



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

SEÑALIZACIÓN DE TGF- β 1 Y SU RELACIÓN CON CAVEOLINA-1 EN FIBROBLASTOS CARDÍACOS DIFERENCIADOS DE RATA ADULTA

Memoria para optar al Título Profesional de Bioquímica

DANICA PAMELA STEPHANIE JIMÉNEZ GALLEGOS

Patrocinante

Dra. Lorena García Nannig
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Advanced Center of Chronic Diseases (ACCDiS)
Universidad de Chile

Directoras de memoria

Dra. Lorena García Nannig
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Advanced Center of Chronic Diseases (ACCDiS)
Universidad de Chile

Mónica Villa Castro
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Advanced Center of Chronic Diseases (ACCDiS)
Universidad de Chile

Santiago de Chile, 2019

Agradecimientos

Hay personas que han estado en y desde un principio, como hay otras que conocí a lo largo del tiempo dedicado en este trabajo. Todas me entregaron un vasto y enriquecedor conocimiento académico y de vida, siendo este último un pilar fundamental en momentos clave.

Por lo que quiero agradecer en primer lugar a mi profesora patrocinante y guía de esta memoria, Dra. Lorena García, quien le agradezco por darme la oportunidad, la confianza y el entusiasmo con el que me recibió el primer día que llegué a su oficina. Agradezco su tiempo y dedicación en su docencia. A mi segunda guía, Mónica Villa, con quien me siento afortunada de haber compartido la vivencia de éxitos y fracasos constantes, por ser profesora y compañera al mismo tiempo. Por convertirse en una persona con la cual compartí anécdotas y conversaciones en el mesón que me llevaron a tomarle un cariño especial y una noble admiración por la mujer que es.

Le agradezco a mis compañeros del laboratorio de la Dra. Lorena García, que junto a ella y a las niñas Nicole, Pauli y Mónica, a Elías y Jafet, me ayudaron desde un principio con sus ideas en momentos críticos al empezar esta memoria. Todos no son solo muy buenos científicos, sino personas con una enorme disposición a enseñar y ayudar, gracias a ellos por entregarme las herramientas para sentirme capaz de todo. Luego quienes me entregaron tanto, que no hay espacio que pueda abarcar lo inmensamente feliz que fui todo este tiempo. A todos mis compañeros que integran el *gran laboratorio* al cual llegué a trabajar con una gran rapidez por terminar, pero que se convirtió en un período que no quería que terminase. Por las personas que me saludaban a primera hora todos y cada día, con una energía y cariño que sin importar lo que pasase a lo largo de este, terminaba lleno de risas; a Don Fidel y la Sra. Gindra. Gracias por crear un espacio tan acogedor y ser personas tan llenas de vida. Sra. Gindra, gracias por entregar tanto amor y confianza que permitiese a cada uno ser cómo es. Conocí personas con las cuales, el cansancio y horas infinitas de trabajo, se olvidaban tomando un cafecito, conversando, riendo, compartiendo todo el día, Jaime, Vale, Cami, Pablo, Pablo shico, Mati, gracias por la grata convivencia familiar día a día. Agradezco al laboratorio de la Dra. Fiedler por permitirme compartir en su entorno de la misma manera, entre la docencia y el compañerismo, a ella misma por los sabios consejos, a Aguayo, Luciano por el acogimiento, y por sobre todo a mi amigo Felipe por el incondicional apoyo en este gran período de cambios.

Gracias a las personas con las que pasé las horas más largas. Apu, Jafet, Seba, Ignacio y Yáreni, convirtieron el sueño y estrés en amistad y humor. Agradezco a Jafet por hacer esos fines de semana de trabajo más cortos. A Apu, Poli, Yáreni por crear una amistad llena de risas y confianza que nunca esperé conocer y que llegaron para compartir grandes experiencias. A Ignacio no solo por contribuir considerablemente a esta memoria, sino por ser un gran compañero, amigo y saber integrar a cada uno con humor, preocupación y entendimiento, de que este camino va a la par de momentos difíciles y un poco de tiempo es suficiente.

Junto a Tomás agradezco el apoyarnos constantemente a ser lo mejor de una misma y formar LabsitoFC. Gran juego que aprendí en este camino con increíbles personas como Pancha, Poli, Xime, Carla, Feña, y muchos más. Algo que partió como una distracción me llevó a conocer a un gran

equipo de niñas futbolistas, con las que empecé a compartir no solo un deporte, sino un equipo en el que “*darlo todo*” son palabras pequeñas para lo que se ve en cada juego con ellas.

Pero todo este gran camino empezó con el Piño, mis amigos y compañeros de curso de la U, amistades leales que nos vimos en nuestros peores y mejores momentos. Largas semanas y grandes viernes, que hacían que cientos de horas sin dormir valieran 100% la pena con ustedes. Pablo, Michi, Guille, Jimmy, Rolo, Felipe, Dine, Ibañez, Gabriel. Gracias por crecer juntos.

Agradezco enormemente a las grandes personas que conocí en la secretaría de extensión y centros de estudiantes que me permitieron conocerme mejor como persona y desarrollar habilidades, siempre con la bandera de llevar la ciencia y bienestar a nuestro entorno.

Gracias al origen de todo esto, empezando por mis amigos del colegio, Los Nefastitos, conociéndonos una vida entera, manteniendo la amistad a lo largo de años y entendiendo cuando cada uno se va y vuelve con los brazos abiertos. A mi amiga Trini, por hacer la vida más liviana riéndonos cuando ya no queda nada más por hacer.

Finalmente, le agradezco a las personas más importantes de mi vida. Ella me ha demostrado que la fuerza no tiene límites, que pararse en cada caída es rutina, por ser la mujer que me enseña que el sacrificio y la constancia te llevan a donde deseas. A mi mamá Ana Maria Gallegos Sanz, gracias por la comprensión y desearme siempre lo mejor. Si no fuese por ella nada de este camino hubiese sido posible. A mi tía Teresa por creer siempre en mí y hacerme sentir tan orgullosa de lo que hago. Y por último a mi sobrina Sofía, un ser precioso que me ha demostrado de lo que soy capaz, en cada abrazo, carcajada, confianza. Te agradezco por estar aquí y darme la fuerza suficiente para seguir adelante.

La claridad y la capacidad de adaptación, aparecen cuando soltamos el deseo de querer controlar el futuro de las cosas y ponemos toda la atención en el momento presente – Aldo Tonelli.

Tabla de contenido

ABREVIATURAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ABSTRACT	9
TGF- β 1 signaling and its relationship with caveolin-1 in differentiated cardiac fibroblasts of adult rat.....	9
RESUMEN	10
Señalización de TGF- β 1 y su relación con caveolina-1 en fibroblastos cardíacos diferenciados de rata adulta.	10
ANTECEDENTES	12
Enfermedades cardiovasculares.....	12
Fibrosis Cardíaca	12
Señalización TGF- β 1 en fibrosis.	14
Caveolas y caveolina-1	15
Caveolina-1 en fibrosis.....	17
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
METODOLOGÍA.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Materiales	23
Animales.....	23
Insumos y Reactivos	23

Métodos	25
Cultivo celular de FC de rata adulta	25
Dosis respuesta de TGF- β 1	26
Inhibición vías de señalización de TGF- β 1	26
Extracción y cuantificación de proteínas	26
Western blot	26
Inmunofluorescencia indirecta	27
Secreción de colágeno tipo I	27
Análisis estadístico	28
 RESULTADOS	 28
1. Determinar el efecto de TGF-β1 sobre los niveles de Caveolina-1	28
1.1 Validación del modelo de diferenciación de fibroblastos.	28
1.2 Determinar los niveles de caveolina-1 en diferenciación.	32
2. Estudiar el efecto de la inhibición de la vía TGF-β1/ERK sobre los niveles de caveolina-1 y parámetros fibróticos.	34
2.1 Evaluar la activación de la vía MAPK-ERK por efecto de TGF- β 1.	35
2.2 Determinar los niveles de caveolina-1, colágeno I y EDA-fibronectina al inhibir la vía ERK.	36
 DISCUSIÓN	 40
Condiciones fibrogénicas <i>in vitro</i>	41
Disminución de caveolina-1 por TGF-β1 independiente de la vía ERK y Smad.	44
Parámetros de fibrosis regulados por vía ERK y Smad.	47
 CONCLUSIONES	 49
 ANEXOS	 50
Anexo N°1 TGF-β1 activa la vía no-canónica ERK independiente de la subunidad TβRII.	50
Anexo N°2. TGF-β1 activa la vía canónica Smad en fibroblastos cardíacos de rata adulta.	51
Anexo N°3. TGF-β1 disminuye caveolina-1 a las 96 hrs de diferenciación de FCs.	52
Anexo N°4. Caveolina-1 disminuye vía independiente ERK de TGF-β1 en diferenciación de FCs neonato. .	53
 REFERENCIAS	 53

ABREVIATURAS

- α -SMA (*α -smooth muscle actin*) – α -actina de músculo liso
- ANOVA (*Analysis of variance*) – Análisis de varianza
- BCA (*Bicinchoninic acid assay*) – Ensayo de ácido bicinconínico
- BSA (*Bovine serum albumin*) – Albúmina de suero bovino
- DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*) – Medio Eagle modificado de Dulbecco
- DMSO Dimetil sulfóxido
- CAV1 Caveolina-1
- COL-I Colágeno tipo I
- CSD (*Scaffolding domain of Caveolin*) – Dominio scaffolding de Caveolina
- CTGF (*Connective tissue growth factor*) – Factor de crecimiento de tejido conectivo
- ECVs Enfermedades cardiovasculares
- EDA-FN (*Fibronectin containing extra domain A*) – Extra dominio A contenido en fibronectina
- ERK (Extracellular signal-regulated kinases) – Quinasas reguladas por señales extracelulares
- FC Fibroblastos cardíacos
- h Horas
- IF Inmunofluorescencia
- IM Infarto del miocardio
- MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) – Proteína quinasa activada por mitógenos
- min Minutos
- MEC Matriz extracelular
- MFC Miofibroblastos cardíacos
- MMPs Metaloproteínas de matriz
- MINSAL Ministerio de salud
- nm Nanómetros
- OMS Organización mundial de la salud
- O.N. Over night – Toda la noche
- PBS (*Phosphate-buffered Saline*) – Solución salina tamponada de fosfato

PFA (*Polimeric formaldehyde*) – Formaldehído polimérico

PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) – Fosfatasa y homólogo de tensina

PVDF (*Polyvinylidene fluoride*) – Fluoruro de polivinilideno

RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay buffer*) – Amortiguador de ensayo de radioimmunoprecipitación.

rpm revoluciones por minuto

SDS (*Sodium dodecyl sulphate*) – Dodecil sulfato de sodio.

SEM (*Standard error of the mean*) – Error estándar de la media.

SBF Suero fetal bovino.

TBS-T (*TRIS-buffered saline with Tween 20*) – Solución salina tamponada de TRIS con Tween 20.

TGF- β 1 (*Transforming growth factor β 1*) – Factor de crecimiento transformante β 1.

T β RI (*Transforming growth factor β receptor I*) – Receptor I del factor de crecimiento transformante β .

T β RII (*Transforming growth factor β receptor II*) – Receptor II del factor de crecimiento transformante β .

TIMPs (*Tissue inhibitors of metalloproteinases*) – Inhibidores de metaloproteinasas de tejido.

TSP-1 – Trombospondina – 1.

VCSM (*Vascular cells of smooth muscle*) – Células vasculares de músculo liso.

WB (*Western Blot*).

WT (Wild type) – Tipo salvaje.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores que promueven la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos.....	12
Figura 2. Receptor heterodímero de TGF- β 1 y su señalización canónica no canónica.....	13
Figura 3. Caveola y estructura de la proteína caveolina-1.....	15
Figura 4. Disminución de caveolina-1 en diferenciación de FCs de neonato por TGF- β 1.....	19
Figura 5. Modelo conducente a hipótesis.....	20
Figura 6. EDA-FN aumenta en dosis dependencia de TGF- β 1.....	28
Figura 7. TGF- β 1 promueve la síntesis y secreción de colágeno tipo I.....	29
Figura 8. Formación de fibras de α -SMA inducida por TGF- β 1 generan fenotipo de MFC.....	30
Figura 9. TGF- β 1 disminuye los niveles de caveolina-1 en FCs diferenciados.....	32
Figura 10. Señalización canónica y no-canónica de TGF- β 1.....	33
Figura 11. TGF- β 1 activa la vía ERK en FCs de rata adulta.....	35
Figura 12. La disminución de caveolina-1 es independiente de la vía ERK y Smad.....	36
Figura 13. El aumento en los niveles de EDA-FN es prevenido ERK y Smad.....	37
Figura 14. El aumento en la secreción de COL I TGF- β 1 es prevenido vía ERK y Smad.....	38
Figura 15. Procesamiento colágeno tipo I.....	43
Figura 16 Modelo final propuesto.....	48
Figura 17. TGF- β 1 activa la vía ERK independiente de la subunidad T β RII.....	49
Figura 18. Activación de la vía canónica Smad por TGF- β 1.....	50
Figura 19. TGF- β 1 disminuye caveolina-1 a las 96 hrs de diferenciación de FCs	51
Figura 20. Caveolina-1 disminuye vía independiente de ERK en FCs diferenciados de neonato.....	52

ABSTRACT

TGF- β 1 signaling and its relationship with caveolin-1 in differentiated cardiac fibroblasts of adult rat.

Objective: TGF- β 1 is the main stimuli to differentiate cardiac fibroblasts (CF) in cardiac myofibroblasts (CMF), the principal event in fibrosis. It has seen low levels of caveolin-1 (CAV1) after an injury to the heart. Also, it was reported a negatively regulation in TGF- β 1 canonical Smad and non-canonical ERK signaling by CAV1 in distinct models of fibrosis, but it is unknown if TGF- β 1 can regulate CAV1 and an associated molecular mechanism in cardiac fibrogenesis. **Methods:** CF were taken and differentiated with TGF- β 1 (0-20 ng/mL) for 96 hrs. The model was validated by quantifying fibrosis markers (pro-COL I, EDA-FN by western blot (WB) and soluble COL I by Sirius red staining) and CMF marker (α -SMA levels by WB and fibers of α -SMA by inmufluorescence (IF)). ERK and Smad pathway was inhibited by PD98059 (10 μ M) and SD208 (200 nM) inhibitors, respectively previous TGF- β 1 treatment for 96 hrs. CAV1 levels and fibrotic makers (EDA-FN and soluble COL I) were quantified. **Results:** The model was validated with 10 ng/mL of TGF β 1 for 96 hrs and significant increases levels of EDA-FN and soluble COL I were obtained. No differences were appreciated in pro-COL I synthesis in contrast to control without treatment. Also, no differences were observed in α -SMA protein levels, but the formation of α -SMA fiber by IF was observed. Along with this it was seen an effective down-regulation of CAV1 by TGF β 1, but this regulation was ERK and Smad independent pathway, unlike the regulation of fibrotic parameters. **Conclusion:** In this report we concluded that TGF- β 1 negatively regulated CAV1 levels independently of ERK and Smad pathway in CF differentiated.

RESUMEN

Señalización de TGF- β 1 y su relación con caveolina-1 en fibroblastos cardíacos diferenciados de rata adulta.

Luego de un infarto al miocardio, el corazón se repara mediante un proceso denominado fibrosis cardíaca, en el cual los cardiomiocitos muertos son reemplazados por una cicatriz de matriz extracelular (MEC), conformada principalmente por colágeno tipo I (COL I) y EDA-fibronectina (EDA-FN). Estas proteínas son secretadas por los miofibroblastos cardíacos (MFC), un fenotipo altamente secretor y contráctil debido a la expresión de fibras de α -SMA. Se obtienen por diferenciación celular de fibroblastos cardíacos (FC), promovida por el Factor de Crecimiento Transformante β 1 (TGF- β 1), un factor pleiotrópico con múltiples funciones fisiológicas de proliferación, diferenciación celular, regeneración y homeostasis de tejidos.

TGF- β 1 al unirse a su receptor puede señalar mediante una vía canónica de proteínas Smads y no-canónica de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), sin embargo estas vías pueden intercomunicarse río abajo. Hay antecedentes que indican que para la señalización de TGF- β 1 es necesaria la endocitosis del complejo receptor-ligando vía clatrina, mientras que la endocitosis vía caveolas lleva al reciclaje del receptor de TGF- β 1. Las caveolas conocidas como invaginaciones de la membrana plasmática están compuestas por proteínas caveolinas. Estas además de tener un rol estructural en la caveola cumplen con un rol de *plataforma de señalización*, por la ubicación de distintos receptores de una misma vía en las caveolas. Se ha reportado que la proteína caveolina-1 (CAV1) es la principal isoforma asociada a ECV. Esta regula negativamente la señalización de TGF- β 1 impidiendo la fosforilación de proteínas smads y la expresión de fibras de α -SMA en línea celular de fibroblastos embrionarios. En fibroblastos pulmonares embrionarios de origen humano (IMR-90) se ha reportado que TGF- β 1 puede regular negativamente los niveles de CAV1 en dosis y tiempo dependencia. En modelos *in vivo* se ha visto que en ratones CAV1 $-/-$ se favorece una permanencia en el tiempo el desarrollo de fibrosis cardíaca aumentando la deposición de COL I intersticial y disminuyendo la expresión de metaloproteinasas específicas para COL I. Por otra parte, se ha indicado que hay una relación entre la disminución de los niveles de CAV1 y una

hiperactivación de la vía MAPK-ERK 1/2, la cual a su vez esta vía se asocia a la síntesis de colágeno tipo I.

Los antecedentes que se conocen nos indican que se asocia una disminución de los niveles de CAV1 con una señalización positiva de TGF- β 1 y a una hiperactivación de la vía ERK 1/2. Pero no se conoce si hay una regulación de TGF- β 1 sobre los niveles de CAV1, ni tampoco posibles mecanismos en esta regulación en FCs diferenciados.

Por lo que para responder a la problemática planteada se propuso la siguiente hipótesis: **“TGF- β 1 disminuye los niveles de caveolina-1 mediante vía ERK y aumenta los marcadores de fibrosis: colágeno I y EDA-fibronectina, en fibroblastos cardíacos diferenciados de rata adulta”**. Para comprobar esta hipótesis se tomaron FC y se diferenciaron a MFC con TGF- β 1 por 96 hrs, por lo que en una primera instancia se validó el modelo *in vitro* mediante la cuantificación de parámetros de fibrosis; pro-COL I y EDA-FN por técnica de western blot (WB), la secreción de COL I soluble por tinción de Sirius Red, y el marcador de MFC; α -SMA por WB y la formación de fibras por inmunofluorescencia (IF). En una segunda instancia, se evaluó el efecto de TGF- β 1 sobre los niveles de CAV1 cuantificados por WB. Por último, para atribuirle una función distintiva a la vía ERK, se procedió a inhibir esta y la vía Smad por separado, y estudiar el efecto sobre los niveles de CAV1 y los parámetros de fibrosis por WB y tinción de Sirius red.

De la validación del modelo *in vitro* se observó que con 10 ng/ml de TGF- β 1 por 96 hrs se obtuvieron niveles aumentados significativos de EDA-FN y COL I soluble, pero no se observó diferencias de pro-COL I respecto al control. Respecto al marcador de α -SMA, no hubo diferencias significativas en sus niveles proteicos, pero sí se observó la formación de fibras de α -SMA por IF. Luego se determinó que TGF- β 1 disminuye significativamente los niveles de CAV1 independiente de una dosis dependencia. Finalmente, se observó que esta disminución no fue prevenida al inhibir la vía ERK y Smad, pero el aumento en los niveles de EDA-FN y COL I soluble sí fueron prevenidos al inhibir ambas vías.

En esta memoria se concluyó que TGF- β 1 regula negativamente los niveles de CAV1 y que esta regulación es independiente de la vía ERK y Smad, a pesar de que los parámetros fibróticos son regulados por ambas vías.

ANTECEDENTES

Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) corresponden a un grupo de desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos. Es la principal causa de muerte en el mundo, representando el 30% del total de muertes de la población mundial. Cada año se estima que 17,7 millones de personas mueren y de estas, 7,4 millones son causadas por enfermedades coronarias. Al menos tres cuartas partes de las defunciones causadas por ECV en el mundo se producen en los países de ingresos medios y bajos (OMS, 2017). En Chile el año 2014 representaron el 27,5% del total de defunciones, principalmente a causa de ataques cerebrovascular e infartos del miocardio (IM) (MINSAL, 2017).

Fibrosis Cardíaca

La fibrosis cardíaca es un proceso reparativo que ocurre luego de algún daño al tejido. Un IM produce la muerte de cardiomiocitos debido a una falta prolongada de suministro de oxígeno, producida generalmente por la formación de una placa aterosclerótica que bloquea una o más arterias coronarias (Thygesen K. & cols. 2012). La fibrosis genera una cicatriz que reemplaza a los cardiomiocitos muertos debido a que estos no tienen la capacidad de regeneración. Esta cicatriz está compuesta mayoritariamente por proteínas de matriz extracelular (MEC) secretadas principalmente por fibroblastos cardíacos (FC). Estas células componen 2/3 del total de células del tejido miocárdico de mamífero, y además secretan metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) e inhibidores de ellas (TIMPs), responsables de mantener la integridad y preservar la geometría cardíaca (Chen W. & Frangogiannis N. 2013). Este proceso reparativo se lleva a cabo en 3 etapas: inflamatoria, proliferativa y maduración (Chen W. & Frangogiannis N. 2013; Nielsen S. & cols. 2019). La etapa inflamatoria se da inicio por la muerte celular de cardiomiocitos y su vaciamiento intracelular con liberación de factores pro-inflamatorios que reclutan neutrófilos y monocitos principalmente. Estas células secretan diversos factores anti-inflamatorios, como el factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1) que da paso a la segunda etapa, la proliferativa. En ésta los fibroblastos cardíacos proliferan y migran a la zona del daño para diferenciarse a miofibroblastos cardíacos (MFC). En la zona del daño, el MFC se caracteriza por ser un fenotipo altamente contráctil con una alta capacidad de secreción de MEC, formándose la cicatriz. El MFC

presenta un fenotipo contráctil ya que expresa fibras contráctiles de actina de musculo liso (α -SMA) lo que permite el desarrollo de adhesiones focales (AF) necesarias para la adherencia a la zona infartada. La cicatriz formada por MEC está compuesta principalmente por colágeno I (COL I) y EDA-fibronectina (EDA-FN), siendo COL I el que se encuentra en mayor cantidad (Chen W. & Frangogiannis N. 2013). Este proceso reparativo se lleva a cabo en equilibrio y finaliza con señales anti-fibróticas no identificadas que llevan a la muerte de los MFC por apoptosis (Kong P. & cols. 2014). Sin embargo, este proceso puede perder su homeostasis llevando a cabo lo que se conoce como una fibrosis patológica caracterizada por una acción de los MFC prolongada en el tiempo, generando una secreción exacerbada y deposición intersticial de COL I y EDA-FN. Esto lleva a una mayor rigidez ventricular del corazón con la consecuente disfuncionalidad cardiaca (Kong P. & cols. 2014).

El principal evento de la fibrosis cardiaca es la diferenciación de los FC a MFC. Este proceso es mediado principalmente por TGF- β 1, estrés mecánico y fragmentos de la MEC (Chen W. & Frangogiannis N. 2013), siendo TGF- β 1 reconocido como el estímulo primario del proceso de fibrosis (Cho N. & cols. 2018) (**Figura 1**).

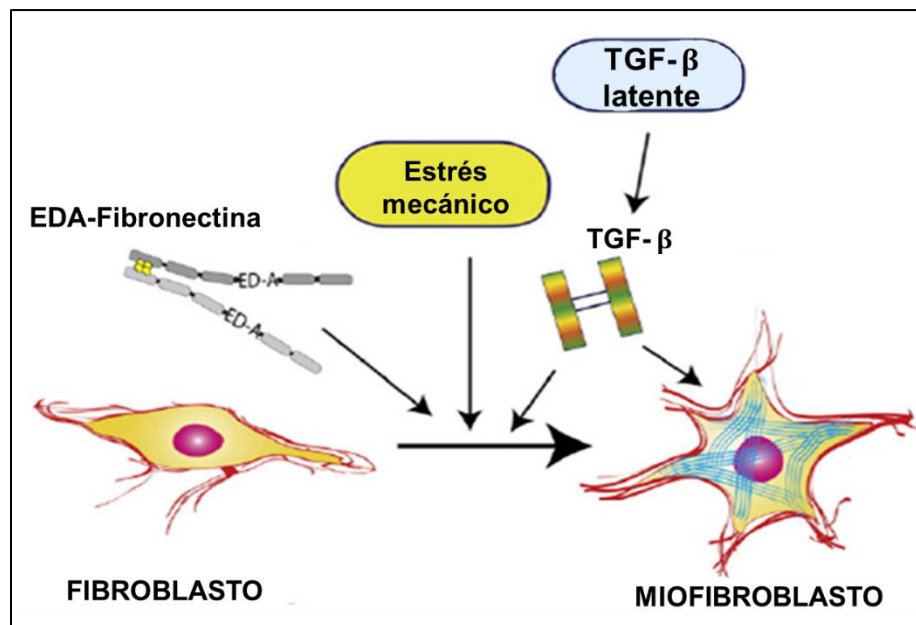


Figura 1. Factores que promueven la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos. La diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto puede ser promovida por fragmentos de EDA-FN de MEC, estrés mecánico producido por la misma rigidez de la MEC, y principalmente por TGF- β 1, el cual es secretado como complejo latente que es clivado y activado por MMPs. Adaptada de Chen W. & cols. (2013).

Señalización TGF- β 1 en fibrosis.

El TGF- β es secretado como un complejo latente que requiere ser activado para poder unirse a su receptor. Se conforma por un extremo C-terminal que contiene la forma madura de TGF- β y por el N-terminal donde se encuentra un péptido asociado a latencia (LAP) (Budi E. & cols. 2017). Existen diversas proteínas que participan en la activación de TGF- β . Hasta el momento se conocen la participación de la proteína trombospondina (TSP-1) y las metaloproteinasas MT1-MMP principalmente, además de MMP-2 y MMP-9 (Biernacka A. & cols. 2011). En fibrosis, el TGF- β activado se une a su receptor heterodimérico tipo serina/treonina quinasa, conformado por las subunidades T β RI (Receptor tipo I de TGF- β) y T β RII (Receptor tipo II de TGF- β) (**figura 2**) (Horbelt D. & cols. 2011). TGF- β 1 es ligando de la subunidad T β RII produciendo su autofosforilación para luego formar un heterodímero con la subunidad T β RI, la cual es activada por una transfosforilación de T β RII (Liu G. & cols. 2017).

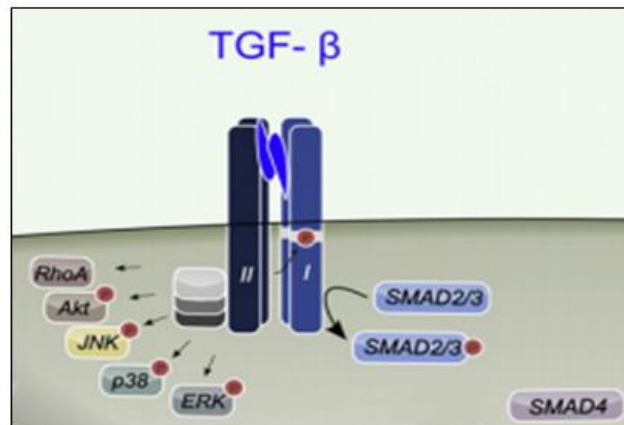


Figura 2. Receptor heterodímero de TGF- β 1 y su señalización canónica y no-canónica. El receptor de TGF- β 1 está conformado por las subunidades T β RI y T β RII, las cuales señalizan vía canónica y no-canónica, respectivamente. La vía canónica está compuesta por proteínas Smads y la vía no-canónica por proteínas MAPKs (JNK, p38 y ERK), RhoA y Akt. Adaptada de Horbelt D. & cols. (2011).

Se conocen dos vías de señalización de TGF- β 1; una vía canónica asociada a proteínas Smads, la que inicia desde la subunidad T β RI del receptor y una vía no-canónica iniciada desde la subunidad T β RII. Esta última está compuesta por las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), PI3K/Akt y RhoA (Horbelt D. & cols. 2011). La familia de proteínas Smads se clasifican en proteínas activadas por receptor (R-Smads 2 y 3), el mediador Smad común (co-SMAD 4) y las Smads inhibitorias

(Smads-1 6 y 7) (Dobaczewski M. & cols. 2011). La subunidad T β RI recluta a las proteínas Smads 2/3 y las fosforila para formar un complejo con Smad 4, este complejo actúa como segundo mensajero y migra al núcleo para regular la expresión de genes pro-fibróticos, entre ellos la expresión α -SMA, COL I y EDA-FN, entre otros (**figura 2**). Dentro de las vías no-canónicas, a la vía PI3K/Akt se le ha otorgado un rol en la proliferación de fibroblastos cardíacos neonatos (Gao Y. & cols. 2014), mientras que la vía RhoA se ha asociado al remodelado de fibroblastos auriculares sin ningún rol específico hasta el momento (Liu L. & cols. 2016). La vía no-canónica de MAPKs está compuesta río abajo por las proteínas quinasas reguladas por señal extracelular (ERK), por la vía p38/MAPK y la vía quinasa c-Jun-N-terminal (JNK) (Biernacka A. & cols. 2011), de las cuales no se conoce con exactitud la función de cada una en el desarrollo de la fibrosis cardíaca, además hay literatura de una posible intercomunicación entre la vía canónica Smad y no-canónica ERK de TGF- β 1 (Fengfeng Li. & cols. 2009).

Se conoce que para la señalización de TGF- β 1 es necesaria la endocitosis del complejo ligando-receptor vía clatrina, mientras que el receptor sin ligando es reciclado mediante endocitosis dependiente de caveolas (Guglielmo G. & cols. 2003).

Caveolas y caveolina-1

Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática de 50-100 nm ubicadas en balsas lipídicas, conformadas por proteínas caveolinas y cavininas que asisten en la curvatura de su estructura rica en colesterol y esfingolípidos (Parat M. 2009). Se forman por un proceso complejo que involucra al retículo endoplasmático, donde las caveolinas oligomerizan para ser exportadas hacia el Golgi con asociación al colesterol para estabilizar los oligómeros y puedan ser insertadas en la membrana plasmática (Busija A. & cols. 2017). Las caveolinas se comportan como un marcador de caveolas, además de ser fundamentales para su estructura. Existen tres isoformas de caveolinas (CAV1, CAV2 y CAV3) de las cuales CAV1 y CAV2 comparten la misma distribución tejido-específica (células endoteliales, músculo liso y esquelético, fibroblastos, células alveolares y adipocitos) mientras que CAV3 se expresa solo en tejido muscular esquelético y cardíaco (Yin H. & cols. 2016).

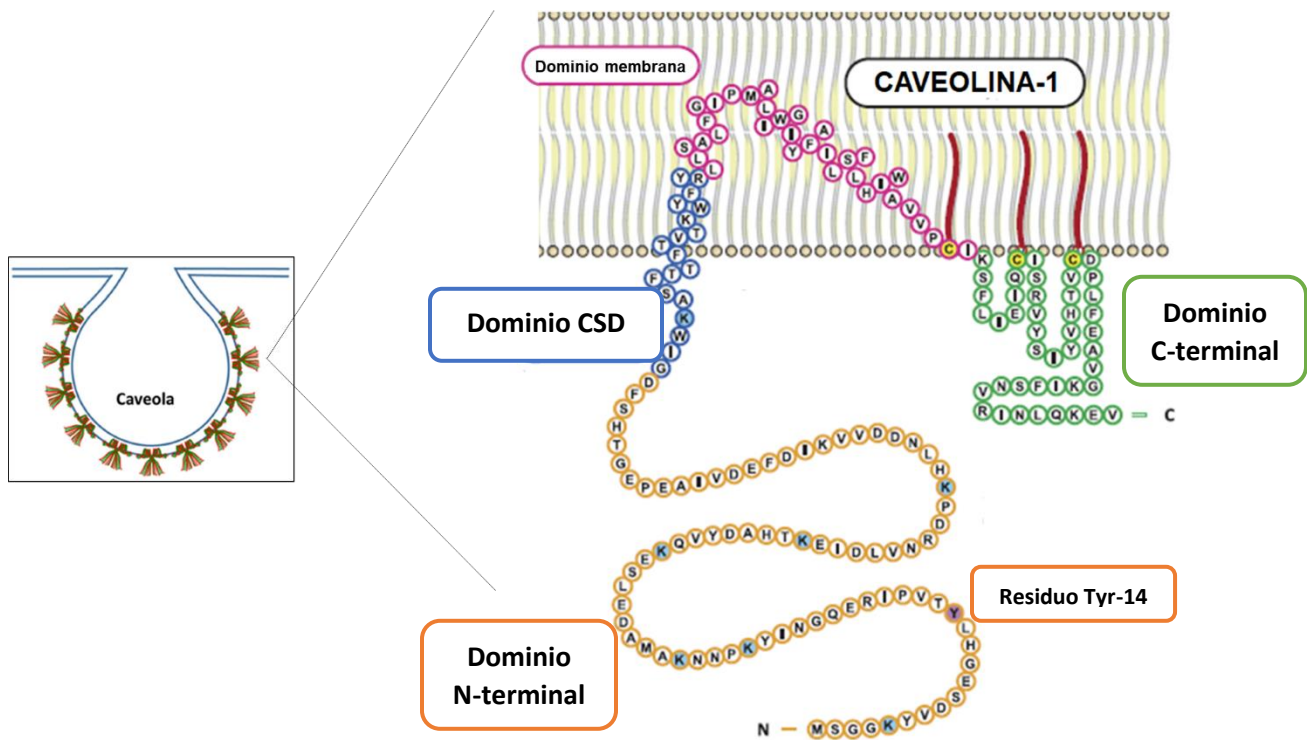


Figura 3. Caveola y estructura de la proteína caveolina-1. Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática que se encuentran en balsas lipídicas y se caracterizan por ser dominios ricos en proteínas, lípidos y colesterol. Están conformadas principalmente por proteínas oligoméricas de caveolina y cavininas, donde las caveolinas al llegar a la membrana plasmática interactúan con las cavininas que asisten en la curvatura de la caveola. La isoforma caveolina-1 es necesaria tanto para la formación como la estructura de las caveolas. Esta se conforma por 4 dominios; 1) Un dominio C-terminal que contiene 3 residuos de cisteína susceptibles a la palmitoilación, necesarios para la estabilización de oligómeros en la membrana plasmática (Parat M. 2002), para la unión a proteínas y para la formación de la curvatura de la membrana (Rui H. & cols. 2014); 2) Un dominio de membrana; 3) Dominio scaffolding de caveolina (CSD), ubicado entre la membrana y el citosol; 4) Dominio NH-terminal donde se ubica el residuo de tirosina 14 (Tyr14) susceptible de fosforilación. Adaptada de Gonçalves de Almeida C. J. (2017); A. Busija & cols. (2017).

Caveolina-1 (CAV1) es la más estudiada y asociada a patologías, tales como cáncer (Díaz J. & cols. 2014) y enfermedades cardíacas (Gvaramia D. & cols. 2013. Shihata W. & cols. 2017). Es una proteína integral de membrana de 22 kDa, conformada por 4 dominios (**figura 3**), de los cuales su funcionalidad reside principalmente en el dominio CSD y en la fosforilación de Tyr14. El dominio CSD, de aproximadamente 20 aminoácidos, tiene por función ser una plataforma de unión a receptores y proteínas de señalización, como el receptor de TGF- β , GTPasas Rho, Src, la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), MAPKs y β -integrinas, entre otras (Gvaramia D & cols. 2013). De este dominio se plantea la *“hipótesis de señalización”*, que propone que la caveola lleva a un

efecto río abajo de acuerdo a la proximidad en que se encuentran distintos receptores de una misma vía de señalización, mediante la unión de moléculas señalizadoras a este dominio. El segundo dominio funcional de CAV1 está dado por el residuo Tyr14, fosforilado por quinasas pequeñas como Src y Fyn, cuya función se asocia a procesos de motilidad celular y adhesión (Grande-García A & cols. 2017; Grande García A. & Del Pozo M. 2008). Por último, estos dos dominios contienen sitios de ubiquitinización en residuos de lisinas, los cuales pueden ser mono- o poli-ubiquitinizados llevando en el primer caso a degradación vía lisosomal y en el segundo caso a degradación vía proteasomal, siendo más común la mono-ubiquitinización (Busija A. & cols. 2017).

Caveolina-1 en fibrosis

La expresión de CAV1 se ha visto disminuida en diversas ECV, como en arritmias (Martens J. & cols. 2001; Bergdahl A. & cols. 2003; Kwiatck A. & cols. 2006), aterosclerosis (Pelat M. & cols 2003. Zhu Y. & cols. 2000), hipertrofia y en cardiomiopatía isquémica (Das M. & Das D. 2012). Todas estas enfermedades pueden desencadenar a largo plazo en una fibrosis de carácter patológico. Por lo que se ha propuesto a CAV1 como una proteína de cardioprotección (Schilling J. & cols. 2015) con participación en el proceso reparativo de fibrosis cardíaca, caracterizándose como una proteína anti-fibrótica. Su principal manera de actuar se basa en su dominio CSD, debido a que en estudios que tratan a CAV1 como un blanco farmacológico en modelos *in vivo*, se ha visto que solamente la adición del dominio CSD de CAV1 y no el péptido completo, revierte la expresión de pro-COL I y la deposición de COL I en la zona infartada (Miyasato S. & cols. 2011). Por ejemplo, se ha reportado que al inyectar el dominio CSD en modelos de ratones C57BL/6J macho adultos con una sobrecarga de presión en el ventrículo izquierdo inducida por una constricción aórtica transversal (TAC), se observa una disminución significativa en la expresión de COL I, en los niveles proteicos de pro-colágeno I, en los de chaperona de colágeno HSP47, en la deposición de colágeno intersticial, en los niveles de FN y aumento de la funcionalidad cardíaca (Pleasant-Jenkins D. & cols. 2017). Pero se ha evidenciado cierta relación tejido-específica de CAV1 al estudiar su función, debido a que en células vasculares de musculo liso (VCMS) de aorta y en células renales de ratones adulto C57BL/6 de 8-10 semanas, la ausencia de CAV1 actúa como un factor protector en el remodelado por hipertensión vascular inducido por Ang II. En estos dos modelos se observó una disminución del área fibrótica y el grosor de la pared vascular en los ratones CAV1 $-/-$ en comparación a los ratones

WT. (Forrester S. & cols. 2016). Por lo que definir a CAV1 como una proteína anti-fibrótica depende del tejido que se esté estudiando.

En cuanto a los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de fibrosis cardíaca, algunos de los primeros estudios que asocian a CAV1 con fibrosis se publicaron hace más de una década (Razani B. & cols. 2001), en el que se describió a CAV1 regulando negativamente la señalización canónica de TGF- β 1. En este trabajo se utilizó un modelo de línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón (NIH-3T3) mediante técnicas de inmunoprecipitación, se describió que CAV1 interactúa con el receptor de TGF- β 1, específicamente el dominio CSD y la subunidad del receptor T β RI. En este mismo trabajo al transfectar las células con el cDNA de mutantes de CAV1 que expresaban solo el dominio CSD, se observó que disminuyó el nivel de fosforilación de Smad2 en comparación a las mutantes de CAV1 que no expresaban este dominio. A sabiendas de esto, se ha observado una dosis respuesta de la regulación de CAV1 sobre la señalización de TGF- β 1 (Zhang G. & cols. 2011). En este estudio, fibroblastos hipertróficos de piel obtenidos de pacientes con desorden fibroproliferativo se trataron con 10 ng/mL de TGF- β 1 y se les administró distintas concentraciones de un péptido sintetizado de CAV1 permeable a las células (Cav1p). Se observó que a mayores concentraciones de Cav1p disminuían los niveles de expresión de α -SMA y los niveles de p-Smad2/Smad2, es decir, CAV1 estaría regulando negativamente la señalización de TGF- β 1 a nivel de su receptor, de proteínas Smads y en la actividad de TGF- β 1.

Con relación a las vías no-canónicas de TGF- β 1, se ha asociado a CAV1 tanto en fibroblastos como en miofibroblastos. Se ha visto que en FCs de ratones neonatos C57BL/6 sometidos a hipoxia, estos producen una disminución en los niveles de CAV1 y la fosfatasa PTEN, activando la vía de integrinas/PI3K/Atk, produciendo aumento de la proliferación de fibroblastos (Gao Y. & cols. 2014). En fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), se ha evidenciado que la forma fosforilada de CAV1 en el residuo de Tyr14, regula la migración de fibroblastos en cuanto a la morfología alargada de las células, su polarización y la distribución del citoesqueleto de actina (Grande-García A. & cols. 2007). En ambos estudios la disminución de los niveles de CAV1 activa vías que regulan positivamente la proliferación y migración de fibroblastos, eventos necesarios para que puedan localizarse en la zona del daño y poder formar la cicatriz de MEC. En cuanto a los miofibroblastos, en el estudio de Sanders Y. & cols. (2015), se determinó que el silenciamiento de CAV1 promueve la proliferación de

miofibroblastos y su resistencia a la senescencia y señalización pro-apoptótica en fibroblastos pulmonares IMR-90, mediante la vía MAPK/p38.

El último estudio mencionado tiene una importancia relevante debido a que se enfoca en uno de los blancos terapéuticos clave que se estudian hoy en día en fibrosis, que es la permanencia en el tiempo de la acción de miofibroblastos, lo que marcaría el límite entre una fibrosis reparativa fisiológica y una fibrosis patológica. La participación de CAV1 en este contexto también se ha observado en modelo *in vivo* (Gao Y. & cols. 2014). Ratones macho C57BL/6 sometidos a una ligación de la arteria coronaria descendiente anterior (LAD) se les midió niveles de CAV1 en tejido cardíaco a los 7, 14 y 28 días post-cirugía por inmunohistoquímica y WB, y se observó que a los 7 días post-cirugía los niveles de CAV1 disminuían significativamente, pero a los 14 y 28 días sus niveles se reestablecían a niveles similares e incluso mayores que el control sham.

Se sabe que CAV1 también está implicada en la etapa de formación de la cicatriz de MEC, participando en la estabilización de fibras de COL I (Shi F. & cols. 2010) y de FN (Sottile J. & Chandler J. 2005) y en su posterior degradación intracelular mediante endocitosis vía caveolas. La secreción de COL I está asociada principalmente a la vía ERK (Bhagal R. & Bona C. 2008) y a la vía Smad (Massagué J. 1998). Gran variedad de estudios asocia a CAV1 con la vía ERK. Por ejemplo, se demostró en el trabajo de Galbiati F. & cols. (1998) que existe una regulación negativa de CAV1 sobre la vía ERK 1/2, ya que se observó una hiperactivación de la vía en células NIH-3T3 al silenciar CAV1 con un vector antisentido. Resultados similares se encontraron en el estudio de Murata y cols. (2007), donde una re-expresión de CAV1 endotelial en tejido cardíaco de ratones CAV1 *-/-* redujo la expresión de COL I junto con una inhibición de la vía ERK. En este último trabajo si bien le atribuyen la funcionalidad a la ausencia de CAV1 en células endoteliales, no descartan que también se pueda deber a los FC. Sin embargo, también se ha visto a la vía ERK regulando negativamente los niveles de CAV1 en línea celular NIH-3T3 (Engelman J. & cols. 1999). En este trabajo al utilizar dosis crecientes (0 – 50 μ M) del inhibidor PD98059 que inhibe la actividad quinasa de MEK 1/2 encargada de fosforilar a ERK 1/2, se observa que los niveles de CAV1 aumentan desde los 5 μ M de PD98059 en comparación a la condición sin tratamiento.

Finalmente, la vía ERK también se ha asociado a una permanencia en el tiempo a la fibrosis. En el trabajo ya mencionado de Miyasato S. & cols (2011), se midió además señalización de la vía canónica

por fosforilación de Smad2 y por vía no canónica mediante la fosforilación de ERK1/2. Se observa que en los ratones CAV1 -/- la fosforilación de Smad2 es significativa solamente a los 3 días, para luego volver a niveles basales similares a la condición control a los 14 y 30 días. En cambio, el aumento en la fosforilación de ERK 1/2 es significativa y permanece en el tiempo a los 3, 14 y 30 días, dando a entender que sería la vía ERK 1/2 podría estar regulando la permanencia en el tiempo de la fibrosis cardíaca.

Como antecedente realizado en el laboratorio, en un principio se trabajó con FCs de neonato a los cuales se trataron con 5 ng/mL de TGF- β 1 y se realizaron cinéticas de diferenciación a 24, 48, 72 y 96 horas (h). Se obtuvo un control a tiempo 0 h y a cada tiempo correspondiente sin tratamiento, para medir los niveles de CAV1. En la **figura 4** se observa que CAV1 disminuía significativamente desde las 48 hrs en adelante en las células tratadas con TGF- β 1 en comparación a los controles sin tratamiento respectivos y solamente a las 96 h la disminución de CAV1 es significativa respecto al control tiempo 0 h. Se sugiere que CAV1 podría estar regulando la diferenciación de FC de rata en un contexto patológico debido al exceso de TGF- β 1 utilizado para diferenciar los FCs. Debido a que en este modelo de fibroblastos de neonato los parámetros de fibrosis y diferenciación no siguen una tendencia clara y los experimentos eran poco reproducibles, se decidió utilizar un modelo de rata adulta para la realización de la memoria.

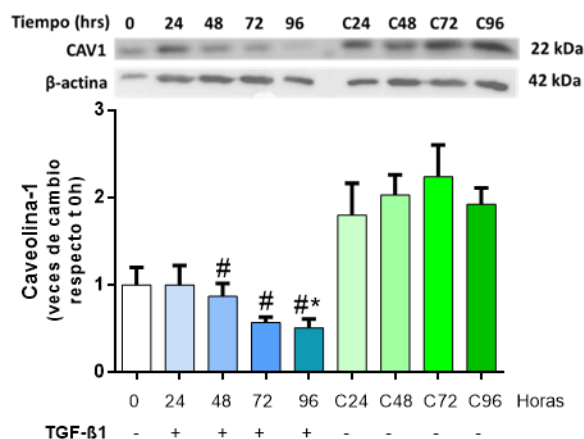


Figura 4. Disminución de caveolina-1 en diferenciación de fibroblastos cardíacos de neonato inducida por TGF- β 1. FC cardíacos de rata neonata fueron tratados con 10 ng/mL de TGF- β 1 por 24, 48, 72 y 96 h. Se muestran los valores con su error estándar medio (SEM) de al menos 4 experimentos independientes (n=4), graficados en GraphPrism 6. Se consideró significancia *p<0,05 respecto al control tiempo 0 h y #p<0,05 respecto a su control sin tratamiento respectivo en tiempo, con análisis estadístico ANOVA de una vía y post-test Dunnet.

En resumen, hasta el momento se conoce que TGF- β 1 es el principal estímulo que promueve la diferenciación de FC a MFC. A la vez este señala vía no-canónica ERK 1/2 y esta, al igual que la vía Smad regula la síntesis y secreción de COL I, principalmente. Por otra parte, la disminución de CAV1 se asocia a la presencia de distintas ECV que desencadenan en fibrosis a largo plazo y además, hay literatura que indica que su disminución puede ser regulada por TGF- β 1, pero en modelo de fibrosis pulmonar. Sin embargo, qué específicamente podría estar regulando la disminución de CAV1 y su posible mecanismo en fibrosis cardíaca no ha sido reportado (**figura 5**). Es por esto, que:

Considerando los siguientes antecedentes claves:

1. TGF- β 1 es el principal estímulo en la fibrosis cardíaca (Cho N. & cols. 2018).
2. TGF- β 1 regula negativamente los niveles de CAV1 mediante la vía MAPK/p38 en línea celular de fibroblastos pulmonares IMR-90 (Sanders Y. & cols. 2015).
3. CAV1 disminuye sus niveles al inhibir la vía ERK en fibroblastos NIH-3T3 (Engelman J. & cols. 1999).
4. Un aumento en los niveles de fosforilación de ERK 1/2 se correlaciona con una permanencia en el tiempo de la expresión del gen de pro-colágeno I *col1A2* en ratones CAV1 -/- (Miyasato S. & cols 2011).

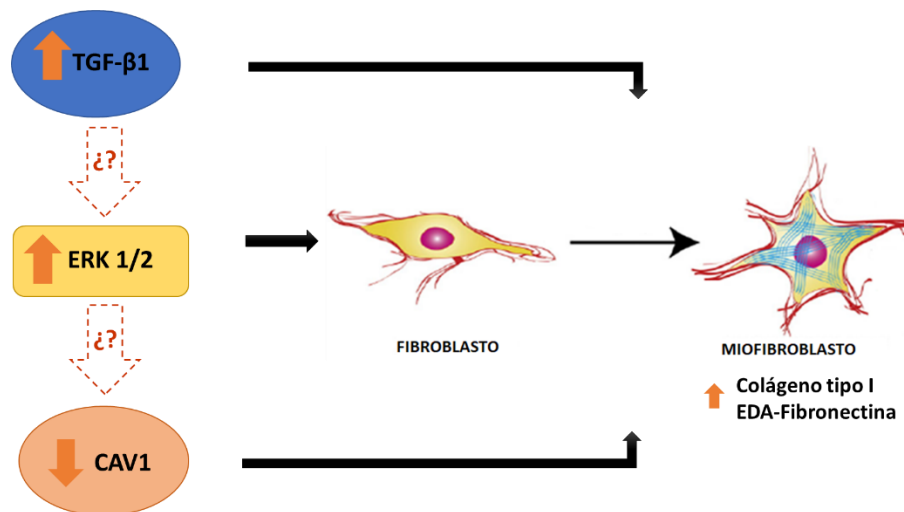


Figura 5. Modelo conductor a hipótesis. Para obtener fibroblastos diferenciados es necesario que TGF- β 1 active la vía ERK para promover el fenotipo de miofibroblasto, contráctil y secretor de MEC. Por otra parte, se ha visto que CAV1 participa en este proceso en distintos modelos *in vitro* e *in vivo*, pero no se conoce un mecanismo molecular involucrado en este proceso de fibroblastos cardíacos de cultivo primario de rata adulta.

Se presenta la siguiente hipótesis que dio origen a esta memoria:

HIPÓTESIS

“TGF- β 1 disminuye los niveles de caveolina-1 mediante vía ERK y aumenta los marcadores de fibrosis: colágeno I y EDA-fibronectina, en fibroblastos cardíacos diferenciados de rata adulta”

OBJETIVO GENERAL

Determinar si TGF- β 1 disminuye los niveles de caveolina-1 vía ERK, y si aumenta los parámetros fibróticos en fibroblastos cardíacos diferenciados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Todos los objetivos específicos serán realizados en cultivo primario de fibroblastos cardíacos de rata adulta.

1. Evaluar el efecto de TGF- β 1 sobre los niveles de caveolina-1.

- 1.1 Validar el modelo de diferenciación de fibroblastos.
- 1.2 Determinar los niveles de caveolina-1 en diferenciación.

2. Estudiar el efecto de la inhibición de la vía TGF- β 1/ERK sobre los niveles de caveolina-1 y parámetros fibróticos.

- 2.1 Determinar la activación de la vía ERK por efecto de TGF- β 1.
- 2.2 Determinar los niveles de caveolina-1, colágeno I y EDA-fibronectina al inhibir la vía ERK.

METODOLOGÍA

Cultivo celular: Se realizó cultivo primario de FC rata adulta Sprague-Dawley.

Tratamiento farmacológico: FC se trataron con TGF- β 1 (5, 10 y 20 ng/mL), inhibidor SD208 (200 nM) de la subunidad TBRI del receptor de TGF- β 1 (Uhl M. & cols. 2004), y el inhibidor PD98059 de MEK 1/2 (10 μ M) para la activación de ERK 1/2 (Hu J. & cols. 2016).

Diseño experimental por objetivo específico

1. Determinar el efecto de TGF- β 1 sobre los niveles de caveolina-1.

1.1 *Validación del modelo de diferenciación de fibroblastos:* Se realizó una dosis respuesta de TGF- β 1 por 96 hrs. Se midieron los niveles de parámetros fibrosis EDA-FN y pro-COL I por WB, y COL I soluble por tinción de Sirius red. En conjunto con los niveles del marcador de MFC; α -SMA por WB y formación de fibras de α -SMA por inmunofluorescencia.

1.2 *Determinar los niveles de caveolina-1 en diferenciación:* Se evaluaron niveles de caveolina-1 por dosis respuesta de TGF- β 1 por WB y niveles de caveolina-1 por inmunofluorescencia.

2. Estudiar el efecto de la inhibición de la vía TGF- β 1/ERK sobre los niveles de caveolina-1, Colágeno I y EDA-Fibronectina.

2.1 *Evaluar la activación de la vía MAPK/ERK por efecto de TGF- β 1:* Se determinó la fosforilación de ERK 1/2 por WB a tiempo corto. Y luego se inhibió la vía ERK 1/2 con el inhibidor PD98059 y la vía Smad con el inhibidor SD208 a tiempo corto.

2.2 *Determinar los niveles de caveolina-1, colágeno I y EDA-fibronectina al inhibir vía MAPK-ERK 1/2:* Se inhibió la vía ERK 1/2 con el inhibidor PD98059, la vía Smad con SD208 a tiempo largo y se evaluaron los niveles de Caveolina-1 y del parámetro de fibrosis EDA-FN por WB y COL I soluble por tinción de Sirius red.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Animales

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos entre 250-270 g. obtenidas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Todos los procedimientos se realiza de acuerdo a la Guía de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio por el Instituto Nacional de Salud de EE.UU (NIH Publication N°85-23, 1996) y bajo la normativa de aprobación del Comité de Bioética local (código N°CBE2015-21).

Insumos y Reactivos

Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti- α -SMA (Abcam: ab7817), anti-pro-COLI (Abcam: ab34710), anti-EDA-FN (Abcam: ab6328), anti-CAV1 (BD Biosciences: 610060),

anti- β -Tubulina (Sigma-Aldrich: R1026), p-ERK 1/2 (T202/Y204) (Cell Signaling: E10 #91065), ERK total (Santa Cruz Biotechnology: K23 sc-123), p-Smad3 (S423/425) (Cell signaling: 9520P), Smad3 total (Cell signaling: 9523P). Para la técnica de WB se utilizaron anticuerpos secundarios rabbit anti-mouse IgG conjugado con peroxidasa Calbiochem: 402335 y goat anti-rabbit IgG conjugado con peroxidasa Calbiochem: 401315, y para inmunofluorescencia se utilizaron los anticuerpos secundarios Alexa 488 goat anti-mouse (Jackson: A11001) y Alexa 568 goat anti-rabbit (Jackson: A11011).

Toracotomía animales

Se empleó anestesia ketamina clorhidrato solución inyectable 115 mg/mL (n° cat: 131243); xilacina clorhidrato 2% solución inyectable (n° cat: XI-51131002); etanol al 95% (Hes Ltda); povidona yodada 10% (Difem pharma); detergente enzimático eglezyme (Egle S.A).

Cultivo celular primario FC

Se utilizaron los siguiente reactivos; colagenasa tipo II (Gibco®: 17101-015); medio DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific®: 12400-024); suero fetal bovino (Biological industries: 04-001-1A-US); tripsina/EDTA 10X (Biological industries: 03-051-5B); solución de penicilina, estreptomina, anfotericina B (Biological industries: 03-033-1B); amortiguador Gerard (NaCl 128 mM, Winkler: SO-145; KCl 4 mM, Winkler: PO-1260; NaH₂PO₄ 0,19 mM , Winkler: PO-1290; Na₂HPO₄ 1,39 mM, Winkler: PO-1285; MgSO₄•7H₂O 1,39 mM, Winkler: MA-0980; HEPES ácido libre 1mM, Winkler: BM-0855; (D)-(+)-Glucosa 1,5 mM, Sigma®: G8270; piruvato de sodio 1,01 mM, Merck Millipore®: 6619); Dulbecco buffer fosfato salino (Sigma: D8537). Los insumos utilizados fueron placas de cultivo de 100 y 35 mm (Falcon®: 3530003 3530002); placas de cultivo celular 12 pocillos (Costar® 3524). Para el conteo de células se empleó cámara de Neubauer 0,1 mm de profundidad 0,0025 mm² (Hirschmann EM Technicolor: 8100203).

Extracción y cuantificación de proteínas

Para la extracción de proteínas de utilizó amortiguador RIPA 1X (25mM Tris-HCl, Winkler: BM-2000; 150 mM NaCl, Winkler: SO-1455; 1% NP-40, Winkler: BM-1225; 1% desoxicolato de sodio, Winkler: BM-0035, 0,1% SDS, Winkler: BM-1650, cocktail inhibidor de proteasas en tabletas Complete Mini, Roche Diagnostics:11836153001; cocktail inhibidor de fosfatasas PhosSTOP en tabletas, Roche Diagnostics: 04906845001). La cuantificación de proteína se realizó con kit micro-BCA™ (Thermo Fisher Scientific: 23235).

Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección

Para la electroforesis se utilizó geles de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (Winkler: BM-0070 y MB-0280); amortiguador de electroforesis 1X (Tris 35 mM, BM-2000; 250 mM SDS, Winkler: BM-1650 y glicina 1.92 M (Winkler: BM-1820), estándar de peso molecular PageRuler™ (Thermo Fisher Scientific®: 26616). Para realizar la electrotransferencia se empleó amortiguador de transferencia 1X (Tris 35 mM, BM-2000; Glicina 1,92 M, BM: 1820); membranas de PVDF protean-blot tamaño de poro 0,2 µm (Macherey-Nagel®: 741260). En la inmunodetección se empleó amortiguador TBS-T (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, Winkler: BM-2000; 150 mM NaCl, Winkler: SO-1455); leche descremada Svelty; kit de detección quimioluminiscente para HRP, EZ-ECL (Biological industrie: 20-500-120); anticuerpos primarios: anti-α-SMA (1:5000), anti-colágeno I (1:5000), anti-FN-EDA (1:2000), anti-Caveolina-1 (1:5000), anti-β-tubulina (1:5000), anti-p-ERK 1/2 (T202/Y204) (1:1000), ERK total (1:1000), p-Smad3 (1:1000), Smad3 total (1:1000); anticuerpos secundarios rabbit anti-mouse (1:5000) y goat anti-rabbit (1:5000).

Inmunofluorescencia

Se utilizó PFA 4% (Electron Microscopy Sciences: 15710); PBS 1X (Sigma-Aldrich: D8537); glicina 100 mM (BiosLabChile: BM-0820); tritón X-100 (Merck Millipore®: 108643) al 0,1% en PBS; BSA (BM: 0150) al 3% en PBS. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-α-SMA (1:200) y anti-caveolina-1 (1:200); anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia mencionados previamente; Hoesch 33342 (Invitrogen: H3570) y medio de montaje para fluorescencia (DAKO: S3023).

Métodos

Cultivo celular de FC de rata adulta

Las ratas se trataron según el protocolo descrito por Aránguiz-Urroz y cols., 2011. Brevemente, las ratas se anestesiaron con ketamina:xilacina 2:1 vía intraperitoneal. Los corazones se extrajeron por toracotomía y se llevó a disgregación mecánica en presencia de colagenasa tipo II (1 mg/mL) en agitación 200 rpm, 37°C por 1 h y 15 minutos (min), para finalmente obtener los FC por ciclos de centrifugación. De la primera centrifugación a 500 rpm por 1 min, se recuperó el sobrenadante y se llevó a 1000 rpm por 10 min, donde se recuperó el pellet, el cual se resuspendió en medio DMEM-F12 - FBS 10%, suplementado con antibióticos (estreptomicina, penicilina y anfotericina B). Se sembró en placas de 100 mm y se incubaron en humedad a 37°C, 5% CO₂ O.N (over night). Al día siguiente se lavaron tres veces con PBS 1X estéril, se cambió medio DMEM-F12 – FBS 10% y se

dejaron proliferar hasta confluencia 90% aprox. Finalmente, se tripsinizó con 1 mL de tripsina por 5 min a 37°C y se inhibió la reacción con 2 mL de DMEM-F12 – FBS 10%, luego se procedió a contar por método cámara de Neubauer y se sembraron 2×10^5 células (pasaje 1) en placas de 35 mm en medio DMEM-F12 – FBS 2%. Luego de 24 h de adherencia y estabilización, se lavaron las placas tres veces con PBS 1x, se cambió medio a DMEM-F12 – FBS 2% y se esperó 4h para realizar los estímulos correspondientes.

Dosis respuesta de TGF- β 1

Se estimularon FC con TGF- β 1 (5, 10 y 20 ng/ml) y el inhibidor SD208 (200 nM) para la subunidad T β RI del receptor de TGF- β 1 por 96 h, el inhibidor se adicionó 30 min previo al tratamiento con TGF- β 1. Se obtuvieron controles sin tratamiento a tiempo de 96 h. Se midieron por WB los niveles de proteína de EDA-FN, colágeno I, α -SMA, CAV1 y tubulina. Por inmunofluorescencia, en presencia de TGF- β 1 (10 ng/ml) y SD208 (200 nM) se observó la presencia de fibras de α -SMA y la expresión de CAV1 a tiempo de 96 h.

Inhibición vías de señalización de TGF- β 1

Se estimularon FC con los inhibidores SD208 (200 nM) y PD98059 (10 μ M) 30 min previos a la adición de TGF- β 1 (10 ng/mL) por tiempos cortos de 30 min y tiempos largos de 96 h. Se obtuvo un control sin tratamiento a los 30 min y 96 h.

Extracción y cuantificación de proteínas

Todos los estímulos se detuvieron colocando las placas en hielo, se removió el medio y se lavó con PBS 1x previamente frío, se adicionó 50 μ L de buffer de lisis RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa, y se procedió a raspar las células con rastrillo. Se recolectó el contenido en tubos Eppendorff, se sonicaron por 5 minutos a 4°C y se centrifugó a 14000 rpm, por 15 minutos a 4°C. Se recuperaron los sobrenadantes y se cuantificó proteínas por el método BCA y se prepararon las muestras con buffer de carga 4x para ser analizadas por WB.

Western blot

Se realizó el siguiente protocolo de WB:

- Electroforesis: Se cargaron 20 μ g de proteína en geles de poliacrilamida denaturantes al 10%/12% y se realizó electroforesis a 95-100 mV por 2 h y 30 min en buffer de electroforesis 1X.

- Electrotransferencia: Se realizó durante 3 o 12 h, según proteínas analizadas, a 50 mA en membranas de PVDF previamente activadas con metanol.
- Inmunodetección: Las membranas se bloquearon en solución TBS-T en leche descremada al 3% y se incubaron con anticuerpo primario O.N. Posteriormente, se incubaron con anticuerpo secundario por 1 h y se realizaron lavados en TBS-T 1x para finalmente revelar con solución EZ-ECL. Las membranas se revelaron con el transiluminador Syngene XT4. Las imágenes se cuantificaron con UN-SCAN-IT gel 6.1 y se normalizaron respecto al control de carga (β -tubulina).

Inmunofluorescencia indirecta

Como producto de la tripsinización se sembraron 3×10^4 por pocillo en placas de 12 pocillos y se realizaron estímulos con TGF- β 1 por 96 h. Una vez detenido el estímulo en frío, se realizaron tres lavados con PBS 1X por 3 min a 70 revoluciones por minuto (rpm), se fijaron las células con PFA al 4% por 30 min a temperatura ambiente y se incubaron con glicina 100 mM por 15 min a 70 rpm. Luego las células se permeabilizaron con Tritón X-100 0,1% y se bloquearon con BSA 3% en TBS-T por 1 h. Los anticuerpos primarios anti-cav1 (1:200) y anti- α -SMA (1:400) se incubaron en cámara húmeda O.N. a temperatura ambiente, se lavó tres veces con PBS 1X por 3 min a 70 rpm y se incubaron anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia Alexa 488 (1:200) y Alexa 568 (1:200) por 1 h y 30 min. Se realizaron lavados y se marcaron los núcleos con Hoechst (1:5000) por 5 min. Finalmente, se montaron los cubreobjetos con medio de montaje DAKO. Se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta la observación por microscopio de epifluorescencia. Las imágenes fueron analizadas por software ImageJ.

Secreción de colágeno tipo I

Se recolectó el medio de las células tratadas con TGF- β 1 e inhibidores SD208 y PD98059 por 96 h, y los controles sin tratamiento a 0 y 96 h. Se precipitó por 24 h a 4°C el colágeno del medio de cultivo con una solución de sulfato de amonio en agua al 50% en relación 1:3. Se centrifugó por 90 min a 14000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con 200 μ L de ácido acético 0,5 M, se tomó una alícuota de 100 μ L y se adicionó 950 μ L de solución Sirius red 50 μ M (en ácido acético 0,5 M). Se agitó por vortex y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó por 60 min a 14000 rpm a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 250 μ L KOH 1 M y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Se realizó una curva de COL I de cola de rata

Merck (0,5; 10; 25; 50; 100 μ g) en ácido acético 0,5 M. Se midió por absorbancia a 450 nanómetros (nm) y se interpolaron los datos con la curva para obtener la concentración de colágeno soluble de cada muestra.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis en el software GraphPad Prism 6. Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar medio (SEM) del total de n de cada grupo experimental. Los análisis estadísticos aplicados fueron T-Test y ANOVA de una vía con post test de Dunnet, comparando los datos con la condición sin tratamiento considerada control (C). Se consideró diferencia significativa si el análisis presentó un valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Para llevar a cabo esta memoria, primero se validó el modelo *in vitro* utilizado de FC de rata adulta, cuantificando marcadores fibróticos y de diferenciación. Luego se evaluó el efecto de TGF- β 1 sobre la proteína en estudio CAV1 y finalmente, se estudió la inhibición de la vía no-canónica ERK de TGF- β 1 sobre los niveles de CAV1 y el efecto de la inhibición de la vía sobre los parámetros fibróticos.

A continuación, los resultados serán presentados detalladamente por objetivo específico planteado:

1. Determinar el efecto de TGF- β 1 sobre los niveles de Caveolina-1.

1.1 Validación del modelo de diferenciación de fibroblastos.

Para validar el modelo *in vitro* utilizado se cuantificaron marcadores de fibrosis: EDA-FN y pro-COL I por técnica de WB, la secreción de COL I soluble por tinción de Sirius red, y el marcador de diferenciación celular: α -SMA por WB y la formación de fibras de α -SMA por IF. Para esto se tomaron FC de rata adulta y se estimularon con TGF- β 1 por 96 h en dosis respuesta, utilizando las concentraciones 5, 10 y 20 ng/mL, considerando un control sin tratamiento de TGF- β 1 a las 96 h.

En cuanto a los marcadores de fibrosis, en la **figura 6** se observa que los niveles de EDA-FN aumentaron significativamente cinco veces con 10 ng/mL y diez veces con 20 ng/mL de TGF- β 1 respecto al control. No se observaron diferencias significativas con 5 ng/mL de TGF- β 1. Además, hay una diferencia significativa en la condición de 20 ng/mL respecto a 5 ng/mL de TGF- β 1. Se puede concluir que la síntesis de EDA-FN aumenta en forma dosis dependiente de TGF- β 1.

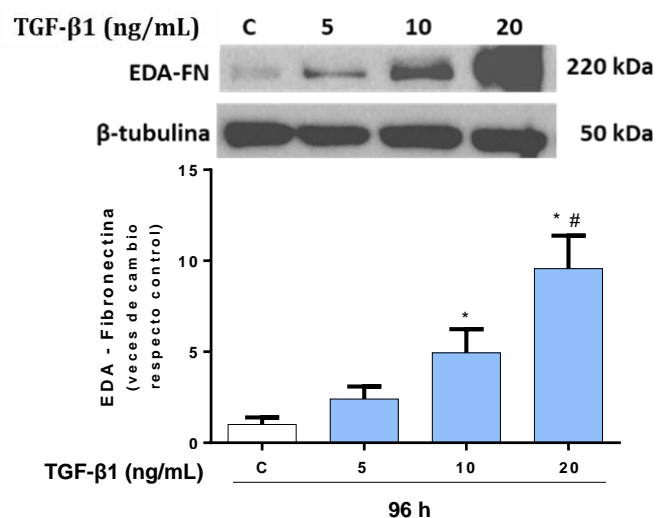


Figura 6. EDA-FN aumenta en dosis dependencia de TGF-β1. FC cardíacos de rata adulta se trataron con 5, 10 y 20 ng/mL de TGF-β1 por 96 h. Se muestran valores promedio con su error estándar de la media (SEM) de al menos 3 experimentos independientes (n=3-5), graficados en GraphPrism 6. Se consideró significancia *p<0,05 respecto al control sin tratamiento, #p<0,05 respecto a la condición 5 ng/mL de TGF-β1, con análisis estadístico ANOVA de una vía y post-test Dunnet.

Respecto al marcador de COL I, para WB el anticuerpo utilizado reconoce una de las cadenas peptídicas α1 (*gen COL1A1*) del pro-COL I intracelular. En la **figura 7A** se observa disminución significativa en los niveles de pro-COL I con 5 ng/mL de TGF-β1 respecto al control. En las condiciones de 10 y 20 ng/mL de TGF-β1 no hubo diferencias significativas con el control. Por otra parte, se observó una diferencia significativa entre las condiciones de 5 y 20 ng/mL. Según esto último indicaría que hay una dosis dependencia en la síntesis de pro-COL I con TGF-β1.

En fibrosis la secreción exacerbada de COL I soluble y su deposición es la responsable de formar la matriz extracelular rígida y generar la disfunción cardíaca (Cowling R. & cols. 2019), por lo que se decidió considerar en este modelo *in vitro* la secreción de COL I soluble. En la **figura 7B** se recolectó el medio de células control sin tratamiento de TGF-β1 y células tratadas con 10 ng/mL de TGF-β1. Se escogió únicamente esta concentración en este experimento, debido a su significancia en los niveles de EDA-FN (**figura 6**). Se puede observar en la **figura 7B** una clara tendencia al aumento de COL I soluble en presencia de 10 ng/mL de TGF-β1 respecto al control. Esto concluye que TGF-β1 no solamente promueve la síntesis de pro-COL I (**figura 7A**), sino también su secreción al medio extracelular.

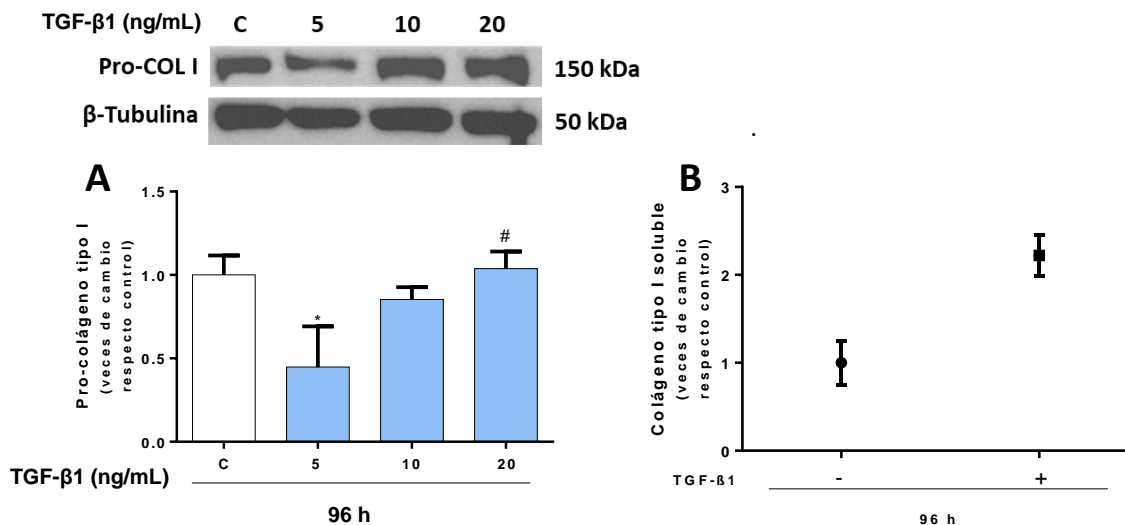


Figura 7. TGF-β1 promueve la síntesis y secreción de colágeno tipo I. A) FC cardíacos de rata adulta fueron tratados con 5, 10 y 20 ng/ml de TGF-β1 por 96 hrs. Se muestran valores promedio con su error estándar de la media (SEM) de al menos 3 experimentos independientes (n=3-5). Se consideró significancia * $p < 0,05$ respecto al control sin tratamiento y # $p < 0,05$ respecto a la condición 5 ng/mL de TGF-β1, con análisis estadístico ANOVA de una vía con post-test Dunnet. **B)** Se recolectó el medio de las células control sin tratamiento (●) y de células tratadas con 10 ng/mL de TGF-β1 (■) por 96 hrs. Se cuantificó el COL I soluble por tinción de Sirius red. Se muestran valores promedio con su error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes (n=2), graficados en GraphPrism 6.

Para comprobar la diferenciación de FC a MFC inducida con TGF-β1, se cuantificó el marcador de α-SMA por WB. En la **figura 8A** se observa que no hubo diferencias significativas entre las condiciones con TGF-β1 y el control, tampoco hubo diferencias significativas entre las distintas concentraciones de TGF-β1. De esta figura se concluye que los niveles del marcador de α-SMA no cambian en dosis respuesta de TGF-β1 en FC de rata adulta.

Debido a esto, es que se decidió corroborar la morfología de los MFC diferenciados por IF, estimulando FC con 10 ng/mL de TGF-β1. Se escogió únicamente esta concentración en este experimento, debido a su significancia en los niveles de EDA-FN (**figura 6**). En la **figura 8B**, se observa la presencia de α-SMA tanto en la condición control como en la condición con TGF-β1, pero solo en las células tratadas con TGF-β1 aumentó el tamaño celular y la formación de fibras de α-SMA características de MFC, en comparación a la condición sin tratamiento a las 96 hrs. Se puede concluir respecto al marcador de diferenciación de α-SMA que es necesaria la formación de fibras y no solamente el aumento en los niveles intracelulares de α-SMA para obtener un fenotipo de MFC.

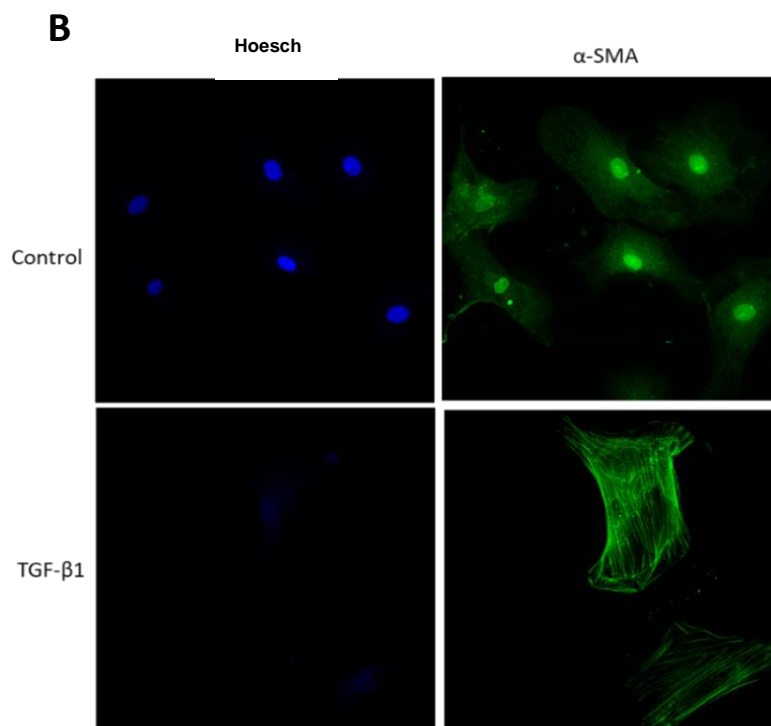
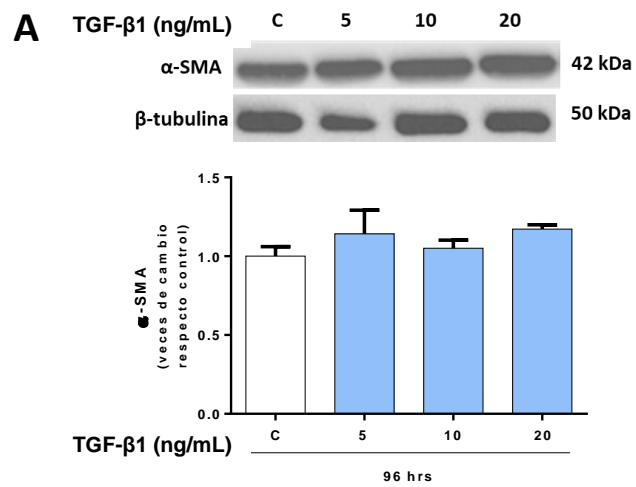


Figura 8. Formación de fibras de α -SMA inducida con TGF- β 1 generan fenotipo de MFC. A) FC cardíacos de rata adulta se trataron con 5, 10 y 20 ng/mL de TGF- β 1 por 96 h. Se muestran valores promedio con su error estándar de la media (SEM) de al menos 3 experimentos independientes (n=3), graficados en GraphPrism 6. Se consideró significancia *p<0,05 respecto al control sin tratamiento con análisis estadístico ANOVA de una vía con post-test Dunnet. **B)** FC de rata adulta se trataron con 10 ng/mL de TGF- β 1 por 96 hrs y se incubaron con anticuerpos primario anti- α -SMA (verde) y Hoesch (azul) para la detección de núcleos de FC según protocolo en materiales y métodos. F: Fibras de α -SMA.

Resumiendo la validación del modelo *in vitro*, una concentración de 10 ng/mL de TGF- β 1 es la mínima necesaria para diferenciar fibroblastos a tiempo final de 96 hrs, debido al aumento significativo que se obtuvieron en los niveles de EDA-FN (**figura 6**), en la secreción de COL I (**figura 7B**) y en la formación de fibras de α -SMA (**figura 8B**).

1.2 Determinar los niveles de caveolina-1 en diferenciación.

Para determinar los efectos de TGF- β 1 sobre CAV1, se cuantificaron los niveles proteicos por WB y se evaluó sus niveles por IF. Al igual que en la validación del modelo *in vitro*, se tomaron FC y se trataron con TGF- β 1 en una dosis respuesta (5, 10 y 20 ng/mL) por 96 h.

En la **figura 9A** se ve que los niveles de CAV1 en FC disminuyeron significativamente con todas las concentraciones TGF- β 1 utilizadas respecto al control, de forma que sus niveles disminuyeron 0,5 veces desde los 5 ng/mL hasta los 20 ng/mL de TGF- β 1 al ser utilizado como estímulo para diferenciar FC a MFC. De igual forma se observa en la **figura 9B** que la fluorescencia de CAV1 disminuye con 10 ng/mL de TGF- β 1 a tiempo final de diferenciación 96 hrs. Se concluye que la disminución de los niveles de CAV1 en diferenciación de fibroblastos cardíacos de rata adulta es por efecto de TGF- β 1.

Respecto a las concentraciones de TGF- β 1 utilizadas, se escogió únicamente la concentración de 10 ng/mL de TGF- β 1 para realizar el objetivo específico 2 de esta memoria, debido a su significancia en los parámetros de fibrosis, de diferenciación y en su significancia en la disminución de CAV1 (**figura 9A**).

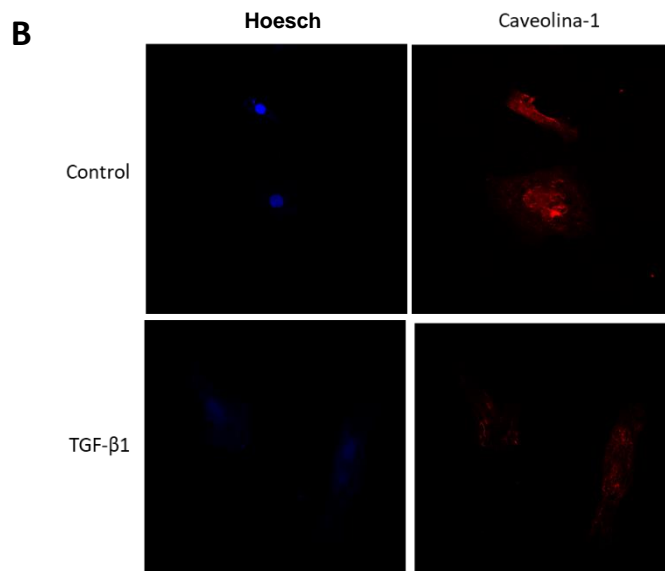
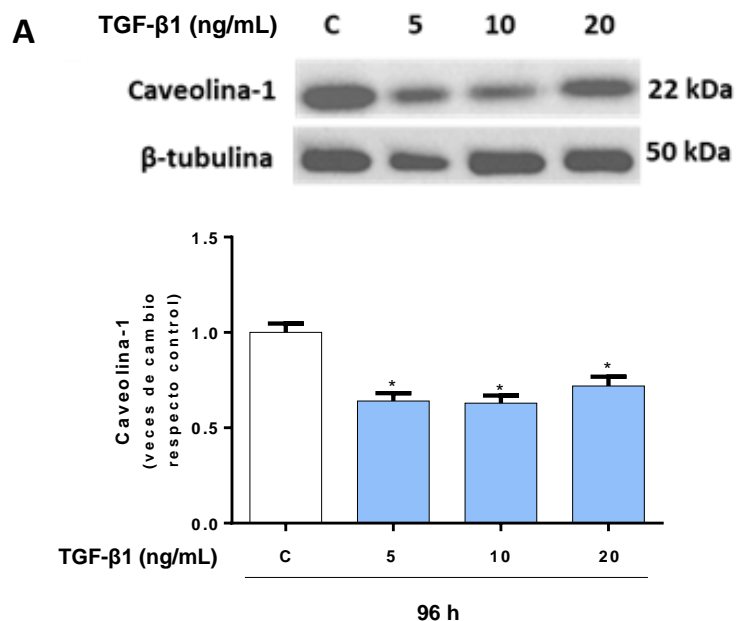


Figura 9. TGF- β 1 disminuye los niveles de caveolina-1 en fibroblastos cardíacos diferenciados. **A)** FC cardíacos de rata adulta se trataron con 5, 10 y 20 ng/mL de TGF- β 1 por 96 h. Se muestran valores promedio con su error estándar de la media (SEM) de al menos 5 experimentos independientes (n=5), graficados en GraphPrism 6. Se consideró significancia *p<0,05 respecto al control sin tratamiento con análisis estadístico ANOVA de una vía y post-test Dunnet. **B)** FC cardíacos de rata adulta se trataron con 10 ng/mL de TGF- β 1 por 96 h y se incubaron con anticuerpos primario anti-cav1 (rojo) y Hoesch (azul) para la detección de núcleos de FC según protocolo en materiales y métodos.

2. Estudiar el efecto de la inhibición de la vía TGF- β 1/ERK sobre los niveles de caveolina-1 y parámetros fibróticos.

Distintos estudios relacionan la hiperactivación de la vía ERK 1/2 por efecto de la disminución en la expresión de CAV1, junto a una posible correlación en la síntesis de colágeno. Es por esto que se decidió estudiar si la vía ERK posiblemente estaría regulando los niveles de CAV1 en diferenciación de FC. Se procedió a estudiar el efecto de la inhibición de esta vía sobre los niveles de CAV1 y sobre los parámetros de fibrosis COL I soluble y EDA-FN. Se evaluó mediante la técnica de WB los niveles fosforilados y totales de ERK1 y ERK2, y su inhibición a tiempos cortos de 30 min y sus efectos a tiempos largos de 96 hrs con el inhibidor PD98059 (Hu J. & cols. 2016) que inhibe la actividad quinasa de MEK 1/2 (**figura 10**). Debido a que hay literatura de una posible intercomunicación entre la vía canónica Smad y no-canónica ERK de TGF- β 1 (Fengfeng Li. & cols. 2009) es que también se decidió evaluar la fosforilación de ERK1 y ERK2 al inhibir la subunidad T β RI del receptor de TGF- β 1 con el inhibidor SD208 que inhibe la actividad quinasa de T β RI (Uhl M. & cols. 2004), y por ende el reclutamiento y fosforilación de Smad 2/3. De esta manera se podría atribuir roles distintivos a cada vía de señalización al estudiar los efectos sobre CAV1 y los parámetros fibróticos a tiempo final de 96 h.

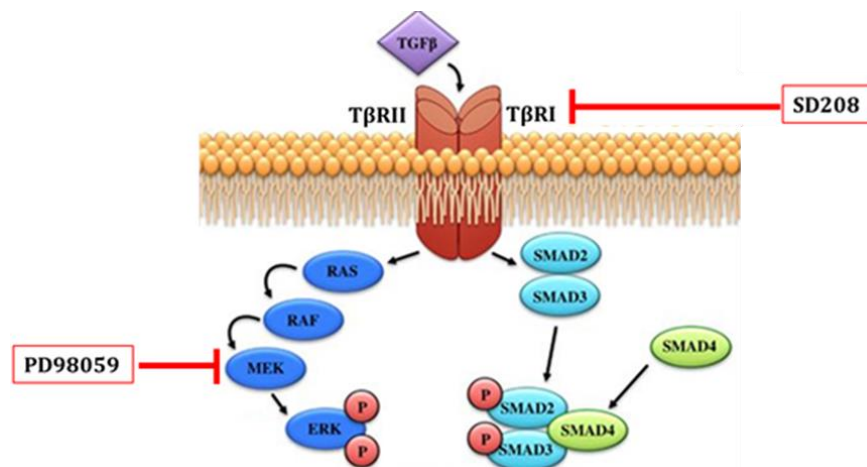


Figura 10. Señalización canónica y no-canónica de TGF- β 1. Adaptada de Príncipe D. et., al. 2017. TGF- β 1 actúa sobre el receptor dimerizado conformado por los monómeros TR β I y TR β II, iniciando la señalización vía SMADs y MAPKs, respectivamente.

2.1 Evaluar la activación de la vía MAPK-ERK por efecto de TGF- β 1.

Para evaluar la activación de vía ERK 1/2, FC se estimularon con TGF- β 1 por 30 min, tiempo de activación descrito en literatura en modelos de FC de rata adulta (Wang Li. & cols 2015). En la **figura 10** en la condición con TGF- β 1 se observan un aumento significativo en los niveles de la fosforilación de ERK1 (44 kDa) y sus niveles totales sin cambios significativos (**figura 10A**), de igual forma se observa en la fosforilación de ERK 2 y sus niveles totales (42 kDa) (**figura 10B**).

Debido a la posible intercomunicación de la vía canónica y no-canónica de TGF- β 1 es que también se decidió evaluar la fosforilación de ERK 1/2 y Smad 3 para poder atribuirle efectos distintivos a largo plazo. Para esto se inhibió la subunidad T β RI con el inhibidor SD208 (200 nM) y se inhibió la actividad quinasa de MEK 1/2 encargada de fosforilar a ERK 1/2 con el inhibidor PD98059 (10 μ M), ambos adicionándolos 30 min previos al tratamiento con TGF- β 1. En la **figura 17 Anexo N°1** al inhibir MEK 1/2 se observa que la fosforilación de ERK 1 y ERK 2 se inhibe, y a la vez en presencia del inhibidor SD208 aun hay fosforilación de ambas. Esto sugiere que ERK 1 y ERK 2 se fosforilan independiente de la subunidad T β RI y que el inhibidor PD98059 es efectivo al inhibir la fosforilación de ERK 1/2. Al inhibir ambas vías los niveles de totales de ERK 1 y ERK 2 se mantienen constantes. En la **figura 18, Anexo N°2** se observa que hay un aumento a la fosforilación de Smad 3 en presencia de TGF- β 1 y su inhibición correspondiente al utilizar el inhibidor SD208. Al igual que lo observado en la vía ERK, al utilizar el inhibidor PD98059 la fosforilación de Smad 3 persiste por efecto de TGF- β 1. Al inhibir ambas vías los niveles totales de Smad3 se mantienen constantes.

De estos resultados, se concluye que TGF- β 1 activa la vía no-canónica ERK 1/2 mediante su fosforilación en el modelo *in vitro* de diferenciación de FC de rata adulta, y además, se sugiere que hay una señalización de TGF- β 1 distintiva en base a la activación de las subunidades T β RII y T β RI de su receptor (**figura 10**).

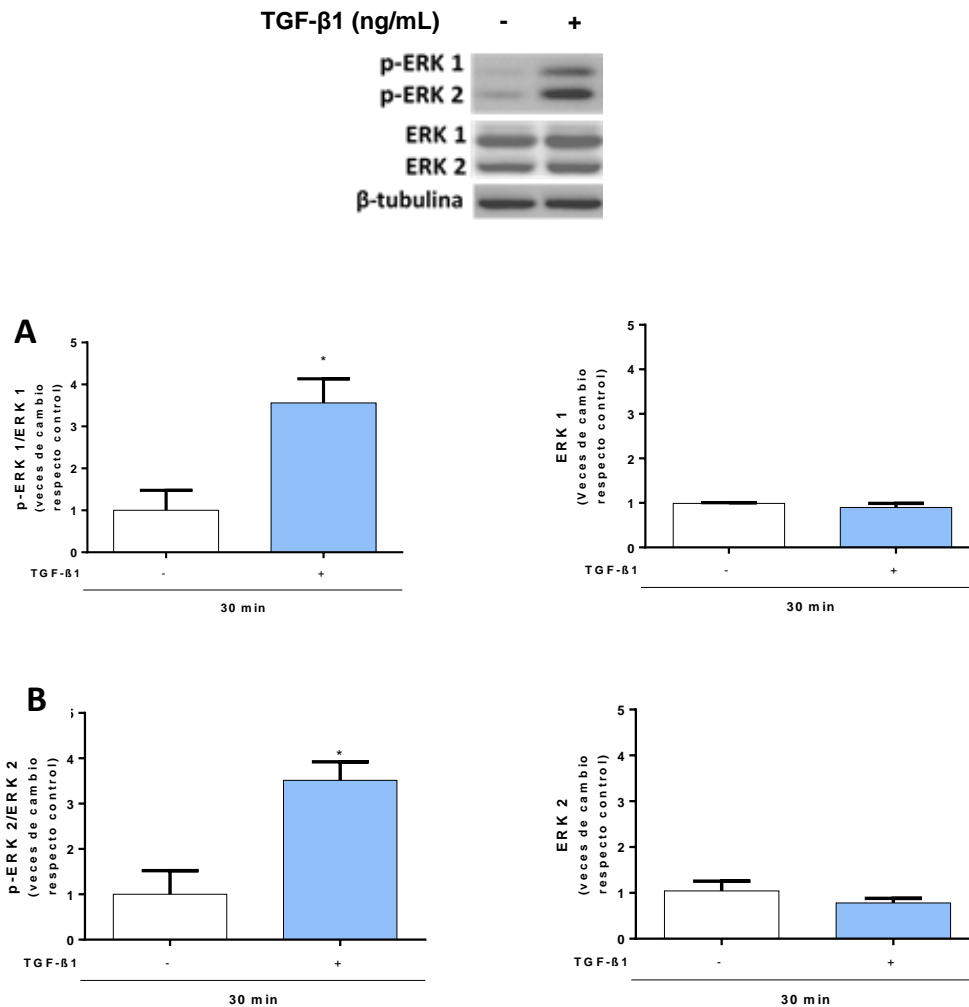


Figura 11. TGF-β1 activa la vía ERK en fibroblastos cardíacos de rata adulta. FC cardíacos de rata adulta fueron tratados con 10 ng/ml de TGF-β1 por 30 minutos. Los gráficos muestran la razón de **A**) p-ERK1/ERK1 y ERK 1 total y **B**) p-ERK2/ERK2 y ERK 2 total. Se muestran los valores con su error estándar medio (SEM) de al menos 4 experimentos independientes (n=4), graficados en GraphPrism 6. Se consideró significancia *p<0,05 respecto a la condición sin tratamiento con análisis estadístico T-test de student.

2.2 Determinar los niveles de caveolina-1, colágeno I y EDA-fibronectina al inhibir la vía ERK.

No hay estudios que demuestren que la vía ERK regula los niveles de CAV1 en diferenciación de FC de rata adulta, y si esta regulación está asociada a parámetros fibróticos. Para este último objetivo se evaluaron los efectos de la vía ERK a 96 h al utilizar el inhibidor PD98056 (10 uM) 30 min previos al tratamiento con TGF-β1. De igual manera, por lo señalado anteriormente, se evaluó los efectos

de la vía Smad al inhibir la subunidad T β RI con el inhibidor SD208 (200 nM) 30 min previos al tratamiento de TGF- β 1. En ambos casos se cuantificaron los niveles de CAV1, EDA-FN por técnica de WB y la secreción de COL I soluble por tinción de Sirius red.

Respecto a la vía de regulación de TGF- β 1 sobre los niveles de CAV1, en la **figura 12A** se observa que la disminución ejercida por TGF- β 1 sobre los niveles de CAV1 no se previene en presencia del inhibidor PD9805 + TGF- β 1. En la **figura 12B** se observa que en la condición de SD208 + TGF- β 1 la disminución de los niveles de CAV1 tampoco se previnieron al inhibir la subunidad T β RI y el uso del inhibidor por sí solo no ejerce efectos sobre los niveles de CAV1. De este resultado podemos concluir que la disminución de CAV1 por efecto de TGF- β 1 no es vía ERK ni tampoco Smad.

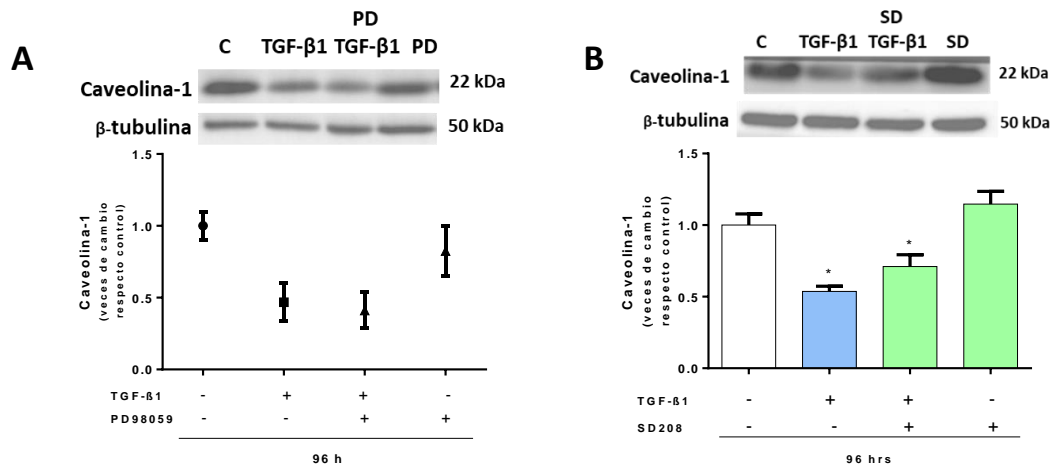


Figura 12. La disminución de caveolina-1 es independiente de la vía ERK y Smad. **A)** FC cardíacos de rata adulta se trataron previamente con PD98059 (10 μ M) (\blacktriangle) para luego ser tratados con 10 ng/mL de TGF- β 1 (\blacksquare) por 96 h. Se muestran valores promedio con su error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes (n=2), graficados en GraphPrism 6. **B)** FC cardíacos de rata adulta fueron tratados previamente con SD208 (200 nM) para luego ser tratados con 10 ng/mL de TGF- β 1 por 96 h. Se muestran valores promedio con su error estándar de la media (SEM) de al menos 5 experimentos independientes (n=5), graficados en GraphPrism 6. Se consideró significancia *p<0,05 respecto a la condición control sin tratamiento y #p<0,05 respecto a la condición TGF- β 1 10 ng/mL, con análisis estadístico ANOVA de una vía y post-test Dunnett. SD: SD208, PD: PD98059.

Finalmente, en cuanto a los efectos de las vías ERK y Smad sobre los parámetros fibróticos, en la **figura 13A** se observa que al inhibir la vía ERK en presencia de TGF- β 1 hubo disminución en los niveles de EDA-FN. Al evaluar los efectos de la vía Smad, en la **figura 13B** se observa una disminución significativa en la síntesis de EDA-FN al inhibir la subunidad T β RI en presencia de TGF- β 1. De este resultado se concluye que la síntesis de EDA-FN es vía canónica Smad y se sugiere que tampoco es vía no-canónica ERK de TGF- β 1 en FC diferenciados de rata adulta.

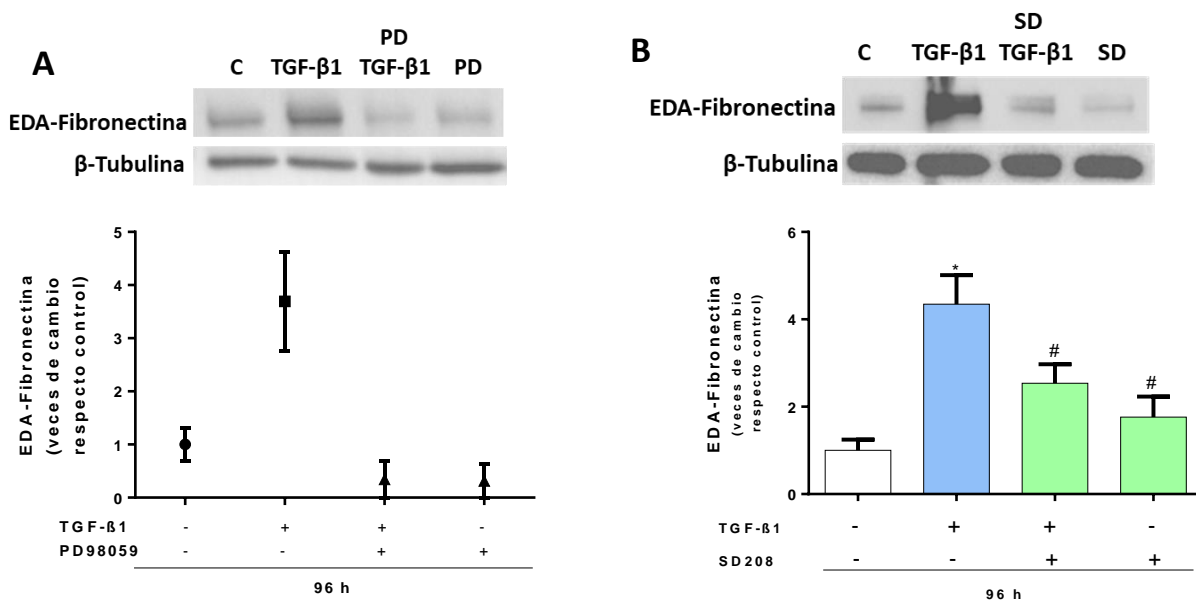


Figura 13. Las vías ERK y Smad previenen el aumento en los niveles de EDA-FN. A) FC cardíacos de rata adulta se trataron previamente con PD98059 (10 uM) (▲) para luego ser tratados con 10 ng/mL de TGF-β1 (■) por 96 h. Se muestran valores promedio con su error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes (n=2), graficados en GraphPrism 6. **B)** FC cardíacos de rata adulta se trataron previamente con SD208 (200 nM) para luego ser tratados con 10 ng/mL de TGF-β1 por 96 h. Se muestran valores promedio con su error estándar de la media (SEM) de al menos 5 experimentos independientes (n=5), graficados en GraphPrism 6. Se consideró significancia *p<0,05 respecto a la condición control sin tratamiento y #p<0,05 respecto a la condición TGF-β1 10 ng/mL, con análisis estadístico ANOVA de una vía y post-test Dunnett. SD: SD208, PD: PD98059.

En cuanto al COL I soluble, se observa que los niveles de secreción al medio son disminuidos a niveles de control sin tratamiento, al inhibir tanto la vía ERK (**figura 14A**) como la vía Smad (**figura 14B**) en presencia de TGF-β1 en ambos casos. De esto último se sugiere que la secreción de COL I producida por TGF-β1 es vía canónica ERK y Smad de igual manera.

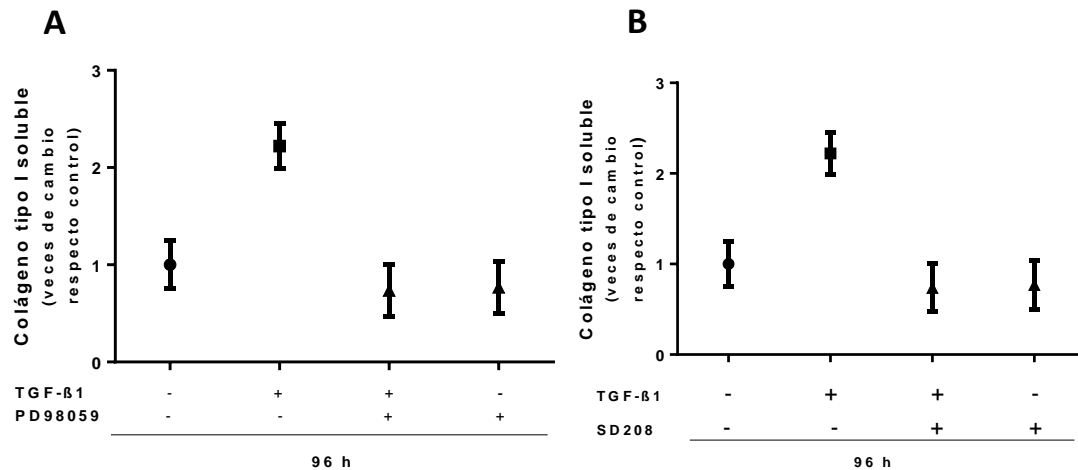


Figura 14. Las vías ERK y Smad previenen el aumento en la secreción de COL I. FC cardíacos de rata adulta fueron tratados previamente con **A)** PD98059 (10 uM) (▲), **B)** SD208 (200 nM) (▲), para luego ser tratados con 10 ng/ml de TGF-β1 (■) por 96 hrs. Se muestran valores promedio con su error estándar de la media (SEM) de al menos 2 experimentos independientes (n=2), graficados en GraphPrism 6.

Para dar pie a la sección de discusión; en esta memoria se determinó que una concentración de 10 ng/mL de TGF-β1 es necesaria para diferenciar FCs a MFCs, y poder obtener un fenotipo morfológico y funcional significativo de acuerdo con los parámetros evaluados. Estos resultados no podrían ser observados en otros tipos de tejido debido a que la complejidad en la señalización de TGF-β1 varía de acuerdo con el modelo que se esté estudiando. Por otra parte, se determinó que el procesamiento de COL I (síntesis de pro-COL I y secreción de COL I soluble) podría ser un hito necesario al momento de evaluar la fibrogénesis. Finalmente, se determinó que TGF-β1 regula negativamente los niveles de CAV1 y al parecer esto sería necesario para obtener MFC funcionales.

DISCUSIÓN

Hoy en día no se conoce cómo el proceso reparativo de fibrosis puede perder la regulación homeostática del proceso y desencadenar en una patología, en este caso llevando a enfermedades cardíacas como arritmias e insuficiencia cardíaca (Cohn J. & cols. 2000). Si bien conocemos sus etapas y los principales actores que dan inicio y término a cada una de ellas, aun no se conoce un blanco terapéutico ideal sin tener efectos secundarios adversos en los procesos fisiológicos. Se conoce a TGF- β 1 como el principal estímulo para la diferenciación de FC a MFC (Cho N. & cols. 2018), pero también se conoce como un factor de crecimiento altamente pleiotrópico. Este participa en funciones vitales en el organismo adulto (Wu M. & Hill C. 2009), y a nivel local de corazón no solo actúa en los fibroblastos, sino también en otros tipos celulares, como en cardiomiocitos (Umbarkar P. & cols. 2019), células inflamatorias y endoteliales (Dobaczewski M. & cols. 2011), por lo que al inhibirlo los efectos irían más allá que solo evitar la diferenciación celular y la deposición exacerbada de MEC (Frantz S. & cols. 2008).

Por otra parte, tenemos a CAV1 como una proteína a la cual se le ha atribuido un rol de cardioprotección, ya que en modelos *in vitro* e *in vivo* de isquemia/reperfusión en rata adulta, se ha visto la disminución de CAV1 en zonas infartadas (Schilling J. & cols 2014). Junto a ello en la última década, se ha propuesto a CAV1 como una proteína anti-fibrótica según los estudios que utilizan su dominio CSD y se observa reversión de parámetros fibróticos (Pleasant-Jenkins D. & cols. 2017; Yi S. & cols. 2014).

Sin embargo, la gran mayoría de los estudios de CAV1 y su participación en distintas etapas del remodelado de tejido, se han reportado en modelos de línea celular o fibroblastos de neonatos o embrionarios. Por ejemplo, en la migración celular (Grande-García A. & cols. 2007) y la formación de adhesiones focales (Nethe M. & Hordijk P. 2011) se utilizaron modelos *in vitro* de MEFs, mientras que la proliferación de fibroblastos cardíacos (Yao G. & cols. 2014) se utilizaron ratones C57BL/6 neonatos de 1-3 días. Lo mismo ocurre en los trabajos que presentan una relación entre la disminución de CAV1 y una hiperactivación de la vía MAPK-ERK 1/2; generalmente se utiliza la línea celular NIH-3T3 (Galbiati F. & cols. 1998; Engelman J. & cols.1999) y tejido cardíaco homogenizado (Murata T. & cols. 2007). Si bien estos antecedentes entregan una base para poder realizar estudios posteriores sobre el rol de CAV1 en fibrosis, cabe destacar que el envejecimiento es un factor

significativo en el desarrollo de la fibrosis cardíaca (Kwak H. & cols. 2011). En este trabajo se muestra que los niveles de TIMP1 en ratas adultas de 2 años y medio están aumentados en comparación a ratas de 3 meses. De igual forma en el estudio de Diaz-Araya G. & cols. (2003) se evaluó la funcionalidad de FC embrionarios, de neonato y adultos. Estos se trataron con IGF-1 y se cuantificó el número de células adheridas a distintas matrices. Se observó que el número FC adultos tratados con IGF-1 aumentaban hasta en un 75% en comparación a los controles sin tratamiento, en cambio, en FC embrionarios solo se vio un aumento del 30%. Por lo que es de relevancia destacar que esta memoria se realizó en un modelo de cultivo primario de fibroblastos cardíacos de rata adulta, lo que es un modelo utilizado más cercano a lo que es la edad de vida en personas que empiezan a sufrir infartos al miocardio, que es sobre los 65 años (Murtha L. & cols. 2017).

Condiciones fibrogénicas *in vitro*

No se conoce el efecto de TGF- β 1 sobre los niveles de CAV1 en FC. Por lo que, para hacer una determinación correcta, primero se evaluó distintas concentraciones de TGF- β 1 que nos otorgara un modelo *in vitro* válido, en el cual se pudiese relacionar un efecto de una concentración de TGF- β 1 sobre los niveles de CAV1 y que esta se pueda asociar a una fibrogénesis cardíaca.

Primero, se cuantificó la forma variante de splicing de fibronectina EDA-FN intracelular, siendo la más abundante en fibrosis (White E. & cols. 2008). En este trabajo se decidió probar las concentraciones de 5, 10 y 20 ng/mL. En la **figura 6** se observa que desde los 10 ng/mL se obtienen niveles de EDA-FN significativos. Por otra parte, tenemos que EDA-FN aumenta en forma dosis dependiente de TGF- β 1 (**figura 6**). Esto se podría correlacionar con la literatura que plantea un feedback positivo entre TGF- β 1 y EDA-FN, debido a que EDA-FN estaría participando en la activación de TGF- β 1, por evidencia de su interacción con LTBP-1; segmento proteico que es necesario clivar de TGF- β 1 latente para obtener la forma activa de TGF- β 1 y pueda interactuar con su receptor (Klingberg F. & cols. 2018). En conclusión, EDA-FN no solo es útil como parámetro fibrótico, sino además es un regulador de la diferenciación de fibroblastos al regular la activación de TGF- β 1, por lo que si bien TGF- β 1 fue el estímulo principal para diferenciar los FCs de esta memoria, es posible que efectos a mayores concentraciones de TGF- β 1 sea consecuencia de EDA-FN en el medio secretada por los mismos FCs.

Otro parámetro de fibrosis cuantificado fueron los niveles de pro-COL tipo I (**figura 7A**) y el COL I soluble en el medio, en el cual hay dos puntos que mencionar. Primero respecto a los niveles de pro-COL I, entre las distintas concentraciones de TGF- β 1 se observó una dosis dependencia que era esperada, ya que en el estudio de Petrov V. & cols. (2001) se demuestra una dosis y tiempo dependencia, donde fibroblastos cardíacos de ratas adultas Wistar se trataron con TGF- β 1 (0,45 ng/mL – 270 ng/mL) por 2, 4, 24 y 48 hrs y se observó concentraciones de COL I soluble y no soluble (unido a matriz) significativas desde los 17 ng/mL de TGF- β 1 a las 24 hrs y 48 hrs.

Segundo, respecto a la disminución de los niveles de pro-COL I en la condición de 5 ng/mL de TGF- β 1 y la ausencia de diferencias significativas con las condiciones de 10 y 20 ng/ml de TGF- β 1 respecto al control se podría explicar por el procesamiento de COL I (**figura 15**). Es posible que una concentración de 5 ng/mL de TGF- β 1 promueva la síntesis de pro-COL I y que este se secrete inmediatamente al medio extracelular. En cambio, a mayores concentraciones de 10 y 20 ng/mL de TGF- β 1, sea tal la exacerbación en la secreción de COL I disponible para el entrecruzamiento de sus fibras y depositarse en la MEC, que se generaría un exceso de pro-COL I al interior de la célula, explicando los niveles de pro-COL I con 10 y 20 ng/mL de TGF- β 1 similares al control. Esto se podría haber comprobado realizando una curva de dosis respuesta en la cuantificación de COL I soluble (**figura 7B**) con las mismas concentraciones que en la medición de pro-COL I (**figura 7A**). Además, el resultado de la **figura 7B** si bien se observa una tendencia al aumento en la secreción de COL I con TGF- β 1, es necesario más N experimentales para completar el resultado y esta discusión.

En fibrosis cardíaca no solo es necesario un fenotipo funcional de MFC (alta capacidad secreción de MEC), sino también el fenotipo morfológico de MFC desarrollado. Este último puede ser reconocido por la presencia del marcador de α -SMA, el cual su expresión es inducida principalmente por estrés mecánico (Schroer A. & Merryman D. 2015) y TGF- β 1, vía Smad principalmente en fibroblastos cardíacos (Dobackzewski M. & cols. 2010). En la **figura 8A** se observa que los niveles de α -SMA no variaron significativamente respecto a al control ni entre las distintas concentraciones de TGF- β 1, es decir, la determinación de la obtención de MFC por el marcador de α -SMA por técnica de WB no fue suficiente para corroborar una diferenciación celular efectiva. Esta no variabilidad también se ha descrito en el estudio de Ohnuma-Koyama A. & cols. (2013), en donde se obtuvieron fibroblastos pulmonares de ratón y se trataron con cloruro de didecildimetilamonio (DDAC), un compuesto presente en el aire debido a procesos industriales causante de fibrosis pulmonar. En este trabajo se

determinó que los niveles de α -SMA por WB no variaban en el tiempo respecto al control a pesar de detectar lesiones fibróticas mediante tinción de hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson en cortes histológicos y presencia de α -SMA por inmunohistoquímica, además de una activación de la señalización de TGF- β por niveles aumentados en la fosforilación de Smad 2/3. Si bien en el trabajo de Ohnuma-Koyama A. & cols. (2013) no hubo diferencias significativas respecto al control, en ambas condiciones de control y tratamiento, las bandas de α -SMA en el WB están aumentadas al igual que en la **figura 8A** de esta memoria. Esto se puede deber a que el estrés mecánico también es un estímulo para la diferenciación de FC. Se ha visto en fibroblastos cardíacos de rata neonata cultivados en matrices de colágeno 3D, en las cuales se reporta que un aumento en la rigidez de la matriz provoca un aumento significativo en la expresión mRNA de α -SMA entre 6 y 24 h (Galie P. & cols. 2011), por lo que el solo hecho de plaquear fibroblastos, estos estarían ya respondiendo al estrés mecánico sin adicionar ningún otro estímulo. Este último evento se sustenta en el trabajo de Santiago J. & cols. 2010, en cual a FC ventriculares obtenidos de cultivo primario de ratas observaron realizaron 3 pasajes y en cada uno midieron el marcador de α -SMA y EDA-FN, en ambos casos se observaron aumentos significativos en los niveles y una mayor formación de fibras de α -SMA a medida que aumentaba los pasajes.

Debido a esto se decidió verificar el fenotipo de MFC a través de inmunofluorescencia. En la **figura 8B**, tanto en la condición control sin tratamiento como en presencia de TGF- β 1 10 ng/ml se puede ver expresión de α -SMA, pero solo con TGF- β 1 se aprecia la formación de fibras y el fenotipo de MFC. No solo la alza en la expresión de α -SMA inducidos por TGF- β 1 es útil como marcador de diferenciación de miofibroblastos, como se suele ver en la mayoría de los estudios de fibrogénesis, sino más bien la formación de fibras de α -SMA que dan origen al fenotipo contráctil, por lo que este junto al aumento en el tamaño celular de los miofibroblastos debiesen ser los marcadores que evaluar en fibrogénesis.

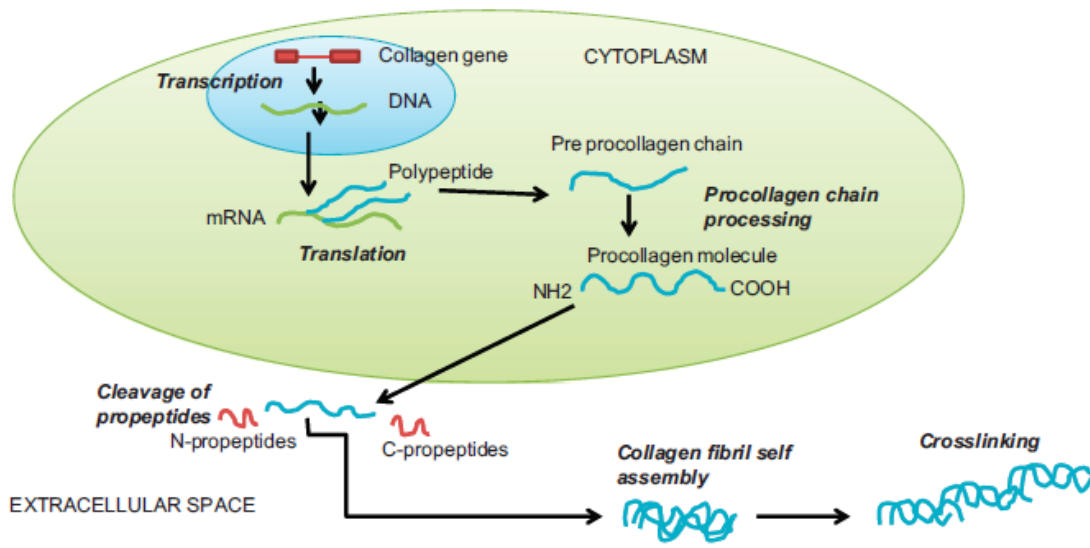


Figura 15. Procesamiento colágeno tipo I. El COL I es un tipo de colágeno fibrilar que se sintetiza como un pro-péptido, el cual en el RER es sometido a modificaciones post-traduccionales de hidroxilaciones en los aminoácidos de prolina y lisina. Los grupos de hidroxilisina son glicosilados, los cuales son necesarios para la formación de la triple hélice conocida como pro-COL I. Luego este es transportado al aparato de Golgi por vesículas donde se le adicionan oligosacáridos y es secretado al medio extracelular. En la membrana plasmática se encuentran las colagenasas, las cuales clivan los extremos N – y C – terminal para dar lugar a la forma madura de COL I. Esta forma madura de COL I al ser secretada al medio extracelular genera COL I soluble disponible para la formación del COL I fibrilar. Este COL I fibrilar es sustrato de la enzima Lisil-Oxidasa (LOX), esta produce grupos aldehídos en los grupos hidroxilados, los cuales forman enlaces covalentes necesarios para el entrecruzamiento de las fibras de COL I y pase a formar parte de la MEC (Bella J. & Hulmes D. 2017) Adaptada de Hookana E. & cols. 2014.

Disminución de caveolina-1 por TGF- β 1 independiente de la vía ERK y Smad.

En la **figura 9** se observa una disminución de 0,5 veces de CAV1 desde los 5 ng/mL hasta los 20 ng/mL de TGF- β 1. No se conoce literatura en la que factores de crecimiento tengan efecto sobre CAV1 en fibrosis cardíaca, sin embargo, en fibrosis pulmonar hay un solo trabajo en el que se reporta que TGF- β 1 regula los niveles de CAV1 (Sander Y. & cols. 2015). En este estudio se utilizó la línea celular IMR-90 de fibroblastos pulmonares de humano fetal, se trataron con TGF- β 1 y reportaron que TGF- β 1 regula en dosis y tiempo dependencia los niveles de CAV1. Utilizaron las concentraciones de 0 – 2,5 – 5 ng/mL de TGF- β 1 y observaron que los niveles de CAV1 disminuían 0,2 – 0,4 – 0,6 veces, respectivamente. Tanto como en el trabajo de Sanders Y. & cols. (2015) como en la **figura 9**, al tratar los FC con 5 ng/mL de TGF- β 1 se da una disminución entre 0,5 – 0,6 veces de

CAV1. Cuando trataron las células con 2 ng/mL de TGF- β 1 y midieron niveles de CAV1 por 0,5 – 1 – 3 – 6 – 12 – 24 – 48 h se ve una disminución del 80% a las 48 hrs respecto al control 0 h.

En cuanto a una posible función que podría estar ejerciendo la disminución de CAV1 en la diferenciación de FC, en el trabajo de Miyasato S. & cols. 2011 hacen una correlación entre la ausencia de CAV1, la resolución de fibrosis y los niveles de expresión de colagenasas. Aquí se utilizó un modelo *in vivo* de ratones C57BL/6J (WT) y Cav tm1Mls/J (Cav1 $^{-/-}$) al cual se les indujo una fibrosis ventricular mediante un daño de crioablación y se midieron los parámetros fibróticos deposición de COL I por tinción de Picosirus red y niveles de metaloproteínas por WB a los 3, 14 y 30 días. Luego del daño, en ratones WT a los 14 días se observa un aumento en un 20% en la deposición de COL I y a los 30 días una recuperación en un 10%. En los ratones CAV1 $^{-/-}$ se determinó un aumento significativo a los 14 días, y a los 30 días en lugar de una recuperación, se observa un 15% más de deposición de COL I intersticial en comparación a los 14 días, es decir, la presencia de CAV1 estaría permitiendo una resolución en la cicatriz de COL I. Además, se cuantificó los niveles de expresión de las colagenasas Mmp8 y Mmp13 y se observó que en los ratones CAV $^{-/-}$ disminuyó significativamente en comparación a los ratones WT a los 3 días. Este trabajo da a entender que CAV1 podría estar participando en el metabolismo de COL I, de tal manera que su ausencia favorecería la deposición de COL I intersticial regulando negativamente la expresión de colagenasas y a la vez, sería CAV1 el punto de inflexión entre una fibrosis fisiológica y el desarrollo de una fibrosis patológica. En la **figura 19, Anexo N°3** se cuantificaron los niveles de CAV1 a un tiempo de 0 h, a 96 h y a 96 h en presencia de TGF- β 1, y se puede observar que entre las 0 y 96 hrs los FC sin tratamiento difieren en sus niveles de CAV1 siendo mayores a las 96 hrs, pero al mismo tiempo las células tratadas con TGF- β 1 genera la disminución de CAV1. Es posible que el MFC a las 96 hrs y a las 96 hrs con TGF- β 1 difieran en funcionalidad probablemente marcando un límite entre una fibrosis fisiológica y una patológica, la cual se podría comprobar utilizando nuevos marcadores que caractericen a un MFC en una fibrosis patológica, entre los cuales los marcadores de apoptosis señalarían a los MFC resistentes a esta y su función permanente en el tiempo. Si bien, la función de CAV1 como proteína anti-fibrótica no ha sido del todo dilucidada, su disminución podría ser un buen marcador para una fibrosis patológica.

Respecto al posible rol de CAV1 regulando el paso de una fibrosis fisiológica a una patológica centrado en el metabolismo de COL I, también se podría inferir de los siguientes estudios que

plantean una regulación sobre la enzima Lisil-Oxidasa (LOX). Esta es la encargada de oxidar grupos hidroxilos de COL I fibrilar para formar grupos aldehídos necesarios para el entrecruzamiento de las fibras y que este se pueda depositar en la MEC (**figura 15**). Se ha demostrado que hay una relación entre TGF- β 1 y la enzima LOX (Voloshenyuk T. & cols. 2011) y entre CAV1 y LOX (Ji De-Gang & cols. 2018). En el primer estudio se trataron FC de ratas adultas con concentraciones de 5 y 10 ng/mL TGF- β 1 y se observó con ambas concentraciones el aumento en la expresión, niveles y actividad de LOX. En el segundo trabajo, se tomaron células estrelladas hepáticas y se silenció CAV con un siRNA y se evaluaron parámetros de estrés oxidativo, inflamación y fibróticos. Dentro de los parámetros fibróticos se cuantificó la expresión de LOX y se observó un aumento significativo en comparación a las células control siRNA.

Para continuar, se decidió estudiar si la vía no-canónica ERK de TGF- β 1 participa en la disminución de los niveles de CAV1. Se conoce que la subunidad T β RII del receptor de TGF- β 1 señaliza río abajo vía MAPKs y que la subunidad T β RI señaliza río abajo vía Smad (**figura 9**). Como bien se conoce es necesaria la autofosforilación de la subunidad T β RII para que esta pueda activar la subunidad T β RI (Dobaczewski M. & cols 2011), por lo que al inhibir la vía ERK con el inhibidor PD98059 que inhibe a MEK 1/2 responsable de fosforilar a ERK 1/2, aun estaría actuando la vía Smad mediante la activación de la subunidad T β RI.

Respecto a la vía de señalización ERK, en la **figura 11** se determinó la fosforilación tanto de ERK1 como de ERK2 por TGF- β 1, con una mayor intensidad de fosforilación en ERK2, y su inhibición efectiva en la fosforilación de ERK1 y ERK2 por inhibidor PD98059. La fosforilación de la vía ERK 1/2 era de esperar debido a que ya se había visto en FC de rata adulta inducida por TGF- β 1 (Wang Li. & cols. 2015) donde se observó aumentos significativos en los niveles de p-ERK 1/2 inducidos por 2 ng/mL de TGF- β 1. La mayor intensidad en p-ERK2 también se ha visto al estimular fibroblastos de línea celular NIH-3T3 con TGF- β 1 (Fengfeng Li. & cols. 2009). En este mismo trabajo se reporta la intercomunicación entre la vía ERK-Smad y como esta es necesaria para la síntesis de COL I. Silenciaron a ERK1 y ERK2, trataron con TGF- β 1 y midieron fosforilación de Smad2 tanto en la región linker como en los residuos de serina sustratos de T β RI. Se observó que al silenciar a ERK2 la fosforilación en la región linker disminuía en comparación al silenciar a ERK1, y en ambos casos el silenciamiento no interrumpía la fosforilación en los residuos de serina sustratos de T β RI, y además observaron que la síntesis de COL I disminuía solamente al silenciar ERK2. En esta memoria

complementariamente se vio la fosforilación de Smad3 por TGF- β 1 (**figura 18, anexo N°2**) y su inhibición efectiva por el inhibidor SD208. Al utilizar el inhibidor SD208 aún se observa fosforilación de p-ERK 1/2 (**figura 11**) y al utilizar el inhibidor PD98059 todavía se tiene fosforilación de p-SMAD3 (**figura 18, anexo N°2**). Por lo que se puede determinar que los resultados hallados en la última parte de esta memoria se pueden atribuir distintivamente a la vía de señalización ERK o Smad sin que haya una intercomunicación de las vías.

En cuanto a las posibles vías de señalización que podrían estar regulando los niveles de CAV1, en la **figura 12A y 12B** se determinó que ni la vía ERK ni la vía Smad respectivamente, eran las responsables en regular los niveles de CAV1. Si bien en la **figura 12A** solo hay dos N experimentales, se reprodujo las mismas condiciones experimentales en FCs de neonato cumpliendo con tres N experimentales (**figura 20, Anexo N°4**), en el cual se observa de igual manera que al inhibir la vía ERK previamente al tratamiento con TGF- β 1, la disminución de CAV1 no es prevenida. Otras posibles vías que podrían estar regulando CAV1, solamente se ha identificado la vía MAPK/p38 (Sanders Y. & cols. 2015) en fibroblastos pulmonares, pero también dentro de las vías no canónicas de TGF- β 1 se encuentran las vías PI3K/ Akt y RhoA las cuales junto a p38 no fueron probadas en esta memoria y deberían ser estudiadas en futuros estudios.

Parámetros de fibrosis regulados por vía ERK y Smad.

En el último tiempo se le ha otorgado distintos roles en fibrosis a cada uno de estos dos componentes. Por una parte, hay estudios que identifican a EDA-FN como uno de los factores que favorece la diferenciación de fibroblastos (Chen W. & Frangogiannis N. 2013) y por otra parte a COL I como el principal componente y responsable de la rigidez de la MEC. Según esto identificar la vía de señalización en la síntesis de EDA-FN aportaría a interferir en uno de los estímulos de diferenciación celular, e identificar la vía de síntesis de COL I interferiría directamente en la fase de la formación de la cicatriz de MEC.

Respecto a la síntesis de EDA-FN por TGF- β 1 se observó que esta puede ser prevenida tanto por vía Smad como por vía ERK en FC. Hasta el momento la vía de síntesis descrita de EDA-FN por TGF- β 1 en fibrosis se atribuía a la vía no-canónica MAPK/JNK (Hocevar B. & cols. 1999). En este trabajo se trató una línea celular de fibrosarcoma con TGF- β 1, de la cual se obtuvo un dominante negativo para la vía JNK y se observó interferida la síntesis de EDA-FN en comparación a la condición control.

En este mismo trabajo se trataron células con inhibidores PD98059 y SB203580 que inhiben la vía ERK y p38 respectivamente, y se determinó que las vías ERK y p38 no eran necesarias para la síntesis de EDA-FN. Según el resultado de la **figura 13a** la vía ERK sí sería necesaria para la síntesis de EDA-FN por TGF- β 1 en fibroblastos cardíacos de rata adulta. Ahora bien, de acuerdo al rol de EDA-FN como estímulo, en el trabajo de Kohan M. & cols (2010) se describió a EDA-FN como inductor en la diferenciación de fibroblastos pulmonares de ratones C57Bl/6, al observarse aumentos en parámetros fibróticos (expresión de α -SMA y deposición de COL I), en la funcionalidad del MFC (mayor contracción en geles de colágeno), y además promovía un aumento en los niveles de TGF- β 1. En este mismo trabajo se determinó que EDA-FN actuaba a través de la ERK 1/2 para regular la diferenciación de fibroblastos pulmonares. Es decir, es posible que la síntesis de EDA-FN en fibrogénesis sea por vía MAPK/JNK y que el mecanismo por el cual EDA-FN favorezca la diferenciación de fibroblastos sea por vía MAPK/ERK.

Finalmente, respecto a la secreción de COL I, en la **figura 14B** se observó que esta es prevenida tanto por vía SMAD como por vía ERK 1/2, resultado que se esperaba debido a que la síntesis de colágeno por TGF- β se determinó en un principio por la vía canónica Smad en fibroblastos de piel (Ghosh A. & cols. 2000), pero no fue hasta el reciente estudio de Khalil H. & cols (2017) donde por primera vez se obtuvieron KO específicos para fibroblastos cardíacos para la subunidad T β RI, Smad2 y Smad3. En donde se realizaron análisis genéticos y funcionales de los efectos que producía cada proteína por separado, donde concluyeron que la proteína smad3 influía mayormente en el desarrollo de la fibrosis y la deposición de MEC. Respecto a la vía no-canónica de TGF- β , en el estudio de Papakrivopoulou J. & cols (2004), se determinó por primera vez los roles diferenciados de las vías ERK, p38 y JNK en fibroblastos cardíacos fetales de rata. En este estudio se cuantificó la expresión de la subunidad α 1 del pro-COL I al estimular FC con estrés mecánico y se utilizó distintas concentraciones de inhibidores farmacológicos específicos para cada una de las vías MAPK. Se observó activación de las tres vías mencionadas por estrés mecánico, pero solamente era necesaria la activación de la vía ERK para la expresión de pro-COL I y además, observaron que a medida que la vía p38 se inhibía a mayores concentraciones de su inhibidor aumentaba la expresión de pro-COL I proporcionalmente.

CONCLUSIONES

- Una concentración de 10 ng/mL de TGF- β 1 es la mínima necesaria para diferenciar fibroblastos cardíacos a tiempo final de 96 h y obtener miofibroblastos funcionales.
- TGF- β 1 disminuye los niveles de CAV1 en fibroblastos cardíacos diferenciados.
- La vía ERK ejerce su acción independiente de la subunidad T β RI del receptor de TGF- β 1.
- La disminución de los niveles de CAV1 por TGF- β 1 es independiente de la vía ERK y Smad.
- El aumento de los parámetros de fibrosis de COL I y EDA-FN es prevenido vía no-canónica ERK y canónica Smad.

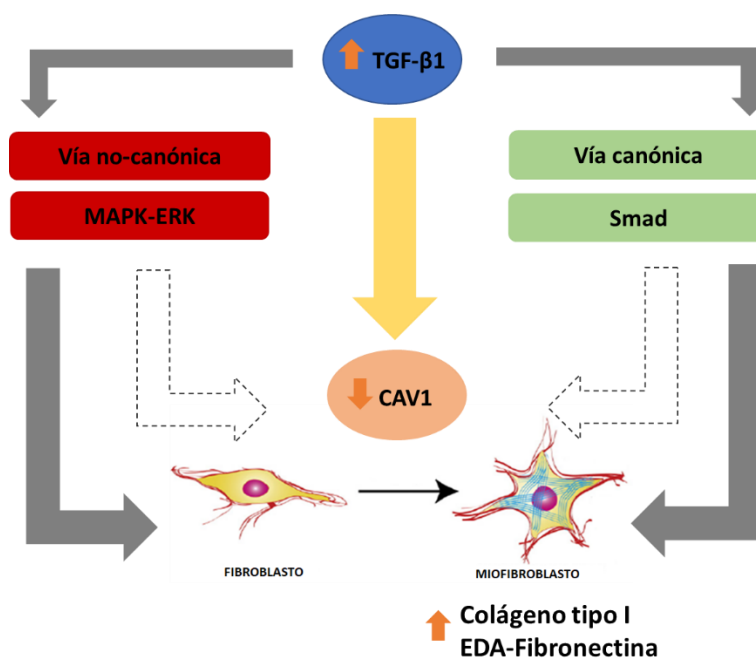
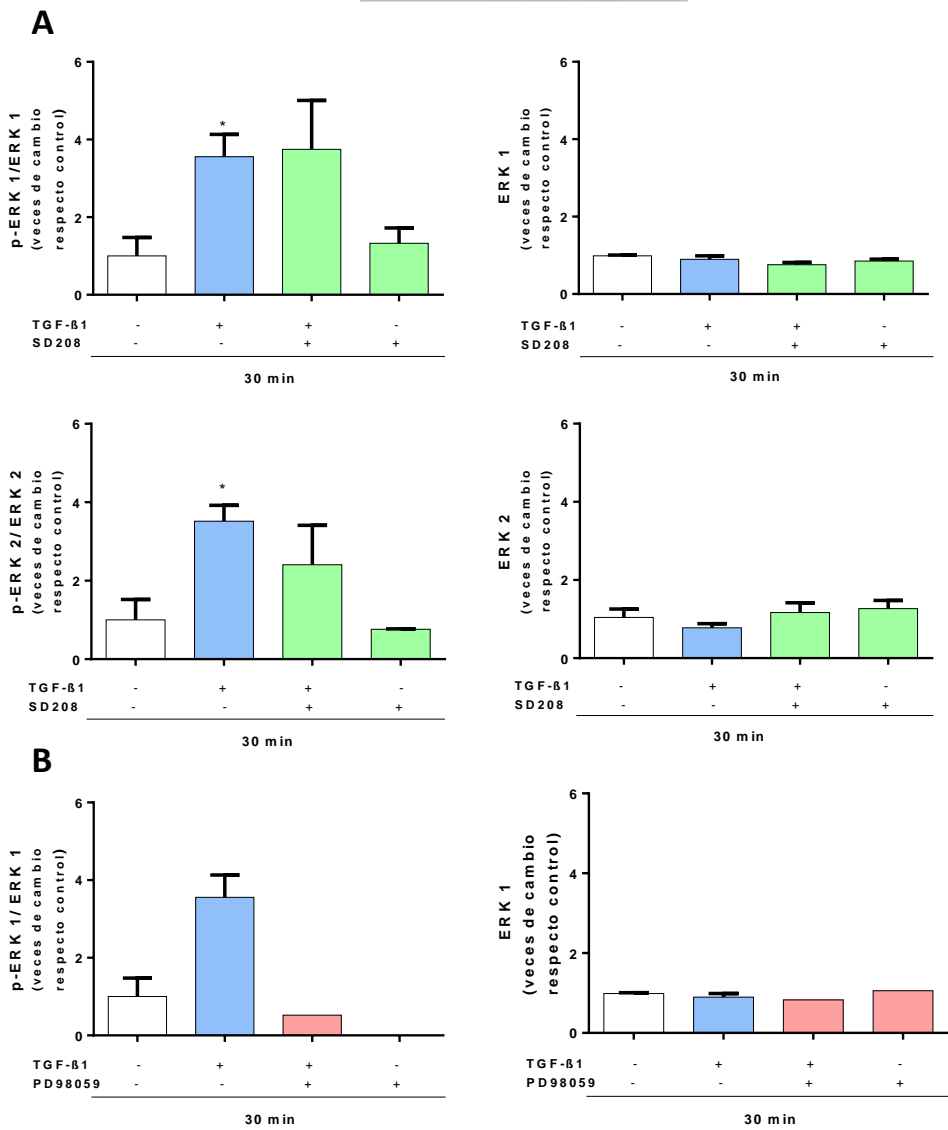
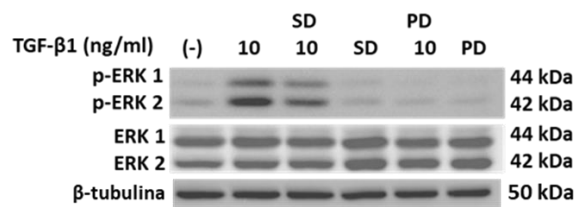


Figura 16. Modelo final propuesto. En esta memoria se propone la regulación negativa de TGF- β 1 sobre CAV1 en fibroblastos cardíacos diferenciados (flecha línea continua amarilla), y que esta regulación es independiente de las vías ERK y Smad (flecha línea gris discontinua) a pesar de que ambas vías están involucradas en la obtención del miofibroblasto (flecha línea gris continua).

ANEXOS

Anexo N°1 TGF-β1 activa la vía ERK independiente de la subunidad TβRII.



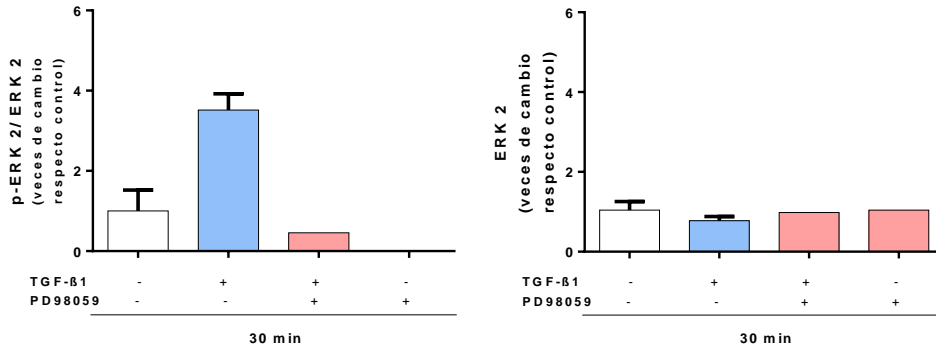
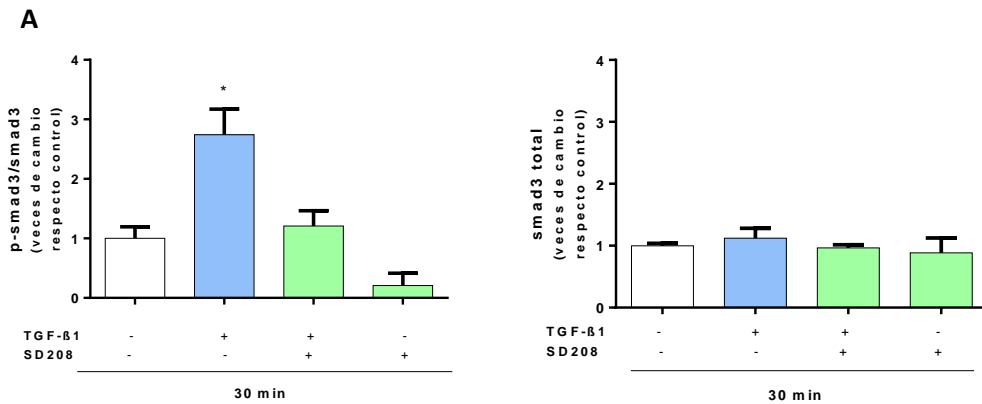
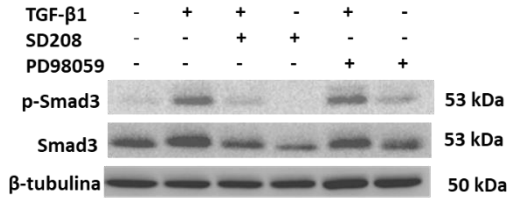


Figura 17. TGF-β1 activa la vía ERK independiente de la subunidad TβRII. FC cardíacos de rata adulta fueron tratados con el inhibidor **A)** SD208 (200 nM) y **B)** PD98059 (10 μM) 30 min previos al tratamiento con TGF-β1 por 30 minutos. Los gráficos muestran la razón de p-ERK1/ERK1 y ERK 1 total y p-ERK2/ERK2 y ERK 2 total para el tratamiento de cada inhibidor. Se muestran los valores con su error estándar medio (SEM) de al menos 4 experimentos independientes (n=1-4), graficados en GraphPrism 6. Se consideró significancia *p<0,05 respecto a la condición sin tratamiento con análisis estadístico ANOVA y post-test Dunnet.

Anexo N°2. TGF-β1 activa la vía canónica Smad en fibroblastos cardíacos de rata adulta.



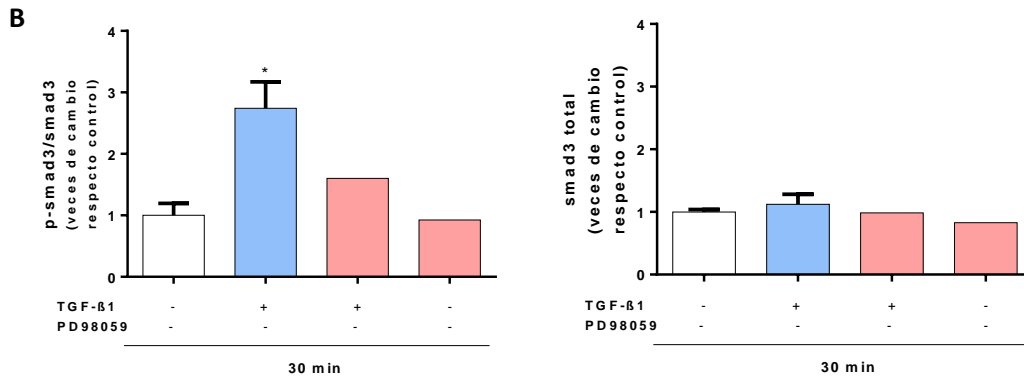


Figura 18. TGF-β1 activa la vía canónica Smad en fibroblastos cardíacos de rata adulta. FC cardíacos de rata adulta se trataron con **A**) SD208 (200 nM) y **B**) PD98059 (10 uM) 30 min previos al tratamiento con TGF-β1 (10 ng/mL) por 30 minutos. Los gráficos muestran la razón de p-Smad3/Smad3 y Smad3/β-tubulina. Se muestran los valores con su error estándar medio (SEM) de al menos 3 experimentos independientes (n=1-3), graficados en GraphPrism 6. Se consideró significancia *p<0,05 respecto a la condición sin tratamiento con análisis estadístico ANOVA de una vía con post-test Dunnet.

Anexo N°3. TGF-β1 disminuye caveolina-1 a las 96 hrs de diferenciación de FCs.

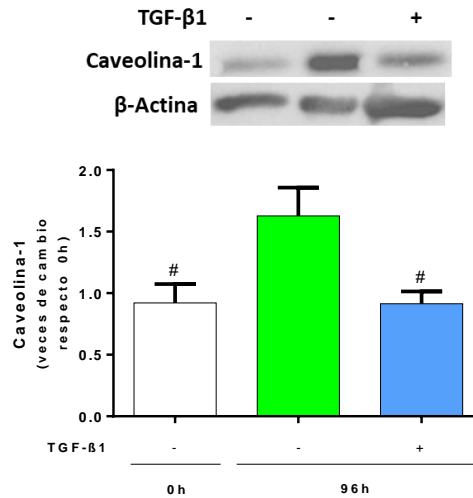


Figura 19. TGF-β1 disminuye caveolina-1 a las 96 hrs de diferenciación de FCs. FCs de rata adulta se trataron con TGF-β1 (10 ng/mL) por 96 h. El gráfico muestra los niveles de Caveolina-1. Se muestran los valores con su error estándar medio (SEM) de al menos 3 experimentos independientes (n=3), graficados en GraphPrism 6. Se consideró significancia #p<0,05 respecto a la condición TGF-β1 10 ng/mL, con análisis estadístico ANOVA de una vía con post-test Dunnet.

Anexo N°4. Caveolina-1 disminuye vía independiente de ERK en FCs diferenciados de neonato

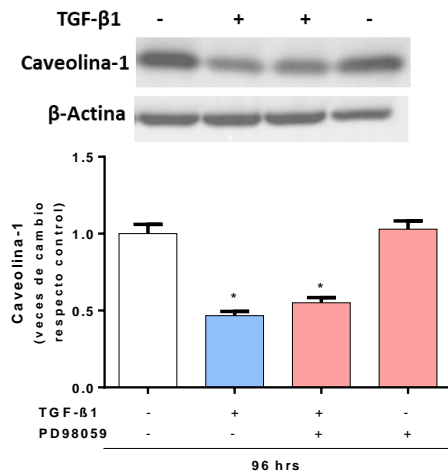


Figura 20. Caveolina-1 disminuye vía independiente ERK de TGF-β1 en diferenciación de FCs neonato. FC cardíacos de neonato se trataron con PD98059 (10 uM) 30 min previos al tratamiento con TGF-β1 (10 ng/mL) por 96 h. El gráfico muestra los niveles de Caveolina-1. Se muestran los valores con su error estándar medio (SEM) de al menos 3 experimentos independientes (n=3), graficados en GraphPrism 6. Se consideró significancia *p<0,05 respecto al control 0h y #p<0,05 respecto a la condición TGF-β1 10 ng/mL, con análisis estadístico ANOVA de una vía con post-test Dunnet

REFERENCIAS

- Bella J. & Hulmes D. (2017) **Fibrillar Collagens**. Parry D. & Squire J. (Eds.) **Fibrous proteins: structures and mechanisms** (pp. 457 – 490). doi: 10.1007/978-3-319-49674-0.
- Bhogal R. & Bona C. (2008) **Regulatory effect of extracellular signal-regulated kinases (ERK) on type I collagen synthesis in human dermal fibroblasts stimulated by IL-4 and IL-13**. *International Reviews of Immunology*, 27(6): 472 – 496.
- Biernacka A., Dobaczewski M., & Frangogiannis N. (2011) **TGF- β signaling in fibrosis**. *Growth factor* 29(5): 196-202.
- Budi E., Duan D. & Derynck R. (2017) **Transforming growth factor β receptors and smads: regulatory complexity and functional versatility**. *Trends in Cell Biology*, Cell Press, 27(9): 658 - 672.
- Busija A., Patel H., & Insel P. (2017) **Caveolins and cavins in the trafficking, maturation and degradation of caveolae: implications for cell physiology**. *Cell Physiology*, American Physiological Society 312: C459 – C477.
- Chen W., & Frangogiannis N. (2013) **Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair**. *Biochimica et Biophysica Acta*, Science 1833(4): 945 – 953.

Cho N., Razipour S., & McCain M. (2018) **TGF- β 1 dominates extracellular matrix rigidity for inducing differentiation of human cardiac fibroblasts to myofibroblasts.** Society Experimental Biology and Medicine 0: 1-12.

Cohn, J. N., Ferrari, R. & Sharpe, N. (2000) **Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling.** Journal of American College of Cardiology. 35(3): 569–582.

Cowling R., Kupsy D., Kahn A., Daniels L. & Greenberg B. (2019) **Mechanisms of cardiac collagen deposition in experimental models and human disease.** Translational research, 209:138 – 155.

Diaz-Araya G., Borg T., Lavandero S., Loftis M. & Carver W. (2003) **IGF-1 Modulation of rat cardiac fibroblasts behavior and gene expression is age-dependent.** Cell Communication & Adhesion, 10(3): 155 – 165.

Dobaczewski M., Chen W. & Frangogiannis N. (2011) **Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling.** Journal of Molecular and Cellular Cardiology, Science 51: 600 – 606.

Dobaczewski M., Bujak M., Li N., Gonzalez-Quesada C., Mendoza L., Wang Xiao-Fan & Frangogiannis N. (2010) **Smad3 signalling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction.** Circulation research 10(3): 418 – 428.

Engelman J., Zhang X., Razani B., Pestell R. & Lisanti M. (1999) **p42/44 MAP kinase-dependent and -independent signaling pathways regulate caveolin-1 gene expression.** The Journal of Biological Chemistry, 274(45): 32333 – 32341.

Fengfeng L., Zeng B., Chai Y., Cai P., Fan C. & Cheng T. (2009) **The linker region of Smad2 mediated TGF- β -dependent ERK2-induced collagen synthesis.** Biochemical and Biophysical Research Communications, Science, 386(2):289 – 293.

Frantz S., Hu K., Adamek A., Wolf J., Sallam A., Maier S., Lonning S., Ling H., Ertl G and Bauersachs J. (2008) **Transforming growth factor beta inhibition increases mortality and left ventricular dilation after myocardial infarction.** Basic research in cardiology, 103(105): 485 – 492.

Forrester S., Elliot K., Kawai T., Obama T., Boyer M., Preston K., Yan Z., Eguchi S. & Rizzo V. (2016) **Caveolin-1 deletion prevents hypertensive vascular remodeling induced by Angiotensin II.** Hypertension 69(1): 79 – 86.

Galbiati F., Voloté D., Engelman J., Watanabe G., Burk R., Pestell R., & Lisanti M. (1998) **Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade.** The European Molecular Biology Organization Journal 17(22): 6633 – 6648.

Galie P., Westfall M. & Stegemann J. (2011) **Reduced serum content and increased matrix stiffness promote the cardiac myofibroblast transition in 3D collagen matrices.** Cardiovascular Pathology 20(6): 325 – 33.

Gao Y., Chu M., Hong J., Shang J & Xu Di (2014) **Hipoxia induces cardiac fibroblast proliferation and phenotypic switch: a role for caveolae and caveolin-1/PTEN mediated pathway.** Journal of Thoracic Disease 6(10): 1458 – 1468.

Ghosh A., Yuan W., Mori Y. & Verga J. (2000) **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, 19(31): 3546 – 3555.

Grande García A., & Del Pozo M. (2008) **Caveolin-1 in cell polarization and directional migration.** The Journal of Cell Biology, Science 87: 641 – 647.

Grande-García A., Echarri A., De Rooij J., Alderson N., Waterman-Storer C., Valdivielso J., & Del Pozo M. (2007) **Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases.** The Journal of Cell Biology, Science 177(4) 683 – 694.

Guglielmo G., Le Roy C., Goodfellow A., & Wrana J. (2003) **Distinct endocytic pathways regulate TGF-β receptor signaling and turnover.** Nature Cell Biology 5(7): 410-680.

Gvaramia D., Blaauboer M., Hanemaaijer R., & Everts V. (2013) **Role of Caveolin-1 in fibrotic diseases.** Matrix Biology, Science 32: 307 – 315.

Horbelt D., Denkis A. & Knaus P. (2011) **A portrait of Transforming Growth Factor β superfamily signalling: background matters.** The international journal of biochemistry & cell biology, Science, 44(3): 469 – 474.

Hocevar B., Brown T. & Howe P. (1999) **TGF-β induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal- kinase dependent, Smad4-independent pathway.** The EMBO journal, 18(5): 1345 – 1356.

Hookana E., Junttila J., Kaikkonen K., Porvari K., Kaija H., Risteli J., Kortelainen M. & Huikuri H. (2014) **Increased type I collagen synthesis in victims of sudden cardiac death due to idiopathic myocardial fibrosis.** Annals of Medicine, 46(5): 318 – 323.

Hu J., Wang X., Wei S., Zhou Q. & Huang C. (2016) **Activin A stimulates the proliferation and differentiation of cardiac fibroblasts via the ERK 1/2 and p38-MAPK pathways.** Science, Pharmacology 789: 319 – 327.

Khalil H., Knisicak O., Prasad V., Correll R., Fu X., Schips T., Vagnozzi R., Liu R., Huynh T., Lee S., Karch J. & Molkenstein J. (2017) **Fibroblasts-specific TGF-β-Smad2/3 signalling underlies cardiac fibrosis.** The Journal of Clinical Investigation, 127(10): 3770 – 3783.

Klingberg F., Chau G., Walraven M., Boo S., Koehler A., Chow M., Olsen A., Im M., Lodyga M., Wells R., White E & Hinz B. (2018) **The fibronectin ED-A domain enhances recruitment of latent TGF- β-binding protein-1 to the fibroblast matrix.** Journal of cell science, 131(5): jcs201293.

Kohan M., Muro A., White E. & Berkman N. (2010) **EDA-containing cellular fibronectin induces fibroblast differentiation through binding to $\alpha 4\beta 7$ integrin receptor and MAPK/ERK 1/2-dependent signaling.** FASEB Journal, 24(11): 4503 – 4512.

Kong P., Christia P., & Frangogiannis N. (2014) **The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis.** Cell Molecular Life, Science 71(4): 549 – 574.

Kwak Hyo-Bum (2013) **Aging, excersice, and extracellular matrix in the heart.** Journal of Exercise rehabilitation, 9(3): 338 – 347.

Lee E., Lee Y., Han I. & Park S. (2007) **Expression of Caveolin-1 reduces cellular responses to TGF- β 1 trough down-regulation the expression of TGF- β type II receptor gene in NIH3T3 fibroblast cells.** Science, 359(2): 385 – 390.

Liu G., Ma C., Yang H. & Zhang P. (2017) **Transforming growth factor β and its role in heart disease.** Experimental and Therapeutic Medicine 13: 2123-2128.

Massagué J. (1998) **TGF- β signal transduction.** Annual Review of Biochemistry, 67: 753 – 791.

Ministerio de Salud (MINSAL) (2017) **Mes del Corazón 2017** [Online] Disponible en: <http://www.minsal.cl/mes-del-corazon-2017/> [Acceso: 17 de Abril 2018]

Miyasato S., Loeffler J., Shohet R., Zhang J., Lindsey M., Jourdan Le Saux C. (2011) **Caveolin-1 modulates TGF- β 1 signalling in cardiac remodeling.** Matrix Biology, Science 30(0): 318 – 329.

Murata T., Lin M., Huang Y., Yu J., Bauer P., Giordano F., & Sessa W. (2007). **Reexpresion of caveolin-1 in endothelium rescues the vascular, cardiac, and pulmonary defects in global caveolin-1 knockout mice.** The journal of experimental medicine 204(10) 2373 – 2382.

Murtha L., Schuliga M., Mabotuwana N., Hardy S., Waters D., Burgess J., Knight D. & Boyle A. (2017) **The processes and mechanisms of cardiac and pulmonary fibrosis.** (2017) Frontiers, 8: 777.

Nielsen S., Mouton A., DeLeon-Pennell K., Genovese F., Karsdal M. & Lindsey M. (2019) **Understanding cardiac extracellular matrix remodeling to develop biomarkers of myocardial infarction outcomes.** Matrix Biology, Science, 75 – 76: 43 – 57.

Ohnuma-Koyama A., Yoshidaa T., Tajima-Horiuchia H., Takahashia N., Yamaguchib S., Ohtsukab R., Takeuchi-Kashimotoa Y., Kuwaharaa M, Takedab M, Nakashimaa N. & Haradac T. (2013) **Didecyldimethylammonium chloride induces pulmonary fibrosis in association with TGF- β signalling mice.** Experimental and Toxicologic Pathology, Science, 65(7-8):1003-1009.

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2017) **Cardiovascular Diseases.(CVDs)** [Online] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/> [Acceso: 17 Apr. 2018].

Parat M. & Stachowicz R. (2002) **Oxidative stress inhibits caveolin-1 palmitoylation and trafficking in endothelial cells.** Biochemical Journal 361(3): 681 – 688.

Parat M. (2009). **Chapter 4 The Biology of Caveolae. Achievements and Perspectives.** International review of Cell and Molecular Biology 273:117-62.

Petrov V., Fagard R. & Lijnen P. (2001) **Stimulation of collagen production by transforming growth factor- β 1 during differentiation of cardiac fibroblast to myofibroblast.** Hypertension 39(2): 258 – 63.

Pleasant-Jenkins D., Reese C., Chinnakkannu P., Kasiganesan H., Tourkina E., Hoffman S and Kuppuswamy D. (2017) **Reversal of maladaptive fibrosis and compromised ventricular function in the pressure overloaded heart by a caveolin-1 surrogate peptide.** Nature, laboratory investigation 97: 370 – 382.

Razani B., Zhang X., Bitzer M., Von Gersdorff G., Bottinger E., & Lisanti M. (2001) **Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF- β /SMADS) signaling through an interaction with the TGF- β type I receptor.** The journal of Biological Chemistry 276(9): 6727 – 6738.

Sanders Y., Cui Z., Jourdan Le Saux C., Horowitz J., Rangarajan S., Kurundkar A., Antony V., & Thannickal V. (2015) **SMAD independent down-regulation of Caveolin-1 by TGF- β : Effects on proliferation and survival of myofibroblasts.** PLOS one 10(2): e0116995.

Schilling J., Rorh D. & Patel H. (2015) **Caveolins in cardioprotection – translatability and mechanisms.** British Journal of Pharmacology 172(8): 2114 – 2125.

Schroer A. & Merryman D. (2015) **Mechanobiology of myofibroblasts adhesion in fibrotic cardiac disease.** Cell Biology and disease, Journal of Cell Science 00: 1-11.

Shi F., Haman J., Fujiwara K., & Sottile J. (2010) **Collagen I matrix turnover is regulated by fibronectin polymerization.** Cell Physiology, American Physiological Society 298: C1265 – C1275

Shihata W., Putra M., & Chin-Dusting J. (2017) **Is there a potential Therapeutic Role for Caveolin-1 in Fibrosis?** Frontiers in Pharmacology 8:567.

Sottile J. and Chandler J. (2005) **Fibronectin matrix turnover occurs through a caveolin-1 dependent process.** Molecular Biology of the Cell 16:757-768.

Rui H., Root K., Lee J., Glover K & Im W. (2014) **Probing the U-shaped conformation of caveolin-1 in a bilayer.** Biophysical Journal 106(6): 1371 – 1380.

Tao X., Fan J., Kao G., Zhang X., Su L., Yin Y. & Zrenner B. (2014) **Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced signaling associated with activation of a tyrosine phosphatase in Sprague-Dawley rats cardiac fibroblasts.** Biology of the cell, 106(6):182 – 192.

Thygesen K., Alpert J., Jaffe A., Simoons M., Chaitman B. & White H. (2012) **Third Universal Definition of Myocardial Infarction.** Journal of the American College of Cardiology 60(16): 1581 – 1598.

Umbarkar P., Singh A., Gupte M., Verma V., Galindo C., Guo Y., Zhang Q., McNamara J., Force T and Lal H. (2019) **Cardiomyocyte SMAD4-dependent TGF- β signaling is essential to maintain adult heart homeostasis**, *Journal of American College of Cardiology*, 4(1): 41-53.

Ungefroren H., Gieseler F., Kaufmann R., Settmacher U., Lehnert H. & Rauch B. (2018) **Signalling crosstalk of TGF- β /ALK5 and PAR2/PAR1 a complex regulatory network controlling fibrosis and cancer**. *International journal of molecular sciences*, 19(6): E1568.

Uhl M, Aulwurm S, Wischhusen J, Weiler M, Ma J, Almirez R, Mangadu R, Liu Y, Platten M, Herrlinger U, Murphy A, Wong D, Wick W, Higgins L & Weller M. (2004) **SD-208, a novel transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor, inhibits growth and invasiveness and enhances immunogenicity of murine and human glioma cells in vitro and in vivo**. *Cancer research* 64(21): 7954 – 7961.

Wang L., Yang X., Wang X., Li S., Sun N. & Zhang T. (2015) **Erythropoietin decreases the occurrence of myocardial fibrosis by inhibiting the NADPH-ERK-NF- κ B pathway**. *Cardiology* 133(2): 97 – 108.

White E., Baralle F. & Muro A. (2008) **New insights into form and function of fibronectin splice variants**. *The Journal of Pathology*, 216(1): 1 – 14.

Wu M. and Hill C. (2009) **TGF- β 1 superfamily signaling in embryonic development and homeostasis**. *Developmental Cell* 16(3):329-43.

Yao G., Chu M., Hong J., Shang J. & Xu D. (2014) **Hypoxia induces cardiac fibroblasts proliferation and phenotypic switch: a role for caveolae and caveolin-1/PTEN mediated pathway**. *Journal of Thoracic Disease*, 6(10): 1458 – 1468.

Yi S., Liu X., Zhong J. and Zhang Y. (2014) **Role of caveolin-1 in atrial fibrillation as an anti-fibrotic signaling molecule in human atrial fibroblasts**. *Plos One*, 9(1): 1 – 8.

Yin H., Liu T., & Zhang Y. (2016) **Caveolin proteins: a molecular insight into disease**. *Frontiers of Medicine* 10(4): 397 – 404.

Zent J. and Guo L. (2018) **Signaling mechanism of myofibroblastic activation: Outside-in and Inside Out**. *Cellular Physiology and Biochemistry* 49(3): 848 – 868.

Zhang G., He B., Liao T., Luan Q., Tao C., Nie C., Albers A. & Xie X. (2011) **Caveolin-1 inhibits transforming growth factor β 1 activity via inhibition of Smad signaling by hypertrophic scar derived fibroblasts in vitro**. *Journal of Dermatological Science* 62(2): 128 – 131.