



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica.

El Ácido 4-Fenilbutírico previene del estrés de retículo causado por  
Tapsigargina sobre fibroblastos cardiacos neonatos de rata.

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

Directores: Dr. Guillermo Díaz Araya

Dr. Sergio Lavandero

Patrocinante: Dr. Guillermo Díaz Araya

José Joaquín Montenegro Obregón

2009

## Resumen

### **El Ácido 4-Fenilbutírico previene del estrés de retículo causado por Tapsigargina sobre fibroblastos cardiacos neonatos de rata.**

Los fibroblastos cardiacos son células que componen alrededor del 70% del total de células del corazón. Estas células son responsables de la mantención de la matriz extracelular del corazón dando soporte mecánico a los cardiomiocitos. Cuando el corazón es dañado, se inicia un proceso de remodelamiento del tejido cardiaco que puede progresar a una insuficiencia cardiaca. Uno de los factores importantes del remodelamiento es la secreción de colágeno a cargo de los fibroblastos.

En el proceso de secreción de proteínas, una vez sintetizadas éstas, deben ser plegadas al interior del retículo endoplásmico (ER). Cuando aumenta la demanda de proteínas que se deben plegar, el ER entra en un estrés que gatilla una respuesta que se llama Respuesta a Proteínas Mal Plegadas (UPR). Si esta respuesta no es capaz de devolver la homeostasis a la célula, se ejecuta un proceso de apoptosis.

En este estudio se determinó que el fármaco Tapsigargina es capaz de disminuir la viabilidad de cultivos de fibroblastos cardiacos de manera concentración y tiempo – dependiente a una concentración de 10 nM, además induce proteínas que son parte de la vía UPR como BiP, eIF2 $\alpha$ , PDI, ATF4 y CHOP ésta última está muy ligada a los procesos de muerte en las células. En la literatura se ha reportado que el ácido 4-fenilbutirico (4-PBA) se comporta como una chaperona química. Demostramos que al preincubar los cultivos con 4-PBA los efectos antes mostrados por Tapsigargina quedan anulados.

También se estudió la implicancia de la UPR provocada por Tapsigargina sobre la secreción de colágeno soluble y también se vieron los efectos del 4-PBA sobre la secreción de colágeno soluble los cultivos, demostrándose la capacidad del 4-PBA de modular la secreción de colágeno.

## Summary

### **The 4-Phenylbutyric acid prevents endoplasmic reticulum stress induced by thapsigargin into cardiac fibroblasts of neonatal rats**

Cardiac fibroblasts are about of 70% of heart total number of cells. These cells are responsible for heart extracellular matrix maintenance and cardiac cells mechanical support. When a heart injury takes place, heart tissue remodeling process begins, and that process can lead to heart failure. One of the relevant factors in heart remodeling is the fibroblast collagen secretion.

On the proteins secretory pathway, proteins must be folded inside endoplasmic reticulum (ER). Whenever that proteins to be folded demands raises, ER gets into a stressed state that leads to an unfolded protein response (UPR). If this response cannot recover homeostasis of ER, cells execute apoptosis.

In this report, we demonstrate that a drug called Thapsigargin can decrease viability of cultured cardiac fibroblasts in concentration and time – dependent way at 10nM, also induce UPR pathway proteins such as BiP, eIF2 $\alpha$ , PDI, ATF4 and CHOP, the former one is very related to death process in cells. On literature Sodium 4-phenybutyrate (4-PBA) has been reported to behave like a chemical chaperone. We demonstrate that a pretreatment with 4-PBA cell cultures anulates Thapsigargin effects.

We also study the implications of Thapsigargin – induced UPR over collagen secretion and we documented 4-PBA effects over collagen secretion showing 4-PBA secretion – modulating effects.

## INDICE GENERAL

	<b>Página</b>
Portada.....	1
Resumen.....	2
Summary.....	3
Índice general.....	4
Índice de figuras.....	7
Abreviaturas.....	8
1. Introducción.....	10
1.1 Generalidades.....	10
1.2 Fibroblastos cardiacos.....	10
1.3 Retículo endoplásmico y secreción de proteínas.....	11
1.4 Chaperonas residentes del retículo endoplásmico y enzimas plegadoras.....	11
1.5 Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, del inglés Unfolded Protein response).....	13
1.5.1 Vía Ire1.....	13
1.5.2 Vía ATF6.....	14
1.5.3 Vía PERK.....	15
1.6 Apoptosis mediada por respuesta a proteínas mal plegadas.....	15
1.7 CHOP.....	16
1.8 Chaperonas químicas.....	17
1.9 Secreción de colágeno por fibroblastos cardiacos.....	17
1.10 Estrés de retículo endoplásmico en corazón.....	18
2. Hipótesis.....	20
3. Objetivo general.....	20
4. Objetivos específicos.....	20
5. Materiales y métodos.....	21
5.1 Reactivos.....	21
5.2 Modelo animal.....	21
5.3 Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardiacos ventriculares de	

ratas neonatas.....	21
5.4 Preparación de solución de tapsigargina.....	22
5.5 Preparación de extractos celulares totales.....	22
5.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	23
5.7 Electrotransferencia de proteínas.....	23
5.8 Inmunowestern – blot.....	23
5.9 Viabilidad celular por conteo de células.....	24
5.10 Determinación de colágeno soluble.....	25
5.11 Análisis estadístico.....	25
6. Resultados.....	26
6.1 Efectos de tapsigargina sobre la viabilidad celular de fibroblastos cardiacos neonatos.....	26
6.1.1 Efecto de la concentración de tapsigargina sobre la viabilidad de fibroblastos cardiacos neonatos.....	26
6.1.2 Efecto de tapsigargina 10 nM en función del tiempo sobre la viabilidad de fibroblastos cardiacos neonatos.....	26
6.1.3 Efecto del tratamiento con ácido 4-fenilbutírico sobre los efectos de tapsigargina.....	28
6.2 Efecto de tapsigargina sobre proteínas de la respuesta a proteínas mal plegadas.....	29
6.2.1 Efecto de tapsigargina y ácido 4-fenilbutírico sobre la expresión de BiP.....	29
6.2.2 Efecto de tapsigargina y ácido 4-fenilbutírico sobre P-eIF2 $\alpha$ .....	32
6.2.3 Efecto de tapsigargin y ácido 4-fenilbutírico sobre la expresión de PDI.....	34

6.2.4 Efecto de tapsigargina y ácido 4-fenilbutírico sobre la expresión de ATF4.....	36
6.2.5 Efecto de tapsigargina y de ácido 4-fenilbutírico sobre la expresión de CHOP.....	38
6.3 Efecto de tapsigargina y de ácido 4-fenilbutírico sobre la secreción de colágeno en fibroblastos cardiacos.....	40
7. Discusión.....	41
7.1 Efecto de tapsigargina sobre la viabilidad celular.....	41
7.2 Tapsigargina induce estrés de retículo en fibroblastos cardiacos neonatos.....	42
7.3 Efecto del ácido 4-fenilbutírico sobre la viabilidad celular.....	44
7.4 Efecto del ácido 4-fenilbutírico sobre la expresión de proteínas de estrés de retículo endoplasmático.....	45
7.5 Efecto de tapsigargina sobre la secreción de colágeno.....	47
7.5 Efecto de ácido 4-fenilbutírico sobre la expresión de colágeno.....	47
8. Conclusiones.....	49
Referencias.....	50

## Índice de Figuras.

<u>Figura 1.</u> Esquema de las vías de la UPR.....	16
<u>Figura 2.</u> Estructura molecular de la tapsigargina.....	19
<u>Figura 3.</u> Estructura molecular del ácido 4-fenilbutírico.....	19
<u>Figura 4.</u> Efecto de tapsigargina sobre la viabilidad de fibroblastos cardiacos.....	27
<u>Figura 5.</u> Efecto de tapsigargina 10 nM sobre la viabilidad de fibroblastos cardiacos en el tiempo.....	28
<u>Figura 6.</u> Efecto del 4-PBA sobre la disminución de la viabilidad inducida por tapsigargina.....	29
<u>Figura 7.</u> Caracterización de la expresión de BiP en distintas condiciones.....	31
<u>Figura 8.</u> Efecto de tapsigargina y ácido 4-fenilbutírico sobre la expresión de P-eIF2 $\alpha$ .....	33
<u>Figura 9.</u> Efecto de tapsigargina y 4-PBA sobre la expresión de PDI.....	35
<u>Figura 10.</u> Efecto de tapsigargina y 4-PBA sobre la expresión de ATF4.....	37
<u>Figura 11.</u> Efecto de tapsigargina y 4-PBA sobre la expresión de CHOP.....	39
<u>Figura 12.</u> Efecto de tapsigargina y 4-PBA sobre la secreción de colágeno de fibroblastos cardiacos.....	40

## **ABREVIATURAS.**

**ATF4:** Factor activante de la transcripción 4, del inglés *Activating Transcription Factor 4*.

**ATF6:** Factor activante de la transcripción 6, del inglés *Activating Transcription Factor 6*.

**BiP:** Proteína inmunoglobulina de cadena pesada de unión, del inglés *Binding Protein*.

**CHOP:** Factor de transcripción homólogo a C/EBP, del inglés *CAAT/enhancer binding protein*

**dsRNA:** Acido Ribonucleico (ARN) de doble hebra, del inglés *double stranded ribonucleic acid*.

**ECV:** Evento Cardiovascular.

**ER:** Retículo endoplásmico, de sus sigla en inglés *Endoplasmic Reticulum*.

**ERAD:** Degradación asociada al Retículo Endoplásmico, del inglés *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*.

**ERSE:** Elemento del estrés de retículo endoplásmico, del inglés *ER stress element*.

**FBS:** Suero fetal bovino, del inglés *Foetal Bovine Serum*.

**Ire1:** Proteína requirente de inositol 1, del inglés *Inositol requiring 1*.

**ISR:** Respuesta a estrés integrada, del inglés *Integrated Stress Response*.

**JNK:** Quinasa N-Terminal de c-Jun

**MEC:** Matriz Extracelular.

**mL:** mililitro

**mUPRE:** Elemento de Respuesta a Proteínas Mal plegadas de mamíferos, de inglés *mammalian Unfolded Protein Response Element*.



**PBS:** Solución tampón de fosfato, del inglés *Phosphate Buffer Solution*.

**PDI:** Proteína Disulfuro-isomerasa, del inglés *Protein disulphide-isomerase*.

**PERK:** Proteína quinasa del retículo endoplasmico, del inglés *Protein kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase*.

**ROS:** Especies reactivas del oxígeno, del inglés *Reactive Oxygen Species*.

**SREBP:** Proteínas que unen elemento regulador de esterol, del inglés *Sterol Regulation Element Binding Protein*.

**UPR:** Respuesta a proteínas mal plegadas, del inglés *Unfolded Protein Response*.

**XBP1:** Proteína de unión 1 caja X, del inglés *X-box Binding Protein 1*.

**µg:** Microgramo.

**µL:** microlitro.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Generalidades.**

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la primera causa de muerte a nivel global. Se estima que 17,5 millones de personas murieron a causa de enfermedades cardiovasculares en el año 2005, lo que representa el 30% del total de muertes. Tanto en Chile como en el resto del mundo, la mortalidad debido a patologías cardiovasculares corresponde aproximadamente al 30% del total de los decesos.

Las principales causas de las ECV son bien conocidas y están bien definidas. Las causas más importantes de cardiopatía son los llamados “factores de riesgo modificables”: dieta poco sana, sedentarismo y consumo de tabaco. También hay una serie de determinantes subyacentes de las enfermedades crónicas, que son un reflejo de las principales fuerzas que rigen los cambios sociales, económicos y culturales: la globalización, la urbanización y el envejecimiento de la población <sup>1</sup>. Esto lleva a poner énfasis en la investigación para aumentar la sobrevivencia de las personas que sufren ECVs.

### **1.2 Fibroblastos cardiacos**

Desde el punto de vista celular, el corazón está compuesto principalmente por cardiomiocitos y células no musculares, siendo la mayoría de ellas fibroblastos los que constituyen dos tercios de la población celular del corazón <sup>2</sup>. El fibroblasto cardiaco es reconocido como un tipo celular no sólo responsable de la mantención homeostática de las proteínas de la matriz extracelular (MEC) en el corazón normal, sino que también secreta una gran variedad de factores de crecimiento y citoquinas las que tienen acción paracrina y autocrina. Aun así, la función secretora de proteínas de la MEC una de sus principales tareas<sup>3</sup>, por lo tanto, el fibroblasto cardiaco participa activamente en el desarrollo de enfermedades que afectan directamente al corazón, especialmente debido a la excesiva secreción y depósito de proteínas de la MEC lo que conduce a fibrosis cardiaca.

### **1.3 Retículo endoplásmico y secreción de proteínas**

El Retículo Endoplásmico (ER, por sus siglas en inglés) es el primer compartimento en la “vía secretora”. Es la cuna de todas las proteínas que llegan a ser secretadas y aquellas que residen en cualquier compartimento de las vías endocíticas o exocíticas. Tras la síntesis, entran al lumen del ER a través de un poro translocon<sup>4</sup>. Dentro del ER, estas proteínas se pliegan y oligomerizan con ayuda de chaperonas residentes y enzimas plegadoras<sup>5</sup>.

### **1.4 Chaperonas residentes del retículo endoplásmico y enzimas plegadoras**

Las chaperonas del ER y las enzimas plegadoras dejan de interactuar con las proteínas que se están plegando, una vez que éstas están completamente plegadas y oligomerizadas. Hecho esto, las proteínas maduras salen del retículo endoplásmico y se dirigen a su destino final, dentro o fuera de la célula. Por otro lado, la asociación de los factores de plegamiento residentes en el ER, con las proteínas mal plegadas o incompletamente plegadas, inherentemente lleva a su retención. Este proceso de selección basado en el estado de plegamiento es llamado Control de Calidad del ER<sup>10</sup>.

Algunas de las proteínas chaperonas residentes del ER más abundantes, fueron originalmente identificadas como proteínas reguladas por glucosa (GRPs): BiP (GRP78), GRP94, GRP170. Bajos niveles de glucosa llevan a poca glicosilación de proteínas que se deben plegar al interior del ER, esto conlleva un mal plegamiento.

Dentro del retículo se encuentran proteínas chaperonas de la familia de las HSP70 en especial BiP. BiP ha demostrado estar asociada a proteínas que no están completamente plegadas<sup>6</sup> como el colágeno en etapa de maduración. También ha demostrado ser parte del mecanismo sensor de la vía de respuesta a proteínas mal plegadas (del inglés Unfolded protein Response: UPR), asociándose con sensores de estrés de retículo que se encuentran en la membrana del ER como Ire1 y PERK<sup>6</sup>. Por lo mismo BiP está considerada como un marcador temprano que da cuenta del estrés del ER.

Otro elemento distintivo en el plegamiento de proteínas en el ER es la formación de puentes disulfuro. El plegamiento oxidativo es facilitado por la enzima plegadora

específica del retículo llamada proteína disulfuro isomerasa (PDI)<sup>7</sup>. PDI oxidada actúa como aceptor de electrones para los grupos sulfidrilos libres, por lo que, es un donador de disulfuro para las proteínas que se están plegando en el ER. En este proceso PDI es reducida<sup>8</sup>. PDI reducida a su vez, cataliza la isomerización de los puentes disulfuro. Los puentes disulfuro son separados a favor de la formación de puentes disulfuro nativos<sup>8</sup>. Para sostener el flujo neto en las proteínas que son secretadas, sin embargo, PDI debe ser oxidada otra vez. Este proceso está a cargo de la proteína Ero1. Como aceptor terminal de electrones, Ero1, usa oxígeno molecular vía FAD<sup>9</sup>.

Algunas moléculas dentro del ER nunca llegan a la madurez, porque se pliegan mal más allá de que puedan ser rescatadas. Las fallas de plegamiento en el lumen del ER son reconocidas por la lectina EDEM<sup>11</sup>. A través de poros translocones, las proteínas mal plegadas son enviadas al citosol, donde son ubiquitinadas, seguida de degradación en el proteasoma de manera similar que las proteínas dañinas para la célula<sup>12</sup>. Este proceso es llamado degradación asociada al ER, más conocida como ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation).

La fidelidad del plegamiento debe ser garantizada en el ER por los esfuerzos de la maquinaria del control de calidad y de sistema ERAD en condiciones basales. Para mantener la homeostasis, el ER necesita adaptarse a los cambios en las cargas proteicas para plegar a nivel tanto cuantitativo como cualitativo. Proteínas mal plegadas que se acumulan en el lumen del ER, pueden causar un aumento en las proteínas residentes del ER<sup>13</sup>. Una respuesta similar es provocada por fármacos que obstaculizan el correcto plegamiento de proteínas dentro del ER, como la Tunicamicina que interfiere con la N- glicosilación y la Tapsigargina que depleta de calcio del ER<sup>14,15</sup>.

La Tapsigargina es una lactona sesquiterpénica extraída de *Thapsia garganica*, ejerce una inhibición irreversible sobre las Ca<sup>+2</sup>-ATPasas del retículo Sarco/endoplásmico (SERCA) depletando los iones de calcio contenidos en el ER<sup>71</sup>. Como se puede apreciar en la Figura 2, la compleja estructura de la tapsigargina se investigó primeramente como fármaco antimalárico y se ha caracterizado también por producir estrés de ER<sup>15</sup>.

El intrincado mecanismo de detección y respuesta es conocido colectivamente como Respuesta a Proteínas Mal Plegadas UPR (del inglés Unfolded Protein Response) <sup>16</sup>. Esta respuesta apunta a mejorar la capacidad de plegamiento del ER por un lado y aliviar la carga por medio del ERAD o el bloqueo de la síntesis de proteínas por el otro <sup>16</sup>.

### **1.5 Respuesta a proteínas mal plegadas.**

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que la UPR está increíblemente conservada desde las levaduras hasta el humano. Quizá más interesante es el hecho de que la UPR parece mediar la transformación de células precursoras a células secretoras profesionales, por ejemplo, durante la diferenciación de linfocitos B.

En mamíferos, varias secuencias activantes río arriba transmiten la transcripción inducida por la UPR: El elemento de estrés de ER (ERSE) <sup>17, 18</sup>, una variante del mismo, ERSE II <sup>19</sup>, el UPRE (de Unfolded Protein Response Element) mamífero <sup>18</sup>, entre otros.

La variedad de estos “elementos” entre los blancos de la UPR refleja la variedad de trans-activadores que transduce la UPR. Con todo esto, la variedad de “elementos” y de factores de transcripción involucrados (XBP1, ATF6 y ATF4), reflejan la complejidad de las vías de la UPR, sobre en todo en mamíferos.

¿Cómo es detectado el estrés de ER?, ¿Cómo es traducido en la activación de factores de transcripción específicos de la UPR?

Existe un de tres vías desde el ER al núcleo de la célula que se encargan de sensar y transmitir información acerca del estado de plegamiento de las proteínas al interior del ER. Estas vías son conocidas como: Ire1, PERK y ATF6. Estas vías en conjunto, actúan concertadamente cada vez que el ER se encuentra en un estado de estrés <sup>57</sup>.

#### **1.5.1 Vía Ire1.**

Es una vía de detección y respuesta que está conservada desde las levaduras hasta el humano que es transducida por Ire1 $\alpha$  <sup>20</sup> e Ire1 $\beta$  <sup>21</sup>, la que consiste en un dominio sensor de proteínas mal plegadas en el lumen del ER, conectado vía dominio transmembrana

a un dominio efector en el citosol. Ire1 al formar un dímero se hace una coincidencia perfecta entre ambos constituyentes formando una estructura parecida a una copa alargada que indicaría que las proteínas elongadas por mal plegamiento, se unen directamente a Ire1 al calzar dentro de esta estructura similar a una copa activando así su dominio citoplasmático<sup>22</sup>.

Cuando el dominio sensor es activado, las proteínas de Ire1 se dimerizan y se trans-autofosforilan<sup>20</sup>. Como consecuencia, los dominios efectores del lado citoplasmático de la membrana asumen actividad endonucleasa<sup>23</sup>.

La traducción de XBP1 (abreviación del inglés *x-box binding protein 1*) a su forma activa, es dependiente del corte mediado por Ire1 de su transcritto y de su subsecuente religación<sup>24</sup>. El ortólogo mamífero de la ligasa R1g1p (la ligasa que liga el mRNA de HAC1, equivalente de XBP1 en levaduras) aun está por ser identificado. En el núcleo XBP1 puede activar secuencias objetivos en ERSE o mUPRE.

### **1.5.2 Vía ATF6**

Una vía que es exclusiva de los mamíferos es la vía de ATF6. Similar a Ire1, ATF6 es una proteína que cruza la membrana del ER, tiene un dominio sensor en el lumen y un dominio efector en el citosol<sup>25</sup>. De la misma forma que Ire1, ATF6 es capaz de detectar proteínas mal plegadas en el lumen del ER a través de la liberación de BiP. La disociación de BiP desenmascara unos motivos de exportación en ATF6, los cuales facilitan su transporte al Golgi<sup>25</sup>. Una manera alternativa de detección de stress de ER puede ser la poca glicosilación del dominio luminal de ATF6. Esto lleva a que ATF6 sea un sustrato pobre de las lectinas chaperonas calnexina y/o calreticulina y consecuentemente lleva a un “escape” desde el ER al Golgi<sup>26</sup>.

Una vez que ATF6 ha llegado al Golgi, el dominio efector de ATF6 es cortado por las proteasas del Sitio 1 y Sitio 2<sup>27</sup>. El dominio efector de ATF6 se traslada al núcleo donde aumenta la transcripción de los genes de ERSE<sup>17</sup>.

Por lo visto, las vías de Ire1/XBP1 y ATF6, apuntan a una disminución de la carga acumulada en el ER aumentando su capacidad de plegamiento. Además, la vía

Ire1/XBP1 puede aliviar el stress mejorando la acción del sistema de degradación asociado al ER (ERAD).

### **1.5.3 Vía PERK.**

Otro mecanismo par aliviar la carga del ER es entregado por una tercera vía, la cual es transducida por PERK. PERK, al igual que las vías anteriores, tiene un dominio sensor en el lumen del ER, que podría ser activado por la disociación con BiP<sup>28</sup>. Una vez activado llevaría a su dimerización y trans – autofosforilación. A diferencia de las proteínas de Ire1, PERK tiene dominios citosólicos con actividad quinasa que promueve la fosforilación del factor eucariótico de iniciación 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ )<sup>29</sup>. Debido a que la fosforilación de eIF2 $\alpha$  bloquea la iniciación de la traducción, esta vía de la UPR bloquea la síntesis general de proteínas. En consecuencia a esto, la cantidad de proteínas que demandan por ser plegadas, disminuye abruptamente, aliviando la carga en la maquinaria de plegamiento del ER<sup>29</sup>.

Paradójicamente la fosforilación de eIF2 $\alpha$  mejora la traducción de ATF4<sup>30</sup>. A su vez, ATF4 es un trans – activador de genes objetivo de la UPR<sup>30,31</sup>. A diferencia de ATF6 y de XBP1, ATF4 no reconoce ERSEs. En vez de eso, transactiva los elementos C/EBP – ATF<sup>32</sup> y ATF/CRE<sup>33</sup> en las regiones promotoras de los genes objetivo de la UPR.

Aparte de PERK, varias otras quinasas fosforilan eIF2 $\alpha$  en respuesta a estímulos como altos niveles de metales reactivos, presencia de dsRNA viral o deprivación de aminoácidos. Todas estas condiciones de stress llevan a la activación de la vía ATF4, de hecho, ATF4 media un amplio rango de mecanismos de respuesta, además de la vía “clásica” de la UPR que apunta a la homeostasis de la maquinaria de plegamiento del ER. Debido a que el programa de expresión de genes de ATF4 es central en la mantención de la homeostasis, esta vía es llamada Respuesta al estrés integrada (ISR)<sup>34</sup>. Esto da como resultado una fosforilación de PERK y activación de la ISR<sup>35</sup>.

### **1.6 Apoptosis mediada por la respuesta a proteínas mal plegadas.**

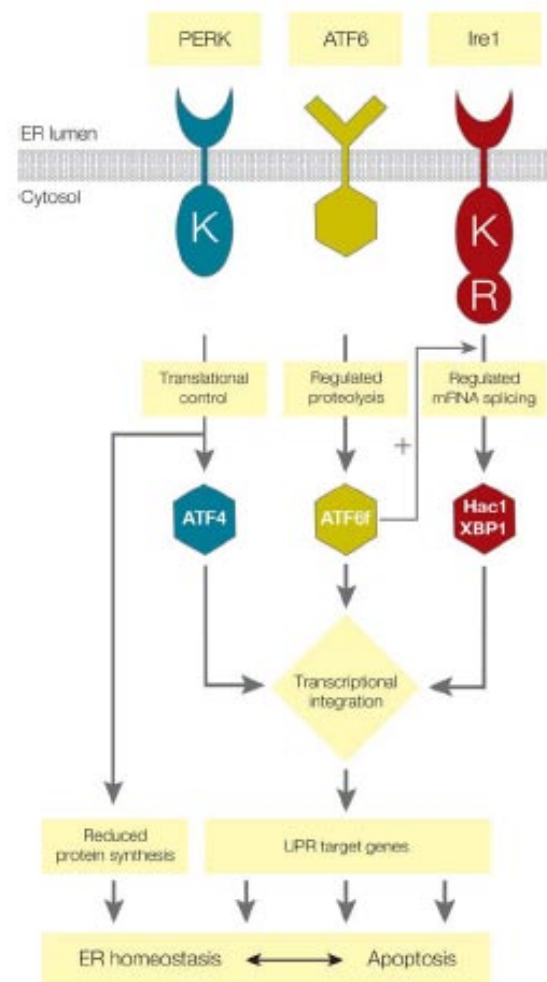
Cuando el estrés de ER persiste y los problemas de plegamiento no pueden ser resueltos, la UPR cambia a una fase en la cual el alivio del retículo parece perder

importancia. Una activación prolongada de PERK media una detención en el ciclo celular, y al final estas células terminarán muriendo<sup>36</sup>.

Los repetitivos pero poco activos intentos por plegar proteínas del ER, involucran creación y destrucción de puentes disulfuro. Como resultado de esto cada ciclo oxidación (o reoxidación) puede ser acompañado por liberación de radicales libres de oxígeno (ROS), mediado por Ero1, al citosol<sup>37</sup>, y se ha demostrado que altas concentraciones de ROS citosólicas llevan a apoptosis.

### 1.7 CHOP

Las tres vías de la UPR activan un efector pro-apoptótico: CHOP. El aumento de CHOP pavimenta el camino para la apoptosis<sup>40</sup>. Ire1 $\alpha$  participa también en una vía pro-apoptótica diferente. Una vez que se ha desencadenado el stress de ER, Ire1 se une a TRAF2, la cual es una molécula adaptadora entre Ire1 y ASK1. A su vez, ASK1 puede activar JNK, que es un factor de transcripción que anuncia la muerte celular<sup>41</sup>. Además, TRAF2 puede acoplar la fosforilación de Ire1 con la activación de caspasa-7 y caspasa-12, las cuales promueven la apoptosis.



**Figura 1. Esquema de la vía de la UPR.** La vía PERK (azul), al activarse, detiene la síntesis de proteínas y aumenta la síntesis de ATF4 que es la vía integrada de transcripción de genes objetivos de la UPR. La vía ATF6 (amarillo), al activarse migra al Golgi donde es cortada por S1P y S2P liberándose el fragmento de ATF6 o ATF6f que promoverá la transcripción de genes objetivo de la UPR. La vía Ire1(rojo) al activarse corta el mRNA de XBP1, lo que da lugar a un cambio en el marco de lectura haciendo que se forme la proteína XBP1s que cooperará en la transcripción de genes de la UPR. [Tomado de Bernales et al, 2006]



A pesar de los datos de interacción de Ire1 con TRAF2 y activar los factores pro apoptóticos, paradójicamente, se ha mostrado que al mantener la vía Ire1/XBP1 activada constantemente, se mejora la supervivencia. Esto sugiere un vínculo entre la duración de la activación de este brazo de la UPR y la supervivencia de las células afectadas<sup>42</sup>.

### **1.8 Chaperonas químicas.**

Las chaperonas químicas son moléculas de bajo Peso Molecular que tienen propiedades que les permiten estabilizar las estructuras de las proteínas que se están plegando, también han demostrado facilitar el transporte de proteínas mutantes. El ácido 4-fenilbutírico es una molécula de bajo peso molecular (PM= 164,2 g/mol), cuya estructura se asemeja a la fenilalanina (Fig. 3). Existen estudios que han demostrado que el ácido 4-Fenilbutírico actúa como chaperona química<sup>43, 44, 71</sup>, actualmente el ácido 4-fenilbutírico es usado sobre pacientes que presentan problemas en el metabolismo de la urea<sup>72</sup>. Las chaperonas químicas ayudan a aminorar los efectos del stress de ER por un mecanismo estabilizador de la conformación nativa de las proteínas que se pliegan al interior del ER<sup>10</sup>. También ha demostrado aumentar el transporte en la vía secretora de la célula. Los estudios reportados en la literatura<sup>58-60</sup>, apoyan la idea de que el 4-PBA afecta la expresión de las proteínas de la vía UPR y que disminuye los efectos observados por el estrés de RE cultivos celulares, lo que nos fundamenta la idea de usarlo sobre los cultivos de fibroblastos cardiacos neonatos.

### **1.9 Secreción de colágeno.**

Los fibroblastos cardiacos son reconocidos principalmente por ser las células responsables de la mantención de la MEC en el corazón. Los fibroblastos están encargados de la secreción de colágeno para mantener la estructura del corazón. Éste colágeno está constituido principalmente por colágeno tipo I (~80%) y colágeno tipo III (~10%)<sup>64</sup>. Las fibrillas de colágeno son sintetizadas al interior de los fibroblastos como un precursor polipéptídico que se secreta al medio donde enzimas en el medio se encargan de cortar y entrecruzar las fibrillas. La secreción de colágeno está regulada por TGB- $\beta$  y por la enzima prolil -4 – hidroxilasa y se considera que este proceso está muy ligado al remodelamiento cardiaco y el fenómeno de fibrosis.<sup>73</sup>

### **1.10 Estrés de retículo endoplásmico en corazón.**

El corazón está constantemente bajo estrés mecánico, metabólico y térmico, aún en condiciones fisiológicas basales, y el estrés cardiaco puede aumentar a consecuencia de agentes dañinos externos o patológicos intrínsecos.

Actualmente se ha encontrado en ratones transgénicos para MCP-1 (proteína quimioattractante de monocitos-1) un aumento en los marcadores de estrés de retículo (BiP, PDI, CHOP) <sup>68</sup>. Por otro lado, Thuerauf et al., utilizando técnicas de transfección con adenovirus paa BiP (in vivo) reportó un gran aumento en la expresión de ese marcador en corazón de ratas infartadas <sup>69</sup>. Finalmente, en el fibroblasto cardiaco, la síntesis de colágeno tipo I, principal proteína sintetizada en el desarrollo de fibrosis, es acompañada de un aumento en la expresión de BiP, PDI y ERO.

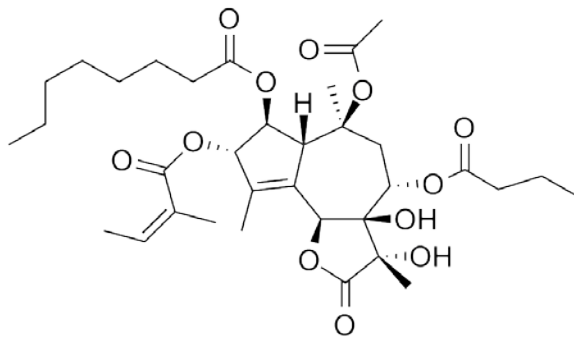
Los fibroblastos cardiacos están continuamente desafiados a plegar apropiada y eficientemente los polipéptidos nacientes moviéndolos de manera eficiente hacia sus destinos. Debido a que el desarrollo de proteínas mal plegadas o no plegadas puede ser desastroso, las células, en general, han desarrollado un ordenado sistema de control de calidad de proteínas a fin de mantener la conformación apropiada para cada una de ellas y eliminar o reorganizar aquellas mal plegadas. Debido a que hoy en día se sabe que en muchas enfermedades está involucrado en forma directa o indirecta el estrés de ER, es necesario estudiar como estos tipos celulares responden frente al estrés de ER, y si este controla o modula procesos de cicatrización o remodelamiento del tejido cardiaco.

Finalmente, no está estudiado si el estrés de ER puede ser modulado con fármacos, por lo tanto, este estudio permitirá sentar las bases que conduzcan a una manipulación farmacológica del estrés de ER, con el fin de conseguir un correcto proceso de cicatrización, pues en muchas células la respuesta a un elevado estrés de ER que no ha podido ser controlado, es la apoptosis <sup>70</sup>, lo que conduciría a una cicatrización inadecuada o remodelado de características patológicas.

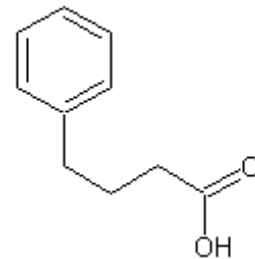
Los cambios en la estructura y función del miocardio en respuesta al daño, es conocido como remodelamiento cardiaco <sup>65</sup>, que puede inicialmente mejorar la función cardíaca,

pero que en el largo tiempo puede progresar a una maladaptación y llevar a insuficiencia cardiaca. Este hecho nos inclina a investigar los mecanismos que puedan modular la MEC de corazón.

En este reporte estudiaremos si el 4-PBA es capaz de prevenir el estrés de retículo en fibroblastos cardiacos y determinar los efectos que la exposición al 4-PBA pueda tener sobre la secreción normal de colágeno, lo cual podría dar luces sobre los efectos que podrían modular la cicatrización en el corazón.



**Figura 2. Estructura molecular de taspigargina.** La taspigargina es una lactona sesquiterpénica extraída de *Thapsia garganica*, posee un peso molecular de 650,76 g/mol. Actualmente está mencionado como alternativa terapéutica en pacientes operados de cataratas y que presentan opacificación capsular posterior. En el pasado se investigó como droga antimalárica por su similitud con la artemesina. [Golenser J, Waknine JH, Krugliak M, Hunt NH, Grau GE (2006). "Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins". *Int. J. Parasitol.* **36** (14): 1427–41.]



**Figura 3. Estructura molecular del ácido 4-fenilbutírico.** El 4-PBA al igual que la mayoría de las chaperonas químicas posee un bajo peso molecular (167,2 g/mol). Cabe notar que su estructura química se asemeja a la fenilalanina con un grupo hidrófobo y un grupo polar permitiéndoles interactuar con distintas cadenas laterales de los péptidos que se están plegando.

## **2 HIPÓTESIS**

El ácido 4-Fenilbutírico previene el estrés de retículo inducido por Tapsigargina en fibroblastos cardiacos.

## **3 OBJETIVO GENERAL**

Determinar si Tapsigargina induce estrés de retículo en fibroblastos cardiacos neonatos, y si el ácido 4-Fenilbutírico previene la inducción de estrés de retículo causada por Tapsigargina.

## **4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 4.1 Determinar que Tapsigargin disminuye la viabilidad de fibroblastos cardiacos neonatos por estimular el estrés de ER.
- 4.2 Demostrar que el ácido 4-fenilbutírico no altera significativamente la viabilidad de fibroblastos cardiacos
- 4.3 Demostrar que el ácido 4-fenibutírico predispone a los fibroblastos cardiacos contra el estrés inducido por Tapsigargina.
- 4.4 Determinar que el ácido 4-fenilbutírico previene el aumento de proteínas marcadoras de estrés de retículo endoplásmico en fibroblastos cardiacos neonatos.
- 4.5 Caracterizar los efectos de la exposición a 4-PBA y Tapsigargina sobre la secreción de colágeno de fibroblastos cardiacos.

## **5 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Reactivos**

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): azul de tripán,. En Gibco BRL (Carlsbad, California EEUU) se adquirieron tripsina-EDTA, estándares de pesos moleculares de proteínas pre-teñidas, suero fetal de bovino (FBS). Los compuestos inorgánicos y orgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en MERCK (Darmstadt, Alemania). El reactivo quimioluminiscente para western blot (Western Lightning) fue adquirido en PerKinElmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA, EEUU). El material de plástico estéril para la obtención y cultivo de fibroblastos cardíacos se obtuvieron en Falcon. TGF- $\beta_1$  fue adquirido en Chemicon. Los anticuerpos secundarios anti-IgG ratón y anti-IgG conejo, conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La jolla, CA, EEUU). Los anticuerpos primarios anti-BiP, anti-PDI, anti-eIF2 $\alpha$  fosforilado se obtuvieron de Cell Signaling Technology (Boston, MA, EEUU), el anticuerpo anti-CHOP fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, EEUU). El anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina, se obtuvo de SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, EEUU). Tapsigargina se obtuvo de BIOMOL International Inc. (Plymouth Meeting, PA, EEUU).

### **5.2 Modelo animal**

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

### **5.3 Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos ventriculares de ratas neonatas**

Se utilizó el procedimiento descrito por Foncea y cols en 1997 <sup>45</sup>. Las ratas se decapitaron e inmediatamente se les removió el corazón bajo condiciones de asepsia, se retiraron las aurículas y los ventrículos se cortaron en pequeños pedazos para

facilitar las sucesivas digestiones posteriores con pancreatina y colagenasa II. El producto de las digestiones se sometió a un preplaqueo por 2 h a 37°C en medio de cultivo conteniendo 5% FBS y 10% FCS en frascos para cultivo de plástico. Por adhesión diferencial al plástico se separaron fibroblastos de cardiomiocitos. Luego de las 2 h, se cambió el medio por DMEM-F12 + 10% FBS, los fibroblastos se dejaron proliferar hasta confluencia y los cambios de pasaje se realizaron mediante tripsinización (hasta pasaje 2 como máximo). Posteriormente las células fueron mantenidas en un medio DMEM-F12 + 2,5% FBS por a lo menos 24 horas antes de ser estimuladas.

#### **5.4 Preparación de solución de tapsigargina**

El reactivo Tapsigargin fue disuelto en 125 µL de DMSO para generar una solución madre de la cual se hicieron diferentes diluciones para llegar a la concentración deseada de estimulación.

#### **5.5 Preparación de extractos celulares totales**

Se prepararon extractos de proteínas totales para evaluar la expresión de las proteínas BiP, PDI, eIF2α-P, ATF4 y CHOP. Las células se sembraron en placas de 100 mm a una densidad de  $2 \times 10^4$  cel/cm<sup>2</sup>. Una vez estimuladas y transcurrido en tiempo del ensayo, las células se lavaron tres veces con PBS 1X frío y luego se lisaron con 100 µL de tampón de lisis HEPES±Triton-X100 buffer (20mM HEPES, pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Triton-X100, 10% glicerol, 1mM EDTA, 10mM difosfato de sodio, 100mM NaF, 17.5mM B-glicerofosfato, 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, leupeptina 2 µg/mL; 10mM aprotinina; 1mM PMSF y 100 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay). Las proteínas se desnaturalizaron en tampón SDS-PAGE 4X (glicerol 20 mL, 2-mercaptoetanol 10 mL, SDS 5 g, Tris base 1,51 g, Azul de bromofenol 0,01 g, Agua

csp. 100 mL, se ajusta a pH 6.8 con HCL). Se calentaron a 95 °C por 5 minutos y se almacenaron posteriormente a -20°C.

### **5.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida**

La separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%. Para la detección se cargaron 50 µg de extracto proteico. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 70 Voltios en tampón de electroforesis 1X (Tris base 30,25 g, Glicina 144 g, SDS 10 g, agua 1000 mL para tampón de electroforesis 10X).

### **5.7 Electrotransferencia de proteínas**

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) a 350 Miliamperes (mA) durante 90 min en tampón de transferencia.

### **5.8 Inmunowestern blot**

Una vez transferidas, la membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (TBS 1X; Tween-20 0,1%; leche descremada 5% p/v) durante 60 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes según ensayo.

- BiP, PDI, en tampón de incubación BSA (TBS 1X; Tween-20 0,1%, BSA 5% p/v) a una dilución 1:1000, toda la noche a 4°C con agitación suave.
- eIF2α-P, en tampón de incubación leche (TBS 1X; Tween-20 0,1%, BSA 5% p/v) a una dilución 1:500, toda la noche a 4°C con agitación suave.
- CHOP, ATF4, en tampón de incubación leche PBS (PBS 1X; leche descremada 5% p/v) a una dilución 1:2000 toda la noche a 4°C con agitación suave.

Posterior a la incubación, las membranas se lavaron 3 veces por 5 min en TBS 1X / Tween-20 al 0,1%, e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa, a un título de 1:5000 para tubulina; anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa a un título de 1:1000 toda la noche a 4°C para BiP y PDI; 1:2000 para eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ -P y 1:7000 para CHOP y ATF4, todos en tampones de incubación con leche descremada. Para la detección de las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en solución de ECL (enhanced chemiluminescence) y se expusieron a la película de fotografía Kodak-Biomax. Las películas se digitalizaron y las imágenes fueron sometidas a densitometría con ayuda de los programas computacionales Photoshop 8.0 y Un-ScanIt. Después de realizar los ensayos de *immunowestern blot*, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 60 min en una solución de rojo ponceau (rojo ponceau 2%, TCA 30%, ácido sulfosalicílico 30%) para desprender los anticuerpos, posteriormente se lavaron en TBS 1X / Tween-20 al 0,1% por tres veces. Luego de este tratamiento, las membranas pudieron ser reutilizadas para nuevos ensayos de *western blot*.

## 5.9 Viabilidad celular por conteo de células

Fibroblastos se sembraron en placas 60 mm a una razón de  $2 \times 10^4$  cel/cm<sup>2</sup>, cultivadas en medio DMEM/F12 + 10% de FBS, que posteriormente fue reemplazado por DMEM/F12 + 2,5% de FBS. 24 horas después de esto, se aplicó la Tapsigargina y/o 4-PBA, a los tiempos y concentraciones indicados para cada experimento. Luego las células fueron soltadas de las placas utilizando Tripsina-EDTA 1x que fue inhibida utilizando DME/F12 10% suero, en proporción 1:1. Posteriormente se tomó una alícuota de 20  $\mu$ l de la suspensión de células y se le adicionaron 20  $\mu$ L de solución de azul de tripán, se homogeneizó y de esta nueva suspensión se tomaron 20  $\mu$ L que se colocaron en un cámara de Neubauer doble y se contaron las células vivas.



### **5.10. Determinación de colágeno soluble**

Para realizar la cuantificación del colágeno soluble se utilizó el Kit “Soluble Collagen Assay” Sircol® (Biocolor, Ireland), de la manera que se describe en el manual del fabricante.

### **5.11 Análisis estadístico**

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

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 Efecto de tapsigargina sobre la viabilidad de fibroblastos cardiacos neonatos**

Para determinar los efectos que produce Tapsigargina sobre la viabilidad de fibroblastos cardiacos neonatos, cultivos celulares en pasaje 2 fueron mantenidos en DMEM/F-12 + 2,5% FBS durante 24 horas, como se describe en la sección 5.9, para luego ser expuestos a diferentes concentraciones de Tapsigargina durante 24 horas.

#### **6.1.1 Efecto de la concentración de tapsigargina sobre la viabilidad de fibroblastos cardiacos**

La exposición a Tapsigargina produce estrés de retículo, pudiendo llegar incluso a la muerte celular por el desencadenamiento de apoptosis una vez que la homeostasis del retículo endoplásmico no pudo ser restaurada<sup>57</sup>.

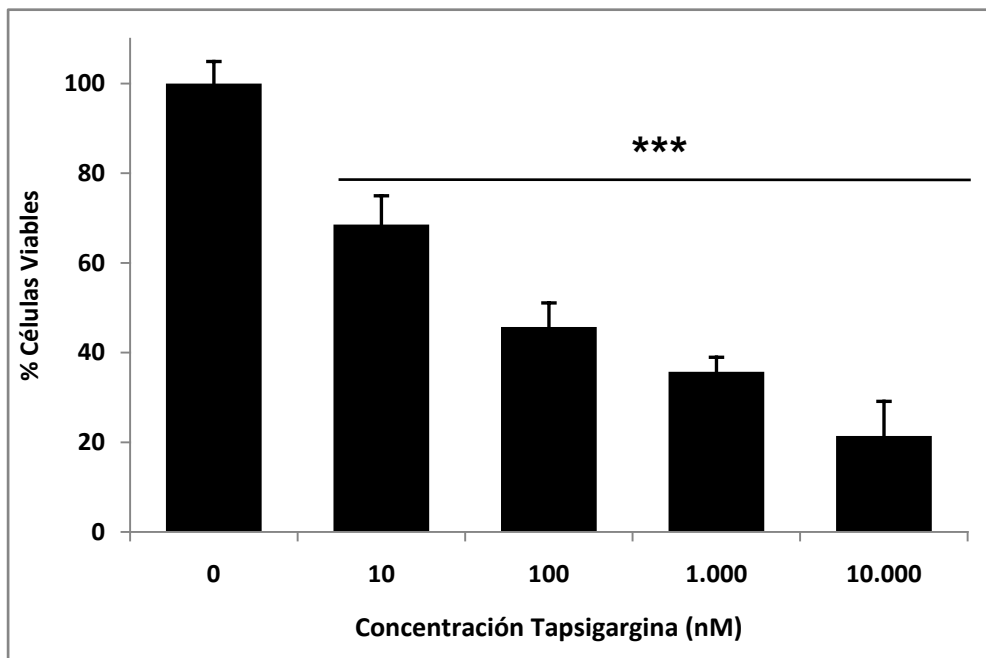
Se realizó un estudio de concentración/respuesta a 24 horas con concentraciones crecientes de Tapsigargina desde de 10 nM hasta 10  $\mu$ M. Las mediciones se hicieron por conteo celular con azul de tripán. En la *Figura 2* se muestra la curva de medición de viabilidad. La pérdida de viabilidad de los cultivos sigue un modelo concentración-dependiente siendo los resultados de 10 nM significativos (alrededor de un 32%) para inducir muerte en los cultivos de fibroblastos neonatos a las 24 horas.

Si bien, se probaron concentraciones menores, la respuesta fue muy variable y en ningún caso indicaron una muerte clara de los cultivos expuestos.

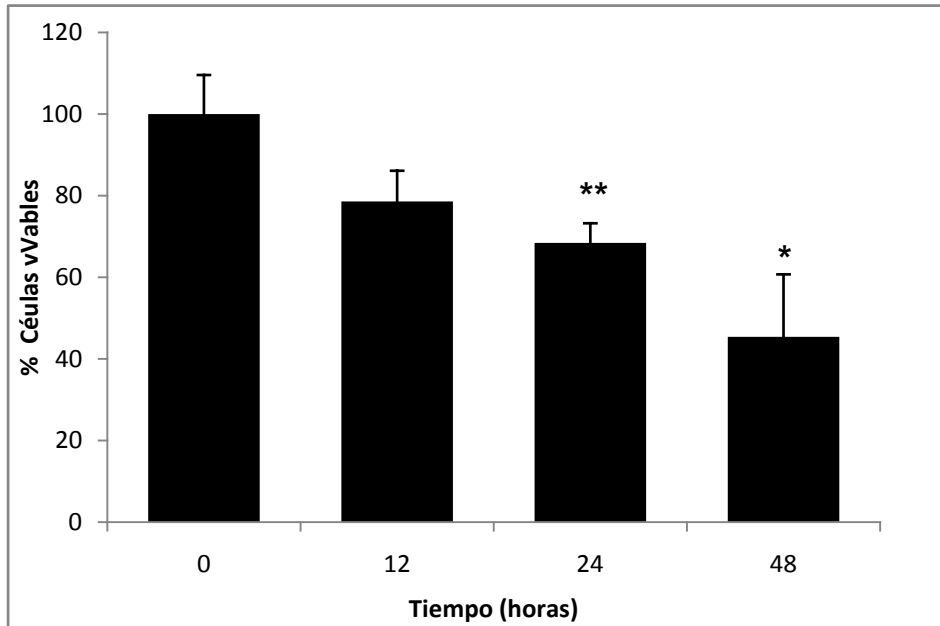
#### **6.1.2 Efecto de tpsigargin 10nM en función del tiempo sobre la viabilidad de fibroblastos cardiacos.**

Con el fin de determinar el efecto de Tapsigargina 10 nM en función del tiempo sobre la viabilidad de fibroblastos se hicieron mediciones de viabilidad por microscopía usando azul de tripán. La *Figura 3* ilustra los efectos de la exposición a Tapsigargina

10 nM a diferentes tiempos comparando el control con respecto a las células tratadas con Tapsigargina. Como se puede apreciar en la figura, durante las primeras 12 horas de exposición se aprecia una tendencia en la pérdida de la viabilidad, que a las 24 horas se vuelve estadísticamente significativa (60% de viabilidad). Mientras que para las 48 horas de exposición sólo se conserva alrededor del 50% de la viabilidad.



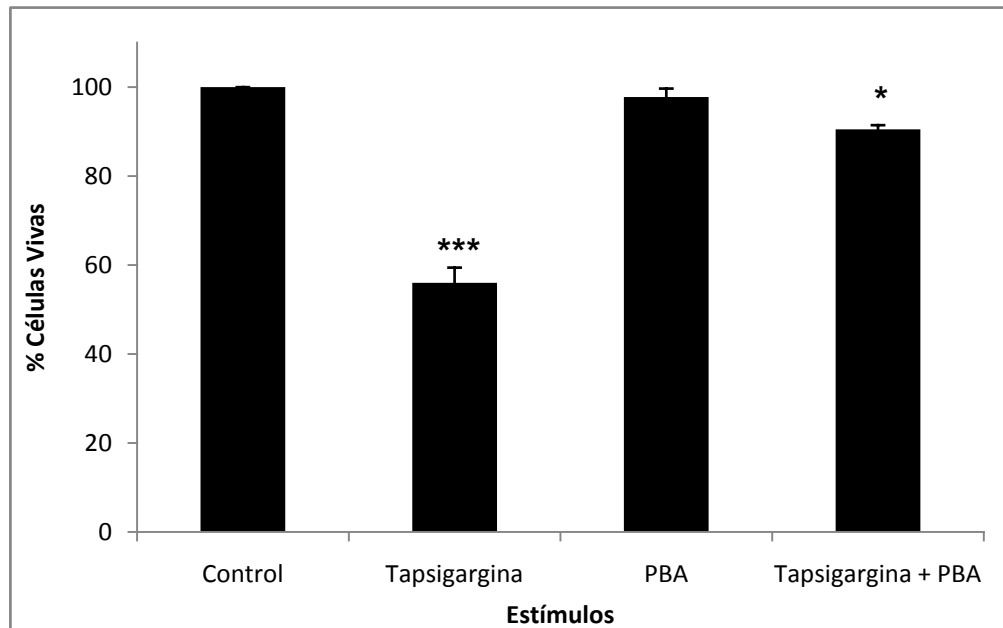
**Figura 4. Efecto de Tapsigargina sobre la viabilidad de fibroblastos cardiacos.** Fibroblastos cardiacos cultivados en DMEM/F12 + 2,5% FBS por 24 h, fueron tratados con Tapsigargina (10 nM –10µM), por 24 h. Las mediciones se realizaron por conteo celular con azul de tripan. Se aprecia que el número de células viables disminuye de una forma concentración – dependiente.[\*\*\*=P<0,001; con respecto al control]



**Figura 5. Efecto de Tapsigargina 10 nM sobre la viabilidad de fibroblastos cardiacos en el tiempo.** Los fibroblastos cardiacos fueron cultivados en DMEM/F12 + 2,5% FBS y fueron tratados con Tapsigargina 10 nM a los tiempos indicados. El conteo fue hecho por microscopia usando azul de tripán. Nótese que la viabilidad decae de manera tiempo – dependiente, siendo estadísticamente significativa desde las 24 horas. [\*= $P < 0,01$ ; \*\*= $P < 0,005$ ; con respecto a su control]

### 6.1.3 Efecto del tratamiento con ácido 4-fenilbutírico sobre los efectos de tapsigargina.

El ácido 4-fenilbutírico (4-PBA) es capaz de actuar como una chaperona química<sup>72</sup>, estabilizando las estructuras tridimensionales de los péptidos nacientes, impidiendo que la creciente demanda de proteínas que se tienen que plegar al interior del retículo endoplásmico activen los sensores de estrés, evitando que se gatille la UPR. Tras preincubar 1 hora con 4-PBA 5 mM los cultivos de fibroblastos fueron expuestos a Tapsigargina 10 nM. Se demostró por conteo celular que a las 24 horas el 4-PBA previene la muerte por exposición a Tapsigargina 10 nM (Figura 4).



**Figura 6. Efecto del 4-PBA sobre la disminución de la viabilidad inducida por Tapsigargina.** Fibroblastos cultivados en DMEM/F12 + 2,5% FBS, fueron tratados con Tapsigargina 10nM . Las mediciones se realizaron a las 24 por conteo celular usando tripan-blue. Es interesante notar como el efecto de Tapsigargina es prácticamente anulado por el tratamiento con 4-PBA [\*= $P < 0.05$ , \*\*\*=  $P < 0,001$ , respecto al control].

## 6.2 UPR en fibroblastos cardiacos.

Para ver el efecto de Tapsigargina sobre la expresión de proteínas de la vía UPR, se tomaron cultivos en medio DMEM/F12 + 2,5% FBS expuestos a tiempos de 1, 6, 12 y 24 horas con el fin de evaluar en escala temporal la expresión de diversas proteínas como se muestran en los resultados mas adelante.

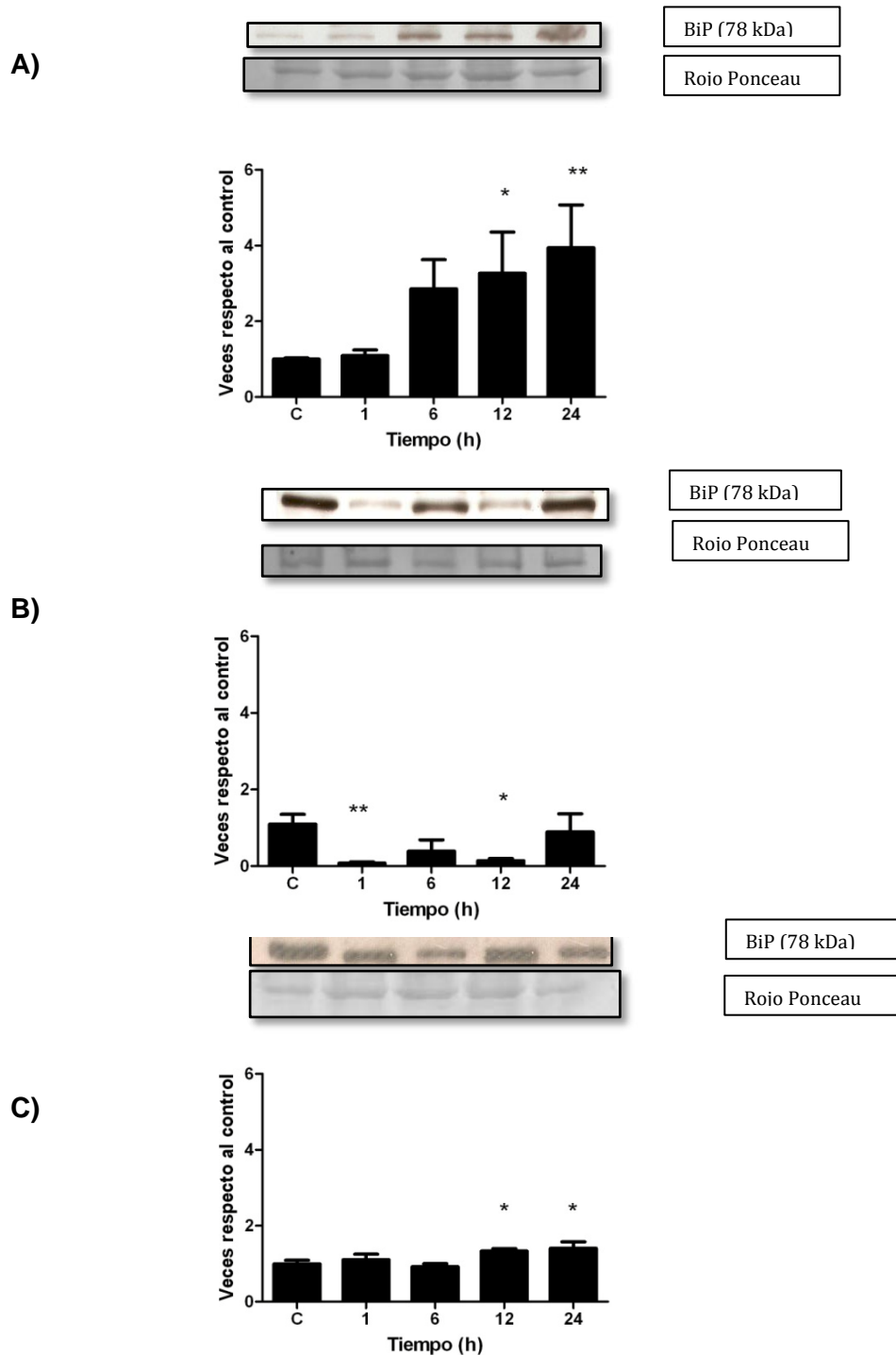
### 6.2.1 Efecto de tapsigargin y ácido 4-fenilbutírico sobre la expresión de BiP.

En la respuesta a proteínas mal plegadas, BiP juega un papel fundamental en la activación de los sensores de proteínas mal plegadas como Ire1, PERK y ATF6. Para ver los cambios en la expresión de ésta proteína en los fibroblastos cardiacos, se estimularon con: a) Tapsigargina, b) 4-PBA y c) preincubación con 4-PBA y posterior exposición a Tapsigargina.

En la figura 5 A se aprecia el aumento en la expresión de BiP indicando que la UPR se ha desencadenado reacción a la exposición a Tapsigargina según se puede apreciar en la figura 5 A, los fibroblastos cardiacos tiene niveles basales de expresión de BiP, sin embargo, los niveles de expresión de BiP en la exposición a Tapsigargina 10 nM se elevan hasta alrededor de 4 veces respecto del basal a las 24 horas, mostrando que estarían los fibroblastos cardiacos, bajo una condición de estrés de retículo ya a partir de las 12 horas.

Al exponer los cultivos a 4-PBA 5 mM, (figura 5 B), se aprecia una fuerte disminución en la expresión de BiP (10 veces) a la primera hora de exposición respecto al control. Sin embargo, a las 6 horas de exposición parece haber una menor disminución en la expresión que no es consistente con lo observado a las 12 horas, donde BiP es tan solo un 20% de lo observado en el control. Las diferencias entre las mediciones de 6 contra 12 horas y de 6 contra 24 horas son estadísticamente significativas. Recién las 24 horas de exposición se puede ver que los niveles de expresión de BiP parecen volver al basal.

Como se puede apreciar en la figura 5C, el pretratamiento con 4-PBA previene el aumento inducido por Tapsigargina. Tapsigargina indujo un aumento temprano en la expresión de BiP (desde las 6 horas) alcanzando el máximo a las 24 horas. Sin embargo, en presencia de 4-PBA el aumento no superó 1,5 veces con respecto al control. Esto indicaría que 4-PBA previene el estrés de ER inducido por Tapsigargina y que tendría la capacidad de modular el estrés de ER. Este dato se correlaciona con el hecho de que la viabilidad en estas condiciones es mayor que la mostrada en la exposición a Tapsigargina sin previo tratamiento con 4-PBA.



**Figura 7. Caracterización de la expresión de BiP en distintas condiciones.** Western blots de fibroblastos cardiacos neonatos, incubados en DMEM/F12 + 2,5% FBS. Se estimuló con los distintos estímulos durante 24 horas. A: Expresión BiP en exposición a Tapsigargina 10 nM. B: Expresión de BiP expuesto a 4-PBA 5 mM. C: Caracterización de la expresión de BiP a durante 24 horas, cultivos preincubados 1 hora antes con 4-PBA y estimulados después con Tapsigargina. [\* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$  con respecto al control]

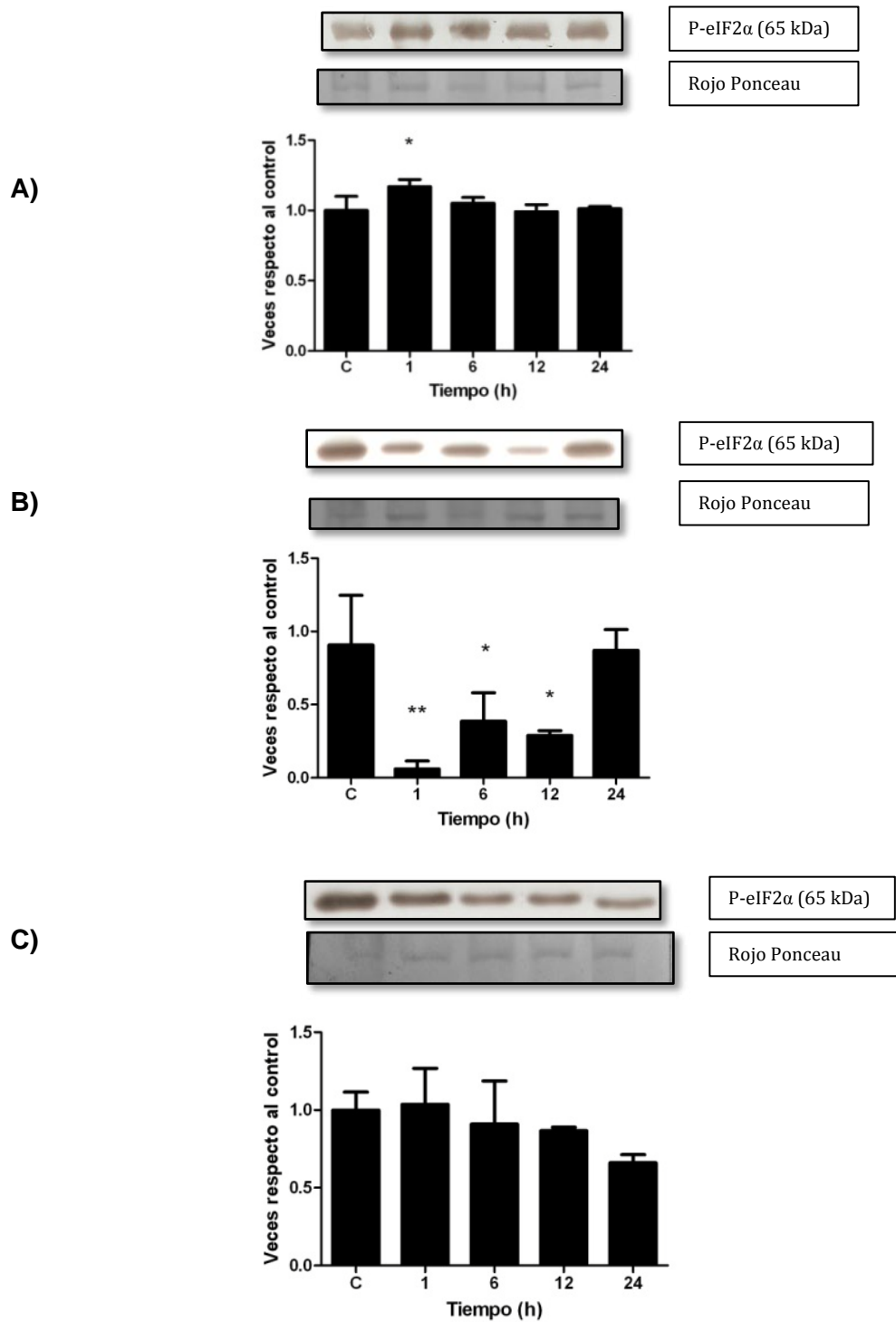
### **6.2.2 Efecto de tapsigargina y 4-PBA sobre P-eIF2 $\alpha$ .**

En la Figura 6 A se puede observar que los fibroblastos cardiacos expresan niveles basales de ésta proteína, el tratamiento con Tapsigargina indujo sólo a tiempos tempranos (1 hora) una mayor fosforilación de eIF2 $\alpha$  estadísticamente significativa (1,2 veces con respecto control). A tiempos más tardíos no se observó un aumento en sus niveles de expresión.

Al exponer los cultivos a 4-PBA (Figura 6 B), se aprecia una menor fosforilación de eIF2 $\alpha$  (0,04 veces del control) en los tiempos tempranos con relación al control. A pesar de eso, a tiempos más tardíos no se observan efectos de 4-PBA sobre los niveles de eIF2 $\alpha$ . Teniendo esto en cuenta, se procedió a ver el efecto del 4-PBA sobre la respuesta provocada por Tapsigargina.

Al preincubar una hora con 4-PBA y al cabo de ese tiempo, estimular con Tapsigargina (figura 6C), se observa que 4-PBA previene la fosforilación inicial inducida por Tapsigargina. A tiempos más tardíos no se observan cambios en los niveles de fosforilación en dicha proteína. Lo anterior indicaría que la preincubación con 4-PBA preconditiona a los fibroblastos cardiacos frente al estrés de ER inducido por Tapsigargina.





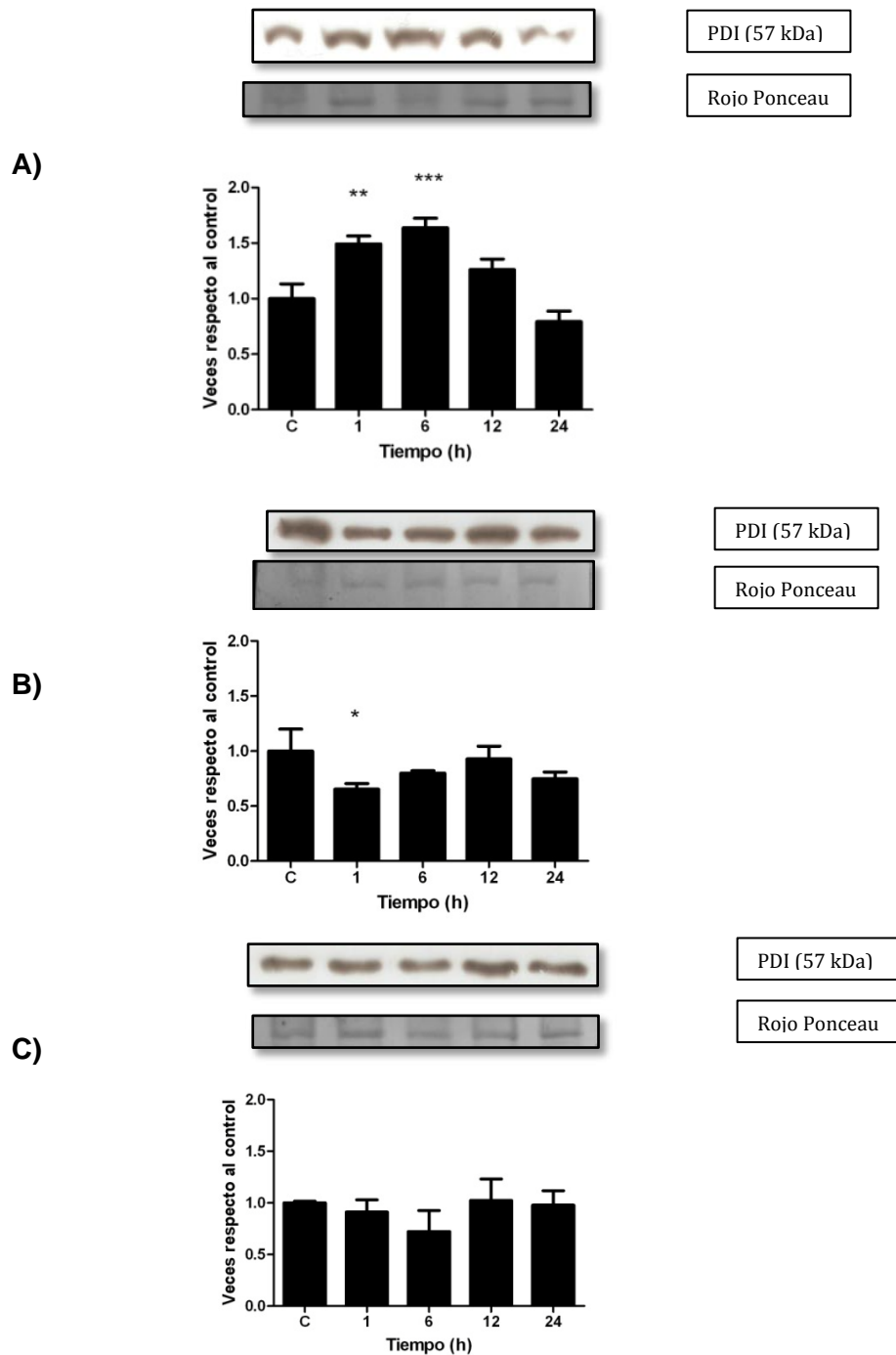
**Figura 8. Efecto de Tapsigargina y ácido 4-Fenilbutírico sobre la expresión de P-eIF2 $\alpha$ .** Western blots para eIF2 $\alpha$  en fibroblastos cardiacos. Los cultivos se incubaron en DMEM/F12 + 2,5% FBS. **A:** Cultivos expuestos a Tapsigargina 10 nM durante 24 h; **B:** Cultivos expuestos a 4-PBA 5 mM; **C:** Cultivos preincubados 1 hora con 4-PBA 5 mM, luego de la cual fueron estimulados con Tapsigargina 10 nM. [\* = P<0,05; \*\* = P<0,01 con respecto al control]

### **6.2.3 Efecto de tapsigargina y 4-PBA sobre la expresión de PDI**

En la Figura 7A se puede ver que los fibroblastos cardiacos expresan niveles basales de ésta proteína. El tratamiento con Tapsigargina indujo a tiempos tempranos (1 y 6 horas) un aumento de la expresión de PDI, estadísticamente significativa (1,5 y 1,6 veces respectivamente con respecto al control). Mientras que a tiempos mas tardíos no se observó un aumento en sus niveles de expresión.

Como se puede apreciar en la figura 7B, el 4-PBA (5 mM) sólo indujo un pequeño descenso (25% respecto al control) en la expresión de PDI a la primera hora de estímulo, efecto que no se observa tardíamente.

Como se puede apreciar en la figura 7C, el pretratamiento con 4-PBA previene el aumento inducido por Tapsigargina (1,5 y 1,6 veces respecto el control a las 1 y 6 horas de estímulo respectivamente Fig.7A). Sin embargo, en presencia de 4-PBA el no fue capaz de aumentar la expresión de PDI, (Fig. 7 B).



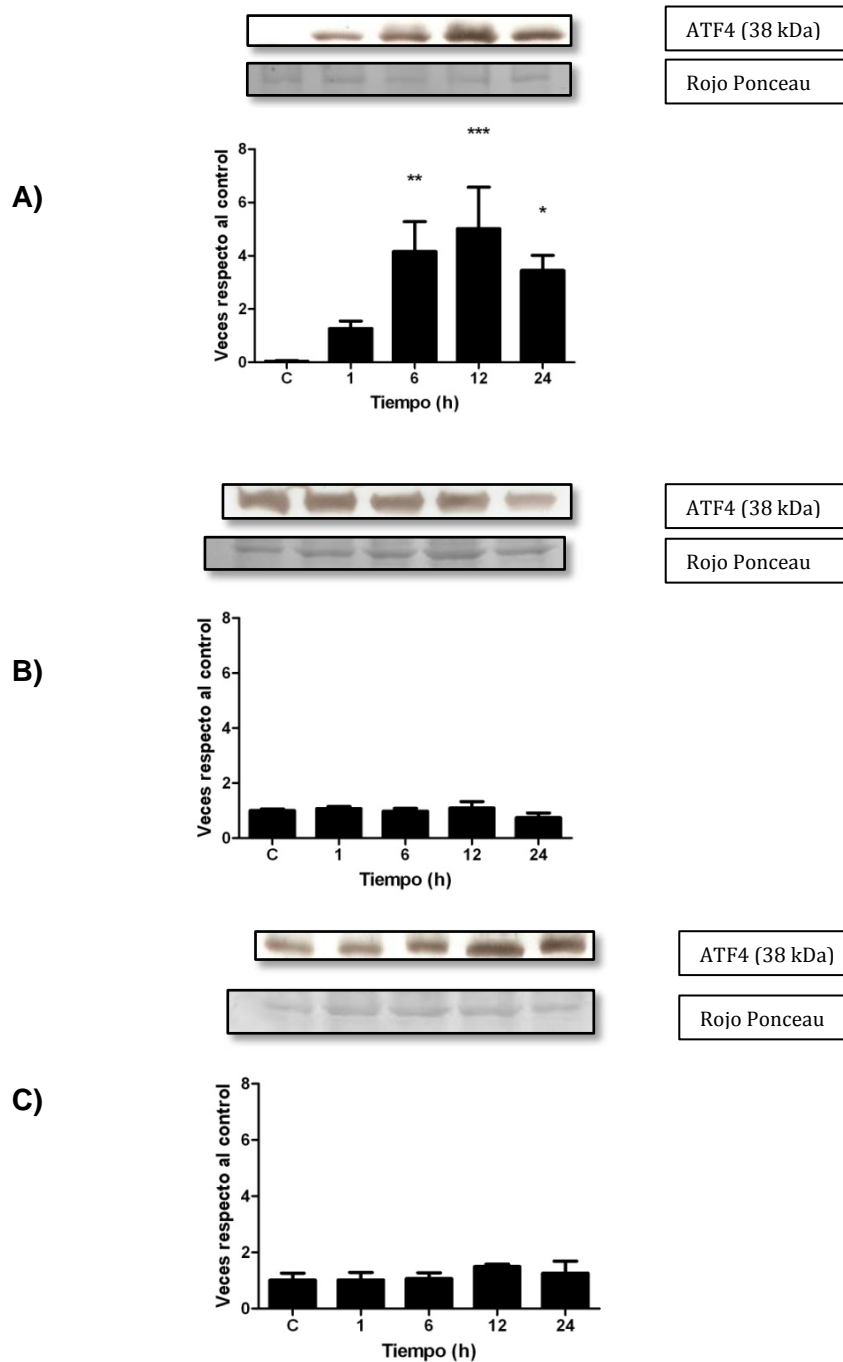
**Figura 9. Efecto de Tapsigargina y 4-PBA sobre la expresión de PDI.** Western blots para PDI. Los cultivos se incubaron en DMEM/F12 + 2,5% FBS. **A:** Caracterización de la expresión de PDI en fibroblastos expuestos Tapsigargina 10 nM. **B:** Efecto de 4-PBA 5 mM sobre la expresión de PDI. **C:** Efecto de 4-PBA 5 mM sobre la respuesta inducida por Tapsigargina 10 nM en fibroblastos. Se preincubó una hora antes de la exposición a Tapsigargina. [\*\*= P < 0,01; \*\*\* = P < 0,001 con respecto al control]

#### **6.2.4 Efecto de tapsigargina y 4-PBA sobre la expresión de ATF4.**

En la figura 8A, se puede apreciar el efecto de Tapsigargina 10 nM sobre la expresión de ATF4. En condiciones basales los fibroblastos expresan ATF4 y cabe destacar que el efecto de Tapsigargina sobre la expresión de ATF4 comienza de manera muy temprana (1 hora), alcanzando su máxima expresión (de aproximadamente 5 veces con respecto al control) a las 12 horas, para luego decaer aunque siempre a niveles superiores a la condición basal.

Por otro lado, la exposición de a 4-PBA no produce mayores efectos sobre la expresión de ATF4 (figura 8B), manteniéndose sus niveles de expresión estables a medida que transcurre el tiempo de exposición.

En la figura 8C se observa el efecto de pretratar los fibroblastos con el 4-PBA sobre el aumento en la expresión de ATF4 por Tapsigargina/4-PBA, observándose que dicho pretratamiento previene el aumento inducido por tapsigargina a los intervalos de tiempo estudiados. Lo que indica que 4-PBA produce un condicionamiento de los fibroblastos a la condición de estrés de ER.



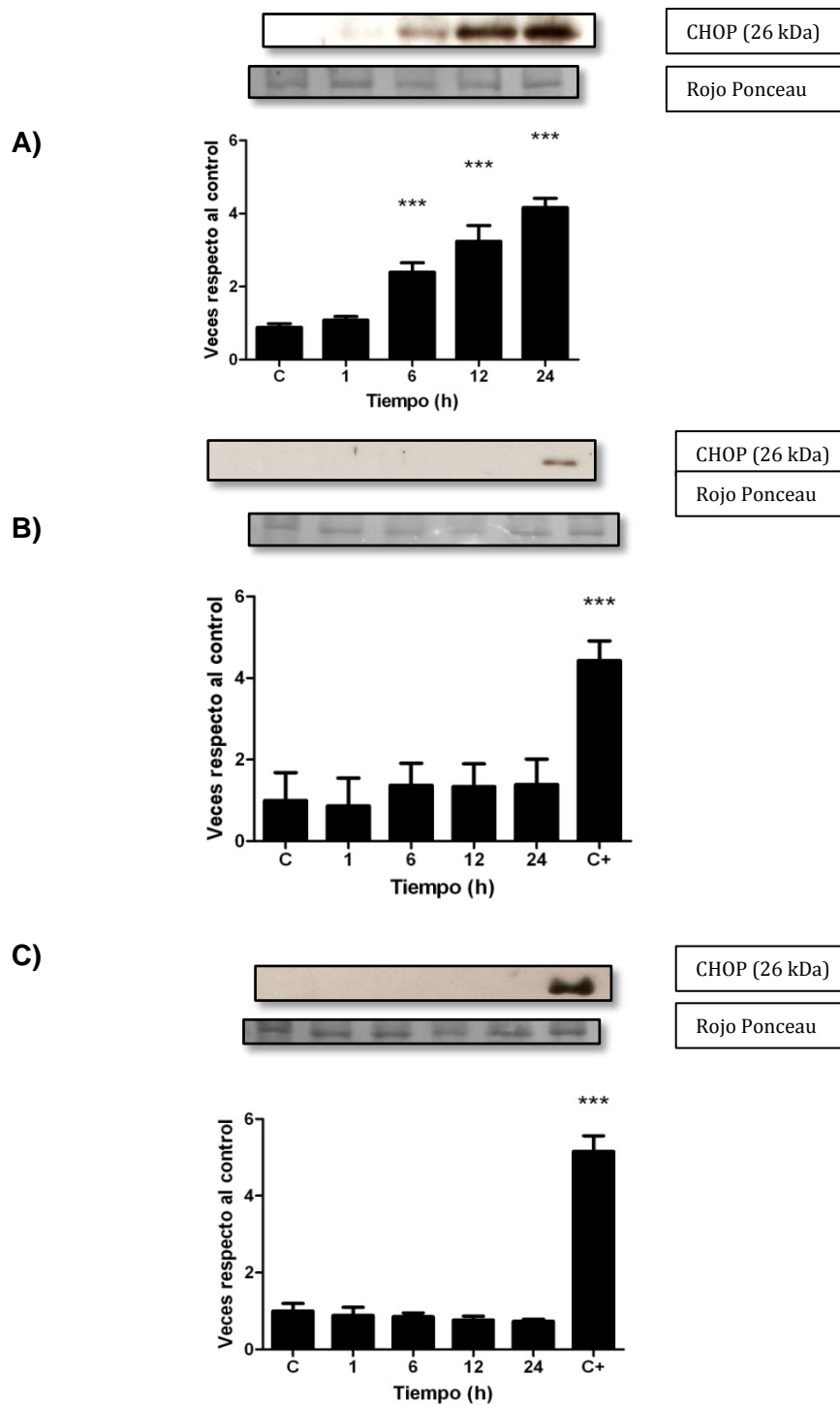
**Figura 10. Efecto de Tapsigargina y 4-PBA sobre la expresión de ATF4.** Western blots para ATF4. Los cultivos fueron incubados en DMEM/F12 + 2,5% FBS. **A:** Efecto de Tapsigargina 10 nM sobre la expresión de ATF4 de fibroblastos. **B:** Efecto de 4-PBA 5 mM sobre la expresión de ATF4 en fibroblastos. **C:** Efectos de 4-PBA sobre la acción de Tapsigargina, los cultivos fueron pretratados una hora con 4-PBA 5 mM, luego se trataron con Tapsigargina 10 nM. [\* = P<0,05; \*\* = P<0,01; \*\*\* = P< 0,001 con respecto al control]

### **6.2.5 Efecto de tapsigargina y de 4-PBA sobre la expresión de CHOP.**

Se expusieron cultivos de fibroblastos cardiacos a Tapsigargina 10 nM, observándose en la figura 9A que la Tapsigargina produce un marcado aumento en la expresión de CHOP a partir de las 6 horas, cuadruplicando los valores basales, a las 24 horas de exposición.

Al probar el efecto de 4-PBA sobre la expresión de CHOP se demostró que los fibroblastos no poseen niveles basales de esta proteína, al menos no en niveles detectables por el método.

Al enfrentar el efecto que desarrollaría Tapsigargina sobre cultivos pretratados con 4-PBA 5 mM, sorpresivamente, se encontró que no había ningún aumento de la expresión de CHOP. Esto confirma que el 4-PBA previene de los efectos mostrados por Tapsigargina en todos los tiempos medidos para CHOP.

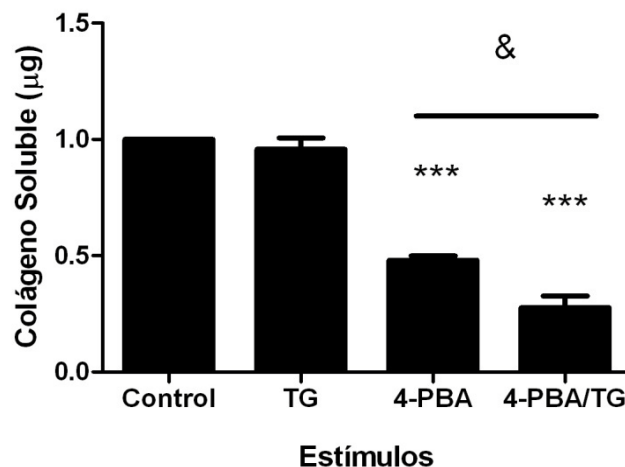


**Figura 11. Efecto de Tapsigargina y 4-PBA sobre la expresión de CHOP.** Western blots para CHOP. Cultivos incubados en DMEM/F12 + 2,5% FBS. **A:** Efecto de Tapsigargina 10 nM sobre la expresión de CHOP en fibroblastos; **B:** Efecto de 4-PBA 5 mM sobre la expresión de CHOP en fibroblastos; **C:** Efecto de Tapsigargina 10 nM sobre cultivos pretratados durante una hora con 4-PBA 5 nM. [\*\*\*= P<0,0001 con respecto al control]

### 6.3 Efecto de tapsigargina y de 4-PBA sobre la secreción de colágeno en fibroblastos cardiacos.

Teniendo ya establecido que Tapsigargina causa estrés de retículo en fibroblastos cardiacos y que el 4-PBA es capaz de modular sus efectos sobre la vía de la UPR, se generó la interrogante acerca de los potenciales efectos beneficiosos que podría tener el 4-PBA sobre los mecanismos de secreción de proteínas de la MEC. Para esto se decidió cuantificar el colágeno soluble que secretan los fibroblastos bajo las distintas condiciones antes experimentadas. Para este experimento se usaron concentraciones menores de Tapsigargina (1 nM) que ha demostrado inducir estrés de retículo sin causar la muerte (resultados no mostrados en esta memoria).

En la Figura 10, se puede apreciar que, Tapsigargina no altera los niveles de secreción de colágeno. Por otro lado, en los cultivos tratados y pretratados con 4-PBA más Tapsigargina, se observa una disminución aun mayor sobre la secreción de colágeno (desde 3,4  $\mu\text{g}$  hasta 1,6  $\mu\text{g}$  a las 24 horas para los fibroblastos con sólo 4-PBA y a 1  $\mu\text{g}$  para fibroblastos pretratados con 4-PBA mas Tapsigargina 1 nM).



**Figura 12. Efecto de Tapsigargina y 4-PBA sobre la secreción de colágeno de fibroblastos cardiacos.** Medición espectrofotométrica de la cantidad de colágeno soluble tomada del medio de cultivo de fibroblastos cardiacos sometidos a distintas condiciones: Tapsigargina 1 nM, 4-PBA 5 mM y pretratamiento con 4-PBA 5mM y posterior tapsigargina 1 nM. Los cultivos se mantuvieron en DMEM/F12 durante la exposición a distintas condiciones. [\*\*\*=  $P < 0,0001$  con respecto al control. &=  $P < 0.0001$  con respecto a 4PBA]



## 7 DISCUSIÓN

Los principales resultados de ésta memoria son:

- a) Tapsigargina induce pérdida de la viabilidad celular de fibroblastos cardiacos de ratas neonatas de una forma concentración – dependiente y tiempo – dependiente.
- b) Disminuye la magnitud de la muerte al pretratar por 1 hora los cultivos con Ácido 4-Fenilbutírico (4-PBA) en una concentración de 5 mM.
- c) Tapsigargina induce una UPR caracterizada por un aumento en los niveles de las proteínas como BiP, PDI, ATF4 y CHOP; y en la fosforilación de eIF2 $\alpha$ .
- d) El 4-PBA es capaz de precondicionar los fibroblastos a la UPR, evitando que se activen los mecanismos de UPR inducidos por Tapsigargina.
- e) Tapsigargina no altera la secreción de colágeno de los cultivos de fibroblastos, pero parece acentuar el efecto del 4-PBA en su disminución.
- f) El 4-PBA disminuye la secreción de colágeno de fibroblastos cardiacos.

### 7.1 Efecto de tapsigargina sobre la viabilidad celular.

En la literatura se ha documentado y reportado que Tapsigargina es capaz de producir estrés de ER en distintos tipos celulares<sup>43, 46, 47</sup>, sin embargo, no se había experimentado con fibroblastos cardiacos. Los fibroblastos cardiacos, como antes se ha mencionado, se caracterizan por ser altamente secretores, por lo que se infiere que tienen una maquinaria de plegamiento de proteínas y secreción bastante eficiente y adaptada y se desconocen los efectos que pudiera tener en tal tipo de células el Tapsigargina.

La concentración a la cual se logró una pérdida significativa de viabilidad de los fibroblastos cardiacos a las 24 horas fue de 10 nM. Estos resultados son menores en al menos un orden de magnitud con respecto a lo ensayado en otros tipos celulares en la literatura<sup>41, 46, 47</sup>. Es posible que éste tipo celular sea mas sensible al estrés de ER o que los sensores de estrés estén en mayor cantidad dada su naturaleza altamente secretora. En la literatura se ha encontrado que Tapsigargina produce apoptosis luego de un prolongado estrés de retículo en el cual no se pudo volver a alcanzar la

homeostasis del propio retículo <sup>17,41, 47</sup>. En este estudio no se midieron marcadores de apoptosis, por lo que queda pendiente la caracterización de los marcadores de apoptosis gatillados por la exposición a Tapsigargina.

## **7.2 Tapsigargina induce estrés de retículo en fibroblastos cardiacos neonatos.**

En virtud de los resultados antes presentados, se observa que la exposición a Tapsigargina en bajas concentraciones es capaz de inducir estrés de retículo. Esto se deduce del hecho de que la exposición a Tapsigargina es capaz de activar los sensores de la vía de UPR lo cual está acorde a lo encontrado en la literatura <sup>17, 41, 47</sup>.

Es sabido que hay diferencias en cuando cada una de las vías de la UPR comienza a ejercer acción. La primera vía en activarse en respuesta al estrés de ER es la vía de PERK para disminuir la traducción de proteínas por fosforilación del factor eIF2 $\alpha$  <sup>16</sup>, para luego continuar con el aumento en la expresión de las proteínas chaperonas y la expresión de CHOP <sup>42</sup>. Lin J. et al. <sup>42</sup>, han demostrado que existe una temporalidad en la duración de los efectos de cada una de las vías sensoras de estrés de ER que se relaciona directamente con la sobrevivencia celular. La vía de IRE1 $\alpha$  se relacionaba con la sobrevivencia celular mientras que la mantención de la actividad de la vía de PERK esta relacionada directamente con la inducción de muerte celular por el aumento de la expresión en el tiempo de CHOP y la consecuente disminución de la fosforilación del factor eIF2 $\alpha$ .

Para determinar la activación directa de la vía del sensor PERK, medimos los niveles de expresión de la proteína fosforilada eIF2 $\alpha$ . Tapsigargina parece inducir significativamente una temprana fosforilación de eIF2 $\alpha$  (1,2 veces respecto al control), esta alza temprana en un principio es suficiente como para dar cuenta del fuerte estímulo estresor que crea Tapsigargina en fibroblastos, sin embargo, parece ser que la vía PERK no es especialmente sensible a éste estresor. Este resultado se asemeja al menos en principio a lo observado por Lin et al <sup>42</sup> en HEK 293 donde Tapsigargina activa la fosforilación temprana de eIF2 $\alpha$ . Llama la atención que en fibroblastos

cardiacos hay un nivel basal de fosforilación de eIF2 $\alpha$  como si hubiera un nivel de estrés basal en los fibroblastos cardiacos.

Cuando hay estrés de ER se produce un aumento en la expresión de ciertas proteínas<sup>16, 34</sup>, entre ellas BiP, una chaperona residente del retículo y que es importante en la síntesis de colágeno<sup>48</sup>. En relación a esta, en nuestros ensayos encontramos que Tapsigargina produce un aumento temprano y progresivo en la expresión de BiP, lo que es coincidente con los trabajos existentes en la literatura en donde se aprecia un aumento temporal de esta proteína<sup>42, 49</sup>. Aunque no hay datos en la literatura sobre los cambios en la expresión de BiP por Tapsigargina en fibroblastos cardiacos, la presencia de BiP en condiciones basales en fibroblastos cardiacos se explica por su actividad como chaperona necesaria para la síntesis de colágeno junto a la chaperona PDI y a la proteína de choque térmico HSP47<sup>50</sup>. Además de lo anterior, Tapsigargina induce en fibroblastos cardiacos la expresión de la proteína PDI, chaperona residente del retículo encargada de la formación de los puentes disulfuro de las proteínas<sup>7, 8, 9</sup>, y en fibroblastos cardiacos es esencial en la síntesis de colágeno, ya que forma los puentes disulfuros en la región C y N Terminal de las hebras de colágeno, y a su vez forma parte de la enzima 4-prolilhidroxilasa (C-P4H), que es la responsable de la hidroxilación de los residuos de prolina presentes en la estructura del procolágeno, siendo PDI la subunidad  $\beta$  de esta proteína<sup>51, 52</sup>. Estos resultados son coincidentes con algunos trabajos en donde se observa el aumento en la expresión de PDI en otros tipos de células que presentan estrés de retículo<sup>48, 53</sup>, aunque este aumento no siempre lleva a la sobrevida celular y no está claro cuando es que las vías de salvataje se ven sobrepasadas y se llega a la muerte celular. Sin embargo, recientemente se ha demostrado en tejido de corazones humanos infartados, que PDI se expresa en regiones infartadas y no en las regiones remotas, lo que indica su participación en el proceso de cicatrización<sup>54</sup>. Por otro lado, también se ha demostrado en corazón de ratones que la sobreexpresión de PDI protege a los cardiomiocitos de la muerte celular producida como consecuencia de un daño por infarto. Nuestros resultados, y otros, fortalecen el concepto de un efecto citoprotector de las chaperonas BiP y PDI en corazón y específicamente en fibroblastos cardiacos, sin embargo, a pesar que se

induce la expresión de las chaperonas para reducir el estrés, éstas parecen ser sobrepasadas por las vías de muerte conduciendo a la pérdida de la viabilidad celular.

Cuando existe la activación de los sensores de estrés de retículo, las respectivas cascadas de señalización que cada uno de estos sensores activa, llevan a la expresión de una proteína en común denominada CHOP que es un potente factor de transcripción<sup>49</sup>. PERK es el principal inductor de CHOP, ya que esta vía lleva a la expresión del factor de transcripción ATF4 que se une directamente al promotor de CHOP<sup>40</sup>. Como demostramos en los resultados, la máxima expresión de ATF4 antecede a la mayor expresión de CHOP, lo cual se correlaciona temporalmente con el alza de CHOP y la disminución de la viabilidad celular. Se ha considerado que la presencia de CHOP es un indicador claro de la existencia de estrés de ER. En muchos estudios se ha evaluado la presencia de la proteína CHOP, ya que esta, además de ser inducida cuando hay estrés de ER<sup>55</sup>, se ha relacionado directamente con la inducción de apoptosis<sup>56,57</sup>. Nuestros resultados muestran que en estado fisiológico los fibroblastos no expresan niveles detectables de la proteína CHOP, pero cuando son estimulados con Tapsigargina se aprecia una notable expresión de esta proteína desde las 6 horas de estímulo, resultados similares se han observado en otros trabajos a tiempos muy similares cuando se estimula con Tapsigargina o con Tunicamicina<sup>49</sup>.

En conjunto, nuestros resultados, muestran que existe una correlación entre la expresión de las proteínas que tratan de hacer frente al estrés demostrado por una temprana expresión de BiP, eIF2 $\alpha$ , PDI; mientras que por otro lado, también demostramos la tardía expresión de ATF4 y CHOP que antecede a los eventos de muerte inducidos por Tapsigargina.

### **7.3 Efecto del ácido 4-fenilbutírico sobre la viabilidad celular.**

El 4-PBA es considerado como un compuesto con propiedades de chaperona, por lo que es referido como chaperona química. Las chaperonas químicas son moléculas de bajo peso que tienen propiedades fisicoquímicas que le permiten estabilizar las estructuras de las proteínas, mejoran la capacidad de plegamiento y facilitan el tráfico de proteínas mutantes<sup>58,59</sup>. Tal como encontraron anteriormente otros investigadores<sup>59</sup>,

<sup>60</sup>, en nuestros experimentos encontramos que a concentraciones de 5 mM de 4-PBA no hay efectos deletéreos sobre los cultivos a nivel de viabilidad celular. Dicho esto, el siguiente paso que decidimos seguir fue determinar la capacidad que tiene el 4-PBA para prevenir los efectos que tiene Tapsigargina sobre la viabilidad celular. Si bien hubo una muerte de los cultivos tratados con Tapsigargina que antes fueron expuestos por 1 hora a 4-PBA, ésta es significativamente menor.

#### **7.4 Efecto del ácido 4-fenilbutírico sobre la expresión de proteínas de estrés de retículo endoplasmático.**

Se ha reportado en la literatura<sup>58, 59, 60</sup> que el efecto tipo chaperona del 4-PBA es capaz de reducir la expresión de proteínas de la vía de UPR. En nuestros experimentos se determinó como el 4-PBA es capaz de disminuir desde tiempos tempranos los niveles de expresión de BiP prácticamente a la mitad. Esto tiene sentido ya que la necesidad de chaperonas endógenas de los fibroblastos, como lo es BiP, es menor porque el trabajo de estabilizar las proteínas está siendo sustentado por el 4-PBA. Estos resultados coinciden con los reportados por Almeida *et al*<sup>59</sup>, donde los niveles de BiP fueron reducidos a la mitad por efecto del 4-PBA. Ahora, cuando probamos los efectos preventivos que tiene el 4-PBA sobre los efectos de Tapsigargina, se vio que la expresión de BiP aumenta aproximadamente en un 40% con respecto al basal, sin embargo, este aumento es mucho menor al observado en los fibroblastos que no fueron tratados previamente con 4-PBA – que aumentó en un 400% - donde la viabilidad se ve claramente afectada.

Un efecto parecido al visto en BiP, es el que acontece con eIF2 $\alpha$  fosforilado, donde el tratamiento con 4-PBA disminuye claramente sus niveles de fosforilación, probablemente debido a que hay una mejorada capacidad de plegamiento y transporte de proteínas lo que favorecería un aumento en la síntesis de proteínas. Hay resultados similares en neuronas<sup>60</sup> donde eIF2 $\alpha$  fosforilado es disminuido por la exposición a 4-PBA en función del tiempo.

Al exponer a los fibroblastos cardiacos al 4-PBA y medir la expresión de PDI, se observa que sus niveles de expresión no parecen ser afectados. Sólo en un primer

momento hay una disminución significativa que rápidamente es recuperada a niveles normales por los fibroblastos cardiacos. Cuando se probó el efecto de Tapsigargina en cultivos tratados con 4-PBA no hubo mayores cambios en la expresión normal de PDI, lo cual indica una atenuación o un efecto de predisposición a enfrentar el estrés de ER inducido por Tapsigargina sobre fibroblastos, donde se había aumentado previamente en un 50%. Se ha determinado en corazones isquémicos que PDI aumenta su expresión, lo que hace pensar en los potenciales efectos preventivos del 4-PBA sobre corazones en proceso de fibrosis<sup>61</sup>.

La vía integrada de la respuesta a las proteínas mal plegadas, pasa por un factor de transcripción, ATF4, el cual va a activar la expresión de los genes que colaborarán en la recuperación de la homeostasis del retículo. Los fibroblastos cardiacos al ser expuestos a Tapsigargina expresaron más de 5 veces los niveles normales de expresión. Al exponerlos a 4-PBA los niveles de expresión de ATF4 se mantienen normales. Esta situación se mantiene al aplicar Tapsigargina a fibroblastos cardiacos pretratados con 4-PBA. Hetz *et al.*<sup>62</sup> ya ha demostrado que en las células que muestran estar bajo estrés de retículo, ATF4 aumenta en conjunto con el aumento de expresión de CHOP.

Como se ha mencionado antes, CHOP es considerado como el marcador más sólido del desencadenamiento de la UPR. Ésta proteína es un efector pro-apoptótico que es inducido por las tres vías de la UPR y pavimenta el camino hacia la apoptosis aunque aun no está claro cuales son los mecanismos por los cuales los hace. Lo que si es claro, es que una sobreexpresión compromete la viabilidad celular y la inhibición de su expresión muestra un efecto protector frente al estrés de retículo<sup>49</sup>. En nuestros experimentos pudimos observar que al exponer los cultivos a 4-PBA no existe ningún aumento considerable de la expresión de CHOP. Al ver el efecto preventivo del 4-PBA contra el efecto deletéreo que causa la exposición a Tapsigargina, se observa que el efecto preventivo es total, en ninguno de los tiempos medidos se aprecia aumento alguno en la expresión de CHOP. Esto se correlaciona y explicaría el efecto protector que se ve en los ensayos de viabilidad efectuados y antes comentados. Este resultado

sumado a la falta de expresión de ATF4, sugieren que los efectos de 4-PBA como protector frente al estrés de retículo son bastante promisorios.

### **7.5 Efecto de taspigargina sobre la secreción de colágeno.**

Vistos los efectos sobre las proteínas de la vía de la UPR, decidimos cuantificar los efectos que Taspigargina tiene sobre la secreción de colágeno con una concentración 10 veces menor a la que causa muerte (1 nM). Teóricamente al inducir la UPR la secreción de proteínas se vería afectada, sin embargo, al medir la cantidad de colágeno soluble determinamos que no hay ningún efecto sobre la cantidad secretada. Estos resultados se contraponen a los expuestos en una memoria reciente de A. Letelier <sup>67</sup>, donde se expusieron cultivos de fibroblastos cardiacos al estresor Tunicamicina en concentraciones de 0,1 µg/µL y 0,5 µg/µL y se observó que la secreción de colágeno disminuía en un 50% y 75% respectivamente.

Puede ser que la depleción de calcio del lumen de retículo no afecte de manera significativa la síntesis y el plegamiento del colágeno como lo puede hacer la inhibición de la N-glicosilación de proteínas. Actualmente en la literatura no se encuentran artículos que hagan referencia a los efectos de Taspigargina sobre la secreción de colágeno en fibroblastos.

### **7.6 Efecto de ácido 4-fenilbutírico sobre la expresión de colágeno.**

La exposición de los cultivos al 4-PBA, redujo en alrededor de un 50% la secreción normal de colágeno por parte los fibroblastos. Estos resultados eran esperables ya que ha sido reportado que en fibroblastos de pulmón, 4-PBA inhibió la expresión de los genes codificantes de colágeno <sup>62</sup>, con todo, la taspigargina posee un efecto sinérgico sobre la disminución de secreción de colágeno por parte del 4-PBA.

Si resumimos lo visto hasta ahora, tenemos que los fibroblastos cardiacos son un tipo celular altamente secretor, por lo tanto, cualquier alteración que atente contra los mecanismos de síntesis o de secreción de éstos, se traducirá en un estrés de ER. Ahora bien, cuando ocurre daño en el corazón hay una secreción aumentada de

colágeno que intenta reparar la MEC, haciendo que la demanda de proteínas que deben ser plegadas al interior del ER aumente. Es probable que los procesos de reparación del corazón produzcan estrés de retículo en los fibroblastos cardiacos.

Ahora bien, como hemos mencionado anteriormente, se ha reportado que el 4-PBA es capaz de disminuir los efectos de Tapsigargina – el cual induce estrés de ER - por lo que es probable que tenga efectos adaptativos frente al estrés de ER que se pueda producir durante la mayor secreción de colágeno en el proceso de cicatrización cardiaca. Asimismo, se ha visto que 4-PBA inhibe la secreción de colágeno lo que podría tener efectos sobre la cantidad de colágeno secretada que lleve a mala cicatrización que, finalmente, podría llevar a una insuficiencia cardiaca.

Perspectivas:

1. Estudiar los efectos del 4-PBA sobre otros tipos celulares del corazón, como por ejemplo, miofibroblastos cardiacos.
2. Estudiar otras concentraciones de 4-PBA distintas a las usadas en la literatura
3. Caracterizar las vías apoptóticas que se gatillan en el tiempo mientras se eleva la expresión de CHOP.
4. Estudiar la posible retención de procolágeno en fibroblastos cardiacos expuestos a 4-PBA.
5. Caracterizar la secreción de colágeno a concentraciones de Tapsigargina que causan muerte.



## **8 Conclusiones.**

I – Tapsigargina reduce significativamente la viabilidad de celular de fibroblastos cardiacos neonatos de manera concentración y tiempo - dependiente.

II – El Ácido 4-Fenilbutírico en una concentración de 5 mM no afecta la viabilidad de fibroblastos cardiacos neonatos luego de 24 de exposición pero si previene de la muerte causada por la exposición a Tapsigargina 10 nM.

III – Tapsigargina 10 nM induce el aumento de la expresión de proteínas de la vía UPR.

IV – El Ácido 4-Fenilbutírico 5 mM disminuye la expresión normal de la mayoría de las proteínas de la vía UPR y previene el aumento de la expresión de ellas inducido por Tapsigargina 10 nM.

V – Tapsigargina no altera la secreción de colágeno soluble por parte de fibroblastos cardiacos neonatos.

VI – El Ácido 4-Fenilbutírico disminuye en alrededor de un 50% la secreción normal de colágeno soluble por parte de fibroblastos cardiacos neonatos, la exposición a Tapsigargina provoca una disminución sinérgica de la secreción.

## REFERENCIAS

- 1- Organización mundial de la Salud (OMS). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>
- 2- Weber, KT. "Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblast". *J Hypertens.* (2004); 22(1): 47-50.
- 3- Eghbali M, Weber KT. "Collagen and the myocardium: fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression". *Mol Cell Biochem.* (1990); 96:1-14.
- 4- Johnson AE, Van Waes MA. "The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane". *Annu Rev Cell Dev Biol.* (1999); 15:799-842.
- 5- Stevens SJ, Argon Y. "Protein folding in the ER". *Semin Cell Dev Biol.* (1999); 10:443-454.
- 6- Hendershot LM. "The ER function BiP is a master regulator of ER function". *Mt Sinai J Med.* (2004); 71: 289-297.
- 7- Ferrari DM, Soling HD. "The protein Disulphide-isomerase family: unraveling a string of folds". *Biochem J.* (1999); 339: 1-10.
- 8- Freedman RB, Hirst TR, Tuite MF. "Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding". *Trends Biochem Sci.* (1994); 19:331-336.
- 9- Tu BP, Weissman JS. "The FAD and O<sub>2</sub>- dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidativo protein folding in the endoplasmic reticulum". *Mol Cell.* (2002); 10: 983-994.
- 10- Ellgaard L, Helenius A. "Quality Control in the endoplasmic reticulum". *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4: 181-191.
- 11- Molinari M, Calanca V, Galli C, Lucca P, Paganetti P. "Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle". *Science.* (2003); 229: 1397-1400.

- 12-Tsai B, Rapoport TA. "Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol". *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2002); 3: 246 – 255.
- 13-Kuzutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J. "The presence of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose regulated proteins". *Nature.* (1988); 332: 462 – 464.
- 14-Marquardt T, Helenius A. "Misfolding and aggregation of Newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum". *J Cell Biol.*(1992); 117: 505-13.
- 15-Li WW, Alexandre S, Cao X, Lee AS. "Transactivation of the gpr 78 promoter by Ca<sup>2+</sup> depletion. A comparative analysis with A23187 and the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase inhibitor Thapsigargin". *J Biol Chem.* 1993; 268: 12003 – 12009.
- 16-Schröder M, Kaufman RJ. "The Mammalian Unfolded Protein Response". *Annu Rev Biochem.* (2005); 74: 739 – 789
- 17-Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. "ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NFY-(CBF) directly to the cis-acting element responsible for mammalian unfolded protein response". *Mol Cell Biol.* (2000); 20: 6755 – 6767.
- 18-Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor". *Cell.* (2001); 107: 881 – 891.
- 19-Kokame K, Kato H, Miyata T. "Identification of ERSE II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response". *J Biol Chem.* (2001); 276: 9199 – 9205.
- 20-Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ. "A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel

- bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells". *Genes Dev.* (1998); 12: 1810 – 1824.
- 21- Wang ZX, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. "Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses". *Embo J.* (1998); 17: 5708 – 5717.
- 22- Credle JJ, Finer-Moore JS, Papa F, Stroud R, Walter P. "On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum". *PNAS.* (2005); 102: 18773 – 18784
- 23- Sidrauski C, Walter P. "The transmembrana kinase Ire1p is a site specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response". *Cell.* (1997); 90: 1031 – 1039
- 24- Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. "Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress". *Mol Biol Cell.* (1999); 10: 3787 – 3899.
- 25- Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. "ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals". *Dev Cell.* (2002); 3: 99 – 111.
- 26- Hong M, Luo S, Boumesiter P, Huang JM, Gogia RK, Li M, Lee AS. "Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the Unfolded Protein Response". *J Biol Chem.* (2004); 279: 11350 – 11363.
- 27- Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. "ER stress induces cleavage of membrane – bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs". *Mol Cell.* (2000); 6: 1355 – 1364.
- 28- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. "Dynamic interaction of BiP an ER stress transducers in the unfolded protein response". *Nat Cell Biol.* (2000); 2: 326 – 332.

- 29-Harding HP, Zhang Y, Ron D. "Protein Translation and folding are coupled by an endoplasmic reticulum resident kinase". *Nature*. (1999); 397: 271 – 274.
- 30-Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. "Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells". *Mol Cell*. (2000); 6: 1099 – 1108.
- 31-Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Jungreis R, Harding HP, Ron D. "Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression". *Embo J*. (2003); 22: 1180 – 1187.
- 32-Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K. "Distinct role of activating transcription factor 6 (ATF6) and double stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response". *Biochem J*. (2002); 366: 585 – 594.
- 33-Luo S, Baumeister P, Yang S, Abcouwer SF, Lee AS. "Induction of GRP78/BiP by translational block: activation of the GRP78 promoter by ATF4 through and upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements". *J Biol Chem*. (2003); 278: 37375 – 37385.
- 34-Ron D. "Translation Control in the endoplasmic reticulum stress response". *J Clin Invest*. (2002); 110: 1383 – 1388.
- 35-Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir, Kaufman RJ. "Tranlational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis". *Mol Cell*. (2001); 7: 1165 – 1176.
- 36-Brewer JW, Diehl JA. "PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response". *Proc Natl Acad Sci USA*. (2000); 97: 12625 – 12630.

- 37-Haynes CM, Titus EA, Cooper AA. "Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death". *Mol Cell*. (2004); 15: 767 – 776.
- 38-Pahl HL, Baeuerle PA. "The ER-overload response: activation of NF-kappa B". *Trends Biochem Sci*; (1997); 22: 63 – 67.
- 39-Nakagawa T, Yuan J. "Cross-Talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis". *J Cell Biol*. (1997); 150: 887 – 894.
- 40-Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. "CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of endoplasmic reticulum". *Genes Dev*. (1998); 12: 982 – 995.
- 41-Nishitoh, H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H. "ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats". *Genes Dev*. (2002); 16: 1345 – 1355.
- 42-Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, Shokat KM, LaVail MM, Walter P. "Ire1 signaling affects cell fate during the Unfolded protein response". *Science*. (2007); 318: 944 – 949.
- 43-Choi SE, Lee YJ, Jang HJ, Lee KW, Kim SY, Jun HS, Kang SS, Chun J, Kang Y. "A chemical chaperone 4-PBA ameliorates palmitate-induced inhibition of glucose stimulated insulin secretion (GSIS)". *Arch of biochem and biophysics*. (2008); 475: 109 -114.
- 44-Hayashi H, Sugiyama Y. "4-phenylbutyrate enhances the cell surface expression and the transport capacity of the wild-type and mutated bile salt export pumps". *Hepatology*. (2007); 45: 1506 – 1516.
- 45-Foncea R, Andersson M, Ketterman A, Blakesley V, Sapag-Hagar M, Sugden P, Lee Roith D, Lavandero S. "Insulin-like growing factor I rapidly

- activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes". *J Biol Chem.* (1997); 31: 19115 – 19124.
- 46- Gómez E, Powel ML, Bevington A, Herbert TP. "A decrease in cellular energy status stimulates PERK-dependent eIF2 $\alpha$  phosphorylation and regulates protein synthesis in pancreatic  $\beta$ -cells". *Biochem J.* (2008); 410: 485 – 493.
- 47- Dianhong L, Yun H, Haifeng Z, Luyang Y, Hong C, Zhe X, Shibo T, Fumihiko U, Wang M. "AIP1 is critical in transducing IRE1-mediated endoplasmic reticulum stress response". *J Biol Chem.* (2008); 283:11905 – 11912.
- 48- Lisse TS, Thiele F, Fuchs H, Hans W, Przemeck GK, Abe K, Rathkolb B, Quintanilla-Martinez L, Hoelzlwimmer G, Helfrich M, Wolf E, Ralston SH, Hrabé de Angelis M. "ER stress-mediated apoptosis in a new mouse model of osteogenesis imperfect". *PLoS Genet.* (2008); 4:e7
- 49- Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D. "CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum". *Genes Dev.* (2004); 18:3066-3077
- 50- Nagata K. "Expression and function of heat shock protein a collagen-specific molecular chaperone in the endoplasmic reticulum". *Matrix Biol.* (1998); 16: 379-386
- 51- Koivunen P, Kirsi E, Salo H, Myllyharju J and Ruddock LW. "Three binding sites in protein-disulfide isomerase cooperate in collagen prolyl 4-hydroxylase tetramer assembly". *J Biol Chem.* (2005); 280: 5227–5235
- 52- Myllyharju J. "Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis". *Matrix Biol.* (2003); 22:15-24.
- 53- Li J, Ni M, Lee B, Barron E, Hinton DR, Lee AS. "The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells". *Cell Death Differ.* (2008); 15: 1460 - 1471.

- 54- Severino A, Campioni M, Straino S, Salloum FN, Schmidt N, Herbrand U, Frede S, Toietta G, Di Rocco G, Bussani R, Silvestri F, Piro M, Liuzzo G, Biasucci LM, Mellone P, Feroce F, Capogrossi M, Baldi F, Fandrey J, Ehrmann M, Crea F, Abbate A, Baldi A. "Identification of protein disulfide isomerase as a cardiomyocyte survival factor in ischemic cardiomyopathy". *J Am Coll Cardiol.* (2007); 50: 1029-37.
- 55- Masud A, Mohapatra A, Lakhani SA, Ferrandino A, Hakem R, Flavell RA. "Endoplasmic reticulum stress-induced death of mouse embryonic fibroblasts requires the intrinsic pathway of apoptosis". *J Biol Chem.* (2007); 282:14132-14139.
- 56- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. "Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state". *Mol Cell Biol.* (2001); 21:1249-1259.
- 57- Wu J, Kaufman RJ. "From acute ER stress to physiological roles of the unfolded protein response". *Cell Death Differ.* (2006); 13:374-384.
- 58- Özcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Gorgum CZ, Hotamisligil. "Chemical Chaperones reduce ER stress and restore Glucose Homeostasis in a Mouse Model of type 2 diabetes". *Science.* (2006); 313: 11237- 1140.
- 59- Almeida SF, Picarote G, Fleming JV, Carmo-Fonseca M, Azevedo J, Sousa M. "Chemical Chaperones Reduce Endoplasmic Reticulum Stress and Prevent Mutant HFE Aggregate Formation". *J Biol Chem.* (2007); 282: 27907 – 27912.
- 60- Qi X, Hosoi T, Okuma Y, Kaneko M, Nomura Y. "Sodium 4-phenylbutyrate Protects against Cerebral Ischemic Injury". *Mol Pharmacol.* (2004); 66: 899 – 908.
- 61- Azfer A, Niu J, Roger LM, Adamski FM, Kolattukudy PE. "Activation of endoplasmic reticulum response during the development of ischemic heart disease". *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (2006); 291: 1411 – 1420.
- 62- Hetz C, Lee AH, Gonzalez – Romero D, Thielen P, Castilla J, Soto C, Glimcher LH. "Unfolded protein response transcription factor XBP-1 does not influence prion replication or pathogenesis". *PNAS.* (2008); 105: 757 – 762.



- 63-Rishikof DC, Ricupero DA, Liu H, Goldstein RH. "Phenylbutyrate Decreases Type I Collagen Production in Human Lung Fibroblasts". *Journal of Cellular Biochemistry*. (2004); 91: 740 – 748.
- 64-Bosman FT, Stramenkovic I. "Functional structure and composition of the extracellular matrix". *J Pathol*. (2003); 200: 423 – 428.
- 65-Swynghedauw B. "Molecular mechanisms of myocardial remodeling". *Physiol Rev*. (1999); 79: 215 - 262.
- 66-Rammohan VR, Bredesen DE. "Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration". *Current Opinion in Cell Biology*. (2004); 16: 653 – 662.
- 67-Letelier A. "TGFβ1 previene la muerte por apoptosis inducida por estrés de retículo endoplasmático en los fibroblastos cardiacos de ratas neonatas". Memoria para optar al título de Químico – Farmacéutico, Universidad de Chile. (2008)
- 68-Powell, D. W., R. C. Mifflin, J. D. Valentich, S. E. Crowe, J. I. Saada, and A. B. West. Myofibroblasts. I. "Paracrine cells important in health and disease". *Am. J. Physiol*. (1999); 277: C1–C19.
- 69-Gabbiani G. "The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases". *J Pathol*. (2003); 200: 500-503.
- 70-Otsu M and Sitia R. "Diseases originating from altered protein quality control in the endoplasmic reticulum". *Current Medicinal Chemistry*. (2007); 14: 1639-1652.
- 71-Golenser J, Waknine JH, Krugliak M, Hunt NH, Grau GE. "Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins". *Int. J. Parasitol*. (2006); **36** (14): 1427–41.
- 72-Cohen FE, Kelly JW, "Therapeutic approaches to protein-misfolding disease". *Nature*. (2003); 426: 905 – 909.
- 73-Brown R, Ambler S, Mitchell D, Long, C. "The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. (2005); 45: 657 – 87.