



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

**ANGIOTENSINA II MODIFICA EL COMPORTAMIENTO
CELULAR DE MIOFIBROBLASTOS CARDIACOS DE
RATAS NEONATAS QUE SOBRE EXPRESAN EL
RECEPTOR SUBTIPO AT₁**

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

MARÍA FRANCISCA MATELUNA GUAJARDO

Director de tesis:

Dr. Guillermo Díaz-Araya
Depto. de Química Farmacológica y
Toxicológica
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Codirectora de tesis:

Dra. Lorena García Nannig
Depto. de Bioquímica y Biología
Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Profesor patrocinante:

Dr. Guillermo Díaz-Araya

Santiago, Chile

2007

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	X
SUMMARY.....	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Generalidades.....	1
1.2. Sistemas celulares cardiacos.....	1
1.2.1. Fibroblastos.....	1
1.2.2. Miofibroblastos.....	1
1.3. Comportamiento celular.....	2
1.4. Sistema renina angiotensina aldosterona.....	4
1.5. SRAA en fibroblastos y miofibroblastos.....	5
2. HIPÓTESIS.....	7
3. OBJETIVOS.....	7
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
5.1. Reactivos.....	8
5.2. Modelo animal.....	8

	Página
5.3. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardiacos de ratas neonatas.....	8
5.4. Desdiferenciación de fibroblastos cardiacos a miofibroblastos.....	9
5.5. Tinción de células con cristal violeta.....	9
5.6. Ensayo de migración celular.....	9
5.7. Transducción adenoviral.....	10
5.8. Ensayo de proliferación.....	10
5.9. Ensayo de adhesión.....	11
5.10. Ensayo de contracción de geles de colágeno.....	11
5.11. Preparación de extractos celulares totales.....	11
5.12. Preparación de medio de cultivo celular.....	12
5.13. Electroforesis de geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes.....	12
5.14. Electrotransferencia de proteínas.....	13
5.15. Western Blot.....	13
5.16. Zimografía.....	14
5.17. Microscopía de transmisión y de epifluorescencia.....	14
5.18. Análisis estadístico.....	15
6. RESULTADOS.....	16
6.1. Evaluación de desdiferenciación de FCN a MCN por efecto de TGF- β_1	16
6.2. Evaluación del efecto de Ang II sobre la proliferación y migración de MCN que sobre expresan el AT ₁ R.....	17
6.3. Efecto de Ang II sobre adhesión de MCN transducidos con AdAT ₁ R.....	20

	Página
6.4. Efecto de Ang II sobre contracción de MCN transducidos con AdAT ₁ R.....	22
6.5. Efecto de Ang II sobre expresión y secreción de proteínas de matriz en MCN transducidos con AdAT ₁ R.....	23
6.6. Efecto de Ang II sobre actividad de MMP-2 en MCN transducidos con AdAT ₁ R.....	26
7. DISCUSIÓN.....	27
8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	34
9. CONCLUSIONES.....	36
10. BIBLIOGRAFÍA.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Comportamiento celular: migración, adhesión, proliferación y secreción de proteínas de la MEC: modelo del rol de fibroblastos y miofibroblastos durante la cicatrización de una herida.....	4
Figura 2	Desdiferenciación de fibroblastos cardiacos a miofibroblastos.....	16
Figura 3	Curva de incorporación de [H ³]-Timidina.....	18
Figura 4	Evaluación de proliferación en miofibroblastos cardiacos que sobre expresan el AT ₁ R.....	18
Figura 5	Efecto de angiotensina II sobre migración de miofibroblastos cardiacos que sobre expresan el AT ₁ R.....	19
Figura 6	Curva de miofibroblastos cardiacos adheridos sobre plástico.....	20
Figura 7	Efecto de angiotensina II sobre la adhesión de miofibroblastos cardiacos...	21
Figura 8	Efecto de angiotensina II sobre la adhesión de miofibroblastos cardiacos que sobre expresan el AT ₁ R.....	21
Figura 9	Curva de contracción de geles de colágeno	22
Figura 10	Efecto de angiotensina II sobre la contracción de miofibroblastos cardiacos que sobre expresan el AT ₁ R.....	23
Figura 11	Efecto de angiotensina II sobre la expresión de fibronectina en extracto celular de miofibroblastos cardiacos que sobre expresan el AT ₁ R.....	24
Figura 12	Efecto de angiotensina II sobre secreción de fibronectina al medio de cultivo celular de miofibroblastos cardiacos que sobre expresan el AT ₁ R....	25
Figura 13	Efecto de angiotensina II sobre expresión de colágeno tipo I en extracto celular de miofibroblastos cardiacos que sobre expresan el AT ₁ R.....	25
Figura 14	Efecto de angiotensina II sobre la actividad de metaloproteinasa-2 en miofibroblastos transducidos con AdAT ₁ R.....	26

ABREVIATURAS

α -SMA	: Alfa actina de músculo liso
AdAT ₁ R	: Adenovirus receptor AT ₁
AdAT ₂ R	: Adenovirus receptor AT ₂
AdGFP	: Adenovirus proteína fluorescente verde
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
cm	: Centímetro
CMV	: Citomegalovirus
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
FN	: Fibronectina
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	: Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	: Gel de poliacrilamida denaturante
SEM	: Error estándar de la media
TBS	: Tampón tris salino
TCA	: Acido tricloro acético
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
WB	: Western blot

RESUMEN

Angiotensina II modifica el comportamiento celular de miofibroblastos cardiacos de ratas neonatas que sobre expresan el receptor subtipo AT₁

Los fibroblastos y miofibroblastos cardiacos son elementos claves en el desarrollo del remodelado cardiaco después de un infarto agudo. Una regulación controlada del crecimiento de la población de fibroblastos y miofibroblastos es importante para una correcta cicatrización y mantención de la función cardiaca. Distintas evidencias muestran que los niveles de angiotensina II (Ang II) y del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT₁R) aumentan después del infarto agudo al miocardio. Por esto, falta saber que funciones pueden ser reguladas por Ang II en estas células post-infarto al miocardio cuando se sobre expresan dichos receptores.

Nuestro modelo experimental consideró la sobre expresión del AT₁R en miofibroblastos cardiacos de ratas neonatas (MCN) mediante el uso de adenovirus y determinar si Ang II modifica su comportamiento celular y la secreción de proteínas de la matriz extracelular (MEC). Nuestros resultados mostraron que Ang II aumentó la adhesión de las células a proteínas de matriz, como colágeno y fibronectina, y también produjo un aumento en la capacidad contráctil de MCN. Ang II no modificó la proliferación y migración celular, sin embargo, al sobre expresar el receptor AT₁, observamos que Ang II disminuyó la viabilidad celular, la cual ocurrió luego de 48 h de transducción, afectando la migración, proliferación, contracción y adhesión celular. Por otra parte, Ang II estimuló la secreción de proteínas de matriz, colágeno tipo I y fibronectina, aumentando su expresión al sobre expresar el AT₁R en MCN. Además se observó que Ang II disminuyó la actividad de metaloproteinasa-2 (MMP-2) en MCN que sobre expresan el receptor AT₁, resultado que junto con el anterior nos indica que se favorece la deposición de proteínas de matriz, aumentando la secreción y disminuyendo su degradación.

Los resultados obtenidos muestran que Ang II a través del AT₁R regula en el miofibroblasto la secreción de proteínas de matriz, disminuyendo su degradación, promoviendo la adhesión a proteínas de la MEC y aumentando la contracción de MCN, todas funciones que apuntan a la reparación del tejido cardiaco después de un infarto.

SUMMARY

Angiotensin II modifies cell behavior of neonate rat cardiac myofibroblasts that over-express subtype AT₁ receptor

Cardiac fibroblasts and myofibroblasts are key elements of the development of cardiac remodeling after myocardial infarction. A tight regulation of fibroblast and myofibroblast growth is important to a correct wound healing and to maintain cardiac function. Several lines of evidence have showed an increase in angiotensin II (Ang II) and AT₁R levels after myocardial infarction. Thus angiotensin II may play a pivotal role in the regulation of number and function of these cells.

Our experimental model considered over-expressing AT₁R in neonatal rat cardiac myofibroblasts (MCN) using adenovirus and to evaluate whether Ang II modifies cell behavior and extracellular matrix (ECM) proteins secretion. Our results show that the stimulation with Ang II increased the adhesion of the cells to ECM proteins, as collagen and fibronectin, and also produced an increase in MCN's contractile capacity. Ang II did not modify proliferation and cellular migration; nevertheless, in MCN over-expressing AT₁R, we observe that Ang II diminished cellular viability, which happened after 48 h of transduction, affecting the migration, proliferation, contraction and cellular adhesion. On the other hand, Ang II promoted the secretion of ECM proteins, collagen type I and fibronectin, increasing their expression in MCN over-expressing the AT₁R. In addition we observed that Ang II diminished the activity of metalloproteinase-2 (MMP-2) in MCN that over-express the AT₁ receptor, and this together with the previous result, indicates that the deposition of ECM proteins is favored, increasing the secretion and diminishing their degradation.

The obtained results demonstrate that the myofibroblast is a key piece in wound healing after myocardial injury, and that Ang II regulates great part of this process, via AT₁ receptor, increasing the secretion of ECM proteins and diminishing their degradation, promoting the adhesion to ECM proteins and increasing MCN's contraction, all functions that point at the repair of the cardiac tissue after a heart attack.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

Actualmente, las enfermedades cardiovasculares dan cuenta del 27% de la mortalidad en los países desarrollados y se proyecta que para el año 2020 serán la causa del 37% de los fallecimientos y del 60% de la morbilidad¹. Por ello es de primera importancia conocer sus causalidades a un nivel molecular.

1.2. Sistemas celulares cardiacos

1.2.1. Fibroblastos

Desde el punto de vista celular, el corazón está compuesto principalmente por cardiomiocitos y células no musculares (entre ellas, fibroblastos, células de músculo liso vascular, células endoteliales, mastocitos, y células residentes del sistema inmune).

Los fibroblastos representan dos tercios de la población celular del corazón². Inicialmente se pensó que los fibroblastos tenían una función meramente estructural. Sin embargo, hoy se sabe que son un elemento celular muy activo, porque pueden migrar, proliferar y en condiciones patológicas pueden desdiferenciarse a miofibroblastos³. Además, poseen una amplia variedad de receptores, secretan diversos factores de crecimiento y citoquinas, los que pueden actuar en forma autocrina y/o paracrina, y finalmente son blanco para una amplia variedad de estímulos tanto mecánicos como neuroendocrinos⁴. En condiciones normales, la principal función del fibroblasto es producir proteínas de la matriz extracelular (MEC), la que sustenta a los cardiomiocitos, mientras que en estados patológicos o de daño tisular participan activamente en el proceso de cicatrización^{2, 5}.

1.2.2. Miofibroblastos

Un fibroblasto puede desdiferenciarse a miofibroblasto en respuesta a estímulos mecánicos y químicos al mismo tiempo. De estos últimos, el factor de crecimiento transformante subtipo beta (TGF- β , especialmente el 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) son los más importantes³. Sin embargo, también es necesaria la expresión del fragmento ED-A de fibronectina y tensión mecánica. En condiciones *in*

vitro, la tensión mecánica es otorgada por la adhesión a la placa de cultivo y el miofibroblasto secreta cantidades importantes de fibronectina. El miofibroblasto también posee una amplia variedad de receptores, además secreta diversos factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, y mediadores de inflamación, los que actúan en forma paracrina y autocrina, también secreta proteínas de la MEC (como colágeno tipo I y fibronectina), además son blanco para una amplia gama de estímulos químicos⁶. La principal característica estructural de este tipo celular es la presencia de microfilamentos citoplasmáticos formados por diferentes tipos de proteínas, siendo una de ellas la α -actina de músculo liso (α -SMA). Esta proteína es uno de los principales marcadores del fenotipo del miofibroblasto. Sin embargo, también pueden expresar vimentina, desmina y miosina de cadena pesada de músculo liso^{3, 6}. La principal función del miofibroblasto es la reparación tisular (cicatrización) después de una injuria o daño tisular. Son los principales elementos celulares presentes en el tejido de granulación y desaparecen por una masiva apoptosis cuando la cicatriz se completa³. Los miofibroblastos no son residentes normales del tejido cardíaco, ellos aparecen en el sitio del infarto, debido a la masiva llegada de macrófagos activados que producen TGF- β_1 , estimulando la dediferenciación de fibroblasto a miofibroblasto. Los miofibroblastos pueden persistir en este tejido por prolongados períodos de tiempo, donde generan señales fibrogénicas que perpetúan la reparación del tejido y promueven la fibrosis. Se desconoce porqué los miofibroblastos persisten en el infarto cardíaco después de largo tiempo, en comparación a los miofibroblastos de la piel, los cuales desaparecen por apoptosis una vez sanada la herida⁷.

1.3. Comportamiento celular

En el comportamiento celular se observan fenómenos de migración, adhesión, proliferación, contracción de geles de colágeno y secreción de proteínas de matriz extracelular. Por ejemplo, en el infarto cardíaco, se ha observado que los fibroblastos migran desde la zona del borde (entre el miocardio infartado y el no infartado) a la región dañada, en donde proliferan, secretan proteínas de la MEC y restauran la zona afectada. En unos días, los fibroblastos cardíacos en la cicatriz se diferencian a miofibroblastos⁸.

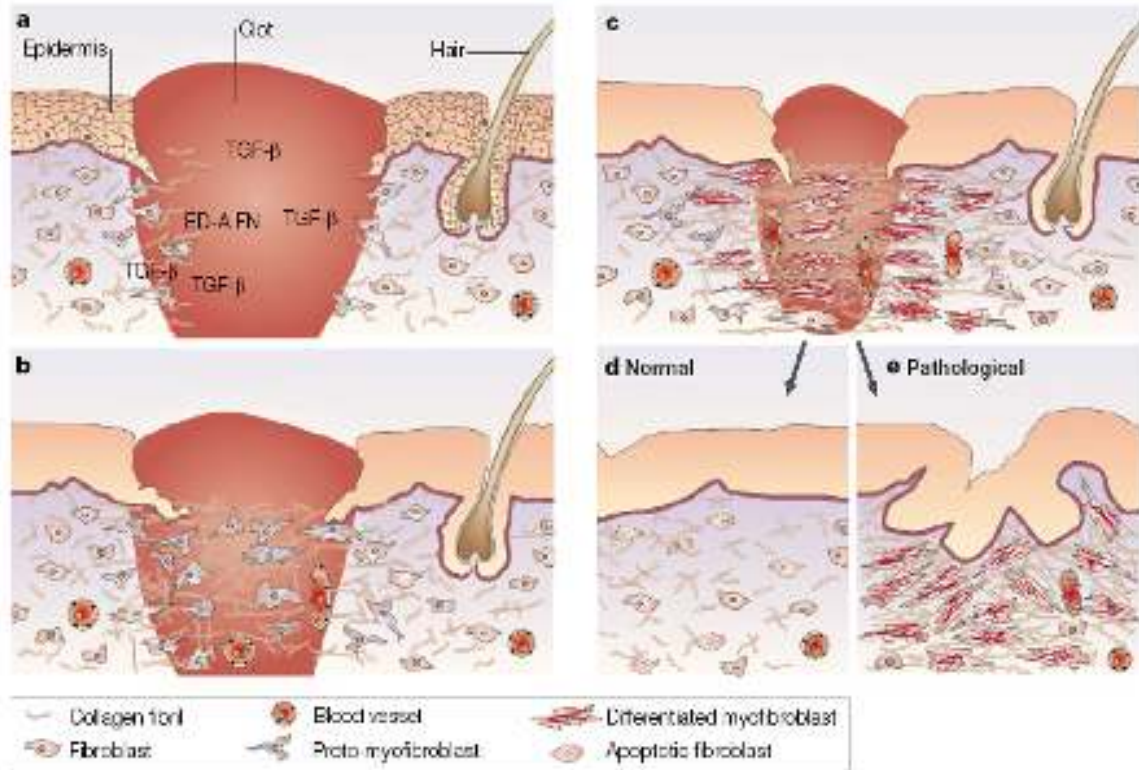
A diferencia de los fibroblastos, los miofibroblastos poseen microfilamentos de actina asociados con proteínas contráctiles tales como miosina no muscular. Los microfilamentos se unen a la superficie del miofibroblasto hacia la MEC a través de

adhesiones focales supermaduras (suFA), estructuras especializadas en la adhesión y caracterizadas por tener un tamaño de 6–30 μm (comparado con las adhesiones focales presentes en fibroblastos de 2–6 μm), que unen α -SMA a través de integrinas $\alpha_5\beta_3$ o $\alpha_5\beta_1$ con el fragmento ED-A fibronectina mediante una compleja composición proteica con altos niveles de vinculina, paxilina y tensina. Todos estos elementos conforman un mecanismo mecano-transductor especializado y característico^{9, 10}. Las suFA potencian la adhesión del miofibroblasto a las proteínas de la MEC, lo cual sumado a su aparato contráctil permite generar una considerable transmisión mecánica en su entorno extracelular^{11,12}. A su vez, las integrinas, permiten una unión directa entre la célula y la matriz que la rodea. En el corazón, la interacción de los fibroblastos con la MEC es crítica para los mecanismos de reparación, incluyendo síntesis de proteínas de matriz, proliferación, contracción y para la motilidad celular^{13, 14}.

Estas características del miofibroblasto, son propias de un fenotipo celular de mayor adherencia a los diferentes sustratos de la MEC, y pueden ser muy importantes en los procesos que gatillan apoptosis (anoikis).

Los miofibroblastos son el tipo celular primordial en contribuir en la reparación y remodelado de tejidos, a través de la síntesis y organización de la MEC, así como también a través de la generación de fuerza (Fig. 1). Los miofibroblastos confieren tensión mecánica a la matriz reestructurada de la zona del infarto, dando soporte y produciendo contracción, lo que produce que los bordes de la herida se unan, reduciendo así, el área total de la cicatriz, mientras que la síntesis y deposición de colágeno provee fuerza a la herida y previene la ruptura de la cicatriz^{15, 16}.

Otra función del fibroblasto y miofibroblasto son su capacidad para contraer geles de colágeno, efecto que está parcialmente mediado por las integrinas β_1 y $\alpha_5\beta_3$. La contracción de geles de colágeno ha sido un modelo tridimensional ampliamente utilizado, y que ha tratado de semejar las condiciones *in vivo* del remodelamiento tisular. Este modelo ha permitido estudiar el efecto de diversos factores de crecimiento, hormonas, estímulos neurohumorales, fármacos, etc. que gobiernan este proceso, utilizando para ello una amplia diversidad de tipos celulares. Sin embargo, en miofibroblastos es un modelo ideal que ha tratado de asemejar las condiciones de cicatrización tisular.



colágeno, cerrando la herida. **d.** Cuando la cicatrización es normal, los miofibroblastos desaparecen por apoptosis. **e.** Sin embargo, en situaciones patológicas, los miofibroblastos persisten y continúan remodelando la MEC lo que genera una contractura del tejido conectivo.

1.4. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

Uno de los principales sistemas neurohumorales que regulan el tamaño de la población celular cardíaca es el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), siendo la angiotensina II (Ang II) su principal efector. A nivel celular, Ang II regula la contracción, el crecimiento, apoptosis y diferenciación celular, la migración celular y el 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^{17,18}. Ang II se une a dos tipos distintos de receptores acoplados a proteínas G, llamados receptores subtipo AT₁ (AT₁R) y subtipo AT₂ (AT₂R). Sin embargo, estos receptores se distinguen por su selectividad a distintos antagonistas no peptídicos¹⁹.

En el corazón, la mayoría de las acciones de la Ang II son mediadas por AT₁R. Este receptor se encuentra expresado en cardiomiocitos y fibroblastos²⁰. En el adulto, la mayoría de los receptores de Ang II son del subtipo AT₁R, mientras que el subtipo AT₂R

es re-expresado después de un daño vascular y cardiaco y durante la cicatrización de las heridas²¹. En el infarto cardiaco los niveles plasmáticos de angiotensinógeno y renina están aumentados y en el tejido cardiaco se observan zonas de alto recambio de colágeno y una alta densidad y actividad de ECA (enzima convertidora de angiotensina I)⁷. Tomando en cuenta lo anterior, se puede deducir que en el sitio del infarto podría existir una sobreproducción de Ang II. Por estos antecedentes, los AT₁R y AT₂R son de vital importancia en el proceso de reparación y remodelado cardiaco

1.5. SRAA en fibroblastos y miofibroblastos

Tanto el fibroblasto como el miofibroblasto expresan principalmente AT₁R en la cicatriz del infarto, donde los niveles de mRNA y la expresión de proteínas del AT₁R están incrementados²². La asociación anatómica de ECA y AT₁R en la cicatriz del infarto acrecienta la perspectiva que una mayor concentración local de Ang II contribuye a la formación del tejido fibrótico⁷. 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 . Otros estudios han demostrado también que Ang II produce dos efectos sobre la MEC cardiaca, induce acumulación de colágeno por aumento en la síntesis y disminución en la degradación de esta proteína, efecto que estaría mediado por metaloproteinasas (MMPs)²³. La actividad de las MMPs está controlada por los inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs), los cuales también estarían regulados por Ang II²⁴. Además, se ha observado que en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos, Ang II por medio del receptor subtipo AT₁ induce la contracción de geles de colágeno, efecto que está parcialmente mediado por las integrinas β_1 y $\alpha_5 \beta_3$. Sin embargo, los miofibroblastos dada las características ya mencionadas poseen mayor capacidad de contraer geles de colágeno, de esta forma, Ang II parece tener un papel fundamental en procesos de cicatrización tisular cardiaca.

Muchos estudios sobre el efecto de Ang II se han realizado en fibroblastos cardiacos, pero muy poco se sabe de los efectos que tiene Ang II sobre el miofibroblasto en este órgano. Aunque el número de receptores que expresan estas células en condiciones normales no es menor, resulta difícil estudiar su comportamiento frente a su ligando endógeno a concentraciones fisiológicas, y más aún en condiciones

fisiopatológicas de elevada expresión del AT₁R, ya que se ha mostrado que el tiempo de cultivo y el número de pasajes celulares disminuye el número de receptores^{25, 26}. Para intentar asemejar las condiciones de las patologías antes descritas, se sobre-expresó el receptor subtipo AT₁ con adenovirus específico.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se plantearon una serie de interrogantes a resolver:

- a. ¿Cuál será el efecto de Ang II sobre la proliferación, adhesión, contracción de geles de colágeno y migración celular de miofibroblastos que sobre expresan el AT₁R?
- b. ¿Qué efectos tendrá Ang II sobre la secreción de proteínas de matriz extracelular en miofibroblastos que sobre expresan el AT₁R?
- c. ¿Qué efecto ejerce Ang II sobre la actividad de metaloproteinasa-2 en los miofibroblastos?

A fin de responder a esas interrogantes se ha planteado la siguiente hipótesis:

2. HIPÓTESIS

Ang II produce cambios en el comportamiento celular del miofibroblasto cardíaco que sobre expresa el AT₁R, incrementando su adhesión y producción de proteínas de la MEC, sin alterar su proliferación.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar *in vitro* si Ang II modifica el comportamiento celular de miofibroblastos cardíacos de rata que sobre expresan el receptor AT₁.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar efecto de Ang II sobre la proliferación y migración celular de miofibroblastos cardíacos que sobre expresan AT₁R.
2. Evaluar si Ang II aumenta la adhesión de miofibroblastos cardíacos que sobre expresan AT₁R a distintas proteínas de la MEC.
3. Investigar si Ang II induce mayor contracción de geles de colágeno en miofibroblastos cardíacos que sobre expresan AT₁R.
4. Determinar si Ang II induce mayor expresión y secreción de fibronectina y colágeno tipo I, en miofibroblastos cardíacos que sobre expresan AT₁R.
5. Evaluar si Ang II reduce la actividad de MMP-2 en miofibroblastos cardíacos que sobre expresan el receptor AT₁.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): MTT, Tritón X-100, azul de tripán, fibronectina.

De Gibco BRL (Carlsbad, California EEUU): tripsina-EDTA, estándares para masas moleculares de proteínas pre-teñidas, suero fetal de bovino (FBS).

De MERCK (Darmstadt, Alemania): compuestos inorgánicos y orgánicos, sales, ácidos y solventes

De PerKin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA, EEUU): El reactivo quimioluminiscente para western blot (Western Lightning), [125 I]-Sar¹-Ile⁸-Ang II

De Falcon (EEUU): material de plástico estéril para la obtención y cultivo de fibroblastos cardíacos.

De Chemicon (Tamecula, EEUU): TGF- β_1

De Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU): Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo y ratón conjugado a peroxidasa.

5.2. Modelo animal

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

5.3. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos de ratas neonatas

Se utilizó el procedimiento descrito por Foncea y cols²⁷, con leves modificaciones. Las ratas se decapitaron e inmediatamente se les removió el corazón bajo condiciones de asepsia, se retiraron las aurículas y los ventrículos se cortaron en pequeños pedazos para facilitar las sucesivas digestiones posteriores con pancreatina y colagenasa II. El producto de las digestiones se sometió a un preplaqueo por 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 los fibroblastos cardiacos de ratas neonatas (FCN) de los respectivos cardiomiocitos. Luego de las 2 h, se cambió 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 de fibroblastos cardiacos a miofibroblastos

Los FCN en pasaje 2, obtenidos como se indica en la sección 5.3 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 cardiacos de ratas neonatas (MCN). Una vez cumplido el tiempo se retiró el medio suplementado y los miofibroblastos se mantuvieron por 24 h con DMEM-F12, y así se utilizaron para los ensayos posteriores.

5.5. Tinción de células con cristal violeta

Esta técnica se utilizó para los ensayos de migración celular y adhesión. Las células se fijaron sobre la placa de cultivo en frío (4°C) durante 30 min, con formaldehído al 4% diluido en PBS. Transcurrido el tiempo de fijado, las células, se lavaron con PBS frío por, al menos, tres veces y fueron teñidas en frío (4°C) durante 30 min, con una solución de cristal violeta 5 mg/mL preparada en metanol al 20%. Al finalizar el tiempo de tinción se retiró la solución de cristal violeta y las células se lavaron con agua destilada tres veces. Se dejó secar para ser observada por microscopia de contraste de fase.

5.6. Ensayo de migración celular

Se utilizaron MCN obtenidos como se describe en el punto 5.4. Las células se sembraron a una densidad de 2×10^4 cel/cm² en placas de seis pocillos, se mantuvieron en medio DMEM F-12 por 24 h después de las cuales se realizó una herida en la placa

de cultivo celular, las células se lavaron para retirar el *debris* celular y se adicionaron los estímulos (Ang II, FBS 10%) por 48 y 72 h. Cumplido el tiempo las células se fijaron y tiñeron con cristal violeta para observar si existía migración sobre la herida.

5.7. Transducción adenoviral

Se utilizó la construcción 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 epítoto HA en extremo N-terminal) y GFP como marcador de transducción, dirigidos por el promotor CMV. Para el control de actividad biológica se utilizó el adenovirus AdGFP que conduce la expresión de la proteína GFP bajo el control del mismo promotor. Las células se sembraron en placas de cultivo, privadas de suero y transducidas con los adenovirus por 24 h a una multiplicidad de infección (MOI) de 15.000. En esas condiciones se determinó mediante microscopía de fluorescencia que un porcentaje mayor del 90% de los fibroblastos y miofibroblastos expresaban GFP.

5.8. Ensayo de proliferación

Se utilizaron MCN obtenidos como se describe en el punto 5.4. Las células se sembraron a una densidad de 2×10^4 cel/cm² en placas de 24 pocillos, se preincubaron durante 2 h en presencia de los estímulos (Ang II, TGF- β_1), luego se agregó timidina tritiada ([H³]-timidina) en una concentración de 0,5 μ Ci/mL, y se incubaron durante 24 h, cumplido este tiempo las células se lavaron con PBS, al menos 3 veces y luego se incubaron con ácido tricloroacético 10% (TCA) a 4°C por 30 min, luego los precipitados se lavaron al menos 2 veces con etanol 95% y luego se solubilizaron con NaOH 1M. La radioactividad de las alícuotas se midió en un contador de centelleo.

5.9. Ensayo de adhesión

Se utilizaron MCN obtenidos como se describe en el punto 5.4. Las células se incubaron por 24 h con el estímulo (Ang II), cumplido este tiempo se soltaron con Accutasse 1X (Chemicon Tamecula, CA, USA), y se sembraron 10.000 células por pocillo en placas previamente tratadas con colágeno I (50 µg/mL), fibronectina (100 µg/mL), laminina (100 µg/mL) o BSA (2%), este último como control negativo de adhesión. Las células se incubaron durante 2 h en las distintas matrices (plástico, colágeno I, fibronectina, laminina y BSA), luego se lavaron con PBS, al menos 3 veces, se fijaron y tiñeron como se describe en el punto 5.5. Las células se lavaron con PBS, al menos 3 veces, para retirar el excedente de solución de cristal violeta, se disolvió con SDS 1% y la solución obtenida se midió por espectrofotometría a 595 nm.

5.10. Ensayo de contracción geles de colágeno

Se utilizaron MCN obtenidos como se describe en el punto 5.4. Las células se soltaron con Accutasse 1X, se resuspendieron en DMEM a una densidad de 600.000 células por mL, y se incubaron en tubos con los estímulos (Ang II, TGF-β₁) por 30 min a 37 °C. Luego se agregó igual volumen de una solución de colágeno I (1 mL Hepes 0,2 M pH 9, 1 mL de DMEM 10 X y 4 mL de colágeno I), se sembraron 300.000 células por pocillo en placas previamente tratadas con BSA 2%, luego de dos horas los geles se despegaron de los bordes del pocillo y se incubaron durante 24 h. La reducción de área de los geles se midió con un programa computacional para evaluar la contracción.

5.11. Preparación de extractos celulares totales

Se prepararon extractos de proteínas totales para evaluar la expresión colágeno tipo I y la expresión de fibronectina.

Las células se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de 2×10^4 cel/cm². Una vez estimuladas con Ang II, las células se lavaron tres veces con PBS frío y luego se lisaron con 35 µL 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 µg/mL; benzamidina 10mM; PMSF 1 mM y Na₃VO₄ 100 µM). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo, se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay), se desnaturalizó en tampón SDS-PAGE 4X (glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%, SDS 2%, Tris base 62,5 mM, azul de bromofenol 0,002%, pH 6,8), se llevó a una concentración conocida y luego el extracto se almacenó a -20°C.

5.12. Preparación de medio de cultivo celular

Se preparó medio de cultivo de MCN para evaluar expresión de fibronectina.

Las células se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de 2×10^4 cel/cm². Una vez estimuladas, se tomó el medio de cultivo celular y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo, se desnaturalizó en tampón SDS-PAGE, para ser almacenado a -20°C.

5.13. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes

La separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Para la detección se cargaron 5 µg de extracto proteico para fibronectina y 60 µg para colágeno tipo I; en el caso del medio de cultivo se cargaron 120 µL de muestra en ambos casos (colágeno tipo I y fibronectina). Los geles concentrador y separador fueron al 5 y 8%, respectivamente, para colágeno tipo I y fibronectina. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 90 V en tampón de electroforesis 1X (Tris HCl 0,05 M, glicina 0,834 M, SDS 0,1%, pH8,3).

5.14. Electrotransferencia de proteínas

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) de 0,2 μ m a 0,45A durante 90 min en buffer de transferencia (Tris HCl 50 mM, glicina 0,196 M, metanol 20%, pH 8,3).

5.15. Western blot

Una vez transferidas, las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (TBS; Tween-20 0,1% (TBS-T); leche sin grasa 6% p/v) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes según ensayo. Colágeno tipo I en tampón de incubación (TBS-T 0,1%) a una dilución 1:1.000 toda la noche a 4°C con agitación suave. Para reconocimiento de fibronectina se usó tampón de incubación (TBS-T 0,1%) y el anticuerpo a una dilución de 1:5.000 durante 4 h a temperatura ambiente con agitación suave. Posterior a la incubación, las membranas se lavaron 3 veces por 10 min en TBS-T al 0,1%, e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo o ratón conjugado con peroxidasa, a un título de 1:5.000 en tampón de bloqueo TBS-T al 0,1%.

Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min con el sustrato quimioluminiscente "Western Lightning" 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 7.0 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-T al 0,1% por tres veces. Luego de este tratamiento, las membranas se reutilizaron para ensayos de Western blot para reconocimiento de vimentina como control de carga.

5.16. Zimografía

Los MCN se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de 2×10^4 cel/cm². Una vez estimuladas con Ang II durante 24 h, se tomó el medio de cultivo celular y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo, se agregó tampón no denaturante SDS-PAGE 5X en ausencia de β -mercaptoetanol o ditioneitol (SDS 10%, Tris HCl 0,5M a pH 6,8, sacarosa, azul de bromofenol 0,05%), para ser almacenado a -20°C. La separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de gelatina soluble (200 mg/mL). Para la detección se cargaron 10 μ L de medio de cultivo. Los geles concentrador y separador fueron al 5% y 8%, respectivamente. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 90 V en tampón de electroforesis (Tris HCl 0,05 M, glicina 0,834 M, SDS 0,1%, pH 8,3). Luego de realizar la corrida electroforética el gel se lavó 3 veces por 15 min en una solución de Tritón X-100 al 2,5% y luego se incubó en un tampón apropiado para el ensayo de actividad gelatinásica (NaCl 0,1M, Tris-HCl 0,005M, CaCl₂ 10 mM, ZnSO₄ 1 μ M) por 24 h a 37°C, lo que favorece la actividad de las proteasas. El resultado de este tipo de geles, es que en la zona donde se ubicó una proteasa, la gelatina habrá sido degradada. Esta degradación se revela tiñendo el gel con una solución de azul de Coomassie (metanol 20%, ácido acético 50%, H₂O y azul de Coomassie 2%) con agitación constante, por un período de 24 h, luego el gel se destiñe con una solución de metanol 20% - ácido acético 50%, observándose una zona blanca donde hubo degradación. Los geles se digitalizaron y las imágenes se cuantificaron por densitometría con ayuda de los programas computacionales Photoshop 7.0 y USI.

5.17. Microscopía de transmisión y de epifluorescencia

Para analizar la morfología celular, los niveles de confluencia y la eficiencia de la transducción adenoviral de la proteína fluorescente verde (GFP) se utilizó un microscopio epifluorescente Axiovert, Carl Zeiss a un objetivo 40X. Las imágenes se registraron con una cámara digital Olympus C-4000, de 4.0 megapíxeles.

5.18. 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. Evaluación de desdiferenciación de FCN a MCN por efecto de TGF- β_1

Estudios, *in vivo* e *in vitro*, han mostrado que TGF- β_1 induce la desdiferenciación de fibroblasto a miofibroblasto⁶. El cambio en el fenotipo celular se ha caracterizado por la expresión de α -SMA, localizada principalmente en las fibras de estrés, y por un aumento del tamaño celular, proceso que depende tanto del tiempo como de la concentración de TGF- β_1 . En este trabajo se utilizó TGF- β_1 a una concentración de 5 ng/mL. Para evaluar la desdiferenciación se analizó la distribución celular de α -SMA, a través de un estudio por inmunocitoquímica. Nuestros resultados mostraron que α -SMA se localizó principalmente en las fibras de estrés (Fig. 2), estas estructuras se caracterizaron por formar haces filamentosos (detectados por un segundo anticuerpo conjugado a fluoresceína isotiocianato (FITC), color verde); estas fibras de estrés no se observaron en fibroblastos no tratados con TGF- β_1 . Como control interno se inmunodetectó vimentina (una proteína marcadora de citoesqueleto de fibroblastos). Los resultados muestran además, que el fibroblasto tratado con TGF- β_1 tuvo un mayor tamaño celular que el fibroblasto control. Estos resultados indican que TGF- β_1 induce la desdiferenciación de fibroblasto a miofibroblasto cardiaco, en los cuales se expresa α -SMA, y se encuentra como constituyente de las fibras de estrés, además se observó un aumento en el tamaño celular, característico de miofibroblastos.

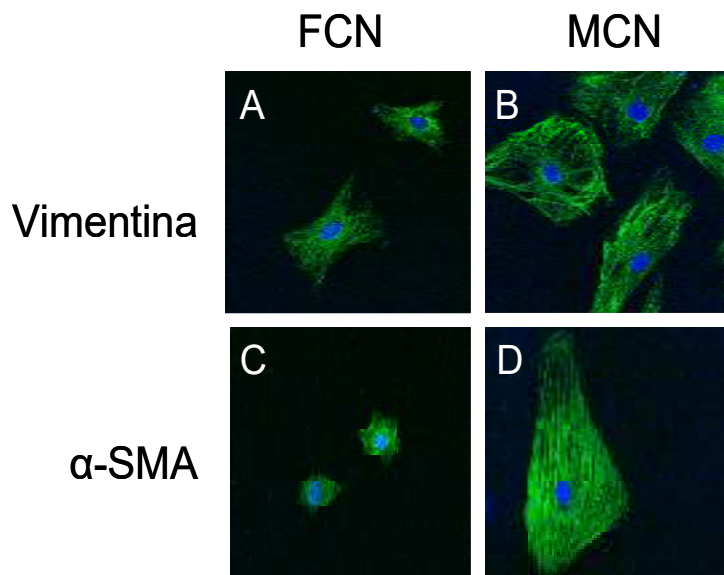


Fig. 2. Desdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos.

Inmunodetección de vimentina y α -SMA en FCN control (A y C) y estimulados con TGF- β_1 (B y D). En azul se observa el núcleo y en verde se observa vimentina (A y B) y α -SMA (C y D). Se muestra una figura representativa de tres experimentos independientes (magnificación 40X).

6.2. Evaluación del efecto de Ang II sobre la proliferación y migración de MCN que sobreexpresan el AT₁R

Se evaluó el efecto de Ang II sobre la proliferación de MCN transducidos y no transducidos con el AdAT₁R, en ausencia de suero. Las células se incubaron durante 24 h en presencia de Ang II (100 nM) o TGF- β_1 (5 ng/ml) o de [H³]-Timidina (0,5 μ Ci). Se realizó una curva con número de células creciente (Fig. 3), para poder extrapolar luego los datos entregados por el contador de centelleo, y obtener el número de células que incorporaron [H³]-Timidina. En los resultados se puede observar que en condiciones basales (MCN que no sobreexpresan el AT₁R), Ang II no produjo cambios en la incorporación de [H³]-Timidina, es decir, no existió aumento del número celular; a diferencia de los MCN transducidos con el AdAT₁R, en los cuales se observó que Ang II disminuyó el número de células de manera significativa con respecto al control transducido con el AT₁R (Fig. 4). Se observa también que TGF- β_1 no tuvo efectos significativos sobre la incorporación de [H³]-Timidina en ninguno de los casos. Además se puede observar que la sobreexpresión del receptor AT₁ no produjo cambios significativos sobre la proliferación de MCN.

Se evaluó el efecto de Ang II y suero 10% (como control positivo) sobre la migración celular de MCN. En nuestros resultados se observó que, tanto los MCN (flechas) que sobre expresan el AT₁R como los que no lo hacen, fueron capaces de migrar en presencia de FBS 10% (Fotos 3, 6 y 9). Por otro lado, Ang II 100 nM no indujo la migración de los MCN no transducidos con el AdAT₁R (Foto 2), mientras que en MCN que sobre expresan el receptor AT₁, Ang II produjo una disminución en el número celular tanto a las 48 h como a las 72 h de estímulo (Fotos 5 y 8, respectivamente) (Fig. 5).

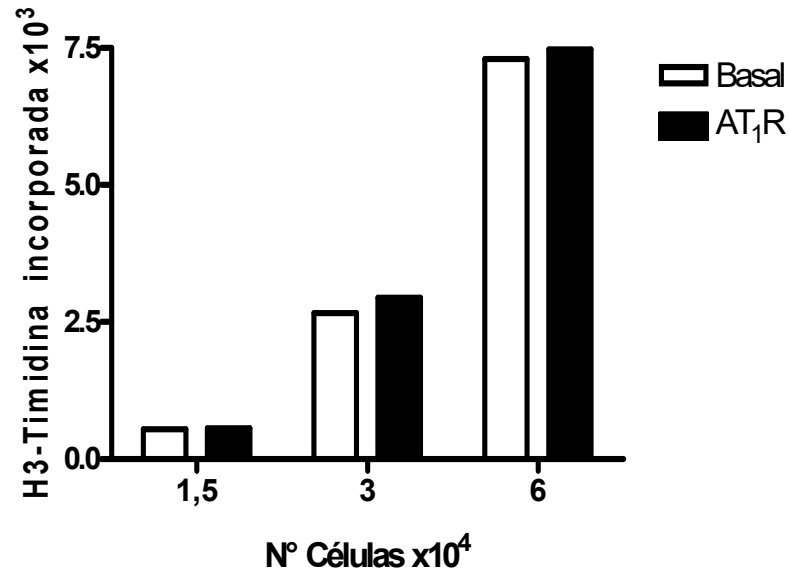


Fig. 3. Curva de incorporación de H³-Timidina.

MCN en condiciones basales y transducidos con el AdAT₁R se incubaron durante 24 h en presencia [H³]-Timidina, para luego medir mediante un contador de centelleo, la incorporación de timidina en el DNA celular. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes.

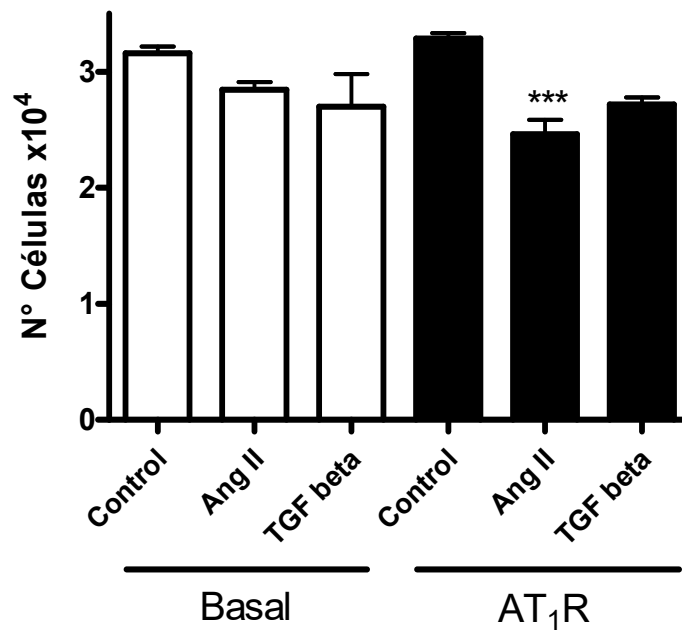


Fig. 4. Evaluación de la proliferación en miofibroblastos.

MCN (en condiciones basales y transducidos con el AdAT₁R) se privaron de suero y luego fueron incubados durante 24 h en presencia de los estímulos (Ang II y TGF-β₁) y de [H³]-timidina (0,5 μCi). Se muestra la cuantificación de tres experimentos independientes expresados como la media ± SD. (***) p < 0,001 vs control AT₁

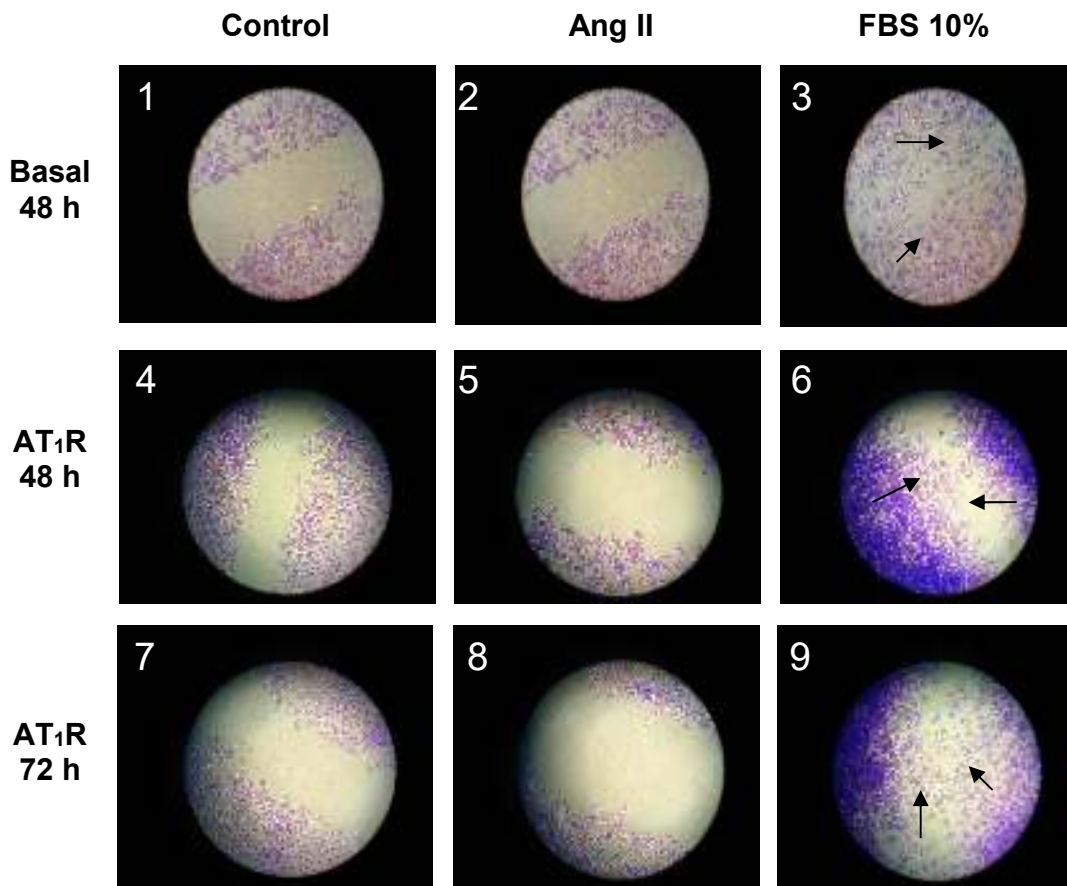


Fig. 5. Efecto de Ang II sobre la migración de MCN transducidos con AdAT₁R en matriz plástica.

Las células se sembraron a una densidad de 2×10^4 cel/cm², se utilizó tinción con cristal violeta para su visualización. Las células se privaron de suero 24 h antes de agregar los estímulos. En las fotos 3, 6 y 9 las flechas muestran la migración celular. Se muestra imagen representativa de tres experimentos independientes.

6.3. Efecto de Ang II sobre adhesión de MCN transducidos con AdAT₁R

Se evaluó el efecto de Ang II sobre la capacidad de adhesión de MCN transducidos con AdAT₁R a distintas proteínas sustratos de la MEC. En primer lugar se realizó una curva con número de células creciente adheridas sobre plástico (Fig. 6), de manera que al extrapolar se obtenga el número de células adheridas a las distintas matrices. Los resultados muestran que en condiciones basales (Fig. 7), MCN se adhirieron mayoritariamente sobre colágeno (**p< 0,001 vs plástico), y luego sobre fibronectina y plástico. Además se observó que Ang II produce un aumento significativo en el número de células adheridas sobre plástico, colágeno y fibronectina. Por otro lado, en MCN que sobre expresaron el receptor AT₁ (Fig. 8), Ang II 100 nM produjo una disminución significativa en la adhesión celular sobre plástico (**p<0,01), colágeno (###p<0,001 vs colágeno basal) y fibronectina (p<0,01 vs FN basal). No se observó adhesión de MCN sobre laminina en ninguno de los experimentos.

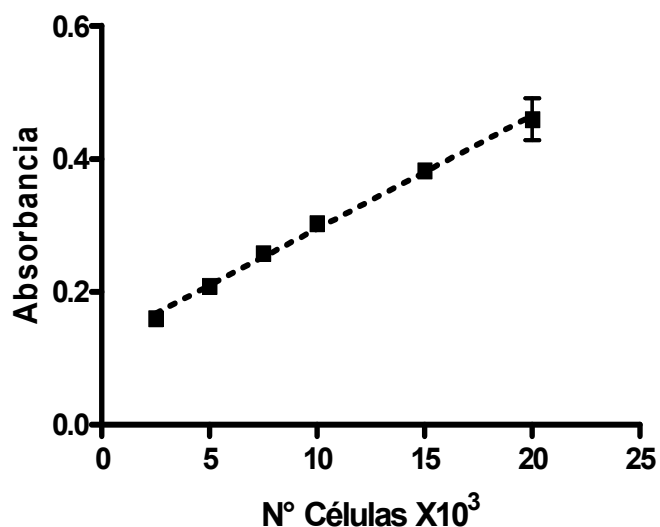


Fig. 6. Curva de MCN adheridos sobre plástico.

MCN fueron incubados durante 2 h a 37 °C sobre plástico, luego se fijaron y tiñeron con cristal violeta, el cual se disolvió con isopropanol, para luego ser medido por espectrofotometría. Se muestra la curva obtenida de, al menos, tres experimentos independientes.

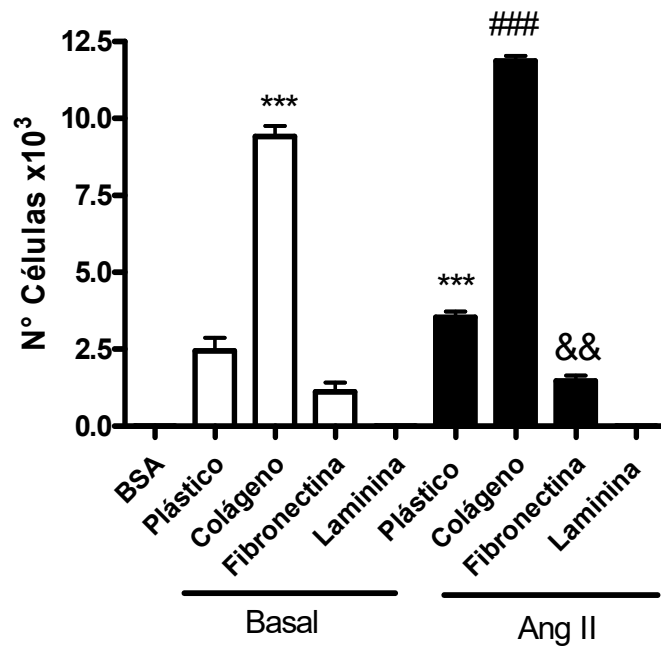


Fig. 7. Efecto de angiotensina II sobre la adhesión celular de MCN.

MCN fueron incubados durante 2 h a 37°C sobre las distintas matrices, luego se fijaron y tiñeron con cristal violeta. BSA 2 % se utilizó como control negativo de adhesión. Se muestra la cuantificación de tres experimentos independientes expresados como la media \pm SD.

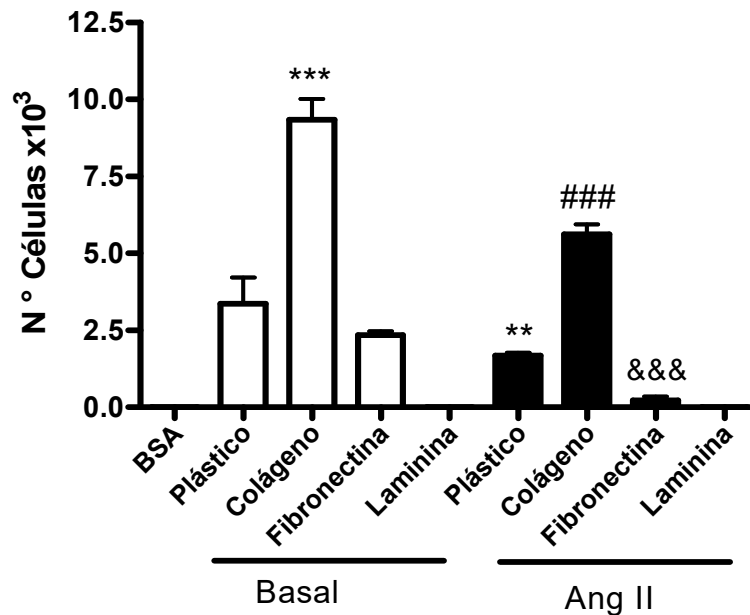


Fig. 8. Efecto de angiotensina II sobre la adhesión de MCN transducidos con el AdAT₁R.

MCN transducidos con el AdAT₁R fueron incubados durante 2 h a 37°C sobre las distintas matrices, luego se fijaron y tiñeron con cristal violeta. Se muestra la cuantificación de tres experimentos independientes expresados como la media \pm SD. (**p < 0,01 vs plástico), (***) p < 0,001 vs plástico), (### p < 0,001 vs colágeno, &&& p < 0,001 vs fibronectina).

6.4. Efecto de Ang II sobre contracción de MCN transducidos con AdAT₁R

El efecto de Ang II sobre la capacidad de contracción de MCN se evaluó mediante el ensayo de contracción de geles de colágeno. Se realizó una curva sembrando cantidades crecientes de células (Fig. 9), para así determinar las condiciones óptimas en las cuales se pudiera observar el efecto de los estímulos sobre la contracción, la cual finalmente fue de 300.000 células por pocillo. Los resultados muestran que MCN fueron capaces de reducir el área del gel por sí solos (sin necesidad de estímulos) aproximadamente en un 20 % a las 24 h. Al estimular con Ang II se observó un aumento significativo en la contracción de los geles, el mismo efecto se observó con TGF- β_1 , que también produce un aumento en la capacidad de contracción del miofibroblasto. Por otro lado, al sobre expresar el receptor AT₁, los MCN no fueron capaces de contraer el gel de colágeno, y al estimular con Ang II se observó la misma situación (Fig. 10).

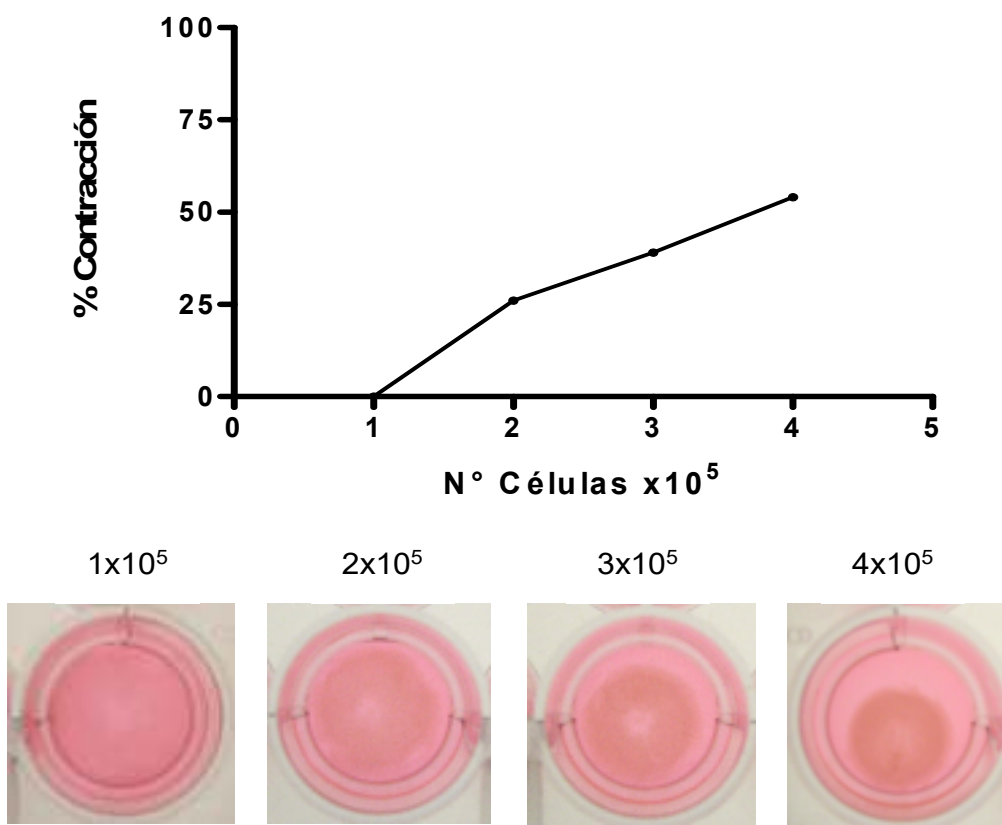


Fig. 9. Curva de contracción de MCN.

La capacidad de contracción de los miofibroblastos se determinó mediante el ensayo de contracción de geles de colágeno, en donde sembraron cantidades crecientes de MCN en una matriz 3D, se incubaron durante 24 h, y se midió la reducción de área del gel. Se muestra una fotografía representativa de, al menos, tres experimentos independientes.

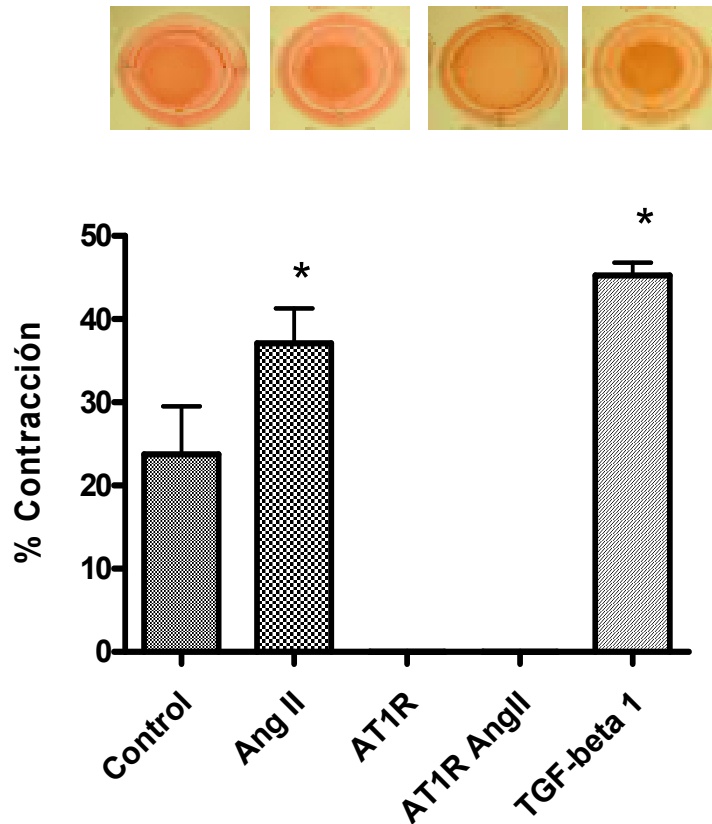


Fig. 10. Efecto de Ang II sobre la contracción de MCN.

La capacidad de contracción de los miofiblastos se determinó mediante el ensayo de contracción de geles de colágeno, en donde sembraron MCN en una matriz 3D, se incubaron durante 24 h, y se midió la reducción de área del gel. Se muestra la cuantificación de al menos tres experimentos independientes expresados como la media \pm SD. * $p < 0,05$ respecto al control.

6.5. Efecto de Ang II sobre expresión y secreción de proteínas de matriz en MCN transducidos con AdAT₁R

Se evaluó el efecto de Ang II sobre la secreción de proteínas de matriz extracelular, colágeno tipo I y fibronectina, en MCN transducidos con el AdAT₁R. Para ello se realizó WB en extractos MCN. Para determinar la secreción de fibronectina se utilizó extractos celulares y de medio de cultivo de MCN, basales y transducidos con el AdAT₁R, estimulados con Ang II 100 nM por un período de 24 h. En el extracto celular (Fig. 11) los resultados muestran que en condiciones basales no existió una diferencia significativa en la expresión de fibronectina, mientras que al sobre expresar el AT₁R, y estimular con Ang II, se produjo un aumento significativo en la expresión de FN con respecto al MCN no transducido con el AdAT₁R. En el medio de cultivo celular (Fig. 12)

nuevamente se observa que en condiciones basales no existieron diferencias significativas en la expresión de FN, pero al sobre expresar el AT₁R, se observó un aumento en la cantidad de FN secretada al medio, tanto en los MCN controles como en los estimulados con Ang II.

Para determinar la secreción de colágeno tipo I, se utilizó extractos celulares de MCN, basales y transducidos con el AdAT₁R, estimulados con Ang II 100 nM por un período de 24 h. Los resultados muestran (Fig. 13) que en condiciones basales Ang II no produjo diferencias significativas en la expresión de colágeno tipo I, mientras que en MCN que sobre expresan el AT₁R, Ang II produjo un aumento significativo en la expresión de colágeno tipo I con respecto al control.

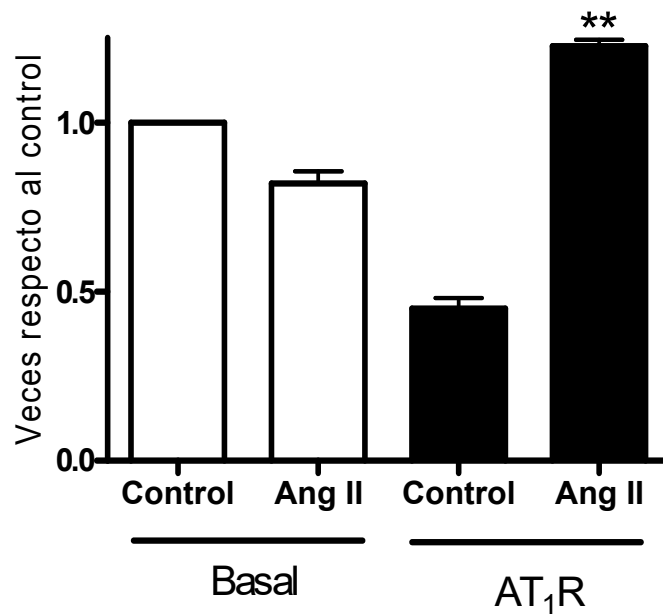


Fig. 11. Efecto de Ang II sobre la expresión de fibronectina en extracto celular de MCN. Efecto de Ang II sobre la secreción de fibronectina en extracto celular de MCN mediante WB. Se muestra la cuantificación de al menos tres experimentos independientes expresados como la media \pm SD. ** $p < 0,01$ vs Ang II Basal

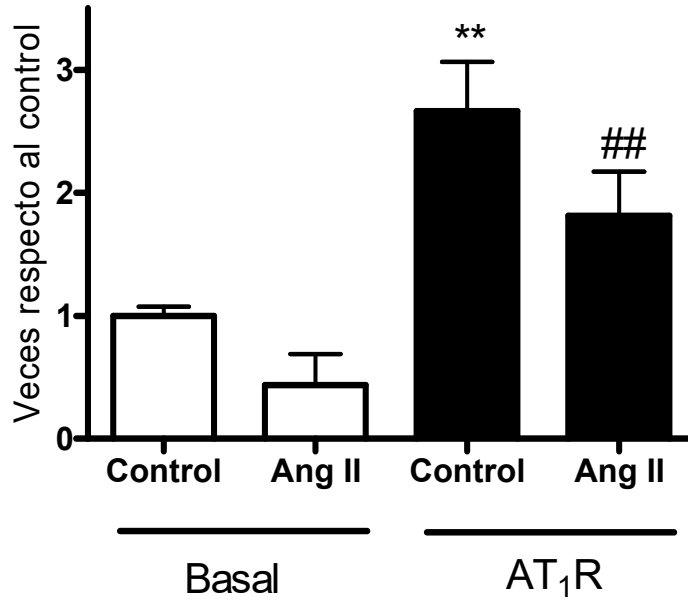


Fig. 12. Efecto de Ang II sobre la secreción de fibronectina al medio de cultivo celular de MCN.

Se evaluó el efecto de Ang II sobre la secreción de fibronectina al medio de cultivo celular de MCN mediante WB. Se muestra la cuantificación de al menos tres experimentos independientes expresados como la media \pm SD. ** $p < 0,01$ vs Control Basal, ## $p < 0,01$ vs Ang II Basal

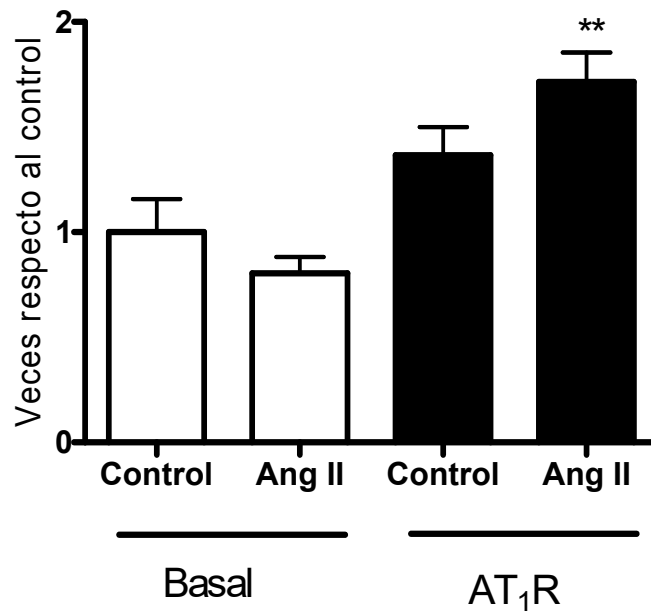


Fig. 13. Efecto de Ang II sobre la expresión de colágeno tipo I en extracto celular de MCN.

Se evaluó el efecto de Ang II sobre la expresión de colágeno tipo I en extracto celular de MCN mediante WB. Se muestra la cuantificación de al menos tres experimentos independientes expresados como la media \pm SD. ** $p < 0,01$ vs Ang II Basal

6.6. Efecto de Ang II sobre la actividad de MMP-2 en MCN transducidos con AdAT₁R.

Se evaluó el efecto de Ang II sobre la actividad de MMP-2 en el medio de cultivo celular de MCN, basales y transducidos con el AdAT₁R, estimulados con Ang II 100 nM durante 24 h. Para ello se realizó zimografía de medio de cultivo de MCN. Los resultados muestran que, en condiciones basales, Ang II produjo una disminución significativa en la actividad de MMP-2 con respecto al control. Por otro lado, al sobre expresar el AT₁R, se produjo una disminución significativa en la actividad de MMP-2, tanto en MCN controles como en los transducidos con el AdAT₁R. Además se observó que en MCN que sobreexpresan el AT₁R, Ang II produjo una disminución de la actividad de MMP-2 con respecto a MCN basales estimulados con Ang II.

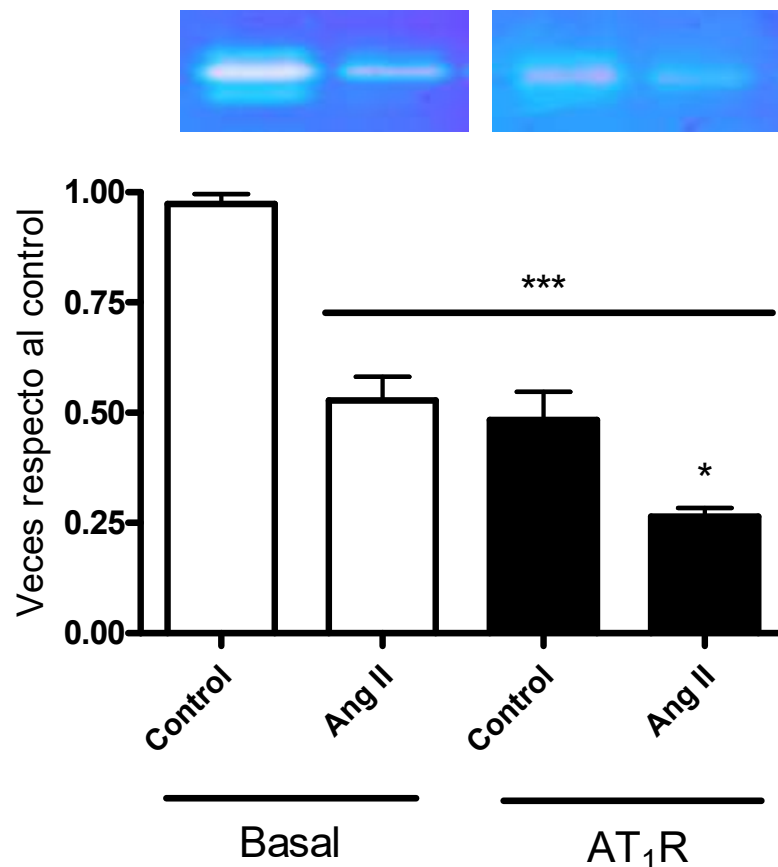


Fig. 14. Efecto de Ang II sobre la actividad de MMP-2 en MCN transducidos con AdAT₁R. Se realizó zimografía de medio de cultivo de MCN transducidos con AdAT₁R, estimulados con Ang II durante 24 h. Se muestra la cuantificación de al menos tres experimentos independientes expresados como la media \pm SD. *** $p < 0,001$ vs Control Basal, * $p < 0,05$ vs Ang II Basal

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo indican que el miofibroblasto responde al estímulo con angiotensina II aumentando la secreción de proteínas de matriz (colágeno tipo I y fibronectina), además de aumentar su adhesión a proteínas de la MEC, la capacidad de contracción y disminuyendo la secreción de MMP-2. De manera paralela, no se observó efecto sobre la proliferación celular, migración y contracción de geles de colágeno.

La fibrosis cardiaca es un problema clínico relevante que se acrecentará con el envejecimiento de la población y el aumento de la incidencia de hipertensión arterial e infarto al miocardio. La fibrosis cardiaca es una consecuencia común a la mayoría de las patologías cardiacas que cursan con un remodelado estructural afectando las propiedades funcionales del corazón. La fibrosis cardiaca patológica se origina por una alteración de la homeostasis celular y estructural del corazón, la que es regulada por un delicado balance entre señales estimuladoras e inhibitorias siendo Ang II, uno de los más importantes reguladores, al activar señales fibrogénicas sobre los fibroblastos, células responsables del recambio de las proteínas de la MEC. En condiciones normales, los fibroblastos cardiacos son las principales células encargadas del recambio de proteínas de la MEC. Sin embargo, estímulos patológicos que cursan con injuria cardiaca, mediado en parte por TGF- β 1, des-diferencian los fibroblastos a miofibroblastos. Estas últimas células poseen mayor capacidad contráctil y un mayor actividad secretora de proteínas de la MEC, que contribuyen a la reparación del tejido durante la cicatrización de la herida, pero esto puede disminuir la función cardiaca, cuando la contracción y secreción de proteínas de la MEC se vuelve excesiva, acción que lleva a fibrosis cardiaca patológica²⁸.

Luego de un infarto invaden el sitio de daño células pro-inflamatorias como monocitos, neutrófilos y macrófagos, estos últimos son activados y comienzan a liberar distintos estímulos al medio, principalmente metaloproteasas de la matriz que permiten la degradación de la MEC y así facilitar la migración de otros tipos celulares al sitio del daño. Consecuentemente los fibroblastos son atraídos al sitio del infarto y por acción del TGF- β 1, liberado por los macrófagos, se desdiferencian a miofibroblastos²⁹.

En este estudio se ha tratado de asemejar a esta condición patológica *in vitro* para evaluar el efecto de Ang II sobre el tipo celular involucrado en la cicatrización del

miocardio infartado, el miofibroblasto cardiaco, más aún cuando se ha encontrado que en condiciones de daño tisular hay una sobre expresión tanto de ECA y AT₁R en estos tipos celulares. Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que los miofibroblastos expresan cinco veces la cantidad de receptores de AT₁R presentes en fibroblastos, sin cambios en la constante de afinidad³⁰, por lo anterior, estas células podrían responder en mayor medida a Ang II. Utilizando adenovirus logramos sobre expresar al doble el número de receptores sin modificar la constante de afinidad, tratando de simular lo que ocurre en condiciones patológicas. La des-diferenciación celular de fibroblasto a miofibroblasto requiere de tres factores: tensión mecánica (aportada por las condiciones de cultivo sobre una matriz rígida, como lo es la placa de cultivo plástica), fragmento ED-A de fibronectina (que es producido por los propios fibroblastos y secretado hacia el medio extracelular), y un factor de crecimiento (en las condiciones de cultivo *in vitro* se encuentran en el suero factores de crecimiento necesarios como PDGF y principalmente TGF-β₁, y este último es también secretado por los fibroblastos hacia el medio extracelular, actuando de manera autocrina)³¹. Por lo anterior, el tiempo de cultivo y el pasaje celular de los fibroblastos es crucial para obtener cultivos puros³². La estimulación de FCN con TGF-β₁ produce un aumento en la expresión de α-SMA (proteína marcadora de miofibroblastos) en el tiempo. En este sentido, en nuestros ensayos las condiciones de cultivo y estímulo se mantuvieron constantes en el proceso de desdiferenciación, a fin de no tener fibroblastos como células “contaminantes” de los miofibroblastos.

Se analizaron procesos fundamentales del comportamiento celular en miofibroblastos y que son de vital importancia en el infarto cardiaco, en virtud de la cicatrización. Estos procesos (migración, adhesión, proliferación, secreción de proteínas de la MEC y MMPs y finalmente, contracción de geles de colágeno) debieran presentarse en forma continua durante todo el proceso de cicatrización, de forma que no es fácil establecer un orden definido y como ellos son modificados por la acción de Ang II sobre todo en condiciones de sobre expresión de el AT₁R.

Para determinar si este tipo celular es capaz de proliferar, se simuló una condición patológica, sobre expresando el receptor subtipo AT₁, y se estimuló con Ang II o TGF-β₁. Nuestros resultados mostraron que los MCN no proliferaron en presencia de Ang II, así como tampoco al estimular con TGF-β₁. Al sobre expresar el AT₁R, no se

produjeron cambios en la proliferación, sin embargo, al estimular con Ang II, observamos una disminución significativa de la incorporación de [H³]-Timidina, por parte de los miofibroblastos. Varios estudios han demostrado que Ang II, a través del receptor AT₁, es capaz de promover la proliferación de fibroblastos cardiacos *in vitro*³⁵, y también *in vivo*³⁶, no obstante, en nuestros experimentos Ang II no fue capaz de estimular la proliferación de MCN, por el contrario, disminuyó el número de células; efecto mediado por el receptor AT₁, ya que en condiciones basales Ang II no produjo cambios en la proliferación. Este efecto de Ang II puede deberse a diversos factores experimentales, tales como el MOI utilizado, que pudo haber provocado la muerte de un pequeño porcentaje de la población de MCN, produciéndose así una disminución de la incorporación de [H³]-Timidina. Estudios dentro de nuestro laboratorio han demostrado que Ang II induce muerte por apoptosis en fibroblastos que sobre expresan el AT₁R³⁷, por lo tanto, la disminución de la incorporación de timidina en los MCN podría ser un efecto de muerte, aunque en menor grado, ya que los miofibroblastos son más resistentes a la apoptosis que los fibroblastos, esto debido a que en miofibroblastos se ha encontrado mayor cantidad de Bcl-2, una proteína antiapoptótica. Por otro lado, se ha observado que el estímulo con TGF-β₁, produce una disminución en la proliferación de miofibroblastos cardiacos adultos³⁸, si embargo nuestros resultados no mostraron cambios en la proliferación de MCN tratados con TGF-β₁.

La migración celular de fibroblastos en condiciones de daño al tejido cardiaco es un paso clave en el proceso de cicatrización de la herida, ya que facilita la reparación de la matriz extracelular. Se ha observado que muchos factores promueven la migración de fibroblastos cardiacos, tales como cardiotrofina-1³⁹, y algunas citoquinas pro-inflamatorias, como interleuquina-β₁ y el factor de necrosis tumoral-α⁴⁰. Resultados anteriores de nuestro laboratorio mostraron que los fibroblastos cardiacos fueron capaces de migrar al ser estimulados con Ang II. En este estudio se evaluó la capacidad de MCN transducidos con el AdAT₁R de migrar en presencia de Ang II. Los resultados mostraron que miofibroblastos en condiciones basales, al ser estimulados con Ang II no fueron capaces de migrar; y al sobre expresar el receptor AT₁, Ang II tampoco fue capaz de promover la migración, sino que se produjo una disminución evidente del número celular, sin embargo, en presencia de suero 10% se observó que los MCN eran capaces de migrar, tanto en MCN basales, como en los que sobre expresan el receptor (Fig. 5). Estos resultados indican que, al contrario de los fibroblastos, el MCN no es capaz de

migrar en presencia de Ang II, sin embargo en otros estudios se ha visto que miofibroblastos cardiacos son capaces de migrar en presencia de otras moléculas, como tenascina-C, molécula de la matriz extracelular que se expresa en condiciones patológicas, como el infarto cardíaco⁴¹. La disminución del número celular observada en MCN transducidos con el AdAT₁R y estimulados con Ang II, puede ser provocada por la cantidad de receptores expresados por los MCN, ya que luego de la transducción con el AdAT₁R, el estímulo con Ang II tuvo una duración de 48 y 72 h, tiempo en el cual el virus continua su expresión dentro de la célula, y al estar tan sobre expresado el AT₁R, Ang II podría provocar la muerte en los MCN, estos resultados son coincidentes con los resultados previos, con respecto a la pérdida en el número celular. Resultados anteriores han demostrado que la muerte celular o pérdida de viabilidad es paralela al número de receptores⁴², por lo tanto en condiciones de ensayo mayor a 24 h, la expresión del adenovirus sigue su curso, aumentando el número de receptores, lo que estaría causando la pérdida de viabilidad.

La matriz extracelular está compuesta predominantemente por fibronectina y colágeno tipo I, proteínas que se encuentran elevadas después del infarto al miocardio. Las integrinas, median la adhesión celular a la matriz extracelular. Debido a que los procesos de adhesión celular son una parte integral para lograr la migración celular, estos mecanismos son fundamentales para el remodelado cardíaco. En nuestro estudio se evaluó la capacidad de los MCN para adherirse a distintas proteínas de matriz, observándose, en condiciones basales, una marcada adhesión del miofibroblasto sobre colágeno tipo I, mientras que al estimular con Ang II se observa un aumento de la adhesión sobre todas las matrices (plástico, colágeno I y fibronectina), excepto laminina (Fig. 7). Por otro lado, en MCN transducidos con Ang II (Fig. 8), se observó nuevamente un aumento de la adhesión sobre colágeno I, sin embargo, al estimular con Ang II, se produjo una disminución significativa en el número de células adheridas a las distintas matrices. Se ha observado en otros estudios que Ang II promueve la adhesión de fibroblastos cardiacos sobre colágeno tipo I, a través de integrina β_1 ¹⁵, también se ha visto que Ang II promueve la adhesión del fibroblasto sobre fibronectina⁴³, esto es concordante con nuestros resultados. La disminución del número de células en MCN transducidos con el receptor AT₁, producida por Ang II, podría estar relacionada con condiciones experimentales, como el MOI utilizado, que pudo provocar la baja en el número de células adheridas.

Los miofibroblastos son responsables de la generación de fuerza contráctil en el tejido de granulación y en estado patológicos. El tejido de granulación que contiene miofibroblastos es capaz de generar cantidades medibles de fuerza isométrica en respuesta a distintas moléculas. Se ha observado que los fibroblastos cardiacos son capaces de contraerse en respuesta a Ang II y TGF- β_1 ^{44, 45}. En este estudio se evaluó la capacidad contráctil de MCN, en presencia de Ang II. Los resultados obtenidos mostraron que, en condiciones basales, Ang II produjo un aumento significativo en la contracción del miofibroblasto, por otro lado, al estimular con TGF- β_1 , se produjo el mismo efecto promotor de la contracción. Por el contrario, en MCN transducidos con el AdAT₁R, no se observó la contracción del gel de colágeno, tampoco al estimular con Ang II se produjo contracción (Fig. 10). La literatura sólo describe la contracción de miofibroblastos cardiacos en respuesta a TGF- β_1 , que está asociado a un potente efecto promotor de la contracción³⁸, lo que se asemeja a nuestros resultados. El efecto de Ang II sobre la contracción es importante en la cicatrización de la herida en el daño cardiaco, condición en la cual Ang II se encuentra aumentada. Existen estudios en que se observa que la contracción mediada por fibroblastos cardiacos, inducida por Ang II, está mediada por el receptor AT₁⁴⁶. Nuestros resultados muestran que al sobre expresar el receptor no hay contracción de los geles de colágeno, esto puede ser debido a las condiciones experimentales, en que el MOI utilizado fue muy alto, y el tiempo de incubación con los estímulos fue prolongado, para poder observar la contracción, todos estos factores pueden afectar de alguna manera a disminuir la capacidad contráctil de los miofibroblastos.

Está establecido que los miofibroblastos son células altamente secretoras de proteínas de la matriz extracelular, función fundamental en la reparación de tejidos, en caso de daño al tejido cardiaco. Para evaluar la capacidad secretora de proteínas de matriz de MCN se realizó Western Blot de extracto celular y de medio de cultivo de miofibroblastos, estimulados con Ang II. Las proteínas llamadas como extracto celular, corresponden a proteínas sintetizadas dentro de la célula y también a proteínas que se secretaron, pero que quedaron adheridas a las células desde el medio externo, en cambio, lo que llamamos proteínas secretadas al medio de cultivo, corresponde a proteínas que han sido secretadas, pero que se encuentran solubles en el medio de cultivo, es decir, no se han adherido a la superficie celular, o no han terminado de formar las fibrillas que son las que se depositan sobre la superficie celular (lado externo

de la membrana celular) o sobre la placa de cultivo. Los resultados mostraron que, en condiciones basales, Ang II no cambió la expresión de fibronectina (Fig. 11) al interior de la célula, mientras que al sobre expresar el receptor AT₁, Ang II produjo un aumento significativo en la expresión de esta proteína. Al evaluar la secreción de fibronectina al medio de cultivo celular (Fig. 12), podemos observar nuevamente que, en condiciones basales, Ang II no produjo cambios en la expresión de FN, sin embargo la sobre expresión del receptor AT₁, fue capaz por sí sola de promover la secreción de fibronectina al medio celular. Está descrito que Ang II es capaz de promover la expresión de fibronectina en fibroblastos cardiacos, efecto mediado a través del receptor AT₁⁴⁷.

Entre las proteínas de la MEC, aproximadamente, el 85 % es colágeno, de los cuales 2/3 corresponden a colágeno tipos I y III. En el sistema cardiovascular, colágeno tipo I usualmente está presente como fibras gruesas con una alta resistencia a la tensión, esta proteína es sintetizada a partir de su precursor, procolágeno-1, el cual es sintetizado por fibroblastos cardiacos. En este estudio se evaluó la expresión de colágeno tipo I en MCN (Fig. 13), en los resultados observamos que, en condiciones basales, Ang II no promovió la expresión de colágeno I, sin embargo, al sobre expresar el receptor AT₁, angiotensina II fue capaz de aumentar la expresión de colágeno tipo I en el miofibroblasto cardiaco. En la literatura se encuentra descrito que Ang II promueve la síntesis de colágeno en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos, y que este efecto es mediado por el receptor AT₁^{48, 49}. Además, se ha observado que los miofibroblastos poseen una mayor actividad secretora de colágeno, en comparación con los fibroblastos⁵⁰. Estos resultados nos indican que el miofibroblasto es una célula altamente secretora de proteínas de matriz, y que esta condición es promovida por Ang II, y está mediada por el receptor AT₁, el cual en condiciones patológicas se encuentra sobre expresado, indicando que en el caso de daño al tejido cardiaco, el miofibroblasto es el principal encargado de la reparación y cicatrización de la herida.

Como se mencionó anteriormente, la matriz extracelular está conformada en su mayoría por colágeno, el cual provee integridad al tejido cardiaco. La síntesis y degradación de colágeno fibrilar son procesos fundamentales en el mantenimiento normal de la MEC, se ha sugerido al sistema renina-angiotensina II como una de las principales vías involucradas en el remodelado de la matriz extracelular⁵¹. Se ha observado que Ang II produce dos efectos sobre la MEC cardiaca, induce la

acumulación de colágeno (aumentando su síntesis), y a su vez disminuye la degradación de esta proteína por una reducción en la actividad de las metaloproteasas⁵². Estas MMPs constituyen una familia de 24 enzimas, de las cuales MMP-2 y MMP-9 juegan un papel fundamental luego del infarto al miocardio. En este estudio se evaluó la actividad de MMP-2 en el medio de cultivo celular de miofibroblastos transducidos con el AdAT₁R. Nuestros resultados mostraron (Fig. 14) que en condiciones basales, Ang II disminuyó de manera significativa la actividad de MMP-2 en el medio extracelular, por otra parte, al sobre expresar el receptor AT₁, nuevamente se observó una disminución en la actividad de MMP-2, tanto en el control, como en los MCN estimulados con Ang II, en los cuales la disminución es mayor. En estudios realizados en fibroblastos cardiacos, se ha observado que Ang II disminuye de manera significativa la actividad de MMP-2, efecto mediado a través del receptor AT₁⁵³, situación que es similar a la obtenida en nuestros resultados. Por lo tanto, hemos observado que la activación del receptor AT₁ por angiotensina II parece estimular la síntesis de colágeno tipo I, e inhibir la actividad de MMP-2, lo que resultaría en un incremento neto del colágeno fibrilar.

Finalmente, podemos concluir que al sobre expresar el AT₁R, Ang II promueve acciones de tipo fibrogénicas en el tejido cardiaco, las que serían considerablemente mayor a las observadas en condiciones basales. El miofibroblasto juega un rol fundamental en estos mecanismos, contribuyendo a la secreción de proteínas de matriz, y disminuyendo su degradación, ayudando así a la reparación del tejido dañado. Sin embargo, de nuestros resultados también se puede concluir que en condiciones de sobre expresión del receptor, la elevada actividad fibrogénica de Ang II podría tener dos consecuencias, y que ellas dependerían de una escala temporal más cercana o lejana del momento del daño tisular. En forma temprana participarían en una rápida y efectiva cicatrización, sin embargo en un tiempo más tardío ello llevaría a un depósito excesivo de colágeno conduciendo a una fibrosis patológica, con un gran componente de rigidez del tejido cardiaco, paso previo a un remodelado patológico que llevaría a una insuficiencia cardiaca.

8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El presente estudio se vio afectado por diversas dificultades, las cuales influyeron en algunos de los resultados presentados anteriormente.

Por un lado, en este trabajo, para la realización de los diferentes ensayos de evaluación de comportamiento celular de MCN, se utilizó adenovirus como herramienta para sobre expresar el AT₁R (AdAT₁R) en estas células. Sin embargo, se utilizaron dos lotes distintos de AdAT₁R, lo que ocasionó dificultad en la comparación de los resultados, ya que algunos ensayos (secreción y expresión de proteínas de MEC y actividad de MMP-2) se realizaron con un primer lote de AdAT₁R, mientras que los demás ensayos (de proliferación, migración, adhesión y contracción) se realizaron con un segundo lote. Esta situación nos permitió sacar conclusiones parciales sobre el comportamiento celular de miofibroblastos transducidos con el AdAT₁R. A futuro, debieran realizarse la totalidad de los ensayos con un único lote de AdAT₁R, para no ocasionar dificultad en la comparación de los resultados.

Por otra parte, en nuestro laboratorio estudios de unión de radioligandos a AT₁R, se determinaron los parámetros farmacológicos (B_{max} y kD) en MCN. No hubo pérdida de la viabilidad celular bajo esas condiciones (Ang II 100 nM por 24 h). Sin embargo, en los estudios de este trabajo no se consideró que la sobre expresión del adenovirus sigue su curso, y por lo tanto en los ensayos de comportamiento celular de MCN-AdAT₁R, incubando por períodos de hasta 72 h con Ang II, se observó una pérdida de la viabilidad, la cual no había sido observada anteriormente. Esta disminución en la viabilidad de MCN afectó el resultado de ensayos que requerían de tiempos de incubación mayores a 24 h (proliferación, migración y contracción de geles de colágeno). En futuros estudios sería necesario evaluar el efecto de Ang II sobre el comportamiento de MCN transducidos con AdAT₁R a una multiplicidad de infección más baja, lo que nos permitiría observar un efecto sin llevar a una pérdida en la viabilidad de las células, sin embargo ello significaría determinar los parámetros farmacológicos antes mencionados.

Además, al realizar ensayos con miofibroblastos transducidos con el Ad-AT₁R, se debió realizar controles de actividad biológica con el adenovirus Ad-GFP para cada uno de los ensayos, lo cual no se pudo efectuar debido a que el laboratorio no contaba con este adenovirus en el momento de realizar estos ensayos. Sin embargo, estos

controles habían sido realizados en trabajos anteriores de nuestro laboratorio, sin que el Ad-GFP afectara el resultado de los ensayos, por lo que pensamos que en los ensayos realizados en este estudio no debieran existir cambios con respecto al efecto del Ad-GFP.

9. CONCLUSIONES

1. Ang II no afectó la proliferación de MCN en condiciones basales, pero si lo hizo al sobre expresar el receptor AT₁, en donde se produjo una pérdida de la viabilidad de los MCN transducidos con el AdAT₁R. La migración celular no se afectó por Ang II en MCN basales, mientras que al sobre expresar el receptor, se observó pérdida de la viabilidad.
2. Ang II aumentó la adhesión de MCN basales sobre colágeno tipo I y fibronectina, mientras que al sobre expresar el AT₁R se observó una disminución del número de células adheridas.
3. En condiciones basales Ang II aumentó la contracción de MCN, sin embargo, al sobre expresar el AT₁R no se observó dicho efecto.
4. Ang II promovió la secreción y deposición de proteínas de matriz extracelular, colágeno tipo I y fibronectina, en MCN que sobre expresan el AT₁R.
5. Ang II disminuyó la actividad de MMP-2 en el medio de cultivo de MCN, tanto en condiciones basales, como al sobre expresar el AT₁R.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud, 55ª Asamblea Mundial de la Salud, A55/16, punto 13.11, 27 de Marzo de 2002.
2. Weber KT. Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertens*. 2004; 22:47-50.
3. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*. 2003; 200:500-503.
4. Booz GW, Baker KM. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 1995; 30:537-543.
5. Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterization of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2005; 65:40-51.
6. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, and West AB. Myofibroblasts. I Paracrine cells important in health and disease. *Am. J. Physiol*. 1999; 277: C1-C19.
7. Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res*. 2000; 46: 250-256.
8. Norman D. An exploration of two opposing theories of wound contraction. *Wound Care*. 2004; 13:138-140.
9. Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol*. 2003; 14:538-546.
10. Hinz B. Masters and servants of the force: The role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. *Eur J Cell Biol*. 2006; 85:175-181.
11. Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2003; 14:2508-2519.
12. Ronnov-Jessen L, Petersen OW. A function for filamentous alpha-smooth muscle actin: retardation of motility in fibroblasts. *J Cell Biol*. 1996; 134:67-80.
13. Clark E, Brugge L. Integrins and signal transduction pathway: the road taken. *Science*. 1995; 268:233-9.
14. Hynes R. Integrins: versality, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell*. 1992; 69:11-25.

15. Stawowy P, Margeta C, Blaschke F, Lindschau C, Spencer-Hänsch, Leitges M, Biagini G, Fleck E, Graf K. Protein kinase C epsilon mediates angiotensin II-induced activation of β_1 -integrins in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2005; 67:50-59.
16. Cleutjens JP, Blankesteyn WM, Daemen MJ, Smits JF. The infarcted myocardium: simple death tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovasc Res*. 1999.
17. Siragy H. Angiotensin II receptors blockers: Review of the binding characteristics. *Am J Cardiol*. 1999; 84:3S-8S.
18. 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.
19. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000; 52:415-472.
20. Schiffrin E. Vascular and cardiac benefits of angiotensin receptor blockers. *Am J Med*. 2002; 113: 409–418.
21. De Gasparo M, Levens N. Does blockade of angiotensin II receptors offer clinical benefits over inhibition of angiotensin-converting enzyme? *Pharmacol Toxicol*. 1998; 82:257–271.
22. Sun Y, Weber KT. Cells expressing angiotensin II receptors in fibrous tissue of rat heart. *Cardiovasc Res*. 1996; 31:518–525.
23. 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: 44-47.
24. Tsuruda T, Costello-Boerrigter LC, Burnett JC. Matriz metalloproteinases: pathways of induction by bioactive molecules. *Heart Fail Rev*. 2004; 9: 53-61.
25. Wharton J, Morgan K, Rutherford RA, Catravas JD, Chester A, Whitehead BF, De Leval MR, Yacoub MH, Polak JM. Differential distribution of angiotensin AT2 receptors in the normal and failing human heart. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998; 284:323-336.
26. Lopez JJ, Lorell BH, Ingelfinger JR, Weinberg EO, Schunkert H, Diamant D, Tang SS. Distribution and function of cardiac angiotensin AT1- and AT2-receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am J Physiol*. 1994; 267:H844-H852.

27. Gago Badenas F. Bases teóricas de la interacción fármaco-receptor. Tratamiento y representación grafica de los datos. Segunda edición, 1992. Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Alcalá de Henares.
28. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 2007; 127:526-537.
29. 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.
30. Soto C. Muerte celular de fibroblastos y miofibroblastos cardiacos neonatos por sobreexpresión de los receptores tipo 1 y 2 de angiotensina II.. Memoria de título Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 2006
31. 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; 106:847-853.
32. Jugdutt B, Menon V. AT2 receptor and apoptosis during AT1 receptor blockade in reperfused myocardial infarction in the rat. *Mol Cell Biochem.* 2004; 262: 203–214.
33. Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2002; 91: 1103-1113.
34. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999; 79: 215-262.
35. Yoshiyuki H, Akimoto K, Nishikimi T, Matsuoka H, Kasai K. Activation of AMP-activated protein kinase enhances angiotensin II-induced proliferation in cardiac fibroblasts. *Hypertension.* 2006; 47: 265-270.
36. McEwan P, Gray G, Sherry L, Webb D, Kenyon C. Differential effects of angiotensin II on cardiac cell proliferation and intramyocardial perivascular fibrosis in vivo. *Circulation.* 1998; 98: 2765-2773.
37. Vivar R. Apoptosis dependiente de angiotensina II en fibroblastos cardiacos de ratas neonatas que sobre expresan el receptor subtipo AT₁: participación de la vía PLC-PKC. Memoria de Título, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 2007.
38. Dobric V, Cunnington R, Bedosky K, Raizman J, Elimban V, Rattan S, Dixon J. Differential and combined effects of cardiotrophin-1 and TGF- β_1 on cardiac miofibroblasts proliferation and contraction. *Am J Physiol.* 293: H1053-H1064.

39. Freed DH, Moon MC, Borowiec AM, Jones SC, Zahradka P, Dixon IM. Cardiotrophin-1: expression in experimental myocardial infarction and potential role in post-MI wound healing. *Mol Cell Biochem.* 2004; 254: 247-256.
40. Mitchell MD, Laird RE, Brown D, Long CS. IL- β_1 stimulates rat cardiac fibroblast migration via MAP kinase pathways. *Am J Physiol.* 2007; 292: 1139-1147.
41. Taniaoki M, Imanaka-Yoshida K, Yokoyama K, Nishioka T, Inada H, Hiroe M, Sakakura T, Yoshida T. Tenascin-C regulates recruitment of miofibroblasts during repair after myocardial injury. *Am J Pathol.* 2005; 167: 71-80.
42. Aránguiz Urroz P.: Sobre expresión 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. Memoria de título, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 2005.
43. Thibault G, Lacombe MJ, Schnapp L, Lacasse A, Bouzeghrane F, Lapalme G. Upregulation of alpha 8 beta 1-integrin in cardiac fibroblast by angiotensin II and transforming growth factor-beta 1. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 281: 1457-1467.
44. Lijnen P, Petrov V, Fagard R. Transforming growth factor- β_1 -mediated collagen gel contraction by cardiac fibroblast. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2003; 4: 113-118.
45. Lijnen P, Petrov V, Díaz-Araya G, Fagard R. Effect of bestatin on angiotensin I-II and II-induced collagen gel contraction in cardiac fibroblast.. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2004;5:183-188.
46. Watson S, Burnside T, Carver W. Angiotensin II-stimulated collagen gel contraction by heart fibroblast: role of the AT₁ receptor and tyrosine kinase activity. 1998; 177: 224-231.
47. Kawano H, Do YS, Kawano Y, Starnes V, Barr M, Law R, Hsueh W. Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. *Circulation.* 2000; 101: 1130-1137.
48. Staufenberger S, Jacobs M, Brandstatter K, Hafner M, Regitz-Zagrosek V, Ehl G, Schorb W. Angiotensin II type 1 receptor regulation and differential trophic effects on rat cardiac myofibroblasts after acute myocardial infarction. *J Cell Physiol.* 2001; 187: 326-335.

49. Weber KT, Sun Y, Katwa LC. Myofibroblast and local angiotensin II in rat cardiac tissue repair. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; 29: 31-42.
50. Petrov W, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor- β_1 during differentiation of cardiac fibroblast to myofibroblast. *Hypertension.* 2002; 39: 258-263.
51. Brilla CG, Rupp H, Funck R, Marsch B. The renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial collagen matrix remodelling in congestive heart failure. *Eur Heart J.* 1995; 16: 107-109.
52. Booz GW, Dostal DE, Baker KM. Paracrine actions of cardiac fibroblasts on cardiomyocytes: implications for the cardiac rennin-angiotensin system. *Am J Cardiol.* 1999; 83: 44-47.
53. Stacy L, Yu Q, Horak, Larson D. Effect of angiotensin II on primary cardiac fibroblast matrix metalloproteinase activities. *Perfus.* 2007; 22:51-55.