



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

**APOPTOSIS DEPENDIENTE DE ANGIOTENSINA II EN FIBROBLASTOS CARDIACOS
QUE SOBRESPRESAN EL RECEPTOR AT1: PARTICIPACION DE FOSFOLIPASA C Y
PROTEINAKINASA C**

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

RAUL FABIAN VIVAR SANCHEZ

Patrocinante : Dr. Guillermo Díaz-Araya.

Directores de tesis : Dr. Guillermo Díaz-Araya.

Dr. Sergio Lavandero.

Santiago, Chile 2007

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer profundamente la oportunidad y el apoyo del profe Guillermo, además de permitirme conocer la investigación científica me demostró que la perseverancia es muy importante. También es este mismo sentido mis sinceros agradecimientos al profe Sergio por la oportunidad brindada, y a ambos profes por la paciencia cuando las cosas no resultaban.

Este trabajo no pudo haberse realizado sin el amor y cariño que me brindó y me seguirá brindando mi familia, tanto mis padres Raúl y Silvia (Topi y Mita) y a mis hermanos Tefa (mu) y Sebita (per), sin olvidarme por supuesto de mi hermana mayor Nataly, mis abuelos y mi tía Margarita que aunque de lejos, su apoyo y cariño, fue y será muy importante para mí. Una persona muy trascendental, no sólo para este trabajo sino que también para mi vida ha sido y será por siempre mi polola catita, mi mulita, a la cual le debo muchas cosas, pero sobre todo, muchas gracias por su tiempo, su alegría, su paciencia y su gran apoyo tanto en los momentos buenos como los malos. No puedo dejar de mencionar a mi segunda familia (la familia de mi polola) por los momentos dados y la gran integración que me han demostrado en todo este tiempo (casi 8 años).

Finalmente me queda por agradecer a dos sectores muy importantes para mí. En primer lugar a mis amigos de la universidad y espero que por más tiempo también, Carlos, Ass, Piero, Mabel, Cuba, Chica, Kike, Pablo, a todos le agradezco por igual, sobre todo por los momentos de esparcimiento, ya que no puedo agradecer los momentos de estudio juntos (siempre estudie solo, jajaja...). En segundo lugar tengo que agradecer a la gente del laboratorio de "cardios", a todos por supuesto, pero sobre todo a JP, Pancho, Laucha, Profe Mario y Clarita por las enseñanzas y el tiempo que me brindaron, además no puedo dejar de mencionar a Fidel, Pame y Ceci, ya que sin ellos no podría haber realizado ninguno de los experimentos de esta tesis. Para finalizar debo nombrar a mis compañeros "fibros", Miguel, Pablo, Pancha Alan, Smolic y Cote, que sinceramente más que compañeros los considero mis amigos, gracias por los momentos compartidos y dar un ambiente muy agradable al laboratorio.

Y sólo me gustaría pedirles a todos que sigan de igual forma y me sigan apoyando en esta nueva etapa que se me presenta....MUCHAS GRACIAS A TODOS

INDICE GENERAL

	Página
INDICE GENERAL.....	3
INDICE DE FIGURAS.....	6
ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	10
1. INTRODUCCION.....	11
1.1. Generalidades.....	11
1.2. Corazón.....	11
1.2.1. Fibroblastos cardiacos.....	11
1.2.2. Miofibroblastos cardiacos.....	12
1.3. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA).....	13
1.3.1. Angiotensina II.....	13
1.3.2. Receptores de Angiotensina II.....	13
1.3.3. Sobreexpresión adenoviral de receptores.....	14
1.4. Apoptosis.....	15
1.5. Efecto de Ang II sobre la apoptosis de los fibroblastos cardiacos.....	16
2. HIPOTESIS.....	18
3. OBJETIVO GENERAL.....	18
4. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	18
5. MATERIALES Y METODOS.....	19
5.1. Reactivos.....	19
5.2. Modelo animal.....	19
5.3. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardiacos ventriculares de rata neonata.....	19
5.4. Desdiferenciación a miofibroblastos.....	20
5.5. Transducción adenoviral.....	20
5.5.1. Determinación de la multiplicidad de infección por microscopia de fluorescencia.....	20

5.5.2.	Determinación multiplicitad de infección por citometría de flujo.....	20
5.6.	Preparación de extractos celulares totales.....	21
5.7.	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	21
5.8.	Electrotransferencia de proteínas.....	21
5.9.	Western blot.....	21
5.10.	Viabilidad celular.....	22
5.10.1.	Viabilidad celular por MTT.....	22
5.10.2.	Muerte Celular por citometría de flujo.....	23
5.11.	Pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\psi$).....	23
5.12.	Cuantificación de la fragmentación del ADN mediante yoduro de propidio (PI).....	24
5.13.	Análisis estadístico.....	24
6.	RESULTADOS.....	25
6.1.	Caracterización de la transducción con AdAT ₁ R de fibroblastos (FCN) y miofibroblastos (MCN) cardiacos de ratas neonatas.....	25
6.2.	Efectos de Ang II sobre el FCN.....	26
6.2.1.	Efectos de Ang II sobre la muerte de FCN.....	26
6.2.2.	Determinación de la apoptosis del FCN-AdAT1R por Ang II.....	28
6.2.3.	Determinación de la integridad del potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\psi$) en FCN-AdAT1R.....	29
6.2.4.	Activación de la Caspasa 3 en FCN-AdAT1R por Ang II.....	30
6.2.5.	Determinación de los niveles de las proteínas Bcl-2 y Bax en FCN-AdAT1R.....	31
6.3.	Participación de la vía AT1R-PLC-PKC en los efectos inducidos por Ang II sobre los FCN-AdAT1R.....	33
6.3.1.	Ang II modula la muerte de FCN-AdAT1R, vía AT1R-PLC-PKC.....	33
6.3.2.	Ang II induce apoptosis del FCN-AdAT1R, vía AT1R-PLC-PKC.....	35
6.3.3.	Ang II ocasiona la pérdida del $m\Delta\psi$ en FCN-AdAT1R, vía AT1R-PLC-PKC.....	36
6.3.4.	Ang II activa la Caspasa 3 vía AT1R-PLC-PKC, en FCN-AdAT1R.....	38
6.3.5.	Ang II modula los niveles de las proteínas Bcl-2 y Bax por la vía AT1R-PLC-PKC en FCN-AdAT1R.....	39
6.4.	Efecto de Ang II sobre el MCN-AdAT1R.	41
6.4.1.	Efecto de Ang II sobre la muerte del MCN-Ad-AT1R.....	41

6.4.2. Efecto apoptótico de Ang II sobre el MCN-AdAT1R.....	44
6.4.3. Efecto sobre los niveles de las proteínas Bcl-2 y Bax por Ang II, en el MCN-AdAT1R.....	45
6.5. Efecto de TGF- β_1 en la viabilidad de los FCN-AdAT1R estimulados con Ang II.	46
7. DISCUSION.....	48
7.1. Efecto de Ang II sobre la muerte de FCN-AdAT1R.....	48
7.2. Ang II gatilla apoptosis del FCN-AdAT1R.....	49
7.3. Ang II induce la caída del potencial de membrana mitocondrial en FCN-AdAT1R.....	50
7.4. Ang II activa la vía de la caspasa 3.....	51
7.5. Participación de la vía AT1R-PLC-PKC en la apoptosis inducida por Ang II en FCN-AdAT1R.....	51
7.6. Efecto de Ang II en la muerte del MCN-AdAT1R.....	53
8. CONCLUSIONES.....	56
9. BIBLIOGRAFÍA.....	57

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transducción del AdAT1R en FCN y MCN.	25
Figura 2 Muerte celular por Ang II 100 nM de forma tiempo dependiente en los FCN-AdAT1R.	27
Figura 3 Apoptosis del FCN-AdAT1R por Ang II.....	28.
Figura 4 Pérdida del $m\Delta\psi$ en FCN-AdAT1R estimulados con Ang II.....	29
Figura 5 Activación de la Caspasa 3 en FCN-AdAT1R por Ang II.	30
Figura 6. Determinación de los niveles de las proteínas Bcl-2 y Bax.....	32
Figura 7 Inhibición de la muerte del FCN-AdAT1R inducida por Ang II, al bloquear la vía AT1R-PLC-PKC.	34
Figura 8 Inhibición de la apoptosis del FCN-AdAT1R inducida por Ang II, al bloquear la vía AT1R-PLC-PKC.	35
Figura 9. Inhibición de la pérdida del $m\Delta\psi$ en FCN-AdAT1R inducida por Ang II al bloquear la vía, AT1R-PLC-PKC.	37
Figura 10 Efecto inhibitorio, sobre la fragmentación de Caspasa 3 inducida por Ang II, al bloquear la vía, AT1-PLC-PKC.	38
Figura 11. Efecto inhibitorio, sobre los cambios en los niveles de las proteínas Bcl-2 y Bax inducido por Ang II, en FCN-AdAT1R, al bloquear la vía AT1-PLC-PKC.....	39
Figura 12. Efecto de Ang II sobre la muerte del MCN-AdAT1R y la participación de la vía AT1R-PLC-PKC.....	42
Figura 13. Apoptosis del MCN-AdAT1R por Ang II.....	44
.	
Figura 14. Efecto de Ang II sobre los niveles MCN de las proteínas Bcl-2 y Bax, en MCN-AdAT1R.....	45
Figura 15. Efecto de TGF- β en la viabilidad de los FCN-AdAT1R y estimulados con Ang II.	47

ABREVIATURAS

α -SMA	: Alfa actina de músculo liso
AdAT ₁ R	: Adenovirus receptor AT ₁
AdAT ₂ R	: Adenovirus receptor AT ₂
Ang II	: Angiotensina II
APS	: Persulfato de amonio
AT ₁ R	: Receptor de angiotensina II subtipo 1
AT ₂ R	: Receptor de angiotensina II subtipo 2
Bax	: Proteína proapoptótica de la familia Bcl-2
BSA	: Albúmina de suero de bovino
Bcl-2	: Proteína Antiapoptótica de la familia Bcl-2
Ca ⁺²	: Calcio
CitC	: Citocromo C
cm	: Centímetro
CMV	: Citomegalovirus
csp	: cantidad suficiente para
DMSO	: Dimetil sulfóxido
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético
EGTA	: Ácido etilén glicol-bis(γ -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetracético
FBS	: Suero fetal de bovino
FCN	: Fibroblastos cardiacos neonatos
FCN-AdAT ₁ R	: Fibroblasto cardiaco neonato transducido con AdAT ₁ R
Fig	: Figura
GFP	: Proteína fluorescente verde
h	: Hora
HA	: Hemaglutinina
HEPES	: Acido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfónico
JNK	: Kinasa N-terminal de <i>c-Jun</i>
kDa	: Kilo dalton
Los	: Losartán
MAPK	: Proteína quinasa activada por mitógenos
MCN	: Miofibroblasto cardiaco neonato
MCN-AdAT ₁ R	: Miofibroblasto cardiaco neonato transducido con AdAT ₁ R
MEC	: Matriz extracelular
min	: Minuto
mg	: Miligramo
mL	: Mililitro
mM	: Milimolar
mm	: Milímetro
MOI	: Multiplicidad de infección
MTT	: Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio
NaCl	: Cloruro de Sodio
NaOH	: Hidróxido de sodio
Na ₃ VO ₄	: Ortovanadato de sodio
nm	: nanómetros
nM	: nanomolar
nmoles	: nanomoles
PBS	: Tampón fosfato salino

PLC	: Fosfolipasa C
pmoles	: picomoles
PMSF	: Fenilmetilsulfonifluoruro
PKC	: Proteína kinasa C
p/v	: Porcentaje peso volumen
rpm	: Revoluciones por minuto
s	: Segundos
SD	: Desviación estándar
SDS	: Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	: Gel de poliacrilamida desnaturalante
SEM	: Error estándar de la media
TBS	: Tampón tris salino
TCA	: Acido tricloroacético
TGF- β_1	: Factor de crecimiento transformante beta 1
TEMED	: <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etilendiamina
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminoetano
μg	: Microgramo
μl	: Microlitro
μM	: Micromolar
μm	: Micrómetro
vs	: Versus
v/v	: Porcentaje volumen volumen
WB	: Western blot

RESUMEN

Los fibroblastos cardiacos son los mayores responsables de la secreción y renovación de la matriz extracelular (MEC). Por otro lado, bajo condiciones patológicas como en el post-infarto al miocardio, los fibroblastos cardiacos se diferencian a miofibroblastos, células con un fenotipo mucho más activo en cuanto a la producción de la MEC, además ambos elementos celulares son claves en el desarrollo del remodelamiento cardiaco después de un infarto agudo al miocardio. Una regulación controlada en el crecimiento de la población de fibroblastos y miofibroblastos es importante para una correcta cicatrización y mantención de la función cardiaca.

Uno de los mayores reguladores de la población cardiaca es el Sistema Renina-Angiotensina (RAS) y se ha reportado que en una situación post-infarto este sistema se encuentra sobre-activado, específicamente la enzima convertidora de angiotensina y el receptor subtipo AT1 de angiotensina (AT1R). Nuestro modelo experimental consideró sobreexpresar el AT1R en ambos tipos celulares con el uso de adenovirus y evaluar si angiotensina II (Ang II) modula la viabilidad celular. Nuestros resultados demuestran que la estimulación con Ang II conduce a una masiva muerte del fibroblasto cardiaco neonato que sobreexpresa el AT1R (FCN-AdAT1R) de una manera tiempo-dependiente. Ang II gatilla la apoptosis por la vía mitocondrial, promoviendo el aumento de los niveles de Bax, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\psi$) y la fragmentación de la caspasa 3. Los efectos producidos por Ang II sobre los FCN-AdAT1R fueron bloqueados por Losartan (antagonista específico AT1R) y por los inhibidores de la vía de la fosfolipasa C - proteínkinasa C (PLC-PKC), U73122 y Gö6976, respectivamente. Por otra parte, los miofibroblastos cardiacos neonatos que sobreexpresan el AT1R (MCN-AdAT1R), fueron menos propensos que los FCN-AdAT1R a los efectos inducidos por Ang II, en cuanto a muerte celular, apoptosis y aumentos en los niveles de Bax. La diferente sensibilidad a la apoptosis producida por Ang II por parte de los MCN-AdAT1R se debió en parte al cambio del fenotipo celular

Nuestros resultados demuestran que Ang II ocasiona apoptosis del FCN-AdAT1R por la vía AT1R-PLC-PKC y que esta depende de la vía mitocondrial.

SUMMARY

Angiotensin II trigger apoptosis on cardiac fibroblast that overexpressing the angiotensin type 1 receptor: Phospholipase C- Protein kinase C pathway participation.

The cardiac fibroblasts are main cells involved in secretion and turnover to extracellular matrix protein (ECM). Under pathological conditions characterized by inflammation, as in myocardial infarction, they are differentiated to cardiac myofibroblast, which are cells with a more active phenotype, producing higher ECM protein. Both cellular types are key elements in the development of cardiac remodeling after myocardial infarction. A tight regulation of fibroblast and myofibroblast growth is important to correct wound healing and maintain cardiac function.

Renin-angiotensin-system (RAS) is the most important regulator of cardiovascular system, and have been reported that after myocardial infarction the RAS is up-regulated, specifically angiotensin converting enzyme (ACE) and angiotensin type 1 receptor (AT1R). In our experimental model using adenovirus to overexpress the AT1R in cardiac fibroblast (FCN-AT1R), we evaluated the Ang II effects on cell viability. Our results show that Ang II triggers FCN-AdAT1R death, in a time-dependent manner. The death cell produced for Ang II in our model was apoptosis by mitochondrial pathway, through an increase Bax expression, loss of mitochondrial membrane potential ($m\Delta\psi$) and caspase 3 activation. These effects were blocked by Losartan (specific antagonist of AT1R) and by phospholipase C-protein kinase C (PLC-PKC) inhibitors, U73122 and Gö6976 respectively. For other hand, cardiac myofibroblast that overexpressing AT1R (MCN-AdAT1R) were less sensible than FCN-AdAT1R to effect of Ang II on death cell, apoptosis and expression of Bax. The different sensibility to apoptosis Ang II-induced was due to the different phenotype.

Our results show that Ang II triggers apoptosis of FCN-AdAT1R by AT1R-PLC-PKC pathway through mitochondrial disruption.

1. INTRODUCCION

1.1. Generalidades

En Chile, y también a nivel mundial, la mortalidad por patologías cardiovasculares corresponde aproximadamente al 25% del total(1). Las estimaciones futuras indican que para el año 2020 esas enfermedades serán la causa del 35% de las defunciones. Por este motivo, resulta de gran trascendencia investigar tanto a nivel clínico como básico las causalidades de estas patologías con el fin de disminuir esas estimaciones(2).

1.2. Corazón

La mayoría de las patologías cardiovasculares se localizan en el corazón. En este órgano la población celular está compuesta principalmente de cardiomiocitos (30% en número y 70% en masa) y por células no musculares (fibroblastos, células endoteliales, células del músculo liso vascular, macrófagos residentes, mastocitos, etc), que corresponden aproximadamente al 30% en masa y 70% en número de células cardiacas. De esta población celular la mayoría son fibroblastos cardiacos(3).

1.2.1. Fibroblastos cardiacos

Inicialmente se pensó que los fibroblastos cardiacos tenían una función meramente estructural. Sin embargo, hoy se sabe que son un elemento celular muy activo, pues ellos poseen una amplia variedad de receptores, y secretan diversos factores de crecimiento y citoquinas, los que pueden actuar en forma autocrina y/o paracrina. Además son blanco para una amplia variedad de estímulos tanto mecánicos como químicos(4), mediante los cuales pueden migrar, proliferar y diferenciarse a un fenotipo mucho más activo(5). En condiciones normales, la principal función del fibroblasto es producir y secretar proteínas de la matriz extracelular (MEC), principalmente colágeno y fibronectina, las que forman la matriz tridimensional que sustenta a los cardiomiocitos y vasos sanguíneos. En estados patológicos o de daño tisular, ellos participan activamente en el proceso de cicatrización(3,6). Otro hecho importante es la gran interacción que existe entre los fibroblastos y los cardiomiocitos. Por ejemplo, los factores de crecimiento liberados desde el cardiomiocito por estiramiento mecánico, actúan sobre el fibroblasto induciendo su

proliferación y síntesis de colágeno. Por otro lado, el fibroblasto secreta Angiotensina II (Ang II) y endotelina 1 las que en forma paracrina inducen la hipertrofia del cardiomiocito(3). Una última e importante característica del fibroblasto cardiaco es su capacidad de diferenciarse a un fenotipo más activo denominado miofibroblasto. Bajo condiciones patológicas como un infarto miocárdico o sobrecarga de volumen, se liberan al medio intersticial mediadores tanto paracrinos como autocrinos como el factor de crecimiento transformante subtipo beta 1 (TGF- β_1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento análogo a la insulina tipo II (IGF-II) y la interleuquina-4 (IL-4), los que estimulan la proliferación del fibroblasto cardiaco y su diferenciación a miofibroblasto(7).

1.2.2. Miofibroblastos cardiacos

El miofibroblasto posee una amplia variedad de receptores, además secreta diversos factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, mediadores de inflamación y proteínas de la matriz extracelular, los que actúan en forma paracrina y autocrina(7). Este fenotipo celular tiene como principal característica la presencia de microfilamentos citoplasmáticos formados por diferentes tipos de proteínas, siendo una de ellas la α -actina de músculo liso (α -SMA)(8). Esta proteína es uno de los principales marcadores del fenotipo del miofibroblasto. Este tipo celular que no es un residente normal del tejido cardiaco también se caracteriza por una secreción disminuida de metaloproteasas de matriz (MMPs) y aumento en la producción de proteínas de la matriz extracelular, lo que se traduce finalmente en un aumento en el tejido fibrótico(9). La principal función de estas células es la reparación tisular (cicatrización) después de la injuria o daño tisular, como un infarto cardiaco.

Comparativamente, los fibroblastos manifiestan un comportamiento celular (proliferación, adhesión, migración y contracción de geles de colágeno) y de secreción de proteínas de la MEC totalmente diferente a los miofibroblastos, siendo mas efectivos en proliferación y migración, mientras que los miofibroblastos presentan mayor adhesión y secreción de proteínas de la MEC.

1.3. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)

SRAA es uno de los principales sistemas neurohumorales que regulan el tamaño de la población celular cardiaca, siendo la Ang II su principal efector(10). A nivel celular, tanto en corazón (cardiomiocitos, fibroblastos, células endoteliales) como extra-cardiacos (fibroblasto de piel y pulmón, células del glomérulo renal), Ang II regula la contracción, crecimiento, apoptosis, diferenciación celular, migración y depósito de proteínas de la MEC. Además, Ang II estimula la síntesis y secreción de otros factores de crecimiento, agentes vasoconstrictores y transactiva otros tipos de receptores de factores de crecimiento, estos efectos de Ang II se han observado en la mayoría de las células del tejido cardiaco, tanto en células del músculo liso vascular como en fibroblastos(10-14).

1.3.1. Angiotensina II

La principal función de Ang II es su acción vasopresora en respuesta a la caída de la volemia o de presión arterial(13). Su administración crónica, aún en dosis sub-presoras conduce al remodelamiento cardiaco manifestado por la disminución del número y la hipertrofia de los cardiomiocitos(6), en el aumento del depósito de colágeno y en la hiperplasia de los fibroblastos. Por otro lado, la administración de antagonistas del receptor de Ang II del subtipo AT1, como Losartan, o inhibidores de la enzima convertidora de Ang II (ECA), como Lisinopril, a estas células de origen cardiaco, conducen a una supresión y la consiguiente mejora de los parámetros celulares antes mencionados(15-18).

1.3.2. Receptores de Ang II

Ang II Interactúa con dos tipos distintos de receptores acoplados a proteínas G, denominados receptores subtipos AT1 (AT1R) y AT2 (AT2R)(19). En el corazón, AT1R se expresa en cardiomiocitos y fibroblastos(20), y la mayoría de las acciones de la Ang II son mediadas por este receptor. Aunque, AT2R también se expresa en corazón, participa en el desarrollo fetal y desaparece prontamente después del nacimiento(21). 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^{2+} , mientras que inhibe a la adenilato ciclasa(19,21). Adicionalmente 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 son responsables de los efectos mitogénicos de Ang II(22). 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(23). Tanto en corazones humanos como modelos experimentales de infarto al miocardio, se ha encontrado un aumento en los niveles de expresión del receptor AT1R(24). Por otro lado, se ha encontrado que después de un infarto cardiaco, en la cicatriz del infarto existe una alta densidad y actividad de ECA(15), así como también una elevada expresión de AT1R. Estos hallazgos son paralelos a la presencia de miofibroblastos en esa zona, indicando que estos tipos celulares tienen una elevada actividad del SRAA(25). Por otro lado, Campbell y Katwa mostraron que Ang II induce la expresión de TGF- β_1 (mRNA y proteína) en cultivos de miofibroblastos mediado primariamente por el AT1R, sugiriendo que Ang II estimula la formación de tejido fibrótico a través de la sobreproducción de TGF- β_1 (15).

1.3.3. Sobreexpresión de receptores

La disponibilidad de adenovirus que nos permiten sobreexpresar una proteína de interés en cultivos celulares, ha sido una herramienta muy útil para estudiar los efectos y mecanismos implicados de diversos estímulos en células que sobreexpresan dichas proteínas. La sobreexpresión ectópica de AT1R en fibroblastos y miofibroblastos se ha orientado a estudiar los efectos de Ang II sobre el equilibrio viabilidad / muerte celular. Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que la sobreexpresión adenoviral de ambos tipos de receptores de Ang II (AT1R ó AT2R) tiene efectos distintos según el tipo celular, y la magnitud del mismo puede también ser diferente. Por un lado, la sobreexpresión de AT1R en los FCN conduce a su muerte, de una manera tiempo y concentración dependiente; mientras que en miofibroblastos este efecto fue de menos magnitud. En cambio, Ang II no indujo cambios en la viabilidad celular cuando se sobreexpresó el receptor AT2R (26). Sin embargo, aún no se ha estudiado cuál es la forma de muerte que afecta al fibroblasto cardiaco cuando se estimula con Ang II, y cuáles son las vías de señalización intracelular implicadas en esos mecanismos.

1.4. Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular que se utiliza para remover células dañadas o infectadas, es importante en el desarrollo normal de todo organismo. Tanto su exceso (p.e. en neurodegeneración e insuficiencia cardiaca) como la ausencia (p.e. en cáncer), repercuten negativamente en la vida(27). Las características más importantes de la apoptosis son contracción del volumen intracelular, formación de “blebs” en la membrana plasmática, mantención de la integridad de los organelos celulares y condensación y fragmentación del ADN(28,29). La apoptosis se clasifica según su vía de ejecución en dos distintos tipos. La vía extrínseca es mediada por los receptores de muerte, entre ellos TNFR y CD95 y su activación por sus respectivos ligandos, TNF y CD95L, conduce a la activación de la caspasa 8 y posteriormente a la activación de la caspasa 3 y por otro, a la amplificación del efecto a través de la mitocondria, estos hechos finalmente conducen a la muerte celular por apoptosis(27,29). Por otro lado, en la vía apoptótica intrínseca uno de los principales organelos afectados es la mitocondria, cuando ésta sensa una injuria que sobrepase un umbral característico en el potencial mitocondrial de membrana, esto puede conducir a la apertura del poro de transición de la permeabilidad y finalmente a la liberación de factores proapoptóticos, como el citocromo C y Smac/DIABLO(30). La liberación de estos factores proapoptóticos por disrupción mitocondrial activan una cascada de señales que llevan a la activación de las proteasas de serina, siendo una de las más importantes la caspasa 3, que es la responsable de los eventos consecutivos río abajo en la maquinaria apoptótica. En este sentido, en el fibroblasto cardiaco de rata neonata, la estimulación con etopósido o estaurosporina, gatilla la liberación mitocondrial de factores proapoptóticos y activación de la caspasa 3, lo que llevó finalmente a una masiva apoptosis(31).

Existe mucha evidencia que avala el papel que cumplen las proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2 en la regulación de la apoptosis en varios tipos celulares(32). Dos proteínas claves en la regulación de la apoptosis son las anti o proapoptóticas Bcl-2 y Bax, respectivamente. Según los datos aportados por Mayorga et al. en los fibroblastos cardiacos la razón Bax/Bcl-2 es menor que sus símiles de piel y pulmón, por lo tanto éstos son más resistentes a la apoptosis inducida por fármacos proapoptóticos debido a la mayor expresión de Bcl-2. En tanto la sobreexpresión adenoviral de Bax, lleva a una marcada apoptosis(31). Además la estimulación de fibroblastos cardiacos por citoquinas tipo IL-1, lleva a la apoptosis por la sobreproducción de radicales libres y el consecuente

aumento en Bax sin cambios en los niveles de las proteínas antiapoptóticas(33). Por otro lado, la estimulación por Ang II del cardiomiocito de rata adulta, vía el AT1R, aumenta los niveles de radicales libres, llevando a la activación de p53 y al aumento en la expresión de Bax, sin afectar a Bcl-2, provocando apoptosis(34). Estos datos en conjunto dan cuenta de la capacidad apoptótica de Ang II, que es controlada por el balance entre la proteína Bax y Bcl-2.

1.5. Efecto de Ang II sobre la apoptosis del fibroblasto cardiaco

Mucho se sabe ya del efecto proliferativo y profibrótico de la Ang II sobre el fibroblasto cardiaco. Sin embargo, no hay información disponible de los efectos de Ang II sobre la viabilidad celular en condiciones de sobreexpresión de sus receptores. Aunque existe evidencia acerca del efecto deletéreo de Ang II sobre algunos tipos celulares cardiacos. Estos efectos proapoptóticos de Ang II son producidos por ambos tipos de receptores, AT1R y AT2R, pero dependientes del tipo celular. En el corazón, Ang II induce apoptosis del cardiomiocito a través de la activación de ambos tipos de receptores(35). 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 AT1, específicamente en el proceso de formación de la neointima(36). Por otro lado, Jugdutt et al, han indicado que la apoptosis del cardiomiocito es mediada por receptores tipo AT1 y no por tipo AT2(37). Sin embargo, se ha reportado que la activación del AT1R por Ang II conduce a la producción de ROS, llevando a la apoptosis del cardiomiocito, siendo este efecto revertido por el tratamiento con antagonistas AT1R(34). Además, también se ha observado que la sobreproducción de radicales libres, por la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) ocasiona muerte por apoptosis del fibroblasto cardiaco(33). Resultados obtenidos por nuestro laboratorio indican que la muerte del fibroblasto cardiaco de rata adulta que sobreexpresa el AT1R es de tipo apoptótica, evidenciada por activación de caspasa-3 y fragmentación del ADN(38). Sin embargo, no se ha caracterizado cuál vía de transducción está implicada en esos eventos de muerte. Resulta también interesante determinar si existen diferencias entre fibroblastos y miofibroblastos, que expliquen, la mayor resistencia a la muerte por parte de este último

Con los antecedentes anteriormente expuestos, resulta claro que aún hay preguntas pendientes, que necesitan ser aclaradas. Aún no está claro si la muerte, tanto del

fibroblasto cardiaco como el miofibroblasto que sobreexpresan el AT₁R, es por apoptosis y cuáles son los mecanismos que la gatillan.

2. HIPOTESIS

Ang II gatilla la vía intrínseca de la apoptosis en el fibroblasto cardiaco por un mecanismo dependiente de la vía AT1R-Fosfolipasa C-Proteínkinasa C.

3. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que Ang II gatilla la vía intrínseca de la apoptosis en el fibroblasto cardiaco por un mecanismo dependiente de la vía AT1R-Fosfolipasa C-Proteínkinasa C.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Demostrar que Ang II induce apoptosis en FCN -AdAT1R.
2. Demostrar que Ang II induce apoptosis en FCN-AdAT1R por activación de la vía intrínseca a través de la mitocondria.
3. Demostrar que Ang II induce apoptosis del FCN-AdAT1R por la vía AT1R-Fosfolipasa C-Proteínkinasa C.
4. Demostrar que Ang II induce apoptosis en MCN-AdAT1R.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): MTT, Tritón X-100, azul de tripán, anticuerpo para vimentina. En Gibco BRL (Carlsbad, California EEUU) se adquirieron tripsina-EDTA, estándares de masas moleculares de proteínas pre-teñidas, suero fetal de bovino (FBS). Los compuestos inorgánicos y orgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en MERCK (Darmstadt, Alemania). El reactivo quimioluminiscente para Western blot (Western Lightning) se adquirió a PerKinElmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA, EEUU). El material de plástico estéril para la obtención y cultivo de fibroblastos cardíacos se obtuvieron en Falcon. TGF- β_1 se adquirió en Chemicon. Los anticuerpos secundarios anti-IgG ratón y anti-IgG conejo, conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU).

5.2. Modelo animal

Ratas Sprague-Dawley neonatas (2 a 3 días de edad), provenientes del bioterio de la Universidad de Chile, en cumplimiento con todas las normas éticas referidas a la utilización de animales y contó con la aprobación del comité de ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

5.3. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos ventriculares de ratas neonatas

Se utilizó el procedimiento descrito por Foncea y cols en 1997(39), el cual da cuenta de la posibilidad de separar cardiomiocitos de fibroblastos cardiacos por la diferente capacidad de adherencia a las placas de cultivo. Las ratas se decapitaron e inmediatamente se les removi6 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 2 h 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 2 h, se cambi6 el medio por DMEM-F12 +

10% FBS, los fibroblastos se dejaron proliferar hasta confluencia y los cambios de pasaje se realizaron mediante tripsinización (hasta pasaje 2 como máximo).

5.4. Desdiferenciación a miofibroblastos

Se utilizaron FCN en pasaje 2, los cuales se cultivaron por 84 h. en medio DMEM-F12 suplementado con TGF- β_1 5 ng/mL. En estas condiciones cerca del 100% de los fibroblastos se desdiferenciaron a miofibroblastos. Una vez cumplido el tiempo se retiró el medio suplementado y los miofibroblastos se mantuvieron por 24 h. con DMEM-F12, los miofibroblastos obtenidos se utilizaron para los ensayos posteriores(25).

5.5. Transducción adenoviral

Se utilizó la construcción adenoviral Ad-GFP-NHA-AT1R donada por el Dr. Walter G. Thomas (Baker Medical Research Institute, Melbourne, Australia). Este adenovirus es bicistrónico ya que co-expresa el receptor de Ang II del subtipo AT1R de rata (con epítipo HA en extremo N-terminal) y GFP como marcador de transducción, dirigidos por el promotor CMV.

5.5.1 Determinación de la multiplicidad de infección por microscopia de fluorescencia

Las células se sembraron en placas de cultivo a una densidad de 20.000/cm², privadas de suero y transducidas con los adenovirus por 24 h. a una multiplicidad de infección (MOI) de 15.000 para AdAT1R. En esas condiciones se determinó mediante microscopia de fluorescencia que un porcentaje mayor del 90% de los fibroblastos y miofibroblastos expresaban GFP.

5.5.2 Determinación multiplicidad de infección por citometría de flujo

Fibroblastos y miofibroblastos se sembraron en placas 35 mm a una razón de 2x10⁴ cel/cm², fueron cultivados en medio DMEM-F12 con distintas cantidades de AdAT1 por 24 h, los cuales representan los siguientes MOI: 0, 10.000, 15.000, 20.000 y 30.000. Luego las células se tripsinizaron desde las placas utilizando Tripsina-EDTA 1x. Luego la fluorescencia dada por la proteína GFP, indicador de MOI se determinó por citometría de flujo (FACS CANTO, Becton Dickinson).

5.6. Preparación de extractos celulares totales

Se prepararon extractos de proteínas totales para evaluar la expresión de las proteínas Bcl-2, Bax y caspasa 3. Las células se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de 2×10^4 cel/cm². Una vez estimuladas, las células se lavaron tres veces con PBS 1X frío y luego se lisaron con 50 μ 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 μ g/mL; aprotinina 10mM; PMSF 1 mM y Na₃VO₄ 100 μ M). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay). Las proteínas se denaturaron en tampón SDS-PAGE 4X (glicerol 20 mL, 2-mercaptoetanol 10 mL, SDS 5 g, Tris base 1,51 g, Azul de bromofenol 0,01 g, Agua csp. 100 mL, ajustar a pH 6.8 con HCL), y se guardaron 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 al 12%. Para la detección se cargaron 50 μ g de extracto proteico. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 70 V en tampón de electroforesis 1X (Tris base 30,25 g, Glicina 144 g, SDS 10 g, agua 1.000 mL para tampón de electroforesis 10X).

5.8. Electrotransferencia de proteínas

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) 400 mA durante 60 min en tampón de transferencia.

5.9. Western blot

Una vez transferidas, la membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (TBS 1X; Tween-20 0,1%; leche sin grasa 5% p/v) durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes según ensayo. Bcl-2, Bax y caspasa 3 en tampón de incubación (TBS 1X; Tween-20 0,1% en

Leche sin grasa 5% p/v) a una dilución 1:500 toda la noche a 4°C con agitación suave. Para vimentina se usó tampón de incubación a una dilución 1:1.000 toda la noche a 4°C con agitación suave. Posterior a la incubación, las membranas se lavaron 3 veces por 5 min en TBS 1X / Tween-20 al 0,1%, e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con anti-IgG de conejo o ratón conjugado con peroxidasa, a un título de 1:5.000 para vimentina, 1:2.000 para Bcl-2 y caspasa 3, y 1:1.000 para Bax, todos en tampón de incubación. Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en solución de ECL (enhanced chemiluminescence) y se expusieron a la película de fotografía Kodak-Biomax. Las películas se digitalizaron y las imágenes se cuantificaron por densitometría con ayuda de los programas computacionales Photoshop 6.0 y USI. Después de realizar los ensayos de Western blot, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 45 min en una solución de rojo Ponceau (rojo Ponceau 2%, TCA 30%, ácido sulfosalicílico 30%) para desprender los anticuerpos, posteriormente se lavaron en TBS 1X / Tween-20 al 0,1% por tres veces. Luego de este tratamiento, las membranas pudieron ser reutilizadas para nuevos ensayos de Western blot.

5.10. Viabilidad celular

Se realizaron dos métodos para determinar la viabilidad celular:

5.10.1. Viabilidad celular por MTT.

- El reactivo bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) se usó para estimar el número celular en cultivo. FCN se sembraron en placas de doce pocillos a una razón de 2×10^4 cel/cm², cultivadas en medio DMEM-F12 con AdAT1R por 24 h, luego se lavaron tres veces con PBS 1X y se reemplazó por medio fresco DMEM-F12 conteniendo o no Ang II, Losartan, Gö 6976, U 73122 o TGF- β_1 a los tiempos y concentraciones indicados para cada experimento. Luego de terminado los experimentos en los tiempos indicados para cada uno, el medio fue cambiado por PBS 1X conteniendo MTT (0,5 mg/mL) y se continuó la incubación a 37°C por 3 h. En este punto el producto formado (azul de formazán) se resuspendió en 2-propanol a -20°C y la absorbancias se determinan a 550 y 655 nm en espectrofotómetro UV.

5.10.2. Muerte celular por citometría de flujo.

- Fibroblastos se sembraron en placas 35 mm a una razón de 2×10^4 cel/cm², cultivadas en medio DMEM-F12 con y sin transducción con AdAT1R por 24 h, luego se lavaron tres veces con PBS 1X y se reemplazó por medio fresco DMEM-F12 conteniendo o no Ang II, Losartan, Gö6976 o U73122 a los tiempos y concentraciones indicados para cada experimento. Luego de terminado los experimentos, las células se soltaron de las placas utilizando Tripsina-EDTA 1x para fibroblastos y Accutase-EDTA para miofibroblastos, en el caso de la tripsina, ésta se inhibió utilizando DMEF-12 10% suero, en proporción 1:1. Por otro lado el medio que contenía a las células se recolectó, centrifugado a 1500 rpm por 5 min y la pella celular obtenida se adicionó de esta forma a las células desprendidas en el sobrenadante inicial. Luego a las células en suspensión se les adicionó ioduro de propidio (PI) 20 µg/µL para poder detectar la muerte celular. Finalmente se midió la muerte celular por citometría de flujo (FACS CANTO, Becton Dickinson).

5.11. Pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\psi$)

La pérdida del $m\Delta\psi$ se midió utilizando tetra metil rodamina (TMR), un marcador específico de la integridad de dicho potencial. Los FCN se sembraron en placas 35 mm a una razón de 2×10^4 cel/cm², cultivadas en medio DMEM-F12 conteniendo AdAT1 por 24 h, luego se lavaron tres veces con PBS 1X y se reemplazó por medio fresco DMEM-F12 (control), DMEM-F12 conteniendo Ang II, Losartan, Gö 6976 o U 73122 a los tiempos y concentraciones indicados para cada experimento. Una hora antes de finalizado el tiempo experimental indicado se adicionó TMR a una concentración final de 1µM. Luego de terminado los experimentos en los tiempos indicados para cada ensayo, las células se soltaron de las placas utilizando Tripsina-EDTA 1x. Luego la pérdida del $m\Delta\psi$ de las células en suspensión fue determinada por citometría de flujo (FACS CANTO, Becton Dickinson).

5.12. Cuantificación de la fragmentación del ADN mediante ioduro de propidio (PI)

Para detectar la fracción sub G1 que corresponde a las células con fraccionamiento del ADN, se utilizó la técnica de incorporación de ioduro de propidio. Fibroblastos y miofibroblastos se sembraron en placas 35 mm a una razón de 2×10^4

cel/cm², se cultivaron en medio DMEM-F12 conteniendo AdAT1R por 24 h. Luego se lavaron tres veces con PBS 1X y se reemplazó por medio fresco DMEM-F12 (control) o DMEM-F12 conteniendo Ang II, Losartan, Gö 6976 o U 73122 a los tiempos y concentraciones indicados para cada experimento. Las células se desprendieron de las placas utilizando Tripsina-EDTA 1x. Por otro lado el medio que contenía a las células se recolectó, centrifugó a 1.500 rpm por 5 min y la pella recuperada y adicionada a las células desprendidas inicialmente de las placas. El total de células obtenido se recolectó en metanol frío, almacenado a -20 toda la noche, sometido a una segunda centrifugación y la fracción no soluble obtenida se resuspendió en PBS frío conteniendo RNAsa por 2 h. Luego a las células en suspensión se les adicionó ioduro de propidio (PI) 20 µg/µL un minuto antes de la medición. Finalmente se determinó la apoptosis celular por citometría de flujo (FACS CANTO, Becton Dickinson).

5.13. Análisis estadístico

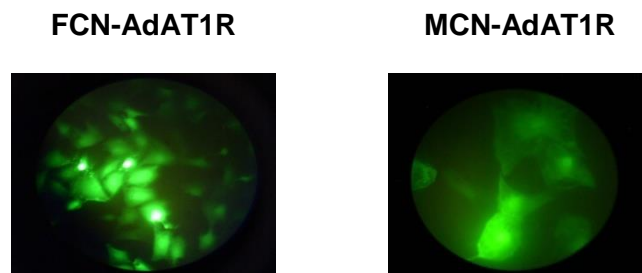
Los resultados mostrados corresponden al promedio \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA y la prueba Tuckey para determinar la significancia estadística de los resultados.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización de la transducción con AdAT1R de FCN y MCN.

FCN y MCN se transdujeron con AdAT1R usando una cantidad creciente de MOI, que va desde 15.000 hasta 45.000 por 24 h. En la figura 1A, se aprecia el aumento en la expresión de la proteína GFP al utilizarse un MOI de 15.000 para FCN y 30.000 para MCN. Por otro lado, mediante citometría de flujo se determinó que el número de células que expresan la proteína GFP a esos MOI, el cual fue de un 45 ± 5 % para ambos tipos celulares (Fig 1B). Por citometría se observó que con MOI superiores hubo mayor expresión de GFP, pero fue paralelo a mayor muerte celular (datos no mostrados). El MOI utilizado finalmente correspondió al que permitió observar por microscopía que el 90% de ambas células en cultivo sean positivas GFP (verdes), es decir, MOI 15.000 para FCN y 30.000 para MCN. Sin embargo, al detectar la transducción por dichos MOI por citometría de flujo corresponde a una menor cantidad. Estos datos podrían explicarse por la mayor sensibilidad de la microscopía comparado a la citometría de flujo, dado que células en apariencia verdes (transducidas) en la microscopía no son detectadas como GFP+ por el citómetro de flujo.

A)



B)

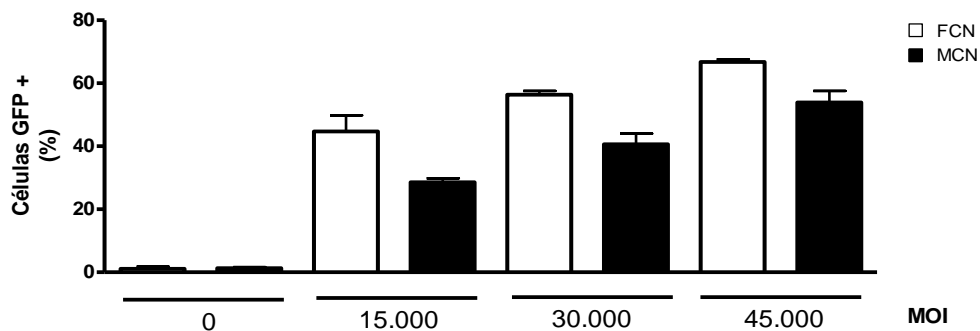


Fig. 1 Caracterización de la transducción del AdAT1R en FCN y MCN. Caracterización de la transducción adenoviral, tanto FCN como MCN. Se puede apreciar una microfotografía de epifluorescencia de células transducidas con AdAT1R. En la fig 1B, se aprecia la determinación del MOI mediante la proteína GFP por citometría de flujo.

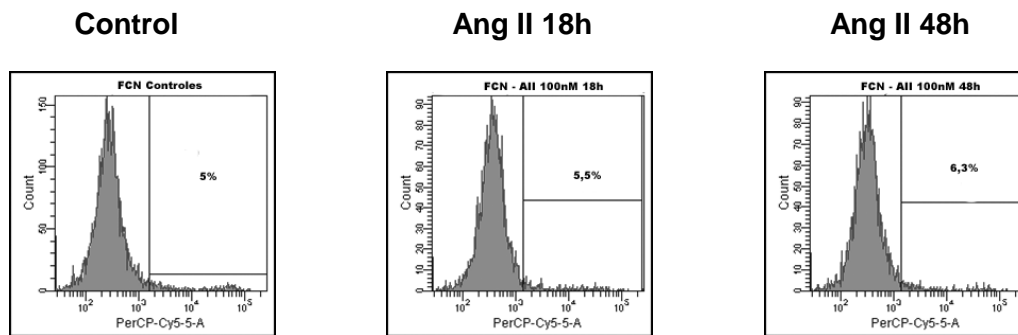
6.2 Efectos de Angiotensina II sobre el FCN-AdAT1R.

Resultados previos de nuestro laboratorio, utilizando la técnica del MTT, mostraron que no hubo efecto de Ang II 100 nM sobre la viabilidad del FCN, sin embargo, cuando se sobre-expresó el AT1R con AdAT1R, Ang II gatilló una masiva pérdida de la viabilidad celular. Por lo tanto, se intentó profundizar en estos resultados por la técnica de la citometría de flujo, a fin de determinar el tipo de muerte que afecta al FCN que sobreexpresa al AT1R y algunos de los mecanismos involucrados río-abajo en la activación del AT1R.

6.2.1 Efectos de Ang II sobre la muerte del FCN-AdAT1R.

En la Figura 2A se muestran los histogramas de citometría de flujo midiendo la incorporación de PI en las células muertas, en los que se observa que los FCN no transducidos no evidenciaron muerte por Ang II 100 nM en forma tiempo dependiente. Por otro lado, en FCN-AdAT1R en ausencia de Ang II se observa un leve aumento en la muerte celular. Sin embargo, en el FCN-AdAT1R en presencia de Ang II hubo una marcada muerte celular de una manera tiempo dependiente (Fig 2B). La figura 2C representa el análisis gráfico de esos eventos, y se observa que en los FCN con Ang II no hubo aumento en la muerte celular en los tiempos ensayados. Por otro lado, los FCN-AdAT1R por si solos experimentan un leve aumento en la muerte celular ($10 \pm 3\%$ en el FCN-AdAT1R versus $5 \pm 2\%$ respecto de los FCN no transducidos), mientras que en los FCN-AdAT1R estimulados con Ang II, la muerte celular fue un $33 \pm 5\%$, $55 \pm 5\%$ y un $69 \pm 3\%$ ($p < 0,001$) a las 18, 24 y 48 h, respectivamente.

A) FCN



B) FCN-AdAT1R

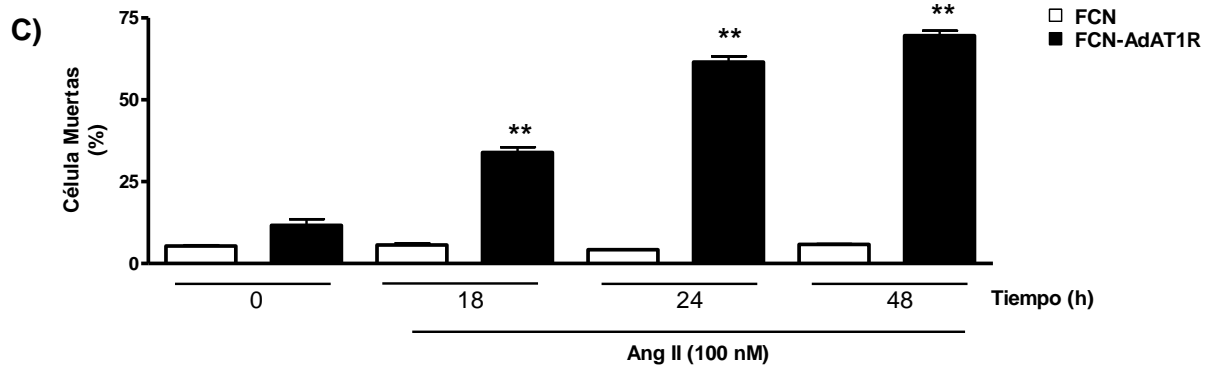
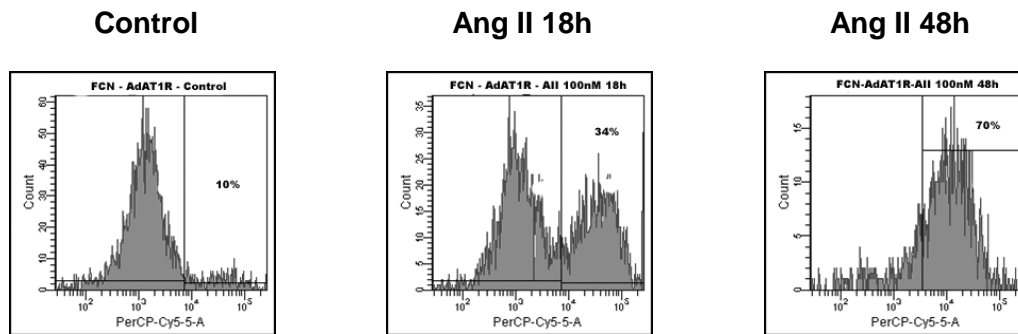


Fig. 2. Muerte celular inducido por Ang II 100 nM de los FCN-AdAT1R. Efecto de Ang II 100 nM sobre el FCN de manera tiempo dependiente. Se aprecian los histogramas obtenidos del citómetro de flujo para FCN sin transducir (Fig 2A) y los transducidos con AdAT1R (Fig 2B) estimulados con Ang II en los tiempos indicados. En las Fig 2C se grafican los datos obtenidos de dichos histogramas, para FCN y FCN-AdAT1R. Los resultados muestran la media \pm SEM para tres experimentos independientes. ** $p < 0,001$ vs su control

6.2.2 Determinación de la fragmentación del ADN en FCN-AdAT1R inducido por Ang II.

Luego de demostrar que Ang II produjo muerte de FCN- AdAT1R, se evaluó si el tipo de muerte producido por Ang II era apoptosis, al detectarse la fragmentación del ADN. Para ello se utilizó la citometría de flujo ocupando como marcador de fragmentación del ADN, la incorporación de yoduro de propidio (PI). En el histograma de la Figura 3A se observa que Ang II (100 nM, 18 h) ocasiona una significativa apoptosis del FCN-AdAT1R, la cual se aprecia por la incorporación de PI en la subpoblación apoptótica G1. El análisis gráfico muestra que no hubo apoptosis a las 12h, pero existe un 28 ± 4 % de FCN que experimentaron apoptosis a las 18h comparado con los 10 ± 2 % del FCN control (figura 3B).

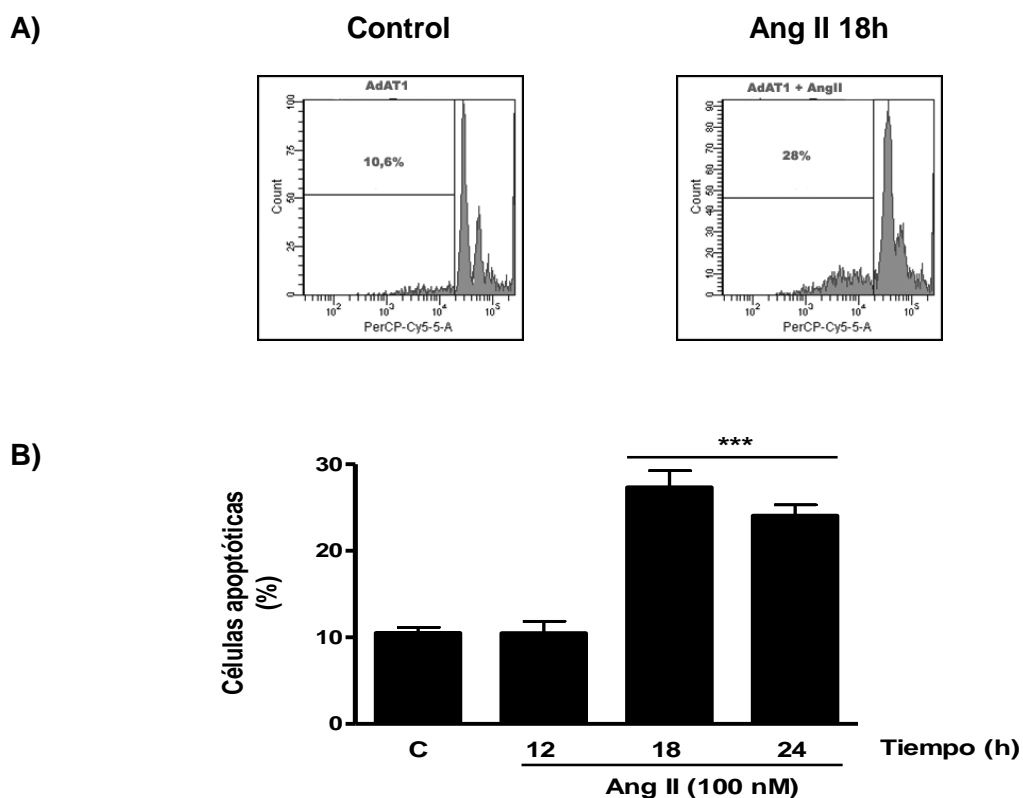


Fig. 3 Fragmentación del ADN en FCN-AdAT1R inducida por Ang II. Apoptosis medida por PI de FCN-AdAT1R y estimulados con Ang II 100 nM. En la figura 3A se muestra los histogramas obtenidos por citometría de flujo. La cuantificación de dichos histogramas es mostrada en el gráfico de la figura 3B. Los resultados muestran la media \pm SEM para tres experimentos independientes. *** $p < 0,001$ vs control (C) y 12h.

6.2.3 Determinación de la integridad del potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\psi$) en FCN-AdAT1R al ser estimulados con Ang II.

Para evaluar si la apoptosis del FCN-AdAT1R inducida por Ang II ocurre por la vía intrínseca se determinó la integridad de la mitocondria al medir el $m\Delta\psi$. Para ello, se recurrió a la citometría de flujo utilizando como marcador de positividad del $m\Delta\psi$ la tetra metil rodamina (TMR). Ang II produjo una pérdida del $m\Delta\psi$ de manera dependiente del tiempo, lo que se observa por el desplazamiento de la población celular a medida que disminuye la fluorescencia de TMR (fig 4A). La cuantificación de este evento se aprecia en el gráfico de la figura 4B, siendo significativo desde las 6 h ($26 \pm 4 \%$, $p < 0,05$) y 9 h ($53 \pm 3 \%$, $p < 0,001$), con respecto al control, Como control positivo se utilizó CCCP, un desacoplador del $m\Delta\psi$.

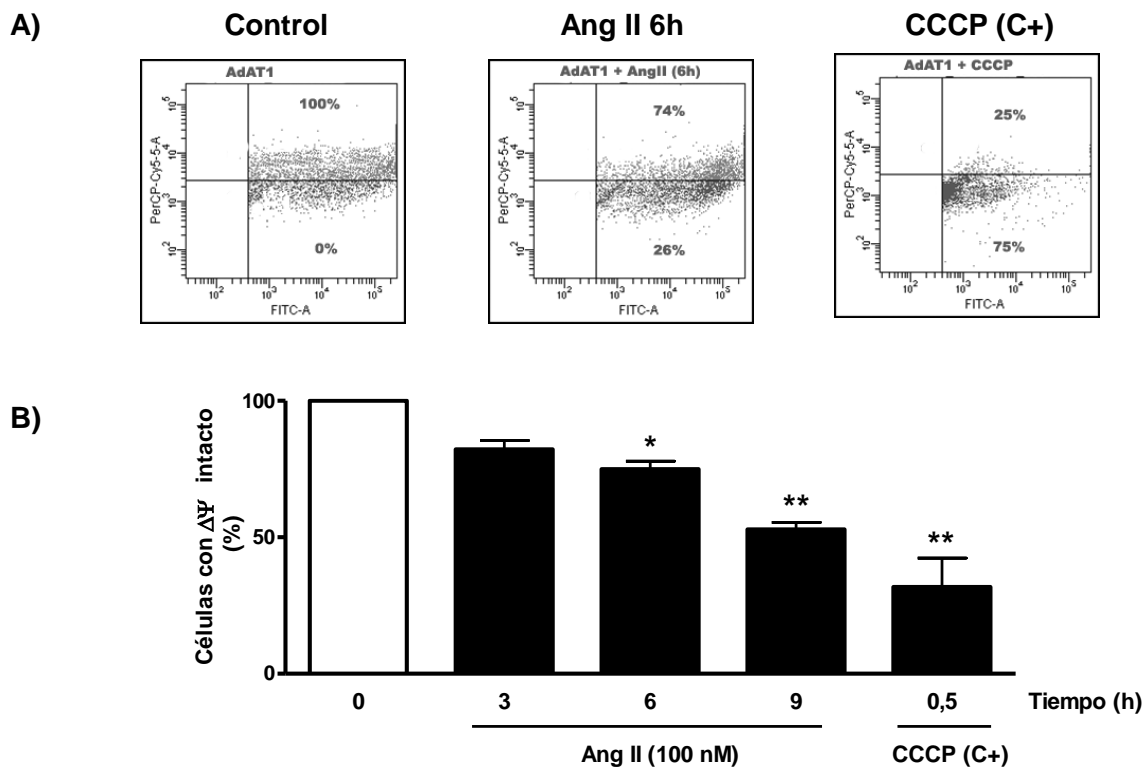


Fig. 4 Pérdida del $\Delta\psi$ en FCN-AdAT1R estimulados con Ang II. La pérdida del potencial de membrana mitocondria ($\Delta\psi$) se midió por citometría de flujo con TMR. La figura 4A muestra los histogramas obtenidos del citómetro de flujo utilizando como control positivo CCCP. En la figura 4B se observa la cuantificación de la pérdida del $\Delta\psi$ en FCN-AdAT1R por Ang II 100 nM en forma tiempo utilizando CCCP como control positivo. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ ambos con respecto al control.

6.2.4 Efecto de Ang II sobre la actividad de caspasa 3 en FCN-AdAT1R.

Para caracterizar la apoptosis del FCN-AdAT1R, se evaluó la fragmentación de la procaspasa 3 a su fragmento activo caspasa 3. Mediante Western blot, se identificó la fragmentación de la procaspasa 3 inducida por Ang II (100 nM, 18 h), observándose la aparición de la caspasa 3 activa como fragmentos de 17 KDa, mientras que no se observaron diferencias en los FCN no transducidos (fig 5 superior). La activación de la caspasa 3, medida como la razón caspasa3/procaspasa3, fue 5 veces mayor en los FCN-AdAT1R estimulados con Ang II que sus respectivo control (FCN-AdAT1 sin Ang II) ($p < 0,001$) y 40 veces mayor con respecto a los FCN sin transducir (con y sin Ang II) ($p < 0,001$) (fig 5 inferior).

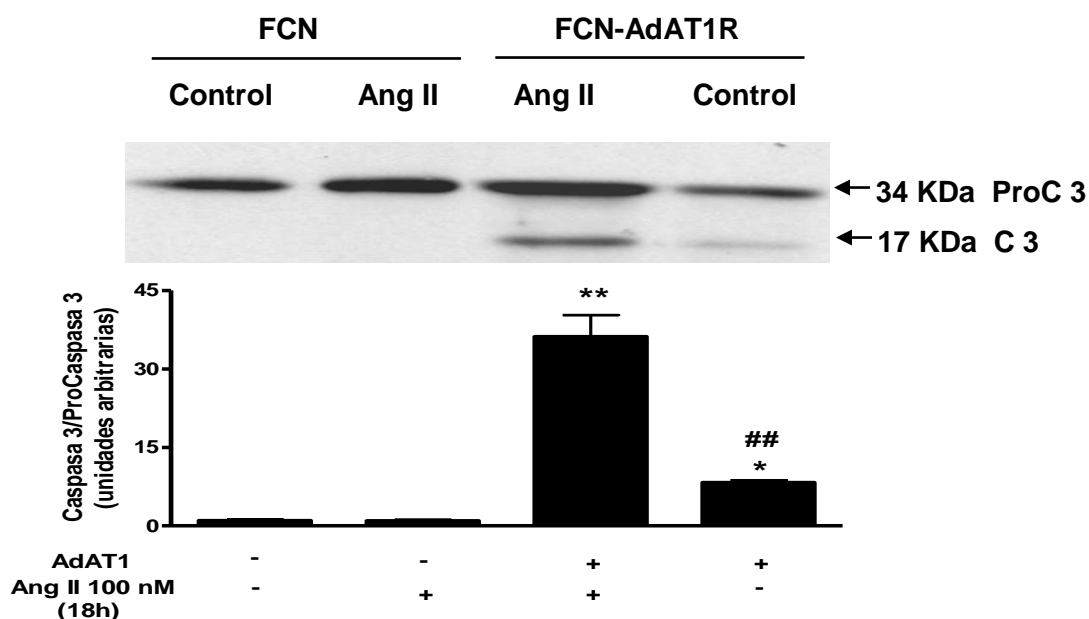


Fig. 5 Activación de la Caspasa 3 en FCN-AdAT1R inducido por Ang II. Determinación de la activación de la caspasa 3 en FCN con y sin transducir con el AdAT1R y cuando se estimulan con Ang II 100 nM por 18h. Parte superior WB indicando el fragmento activo de la caspasa 3 (17 KDa) y en la parte inferior gráfico que muestra la razón entre Caspasa 3/Procaspasa 3. * $p < 0.05$ y ** $p < 0,001$ con respecto al control. ## $p < 0,001$ con respecto a AdAT1R + Ang II.

6.2.5 Determinación de la niveles de las proteínas Bcl-2 y Bax en FCN-AdAT1R estimulados con Ang II.

Uno de los factores que participan en la regulación de la apoptosis son las proteínas de la familia Bcl-2, entre ellas la proapoptótica Bax y la antiapoptótica Bcl-2. La regulación de los niveles de dichas proteínas es crucial para la respuesta celular a estímulos de daño, como lo es la Ang II. Los FCN expresan a nivel basal Bcl-2, pero ésta no es modificada por Ang II, ni por la transducción con el AdAT1R. Sin embargo, hubo una leve disminución en la expresión de Bcl-2 al estimular al FCN-AdAT1R con Ang II por 18h, pero esta reducción no es significativa (fig 6A). Por otro lado, la proteína proapoptótica Bax también está presente en el FCN basal y sus niveles no son alterados por Ang II o por la transducción con el AdAT1R (fig 6B). Sin embargo, al estimular con Ang II (100 nM por 18 h) a los FCN-AdAT1R, estos experimentaron un aumento significativo de 2,5 veces más en los niveles de Bax, respecto a los controles ($p < 0,05$) (fig 6B). Un factor que determina la vulnerabilidad a la apoptosis es la razón Bax/Bcl-2, la cual mientras mayor es, más propensa a la apoptosis está la célula. La estimulación con Ang II ocasionaría un aumento de dicho factor en los FCN-AdAT1R, con respecto a los FCN-AdAT1R no estimulados con Ang II, ni en los FCN no transducidos con el adenovirus por aumentar la proteína proapoptótica Bax y mantener el nivel de la antiapoptótica Bcl-2.

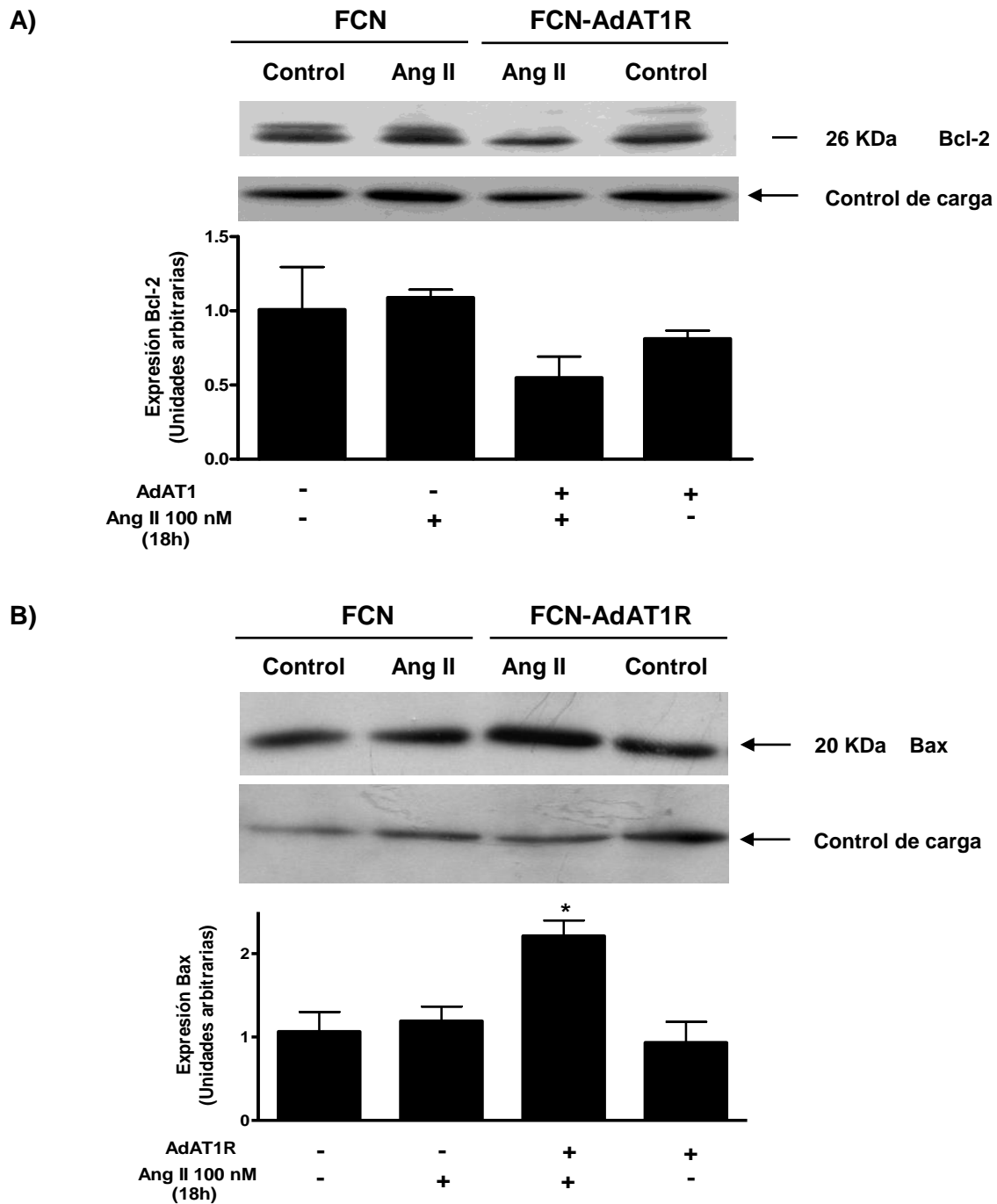


Fig. 6 Determinación de los niveles de las proteínas Bcl-2 y Bax en FCN-AdAT1R estimulados con Ang II. Para FCN tanto transducidos como no transducidos con AdAT1R, se determinaron por WB y posterior cuantificación densitométrica, tanto los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (26 KDa) (fig 6A) y la proteína proapoptótica Bax (20 KDa) (figura 6B). Vimentina se utilizó como control de carga. * $p < 0,05$ con respecto al resto de los tratamientos.

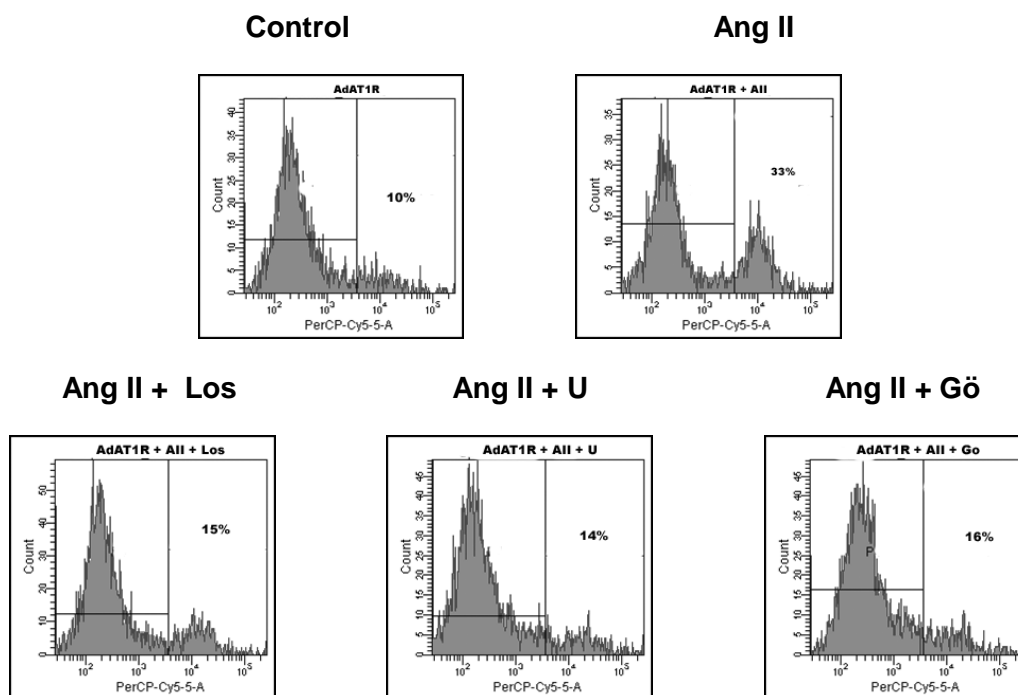
6.3 Participación de la vía AT1R-PLC-PKC en los efectos inducidos por Ang II sobre los FCN-AdAT1R.

Para caracterizar la vía por la cual Ang II ejerce sus efectos sobre el FCN-AdAT1R, en cuanto a la viabilidad, apoptosis, $m\Delta\psi$, fragmentación de la procaspasa 3 y aumento de los niveles de Bax, se ocuparon los siguientes antagonistas o inhibidores de la vía AT1R-PLC-PKC: Losartan, U73122 y Gö6976, respectivamente. Las concentraciones a utilizar de dichos inhibidores se probaron por 19 h y fueron obtenidas de la literatura, demostrándose inocuos en FCN-AdAT1R.

6.3.1 Ang II induce la muerte de FCN-AdAT1R por la vía AT1R-PLC-PKC.

Los efectos de Ang II sobre la muerte de los FCN se cultivaron por citometría de flujo utilizando la incorporación de yoduro de propidio (PI). Ang II (100 nM, 18 h) produjo la muerte del FCN-AdAT1R, en forma significativa respecto al control ($p < 0,001$). Losartan, U73122 y Gö6976 bloquean el efecto promuerte inducido por Ang II ($p < 0,001$) (figs 7A y 7B). Por otro lado, los tres bloqueadores utilizados, por si solos no tienen efecto sobre la viabilidad del FCN-AdAT1R, comparados al control (fig 7B).

A) FCN-AdAT1R



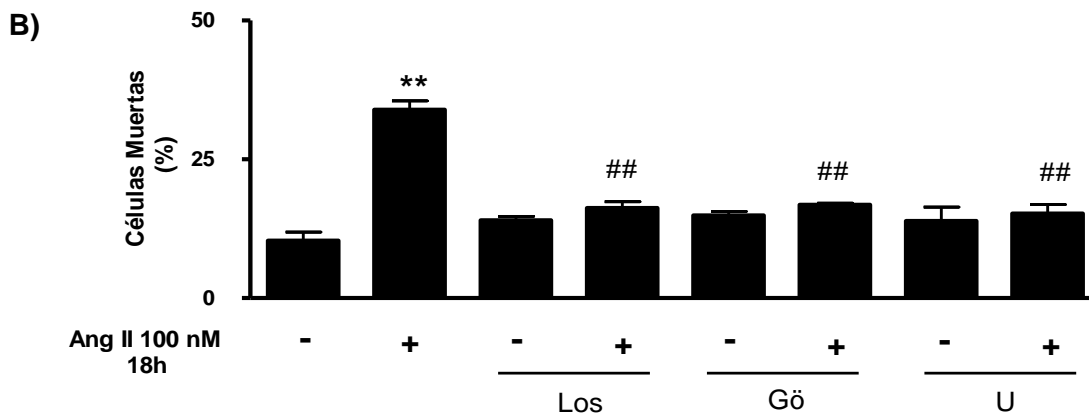


Fig. 7 Inhibición de la muerte del FCN-AdAT1R inducida por Ang II al bloquear la vía AT1R-PLC-PKC.

Inhibición de la muerte ocasionada por Ang II 100 nM por 18h sobre FCN-AdAT1R, por bloquear la vía AT1R-PLC-PKC, con Losartan 10 μ M, U73122 1 μ M o Gö6976 100 nM en la forma que muestra la figura 7. Ganancia de PI, que demuestra el grado de muerte del FCN-AdAT1R con los distintos tratamientos (figura 7A). Cuantificación de los histogramas obtenidos por citometría de flujo (figura 7B). ** $p < 0,001$ vs control; ## $p < 0,001$ vs AdAT1R + Ang II.

6.3.2 Ang II induce fragmentación del ADN del FCN-AdAT1R vía AT1R-PLC-PKC.

En la figura 8A se muestran los histogramas representativos obtenidos por citometría de flujo, donde se aprecia el grado de incorporación de yoduro de propidio (PI) a la subpoblación apoptótica en los FCN-AdAT1R controles (10%) y como esta incorporación aumenta considerablemente en los FCN-AdAT1R con Ang II (28%), y el efecto del bloqueo con Losartan, Gö6976 y U73122. En la figura 8B se muestra el análisis gráfico de esos eventos. La apoptosis de los FCN-AdAT1R inducida por Ang II (100 nM, 18 h) con respecto al control ($p < 0,001$), fue bloqueada de forma significativa por Losartan 10 μ M, U73122 1 μ M o Gö6976 100 nM, respectivamente ($p < 0,001$). Los tres bloqueadores utilizados no muestran efecto proapoptótico por si solos (figura 8B).

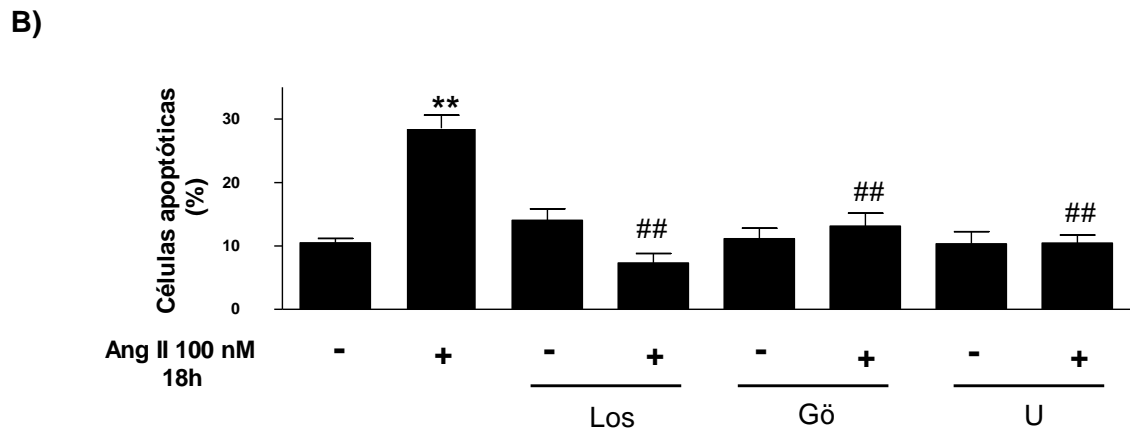
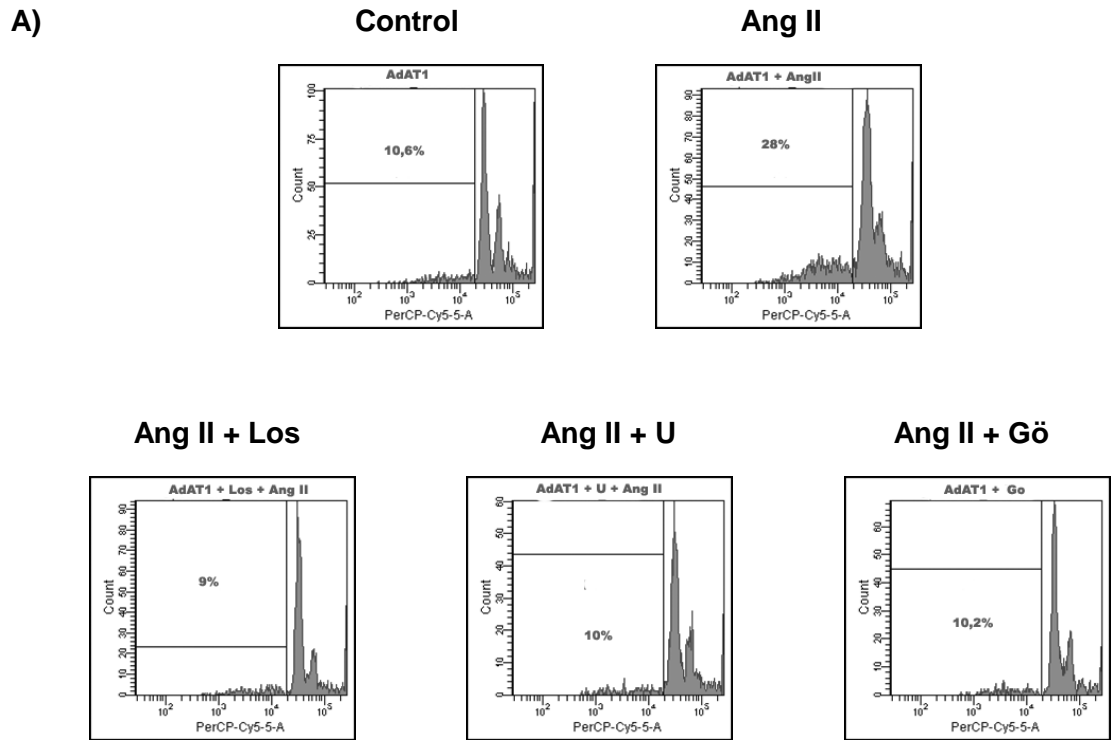


Fig. 8 Inhibición de la fragmentación del ADN del FCN-AdAT1R inducida por Ang II al bloquear la vía AT1R-PLC-PKC. Inhibición de la apoptosis ocasionada por Ang II 100 nM por 18h sobre FCN-AdAT1R, por bloquear la vía AT1R-PLC-PKC, con Losartan 10 μ M, U73122 1 μ M o Gö6976 100 nM. Cuantificación de los histogramas (fig 8A) obtenidos por citometría de flujo. ** $p < 0,001$, con respecto al control y ## $p < 0,001$ con respecto al AdAT1R + Ang II.

6.3.3 Ang II ocasiona la pérdida del $m\Delta\psi$ en FCN-AdAT1R, vía AT1R-PLC-PKC.

En la figura 9A se muestran los histogramas representativos obtenidos por citometría de flujo, donde se aprecia células TMR +, es decir, las que poseen el $m\Delta\psi$ intacto (control), La subpoblación, manifiesta un desplazamiento ocasionado por Ang II (100nM, 6h), semejante al producido por el desacoplador del $m\Delta\psi$, CCCP. Por otro lado, la incubación con los bloqueadores de la vía AT1R-PLC-PKC, disminuyó completamente este desplazamiento celular. La cuantificación de los histogramas manifiesta una pérdida significativa del $m\Delta\psi$ por Ang II, cercana al 25% para los FCN-AdAT1R ($p < 0,01$), mientras que el bloqueo de la vía AT1R-PLC-PKC, inhibe el efecto de Ang II, comportándose semejante al control ($p < 0,01$) (Figura 9B). Además CCCP fue ocupado como control positivo, ocasionando una significativa pérdida del $m\Delta\psi$ ($p < 0,001$).

A)

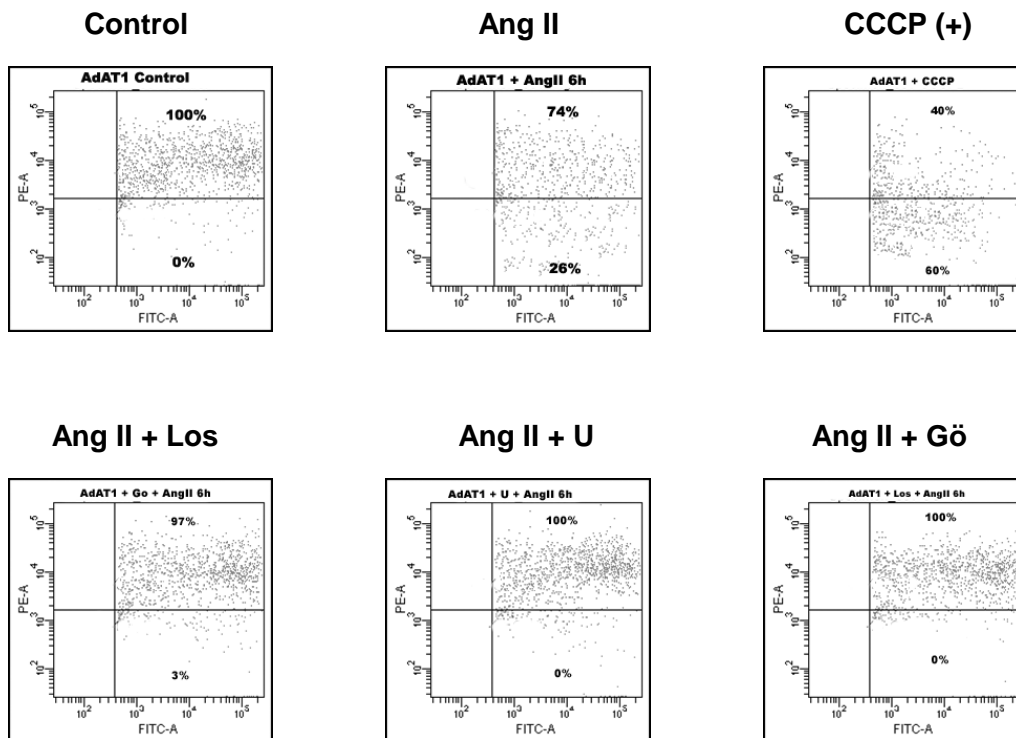


Fig. 9 Inhibición de la pérdida del $m\Delta\psi$ en FCN-AdAT1R inducida por Ang II al bloquear la vía AT1R-PLC-PKC. Inhibición de pérdida del $m\Delta\psi$ en FCN-AdAT1R ocasionada por Ang II 100 nM por 6h, por bloquear la vía AT1R-PLC-PKC, con Losartan 10 μ M, U73122 1 μ M o Gö6976 100 nM o una mezcla de ellos en la forma que muestra la figura 9. Histogramas que muestran el desplazamiento de la subpoblación TMR + por Ang II, lo que determina el grado de pérdida del $m\Delta\psi$ con los distintos tratamientos (figura 9A).

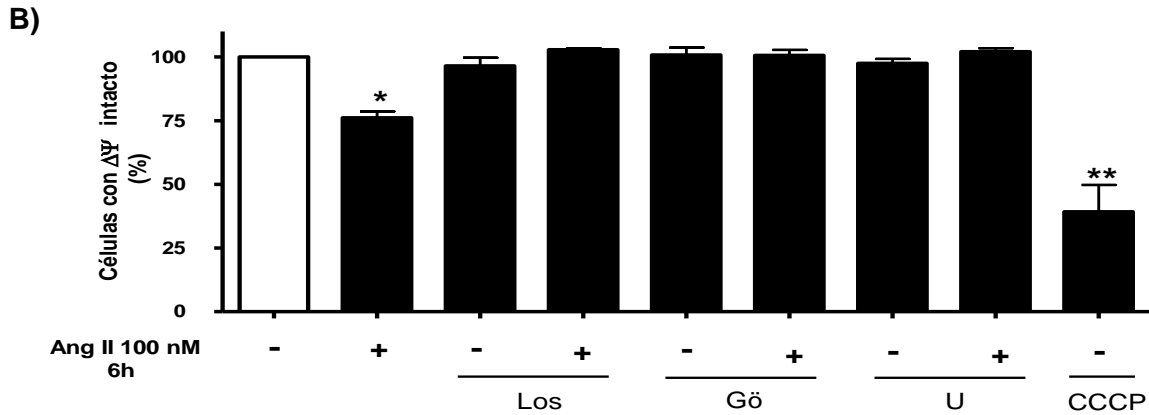


Fig. 9 Efecto del bloqueo de la vía AT1R-PLC-PKC sobre la pérdida del $m\Delta\psi$ inducido por Ang II en FCN-AdAT1R. Inhibición de pérdida del $m\Delta\psi$ en FCN-AdAT1R ocasionada por Ang II 100 nM por 6h, por bloquear la vía AT1R-PLC-PKC, con Losartan 10 μ M, U73122 1 μ M o Gö6976 100 nM o una mezcla de ellos en la forma que muestra la figura 9. Cuantificación de los histogramas obtenidos por citometría de flujo (figura 9B). En la figura 9B, * $p < 0,01$ y ** $p < 0,001$ con respecto al resto de los tratamientos.

6.3.4. Ang II activa caspasa 3 vía AT1R-PLC-PKC.

Ang II (100 nM, 18 h) produjo una masiva fragmentación de la procaspasa 3 (34 KDa) en los FCN-AdAT1R con respecto al control ($p < 0,001$). El fragmento activo de 17 KDa, la caspasa 3 activa, es el mayor efector de los eventos apoptóticos que ocurren río abajo de la activación del AT1R. Los bloqueadores Losartan 10 μ M, U73122 1 μ M o Gö6976 100 nM, evitaron la fragmentación de la procaspasa 3 (fig 10 superior). La razón caspasa 3/procaspasa 3, es una forma de identificar la magnitud en la activación de este evento proapoptótico. En la parte inferior de la figura 10 se aprecia el análisis gráfico de la cuantificación de la razón caspasa 3/procaspasa 3, indicando que Ang II aumentó 5 veces esta razón por sobre el control ($p < 0,001$). Al mismo tiempo, los bloqueadores disminuyen esa razón hasta llegar al nivel del FCN-AdAT1R control ($p < 0,01$ con respecto a FCN-AdAT1R-AngII).

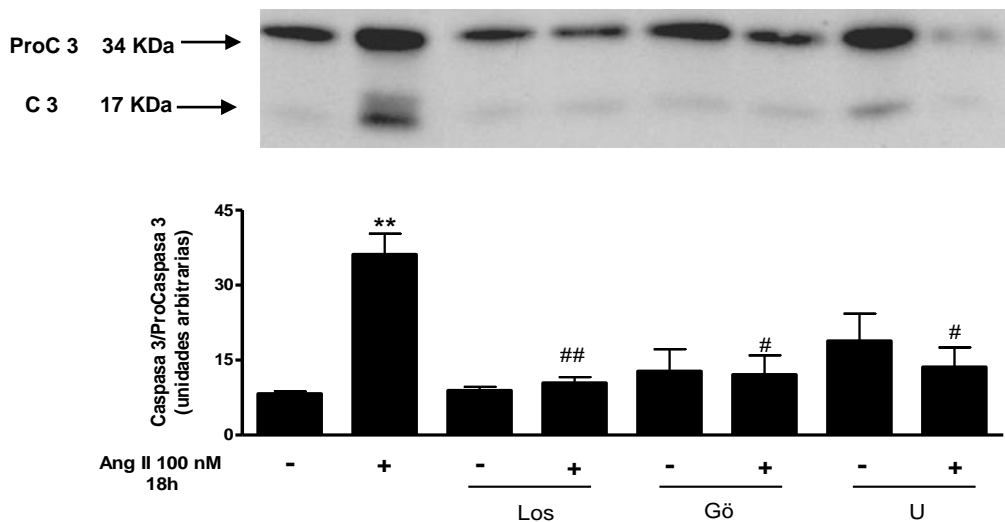
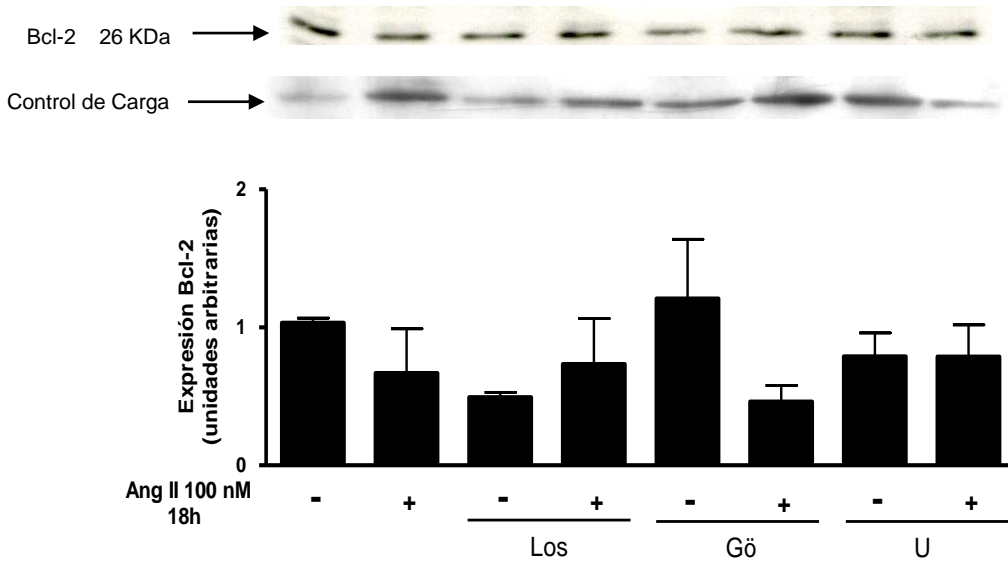


Fig. 10 El efecto activador de caspasa 3 inducido por Ang II en FCN-AdAT1R es inhibido por el bloqueo de la vía AT1R-PLC-PKC. WB que muestra la fragmentación de la procaspasa 3 (34 KDa) en su segmento activo caspasa 3 (17 KDa) en el FCN-AdAT1R estimulado con Ang II 100 nM por 18h y el efecto contrario que ocasiona el bloqueo de la vía AT1R-PLC-PKC por Losartan 10 μ M, U73122 μ M o Gö6976 100 nM o una mezcla de ellos, además en la parte inferior se muestra un grafico con la cuantificación de la razón caspasa3/procaspasa3 para los distintos tratamientos. ** $p < 0,001$ con respecto a control; # $p < 0,01$ y ## $p < 0,001$ con respecto a AdAT1R + Ang II.

6.3.5. Ang II modula los niveles de las proteínas Bcl-2 y Bax por la vía AT1R-PLC-PKC en FCN-AdAT1R.

Ang II (100 nM, 18 h), no tuvo un efecto significativo en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (fig 11A), en cambio indujo un aumento en los niveles de la proteína proapoptótica Bax ($p < 0,001$) (fig 11B). Por otro lado, en presencia de Losartan 10 μ M, U73122 1 μ M o Gö6976 100 nM, no se observaron los efectos inducidos por Ang II sobre los niveles de Bax ($p < 0,001$). Los bloqueadores por si solo no mostraron efectos significativos sobre los parámetros evaluados. Dichos efectos de Ang II manifiestan un efecto que conduciría al aumento de la razón Bax/Bcl-2 y esto sería bloqueado por las sustancias utilizadas para bloquear la vía AT1R-PLC-PKC.

A)



B)

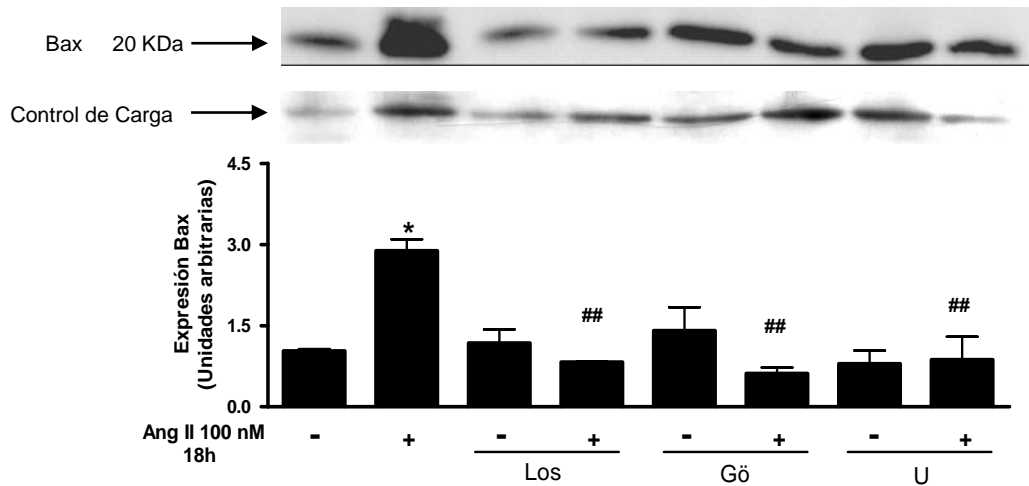


Fig. 11A Determinación de los niveles de las proteínas Bcl-2 y Bax en FCN-AdAT1R cuando se bloquea la vía AT1R-PLC-PKC, luego del estímulo con Ang II. Determinación del efecto antagónico por bloqueo de la vía AT1R-PLC-PKC con Losartán 10 μ M, U73122 1 μ M o Gö6976 100 nM respectivamente, en el efecto de Ang II 100 nM por 18h, sobre los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (26 KDa) (fig 11A) y la proteína la proapoptótica Bax (20 KDa) (fig 11B) mediante WB. ** $p < 0,001$ con respecto al control; ## $p < 0,01$ con respecto a AdAT1R + Ang II.

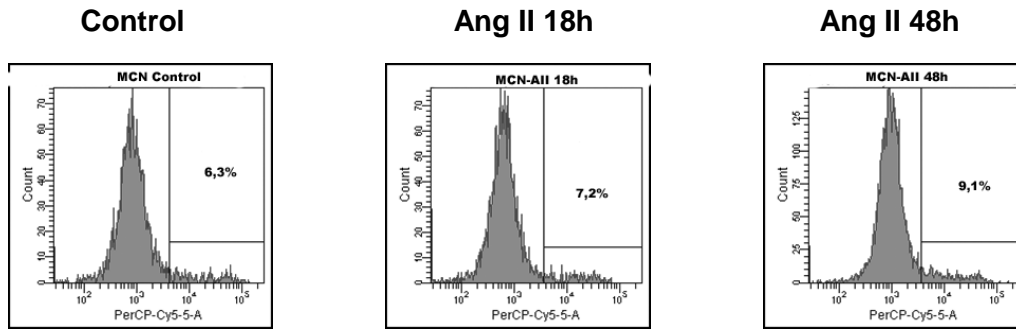
6.4 Efecto de Ang II sobre el MCN-AdAT1R.

En resultados previos en el laboratorio se encontró que este tipo celular era más resistente a la muerte celular estimulada por Ang II que los FCN-AdAT1R. Por lo tanto, se llevaron a cabo estudios con el fin de determinar las diferencias entre ambos tipos celulares, para ello se observaron efectos sobre la muerte celular, la apoptosis y los niveles de las proteínas Bax y Bcl-2.

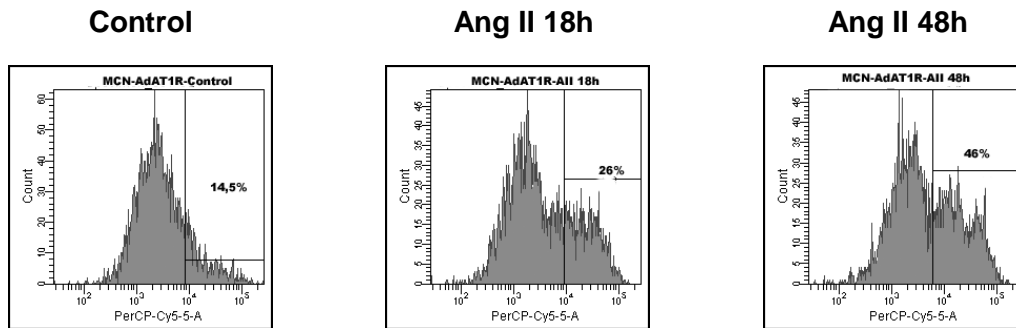
6.4.1 Efecto de Ang II sobre la muerte del MCN-AdAT1R.

La muerte celular se midió por citometría de flujo, ocupando como marcador de muerte celular la incorporación de yoduro de propidio (PI). Los histogramas muestran que en los MCN no transducidos con AdAT1R no hubo muerte por Ang II (fig 12A). Sin embargo, en los MCN-AdAT1R la transducción por si sola induce un leve aumento en la muerte celular (14 ± 3 % MCN-AdAT1R versus 6 ± 2 % en el MCN control). Cuando los MCN-AdAT1R son estimulados con Ang II, se observó una marcada muerte celular de una manera tiempo dependiente (27 ± 5 % y un 45 ± 3 % a las 18 y 48 h, respectivamente) (Figs 12 B y C) ($p < 0,001$), con respecto a MCN control. En la figura 12D, se muestran los histogramas obtenidos por citometría de flujo, que dan cuenta del efecto de los bloqueadores Losartan $10 \mu\text{M}$, U73122 $1 \mu\text{M}$ o Gö6976 100 nM sobre los efectos de Ang II. La cuantificación de dichos histogramas (figura 12E), señala que Ang II (100 nM , 18 h) produce una significativa muerte del MCN ($p < 0,001$) y que el bloqueo de la vía AT1R-PLC-PKC, disminuye a nivel del MCN control, la muerte celular ($p < 0,001$).

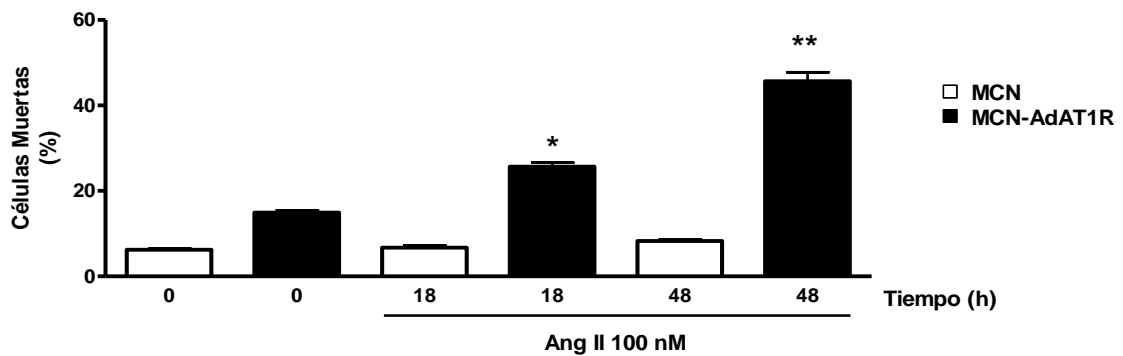
A) MCN



B) MCN-AdAT1R

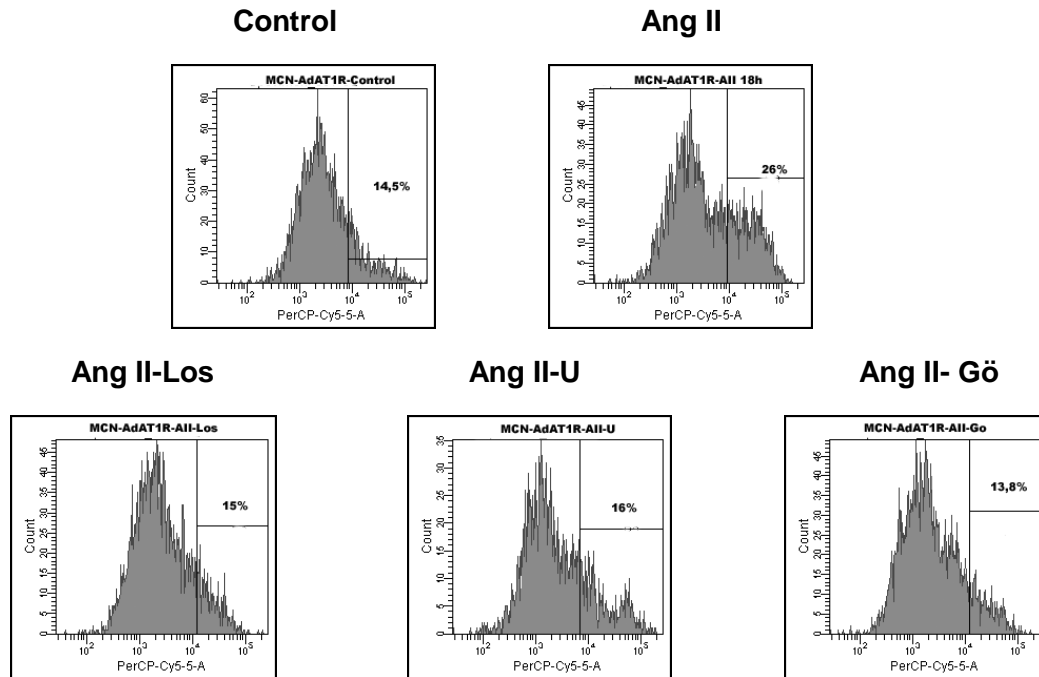


C)

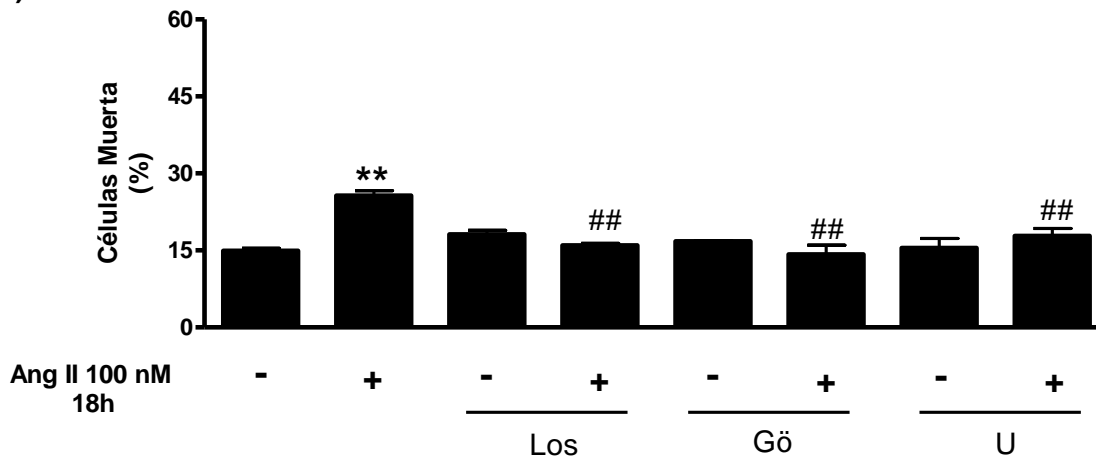


Figs. 12 A-C. Efecto sobre la muerte del MCN-AdAT1R inducido por Ang II. Efecto de Ang II 100 nM tiempo dependiente por citometría de flujo, sobre MCN basales (fig 12A) y MCN-AdAT1R (fig 12B). La cuantificación de los histogramas obtenidos del citómetro de flujo se observa en la figura 12C. * $p < 0,01$ con respecto a MCN y MCN-AdAT1R control; ** $p < 0,001$ con respecto a todos los tratamientos.

D) MCN-AdAT1R



E)



Figs. 12 D-E. Efecto inhibitorio de la muerte del MCN-AdAT1R inducido por Ang II al bloquear la vía AT1R-PLC-PKC. Los efectos de Ang II 100 nM tiempo dependiente por citometría de flujo MCN-AdAT1R (figura 12B) son inhibidos por Losartán 10 μ M, U73122 1 μ M o Gö6976 100 nM, dicho efecto se observa en los histogramas obtenidos del citómetro de flujo (fig 12D) y la gráfica con la cuantificación de dichos histogramas en la figura 12E. ** p<0,001 con respecto al control. ## p<0,001 con respecto a Ang II

6.4.2 Efecto apoptótico de Ang II sobre el MCN-AdAT1R.

Luego de demostrar que Ang II ocasiona muerte del MCN-AdAT1R, se evaluó dicha muerte por apoptosis del MCN-AdAT1R, para ello se utilizó la citometría de flujo ocupando como marcador apoptótico la fragmentación del ADN mediante ioduro de propidio (PI). Los histogramas obtenidos por citometría de flujo muestran los efectos de Ang II sobre la incorporación de PI en la subpoblación G1 apoptótica (fig 13A). El análisis gráfico muestra que Ang II (100 nM, 18 h) induce una significativa apoptosis del MCN-AdAT1R ($18 \pm 3 \%$, versus $7 \pm 2 \%$, respecto de los controles ($p < 0,001$) (figura 13B).

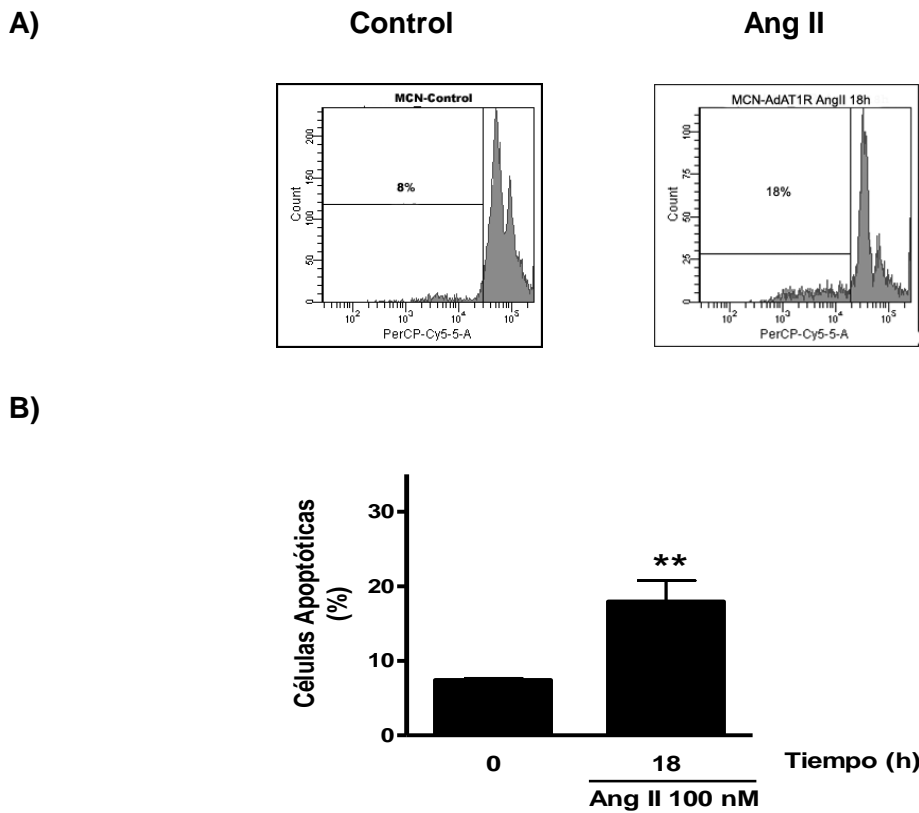


Fig. 13 Fragmentación del ADN en MCN-AdAT1 inducido por Ang II. Apoptosis medida por PI de MCN-AdAT1R y estimulados con Ang II 100 nM por 18h. En la figura 13A se muestra los histogramas obtenidos por citometría de flujo. La cuantificación de los histogramas es mostrada en el gráfico de la figura 13B. Los resultados muestran la media \pm SEM para tres experimentos independientes. ** $p < 0,001$ vs control.

6.4.3 Efecto de Ang II en los niveles de las proteínas Bcl-2 y Bax en MCN-AdAT1R.

En la Figura 14A se observa que los MCN-AdAT1R expresan a nivel basal Bcl-2, pero esta expresión no es modificada por Ang II, ni por la transducción con el AdAT1R. (fig 6A). Por otro lado, la proteína proapoptótica Bax también esta presente en el MCN basal y su expresión no es afectada por la estimulación con Ang II o por la transducción con el AdAT1R (figura 6B). Sin embargo, en MCN-AdAT1R al estimular con Ang II (100 nM, 18 h) se observa un aumento significativo en 1,7 veces con respecto a los controles ($p < 0,01$), (figura 14B). Además esto se correlaciona con un aumento en la razón Bax/Bcl-2, por el aumento de Bax y la invariabilidad de Bcl-2, llevando a un efecto proapoptótico.

A)

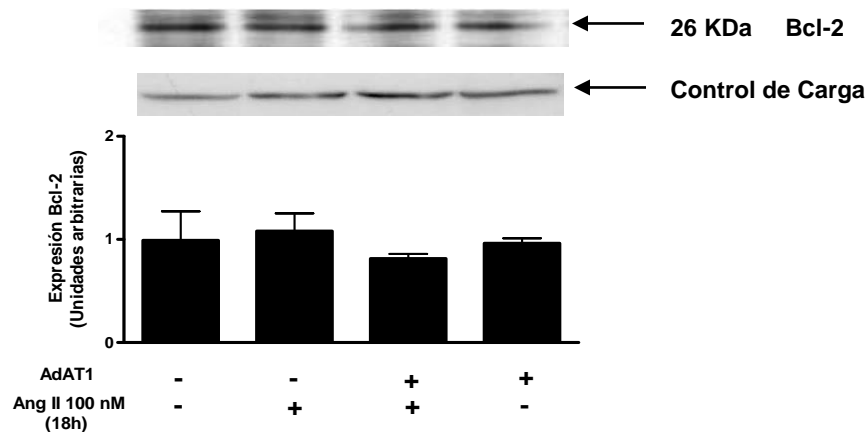


Fig. 14A Determinación en MCN-AdAT1R de los niveles de la proteínas Bcl-2 al ser estimulados con Ang II. Para MCN tanto transducidos como no transducidos con AdAT1R y posterior estimulación con Ang II 100 nM por 18h, se determinaron por WB y posterior cuantificación densitométrica, la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (26 KDa) (fig 14A). La tinción con rojo Ponceau se utilizó como control de carga para ambas proteínas.

B)

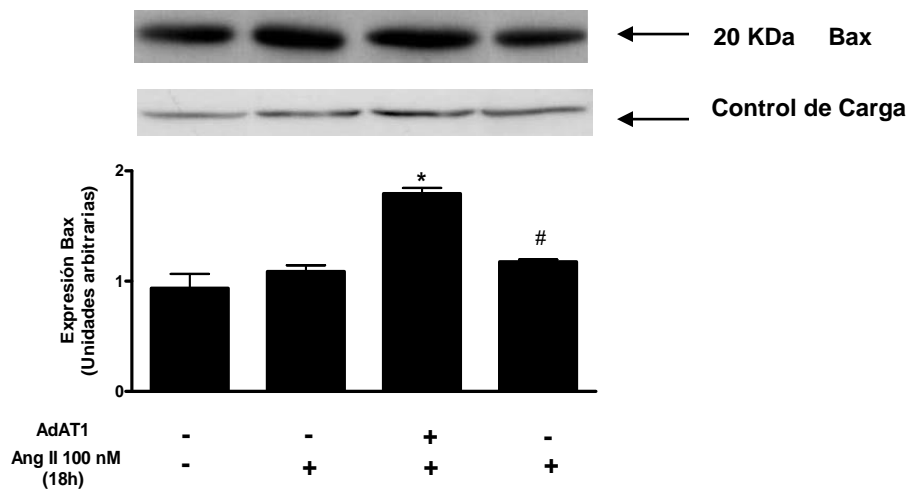


Fig. 14 Determinación en MCN-AdAT1R de los niveles de las proteína Bax al ser estimuladas con Ang II. Para MCN tanto transducidos como no transducidos con AdAT1R y posterior estimulación con Ang II 100 nM por 18h, se determinaron por Western blot y posterior cuantificación densitométrica, de la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax (20 KDa) (fig 14B). La tinción con rojo ponceau se utilizó como control de carga para ambas proteínas. Para la figura 14B, * $p < 0,01$ vs control sin transducir y Ang II, # $p < 0,01$ con respecto al AdAT1R+Ang II.

6.5 Efecto de TGF- β en la viabilidad de los FCN-AdAT1R estimulados con Ang II.

Para clarificar si la mayor resistencia a la apoptosis del MCN-AdAT1R respecto del FCN-AdAT1R, se debía a un efecto debido a diferencias por el tipo celular o sí la preincubación con TGF- β_1 activaba un mecanismo protector sobre el FCN-AdAT1R, se realizaron ensayos preincubando con TGF- β_1 por diferentes tiempos. Para tal efecto los FCN-AdAT1R se preincubaron por tiempos variables con TGF- β_1 y se evaluó la viabilidad celular por el método del MTT. Los resultados indicaron que la pérdida en la viabilidad inducida por Ang II se previno por TGF- β_1 previa preincubación por 72h ($p < 0,001$). La preincubación por 96h con TGF- β_1 , previno completamente el efecto de Ang II sobre la viabilidad del el FCN-AdAT1R.

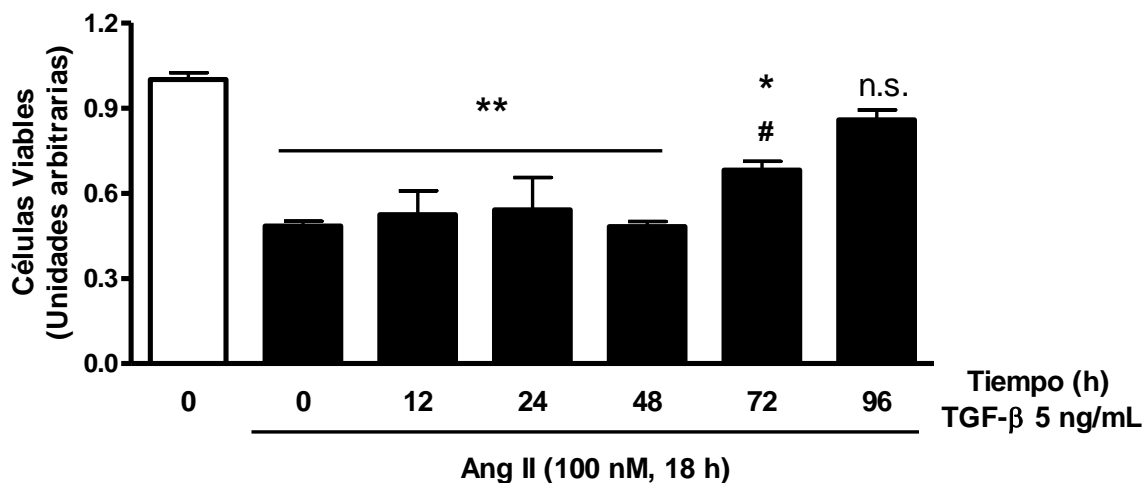


Fig. 16 Efecto de TGF- β_1 en la viabilidad de los FCN-AdAT1R estimulados con Ang II. Efectos del TGF- β_1 , tiempo dependiente, en la viabilidad celular medida por el método del MTT de los FCN-AdAT1R estimulados con Ang II 100 nM por 18h. ** $p < 0,001$ vs control; no significante (n.s.) vs control; * $p < 0,01$ vs control; # $p < 0,01$ con respecto a C + Ang II.

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo nos indican que el FCN experimenta muerte al sobreexpresar AT1R y ser estimulados posteriormente con Ang II, dicha muerte celular corresponde al tipo apoptótico dependiente de mitocondria. El mecanismo es a través de la activación de la vía AT1R-PLC-PKC, que induce la sobreexpresión de Bax, la pérdida del $m\Delta\psi$ y la activación de la caspasa 3.

7.1 Efecto de Ang II sobre la muerte del FCN-AdAT1R

Está bien reportado en la literatura el papel que Ang II tiene en el remodelamiento cardiaco(40). Sin embargo, respecto a las respuestas celulares que se observan en este proceso, son aún materia de discusión si corresponden a acciones directas o indirectas de este péptido sobre el fibroblasto y por tanto, secundarias, adaptativas o paracrinas(41).

Esta descrito en la literatura que en sitios de injuria o cicatrización cardiacos, p.e después del infarto al miocardio, los niveles de AT1R, ECA y la propia Ang II están aumentados, tomando esta última un papel principal en este proceso(6,25). A pesar de esto, son pocos los estudios que relacionan el efecto de Ang II sobre fibroblastos y miofibroblastos que sobreexpresen AT1R. Para resolver este problema, hemos utilizado un adenovirus de construcción Ad-GFP-NHA-AT1R que permiten sobreexpresar el AT1R (AdAT1R). Este adenovirus es bicistrónico, ya que co-expresa el receptor de Ang II del subtipo AT1R de rata (con epítipo HA en extremo N-terminal) y GFP (proteína fluorescente Verde) como marcador de transducción, dirigidos por el promotor CMV. Es por esta razón que el AdAT1R transducido se caracterizó mediante microscopia epifluorescente y por citometría de flujo para detectar la expresión de GFP. Los resultados obtenidos en este trabajo indican claramente la expresión de la proteína verde GFP por ambos métodos, lo que se puede correlacionar con una efectiva transducción del AdAT1R. Además, en resultados obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio se confirma que la fluorescencia verde obtenida por microscopia epifluorescente se correlaciona con la expresión del AT1R presente, lo cual se ratificó por estudios de unión de radioligandos(26).

Resultados previos de nuestro laboratorio utilizando el método del MTT demostraron que Ang II redujo la viabilidad de FCN-AdAT1R, en una manera dosis y tiempo dependiente(26). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo confirman los efectos

negativos sobre la viabilidad celular de Ang II cuando se sobreexpresa el AT1R. Nuestros resultados obtenidos por citometría de flujo, demuestran que Ang II 100 nM de una manera tiempo dependiente induce muerte del FCN-AdAT1R, comenzando este efecto a denotarse a las 18h de estímulo con un 33% de muerte, hasta un máximo de 70% observado a las 48h. Estos datos se contradicen con lo reportado en la literatura, en la cual se denota un efecto proliferativo de Ang II sobre el fibroblasto cardiaco(33,43), aunque estas diferencias pueden deberse al número de receptores. En dichos estudios el número de los AT1R no fueron modificados, es decir, se presentan en forma natural, en comparación a la sobreexpresión del AT1R en nuestro modelo experimental. A este respecto, se desconoce que consecuencias traería el exceso de activación de los receptores AT1 en los FCN, pero según nuestros resultados serían deletéreos para este tipo celular. En este sentido, en la literatura es relativamente escasa la información del efecto proapoptótico de Ang II sobre los fibroblastos cardiacos. Además, se conoce que Ang II conduce a la proliferación de este tipo celular en condiciones normales. Sin embargo, bajo condiciones patológicas como en un estado post-infarto donde se produce la sobreexpresión del AT1R no se ha evaluado el efecto de Ang II. Nuestros resultados indican que el FCN-AdAT1R muere por Ang II en estas condiciones, utilizando la citometría de flujo se demostró que dicha muerte celular corresponde a una masiva apoptosis. Ang II 100 nM induce apoptosis (28%, respecto del control a las 18h de estímulo). En este sentido, se ha observado que en el corazón, Ang II induce apoptosis en cardiomiocitos de ratas a través de la activación de ambos tipos de receptores de Ang II(35). Sin embargo, en células del músculo liso vascular Ang II ejerce un efecto antiproliferativo y proapoptótico solamente a través del receptor tipo AT2, contrarrestando los efectos de AT1, específicamente en el proceso de formación de la neoíntima(36). En conjunto, estos resultados indican que los efectos de Ang II son dependientes tanto del tipo celular como de la especificidad de los receptores activados.

7.2 Ang II gatilla apoptosis del FCN-AdAT1R

Ang II gatilla la vía apoptótica tanto en células cardiacas (cardiomiocitos y células endoteliales)(34,36) como no cardiacas (células del musculo liso vascular del glomérulo)(43), en estos modelos se ha observado que la desregulación de proteínas encargadas de controlar la apoptosis es crucial para que se desarrolle dicho evento, estas proteínas son las denominas proteínas de la familia Bcl-2, las cuales se dividen en dos

tipos, según si son proapoptóticas, como Bax o Bak o si su función es antiapoptótica como Bcl-2 o Bcl-xl(32). Sin embargo, es la razón Bax/Bcl-2 la que determina si una célula vive o muere por apoptosis luego de un estímulo. Se ha reportado que Ang II, a través de su receptor AT1, ocasiona muerte por apoptosis en cardiomiocitos, por promover el aumento de los niveles de Bax y una disminución en los niveles de Bcl-2(34). Por otro lado, en fibroblastos cardiacos se ha observado que algunos estímulos apoptóticos, como etopósido y estaurosporina conducen a la disminución en los niveles de Bcl-2 sin cambios en los niveles de Bax, promoviendo la apoptosis(31). Nuestros resultados demuestran que Ang II produce un aumento de la razón Bax/Bcl-2 en el FCN-AdAT1R, favoreciendo la apoptosis, y sugieren que el aumento en los niveles de Bax, más que una disminución en Bcl-2, gatillaría la apoptosis. Ang II ocasiona un aumento en los niveles de expresión de Bax 2,5 veces comparado al control. Este resultado coincide con observaciones realizadas en cardiomiocitos de ratas espontáneamente hipertensas(44), las cuales manifiestan aumento de la razón Bax/Bcl-2 y dicho efecto es revertido por el tratamiento crónico de estas ratas con Losartan. Además, se ha reportado que la estimulación con Ang II por medio del AT1R sobre cardiomiocitos y células del glomérulo renal lleva a un aumento en los niveles de Bax(34,43) y en ambos modelos experimentales se llega a la apoptosis.

7.3 Ang II induce una pérdida del potencial de membrana mitocondrial en FCN-AdAT1R

Se ha reportado en la literatura que aumento en los niveles de Bax por estiramiento mecánico en cardiomiocitos lleva a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\psi$) por producir la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP)(45). En nuestros resultados se observó que Ang II gatilla una caída en el $m\Delta\psi$, a tiempos iniciales (desde las 6h). Se ha demostrado que la traslocación de Bax a la mitocondria, luego de estímulos proapoptóticos, como el estiramiento mecánico y Ang II, produce disrupción de la membrana mitocondrial externa, por la apertura del mPTP y la consecuente pérdida del $m\Delta\psi$. Esta traslocación de Bax a la mitocondria se produce luego de la activación de Bax, esto último se produce mediante otro tipo de proteínas encargadas de regular la apoptosis celular, estas son las llamadas proteínas con sólo dominio BH3 (BOPs), como Bid o Bim. Por otro lado, también se ha demostrado que estas proteínas conducen a la inhibición de Bcl-2, es por eso que resultaría interesante

investigar que importancia tendrían estas proteínas en el fenómeno visto en nuestro modelo. Esto último podría explicar el nulo efecto de Ang II sobre los niveles de Bcl-2 vistos en este trabajo, ya que Ang II podría estar inhibiendo a Bcl-2 por medio de las proteínas BOPs sin afectar su nivel de expresión, del mismo modo Ang II podría a tiempos iniciales activar a Bax mediante BOPs. La disrupción mitocondrial conduce a la liberación de factores proapoptóticos que llevarían finalmente a la muerte celular programada. Por otro lado, Bcl-2 se opone a la apertura del mPTP, evitando la pérdida del $m\Delta\psi$ y la subsiguiente apoptosis celular(27,31,32). Es así, que un cambio en la razón Bax/Bcl-2 (por aumento de Bax o disminución de Bcl-2 o regulando tanto su activación como su inhibición, respectivamente) conducirían a la apoptosis por abrir mPTP y producir la pérdida del $m\Delta\psi$. Faltaría en nuestro modelo determinar por el uso de fraccionamiento celular si existe traslocación inicial de Bax a la mitocondria y si este evento se correlacionaría con la pérdida del $m\Delta\psi$ vista a tiempos iniciales (6 h) o si este último efecto de Ang II también se podría producir por aumento inicial de los niveles de expresión de la proteína Bax.

7.4 Ang II activa la vía de la caspasa 3 en FCN-AdAT1R.

Está ampliamente descrito en la literatura que factores que producen injuria celular conducen a una rápida liberación desde la mitocondria de factores que favorecen la apoptosis. Entre estos factores se incluyen el Citocromo C (CitC), Apaf 1 y Smac/DIABLO(27,31,32). La liberación de estas proteínas conducen a la activación sucesiva de la caspasa 9 iniciadora y a su principal efector de la vía apoptótica, la caspasa 3. En fibroblastos cardiacos neonatos se ha descrito que factores que inducen la liberación de productos proapoptóticos mitocondriales, como etopósido y estaurosporina, promueven una masiva activación de la caspasa 9 y la caspasa 3(31). Por otro lado, también se ha visto que algunas citoquinas inductoras de muerte celular, como la IL-1, conducen a la activación de la caspasa 3 y la subsiguiente apoptosis celular en los fibroblastos cardiacos(33). Nuestros resultados coinciden con lo descrito en la literatura, hemos observado que Ang II induce la fragmentación de la procaspasa 3 en los FCN-AdAT1R en comparación a los controles. Así la razón caspasa-3/procaspasa-3 aumentó 4 veces respecto de los controles. Estos resultados subrayan el rol preponderante que tiene la caspasa 3 en la apoptosis celular en muchos modelos experimentales, incluido el nuestro.

7.5 Participación de la vía AT1R-PLC-PKC en la apoptosis inducida por Ang II en FCN-AdAT1R

Para confirmar si los eventos que conducen a la apoptosis inducida por Ang II en nuestro modelo experimental, son dependiente de la activación del AT1R, nosotros evaluamos el efecto de bloquear el receptor AT1 con Losartan. Este antagonista específico bloqueó todos los efectos gatillados por Ang II (pérdida del $m\Delta\psi$, fragmentación del DNA, fragmentación de procaspasa-3 y aumento en los niveles de Bax). Resultados similares se observaron en ratas espontáneamente hipertensas, donde Ang II conduce a una masiva apoptosis de los cardiomiocitos, efecto que se correlaciona con un aumento en los niveles de Bax y un fragmentación de la procaspasa 3 y en los que candesartan(44), otro antagonista del AT1R bloqueó los efectos inducidos por Ang II.

Una de las vías clásicas de señalización del AT1R, es la activación de la fosfolipasa del subtipo C (PLC), el aumento intracelular de Ca^{+2} y la activación subsiguiente de la proteínkinasa C (PKC)(13,19). Con el fin de demostrar si la vía de señalización intracelular activada por Ang II, PLC-PKC, es la responsable de los eventos que llevan a la apoptosis de los FCN-AdAT1R, utilizamos U73122 (inhibidor inespecífico de PLC) y Gö6976 (inhibidor inespecífico de PKC). Ambos inhibidores bloquearon completamente los efectos inducidos por Ang II sobre los FCN-AdAT1R, confirmando que los efectos deletéreos de este octapéptido son consecuencia de la activación de la vía PLC-PKC. Es importante hacer notar, que el Ca^{+2} podría tener una participación clave en los efectos producidos por Ang II y que es un punto que faltaría por estudiar en nuestro modelo. Sin embargo, resultados previos de nuestro laboratorio han confirmado la participación del Ca^{+2} extracelular como un factor clave en la muerte del fibroblasto cardiaco adulto que sobreexpresa el AT1R(38). Estos resultados son concordantes con lo descrito por Policha y cols(46), quienes han demostrado que en células HEK 293, existe una isoforma de PKC que se activa en forma permanente por la entrada de Ca^{+2} desde el medio extracelular. Por lo tanto, en nuestros resultados la activación del AT1R en FCN-AdAT1R podría inducir una entrada masiva de Ca^{+2} , la que activaría esa isoforma de PKC provocando la muerte celular en forma dependiente de esta vía transduccional. Por otro lado, diferentes efectores moleculares activados por PKC conducen a la apoptosis(47). Altos niveles de Ca^{+2} intracelular inducen caída del $m\Delta\psi$ y liberación de factores pro-apoptóticos como CitC(48). En este sentido, en cultivo de fibroblastos cardiacos, se ha demostrado que Ang II induce un incremento bifásico en los niveles intracelulares de Ca^{+2} con un pick inicial

elevado producto del Ca^{+2} almacenado en los reservorios intracelulares y luego un plateau involucrando un flujo externo de Ca^{+2} (49). Por otro lado, se ha demostrado en distintos modelos experimentales que el aumento de Ca^{+2} intracelular y a nivel mitocondrial, es capaz de producir un aumento en los niveles de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (50). Así mismo, se ha visto que en cardiomiocitos la activación del AT1R por Ang II conduce a la activación de NADPH oxidasa con la consecuente activación de iNOS y la generación de ROS, lo que lleva a la apoptosis celular por aumentar los niveles de Bax(34). También se ha observado que en otros tipos celulares PKC posee efectos estimuladores sobre NADPHox(13,51). Datos no mostrados en la presente tesis demuestran que la muerte inducida por Ang II fueron bloqueados por el pre-tratamiento con N-Acetilcisteína (NAC), una especie fuertemente antioxidante, sugiriendo que Ang II produciría un aumento en las especies radicalarias de oxígeno en nuestro modelo experimental. Sin embargo, estos estudios necesitan ser evaluados con más profundidad. En conjunto, estos resultados sugerirían que Ang II induce en los FCN-AdAT1R apoptosis a través de la activación de la vía AT1R-PLC-PKC conduciendo tanto a un aumento del Ca^{+2} intracelular y/o de ROS. Permanece aún por resolver cuales son los mecanismos que conducirían al aumento de Ca^{+2} intracelular y/o de ROS.

7.6 Efecto de Ang II en la viabilidad de MCN-Ad-AT1R

El miofibroblasto cardiaco es un tipo celular que no es residente normal del tejido cardiaco y aparece solo bajo condiciones de daño tisular(5,7). Este tipo celular es un fenotipo mucho más activo que su precursor el fibroblasto. Patológicamente los fibroblastos se diferencian a miofibroblastos principalmente por la secreción de citoquinas pro-inflamatoria y pro-fibróticas, entre ellas TGF- β_1 , la que es producida por los propios fibroblastos o por los macrófagos que son atraídos a la zona dañada(9). Mucho se ha dicho acerca de las diferencias acerca de las propiedades secretoras de ambos tipos celulares, pero casi nada se ha reportado en cuanto a las diferencias que puedan existir en la viabilidad celular frente a estímulos nocivos. En este contexto, pero en fibroblastos y miofibroblastos de piel humana, se ha demostrado que los fibroblastos son más propensos a la apoptosis que los miofibroblastos obtenidos a partir de cicatrices del tipo queloides. Estas diferencias radican, en la diferente expresión de las proteínas de la familia Bcl-2, donde los fibroblastos expresan menor cantidad de Bcl-2 y mayor de Bax, en

contraposición a los miofibroblatos(52). En este sentido, nuestros resultados demuestran que los FCN-AdAT1R son más propensos a la apoptosis inducida por Ang II que los MCN-AdAT1R, y que ello puede residir en los niveles de Bax, el cual es ser mayor para los fibroblastos. Queda aún por demostrar lo que pudiera estar aconteciendo con respecto al $m\Delta\psi$ y la activación de la Caspasa 3 en MCN-AdAT1R. Para entender sí, la mayor resistencia a la muerte del MCN-AdAT1R en comparación al FCN-AdAT1R en nuestro modelo experimental, se debía a una marcada diferencia entre ambos tipos celulares, o si TGF- β_1 gatillaba una vía de señalización que se opone a la acción deletérea de Ang II, se determinó el efecto que tiene el tiempo de preincubación con TGF- β_1 sobre la viabilidad del FCN-AdAT1R. Varios reportes han indicado que TGF- β_1 posee acciones contrarias con respecto a la viabilidad celular, según el tipo celular y el modelo experimental. Por un lado, algunos autores indican propiedades inductoras de la muerte celular por apoptosis(53) y por otro lado, otros autores han encontrado que TGF- β_1 protege contra efectos deletéreos para la célula(54). Con respecto a este último punto, se ha demostrado que los miofibroblastos de origen pulmonar son menos propensos a los efectos apoptóticos de IL-1, al ser pretratados con TGF- β_1 y este hecho se produce por disminución en los niveles de iNOS y la mayor expresión de Bcl-2(54). Nuestros resultados avalan esta última evidencia, luego de que se demostró que TGF- β_1 , a tiempos prolongados, esto es 72 y 96 h, protege frente al efecto negativo que tiene Ang II sobre la viabilidad celular del FCN-AdAT1R. Este hecho confirma que en FCN-AdAT1R TGF- β_1 tiene propiedades pro-sobrevida en nuestro modelo experimental. Sin embargo, el efecto protector de TGF- β_1 frente a los efectos nocivos de Ang II sobre los FCN-AdAT1R sería cuando éstos estarían casi totalmente diferenciados a MCN, porque a tiempos cortos (entre 6h – 48h) en donde no existirían prácticamente MCN, la cantidad de células apoptóticas no es distinta entre Ang II y Ang II + TGF- β_1 , dando cuenta que los FCN resisten a los efectos de Ang II sólo cuando son diferenciados a MCN. En conjunto, estos resultados indican que TGF- β_1 le confiere al FCN resistencia a la apoptosis, sólo cuando ya es diferenciado a MCN, frente a estímulos nocivos como la privación de nutrientes(52), IL-1(54) y Ang II(este trabajo). Queda aún por definir en nuestro modelo experimental, el mecanismo por el cual TGF- β_1 modula la mayor supervivencia del MCN.

Finalmente, muy poco se ha documentado sobre las consecuencias que traería la muerte por apoptosis del FC y del MC y la consecuente pérdida de su principal actividad, la producción y mantenimiento de la MEC, lo cual llevaría finalmente a un remodelamiento

adverso conduciendo a una falla en el funcionamiento del miocardio. Esto puede resultar importante, puesto que se ha documentado que la pérdida en la integridad de la MEC miocárdial parece ser un factor crítico en la dilatación ventricular que ocurre en la insuficiencia cardíaca(55). Anand et al(56) demostraron que la función de los cardiomiocitos aislados y obtenidos de una región remota a un infarto de miocardio en ratas fueron normales, sin embargo, la disfunción sistólica existente en dicha zona remota al infarto podría deberse a factores derivados de las células no miocíticas, principalmente los fibroblastos, y a alteraciones no miocíticas las que podrían incluir anomalías en la MEC, las que en conjunto llevarían a una ineficiente transmisión de fuerza debido a falla en el acoplamiento entre los miocitos, y entre los miocitos con la MEC. Esto resulta más interesante en corazones humanos post-infarto y modelos de infarto de ratas donde se encuentra sobrepresado el sistema SRAA, y principalmente el AT1R(6,25). En este sentido, está bien documentado que el tratamiento farmacológico tanto con antagonistas del AT1R e inhibidores de la ECA, mejoran la función cardíaca post-infarto. Nuestros resultados demuestran que Ang II ocasiona efectos más deletéreos sobre el FCN que sobre el MCN que sobrepresan el AT1R. Esta respuesta diferencial de Ang II podría regular el equilibrio supervivencia/muerte del fibroblasto y miofibroblasto durante el proceso de cicatrización post-infarto, condiciones en que se sobrepresa AT1R. Una proliferación exacerbada de los fibroblastos en presencia de TGF- β_1 llevarían a una excesiva cantidad de miofibroblastos, produciendo por lo tanto, un excesivo depósito de proteínas de la MEC, lo que llevaría a una fibrosis patológica. Por otro lado, el menor efecto sobre la viabilidad de los miofibroblastos post-infarto, asegura que la reparación del tejido se lleve a cabo de una manera correcta y eficaz. En conjunto, estos resultados podrían indicar que la muerte del fibroblasto y el miofibroblasto cardíaco sería uno de los factores que conducirían a la pérdida de la función contráctil del corazón, llevando finalmente a la insuficiencia cardíaca, y en segundo lugar destaca más aún el efecto citoprotector de los antagonistas de la vía del AT1R como Losartan en condiciones de alta actividad del sistema SRAA.

Las limitaciones que afectan a este trabajo son:

- Falta del control AdGFP, para determinar como afecta a nuestro modelo experimental el solo hecho de transducir con un adenovirus.

- No haber determinado la traslocación de Bax a la mitocondria y el nivel de expresión de dicha proteína a tiempos iniciales, cuando se observa pérdida del $m\Delta\psi$.
- También faltó determinar tanto por WB como por inmunocitoquímica la traslocación de marcadores importantes de la apoptosis, como lo es el CitC.
- Falta en determinar la participación de la vía extrínseca de la apoptosis en nuestro modelo experimental, como tBid o caspasa 8.

8. CONCLUSIONES

- Ang II ocasiona la muerte de los FCN-AdAT1R de una manera tiempo dependiente.
- La muerte producida en FCN-AdAT1R por Ang II, corresponde a apoptosis por la vía mitocondrial, con pérdida del $m\Delta\psi$, aumento en los niveles de Bax y fragmentación de la Caspasa 3.
- Los efectos deletéreos producidos por Ang II sobre los FCN-AdAT1R, acaecen por la activación de la vía AT1R-PLC-PKC.
- Ang II ocasiona en MCN-AdAT1 pérdida de la viabilidad celular, apoptosis y aumento en los niveles de Bax.
- Ang II produce un efecto diferencial con mayor sensibilidad sobre los FCN-AdAT1R, en cuanto a viabilidad celular, apoptosis y nivel de la proteína Bax.
- TGF- β_1 produce rescate de los FCN-AdAT1R de los efectos pro-muertes de Ang II, a tiempos en los que existirían prácticamente sólo MCN-AdAT1R.

9. BIBLIOGRAFIA.

1. Ministerio de salud, 2004, Departamento de Estadística e información en salud 2004. www.minsal.cl
2. Organización Mundial de la Salud, 55ª Asamblea Mundial de la Salud, A55/16, punto 13.11, 27 de Marzo de 2002.
3. Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterization of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 2005; 65:40-51.
4. Booz GW, Baker KM. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 1995; 30:537-543.
5. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol.* 2003; 200:500-3.
6. Weber KT. Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertens.* 2004; 22:47-50.
7. Powell D, Mifflin R, Valentich J, Crowe S, Saada J, West A. Myofibroblasts. I Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physio.* 1999; 277: C1-C19.
8. Walker G, Masters K, Shah D, Anseth K, Leinwand L. Valvular myofibroblasts activation by transforming growth factor- β . *Circ Res.* 2004; 95: 253-260.
9. Bujack M, Frangoigianis N. The role of TGF- β signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 2007;74: 184-195.
10. Dostal D. The cardiac renin–angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. *Cardiovasc Res.* 2000; 91: 1-11.
11. Siragy H. Angiotensin II receptors blockers: Review of the binding characteristics. *Am J Cardiol.* 1999; 84:3S-8S.
12. Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Kudoh S, Aikawa R, Zhu W, Shiojima I, Hiroi Y, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y. Cell type-specific angiotensin II-evoked signal transduction pathways. *Circ Res.* 1998; 82:337-345.
13. Touyz R, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Biol Res* 2002; 35: 1001-1015
14. Bader M. Role of the local renin-angiotensin system in cardiac damage: a minireview focussing on transgenic animal models. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34: 1455-1462
15. Sun Y, Weber KT. RAS and connective tissue in the heart. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35:919-31.

16. Tsutsui H, Matsushima S, Kinugawa S, Ide T, Inoue N, Ohta Y, Yokota T, Hamagushi S, Sunagawa K. Angiotensin II type 1 receptor blocker attenuates myocardial remodeling and preserves diastolic function in diabetic heart. *Hypertens Res.* 2007; 30: 439–449
17. Liu Y, Yang X, Sharov V, Nass O, Sabbah H, Peterson E, Carretero O. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin ii type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. *J Clin Invest.* 1997; 99:1926–1935
18. Hoon Choi J, Hwan Yoo K, Won Cheon H, Burm Kim K, Sook Hong Y, Won Lee J. Angiotensin converting enzyme inhibition decrease cell turnover in the neonatal rat heart. *Pediatric Res.* 2002; 52:325-333.
19. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000; 52:415-72.
20. Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Kudoh S, Aikawa R, W. Zhu, Shiojima I, Hiroi Y, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y. Cell type-specific angiotensin II-evoked signal transduction pathways. *Circ Res* 1998;82:337-345.
21. Schiffrin E. Vascular and cardiac benefits of angiotensin receptor blockers. *Am J Med.* 2002; 113: 409
22. 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 Ca²⁺/calmodulin-sensitive tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 1996;271: 14169–14175.
23. 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: 57–61.
24. 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 :303-10.
25. Sun Y, Weber KT. Cells expressing angiotensin II receptors in fibrous tissue of rat heart. *Cardiovasc Res.* 1996; 31:518–525.
26. Soto C. Memoria de título “Muerte celular de fibroblastos y miofibroblastos cardiacos neonatos por sobreexpresión de los receptores tipo 1 y 2 de angiotensina II”. 2006. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

27. Bratton S, Cohen G. Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Pharmacol. Sciences*. 2001; 22: 306-315.
28. Guimaraes C, Linden R. Programmed cell death: Apoptosis and alternative deathstyles. 2004; 271: 1638:1650.
29. Strasser L, O'Connor V. Apoptosis Signaling. *Biochem*. 2000; 69:217-245
30. Regula K, Kirshenbaun L. Apoptosis of ventricular myocytes: a means to an end. *J of Mol and Cell Cardiology*. 2005; 38:3-13.
31. 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.
32. Gross J, McDonnell S, Korsmeyer, R. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*. 2006; 13:1899-1911.
33. Tian B, Liu J, Bitterman P, Bache R. Mechanism of cytokine induced NO-mediated cardiac fibroblast apoptosis. *Am J Physiol Heart*. 2002; 283:1958-1967.
34. Grishko V, Pastukh V, Solodushko V, Gillespie M, Azuma J, Shaffer S. Apoptotic cascade initiated by angiotensin II in neonatal cardiomyocytes: role of DNA damage. *Am J Physiol*. 2003;285:H2364-H2372.
35. 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;19:1681-1689
36. 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.
37. Bodh I, Jugdutt C, Vijayan M. AT2 receptor and apoptosis during AT1 receptor blockade in reperfused myocardial infarction in the rat. *Mol Cell Bioch* 2004; 262: 203–214.
38. Aránguiz P. Memoria de título: “Sobreexpresión de receptores tipo AT₁ y AT₂ de angiotensina II en fibroblastos cardiacos adultos de rata: participación en el equilibrio sobrevida / muerte celular inducida por angiotensina II”. 2005. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
39. 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 Bio Chem*. 1997; 31:19115-19124.

40. Dostal DE, Baker KM. Angiotensin-II stimulation of left-ventricular hypertrophy in adult-rat heart - mediation by the AT1 receptor. *Am J Hypertens.* 1992; 5:276-280.
41. Booz GW, Dostal DE, Baker KM. Paracrine actions of cardiac fibroblasts on cardiomyocytes: Implications for the cardiac renin-angiotensin system. *Am J Cardiol.* 1999; 83:44H-47H.
42. Tian B, Liu J, Bitterman P. and. Bache R. Angiotensin II modulates nitric oxide-induced cardiac fibroblast apoptosis by activation of AKT/PKB. *Am J Physiol Heart.* 2003; 285:1105-1112.
43. Ding G, Kapasi A, Franki N, Gibbons N, Kasinath B, Singhal P. Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Heart.* 2002; 283:173-180.
44. Fortuño M, Ravassa S, Etayo J, Diez X. Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in left ventricle of spontaneously hipertensive rats. *Hypertension.* 1998; 32:280-286.
45. Xu Dong Liao, Xiao Hui Wang, Hai Jing Jin, Lan Ying Chen, Quan Chen. Mechanical stretch induces mitochondria-dependent apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes and G2/M accumulation in cardiac fibroblasts. *Cell research.* 2004; 14:16-26.
46. Policha A, Daneshtalab N, Chen L, Dale L, Altier C, Khosravani H, Thomas W, Zamponi G, Ferguson S. Role of angiotensin II type 1A receptor phosphorylation, phospholipase D, and extracellular calcium in isoform-specific protein kinase C membrane translocation responses. *J Biol Chem.* 2006; 281:26340–26349.
47. Li D, Yang B, Philips M, Mehta J. Proapoptotic effects of Ang II in human coronary artery endothelial cells: role of AT1 receptor and PKC activation. *Am J Physiol.* 1999; 276:786-792.
48. Gogvadze V, Robertson J, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release occurs via Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent mechanisms that are regulated by Bax. *J Biol Chem* 2001; 276: 19066-19071.
49. Brilla C, Scheer C, Rupp H. Angiotensin II and intracellular calcium of adult cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 1237-1246.
50. Brookes P, Yoon S, Robotham J, Anders M, Shey-Shing S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physio.* 2004; 287: 817–833.
51. Yuan Fan CH, Katsuyama M, Yabe-Nishimura CH. PKC δ mediates up-regulation of NOX1, a catalytic subunit of NADPHox, via transactivation of the EGF receptor: possible involvement of PKC δ in vascular hypertrophy. *Biochem J.* 2005; 390: 761–767

52. Moulin V, Larochelle S, Langlois C, Thibault I, Lopez C, Roy M. Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblast have differential responses to apoptotic inducers. *J of cellular physiology*. 2004; 358:350-358.
53. Edlund S, Bu S, Schuster N, Aspenström P, Heuchel R, Heldin NE, Dijke P, Heldin CH, Landström M. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3. *Mol Biol Cell*. 2003; 14:529-544.
54. Hong-Yu Z, Sem H. Phan. Inhibition of Myofibroblast apoptosis by Transforming Growth Beta 1. *J Am Respir Cell Biol*. 1999; 21:65-665.
55. Pelouch V, Dixon IM, Golfman L, Beamish RE, Dhalla NS. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem*. 1993; 129: 101–120.
56. Anand IS, Liu D, Chugh SS, Prahash AJ, Gupta S, John R, Popescu F, and Chandrashekar Y. Isolated myocyte contractile function is normal in postinfarct remodeled rat heart with systolic dysfunction. *Circulation*. 1997; 96: 3974–3984.