERK en FCA transducidos ATxR y estimulados con Ang II.**

La estimulación con Ang II 100 nM resultó en la activación de ERK, para los FCA AdGFP ( $8,1 \pm 2,1$  15min) y para FCA AdAT1R ( $15,3 \pm 4,4$  15min) y concordantemente con reportes previos<sup>28</sup> en la falta de señalización mediante esta vía para los FCA AdAT2R ( $2,8 \pm 2,6$  15 min) (Fig. 6B). Se evaluó la dependencia de la activación de ERK, con el tiempo y la concentración de Ang II. La estimulación de FCA AT1R con Ang II 100 nM, resultó en una persistente activación hasta tiempos tan largos como 8h, y una actividad independiente de la concentración (fig 6A). Preincubación de 30 min con losartán inhibió parcialmente la activación de ERK (54,8%) por Ang II en FCA AdAT1R (fig 6C). Recientes reportes han propuesto que la activación persistente de la vía ERK conduce a la apoptosis por un mecanismo de anoikis<sup>29</sup>. Por tanto, se evaluó si la inhibición con PD98059 (inhibidor de MEK1) era condición suficiente para prevenir la muerte de FCA AdAT1R estimulados con Ang II. Se logró prevenir la activación de ERK, sin embargo este inhibidor no pudo detener la pérdida de viabilidad de los FCA AdAT1R. (Fig 6D)

**Figura 6. Activación de la vía ERK en FCA transducidos ATxR y estimulados con Ang II.**

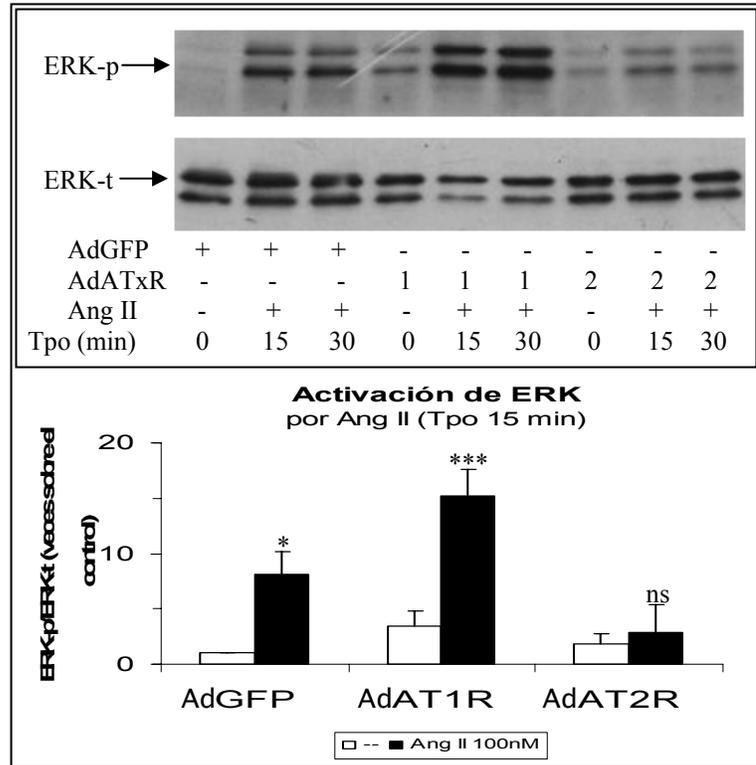


**Figura 6 A. Activación de la vía ERK en FCA AdAT1R estimulados con Ang II.**

FCA sembrados en una densidad de  $3.2 \times 10^5$  cel/ placa de 35mm, fueron privados de suero y transducidos a un MOI de 300 con AdAT1R por 24h. Mediante WB se inmunodetectó ERK-p y ERK-t según se indica en materiales y métodos. En la figura se aprecia la activación de ERK dosis independiente (0.1 – 1 – 10 – 100 nM) y tiempo dependiente (0.25 – 2 – 4 – 8h) para FCA AdAT1R.

\*\*\*  $p < 0.001$

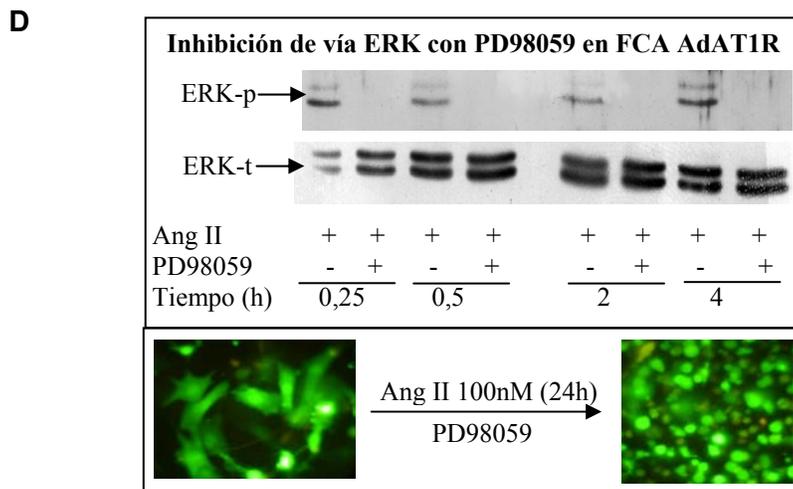
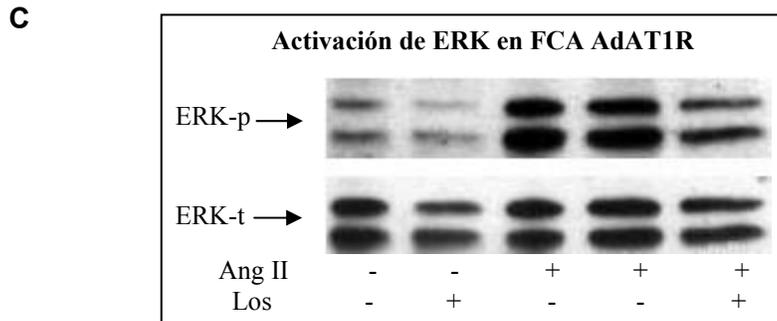
**B**



**Figura 6 B. Activación de la vía ERK en FCA transducidos ATxR y estimulados con Ang II.**

FCA sembrados en una densidad de  $3.2 \times 10^5$  cel/ placa de 35mm, fueron privados de suero y transducidos a un MOI de 300 con AdGFP, AdAT1R o AdAT2R por 24h. Luego las células fueron estimuladas con Ang II 100nM por 24h en M199 para realizar los siguientes ensayos. Mediante WB se inmunodetectó ERK-p y ERK-t según se indica en materiales y métodos. En el panel superior se aprecia la activación diferencial de ERK para FCA AdGFP, AdAT1R y AdAT2R a tiempos cortos (15 y 30 min). En el panel inferior se muestra la cuantificación de al menos 3 experimentos independientes expresados como la media  $\pm$  SEM a un tiempo de 15 min.

\*  $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$



**Figura 6 C y D. Activación de la vía ERK en FCA AdAT1R estimulados con Ang II. Efecto de losartán y PD98059 en la inhibición de esta vía.**

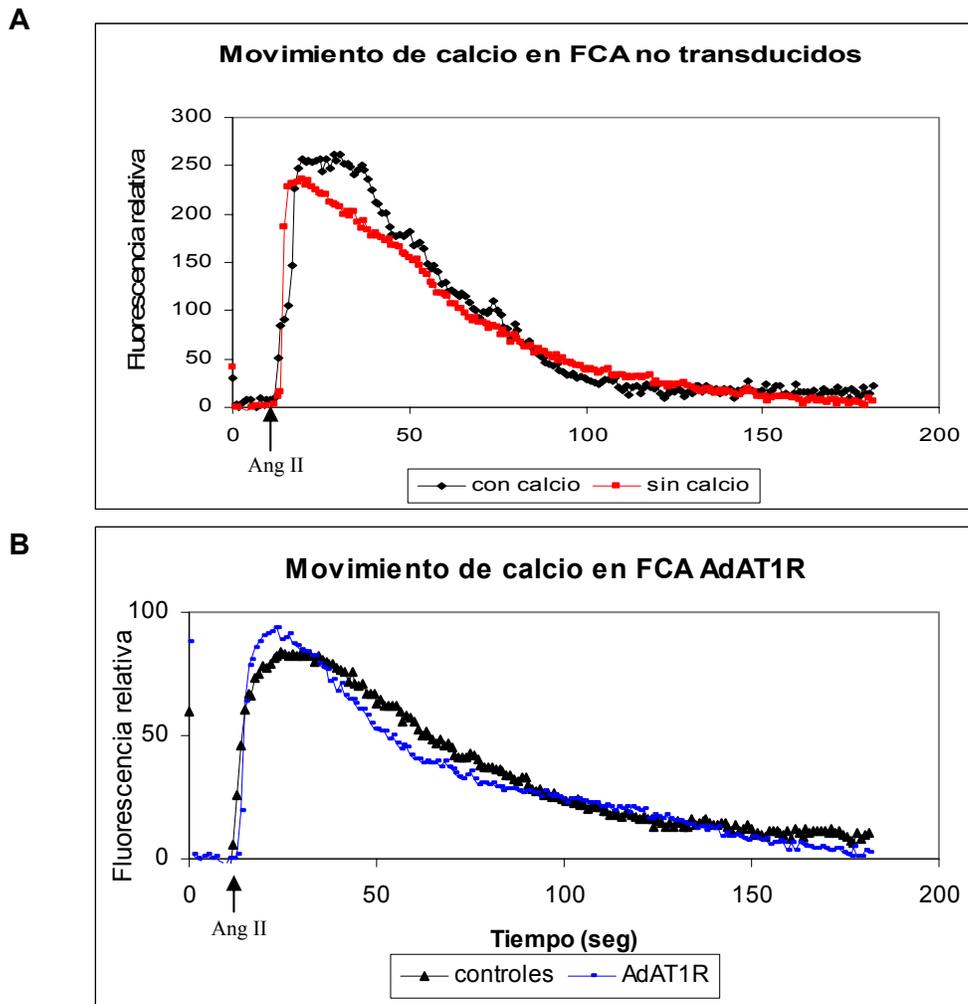
FCA sembrados en una densidad de  $3.2 \times 10^5$  cel/ placa de 35mm, fueron privados de suero y transducidos a un MOI de 300 con AdAT1R por 24h. Luego las células fueron estimuladas con Ang II 100nM por 24h en M199 para realizar los siguientes ensayos. Mediante WB se inmunodetectó ERK-p y ERK-t según se indica en materiales y métodos. C) Inhibición parcial con losartán 10uM en FCA AdAT1R. D) En panel superior se ve la inhibición total de ERK lograda con PD98059 en FCA AdAT1R a distintos tiempos. En el panel inferior se aprecia mediante microfotografía epifluorescente la pérdida de viabilidad en FCA AdAT1R pre-incubados con PD98059 y estimulados con Ang II por 24h.

## **6.7. Movimientos rápidos y transitorios de calcio en FCA AdAT1R estimulados con Ang II.**

Ang II mediante el receptor AT1 induce el aumento del calcio intracelular por la canónica vía transduccional proteína Gq-Fosfolipasa C-receptores de IP<sub>3</sub>. Por tanto, exploramos si existían diferencias en el comportamiento de los movimientos rápidos de calcio en FCA respecto a la condición de expresar AT1R. Para esto se registraron mediante microscopia confocal los cambios de fluorescencia inducidos por Ang II 100nM en FCA. Se observó que FCA transducidos con AdAT1R no presentaron diferencias en el patrón de movimiento de calcio inducido por Ang II, respecto a FCA no transducidos (Fig 7B). Este registro se realizó en presencia de calcio extracelular. Previamente demostramos que no existen diferencias en el movimiento de calcio inducido por Ang II en presencia o ausencia de calcio extracelular (Fig 7A). Está reportado que estímulos que conducen movimientos rápidos de calcio son precedidos por entradas tardías y mayores de este catión. Por tanto, evaluamos si la apoptosis de FCA AdAT1R dependía de la presencia o ausencia de calcio extracelular post estímulo. FCA AdAT1R fueron lavados y suplementados con medio de cultivo Gerard o Gerard conteniendo CaCl 2mM, para las condiciones con o sin calcio, respectivamente. Luego de 1h, estos fueron estimulados con Ang II 100 nM y su viabilidad fue evaluada, 24h post estímulo por bio-reducción de MTT. Se utilizó como control FCA AdAT1R en medio de cultivo M199 sin estimulación con Ang II. En estos ensayos se utilizó una curva de calibración interna, para referir las absorbancias a 570nm al número de células presentes en los pocillos. Como se observó en la figura 3B, Ang II disminuye el % de células viables luego de ser estimuladas en M199 (medio con calcio externo) en alrededor de un 50%. En este caso, el cambio de medio a Gerard condujo el aumento de la muerte celular, semejante al observado cuando este medio fue suplementado con CaCl 2mM (24% ± 2,6 y 26% ± 3,0 con y sin calcio, respectivamente), indicando que el calcio no posee efecto deletéreo sobre la viabilidad celular. Sorprendentemente, en la condición sin calcio externo, la estimulación con Ang II condujo una reducción del % de células muertas (3% ± 2,5), y la estimulación en este medio suplementado con calcio alcanza niveles similares de muerte celular (58% ± 8,4) (fig 7C) al observado en células

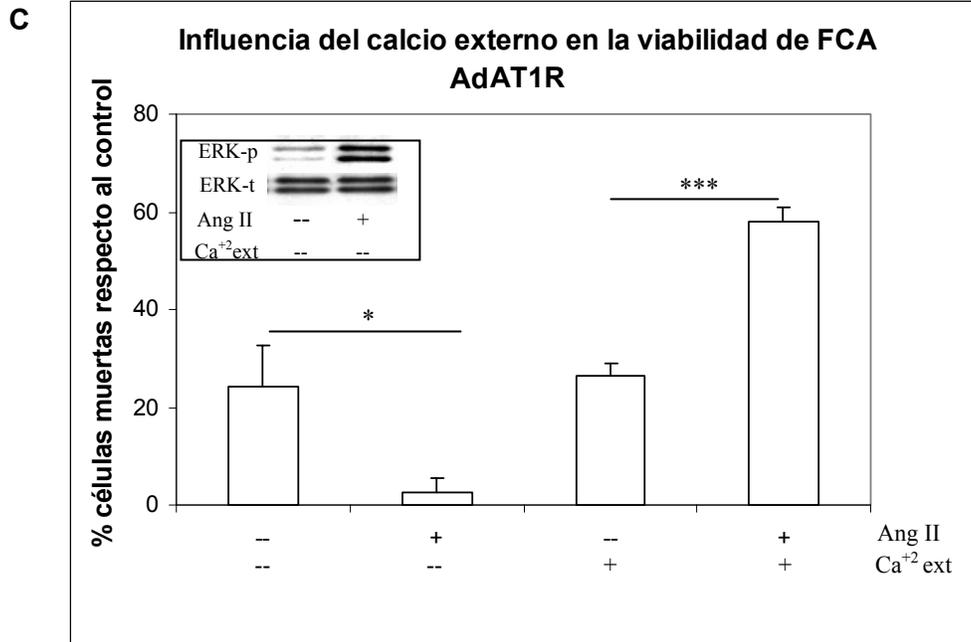
estimuladas con Ang II en M199 (Fig 3B). Además se observó que Ang II activó la vía ERK en ausencia de calcio externo (Fig 7C inserto).

**Figura 7. Movimientos rápidos y transitorios de calcio, y viabilidad en medio sin calcio en FCA AdAT1R estimulados con Ang II 100nM.**



**Fig 7 A y B. Movimientos rápidos y transitorios de calcio en FCA AdAT1R estimulados con Ang II 100nM.**

FCA sembrados en una densidad de  $1.8 \times 10^5$  cel/placa de 35mm y fueron privados de suero por 24h. Solo para (B) se utilizaron FCA transducidos con AdAT1R (moi 300). Previo a la estimulación, las células fueron lavadas e incubadas con los fluoróforos de calcio Fluo 3-AM por 30min (A) y Rhod-2 por 15min (B). Mediante microscopia confocal se apreció para (A) que las cinéticas de  $Ca^{+2}i$  posterior a la estimulación con Ang II 100nM eran similares tanto en un medio con o sin calcio externo. Del mismo modo en (B) se aprecia esta misma conducta tanto para FCA AdAT1R como no transfectados.



**Fig 7 C. Viabilidad de FCA AdAT1R en medio ausente de calcio estimulados con Ang II 100nM.**

FCA sembrados en una densidad de  $3.2 \times 10^5$  cel/placa de 35mm, fueron privados de suero, transducidos a un MOI de 300 con AdAT1R por 24h. Previo a la estimulación las células fueron lavadas e incubadas en tampón Gerard como se indica en materiales y métodos para evaluar el efecto del calcio externo en la viabilidad de FCA AdAT1R en presencia o no de Ang II. Se aprecia que en medio sin calcio externo, Ang II mejora la sobrevivencia celular respecto a su control no estimulado, sin embargo cuando este medio es suplementado con calcio externo 2mM, Ang II aumenta significativamente el porcentaje de células muertas. En el inserto de esta figura se muestra una inmunodetección para ERK de FCA AdAT1R en medio sin calcio externo y se observa que Ang II activa esta vía. Los resultados muestran la media  $\pm$  SEM para al menos tres experimentos independientes.

\*  $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$

## 7. DISCUSIÓN

Está establecido en la literatura el rol que Ang II tiene en el remodelamiento cardiaco <sup>31</sup>. Sin embargo, respecto a las manifestaciones celulares que se observan en este proceso, son aun materia de discusión si corresponden a acciones directas de este péptido sobre la célula o indirectas y por tanto, secundarias, adaptativas o paracrinas <sup>32</sup>.

Está reportado que la apoptosis de cultivos primarios de fibroblastos es dependiente del tejido desde donde se obtienen, siendo más resistente los cardiacos que los correspondientes de pulmón o piel a la muerte celular programada <sup>34</sup>. Así mismo se ha evaluado el efecto directo de la Ang II sobre fibroblastos cardiacos y se ha encontrado una respuesta mínima en términos hiperplásicos asociado a la activación por éste péptido de su receptor de tipo 1.

El octapéptido Ang II media las acciones fisiológicas del sistema renina – angiotensina, a través de sus 2 subtipos de receptores, especialmente mediante AT1. En muchos tejidos, el bajo número de estos receptores hace muy difícil estudiar la respuesta biológica a concentraciones fisiológicas de Ang II ( $10^{-11}$  -  $10^{-9}$  M), además en células en cultivo, se encuentra aún mas disminuido con respecto al tiempo y al número de pasaje. Por otro lado existen algunas condiciones patológicas donde estos receptores se sobre-expresan, como por ejemplo luego de un infarto agudo al miocardio para AT1R y en un estado de cardiomiopatía dilatada para el AT2R <sup>17</sup>. Es por esta razón que el objetivo del presente estudio es investigar el efecto sobre la viabilidad de fibroblastos cardiacos cuando se estimula con Ang II.

Para identificar si los cambios observados eran mediados por el receptor AT1 o AT2, los fibroblastos fueron transducidos con adenovirus de manera que sobre-expresaran de manera independiente cada uno de los subtipos de receptor. El receptor transfectado fue caracterizado mediante microscopia epifluorescente para detectar la co-expresión de GFP, inmunowestern blot para detectar el epitope HA presente en receptores transducidos tanto del subtipo 1 como 2, estudios de unión mediante radioligando y ensayos funcionales tras activación diferencial de vías de señales clásicas como ERK.

Como se demuestra en los resultados, la transducción adenoviral fue similar e independiente del subtipo de receptor al igual que aquellos que fueron transducidos con AdGFP, esto dado tanto por microfotografía epifluorescente como por el nivel de proteína inmunodetectada para estas tres condiciones (fig 1A). Además, mediante inmunodetección del epítopo HA se aprecia una amplia banda que va desde 200 hasta 36 kDa, concordante con lo demostrado por Deslauriers et al.<sup>33</sup> indicando que el receptor transducido tanto AT1R como AT2R, va sufriendo glicosilaciones necesarias para la migración y posterior expresión en la membrana celular (fig 1B).

El ensayo de radioligando indica que Ang II se une específicamente a los AT1R y AT2R, de manera saturable y reversible, esto determinado mediante el uso de antagonistas específicos para AT1R y AT2R (losartán y PD123319 respectivamente) los cuales bloquean la unión de Ang II en FCA transfectados (fig 2B). En este mismo sentido, se determinaron los parámetros farmacocinéticos para Ang II mediante ensayos de unión específica. Estos resultados indican que los receptores AT1 y AT2 tienen una constante de disociación de 6.7nM y 1.6nM respectivamente, además de una densidad de receptores de 0.03 pmoles/mg proteína y 0.47 pmoles/mg de proteína para AT1 y AT2, respectivamente, similar al descrito en otros reportes<sup>27,30</sup> (fig 2A).

Según lo planteado anteriormente, los resultados demuestran que los receptores fueron sobreexpresados exitosamente, puesto que se encuentra glicosilación de éstos<sup>33</sup>, localización en membrana, especificidad demostrada con el uso de antagonistas específicos para cada subtipo y su afinidad por el ligando concuerda con la literatura<sup>27,30</sup>.

La influencia de Ang II sobre la viabilidad es específica del tipo y del contexto celular. Se ha reportado que Ang II puede prevenir de la apoptosis a cardiomiocitos y células del músculo liso. En contraste se ha reportado que Ang II induce apoptosis células del epitelio alveolar, células endoteliales y células del músculo liso vascular. El mecanismo por el cual Ang II induce apoptosis en estas células no es bien comprendido, sin embargo se sabe que existe una participación directa de Ang II mediante los receptores AT1R y AT2R.

Sorprendentemente la estimulación con angiotensina II produjo una fuerte caída en la viabilidad en FCA mediante la activación del receptor subtipo AT1 (alrededor del 50% de células viables), no así en los transducidos AdAT2R o AdGFP los cuales no muestran diferencia significativas respecto al control (fig 3B). Además este resultado fue confirmado mediante microfotografía de contraste de fase, en la cual se observa claramente la disminución del % de células viables sólo para la condición FCA AdAT1R estimulados con Ang II 100nM por 24h (fig 3A). Este resultado es opuesto a lo comúnmente reportado, en donde Ang II induce proliferación celular por activación de este receptor<sup>35</sup>. Más aún, se ha reportado que la apoptosis mediada por Ang II ocurre mediante activación de AT2<sup>19</sup>, sin embargo, nuestros resultados indican que este receptor no está involucrado directamente en este fenómeno de muerte celular. Recientemente Der sarkissian et al<sup>36</sup> en un modelo experimental de hipertensión han demostrado que Ang II induce apoptosis en células no miocíticas, principalmente fibroblastos, el cual fue bloqueado por losartán, indicando la participación de receptores AT1 en este proceso, aunque hay que decir que el mecanismo por el cual los FCA sufren apoptosis mediante la activación del receptor AT1 aún no es bien conocido. Para confirmar que este fenómeno de muerte celular es dependiente de la activación del AT1R por Ang II, nosotros evaluamos el efecto en la viabilidad celular bloqueando el receptor AT1R con losartán. El bloqueo del AT1R suprimió totalmente la muerte del FCA AdAT1R estimulado con Ang II 100 nM por 24h (fig 3C), lo que indica que efectivamente este fenómeno requiere tanto de la activación de este receptor como de las vías transduccionales asociadas éste, las cuales serán discutidas más adelante.

Por otro lado, en este trabajo evaluamos si este fenómeno de muerte celular dependía del estadio de desarrollo de la célula, por lo que se comparó en términos de viabilidad a fibroblastos cardíacos neonatos y adultos transducidos AdGFP, AdAT1R y AdAT2R estimulados con Ang II 100nM por 12 y 24 horas. El resultado de este experimento indicó que ambos, FCN y FCA cuando son transducidos AdAT1R y estimulados con Ang II, presentan el mismo fenómeno de muerte con la diferencia que los FCN AdAT1R responden más tempranamente disminuyendo su viabilidad de

manera significativa a un tiempo de 12h v/s las 24h que tarda el FCA AdAT1R (fig 4 Ay B).

Con respecto a la pérdida de viabilidad celular mediada por la activación del receptor AT1, nuestros resultados confirman mediante microscopía de contraste de fase y epifluorescente la aparición de cuerpos apoptóticos (fig 5A) en FCA AdAT1R estimulados con Ang II 100nM por 24h, lo que nos sugiere que el principal tipo de muerte asociado a este fenómeno es apoptosis. Para confirmar lo planteado anteriormente, se evaluaron 2 parámetros característicos de este tipo de muerte tales como, activación de caspasa-3 en el tiempo y fragmentación ordenada de DNA. Estos resultados indican la presencia de caspasa-3 la que se activa a las 8h post-estímulo con Ang II 100 nM tal y como se muestra en la inmunodetección correspondiente a la figura 5B. Además, el DNA laddering muestra un bandeo típico de apoptosis sólo para la condición FCA AdAT1R estimulados con Ang II por 24h (fig 5C). Finalmente, y avalado en los resultados recién planteados, se puede asegurar que el mecanismo de muerte implicado en este fenómeno es apoptosis dependiente de la activación de caspasa-3.

A nuestro entender, el presente estudio es el primero que sugiere que Ang II a través de la activación del AT1R induce apoptosis en FCA, por lo tanto, intentamos dar una aproximación en cuanto a la cascada de transducción de señales involucrada en este fenómeno.

Los mecanismos transduccionales del AT1R han sido ampliamente estudiados, su activación implica entre otros, la fosforilación de ciertas proteínas, siendo clásica la ERK. Nosotros evaluamos la activación de esta MAPK y encontramos que en FCA AdAT1R existe una activación significativa luego de la estimulación con Ang II, esto sumado a la activación diferencial dependiendo del receptor sobre-expresado, puesto que para FCA AdAT2R estimulados con Ang II no se encontró tal fosforilación de ERK, lo cual es concordante con la literatura <sup>28</sup> (fig 6B). Estos datos inicialmente indicaron que los receptores transducidos eran funcionales, sin embargo, debido a las características de muerte presentadas tipo anoikis (apoptosis inducida por pérdida de adhesión a la matriz) y la relación demostrada por Chen et al <sup>29</sup> de éste fenómeno con

una activación prolongada de ERK evaluamos el comportamiento de esta fosforilación en cuanto a la dosis de Ang II y al tiempo de estímulo con Ang II. En este sentido, los resultados muestran una activación de ERK dosis independiente tipo *switch on/off* y prolongada de hasta al menos 8 horas (fig 6A). Para determinar si esta activación prolongada de ERK era la causal de la muerte de los FCA AdAT1R se intervino río arriba a la fosforilación de la ERK, inhibiendo a la MEK-1 con PD98059, sin embargo, si bien se logró inhibir totalmente los niveles de la proteína a distintos tiempos, mediante microfotografía epifluorescente se aprecia que esta condición por si sola no bastó para evitar la pérdida de viabilidad (fig 6D). Por otro lado, mediante inmunodetección apreciamos que losartán disminuyó parcialmente la activación de ERK (58,4% de inhibición) (fig 6C).

La unión de Ang II sobre los receptores AT1 en FCA activa la vía de señales dependientes de proteína Gq. Esta señalización incluye la activación de fosfolipasa C (PLC), producción de inositol fosfatos (IPs), movilización intracelular de  $Ca^{+2}$  y una consecuente activación de proteína quinasa C (PKC).

Nosotros demostramos que Ang II induce un incremento transitorio del calcio libre citosólico y una activación de la MAPK ERK de manera independiente de la dosis y por tiempos largos de al menos 8h (fig 6A). A pesar de que nuestros resultados muestran que Ang II induce un aumento en el calcio citosólico (fig 7 A y B), sólo podemos especular sobre el mecanismo involucrado en esta respuesta. En este sentido creemos que el  $Ca^{+2}$  almacenado en compartimentos intracelulares, principalmente por el retículo endoplásmico rugoso, es liberado a través de un mecanismo mediado por PLC.

Bajo nuestras condiciones experimentales, nosotros no encontramos apoptosis cuando los FCA fueron estimulados con Ang II en medio de cultivo libre de calcio (fig 7C), más aún, se aprecia una mejora en la sobrevivencia celular, que además se correlaciona con un aumento de la activación de ERK en estas condiciones experimentales (fig 7C inserto). Este resultado sugiere que un influjo excesivo y tardío de calcio desde el extracelular, puede modular la apoptosis en este modelo celular.

El mecanismo apoptótico dependiente de calcio es bien conocido. Elevados niveles de  $Ca^{+2}$  citosólico ha sido implicado en vías de muerte celular, y en este

sentido, se ha reportado que una sobrecarga de  $\text{Ca}^{+2}$  en la matriz mitocondrial produce la apertura del poro-PT, despolarización de la membrana mitocondrial, liberación del citocromo c y posterior activación de caspasas. Los experimentos descritos aquí proveen de evidencia que en presencia de calcio externo, Ang II a través del receptor AT1 puede llevar a las alteraciones mitocondriales planteadas anteriormente.

La estimulación con Ang II sobre FCA AdAT1R generó un pool de señales que involucran la vía ERK y movimientos de calcio, tanto rápidos y transitorios desde compartimientos intracelulares, como, un probable influjo tardío de este catión proveniente del medio extra-celular. Sorprendentemente este patrón de señales es divergente en su acción celular, siendo la vía ERK conducente a supervivencia y probablemente movimientos tardíos de calcio desde el extracelular los responsables de la muerte de fibroblastos cardíacos AdAT1R.

## 8. CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión adenoviral de los receptores de Ang II AT1 y AT2 en fibroblastos cardiacos de ratas adultas demostró ser específica, saturable y reversible.
2. Ang II indujo muerte celular tanto en fibroblastos cardiacos de ratas adultas como de neonatas que sólo sobre-expresaron AT1R. Esta muerte celular pudo ser bloqueada mediante la incubación con losartán, con lo que demostramos que este fenómeno requiere de la activación del receptor AT1R.
3. La muerte de los fibroblastos cardiacos de ratas adultas fue con características apoptóticas, evidenciado por activación de caspasa-3 y DNA laddering, este efecto fue mediado por la presencia de calcio en el medio externo, puesto que cuando no existía calcio en el medio de cultivo, no se apreció el fenómeno de muerte.
4. Ang II probablemente activó la vía clásica AT1R-PLC-IP3-Calcio intracelular produciendo un aumento rápido y transitorio de este catión tanto para FCA transducidos AdAT1R como no transducidos, manteniendo una cinética similar para ambas condiciones.
5. Ang II activó la vía transduccional MAPK-ERK 1/2 como un mecanismo de supervivencia, tanto a tiempos cortos como largos, pero que se ve sobrepasado a la hora de prevenir la muerte celular en un medio de cultivo con calcio externo. Por contraparte, en un medio ausente de calcio externo, la activación de ERK se correlaciona con aumento de la supervivencia de los FCA AdAT1R.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud, 55ª Asamblea Mundial de la Salud, A55/16, punto 13.11, 27 de Marzo de 2002.
2. Weber KT. Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertens*. 2004; 22(1):47-50.
3. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*. 2003; 200(4):500-503
4. Booz GW, Baker KM. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 1995; 30(4):537-543.
5. Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterization of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2005; 65(1):40-51
6. Mayorga M, Bahi N, Ballester M, Comella JX, Sanchis D. Bcl-2 is a key factor for cardiac fibroblast resistance to programmed cell death. *J Biol Chem*. 2004; 279(33):34882-9.
7. Sun Y, Weber KT. RAS and connective tissue in the heart. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35(6):919-31.
8. Helmy Siragy. Angiotensin II Receptors Blockers: Review of the Binding Characteristics. *Am J Cardiol*. 1999;84:3S-8S
9. Yunzeng Zou, Issei Komuro, Tsutomu Yamazaki, Sumiyo Kudoh, Ryuichi Aikawa, Weidong Zhu, Ichiro Shiojima, Yukio Hiroi, Kazuyuki Tobe, Takashi Kadowaki, Yoshio Yazaki Cell Type-Specific Angiotensin II-Evoked Signal Transduction Pathways. *Circ Res*. 1998;82:337-345.

10. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(3):415-72.
11. Eguchi S, Matsumoto T, Motley ED, Utsunomiya H, Inagami T. Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells: possible requirement of Gq-mediated p21ras activation coupled to a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-sensitive tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 1996;271: 14169–14175.
12. Inagami T, Eguchi S, Numaguchi K, Motley ED, Tang H, Matsumoto T, Yamakawa T. Cross-talk between angiotensin II receptors and the tyrosine kinases and phosphatases. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(suppl 11):S57–S61.
13. Ernesto L. Schiffrin. Vascular and Cardiac Benefits of Angiotensin Receptor Blockers. *Am J Med.* 2002;113: 409–418.
14. de Gasparo M, Levens N. Does blockade of angiotensin II receptors offer clinical benefits over inhibition of angiotensin-converting enzyme?. *Pharmacol Toxicol.* 1998;82:257–271.
15. Ohtani S, Fujiwara H, Hasegawa K, Doyama K, Inada T, Tanaka M, Fujiwara T, Sasayama S. Up-regulated expression of angiotensin II type 1 receptor gene in human pathologic hearts. *J Card Fail.* 1997; 3(4):303-10.
16. Strehlow K, Wassmann S, Bohm M, Nickenig G. Angiotensin AT1 receptor over-expression in hypercholesterolaemia. *Ann Med.* 2000;32(6):386-9.
17. Tsutsumi Y, Matsubara H, Ohkubo N, Mori Y, Nozawa Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Moriguchi Y, Shibasaki Y, Kamihata H, Inada M, Iwasaka T. Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with

interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ Res.* 1998; 83(10):1035-46.

18. Chen WS, Sim MK. Effects of des-aspartate-angiotensin I on the expression of angiotensin AT1 and AT2 receptors in ventricles of hypertrophic rat hearts. *Regul Pept.* 2004; 117(3):207-12.
19. Bin Tian. Angiotensin II modulates nitric oxide-induced cardiac fibroblast apoptosis by activation of AKT/PKB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285: H1105–H1112.
20. Goldenberg I, Grossman E, Jacobson KA, Shneyvays V, Shainberg A. Angiotensin II-induced apoptosis in rat cardiomyocyte culture: a possible role of AT1 and AT2 receptors. *J Hypertens.* 2001 Sep;19(9):1681-9.
21. Suzuki J, Iwai M, Nakagami H, Wu L, Chen R, Sugaya T, Hamada M, Hiwada K, Horiuchi M. Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT1 and AT2 receptors in neointimal formation. *Circulation.* 2002; 106(7):847-53.
22. Bodh I. Jugdutt and Vijayan Menon. AT2 receptor and apoptosis during AT1 receptor blockade in reperfused myocardial infarction in the rat. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2004; 262: 203–214.
23. Miura S, Karnik SS. Ligand-independent signals from angiotensin II type 2 receptor induce apoptosis. *EMBO J.* 2000;19(15):4026-35.
24. Li W, Ye Y, Fu B, Wang J, Yu L, Ichiki T, Inagami T, Ichikawa I, Chen X. Genetic deletion of AT2 receptor antagonizes angiotensin II-induced apoptosis in fibroblasts of the mouse embryo. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;250(1):72-6.

25. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Archives für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*. 1895;291-332.
26. Foncea, R. Andersson, M. Ketterman, A. Blakesley, V. Sapag-Hagar, M. Sugden, P. Lee Roith, D. Lavandero, S. Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 1997;31:19115-19124
26. Tokuda K, Kai H, Kuwahara F et al. Pressure-independent effects of angiotensin II on hypertensive myocardial fibrosis. *Hypertension*. 2004; 43:499-503.
27. Montiel M, Jiménez E. Characterization of angiotensin II receptors (binding and mRNA) in the rat thyroid gland. *Journal of Molecular Endocrinology* 1998; 20, 299–304.
28. Masatsugu Horiuchi, Wataru Hayashida et al. Stimulation of Different Subtypes of Angiotensin II Receptors, AT1 and AT2Receptors, Regulates STAT Activation by Negative Crosstalk. *Circ Res*. 1999; 84:876-882.
29. Chen CH, Wang WJ, Kuo JC et al. Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. *EMBO J*. 2005;24(2):294-304.
30. Modrall JG, Nanamori M, Sadoshima J et al. ANG II type 1 receptor downregulation does not require receptor endocytosis or G protein coupling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281:801-809.
31. Dostal DE, Baker KM. Angiotensin-II Stimulation of Left-Ventricular Hypertrophy in Adult-Rat Heart - Mediation by the At1 Receptor. *American Journal of Hypertension*. 1992;5:276-280

32. Booz GW, Dostal DE, Baker KM. Paracrine actions of cardiac fibroblasts on cardiomyocytes: Implications for the cardiac renin-angiotensin system. *American Journal of Cardiology*. 1999;83:44H-47H
33. Deslauriers B, Ponce C et al. N-glycosylation requirements for the AT1a angiotensin II receptor delivery to the plasma membrane. *Biochem J*. 1999;339:397-405.
34. Mayorga M, Bahi N et al. Bcl-2 Is a Key Factor for Cardiac Fibroblast Resistance to Programmed Cell Death. *J Biol Chem*. 2004;279(33):34882-34889.
35. Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ res*. 1993;73(3):413-23.
36. Marchand E, Der Sarkissian S et el. Caspase-Dependent Cell Death Mediates the Early Phase of Aortic Hypertrophy Regression in Losartan-Treated Spontaneously Hypertensive Rats. *Circ Res*. 2003;92;777-784.
37. Ito M, Oliverio MI, Mannon PJ et al. Regulation of Blood-Pressure by the Type 1A Angiotensin-II Receptor Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92:3521-3525.

