



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

Conversación cruzada en las vías de señalización del receptor β 2-adrenérgico y B2 de cininas y su efecto en la adhesión, migración, secreción de colágeno y diferenciación en fibroblastos cardiacos

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

CRISTOPHER FABIAN RIVAS ESPINOSA

Patrocinante:

Dr. Guillermo Díaz-Araya.

Director de tesis:

Dr. Guillermo Díaz-Araya.

Santiago, Chile

2013

Agradecimientos

Primero que todo quiero agradecer a mis padres Raquel (Mony) y José (Lin) quienes me han brindado su amor y toda la comprensión, por apoyarme desde siempre, y estar alentándome constantemente, gracias a ellos por todo el cariño que me entregan día a día. También agradecer a otra integrante de mi familia Andrea, a ti te agradezco por ser mi compañera de la vida por las mil y una situaciones que hemos pasado juntos por estos seis años donde me viste crecer desde que era mechón hasta ahora que estoy a un paso de ser QF.

Junto con esto quiero agradecer sinceramente al Dr. Guillermo Diaz, por permitirme trabajar en su laboratorio y permitirme conocer la ciencia desde el origen mismo; por brindarme todas las herramientas para llevar a cabo esta tesis, por su apoyo y consejos que guiaron mis pasos y mis experimentos, por todo lo anterior le estoy muy agradecido.

Obviamente el laboratorio no sería un lugar tan ameno para trabajar sin sus integrantes, Raúl, Pedro, Pablo, Diego, Pía, Claudia, Mábel, Ivonne, chicos los aprecio mucho y estoy muy agradecido de haber compartido los día a día en el lab, los momentos de distensión, y también por ayudarme con los experimentos dándome consejos de cómo optimizarlos y llegar a buen puerto, agradecerles por ser muy generosos con sus conocimientos y por ser excelentes personas. También quiero agradecer a Don Fidel Albornoz (maestrizo), ya que sin él ningún experimento hubiese sido posible.

A todos ustedes, muchas gracias porque de una forma u otra, contribuyeron a que esto sea posible.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	3
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
SUMMARY	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Generalidades	10
1.2 Remodelamiento cardiaco	10
1.3 Estructura del músculo cardiaco	10
1.3.1 Fibroblastos cardiacos	11
1.3.2 Miofibroblastos cardiacos	12
1.4 Receptores en membrana plasmática de FC y MFC	13
1.5 Receptores adrenérgico	13
1.5.1 Vía de señalización del AMPc	14
1.6 Cininas-caliceínas y su función moduladora en la producción de la MEC	15
1.7 Antecedentes del <i>cross-talk</i> Gs-Gq	17
2. HIPÓTESIS	18
3. OBJETIVO GENERAL	18
4. OBJETIVO ESPECÍFICO	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 Reactivos	19
5.2 Modelo animal	19
5.3 Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardiacos de ratas neonatas	19
5.4 Diferenciación celular	20

5.5	Determinación de los niveles de AMPc	20
5.6	Preparación de extractos celulares totales	20
5.7	Electroforesis en geles de poliacrilamida	21
5.8	Electrotransferencia de proteínas	21
5.9	Inmunowestern blot	21
5.10	Adhesión celular	22
5.11	Migración celular	22
5.12	Inmunocitoquímica	22
5.13	Análisis estadístico	23
6.	RESULTADOS	24
7.	DISCUSIÓN	37
7.1	Niveles de AMPc en presencia de ISO y/o BK	37
7.2	Adhesión de fibroblasto cardiacos de ratas neonatas	38
7.3	Migración de fibroblastos cardiacos de ratas neonatas	39
7.4	Efecto de ISO y/o BK sobre la síntesis de colágeno en fibroblastos cardiacos de ratas neonatas	40
7.5	Diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos por efecto de TGF- β 1	41
7.6	Modelo propuesto del efecto antifibrótico de AMPc, por efecto de la co-estimulación Gs-Gq en FC.	43
8.	Limitaciones	44
9.	Conclusiones	44
	Bibliografía	45

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Comportamiento celular de los fibroblastos cardiacos	11
Figura 2: Receptores de cininas y adrenérgicos en fibroblastos y Miofibroblastos cardiacos	13
Figura 3: Vías activadas por el receptores β 2-adrenérgico en fibroblastos cardiacos	15
Figura 4: Vías transduccionales activadas por los receptores B1 y B2 de cininas	16
Figura 5: Efecto de ISO y/o BK en los niveles de AMPc	23
Figura 6: Efecto de los inhibidores de PLC, PKC, CAMK-II en los niveles de AMPc producidos al co-estimular con ISO y BK	24
Figura 7: Efecto ISO y/o BK sobre la adhesión de fibroblastos cardiacos sobre plástico	25
Figura 8: Fotografías de fibroblastos cardiacos (40x)	27
Figura 9: Efecto de la migración celular sobre el cierre de la herida en fibroblastos cardiacos	27
Figura 10: Efecto de ISO y/o BK en la síntesis de colágeno α 1	28
Figura 11: Participación de PLC en la síntesis de colágeno α 1	29
Figura 12: Participación de PKC en la síntesis de colágeno α 1 inducida por Ang II	30
Figura 13: Participación de PKC en la síntesis de colágeno α 1	31
Figura 14: Participación de CaMK-II en la síntesis de colágeno α 1	32
Figura 15: Diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos por efecto de TGF- β	33

Figura 16:	Efecto de ISO y/o BK en la expresión de α -SMA en fibroblastos cardiacos estimulados con TGF- β 1	34
Figura 17:	Inmunocitoquímica de α -SMA	35
Figura 18:	Vía de señalización canónica de TGF- β 1	41
Figura 19:	Modelo propuesto del efecto antifibrótico de AMPc, por efecto de la co-estimulación Gs-Gq en FC	42

ABREVIATURAS

α -SMA	: Alfa actina de músculo liso
AC	: Adenilato ciclasa
Ang II	: Angiotensina II
AMPC	: 3',5'-adenosina monofosfato cíclico
BK	: Bradicinina
CaMK-II	: Calcio/calmodulina quinasa II
DMEM F-12	: Medio de mantención modificado Dulbecco
DMSO	: Dimetil sulfóxido
ECV	: Enfermedades cardiovasculares
Epac	: Proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina activada por AMPC
EZ-ECL	: Reactivo quimioluminiscente para inmunowestern blot
FBS	: Suero fetal de bovino
FC	: Fibroblastos cardíacos neonatos de rata
FCS	: Suero fetal de cabra
Fig.	: Figura
GPCR	: Receptor acoplado a proteína G
h	: Hora
HEPES	: Acido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfónico
HTA	: Hipertensión arterial
IBMX	: 3-isobutil-1-metilxantina
ISO	: Isoprotenerol
IWB	: Inmunowesternblot
kDa	: Kilo Dalton
MFC	: Miofibroblastos cardiacos de ratas neonatas
MEC	: Matriz extracelular
mg	: Miligramos
min	: Minutos
MMP	: Metaloproteasa
mL	: Mililitro
ng	: Nanogramos
nm	: Nanometros
Nm	: Nanomolar
PBS	: Tampón fosfato salino
PKA	: Proteína quinasa A
RC	: Remodelamiento cardiaco
p/v	: Porcentaje peso volumen
rpm	: Revoluciones por minuto
SD	: Desviación estándar
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	: Gel de poliacrilamida denaturante
TEMED	: N, N, N, N- tetrametil- etilendiamina
TBS	: Tampón tris salino
TGF β ₁	: Factor de crecimiento transformante beta 1
μ g	: Microgramo
μ m	: Micromolar

RESUMEN

Los fibroblastos cardiacos son las principales células no contráctiles presentes en el miocardio. Su función principal es preservar la estructura y el buen funcionamiento cardiaco, lo cual se realiza a través de la síntesis y secreción de componentes de la matriz extracelular. Después de un daño tisular, los fibroblastos cardiacos son células claves, del proceso reparativo y de cicatrización. Si este proceso se exagera, se llega a fibrosis cardiaca rigidizando el corazón e incrementando el riesgo de arritmias, alterando fuertemente la función cardiaca.

En este sentido, se ha demostrado que el aumento de AMPc, contribuye a disminuir el grado de fibrosis cardíaca, por regulación de procesos tales como adhesión, migración, secreción de colágeno y la diferenciación celular.

En fibroblastos cardiacos se ha descrito que isoproterenol, un agonista de los receptores β -adrenérgicos, actúa vía Gs y estimula la producción de AMPc. Por otro lado, BK agonista del receptor B2 de cininas, activa su receptor vía Gq, y por sí mismo, no altera la producción de AMPc. Sin embargo, BK en combinación con isoproterenol potencia la respuesta adrenérgica aumentando de manera sinérgica la producción de AMPc en relación a la activación solo por isoproterenol.

El objetivo de este trabajo fue estudiar *in vitro*, en cultivos primarios de fibroblastos cardiacos de ratas neonatas, el *cross-talk* entre las vías de señalización Gs-Gq y determinar si el aumento en los niveles de AMPc modula la adhesión, migración, síntesis de colágeno y diferenciación en fibroblastos cardiacos.

BK tiene un efecto sinérgico en los niveles de AMPc aumentados por isoproterenol. Del mismo modo, BK potencia la adhesión de fibroblastos cardiacos estimulada por Isoproterenol; sin embargo, BK no tiene efectos sobre la migración en los fibroblastos cardiacos inducida por isoproterenol. Por otro lado, BK e isoproterenol por separado disminuyen la síntesis de colágeno; sin embargo, la administración conjunta de ISO+BK induce una mayor disminución de la síntesis. El efecto sinérgico de BK sobre el aumento de AMPc inducido por ISO potencia la inhibición de la diferenciación celular de fibroblasto a miofibroblasto estimulada por TGF- β 1.

Finalmente, determinamos que el efecto sinérgico de BK sobre la señalización de ISO es gatillada vía Gq-PLC-CaMK-II, conduciendo al aumento sinérgico en la producción de AMPc.

SUMMARY

Crosstalk between signaling pathways of β 2-adrenergic and B2 kinin receptors and its effect on the adhesion, migration, differentiation and collagen secretion in cardiac fibroblasts

Cardiac fibroblasts are the major non-contractile cells present in the myocardium. Its main function is to preserve the structure and the proper functioning of the heart, which is done through the synthesis and secretion of extracellular matrix components. After tissue injury, cardiac fibroblasts are key cells of the reparative process and healing. If this process is exacerbated cardiac fibrosis is reached, stiffening the heart and increasing the risk of arrhythmia, altering strongly the heart function

In this regard, it has been shown that the increase of cAMP, helps to reduce the degree of cardiac fibrosis, by regulating processes such as adhesion, migration, collagen secretion and cell differentiation.

In cardiac fibroblasts has been reported that isoproterenol, an agonist of β -adrenergic receptors, acts via Gs and stimulates the production of cAMP. On the other hand, BK an agonist of B2 kinin receptor, activates its receptor Gq, and by itself does not alter cAMP production. However, in combination with isoproterenol enhances the adrenergic response, increasing the levels of cAMP in a synergistic manner, in relation to activation by isoproterenol alone.

The aim of this work was to study in vitro, in cultured of neonatal rat cardiac fibroblasts, the cross-talk between signaling pathways Gs-Gq and determine if the increase in cAMP modulates adhesion, migration, collagen secretion and differentiation in cardiac fibroblasts. BK has a synergistic effect on cAMP levels increased by isoproterenol. Similarly, BK enhances the adhesion of cardiac fibroblasts stimulated by isoproterenol, but BK has no effect on migration in cardiac fibroblasts induced by isoproterenol. Furthermore, BK and isoproterenol separately decrease collagen synthesis, but the co-administration of ISO+ BK induces a greater decrease in the synthesis.

The synergistic effect of BK in the cAMP levels induced by ISO, showed inhibit the cellular differentiation of fibroblasts into myofibroblasts stimulated by TGF- β 1

Finally, we determined that the synergistic effect of BK on ISO signaling is triggered via Gq-PLC-CaMK-II, leading to the synergistic increase in cAMP production.

INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades cardiovasculares (ECV) son hoy en día, una de las principales causas de muerte en los países de desarrollo intermedio o avanzado representando alrededor del 30% de las defunciones mundiales [1]. En Chile, producto de la transición demográfica y epidemiológica de las últimas décadas, la situación es similar [2]. Por este motivo, resulta de gran trascendencia investigar tanto a nivel clínico como básico las causalidades de las ECV, con el fin de disminuir estas cifras.

1.2 REMODELAMIENTO CARDIACO

Una consecuencia común de las ECV es el remodelamiento cardiaco, proceso caracterizado por cambios anatómicos, geométricos, histológicos y moleculares, que se observan en respuesta a una sobrecarga de trabajo o daño miocárdico. Dichos cambios alteran la función cardiaca, y macroscópicamente se observa un cambio de la forma del corazón (de elipsoide a una más esférica), hipertrofia y **fibrosis cardiaca** [3,4]. La acumulación de las proteínas de la matriz extracelular (MEC) y en particular de colágeno tipo I, el principal colágeno encontrado en fibrosis cardiaca, endurece los ventrículos e impide tanto la contracción como la relajación cardiaca [5]. Esta acumulación exagerada, puede deberse a un desproporcionado aumento en la síntesis y/o en la inhibición de la degradación de ella [6].

1.3 ESTRUCTURA DEL MÚSCULO CARDÍACO

A nivel celular, el corazón está compuesto principalmente por cardiomiocitos y fibroblastos cardiacos (FC). Los cardiomiocitos corresponden a un 30% de las células constituyentes del corazón, ocupando un 70% del volumen cardiaco, mientras que los FC, principales células no musculares del corazón, corresponden a un 70% del total de células y ocupan un 30% del volumen total del miocardio [7]. Menos del 5% corresponde a otras células no musculares, tales como células endoteliales, células del músculo liso vascular, mastocitos y células residentes del sistema inmune [8].

1.3.1 FIBROBLASTOS CARDIACOS

Son las principales células no contráctiles presentes en el miocardio, son definidas como células de origen mesenquimático [9]. Su función principal es preservar la estructura cardíaca y el buen funcionamiento, lo cual se realiza a través de la síntesis y secreción de componentes de la MEC (colágeno, fibronectina, etc), que actúa como una red que ayuda a delimitar la estructura cardíaca [7]. Además son capaces de actuar como sensores de los cambios del entorno y reaccionar frente a estímulos externos, tanto mecánicos como químicos, produciendo citoquinas de acción autocrina y paracrina, gracias a las cuales pueden migrar, proliferar y diferenciarse a un fenotipo mucho más activo los miofibroblastos cardíacos (MFC) [10] (ver figura 1).

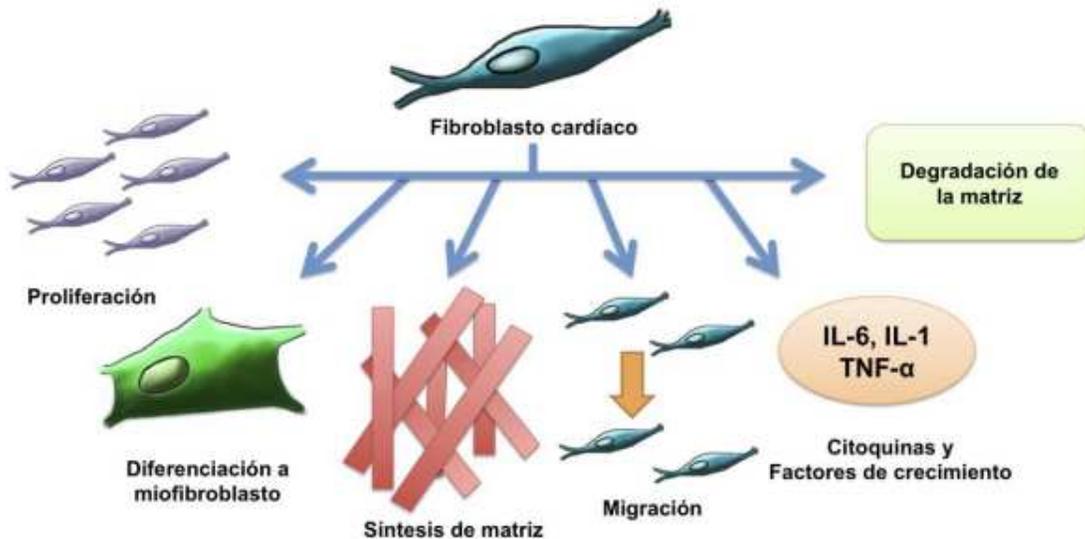


Figura 1. Comportamiento celular de los fibroblastos cardíacos (de Colby A. Souders, Stephanie L.K. Bowers and Troy A. Baudino. *Circulation Research* 2009; 105:1164-1176)

En condiciones fisiológicas, los FC cardíacos están encargados de mantener la homeostasis de la MEC. Sin embargo, en condiciones patológicas, p.e. en un infarto al miocardio o HTA, los FC son activados en respuesta a este daño, participando activamente, como células clave, del proceso reparativo y de cicatrización [9]. Esta activación se lleva a cabo gracias a la producción de diversas citoquinas y factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento transformante subtipo beta (TGF- β) [11]. Al activarse estas células comienzan con una gran proliferación, secreción de colágeno

(principalmente de tipo I y III), y degradación de la MEC [12]. La activación de los FC involucra su proliferación y diferenciación a MFC, ambos tipos celulares pueden conducir a un exceso de producción de la MEC y eventualmente llegar a fibrosis cardiaca [11].

1.3.2 MIOFIBROBLASTOS CARDIACOS

Son un subtipo especializado de FC involucrados en la cicatrización de heridas en muchos tejidos. La diferenciación de los FC a MFC se caracteriza por la expresión tanto de una proteína conocida como alfa actina del musculo liso (α -SMA) como de una variante de empalme de la fibronectina conocida como ED-A fibronectina [11]. En un MFC la α -SMA debe estar organizada como fibras de estrés en el citoesqueleto. Esta reorganización permite una contracción lenta y sostenida, que es responsable de cierre de la herida, mientras que la naturaleza hipersecretora permite el depósito de grandes cantidades de proteínas de la MEC en el sitio de la herida, lo cual ayuda en la estabilización de la misma [13]. Después de la cicatrización, los MFC mueren por apoptosis, siendo los FC residentes los encargados mantener la MEC. Si este evento no se produce, la hipersecreción de las proteínas de la MEC por los MFC puede conducir a una cicatrización aberrante, y consecuente fibrosis [14]. Se piensa que una falla en la apoptosis de los MFC conduciría a la progresión de la fibrosis [15] y adicionalmente, las citoquinas y otros factores de crecimiento producidos por los MFC podrían, al mismo tiempo, estimular a otros FC y desencadenar su diferenciación, perpetuando la cascada fibrogénica [16]. Debido a esto, es importante conocer los mecanismos moleculares involucrados (cambios en el número y tipo de receptores, cambios en la secreción de MEC, etc) y los mecanismos celulares (adhesión, migración y capacidad contráctil) que ocurre en FC y MFC que conducen al desarrollo de la fibrosis cardiaca.

La formación de MFC es controlada por una variedad de factores de crecimiento, citoquinas y estímulos mecánicos. TGF- β 1 es el principal factor que estimula tanto la formación de MFC, como la síntesis de colágeno [17]. Tales antecedentes sugieren que agentes capaces de inhibir, la transformación FC-MFC estimulada por TGF- β 1 pueden ser un medio capaz de evitar el remodelado cardiaco maladaptativo.

1.4 RECEPTORES EN FIBROBLASTOS Y MIOFIBROBLASTOS CARDIACOS

Según datos generados en nuestro laboratorio y otros reportes de la literatura, se sabe que ambos tipos celulares poseen una variedad de receptores a nivel de membrana plasmática siendo los más estudiados por su participación en procesos de fibrosis los receptores β -2 adrenérgico y los receptores B1-B2 de cininas. Tanto FC como MFC expresan a nivel de membrana los receptores β -2 adrenérgico y B2 de cininas, mientras que el receptor B1 se encuentra en bajos niveles de expresión en FC y se induce su expresión en MFC [18,19] (ver figura 2).

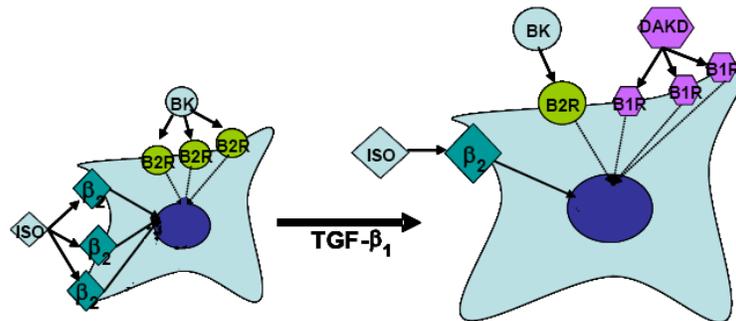


Figura 2. Receptores de cininas y adrenérgicos en fibroblastos / miofibroblastos cardiacos

1.5 RECEPTORES ADRENÉRGICOS.

De la gran cantidad de receptores presentes en el corazón, los más estudiados son los de tipo adrenérgico debido al rol que juegan en la regulación del sistema cardiovascular [20]. Está descrito que los FC de ratas neonatas presentan sólo el receptor β 2 [19]. Este receptor es del tipo de 7 dominios transmembrana y puede estar acoplado dualmente a proteína G (GPCR) estimuladora (Gs) e inhibitoria (Gi). Dichas proteínas están constituidas por 3 subunidades, el complejo $\beta\gamma$ y la subunidad α [21]. El tipo de señal generado está dado por las subunidades α , cuando se acoplan a Gi el GPCR inhibe la adenilato ciclasa (AC), mientras que cuando se acopla a Gs, el GPCR activa a la AC, lo que se traduce en un incremento en los niveles de 3',5'-adenosina monofosfato cíclico (AMPc) [22].

Existen numerosos antecedentes que demuestran que el aumento en la producción de AMPc a nivel cardiaco podría estar contribuyendo a la reducción del proceso fibrótico [23],

razón por la cual la vía de transducción intracelular de aquellos GPCRs que llevan a la activación de la AC y posterior síntesis de AMPc toma importancia en los procesos asociados al remodelamiento cardiaco. En el corazón existen numerosos GPCRs que una vez activados llevan a un aumento en los niveles de AMPc, tanto en cardiomiocitos como en FC. En estos últimos y tal como se comentó anteriormente, se ha documentado la presencia de receptores β 2-adrenérgicos, receptores de adenosina (A2b) y de prostaglandinas los cuales están acoplados a la subunidad Gs y por ende a la generación de AMPc [22].

En este sentido, estudios realizados por nuestro laboratorio y por otros investigadores han demostrado que el Isoproterenol (ISO: un agonista no específico de los receptores β -adrenérgicos) es capaz de regular la proliferación, la secreción de colágeno, la adhesión y migración celular en fibroblastos cardiacos tanto de ratas neonatas como adultas, antecedentes que dan cuenta de la participación del sistema adrenérgico en los procesos de remodelamiento cardiaco [24,25].

1.5.1 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL AMPc

La figura 3 ejemplifica la vía transduccional asociada al ISO. En la vía de señalización asociada al AMPc están involucradas principalmente dos proteínas; la proteína quinasa A (PKA) y la EPAC (del acrónimo Exchange protein activated directly by AMPc), entre otros efectores. EPAC regula la actividad de las GTPasas pequeñas Rap 1 y Rap 2 [26,27], mientras que la PKA regula la activación de factores de transcripción como el CREB (AMPc response element-binding) o GSK3- β (proteína quinasa glicógeno sintasa 3 β) [28]. Experimentos llevados a cabo en el laboratorio confirman que al activar EPAC y PKA por sus agonistas específicos se reduce la síntesis de colágeno tipo I, tanto en FC, como MFC [24].

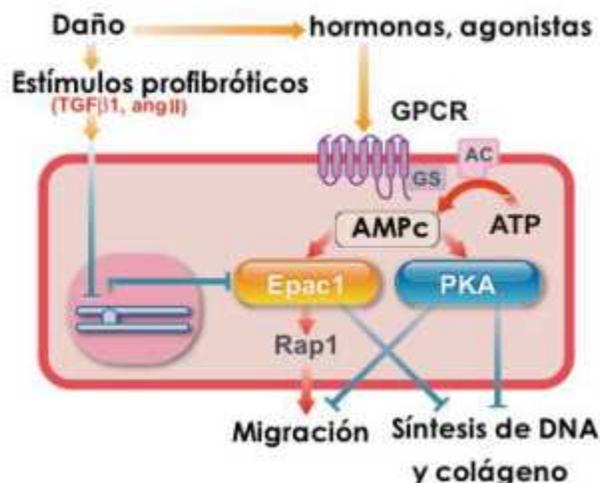


Figura 3. Vías activadas por el receptor β 2-adrenérgico en fibroblastos cardiacos (de Yokoyama U, Patel HH, Lai NC, Aroonsakool N, Roth DM, Insel PA. PNAS. 2008; 105: 6386-6391)

Por otro lado, agonistas de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), que estimulan la producción de AMPc han demostrado recientemente inhibir la expresión de α -SMA inducida por TGF- β 1 y la formación de colágeno por los fibroblastos humanos de pulmón [29]. Estos antecedentes hacen pensar que el aumento en la producción de AMPc a nivel cardiaco podría contribuir a la reducción del proceso fibrótico, razón por la cual la vía de transducción intracelular de aquellos GPCRs que llevan a la activación de la AC y posterior aumento en los niveles de AMPc, toma vital importancia.

Además resultados de nuestro laboratorio indican que aumentos en los niveles de AMPc, se correlacionan con mayor adhesión celular y mayor migración, procesos claves en los procesos de remodelado cardiaco [24].

1.6 CININAS-CALICREÍNAS Y SU FUNCIÓN MODULADORA EN LA PRODUCCIÓN DE LA MEC

Las cininas son polipéptidos farmacológicamente activos, liberados en los tejidos y fluidos corporales como resultado de la acción enzimática de calicreínas sobre cininógenos [30]. Las cininas de relevancia son: la bradicinina endógena (BK) y la Lis-bradicinina (Lis-BK), también llamada calidina (KD) que actúan sobre el receptor B2; mientras que des-Arg-BK (DABK) y des-Arg-LisKD (DAKD), actúan como agonistas del receptor B1 [31]. Los receptores B1 y B2 de las cininas, están acoplados a proteína Gq/Gi poseen siete

dominios de transmembrana. Tras su estimulación activan a PLC, lo que lleva a formación de inositol-1,4,5-trifosfato (aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular) y diacilglicerol (activa a la proteincinasa PKC). Por otra parte, también estimulan a la fosfolipasa A2 (PLA₂), la que incrementa la liberación de ácido araquidónico (AA), sustrato de una gran variedad de mediadores inflamatorios [32]. Tanto FC como MFC expresan la enzima COX, la cual es capaz de catalizar la transformación del AA a derivados prostanoides, siendo de gran relevancia la formación de PGI₂ [33]. Se ha visto que al aumentar los niveles de PGI₂ se produce una disminución en la síntesis y secreción de colágeno, este efecto es bloqueado al inhibir la enzima COX [34]. Esto demuestra que la obtención de derivados prostanoides es necesaria para mediar la disminución en la síntesis y secreción del colágeno. Se sabe que al actuar PGI₂ sobre su receptor intracelular acoplado a proteína Gs, provoca un aumento en la cantidad de AMPc por acción de la adenilato ciclasa [35]. Este aumento sobre el AMPc es clave para mediar los efectos inhibitorios sobre la síntesis de proteínas de la MEC (ver figura 4).

Desde el punto de vista terapéutico sería beneficioso contar con mayor conocimiento sobre el cómo las cininas podrían ayudar a contrarrestar la fibrosis.

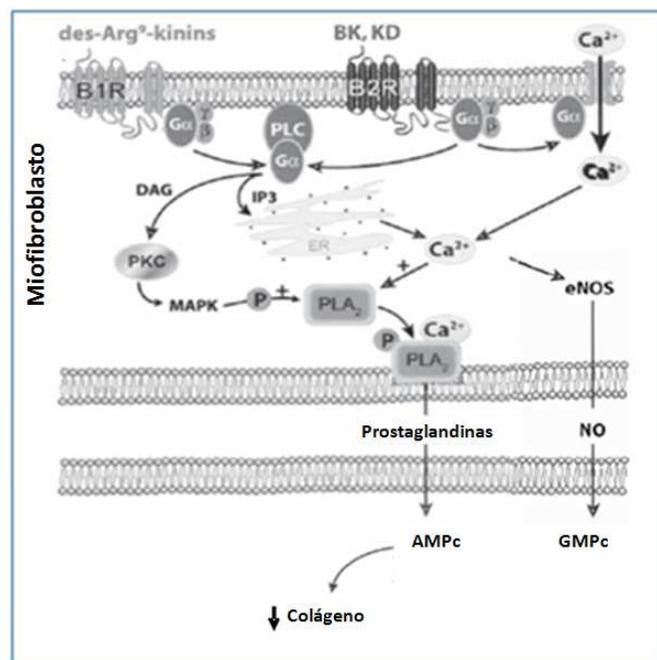


Figura 4. Vías transduccionales activadas por los receptores B1 y B2 de cininas. (Adaptado desde: Marie Eve Moreau, Nancy Garbacki, Giuseppe Molinaro, Nancy J. Brown, François Marceau and Albert Adam. Journal of Pharmacological Sciences 99, 6 – 38 (2005))

Así también, es la adhesión y migración celular un proceso clave dentro de las funciones que ejerce un FC. En relación a este punto, datos del laboratorio indican que agonistas de los receptores de cininas no regulan procesos ni de adhesión ni de migración celular en FC [36].

1.7 ANTECEDENTES DEL *CROSS-TALK* GS-GQ

Se ha descrito recientemente un *cross-talk* entre dos vías claves en la transducción de señales a través de GPCR en FC. ISO un agonista del receptor β -adrenérgico, actúa vía Gs y estimula la producción de AMPc diez veces sobre los niveles basales. BK activa su receptor GPCR vía Gq, mientras que por sí mismo no altera mayormente la producción de AMPc en FC; en combinación con ISO potencia la respuesta adrenérgica aumentando 2 veces la producción de AMPc en relación a la activación solo por ISO [37]. Considerando que BK por si solo ha demostrado tener propiedades antifibróticas al igual que ISO, sería importante estudiar si al administrar en conjunto ISO+BK se produce una mayor disminución en la producción de colágeno que al administrarlos por sí solos, lo cual hipotéticamente tendría una base en que AMPc es un conocido agente antifibrótico.

En relación a la producción de la MEC, se ha demostrado que Ang II activa la síntesis de colágeno, pero cuando es co-administrada con ISO potencia la producción de AMPc. Como resultado de esto, la inhibición en la síntesis de colágeno estimulada por ISO incrementa 31 a 48% en presencia de ANG II [38]. Este resultado estaría dando cuenta del *cross-talk* entre ISO y Ang II (Gs-Gq), el cual tiene consecuencias funcionales regulando hacia abajo la síntesis de proteínas de la MEC en el miocardio.

Por otro lado, en células COS-7 que expresan endógenamente receptores adrenérgicos y que fueron transfectadas con el receptor B2 de bradicinina (BK) humano, ISO induce un incremento en la concentración de AMPc, mientras que BK no modifica los niveles de AMPc. Sin embargo al pretratar las células COS-7 con ISO por 5-10 minutos seguido de una estimulación con BK, así como la administración simultánea de ISO y BK resulta en una mayor concentración de AMPc que al aplicar de forma aislada ISO. Este efecto de BK sobre la acumulación de AMPc en presencia de ISO fue concentración dependiente [39].

Estos antecedentes sobre el cross-talk entre ambas vías, y considerando que no ha sido estudiado a cabalidad un efecto funcional que pudiese tener este aumento en los niveles de AMPc en FC, nos permiten plantear la siguiente hipótesis:

2.0 HIPÓTESIS

La estimulación conjunta de los receptores B2 de cininas y β 2-adrenérgicos, conduce a un aumento en la producción de AMPc, y consecuentemente a una mayor:

- disminución en la síntesis de colágeno
- adhesión, migración celular e
- inhibición de la diferenciación de FC a MFC.

3.0 OBJETIVO GENERAL

Estudiar si ISO en conjunto con BK, regulan procesos de adhesión, migración, síntesis de colágeno, y diferenciación en FC de ratas neonatas.

4.0 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demostrar que existe un efecto cooperativo en el aumento de los niveles de AMPc al administrar conjuntamente agonistas del receptor β 2-adrenérgico y de los receptores B2 de cininas.
- Estudiar si la PLC, PKC y CaMK-II median los efectos sinérgicos de BK sobre los efectos de ISO.
- Demostrar que el aumento potenciado en los niveles de AMPc repercute en la síntesis de colágeno, adhesión y migración celular en FC.
- Demostrar que fibroblastos cardiacos co-estimulados con ISO y BK, son capaces de inhibir su diferenciación a miofibroblastos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron de Sigma Aldrich Company (St. Louis, MO, EEUU): Azul de tripán, isoproterenol. En Gibco BRL (Carlsbad, California, EEUU) se adquirieron tripsina-EDTA, estándares de masas moleculares de proteínas preteñidas, suero fetal de bovino (FBS) y Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12). 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 adquirieron de Corning Incorporated (New York, EEUU), Plastibrand y Falcon (EEUU).

Los inhibidores: U73122, GÖ6983, KN93 fueron comprados a Sigma Aldrich Company,(Reino Unido).El anticuerpo primario del Col I fue adquirido de Abcam (Cambridge, Reino unido) y los anticuerpos primarios α -SMA, tubulina y GAPDH a Sigma Aldrich Company (Reino Unido).

Bradicinina (BK) a AnaSpec EGT Group (San José, CA, EEUU). Angiotensina II y cristal violeta a Sigma Aldrich (Reino Unido). El análogo de timidina Bromodeoxiuridina a Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). TGF- β 1 se adquirió en Chemicon. 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y 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 Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, en cumplimiento de todas las normas éticas referidas a la utilización de animales.

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

Se utilizó el procedimiento descrito por Foncea y cols., 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 celular. Por adhesión diferencial al plástico se separaron FC de cardiomiocitos. Luego de las 2 h, se cambió el medio por DMEM-F12 + 10% FBS, los FC se dejaron proliferar hasta confluencia y los cambios de pasaje se realizaron mediante tripsinización (hasta pasaje 2 como máximo).

5.4. Diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos

Se utilizaron FC neonatos en pasaje 2, los cuales se cultivaron por 72 h en medio DMEM-F12 suplementado con TGF- β 1 5 ng/mL. En estas condiciones cerca del 100% de los fibroblastos se diferenciaron a MFC.

5.5. Determinación de los niveles de AMPc.

Se determinó AMP cíclico (AMPc) mediante un enzimoimmuno análisis (EIA) de competencia con Cyclic AMP EIA Kit de Cayman Chemical Company.

5.6. Preparación de extractos celulares totales

Se prepararon extractos de proteínas totales para evaluar la síntesis de colágeno tipo I y α -SMA, FC se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de 2×10^4 cel/cm²., las células se lavaron tres veces con PBS frío y luego se lisaron con 100 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; benzamidina 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 en un tubo nuevo, se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay) y se desnaturó en tampón SDS-PAGE 4X (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, pH 6.8), para ser almacenado a -20°C.

5.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% (colágeno I) y 10% (α -SMA). Para la detección se cargaron 50 μ g de extracto proteico. La electroforesis se realizó a un voltaje de 70 Voltios durante los primeros 20 minutos y luego a 100 Voltios en tampón de electroforesis 1X (Tris base 30,25 g, glicina 144 g, SDS 10 g, agua 1000 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) a 400 Miliamperes durante 100 min en tampón de transferencia.

5.9. Western blot

Una vez transferidas las proteínas, la membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (TBS 1X; Tween-20 0,1%; leche sin grasa 5% p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de tres lavados con TBS 1X de 10 minutos cada uno. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes según el ensayo: Anti Col I (dilución 1:5000 en TBS 1X) o Anti α -SMA (dilución 1:20000 en TBS 1X) toda la noche a 4°C con agitación suave. Para el control de carga GAPDH y tubulina se usó una dilución de los anticuerpos específicos de 1:10000 y se dejó la membrana 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 los anticuerpos secundarios anti rabbit o anti mouse, a un título de 1:10000 e 1:5000 respectivamente en tampón de incubación. Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en solución de EZ-ECL y se expusieron a la película de fotografía AGFA. Las películas se digitalizaron y las imágenes se cuantificaron por densitometría con ayuda del programa computacional UN-SCAN-IT gel 6.1. Después de realizar los ensayos de Western blot, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 45 min en una solución de Mild Stripping (dilución de glicina, SDS y Tween 20 en agua nanopura ajustada a pH 2,2) 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. Adhesión celular

Se utilizaron FC obtenidos como se describió en el punto que se refiere a aislamiento y cultivo de FC de ratas neonatas. Las células se incubaron por 24 h con los distintos estímulos. Cumplido este tiempo se soltaron con tripsina 1X y se sembraron 20.000 células en placas de 35mm. Las células fueron incubadas durante 2 hora en la matriz plástico, luego fueron lavadas con PBS, al menos 3 veces, y fueron fijadas y posteriormente teñidas previo lavado con PBS frío para luego agregar una solución de cristal violeta 5 mg/ml preparada en metanol al 20% para dejarlo durante 20 min. Transcurrido este tiempo las células se lavan con agua tres veces. Posteriormente se disolvió con SDS 10% y se midió por espectrofotometría a 595 nm.

5.11. Migración celular

Se utilizaron FC obtenidos como se describe en el punto que se refiere a aislamiento y cultivo de FC y MFC de ratas. Las células se sembraron a una densidad de 1×10^4 células/cm² en placas de 35 mm, se mantuvieron en medio DMEM F-12 por 24 h después de las cuales se realizó la herida en el cultivo celular, las células se lavaron para adicionar los estímulos por 24 h en medio DMEM F-12 . Cumplido el tiempo las células se lavaron con PBS y luego teñidas con solución de cristal violeta 5 mg/ml preparada en metanol al 20% para dejarlo durante 20 min. Transcurrido este tiempo las células se lavan con agua tres veces y finalmente se observó mediante microscopía la migración sobre la herida (cierre de la herida). El cierre de la herida fue medida con el programa computacional Image J.

5.12. Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica fue realizada para FC. Las células fueron inicialmente fijadas con paraformaldehído 4% e incubadas con glicina 100µM. Luego fueron permeabilizadas con tritón x 0,1% por 10 minutos y bloqueadas por 20 minutos. La incubación del anticuerpo primario. Se realizó durante toda la noche a temperatura ambiente, y el anticuerpo

secundario. Se dejó incubando durante 2 horas a temperatura ambiente en total oscuridad. Finalmente se montó la muestra ubicada en un cubre objeto sobre un porta objeto con DAKO. Una vez secas se observaron y fotografiaron las muestras en un microscopio.

5.13. Análisis estadístico

Los resultados mostrados corresponden al promedio \pm SD de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA y la prueba Tuckey, considerándose $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1 Efecto de ISO y/o BK sobre los niveles de AMPc.

La cuantificación de los niveles de AMPc se realizó por inmunoensayo enzimático (EIA). De esta forma se determinó la influencia de BK en los niveles de AMPc inducidos con ISO. Teniendo en antecedente que AMPc es un segundo mensajero que refleja la activación de los receptores acoplados a proteína Gs por actividad de la subunidad G α , y que esta activación ocurre en una fase temprana, el tiempo al cual se colectaron las muestras de estudio fue a los 10 min luego de su estimulación con los agonistas, tiempo elegido en base a antecedentes bibliográficos [37,38,39]. FC fueron pre-incubados 15 min con isobutilmetilxantina (IBMX: un inhibidor de las fosfodiesterasas), posteriormente fueron estimulados con ISO 10 μ M y/o BK 100 nM durante 10 min. Como se aprecia en la Figura 5, la estimulación con BK por sí mismo no altera la producción de AMPc, mientras que ISO aumenta de manera significativa la producción de AMPc. Sin embargo, BK potencia la respuesta adrenérgica inducida por ISO, aumentando al doble la producción de AMPc en relación a la activación solo por ISO.

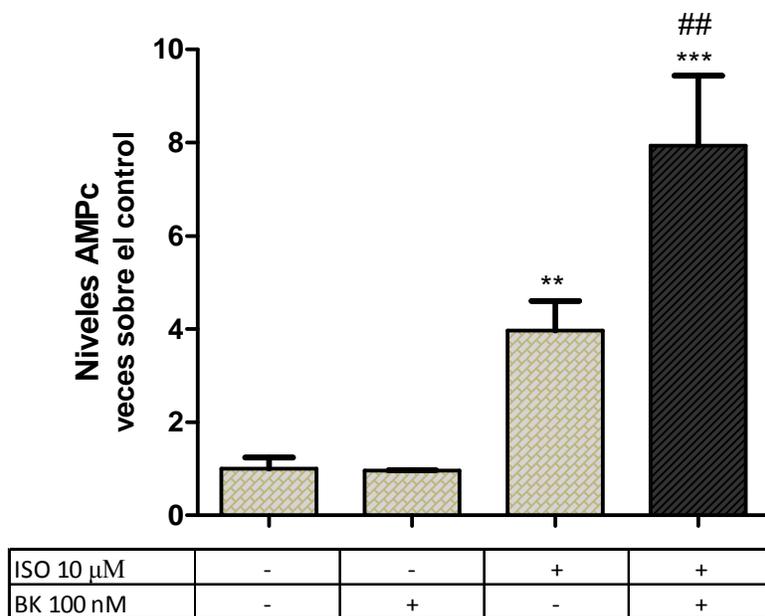


Figura 5. Efecto de Isoproterenol y/o bradicinina en los niveles de AMPc. FC privados de suero fueron incubados 15 min con isobutilmetilxantina (IBMX) 0,2 mM, posteriormente fueron estimulados con ISO (10 μ M) y/o BK (100 nM) durante 10 min. Se midieron los niveles de AMPc por inmunoensayo (EIA). En la parte superior se muestra la cuantificación de n=3 experimentos independientes expresados como la media \pm SD. **p < 0,01 vs control;***p < 0,001 vs control; ## p < 0,01 vs ISO.

6.1.2 BK a través de la vía Gq-PLC-CaMK-II, muestra un efecto sinérgico en los niveles de AMPc inducidos por ISO.

Para determinar que mediadores intracelulares activados por BK participan en el aumento potenciado en los niveles de AMPc, se recurrió a inhibidores específicos de PLC (U73122); PKC (Gö6983) y CaMK-II (KN93). FC privados de suero fueron incubados 30 min con los inhibidores antes mencionados, posteriormente fueron estimulados con ISO 10 μ M y BK 100 nM durante 10 min. Como se aprecia en la Figura 6, el inhibidor de la PLC, así como el inhibidor de CaMK-II son capaces de prevenir el aumento en la producción de AMPc inducido por ISO+BK, llegando a niveles de AMPc inducidos por ISO; en tanto que el inhibidor de PKC no previene el aumento potenciado inducido por ISO+BK, indicando que el efecto sinérgico de BK sobre la señalización de ISO es gatillado vía Gq-PLC-CaMK-II. Los inhibidores por sí mismo no mostraron efectos sobre los niveles de AMPc.

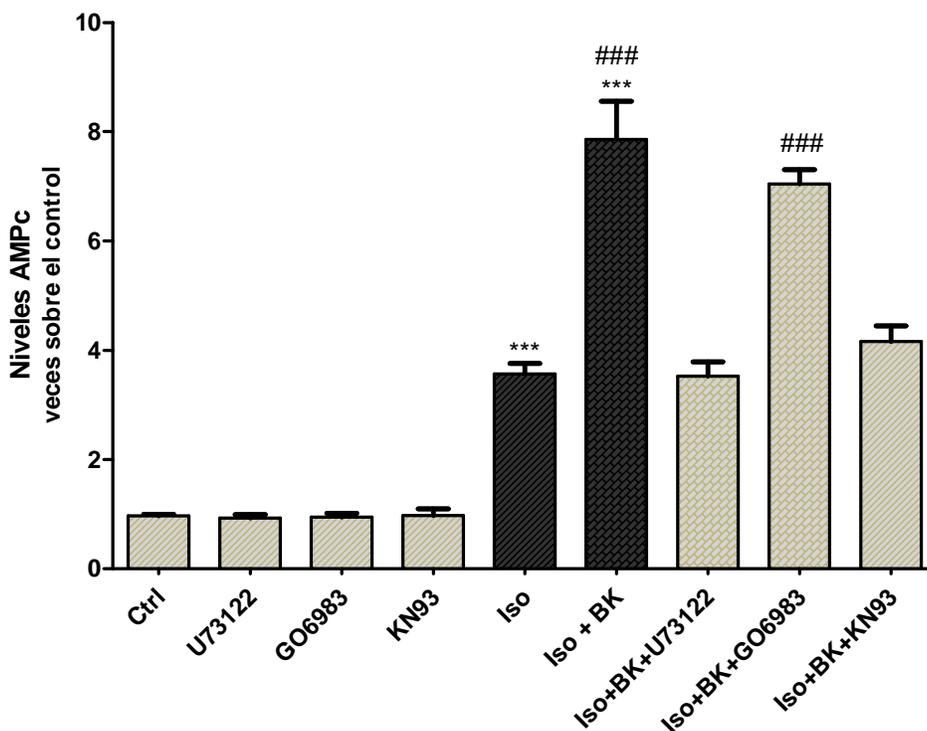


Figura 6. Efecto de los inhibidores de PLC, PKC, CaMK-II en los niveles de AMPc producidos con ISO+ BK. FC fueron incubados 30 min con los inhibidores de PLC (U73122 5 μ M), PKC(Gö6983 1 μ M) y CaMK-II(KN93 1 μ M), posteriormente fueron estimulados con ISO(10 μ M) + BK (100 nM) durante 10 min. Se midieron los niveles de AMPc por inmunoensayo (EIA). En el gráfico se muestra la cuantificación de tres experimentos independientes expresados como la media \pm SD. ***p < 0,001 vs control; ### p < 0,001 vs ISO.

Del objetivo específico 1 se concluye que FC co-estimulados con ISO+BK, experimentan un mayor aumento en los niveles de AMPc, en comparación al estímulo de ISO por si solo, luego de esto, surge la interrogante: ¿Qué función intracelular cumplen estos niveles aumentados de AMPc? Para responder esta incógnita se realizaron estudios de comportamiento celular, evaluando la adhesión, migración, síntesis de colágeno y diferenciación en FC, procesos que según bibliografía son mediados por este segundo mensajero.

6.2 Adhesión de fibroblastos cardíacos sobre plástico:

Los FC fueron privados de suero y estimulados con BK y/o ISO, en presencia/ausencia del inhibidor de CaMK-II (KN93). En la Figura 7, se observa un aumento en la adhesión de los FC sobre plástico, al ser estimulados con ISO y con ISO+BK; el cual fue estadísticamente significativo con respecto al control, siendo el estímulo en conjunto, el que presenta una mayor adhesión en comparación al control. En concordancia con resultados de nuestro laboratorio, BK por si mismo, no alteró la adhesión de los FC sobre plástico. Sin embargo, cuando las células fueron pre-tratadas con el inhibidor de CaMK-II, el efecto de ISO+BK fue prevenido.

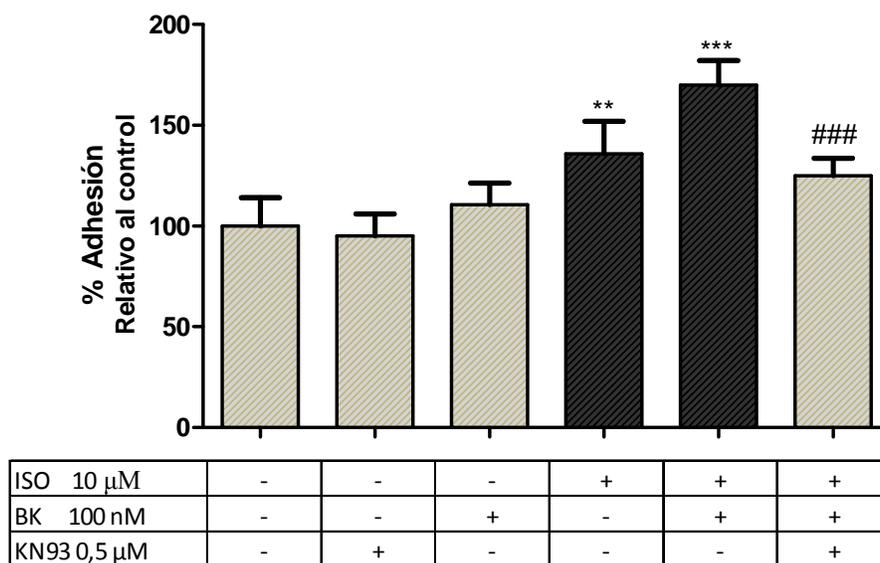


Figura 7. Adhesión de FC sobre plástico . Se evaluó la adhesión de FC sobre plástico, estimulando 24 horas antes de realizar el protocolo de adhesión. Los estímulos utilizados fueron ISO (10 μ M), BK (100 nM), además se considero el uso del inhibidor de CaMK-II (KN93 1 μ M), como control se usó DMEM-F-12. En la parte superior se muestra la cuantificación de n=3 experimentos independientes expresados como la media \pm SD. **p < 0,01 vs control;***p< 0,001 vs control; ### p< 0,001 vs ISO + BK.

6.3 Migración celular en FC

Antecedentes en la literatura señalan que los FC migran cuando se incrementan los niveles de AMPc. Tomando en consideración los resultados obtenidos del objetivo específico 1 se evaluó la capacidad migratoria de los FC con los estímulos ISO y/o BK. Para ver el efecto sobre la migración, se cuantificó el cierre de las heridas por medición del área de éstas (ver figura 9). La figura 9 ilustra los porcentajes de disminución en el tamaño de la herida. Las células fueron estimuladas por 48 h, a la vez que estas migraban, tiempo después del cual las células fueron teñidas y analizadas según como se indica en materiales y métodos. Los resultados indican que los FC tratados con ISO reducen el área de la herida en un 40% aproximadamente, a su vez el estímulo conjunto ISO+BK disminuyó el área de la herida en aproximadamente un 38-40%. Cuando estimulamos con BK no se observó cierre de la herida.

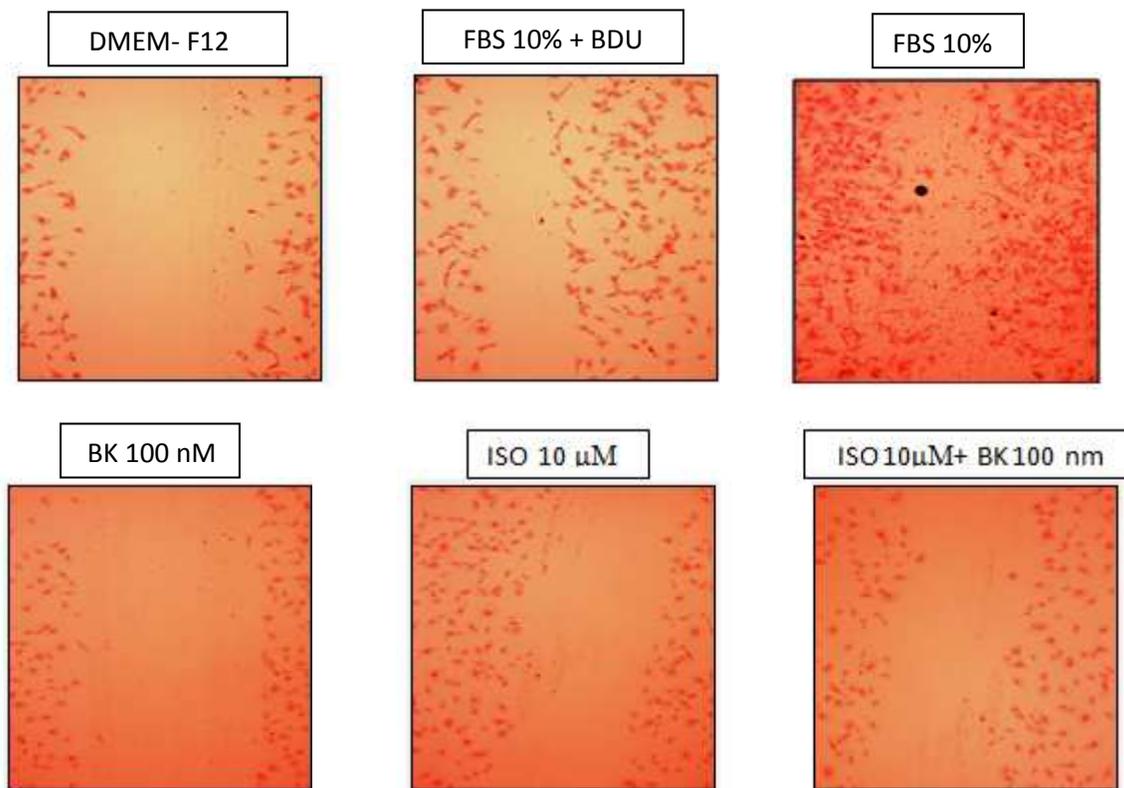


Figura 8: Fotografías de FC tomadas con microscopio (40x).

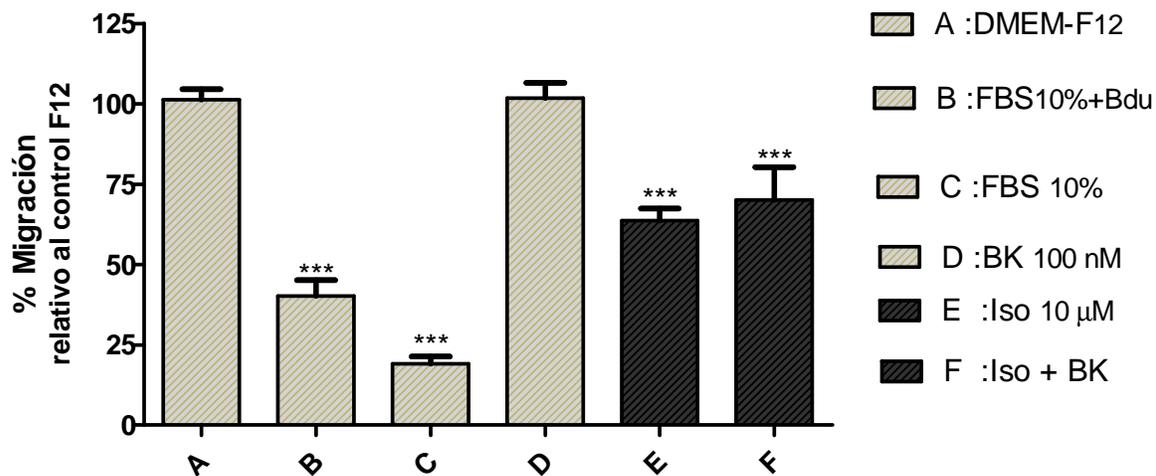


Figura 9. Efecto de Iso y/o BK en la migración celular. Gráfico que cuantifica el área al que se redujo la herida una vez que las células migraron al incubarlas con ISO (10 μM)y/o BK 100 nM. En la parte superior se muestran fotos de un experimento representativo. En el gráfico se muestra la cuantificación de n=3 experimentos independientes expresados como la media ± SD. ***p< 0,001 vs control.

6.3 Efecto de ISO y/o BK sobre la síntesis de colágeno.

La importancia de medir la síntesis de colágeno en FC radica en que este fenotipo celular está relacionado e involucrado en la homeostasis de la MEC cardíaca y en los procesos fisiopatológicos que conducen al desarrollo de fibrosis cardíaca. Existen antecedentes que indican que tanto ISO, como BK disminuyen la síntesis de colágeno; sin embargo, no hay reportes del efecto que pudiesen tener ambos estímulos en conjunto.

Los resultados de la figura 10 muestran que a 24 y a 48 hrs, tanto ISO como BK por separado, son capaces de disminuir la síntesis de colágeno. Cuando se estimuló con ISO hubo disminución en la síntesis de colágeno de aproximadamente un 25% en relación al control, mientras que con BK esta disminución fue del orden de un 20-25% en relación al control. Al administrar en conjunto ambos estímulos la disminución es mucho mayor que por separado, disminuyendo un aproximadamente un 60% en relación al control, esto, confirma la hipótesis planteada en un comienzo.

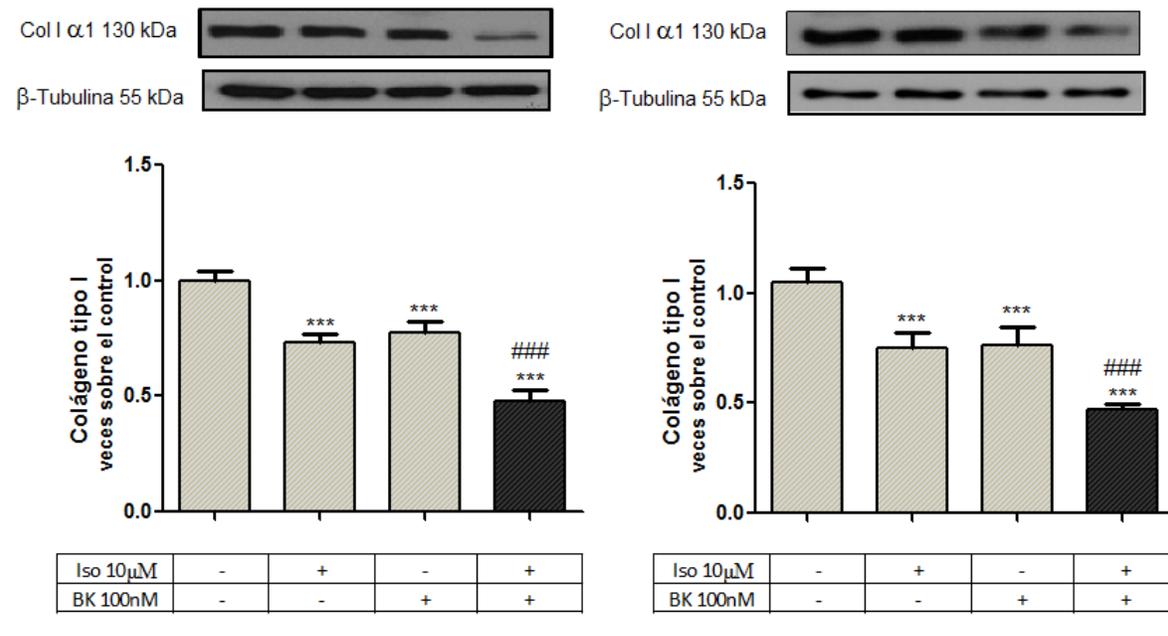


Figura 10. Efecto de Isoproterenol y/o bradicinina en la síntesis de colágeno I $\alpha 1$. FC fueron incubados durante 24 hrs (izquierda) y 48 hrs (derecha) con ISO 10 μ M y/o BK (100 nM). Se evaluó la síntesis de colágeno I por western blot. En la parte superior se muestran fotos de un experimento representativo. En el gráfico se muestra la cuantificación de al menos tres experimentos independientes expresados como la media \pm SD. ***p < 0,001 vs control; ### p < 0,001 vs ISO.

6.3.1 Participación de la vía activada por BK (PLC-PKC-CaMK-II) en la disminución de la síntesis de colágeno.

PLC:

Los FC fueron pre-estimulados por 30 min con el inhibidor de PLC, U73122; y posteriormente fueron estimulados con ISO, BK ó ISO/BK durante 24 horas. Los resultados muestran que U73122 previno de manera parcial aunque significativamente el efecto de BK y el efecto aditivo de BK+ISO sobre la síntesis de colágeno. Mientras que el inhibidor no modificó los efectos de ISO. Lo anterior indica que el efecto aditivo de BK sobre la señalización de ISO es gatillada vía Gq-PLC. El inhibidor, por sí mismo, no mostró efecto en la síntesis de colágeno (Figura 11).

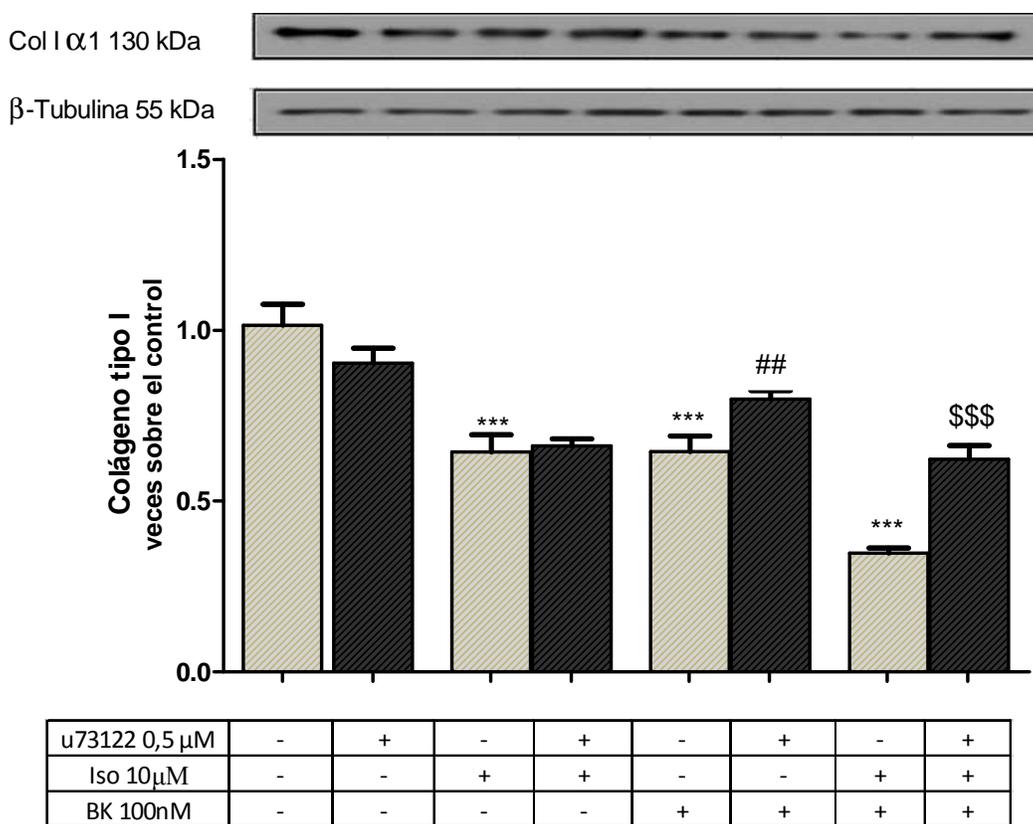


Figura 11. Participación de PLC en la síntesis de colágeno α 1. FC privados de suero fueron incubados 30 min con el inhibidor de PLC U73122 0,5 μ m, luego fueron estimulados con ISO (10 μ M) y/o BK (100 Nm) durante 24 hrs en DMEM-F12. Se evaluó la síntesis de colágeno α 1 por western blot. En la parte superior se muestran fotos de un experimento representativo. En el gráfico se muestra la cuantificación de n=3 experimentos independientes expresados como la media \pm SD. ***p < 0,001 vs control; ## p < 0,01 vs BK; \$\$\$ p < 0,001 vs ISO+ BK.

PKC:

Antecedentes bibliográficos señalan que Ang II, conocida por activar la vía Gq, activa a PKC, conduciendo a la síntesis de colágeno [40], por lo tanto, este estímulo se utilizó como control positivo de síntesis de colágeno. En la Figura 12 se observa que, en los FC pre-tratados con el inhibidor de PKC, Gö6983 durante 30 min, hay disminución en los niveles basales de colágeno, a su vez el aumento en los niveles de colágeno por efecto de Ang II fue prevenido por la administración del inhibidor de PKC. Estos resultados indican que PKC participa tanto en la síntesis basal de colágeno en los FC como en aquella inducida por Ang II.

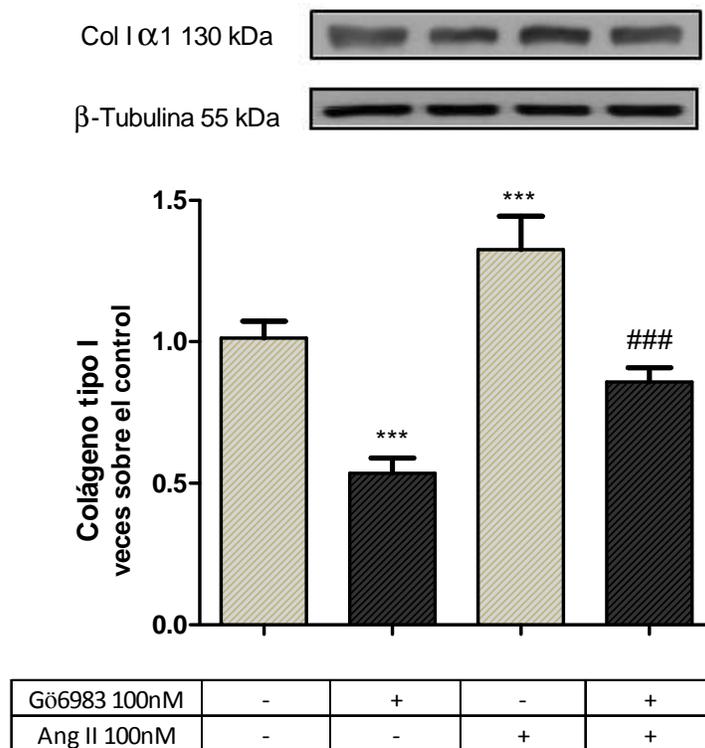


Figura 12. Participación de PKC en la síntesis de colágeno α 1 inducida por Ang II. FC privados de suero fueron incubados 30 min con el inhibidor de PKC Gö6983 100nM, luego fueron estimulados con Ang II 100 nM durante 24 hrs en DMEM-F12. Se evaluó la síntesis de colágeno α 1 por western blot. En la parte superior se muestran fotos de un experimento representativo. En el gráfico se muestra la cuantificación de n=3 experimentos independientes expresados como la media \pm SD. ***p < 0,001 vs control; ### p < 0,001 vs Ang II.

Teniendo en cuenta esta premisa, se estudió el efecto del inhibidor de PKC sobre la síntesis de colágeno inducida por ISO y/o BK. Los resultados indican que GÖ6983 disminuye la síntesis basal de colágeno. Por otro lado, GÖ6983 no previene la disminución de colágeno inducida por ISO; aunque previene el efecto inducido por BK. Sin embargo, el efecto aditivo de ISO+BK es potenciado aún más en presencia del inhibidor de PKC, confirmando que PKC participa en la síntesis de colágeno, estos resultados permiten señalar que PKC no participa en el efecto potenciado de BK en la disminución de colágeno de ISO (figura 13).

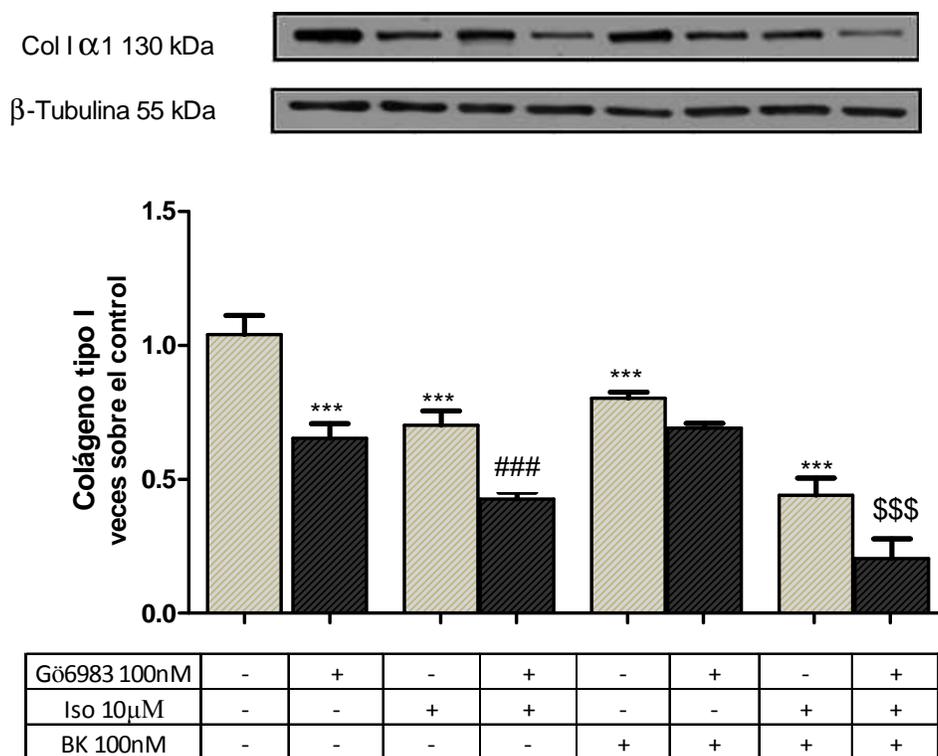


Figura 13. Participación de PKC en la síntesis de colágeno α 1. FC privados de suero fueron incubados 30 min con el inhibidor de PKC GÖ6983 100nM, luego fueron estimulados con ISO (10 μ M) y/o BK (100 nM) durante 24 hrs en DMEM-F12. Se evaluó la síntesis de colágeno α 1 por western blot. En la parte superior se muestran fotos de un experimento representativo. En el gráfico se muestra la cuantificación de n=5 experimentos independientes expresados como la media \pm SD. ***p < 0,001 vs control; ### p < 0,001 vs ISO; \$\$\$ p < 0,001 vs ISO+ BK.

CaMK-II:

Finalmente se estudio la influencia de CaMK-II, un efector río abajo en la señalización de BK. Con ello, se busca detallar la vía mediante la cual BK estaría favoreciendo la disminución en la síntesis de colágeno inducida por ISO. Para ello se empleo un inhibidor específico de CaMK-II (KN93). Los resultados muestran que el inhibidor no previene el efecto de ISO, mientras que previene significativamente el efecto de BK así como el efecto aditivo de ISO+BK sobre la síntesis de colágeno. Lo anterior nos lleva a concluir que el efecto potenciado de BK en la disminución de colágeno inducida por ISO es gatillada vía Gq-PLC-CaMK-II. Lo anterior refuerza la hipótesis planteada sobre la relación inversa entre niveles de AMPc y síntesis de colágeno, en base a los resultados de la medición de los niveles de AMPc (figura 14).

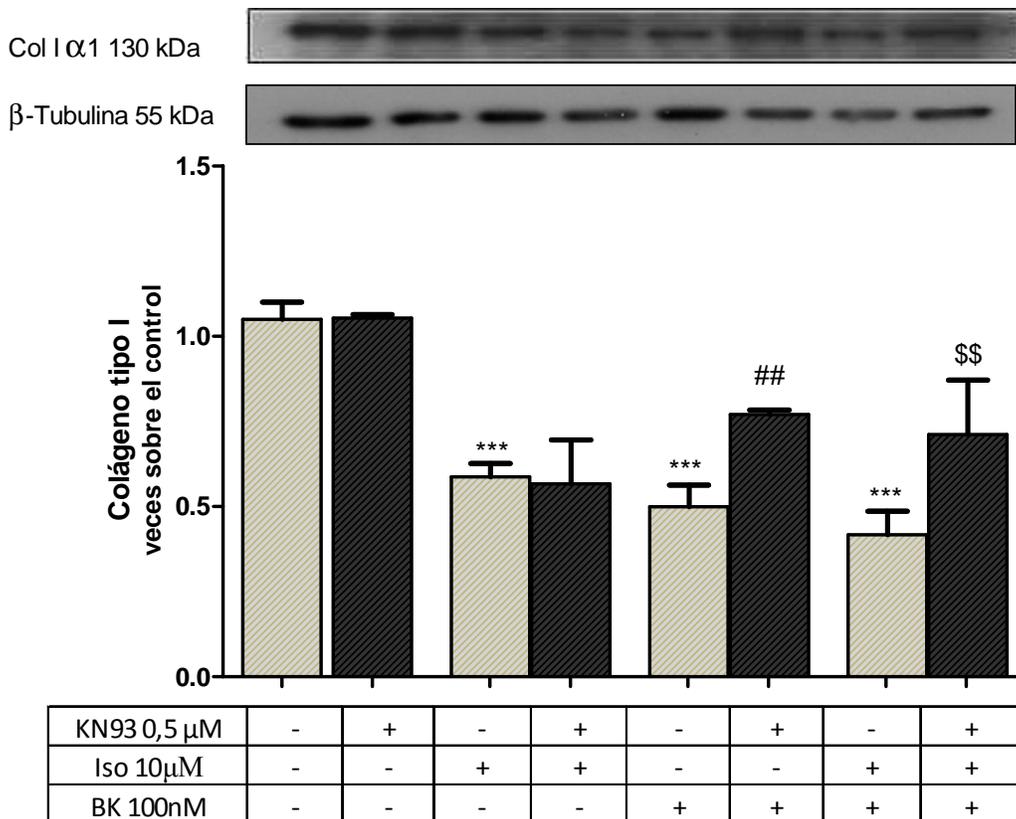


Figura 14. Participación de CaMK-II en la síntesis de colágeno Ia1. FC privados de suero fueron incubados 30 min con el inhibidor de CaMK-II (0,5 μ M) luego fueron estimulados con ISO (10 μ M) y/o BK (100 nM) durante 24 hrs en DMEM-F12. Se evaluó la síntesis de colágeno Ia1 por western blot. En la parte superior se muestran fotos de un experimento representativo. En el gráfico se muestra la cuantificación de n=3 experimentos independientes expresados como la media \pm SD. ***p < 0,001 vs control; ## p < 0,01 vs BK; \$\$ p < 0,01 vs ISO+ BK.

6.4 Efecto de TGF-β1 en los niveles de expresión de alfa-actina del músculo liso

En este trabajo se utilizó TGF-β1 a una concentración de 5 ng/mL para diferenciar FC a MFC. La diferenciación se analizó por la presencia de la proteína alfa-actina del músculo liso (α-SMA) por Western Blot. Nuestros resultados mostraron que TGF-β1 aumentó, de una manera dependiente del tiempo, la expresión de α-SMA, alcanzando el máximo a las 72 h de estudio ($3,1 \pm 0,5$ veces respecto el control) (figura 15). Además, se observa que en FC no tratados con TGF-β1, hay un leve aumento en la proteína α-SMA, dependiente del tiempo, esto debido a una síntesis y secreción basal de TGF-β1 por los FC, concordante con lo encontrado en la literatura [41]

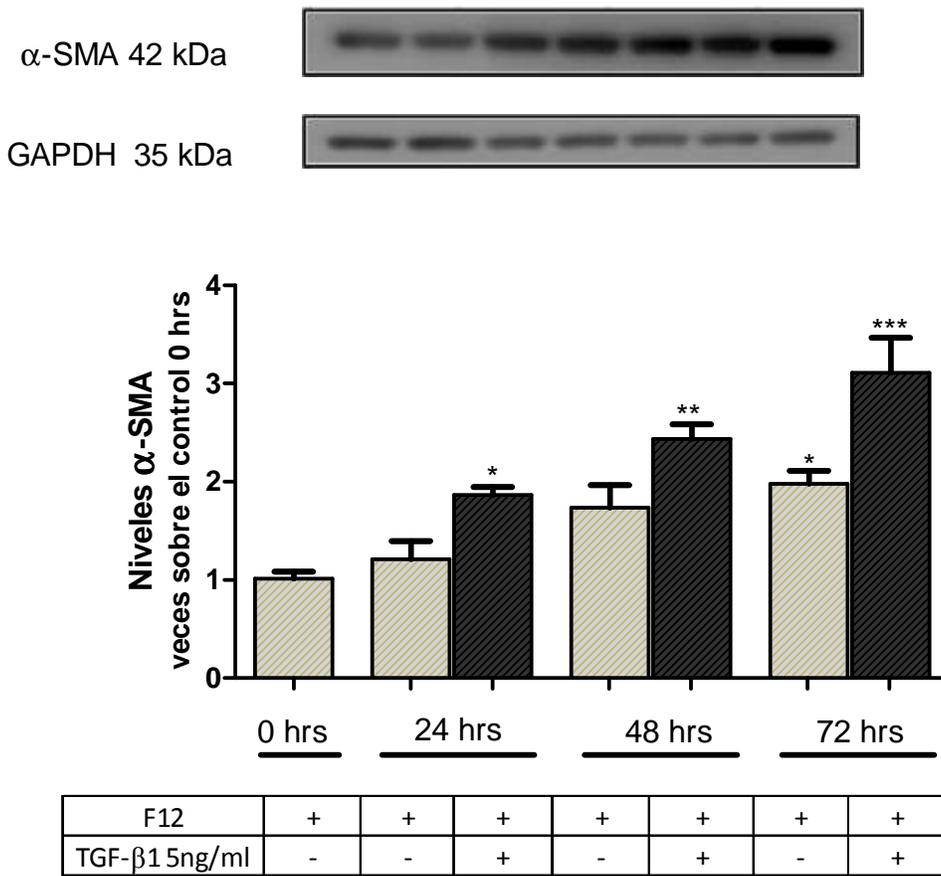


Figura 15. Efecto de TGF-β1 sobre la expresión de la proteína α-SMA. FC fueron privados de suero y estimulados con TGF-β1 5 ng/ml por 24, 48, y 72 hrs, en DMEM-F12. Se evaluó la expresión de α-SMA por western blot. En la parte superior se muestran fotos de un experimento representativo. En el gráfico se muestra la cuantificación de n=5 experimentos independientes expresados como la media ± SD. *p < 0,05 vs control 24 hrs; **p < 0,01 vs control 48 hrs; ***p < 0,001 vs control 72 hrs.

6.4.1 Efecto de ISO y/o Bk en la diferenciación de FC estimulados con TGF-β 1

Para determinar si la diferenciación celular de FC a MFC, mediada por la citoquina TGF-β1, es prevenida al administrar los estímulos ISO y/o Bk, los FC fueron privados de suero por 24 hrs, y posteriormente se estimularon con ISO y/o BK en presencia/ausencia de TGF-β1, durante 72 hrs. Los resultados mostraron que en los FC no tratados con TGF-β1, ISO+BK disminuyen los niveles de α-SMA, de manera estadísticamente significativa. Por otro lado, en los FC tratados con TGF-β1, se ve una disminución en los niveles de α-SMA tanto en los FC tratados solo con ISO, así como en los tratados con ISO+ BK, siendo este último el que disminuyó más los niveles, llegando al nivel del control sin TGF-β1 (figura 16).

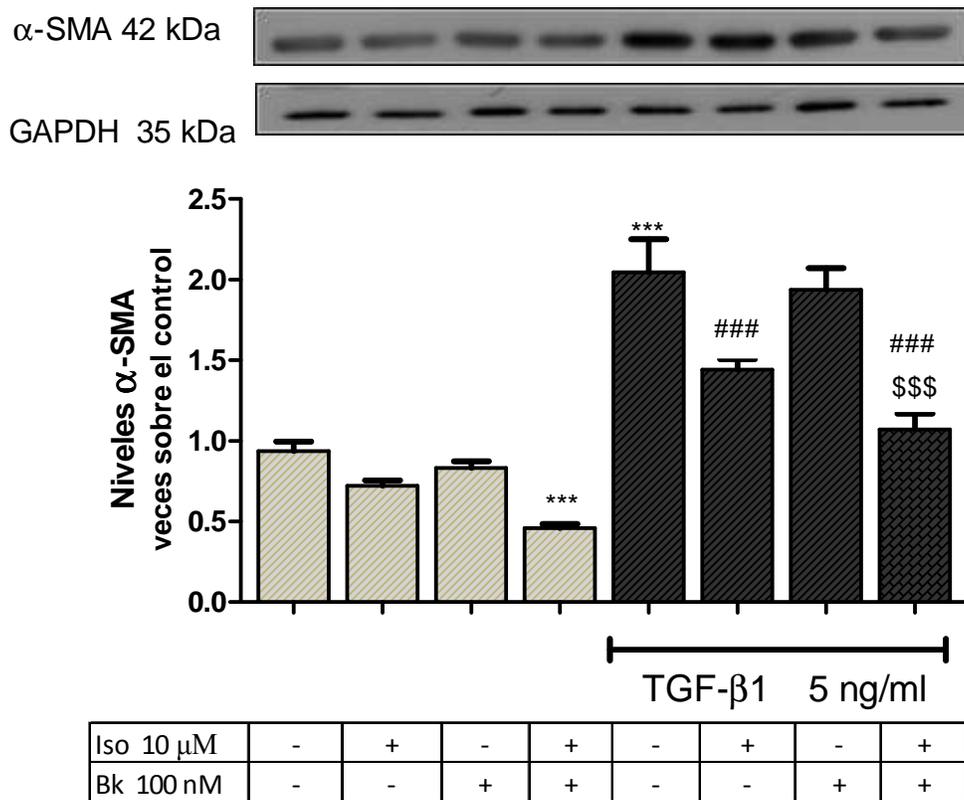


Figura 16. Efecto de Isoproterenol y/o bradicinina en la expresión de α-SMA en FC estimulados con TGF-β1. FC privados de suero e incubados durante 72 h con ISO 10 μM y/o BK100 nM, se dejó un grupo control y un grupo que también fue estimulado con TGF-β1 5 ng/ml, en medio DMEM-F12. Se evaluó la expresión de α-SMA a 72 hrs por western blot. En la parte superior se muestran fotos de un experimento representativo. En el gráfico se muestra la cuantificación de n=6 experimentos independientes expresados como la media ± SD. ***p< 0,001 vs control DMEM-F12; ### p< 0,001 vs control TGF-β1; \$\$\$ p<0,001 vs ISO+ TGF-β1.

6.4.2 Inmunocitoquímica de α -SMA

Para corroborar los resultados obtenidos por inmunowestern blot referente a la capacidad de ISO+BK de inhibir la diferenciación FC-MFC, realizamos una inmunocitoquímica para α -SMA. FC fueron estimulados con TGF- β 1 (5ng/mL) en presencia/ausencia ISO+BK, durante 72 hrs. Los resultados mostraron que en los FC tratados con TGF- β 1, se ve un aumento del tamaño celular y una reorganización y ensamblaje de las fibras de stress de α -SMA, lo cual es un marcador de la diferenciación. Por otro lado, al estimular con TGF- β 1 en presencia de ISO+BK, las células no experimentan la diferenciación, lo cual se demuestra al mantener el tamaño celular del control, y no apreciar las fibras de stress características de un MFC (figura 17).

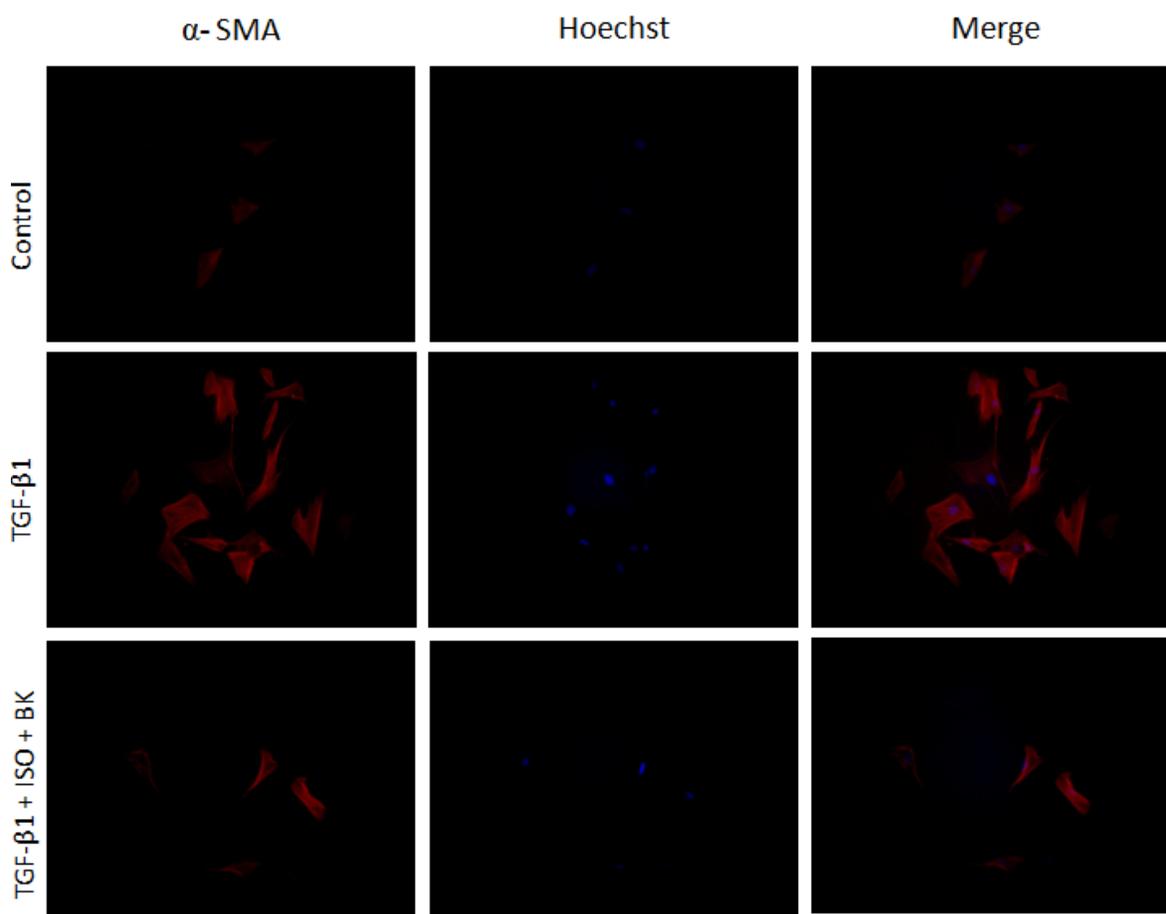


Figura 17. Inmunocitoquímica de α -SMA en fibroblastos y FC. Las fibras de α -SMA aparecen de color rojo y el núcleo de color azul. Las imágenes corresponden a una amplificación a 40x. Los FC fueron transformados a miofibroblastos a través de un estímulo de TGF- β 1 5ng/mL e incubados por 72 horas. El anticuerpo secundario utilizado para α -SMA corresponde a Alexa Fluo 568 Donkey Anti-mouse y la tinción de núcleo corresponde a Hoesch.

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se investigaron los efectos funcionales del cross-talk Gs-Gq en FC de ratas neonatas. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo nos indican que: a) La co-estimulación con ISO+BK aumentó de manera sinérgica los niveles de AMPc, siendo mayor a los observados sólo con ISO, no observándose efecto con BK, b) Los estímulos ISO e ISO+BK inducen tanto adhesión como migración celular en FC, c) Tanto ISO como BK demostraron disminuir la síntesis de colágeno, y al administrar ambos estímulos en conjunto la disminución es mucho mayor que cada uno por separado, d) Tanto ISO como ISO+BK demostraron inhibir la diferenciación celular FC-MFC estimulada por TGF- β 1, siendo la inhibición significativa con el estímulo en conjunto y, e) El efecto sinérgico de BK sobre la señalización de ISO es gatillado vía Gq-PLC-CaMK-II.

7.1 BK tiene un efecto sinérgico sobre los niveles de AMPc inducidos por ISO.

Nuestros resultados mostraron que en FC la estimulación con BK, por sí solo, no alteró la producción de AMPc; sin embargo, en combinación con ISO potenció la respuesta adrenérgica aumentando al doble la producción de AMPc, en relación a la activación solo por ISO. Estos resultados son coincidentes con datos bibliográficos, donde se señala que en FC la co-estimulación de receptores asociados a las proteínas efectoras Gs-Gq lleva a un mayor aumento en los niveles de AMPc. Dicho efecto sinérgico estaría mediado por activación de la vía Gq, pues al menos otros dos receptores acoplados a la vía Gq (P2Y y AngII) son capaces de inducir una potenciación similar en los niveles de AMPc inducidos por ISO [37].

Respecto de los mediadores intracelulares activados por BK que participan en el aumento potenciado en los niveles de AMPc, determinamos que al inhibir la PLC, así como al inhibir a CaMK-II el aumento en la producción de AMPc inducido por ISO+BK es prevenido, en tanto que al inhibir la PKC el aumento potenciado en los niveles de AMPc no se ve alterado, indicando que PKC no participaría en el efecto sinérgico. Resultados similares se han observado en FC de rata adulta, donde la inhibición de PLC elimina el efecto sinérgico de Ang II o UTP sobre la respuesta inducida por ISO; además la sobreexpresión de Gq mostró aumentar dicha potenciación [38]. En relación a la participación de PKC, nuestros resultados fueron similares a los obtenidos con los

inhibidores de PKC calfofostina C y estaurosporina, demostrando que PKC no participa en un mayor aumento en los niveles de AMPc [38].

Ostrom et al, también demostraron que la quelación del Ca^{+2} intracelular, un segundo mensajero clave de la vía Gq, resultó en la atenuación de dicha potenciación; y agentes farmacológicos que aumentan directamente la $[Ca^{+2}]$ intracelular (ionomicina, tapsigargina), también potencian la acumulación de AMPc inducidas por ISO. Por otro lado, utilizando inhibidores del complejo calcio-calmodulina el efecto sinérgico sobre AMPc se ve disminuido de forma significativa [38]. En relación a este punto nuestro estudio consideró el uso de un inhibidor de CaMK-II, esta proteína es una Serina/treonina proteína quinasa regulada por el complejo calcio-calmodulina [42]. Esta quinasa es también necesaria para la homeostasis de $[Ca^{+2}]$ intracelular y para la recaptación de este en los cardiomiocitos [43]. En nuestro modelo la inhibición de la CaMK-II previno el aumento en la producción de AMPc inducido por ISO+BK, indicando que esta proteína juega un papel preponderante en los efectos sinérgicos. En conclusión, nuestros resultados indicaron que el efecto sinérgico de BK sobre la señalización de ISO es gatillado vía Gq-PLC-CaMK-II.

7.2 Adhesión de fibroblasto cardiacos de ratas neonatas

Esta reportado en la literatura que EPAC-1 regula los niveles de expresión de las integrinas, proteínas que median la adhesión célula-matriz, y que este efecto sería tiempo dependiente, tal como se ha observado en células OVCAR3 [44]. La presencia de EPAC en FC se podría relacionar con lo descrito en la literatura. Resultados anteriores de nuestro laboratorio han mostrado que AMPc induce un aumento en la adhesión de los FC y MFC; y que dicho efecto es mediado por la activación de la EPAC [45]. También se evaluó en el laboratorio la participación de PKA en los procesos de adhesión, encontrándose que dicha proteína no media estos procesos [24].

Teniendo estos antecedentes evaluamos si el cross-talk Gs-Gq repercute en el proceso de adhesión, pues como esta descrito es un proceso regulado por AMPc. En general nuestros resultados con estímulos que aumentan los niveles de AMPc mostraron un aumento en la adhesión celular, tanto con ISO, como con ISO+BK, siendo el estímulo en conjunto el que presenta una mayor adhesión en comparación al control. Presumimos que este mayor nivel de adhesión se debería al aumento potenciado en los niveles de AMPc. Por otro lado, cuando las células fueron incubadas con el inhibidor de CaMK-II (KN-93), el efecto de ISO+BK fue prevenido. Este resultado es consistente con el efecto de dicho

inhibidor en los niveles de AMPc alcanzados con el estímulo ISO+BK, reforzando la idea de que el mayor grado de adhesión sería resultado de un mayor aumento en los niveles de AMPc. Por otro lado, no encontramos variación en la adhesión en presencia de BK.

7.3 Migración de fibroblasto cardiacos de ratas neonatas

Otro proceso celular importante en un FC es la capacidad de migrar y desplazarse hacia los sitios de daño para contribuir a la reparación del tejido. Una vez que se genera un daño, los fibroblastos migran hacia el sitio de la herida para comenzar con el proceso de cicatrización y cierre de la herida mediante expresión y secreción de proteínas de matriz.

Antecedentes en la literatura señalan que los FC migran cuando se incrementan los niveles de AMPc [46]. Así también, este proceso migratorio es regulado por sustancias presentes en el sitio del daño al miocardio, como lo son las citoquinas [47].

Nuestros resultados de migración en los FC, por método de la herida, muestran que ISO e ISO+BK aumentan significativamente la migración celular. Sin embargo, aún cuando el estímulo en conjunto aumenta en mayor medida los niveles de AMPc, no encontramos diferencia en relación a la migración mediada solo por ISO. Resultados obtenidos con derivados de AMPc, que selectivamente activan EPAC o PKA, indican que a bajas concentraciones de este segundo mensajero se activaría preferentemente la vía EPAC y que esta promovería la migración celular [48]. Creemos que en ambos casos los niveles de AMPc alcanzados, serían capaces de activar a EPAC y así mediar el proceso migratorio. Por otro lado, también no podemos descartar que el efecto migratorio debido a la activación adrenérgica esté en su máximo nivel, y que el aumentar más los niveles de AMPc no se traduzca en mayor migración. Por otro lado, BK no participó en procesos de migración, indicando que las cininas tendrían otras funciones en el FC como es la disminución en la síntesis de colágeno [18]. En este ensayo ocupamos como control positivo medio con suero, y está demostrado que los factores de crecimiento y diversos estímulos presentes en el suero promueven la migración celular pero además tienen un efecto proliferativo [49], por tanto, el cierre de la herida podría confundirse con la mayor cantidad de células. Para ello se utilizó un segundo control, el cual corresponde a suero+ BDU (bromodeoxiuridina). Este último reactivo inhibe la proliferación celular, y nos sirve para determinar que el suero si permite la migración celular, descartando que el cierre de la herida se deba al efecto proliferativo del suero.

Posterior a un daño tisular, los niveles plásmáticos de las catecolaminas, están aumentados en muchos órganos, incluyendo el corazón, lo que se traduce en niveles mayores de AMPc. Dichos niveles estarían favoreciendo la migración de los FC, hacia la zona dañada. En este sentido, el aumento en la migración celular es beneficioso, en una etapa temprana del daño cardíaco, ya que llevaría a los FC a la zona dañada para que estos, secreten proteínas de matriz a fin de reparar la zona afectada. Por otro lado existen reportes que señalan que TGF- β 1, una citoquina que se libera en situaciones de daño cardíaco, sería capaz de inhibir la expresión de la proteína EPAC, de esta forma inhibiría la migración y facilitaría la síntesis de MEC en el sitio dañado [48].

En resumen, en FC los niveles de AMPc regulan los procesos de adhesión y migración celular, y este efecto es mediado de forma diferencial por la proteína EPAC y no así por PKA. Por lo anterior, estos efectos pueden considerarse como un nuevo punto de intervención para detener y/o revertir el proceso de RC y la posterior fibrosis cardíaca.

7.4 Efecto de ISO y/o BK sobre la síntesis de colágeno en FC.

Existen numerosos antecedentes que demuestran que el aumento en la producción de AMPc a nivel cardíaco podría estar contribuyendo en la reducción del proceso fibrótico [51,52]. Nuestros resultados tanto con ISO como BK, muestran que ambos estímulos disminuyen la síntesis de colágeno, y al administrar ambos estímulos en conjunto la disminución es mucho mayor que por separado. Pensamos que dicho efecto se debe a un mayor nivel de AMPc, puesto que los antecedentes bibliográficos avalan el efecto antifibrótico de este segundo mensajero. Además cuando utilizamos los inhibidores de la vía activada por BK, encontramos un resultado concordante entre los niveles de AMPc alcanzados en presencia de dichos inhibidores y los niveles de colágeno, es decir, al inhibir tanto PLC como CaMK-II el efecto sinérgico tanto en los niveles de AMPc como en la disminución en la síntesis de colágeno, fue prevenido, no así con el inhibidor de PKC, quien no inhibe la potenciación ISO+BK en ninguno de los dos aspectos, por tanto no participando del *cross-talk*, es más demostramos que PKC participa en la síntesis basal de colágeno.

Ostrom et al, demostraron que en FC de rata adulta existe un "cross-talk" entre los receptores activados por Gas (catecolaminas) y G α q (angiotensina II), ellos describen que existe una potenciación funcionalmente relevante en los FC donde la inhibición en la síntesis de colágeno estimulada por ISO se incrementa 31 a 48% en presencia de AngII,

destacando una vía de señalización por el que la síntesis de AMPc endógeno limita la producción de colágeno, y tal vez la fibrosis cardiaca.

A su vez estudios en FC de rata adulta revelan que al incrementar la formación de AMPc, por sobreexpresión de AC6 ó por la activación con forskolina también se disminuye la síntesis de colágeno, y previene el incremento en la expresión de α -SMA, y por tanto, en la diferenciación de FC a MFC [53].

Experimentos llevados en nuestro laboratorio con agonistas específicos de EPAC y de PKA, demuestran que ambas proteínas participan en la disminución de la síntesis de colágeno [24].

7.5 Diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos por efecto de TGF- β 1.

Estudiar el proceso de diferenciación celular es muy importante teniendo en consideración que los MFC son el principal tipo celular que participa en el proceso fibrótico, debido a su mayor capacidad de secretar proteínas de MEC, principalmente colágeno. Estudios, in vivo e in vitro, han mostrado que TGF- β 1 induce la diferenciación FC-MFC [54,55]. El cambio en el fenotipo celular se ha caracterizado por la expresión de α -SMA y en su ensamblaje en las fibras de estrés, y por un aumento del tamaño celular. Sin embargo, este proceso depende tanto del tiempo como de la concentración del TGF- β 1 [11].

Este aumento esta descrito en la literatura, sin embargo, el tiempo necesario para alcanzar la máxima expresión de esta proteína depende de la concentración de TGF- β 1, en nuestro modelo la concentración usada fue de 5 ng/mL. Por otro lado, la sola expresión de esta proteína no es suficiente para afirmar que ocurrió la diferenciación, por esto se realizó una inmunocitoquímica de α -SMA, constatándose su presencia en las fibras de stress y un aumento del tamaño celular (ver figura 17).

El hallazgo más importante es que la diferenciación mediada por la citoquina TGF- β 1, es prevenida al administrar los estímulos ISO+BK. Los resultados mostraron que a las 72 hrs en los FC tratados con ISO + TGF- β 1, así como en los tratados con ISO+ BK+ TGF- β 1 mostraron una disminución en los niveles de α -SMA, siendo el estímulo en conjunto, el que disminuyó más los niveles de la proteína, llegando al nivel del control, lo que consideramos como la inhibición de la diferenciación celular.

En el FC, la activación de las Smads, proteínas activadas por la unión de TGF- β 1 a su receptor, tiene como consecuencia la diferenciación de los mismos a MFC. Se sabe que el receptor de TGF- β 1 de tipo I una vez que ha sido activado comienza la propagación de

la señal ríó abajo del receptor mediante la participación de las Smads (ver figura 18). El receptor activado induce la formación de un complejo activo Smad3 / 4, el cual se transloca al núcleo donde interactúa con elementos de unión a Smad dentro de las regiones promotoras del ADN para activar la transcripción [56]. Las Smads requieren otras proteínas para su actividad transcripcional, incluyendo los coactivadores CBP1 (CREB binding proteins) y p300 [57]. Por lo tanto, la activación de Smads, su translocación al núcleo, y los efectos posteriores sobre la transcripción de genes son los pasos críticos en la modulación de la señalización por esta vía.

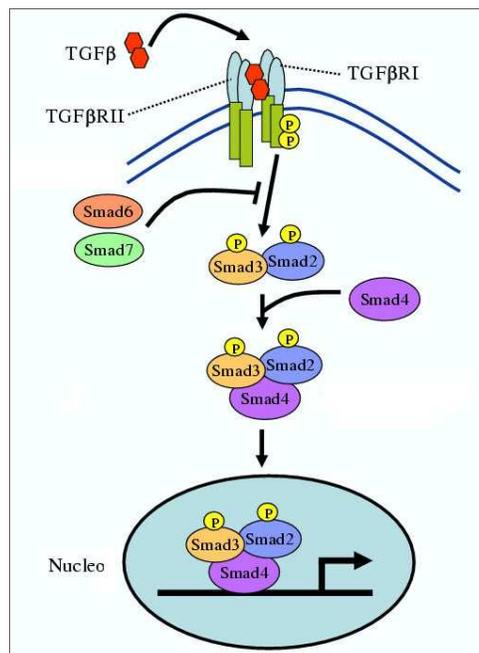


Figura18. Vía de señalización canónica de TGF-β1.

Aumentos en los niveles de AMPc, han demostrado prevenir la transactivación de genes específicos requeridos por las Smads; aunque la activación de las Smads y su translocación al núcleo mediada por TGF-β1 no se vieron afectadas. Sin embargo, el aumento de los niveles de AMPc demostró evitar la interacción de Smad3 con su coactivador transcripcional (CBP) / p300 [58]. En este estudio la sobreexpresión de los coactivadores transcripcionales CBP/p300, mostró recuperar la transcripción asociada a las Smads, aún en presencia de AMPc, lo que sugiere que el secuestro de cantidades limitadas de CBP/p300 por el AMPc es la base molecular de este efecto inhibitorio. Nuestros resultados en los niveles de AMPc alcanzados con ISO+BK serían la base de este efecto inhibitorio sobre la señalización de TGF-β1, lo cual se traduce en la inhibición

de la diferenciación celular FC-MFC. Finalmente, en la Figura 19 muestra de manera esquemática la conversación cruzada entre las vías activadas por el receptor β 2-adrenérgico y el B2 de cininas, en relación a las diferentes funciones celulares estudiadas.

7.6 Modelo propuesto del efecto antifibrótico de AMPc, por efecto de la co-estimulación Gs-Gq en FC.

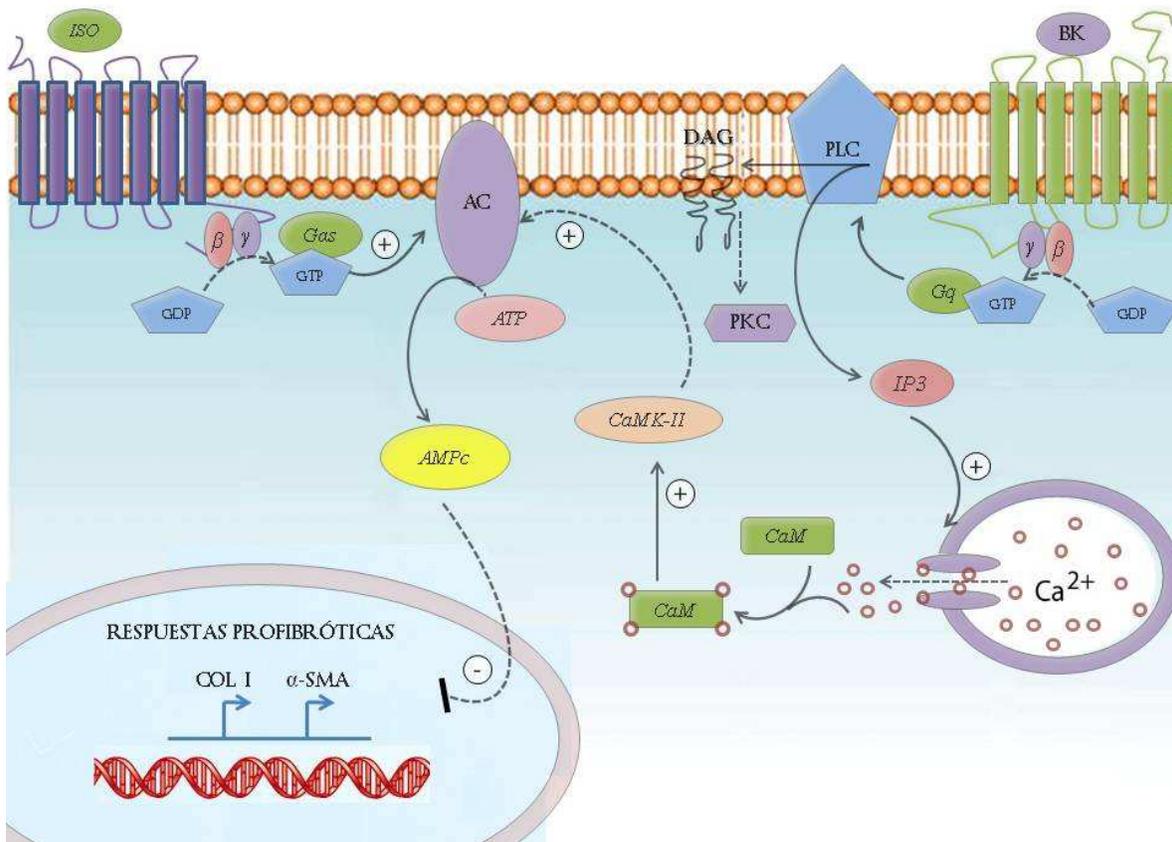


Figura 19. Modelo propuesto del efecto antifibrótico de AMPc, por efecto de la co-estimulación Gs-Gq en FC. Como se aprecia en la figura, la co-estimulación Gs-Gq genera una sinergia en los niveles de AMPc alcanzados. Dichos niveles demostraron tener mayores propiedades antifibróticas que al incubar las células solo con ISO. AMPc a través de PKA y EPAC (no mostrado en el dibujo), disminuye la síntesis de colágeno, y la diferenciación FC-MFC.

8. LIMITACIONES

En este estudio se encontraron las siguientes limitaciones:

- Modelo *in vitro*
- Utilización de cultivos primarios de ratas neonatas

9. CONCLUSIONES

Al realizar este trabajo se obtuvieron varios resultados sobre los efectos funcionales de la co-estimulación Gs-Gq en FC de ratas neonatas, respecto de migración, adhesión, síntesis de colágeno y diferenciación celular en FC.

- Primero se determinó que los niveles de AMPc obtenidos al co-estimular con ISO+BK son más altos, que al estimular solo con ISO.
- Utilizando inhibidores específicos de la vía intracelular activada por BK se demostró que el efecto sinérgico de BK sobre la señalización de ISO es gatillado vía Gq-PLC-CaMK-II.
- Respecto a la adhesión y migración se observó en FC un aumento significativo en dichos procesos con la estimulación tanto de ISO como de ISO+BK. Estos procesos son modulados de forma diferencial por la proteína EPAC, la cual es activada por aumento en los niveles de AMPc.
- Tanto ISO como BK demostraron disminuir la síntesis de colágeno. Al administrar ambos estímulos en conjunto la disminución es mucho mayor que por separado, este mayor aumento lo atribuimos al aumento potenciado en los niveles de AMPc.
- Tanto ISO como ISO+BK demostraron inhibir la diferenciación celular FC-MFC estimulada por TGF- β 1, siendo la inhibición significativa con el estímulo en conjunto, atribuimos este efecto a los niveles alcanzados de AMPc, los cuales serían capaces de inhibir la acción de TGF- β 1.

10. BIBLIOGRAFIA

1. 55ª Asamblea Mundial de la Salud. Organización Mundial de la Salud. Marzo de 2010.
2. Luque C, Cisternas F, Araya M. Cambio del patrón de enfermedad en la post transición epidemiológica de salud en Chile 1950-2000. *Rev. Med. Chile.* 2006; 134: p 703-712.
3. Takano H, Hasegawa H, Nagai T, Komuro I. Implication of cardiac remodeling in heart failure: mechanisms and ,therapeutic strategies. *Intern. Med.* 2003; 42: p 465-469.
4. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation.* 1991; 83: p 1849-1865
5. Krenning G, Zeisberg E, Kalluri R. The Origin of Fibroblasts and Mechanism of Cardiac Fibrosis. *J. Cell. Physiol.* 2010; 225: p 631-637
6. Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2002; 91: p 1103-1113.
7. Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterization of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 2005; 65: p 40-51.
8. Weber KT. Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertens.* 2004; 22: p 47-50
9. Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS. The cardiac fibroblast: Therapeutic Target in Myocardial Remodeling and Failure. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005; 45: p 657–687.
10. Silze T, Randolph GJ, Kreutz M, Kunz-Schughart LA. The fibroblast: Sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue. *Int. J. Cancer.* 2003; 108: p 173-180.
11. Petrov V, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension.* 2002; 39: 258-263.
12. Redden, R.A. and E.J. Doolin, Collagen cross-linking and cell density have distinct effects on fibroblast-mediated contraction of collagen gels. *Skin Res Technol,* 2003; 9: p 290-293.
13. Tomasek JJ , Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2002; 3: p 349-63.

14. Desmouliere A, Badid C, Bochaton-Piallat M, Gabbiani G. Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1997; 29: p 19-30
15. Baudino, T.A., et al., Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006; 291: p 1015-1026
16. Yue, L., J. Xie, and S. Nattel, Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2011; 89: p 744-753.
17. Van den Borne, S. W. M. et al. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat. Rev. Cardiol.* 2010; 7: p 30–37.
18. Catalán M, Smolic C, Contreras A, Ayala P, Olmedo I, Copaja M, Boza P, Vivar R, Ávalos Y, Lavandero S, Velarde V, Díaz G. Differential regulation of collagen secretion by kinin receptors in cardiac fibroblast and myofibroblast. *Toxicol. and Applied Pharmacol.* 2012; 261: p 300-308
19. Lau Y, Robinson R, Rosen M, Bilezikian J. Subclassification of beta-adrenergic receptors in cultured rat cardiac myoblasts and fibroblasts. *Circ. Res.* 1980; 47: p 41-48.
20. Bassiakou E, Xanthos T, Papadimitriou L. The potential beneficial effects of beta adrenergic blockade in the treatment of ventricular fibrillation” *European Journal of Pharmacology.* 2009; 616: p 1-6.
21. Rosenbaum D.M.,et al.The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*,2009; 459: p 356-363.
22. Tang, C.M. et al. GPCR expression in the heart; "new" receptors in myocytes and fibroblasts”. *Trends Cardiovasc Med.* 2004; 14: p 94-99.
23. Kolodsick J, Peters-Golden M, Larios J, Toews GB, Thannickal J, Moore B. PGE2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via EP2 signaling and cAMP elevation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*2003;29: p 537-544.
24. Muñoz C. “La activación de proteína kinasa A disminuye la adhesión, migración y expresión de colágeno en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos de rata neonata”. Tesis de pregrado para optar al título de Químico farmacéutico, 2012.
25. Copaja Soto M, Valenzuela R, Saldaña A, Paz Ocaranza M, Jalil JE, Vio C, Lijnen P, Ordenes GE, Vivar Sanchez R, Lavandero S, Díaz-Araya G. Early expression of monocyte chemoattractant protein-1 correlates with the onset of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in rats with distinct angiotensin-converting enzyme polymorphism. *JRAAS.* 2008; 9: p 154-162.

26. De Rooij, J et al."Epac is a Rap1 guanine-nucleotide- exchange factor directly activated by cyclic AMP". *Nature* 1998; 3: p 474-477
27. De Rooij J. et al "Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP- dependent Rap GEFs". *J. Biol.Chem.*2000; 275: p 20829- 20836
28. TamayoJM. et al. <<http://psicofarmacologia.info/curso/farmacodinamia/Fig24.html>> [consulta 27 marzo de 2013]
29. Mio T, Liu XD, Adachi Y, Striz I, Skold CM, Romberger DJ, Spurzem JR, Illig MG, Ertl R, Rennard SI. Human bronchial epithelial cells modulate collagen gel contraction by fibroblasts. *Am. J. Physiol.* 1998; 274: p 119-126.
30. Sharma JN. Role of tissue kallikrein-kininogen-kinin pathways in the cardiovascular system. *Arch Med. Res.* 2006; 37: p 299-306.
31. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.* 1998; 50: p 357-386.
32. Lorenzo P. Moreno A, Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica*. Ed. 18. Buenos aires- Madrid. Ed. Panamericana. 2008; p 495-496.
33. Moreau M, Garbacki N, Molinaro G, Brown N, Marceau F, Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J. Pharmacol. Sci.* 2005; 99: p 6-38.
34. Gallagher AM, Yu H, Printz MP. Bradykinin-Induced Reductions in Collagen Gene Expression Involve. *Hypertension.* 1998;32: p 84-88
35. Dembinska-Kiec A, Rücker W, Schönhöfer PS. Effects of PGI2 and PGI analogues on cAMP levels in cultured endothelial and smooth muscle cells derived from bovine arteries. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 1980;311: p 67-70.
36. Boza P. "Expresión y función de los receptores de cininas en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos". Tesis de pregrado para optar al título de Químico farmacéutico, 2012.
37. Meszaros G, Gonzalez A, Endo-Mochizuki Y, Villegas S, Villarreal F, Brunton L. Identification of G protein-coupled signaling pathways in cardiac fibroblasts: cross talk between Gq and Gs. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*2000; 278: p 154-160.
38. Ostrom RS, Naugle JE., Hase M, Gregorian C , Swaney J, Insel P, Brunton L, Meszaros JG. Angiotensin II Enhances Adenylyl Cyclase Signaling via Ca2/Calmodulin. *The Journal of Biol. Chem.* 2003; 278: p 24461–24468.

39. Hanke S, Nürnberg B, Detlef H, Groll H, Liebmann C. Cross Talk between β -Adrenergic and Bradykinin B2 Receptors Results in Accumulation and Mitogen-Activated Cooperative Regulation of Cyclic AMP Protein Kinase Activity. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21: p 8452-8460.
40. Chintalgattu V, Katwa L. Role of protein kinase C delta in angiotensin II induced cardiac fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 386: p 612–616.
41. Fisher SA, Absher M. Norepinephrine and ANG II stimulate secretion of TGF- β by neonatal rat cardiac fibroblasts in vitro. *Am J Physiol.* 1995;268: p 910-917.
42. Yang E, Schulman H. Structural examination of autoregulation of multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.* 1999;274: p 26199-26208.
43. Ronkainen J, Hänninen SL, et al. Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II represses cardiac transcription of the L-type calcium channel $\alpha(1C)$ -subunit gene (*Cacna1c*) by DREAM translocation. *J Physiol.* 2011;589:2669-2686.
44. Rangarajan, S., et al. Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the β 2-adrenergic receptor. *J Cell Biol.*2003; 160: p 487-493
45. Guzmán N. “Participación de Epac en procesos de adhesión, migración y contracción de geles de colágeno en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos de ratas neonatas”. Tesis de pregrado para optar al título de Químico farmacéutico, 2011.
46. Yokoyama U, Patel H, Swaney J, Rothand D, Insel P. cAMP promotes migration of cardiac fibroblasts via Epac and attenuates their transformation to myofibroblasts via PKA. *The FASEB Journal.* 2007;21: P 788-801
47. Brown, R.D., et al., Cytokines regulate matrix metalloproteinases and migration in cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 362: p. 200-205.
48. Yokoyama U, Patel H, Lai NC, Aroonsakool N, Roth DM, Insel P. The cyclic AMP effector Epac integrates pro- and anti-fibrotic signals. *PNAS.* 2008; 105: p 6386-6391
49. Chua Kien Hui, et al . Human serum promotes the proliferation but not the stemness genes expression of human adipose-derived stem cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 2012; 17 p 1306-1313
50. Rabinowitz B, et al. Myocardial and plasma levels of adenosine 3:5-cyclicphosphate. *Studies in experimental myocardial ischemia. Chest.* 1975; 68: p 69–74.

51. Liu X, Ostrom RS, Insel PA. "cAMP-elevating agents and adenylyl cyclase overexpression promote an antifibrotic phenotype in pulmonary fibroblasts". *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004; 286: p 1089–1099.
52. Villareal P, Epperson S. A, Ramirez-Sánchez I, Yamazaki K, Brunton L. Regulation of cardiac fibroblast collagen synthesis by adenosine: Roles for Epac and PI3K. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009; 296: p 1178-1184
53. Swaney J, Roth D, Olson E, Naugle J, Meszaros G, Insel P. Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenylyl cyclase. *pnas.* 2005;102: p 437-442.
54. Dobaczewski, M., Chen, W., Frangogiannis, N.G. Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011; 51: p 600–606.
55. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol.* 2003; 200: p 500-503.
56. Attisano L and Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta super family. *Science (Wash DC).* 2002 ; 296: p 1646–1647.
57. Ghosh AK, Yuan W, Mori Y, and Varga J .Smad-dependent stimulation of type I collagen gene expression in human skin fibroblasts by TGF-beta involves functional cooperation with p300/CBP transcriptional coactivators. *Oncogene.* 2000;19: p 3546–3555.
58. Schiller M, Dennler S, Andereg U. Increased cAMP levels modulate transforming growth factor-/Smad-induced expression of extracellular matrix components and other key fibroblast effector functions. *J. of bio. chem.* 2010; 285:p 409–421