



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

La activación de proteína kinasa A disminuye la adhesión, migración y expresión de colágeno en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos de rata neonata

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

CLAUDIA MURIEL MUÑOZ RODRÍGUEZ

Directores: Dr. Guillermo Antonio Díaz-Araya

Ivonne Olmedo Alegría

Patrocinante: Dr. Guillermo Antonio Díaz-Araya

2012

Agradecimientos:

En primer lugar quiero agradecer al profesor Dr. Guillermo Díaz Araya por recibirme en su laboratorio y permitirme hacer tesis con él. En segundo lugar quiero agradecer a Ivonne Olmedo por su paciencia y buena disposición, ya que sin ella no hubiese sido capaz de empezar ni de terminar esta tesis; a Mabel Catalán por toda su ayuda, además de sus buenos consejos y constantes ánimos para mi; a Raúl Vivar por responder siempre hasta mis dudas más básicas, incluso aquellas; a Pedro Ayala por ser tan buen compañero de laboratorio, por ayudarme a revelar y darme suerte con mis westernblots; a Diego Humeres por todo lo que he vivido en este tiempo, y por su ayuda a sobrevivir al infierno innombrable, y finalmente a Pía Boza, quien ha sido uno de mis pilares fundamentales en todo este proceso, por tenderme una mano amiga en mis experimentos y bueno por siempre estar ahí. A todos los fibros, de todo corazón muchas gracias por hacer de este período algo grato desde el comienzo, por la buena onda, las risas y muchas veces las rabias, por ser una hermandad y por tenerme fe. También quiero mencionar a don Fidel Albornoz, técnico del laboratorio de transducción de señales moleculares, quien me ayudó en muchas ocasiones y a quien le debo mucho con respecto a mis experimentos.

No puedo dejar afuera de estos agradecimientos a mis padres Víctor y Cecilia y a mi hermano Diego, por siempre exigirme más de la cuenta y no dejarme flaquear porque gracias a eso estoy aquí y he logrado todo lo que tengo hasta ahora. A mi abuelo Rogelio, que nunca dejó de creer en mi, por siempre ayudarme a salir de los malos momentos y por infundirme ánimos para continuar cualquier cosa en la que me embarqué. A la gran familia Muñoz, por apoyarme e impulsarme a llegar hasta acá. A mis compañeras de colegio, Elisa, Elizabeth, Jing, Javiera y Pía por hacerme ver que el camino que tomé fue el correcto y por estar cerca cada vez que las necesité.

También me gustaría extender mi agradecimiento a la Comisión de Difusión del Uso Racional del Medicamento en la que aprendí muchas cosas que me hicieron querer a esta carrera, además de los vínculos forjados con la profesora Olosmira Correa, el profesor Javier Morales y la periodista de la facultad, Bárbara López.

Tampoco quiero dejar afuera a mis compañeros de universidad, a mis amigos que hicieron que este proceso fuera divertido incluso cuando no había luz en el camino, por tenderme una mano cuando lo necesité y por hacerme ver que con esfuerzo las cosas se

pueden lograr. María José, Angelo, Pamela, Valentina, Claudia (Machalí), Francisco, Nicolás, Cristian (Vago), Natalia (Padilla), Pau, Camila, Daniel y Chure, gracias por todo.

A todos los que ya he mencionado y a toda la gente que siempre estuvo cerca de mi, sin excepción, les agradezco enormemente porque sin ustedes no sería la persona que soy ahora.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	Página
<i>Índice general</i>	4
<i>Índice de figuras</i>	6
<i>Abreviaturas</i>	7
<i>Resumen</i>	9
<i>Summary</i>	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Generalidades	11
1.2 Remodelamiento	11
1.3 Estructura del músculo cardíaco	12
1.3.1 Fibroblastos cardíacos	13
1.3.2 Miofibroblastos cardíacos	14
1.4 Receptores adrenérgicos en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos	15
1.4.1 Vía de señalización del AMPc	16
1.4.2 Rol de la Proteína quinasa A (PKA) en adhesión, migración y expresión de colágeno	18
2. HIPÓTESIS	21
3. OBJETIVO GENERAL	21
3.1 Objetivos específicos	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1 Reactivos	22
4.2 Modelo animal	23
4.3 Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos de ratas neonatas	23
4.4 Diferenciación	23
4.5 Viabilidad por conteo celular	23
4.6 Adhesión	24
4.7 Migración celular	24
4.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida	25
4.9 Electrotransferencia de proteínas	25
4.10 Inmunowestern blot	25

4.11 Expresión de resultados y análisis estadístico	26
5. RESULTADOS	27
5.1 Ensayos de viabilidad a las 14 y 24 h con H-89	27
5.2 Ensayos de adhesión	28
5.2.1 Adhesión de fibroblastos cardíacos neonatos sobre plástico	28
5.2.2 Adhesión de fibroblastos cardíacos neonatos sobre fibronectina	29
5.2.3 Adhesión de miofibroblastos cardíacos neonatos sobre plástico	30
5.2.4 Adhesión de miofibroblastos cardíacos neonatos sobre fibronectina	31
5.3 Migración	32
5.3.1 Migración de fibroblastos cardíacos neonatos	32
5.3.2 Migración de miofibroblastos cardíacos neonatos	34
5.4 Expresión de colágeno	36
5.4.1 Expresión de colágeno en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos neonatos, efecto de isoproterenol	36
5.4.2 Expresión de colágeno en fibroblastos cardíacos neonatos	38
5.4.3 Expresión de colágeno en miofibroblastos cardíacos neonatos	39
6. DISCUSIÓN	40
6.1 Influencia del H-89 sobre la viabilidad celular de fibroblastos cardíacos de rata neonata	40
6.2 Adhesión de fibroblastos y miofibroblastos cardíacos de ratas neonatas	41
6.3 Migración en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos de rata neonata	43
6.4 Expresión de colágeno en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos de rata neonata	45
7. CONCLUSIONES	47
8. LIMITACIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Esquema de las funciones desempeñadas por el fibroblasto en el proceso de remodelamiento cardíaco (RC)	14
Figura 2: Esquema del rol de PKA y Epac en fibroblastos, después de un daño	18
Figura 3: Activación de PKA por medio de la activación de receptor acoplado a proteína G (GPCR)	19
Figura 4: Ensayos de viabilidad de fibroblastos a las 14 y 24 horas luego de ser estimulados con H-89 (10µM , 5µM y 1µM)	27
Figura 5: Efecto del AMPc sobre la adhesión de FC sobre plástico	28
Figura 6: Efecto del AMPc sobre la adhesión de FC sobre fibronectina	29
Figura 7: Efecto del AMPc sobre la adhesión de MCN sobre plástico	30
Figura 8: Efecto del AMPc sobre la adhesión de MCN sobre fibronectina	31
Figura 9a: Fotografías de FC tomadas con microscopio electrónico (40x)	33
Figura 9b: Efecto de la migración celular sobre el cierre de la herida en FC	33
Figura 10a: Fotografías de MCN tomadas con microscopio electrónico (40x)	35
Figura 10b: Efecto de la migración celular sobre el cierre de la herida en MCN	35
Figura 11: Expresión de colágeno en FC y MCN estimulados con isoproterenol	37
Figura 12: Expresión de colágeno en FC estimulados con isoproterenol, forskolina, Me-AMPc y 6-Bz-AMPc	38
Figura 13: Expresión de colágeno en MCN estimulados con isoproterenol, forskolina, Me-AMPc y 6-Bz-AMPc	39

Abreviaturas:

5 Br-DU	: 5 bromo deoxiuridina
6 Bz-AMPC	: 6-N- bencil- 3', 5'-adenosina monofosfato cíclico
α SMA	: Alfa actina del músculo liso
AC	: Adenilato ciclasa
AMPC	: Adenosín monofosfato cíclico
APS	: Persulfato de amonio
ATP	: Adenosín trifosfato
Ang II	: Angiotensina II
cm	: Centímetros
CREB	: Elemento ligante que responde a AMPC
DE	: Desviación estándar
DMEM F-12	: Medio de mantención modificado Dulbecco
DMSO	: Dimetilsulfóxido
ECL	: Enhanced chemiluminescence
Epac	: Proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina activada por AMPC
ET-1	: Endotelina 1
FBS	: Suero fetal bovino
FCS	: Suero fetal de cabra
FCN	: Fibroblastos cardíacos neonatos
Fig.	: Figura
FSK	: Forskolina
GPCR	: Receptor acoplado a proteína G
GSK3- β	: Glicógeno sintasa quinasa 3- β
ICAM-1	: Moléculas de adhesión intercelulares
IGF-1	: Factor de crecimiento análogo a la insulina tipo 1
h	: horas
H-89	: N-[2-(p- bromocinamilamino)-etil]-5-isoquinolinasulfonamida
IL-4	: Interleuquina 4
ISO	: Isoproterenol
IWB	: Inmunowesternblot
kDa	: Kilo Dalton
MC	: Miofibroblastos cardíacos

MCN	: Miofibroblastos cardiacos de rata neonata
MCP-1	: Proteína quimioatrayente de macrófagos
Me-AMPC	:8-(4-clorofeniltio)-2-O-metiladenosina-3',5'-adenosina monofosfato cíclico
MEC	: Matriz extracelular
min	: Minutos
mg	: Miligramos
MLCK	: Quinasa de la miosina de cadena ligera
mM	: Milimolar
MMP	: Metaloproteasas
NaCl	: Cloruro de sodio
nm	: Nanómetros
nM	: Nanomolar
PBS	: Tampón fosfato salino
PDGF	: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PKA	: Proteína quinasa A
RC	: Remodelamiento cardíaco
rpm	: Revoluciones por minuto
SA	: Sistema adrenérgico
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SDS PAGE	: Gel de poliacrilamida desnaturante
SRAA	: Sistema renina angiotensina aldosterona
suFA	: Adhesiones focales supermaduras
TBS	: Tampón tris salino
TEMED	: N, N, N', N' –tetrametil-etilendiamina
TGF-β	: Factor de crecimiento transformante beta
µg	: Microgramo
µM	: Micromolar

Resumen:

El corazón está compuesto por varios tipos celulares, de los cuales aproximadamente el 90% corresponde a cardiomiocitos y a fibroblastos. Los fibroblastos representan 2/3 de la población total de células del corazón y están encargados principalmente del recambio de las proteínas de la matriz extracelular. Este tipo celular puede responder frente a una variedad de citoquinas, factores de crecimiento y expresan sus receptores, indicativo de una respuesta autocrina. Por acción del TGF- β 1 se diferencian a un fenotipo celular altamente secretor de colágeno, el miofibroblasto, principal célula encargada del proceso de cicatrización. Por otra parte, existen antecedentes que demuestran que en fibroblastos cardíacos la activación de las vías transduccionales que conducen a un aumento en los niveles de AMPc contribuye a disminuir el grado de fibrosis cardíaca, por regulación de procesos tales como adhesión, migración y la diferenciación a miofibroblasto.

Para estos efectos, el AMPc es crítico debido al rol que juegan dos proteínas que se activan cuando aumentan los niveles de éste; estas son Epac (Exchange protein activated by cAMP/ proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina activada por AMPc) y PKA (proteína quinasa A). Anteriormente se estudió el rol desempeñado por la Epac en los procesos de adhesión y migración de fibroblastos y miofibroblastos, en donde se vio que Epac aumenta la adhesión en ambos fenotipos celulares, y con respecto a migración, se vio que los estímulos que aumentan los niveles de AMPc aumentan la migración en fibroblastos, pero no así en miofibroblastos. Con esto surge la interrogante de saber cómo modula la PKA estos procesos. El objetivo de este trabajo fue determinar el rol que juega la PKA en adhesión, migración y expresión de colágeno. Se utilizaron estímulos que aumentan los niveles de AMPc (isoproterenol y forskolina), el agonista de la PKA 6-Bz-AMPc y su inhibidor H-89.

Nuestros resultados mostraron que tanto en fibroblastos como en miofibroblastos, hubo un aumento de la adhesión al estimular con isoproterenol y forskolina, pero con 6-Bz-AMPc no se observó un cambio significativo con respecto al control, aunque sí tendió a disminuir lo que indica que la PKA no regula la adhesión celular. En migración no se observa efecto alguno con el agonista de la PKA y en la expresión de colágeno se vio una disminución con isoproterenol, forskolina, 6-Bz-AMPc y Me-AMPc tanto en fibroblastos como en miofibroblastos.

Conclusión: PKA no interviene dentro de los procesos de adhesión y migración, pero sí lo hace en la expresión de colágeno.

Summary:

Activation of PKA decreases adhesion, migration and collagen expression in neonate rat cardiac fibroblasts and myofibroblasts.

The heart is composed by many types of cells, mainly cardiomyocytes and fibroblasts (almost 90% of total cells). Fibroblasts represent two thirds of the whole heart cell population and are responsible for the constant turnover of extracellular matrix proteins. This kind of cells can respond to many cytokines, growth factors and express their receptors indicating an autocrine answer. By the action of TGF- β 1, they can be differentiated into a new phenotype called myofibroblasts, highly secreting of collagen and main cell involved into the healing process. Otherwise, there are numerous reports indicating that in cardiac fibroblasts, activation of signal transduction pathways leading to increased cAMP levels contributes to the reduction of cardiac fibrosis by regulating profibrotic processes like adhesion, migration and myofibroblast differentiation.

For these effects cAMP is critical due to the role played by two proteins whose activation depends on the increase in the cAMP levels. These proteins are Epac (Exchange protein activated by cAMP) and PKA (protein kinase A). Formerly it was studied the role played by Epac in adhesion and migration of fibroblasts and myofibroblasts. Epac increased cell adhesion in both phenotypes, and about migration, in fibroblasts this phenomenon was increased with all the stimuli that increased the cAMP levels, whereas in myofibroblasts were no effect. So, we can ask about the role lead by PKA in these processes. The objective in this work was determined which role plays PKA in adhesion, migration and collagen expression. We used stimuli that increase cAMP levels (isoproterenol and forskolin), PKA's agonist 6-ph-cAMP and its inhibitor H-89.

Our results showed that both fibroblasts and in myofibroblasts there was an increase in cell adhesion in response to isoproterenol, forskolin and H-89, but with 6-ph-cAMP no significant change was observed respect control but tended to decrease, indicating that PKA is not involved in cell adhesion. In migration no effect was observed with 6-ph-cAMP, and finally in collagen expression these stimuli decreased the expression (we tried with Epac agonist Me-cAMP too) in both phenotypes.

Conclusion: PKA does not intervene in adhesion and migration processes, but it does in collagen expression.

1. Introducción:

1.1 Generalidades:

Existe una gran cantidad de enfermedades que puede padecer el ser humano y dentro de las cuales las cardiovasculares constituyen una de las principales causas de muerte a nivel mundial, especialmente en los países con un nivel de desarrollo intermedio o avanzado, debido a un fenómeno conocido como transición epidemiológica [1]. En Chile estas enfermedades corresponden a la primera causa de muerte, generando aproximadamente unas 24.000 cada año. Dentro de estas patologías encontramos accidentes cerebrovasculares y cardiopatías tales como insuficiencia cardíaca, hipertensión arterial, angina de pecho, etc. [2].

1.2 Remodelamiento cardíaco:

Un fenómeno común en todas estas patologías es el desarrollo del remodelamiento cardíaco (RC), que corresponde a un proceso caracterizado por cambios en la anatomía, geometría, histología, así como también a nivel molecular del tejido cardíaco, que se observa en respuesta a una sobrecarga de trabajo o daño al miocardio. [3,4]. Dichos cambios alteran las funciones cardíacas y a nivel macroscópico se observa un cambio en la forma del corazón, pasando desde una forma elipsoide a una más esférica, además de una hipertrofia cardíaca y fibrosis cardíaca [4]. Una vez que se ha producido un daño cardíaco (como por ejemplo infarto agudo al miocardio, sobrecarga de presión o volumen, inflamación, etc.) se activan diversos mediadores neurohormonales (Sistema Renina Angiotensina Aldosterona: SRAA, Sistema Adrenérgico: SA, endotelina), liberación de factores de crecimiento (TGF- β 1) y de citoquinas (TNF- α , IL-1 β), estrés oxidativo, etc., los cuales en forma organizada ponen en movimiento los procesos genéticos, moleculares y celulares que conducen al remodelado del tejido. [5,6]

El RC puede ser de dos tipos: *reactivo* cuando se genera gracias a un mecanismo compensatorio frente a un estado patológico, o *reparativo*, que se presenta en respuesta a la pérdida masiva de células parenquimáticas por muerte celular [7].

En condiciones fisiológicas y/o fisiopatológicas los procesos celulares de proliferación, muerte celular, hipertrofia, migración, adhesión, capacidad contráctil y secreción de proteínas de la matriz extracelular (MEC) participan de forma integrada, sincronizada y controlada en la mantención y/o reparación del tejido cardíaco [8]. La

sobreactivación de uno de estos procesos puede desembocar en la aparición de una fibrosis cardíaca, la cual finalmente conduce a una insuficiencia cardíaca [9].

1.3 Estructura del músculo cardíaco:

A nivel celular, el corazón está conformado por diversos tipos celulares, de los cuales el 90% corresponde a cardiomiocitos y fibroblastos que coordinan y regulan la función cardíaca. Los fibroblastos cardíacos (FC) representan aproximadamente dos tercios de la cantidad total de células cardíacas y su rol es el recambio (síntesis, secreción y degradación) de las proteínas de la MEC [10], incluyendo colágeno tipo I, III y VI, proteoglicanos, fibronectina, laminina, etc, con el fin de regular y mantener la estructura del corazón. Además, estas células son capaces de sensar y transmitir señales químicas, mecánicas y eléctricas entre los componentes celulares y no celulares [11,12].

En una condición patológica, como por ejemplo, un infarto al miocardio, los FC son activados rápidamente en respuesta a este daño, jugando un rol activo como células claves del proceso de reparación y cicatrización. Esta activación se lleva a cabo gracias a la producción de múltiples citoquinas y factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$), en especial el $TGF-\beta_1$, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento análogo a la insulina tipo I (IGF-1) y la interleuquina 4 (IL-4) [4], los cuales pueden actuar de forma autocrina o paracrina, facilitando la acción reparadora de los fibroblastos, estimulando su diferenciación a miofibroblastos cardíacos (MC). Estas células ya diferenciadas expresan una proteína conocida como alfa actina del musculo liso (α -SMA) y durante el proceso de reparación del tejido cardíaco son los principales responsables de la síntesis de numerosas proteínas de la MEC, incluyendo colágeno, fibronectina y laminina. Asimismo, los MC están encargados de liberar citoquinas, factores de crecimiento, angiotensina II y en forma adicional, incrementan el número de receptores para estos mediadores [6].

Definitivamente la causa más común de fibrosis cardíaca es el infarto agudo al miocardio y en este caso los principales elementos celulares encargados de su desarrollo son el miofibroblasto en la zona remota y el fibroblasto en la zona dañada. Pese a que el RC y con ello la fibrosis ocurren por diferentes condiciones etiológicas, las vías que conducen al remodelamiento en términos de cambios moleculares, bioquímicos y mecánicos son en general comparables [13]. La fibrosis cardíaca se genera por la expresión de diferentes mediadores entre los que destacan por su importancia, moléculas

de adhesión intercelulares (ICAM-1), proteína quimioatrayente de macrófagos (MCP-1), endotelina-1 (ET-1) y el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). Estos componentes participan en el desarrollo del proceso fibrótico y en conjunto con otros mediadores endógenos tales como Angiotensina II (Ang II) dan cuenta de la disfunción ventricular [4].

1.3.1 Fibroblastos cardíacos:

Con respecto a los FC se pensaba que estos tenían una función meramente estructural. Sin embargo, hoy se conoce que son un elemento celular muy activo, puesto que tienen la capacidad de migrar, proliferar y diferenciarse [14]. Debido a que pueden regular su estructura y propiedades mecánicas y eléctricas, los FC son uno de los actores principales en el tejido cardíaco, junto a los cardiomiocitos encargados del trabajo contráctil del corazón. Además los FC son los encargados de mantener la estructura del miocardio al controlar la homeostasis de la MEC mediante la secreción de citoquinas, factores de crecimiento y metaloproteasas (MMP) [15,16] (ver figura 1).

Cuando un tejido sufre un daño puede ser reparado mediante dos etapas; la primera es la fase regenerativa, en donde las células dañadas son reemplazadas por células del mismo tipo, excepto los cardiomiocitos y una fase conocida como fibrosis, en donde el tejido normal es reemplazado por tejido conectivo [16].

En el RC producido debido a alguna patología cardíaca como infarto agudo al miocardio, hipertensión o insuficiencia cardíaca, los fibroblastos son activados rápidamente en respuesta a este daño, participando como células claves del proceso reparativo y de cicatrización [17]. Cuando estas células se activan, comienzan a proliferar, expresar y secretar colágeno (principalmente de tipo I y III) y a degradar la MEC.

La MEC cardíaca es una red de tejido conectivo sensible a cambios en su entorno, cumpliendo un papel clave en la decodificación de señales mecánicas y transmitiéndola a los fibroblastos [18]. Éstos se encargan de sensar estos cambios a través de mecanorreceptores tales como integrinas y algunos canales iónicos [19] y como consecuencia se producen alteraciones en la síntesis de proteínas de la MEC, liberación de factores de crecimiento y MMP's. Todo esto trae como consecuencia fibrosis, además de alterar la conducción y por ende, ser capaz de generarse arritmias [11].

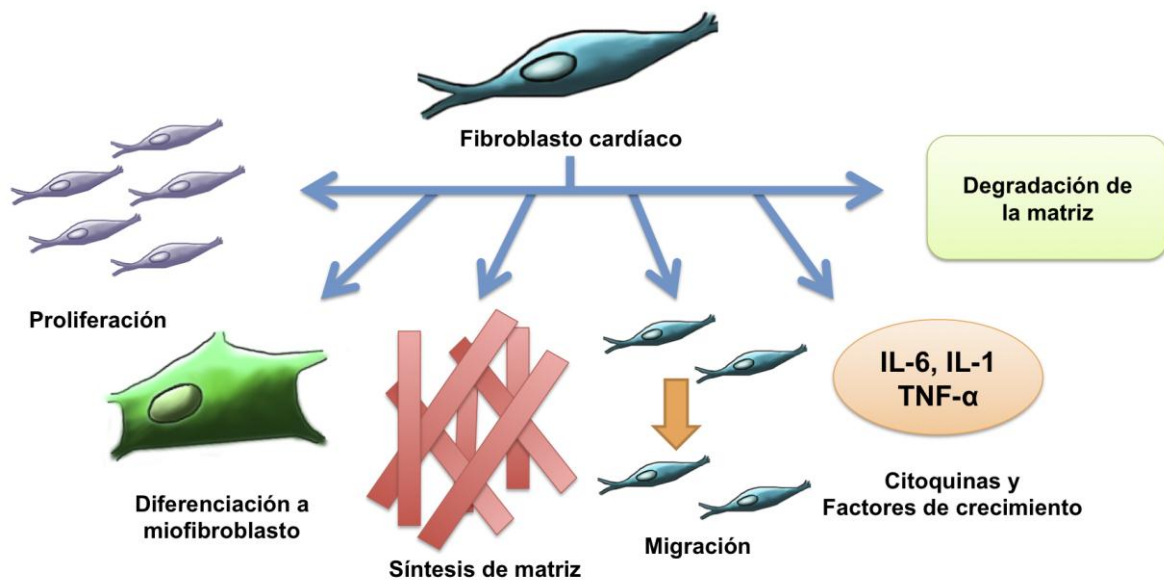


Fig.1. Esquema de las funciones desempeñadas por el fibroblasto en el proceso de remodelamiento cardíaco (RC) [11].

1.3.2 Miofibroblastos cardíacos:

Los fibroblastos tienen la capacidad de diferenciarse; *in vitro* se ha visto que esta diferenciación puede darse por el estrés mecánico junto a la presencia de TGF- β 1 y fibronectina ED-A. Ello significa que las células al adherirse a las placas de cultivo se activa la diferenciación, por lo que este fenotipo diferenciado va incrementando su número a medida que aumentamos el número del pasaje celular [20]. Sin embargo, este proceso también se ve estimulado por hormonas y citoquinas: Ang II, ET-1 y TGF- β 1. Este último es un factor crítico, ya que además de ayudar en la diferenciación, también lo hace en la formación y secreción de colágeno [21].

Una característica de este fenotipo celular es la formación de fibras de estrés y la expresión de una proteína conocida como alfa actina del músculo liso (α -SMA) [22], lo que le confiere mayor capacidad contráctil, especialmente en el borde de las heridas. Las células interactúan con el fragmento ED-A de la fibronectina de la MEC a través de las integrinas α 5 β 3 o α 5 β 1, mediante una compleja composición proteica con altos niveles de vinculina, paxilina y tensina; dando origen a las adhesiones focales supermaduras (suFAs) [24]. Todos estos elementos conforman un mecanismo mecano-transductor especializado y característico. Las suFAs potencian la adhesión del miofibroblasto a las

proteínas de la MEC, lo cual sumado a su aparato contráctil permite generar una considerable transmisión mecánica en su entorno extracelular.

Los miofibroblastos son células que normalmente no se encuentran en el tejido cardíaco, sino que aparecen en el momento del daño y funcionalmente son capaces de secretar cantidades más grandes de proteínas de la MEC comparado al fibroblasto [3,11]. Debido a esto, son los principales responsables del depósito de estas proteínas en el proceso de reparación del tejido [22]. Conociendo esto, además del aumento del recambio de colágeno y la degradación de la MEC por acción de las MMP los posicionan como células críticas para el proceso de RC. También se ha demostrado *in vivo* que tienen mayor propiedad de migración y proliferación que los fibroblastos, lo que los vuelve aptos para reclutarse en la zona del daño y con esto reparar el tejido [23].

1.4 Receptores adrenérgicos en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos:

La homeostasis del sistema cardiovascular depende de la acción conjunta de muchos neurotransmisores y hormonas. Como bien se sabe, a nivel cardíaco la proliferación celular, la contracción, frecuencia y conducción cardíaca, así como la síntesis de proteínas de la MEC son controladas por diversos tipos de receptores [25]. En el fibroblasto cardíaco, receptores de tipo β -2 adrenérgico, de adenosina (A2b), Ang II, bradicininas, prostaglandinas, urotensina II, urocortina y vasopresina, son algunos de los encargados de modular las funciones de dicho tipo celular tanto en condiciones fisiológicas como patológicas [26].

De la gran cantidad de receptores presentes en el corazón, los más estudiados son los de tipo adrenérgico debido al rol que juegan en la regulación del sistema cardiovascular [27]. Está descrito que los fibroblastos cardíacos de ratas adultas presentan sólo un subtipo de receptor adrenérgico, correspondiente al receptor β 2 [28,29]. Este receptor es del tipo de 7 dominios transmembrana y puede estar acoplado dualmente a proteína G (GPCR) estimuladora (Gs) e inhibitoria (Gi). Dichas proteínas están constituidas por 3 subunidades, el complejo $\beta\gamma$ y la subunidad α [30]. El tipo de señal generado está dado por las subunidades α . Cuando se acoplan a Gi el GPCR inhibe la adenilato ciclasa (AC), mientras que cuando se acopla a Gs, el GPCR activa a la AC, lo que se traduce en un incremento en los niveles de 3',5'-adenosina monofosfato cíclico

(AMPc) [31], quien es el encargado de activar a la proteína quinasa A (PKA), que a su vez mediante fosforilación es capaz de activar a diversos intermediarios [32]; o a la proteína Epac.

Se ha descrito que los agonistas β -adrenérgicos son capaces de inhibir la síntesis de colágeno en FC y como inhibidores de la contracción de geles de colágeno en fibroblastos de pulmón [33]. Además, estudios realizados en este laboratorio han demostrado la presencia de receptor β 2 en MC y que el agonista β -adrenérgico isoproterenol (ISO) induce la proliferación celular de fibroblastos cardíacos [34]. Por otro lado, el ISO inhibe los efectos profibróticos del TGF- β 1 y la diferenciación del fibroblasto a miofibroblasto, lo cual es indicio de un posible efecto antifibrótico de la estimulación adrenérgica vía aumento de los niveles de AMPc [35].

Estudios en otros tipos de fibroblastos, como los de pulmón humano han demostrado que el TGF- β 1 disminuye el número de receptores β -adrenérgicos, aún manteniendo la afinidad por ISO [36,37]. Más allá de estos antecedentes, poco es lo que se conoce acerca de las vías transduccionales activadas por las catecolaminas en miofibroblastos cardíacos neonatos (MCN).

1.4.1 Vía de señalización del AMPc:

En esta vía están involucradas dos proteínas activadas por AMPc; además de otros efectores, la proteína quinasa A (PKA) y la EPAC (del acrónimo *Exchange protein activated directly by cAMP* o proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina). Epac tiene 2 isoformas denominadas Epac-1, la que se encuentra principalmente en el cerebro, corazón, riñón, páncreas, ovario, tiroides y médula espinal, y Epac-2 que es menos abundante y se encuentra en algunas zonas del cerebro, en la médula adrenal y en los islotes de Langerhans [38]. Epac regula la actividad de las GTPasas pequeñas Rap 1 y Rap 2 [20,21], mientras que la PKA regula la activación de factores de transcripción como el CREB (*cAMP response element-binding*, elemento de respuesta que une a AMPc) o GSK3- β (glucógeno sintasa quinasa 3- β) [39]. Estas proteínas se sitúan en la membrana plasmática, en las regiones perinucleares, en la membrana nuclear y mitocondria. El aumento del AMPc puede ser mediado por la activación del receptor β -adrenérgico, receptores de adenosina (A2b) y de prostaglandinas [31]. Al estar todos estos receptores acoplados a proteína Gs activarían la AC y ésta respondería sintetizando AMPc, que finalmente activaría a PKA o Epac dependiendo de la concentración de AMPc y/o de la

compartimentalización intracelular de los efectores. Otros reportes que indican que la activación de PKA o de Epac dependerá de la concentración intracelular de AMPc, sugiriendo que a niveles altos de AMPc se activará la PKA, mientras que a bajas concentraciones se activará la Epac [40,42]. También se ha descrito que los niveles de AMPc pueden activar una proteína por sobre la otra, pero no siempre resulta ser de este modo por lo que aún se sigue investigando. Dependiendo de quién se active, los efectos serán muy distintos. Por ejemplo, la vía de la Epac induce un aumento en la migración y una disminución de la secreción/efecto de factores profibróticos como el TGF- β 1, mientras que por otro lado la PKA disminuye la migración celular y la síntesis de colágeno.

Sabiendo esto, podemos visualizar diferentes blancos para incrementar los niveles de AMPc. En primer lugar está la activación del receptor β -adrenérgico mediante el uso de un agonista como es el ISO. Otro blanco en la cascada transduccional es aumentar los niveles de segundo mensajero por medio de la activación de la AC utilizando forskolina (FSK) que es un agonista de la AC. Como último punto de intervención, podemos emplear un agonista específico de AMPc que se una selectivamente a Epac, como el compuesto 8-(4-clorofeniltio)-2-O-metiladenosina-3',5'-adenosina monofosfato cíclico (Me-AMPc) que al reemplazar el OH del AMPc por un grupo metilo en posición 2, disminuye la afinidad hacia PKA y al añadir el grupo paraclorofeniltio (PCPT) aumenta la afinidad por Epac [41], y por el lado de PKA se utiliza el compuesto 6-N- bencil- 3', 5'-adenosina monofosfato cíclico (6-Bz-AMPc), correspondiente al agonista específico de la PKA.

Después de la injuria, los niveles de hormonas que elevan la concentración de AMPc están aumentadas. La síntesis de AMPc por adenilato ciclasa estimula a Epac y a PKA. La Epac promueve la migración de fibroblastos, mientras que la PKA inhibe la migración y la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto. Tanto Epac como PKA inhiben la síntesis de colágeno y la proliferación de los fibroblastos, pero en el caso de Epac, los estímulos profibróticos inhiben su expresión y por ende, se estimula la síntesis de colágeno [42] (ver figura 2).

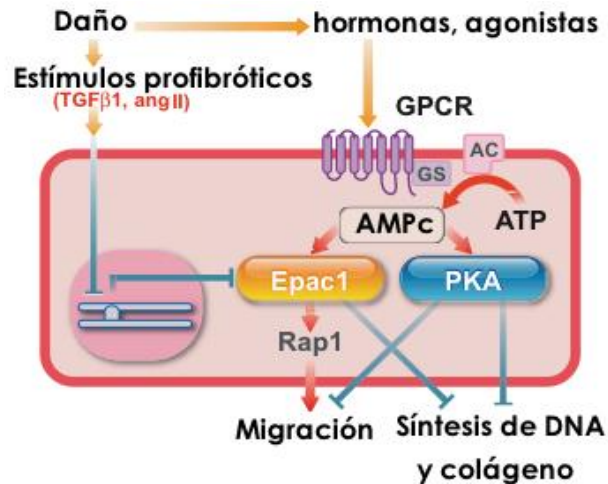


Fig.2: Esquema del rol de PKA y Epac en fibroblastos, después de un daño. [42]

1.4.2 Rol de la Proteína quinasa A (PKA) en adhesión, migración y expresión de colágeno:

Las proteínas quinasas están involucradas en casi todos los procesos celulares regulables. Como ejemplo, la PKA, que es una proteína quinasa activada por AMPc, y debido a su amplia distribución a nivel subcelular está involucrada en muchos procesos tales como apertura de canales de calcio en células del miocardio, aumento de la recaptación de calcio a nivel del retículo endoplasmático en células del músculo liso bronquial, estimulación de enzimas que participan en la síntesis de estrógenos, entre otras [43]. Se sabe que regula proteínas directamente mediante fosforilación y que activa factores transcripcionales (ver figura 3). Una gran parte de las proteínas quinasas poseen una secuencia de 11 subdominios conservados, el core catalítico, en conjunto con sus tareas respectivas de modular proteínas sustratos por fosforilación de residuos de serina, treonina o tirosina [44].

La PKA fue una de las primeras proteínas quinasas en ser descubierta. A diferencia de la mayoría de las proteínas quinasas de eucariontes está compuesta por dos subunidades: la catalítica (C) y la reguladora (R). La subunidad C es fosforilada para activar a la PKA mientras que el AMPc se une a la subunidad R, induciendo cambios conformacionales que llevan a la disociación de la holoenzima en sus subunidades correspondientes C y R. La subunidad C libre y activa puede afectar diversos eventos celulares por fosforilación de muchas proteínas sustrato citoplasmáticas y nucleares

incluyendo enzimas y factores transcripcionales. [45,46]

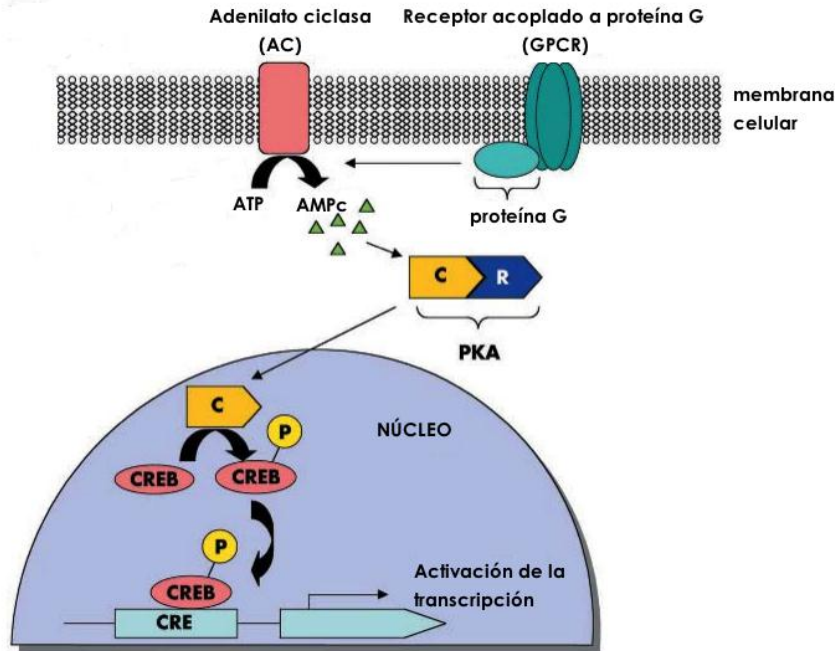


Fig.3: Activación de PKA por medio de la activación de receptor acoplado a proteína G (GPCR). [47]

Como ya se ha descrito, la PKA es una proteína quinasa activada por AMPc siendo capaz de regular una infinidad de procesos bioquímicos. Pese a esto, se desconoce una parte de su mecanismo de acción. La PKA es clave, porque los antecedentes señalan que participa activamente en los procesos relacionados a la fibrosis y al RC en conjunto con Epac. Anteriormente, en nuestro laboratorio se investigó la influencia y rol que juega Epac en los procesos relacionados a la fibrosis y al RC, pero con respecto a la PKA no se tenían mayores antecedentes salvo los pocos que menciona la literatura. En FC de rata adulta se ha visto que la PKA inhibe la síntesis de colágeno, la migración celular, la proliferación y la diferenciación celular. Pero aún se desconoce el rol de la PKA al modular estos procesos en MCN.

Finalmente, tanto FC como MCN tienen una importante participación en aquellos procesos celulares asociados al RC tales como adhesión, migración, expresión/secreción de colágeno y contracción de geles de colágeno (matriz tridimensional similar al proceso reparativo). Pese al importante papel que juega el AMPc en estos procesos, existen muy

pocos antecedentes de cómo la PKA sería capaz de regularlos en fibroblasto y más aún en miofibroblastos. Entonces, sabiendo que el AMPc activa a Epac y a PKA surge la interrogante de conocer lo que ocurre con la adhesión, migración y síntesis de colágeno cuando se activa PKA, en fibroblastos y miofibroblastos, lo que nos ha llevado a plantear la siguiente hipótesis:

2. Hipótesis:

- La activación de la PKA disminuye la adhesión, migración y expresión de colágeno en fibroblastos y miofibroblastos de ratas neonatas.

3. Objetivo general:

Estudiar si agonistas del receptor β -2 adrenérgico, análogos de AMPc y el agonista directo de la PKA regulan procesos de adhesión, migración, y expresión de colágeno en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos de rata neonatas.

3.1 Objetivos específicos:

- 1) Estudiar participación de la PKA sobre proceso de adhesión y migración en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos de rata neonata mediante el uso de agonista de PKA (6-Bz-AMPc) y su inhibidor H-89.
- 2) Estudiar la participación de Epac y PKA sobre la expresión de colágeno utilizando los agonistas directos de ambas proteínas.

4. Materiales y Métodos:

4.1 Reactivos:

De Sigma Aldrich. (St. Louis, MO, EEUU): Azul de tripán, isoprotenerol, forskolina, Me-AMPc (8-(4-clorofeniltio)-2-O-metiladenosina-3',5'-adenosina monofosfato cíclico), 6-Bencil- AMPc (6-N- bencil- 3', 5'-adenosina monofosfato cíclico), H-89 (N-[2-(p-bromocinamilamino)-etil]-5-isoquinolinasulfonamida), Angiotensina II, Cristal Violeta.

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

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

De Winkler: compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes.

De PerKin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA, EEUU): El reactivo quimioluminiscente para western blot (Western Lightning)

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

De Chemicon (Tamecula, CA, USA). Colágeno, fibronectina, accutasse y TGF- β 1

4.2 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.

4.3 Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos de ratas neonatas:

Se utilizó el procedimiento descrito por Foncea y cols., con leves modificaciones. Las ratas se decapitaron e inmediatamente se les removió el corazón bajo condiciones de asepsia, se retiraron las aurículas y los ventrículos siendo cortados en pequeños trozos para facilitar las sucesivas digestiones posteriores con pancreatina y colagenasa II. El producto de las digestiones se sometió a un preplaqueo por 2 h a 37°C en medio de cultivo conteniendo 5% FBS y 10% FCS en frascos para cultivo celular. Por adhesión diferencial al plástico se separaron fibroblastos de cardiomiocitos. Transcurridas las 2 h, se cambió el medio por DMEM-F12 + 10% FBS, dejando proliferar a los fibroblastos hasta confluencia en condiciones convencionales de cultivo (5% de CO₂ y 37°C). Los cambios de pasaje se realizaron mediante tripsinización de los fibroblastos alcanzando un máximo de pasaje 2.

4.4 Diferenciación:

Se utilizaron fibroblastos cardíacos neonatos (FCN) en pasaje 2, los cuales se cultivaron por 96 h en medio DMEM-F12 suplementado con TGF-β1 5 ng/mL. En nuestro laboratorio está estandarizado que bajo estas condiciones el 100% de los fibroblastos se diferenciaron a MCN. Una vez cumplido el tiempo se retiró el medio suplementado y los MCN se mantuvieron por 24 h con DMEM-F12. Los miofibroblastos obtenidos se utilizaron para los ensayos posteriores.

4.5 Viabilidad por conteo celular:

Se sembraron FCN en placas de 60 mm, a una razón de 2×10^5 células/cm², cultivadas en medio DMEM F-12 + 10% de FBS. 24 horas más tarde fueron privadas de suero, y estimuladas con H-89. Transcurridas 14 horas, las placas fueron lavadas 2 veces bajo campana con PBS 1x estéril y se les puso 300μL de tripsina 1x para soltar las células

de la placa. Una vez sueltas, se homogeneizó cuidadosamente con pipeta hasta disolver los grumos de células. Luego se añadió 1mL de DMEM F-12 + 10%FBS a cada placa y se traspasó el volumen de cada placa a un tubo eppendorff de 1.5 mL, del cual se tomó una alícuota de 20µL de la suspensión y se le agregaron 20µL de solución de azul de tripán. Se homogeneizó y de la suspensión resultante se tomó una alícuota de 20µL, la cual se puso en una cámara de Neubauer doble para proceder al conteo. Las células que no retienen el azul de tripán en su interior son las que se consideran viables y se proceden a contar.

4.6 Adhesión:

Se utilizaron MCN y FCN obtenidos como se describió en el punto que se refiere a aislamiento y cultivo de FCN y MCN. Las células se incubaron durante 24 h con los distintos estímulos y cumplido este tiempo se soltaron los FCN con tripsina 1x y los MCN con Accutasse 1X y se sembraron 10.000 células por pocillo en placas previamente tratadas con fibronectina 100 µg/mL y no tratadas (plástico). Se les permitió a las células adherirse por 2 horas a 37°C, tiempo después del cual fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con cristal violeta. Posteriormente se disolvió el cristal violeta retenido por las células adheridas a la placa con SDS 10% y se midió por espectrofotometría a 595 nm.

4.7 Migración celular:

Se utilizaron MCN y FC obtenidos como se describe en el punto que se refiere a aislamiento, cultivo y diferenciación de FC y MCN cardíacos de ratas. Las células se sembraron a una densidad de 15×10^4 células/cm² para FCN, y 8×10^4 células/cm² de MCN en placas de 35 mm. Las células se mantuvieron en medio DMEM F-12 por 24 h, tiempo después del cual se les realizó una herida en la placa de cultivo y se adicionaron los estímulos por 48 h en medio DMEM F-12. Cumplido el tiempo las células se lavaron con PBS 1x y posteriormente fueron fijadas por 20 minutos con una solución de cristal violeta 0,3%. Transcurrido este tiempo las células se lavaron con agua tres veces y finalmente se observó mediante microscopía óptica 40x la migración de células sobre la herida (cierre de la herida). Este cierre fue fotografiado y posteriormente medido con el programa computacional Image J, y posteriormente graficado con Prism Graphpad.

4.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida:

La separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida según Laemmli, 1970. Para la detección de colágeno se cargaron 50 µg de extracto proteico. Los geles concentrador (3,78mL de upper buffer 4x (Tris base 30g, HCl pH 6.8; 20 mL SDS 10%, 500mL agua destilada) + 1,98mL A/BA + 150µL APS 10% + 30µL TEMED solución stock + 9,24 mL de agua destilada para dos geles) y separador (5mL de lower buffer 4x (Tris base 90g, HCl pH 8.8, 20 mL SDS 10% + 500mL de agua destilada) + 4mL A/BA + 150µL APS + 30µL TEMED + 11mL de agua destilada para 2 geles) fueron al 5% y 6% respectivamente. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 Volt en tampón de electroforesis 1X (Tris base 30,25 g, Glicina 144 g, SDS 10 g, agua 1000 mL para tampón de electroforesis) durante aproximadamente 110 minutos.

4.9 Electrotransferencia de proteínas:

Una vez realizada la electroforesis las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) de 0,2 µ a 0,40 Amperes durante 180 min en tampón de transferencia 1X.

4.10 Inmunowestern blot (IWB):

Una vez transferidas, las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (TBS; Tween-20 0,1% (TBS-T); leche sin grasa 5% p/v) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios en tampón de incubación (TBS-T 0,1%) a una dilución 1:1000 toda la noche a 4°C con agitación suave. Posterior a la incubación, las membranas se lavaron 3 veces por 10 min en TBS-T al 0,1%, e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo, a un título de 1:10000 en tampón de bloqueo TBS-T al 0,1%.

Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron con el sustrato quimioluminiscente "Western Lightning" (ECL) y se expusieron por aproximadamente 30 segundos a la película de fotografía AGFA. Las películas se digitalizaron y las imágenes fueron sometidas a densitometría con ayuda de los programas computacionales Photoshop 7.0 e imageJ. Después de realizar los ensayos de

inmunowestern blot, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 10 min en una solución mild stripping (15 g de glicina, 1 g de SDS, 10 mL de Tween 20, Agua nanopura csp 1L, pH 2,2) para desprender los anticuerpos, posteriormente se lavaron en TBS al 0,1% por tres veces durante 10 minutos. Luego de este tratamiento, las membranas pudieron ser reutilizadas para ensayos de western blot con beta-tubulina como control de carga.

4.11 Expresión de resultados y análisis estadístico:

Los resultados se expresan como promedio \pm DE (n=3-6 preparaciones celulares independientes). Las comparaciones entre los distintos grupos experimentales versus el control se realizó utilizando t-Student de una cola o análisis de ANOVA y test de Dunnet. Se estableció como nivel de significancia un $p < 0,05$.

5. Resultados:

5.1 Ensayos de viabilidad de FC a las 14 y 24 h con H-89:

Para poder evaluar el papel que desempeña la PKA en adhesión, migración y expresión de colágeno fue necesario hacer ensayos de viabilidad con el inhibidor de la PKA (H-89), ya que se tenía el antecedente de que induce muerte celular. Se ensayó en 3 concentraciones distintas y se realizó conteo de viabilidad por exclusión con azul de tripán. En la figura 4 se muestra que a las 14 o 24h de estímulo hubo una gran pérdida de viabilidad celular a 10 μ M (65%), mientras que a 5 μ M fue un 25% a las 14 h, y de 35% a las 24 h. No hubo pérdida de la viabilidad con H-89 1 μ M, ni con DMSO (vehículo de H-89).

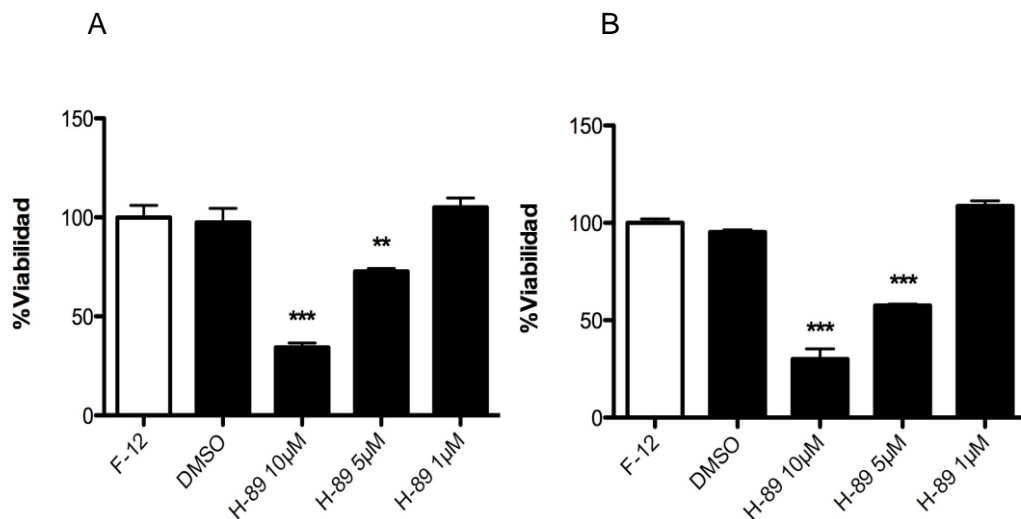


Fig.4: Ensayos de viabilidad de fibroblastos a las 14 y 24 horas luego de ser estimulados con H-89 (10 μ M , 5 μ M y 1 μ M). Resultados de los ensayos de viabilidad celular A) a las 14 horas y B) a las 24 horas. Se cuantificó la viabilidad mediante conteo celular por exclusión con azul de tripán. Los estímulos utilizados fueron H-89 en concentración de 10 μ M, 5 μ M y 1 μ M. Como controles DMEM-F-12 y DMSO (vehículo del H-89) n=4 \pm DE. **p<0,01 y ***p<0,001 para ambos tiempos.

5.2 Ensayos de Adhesión:

5.2.1 Adhesión de fibroblastos cardíacos neonatos sobre plástico:

Para evaluar el comportamiento de los FC sobre plástico se evaluó su capacidad de adhesión utilizando estímulos que aumentaban los niveles de AMPc 24 horas antes de realizar el protocolo de adhesión (cuando se utilizaron dos estímulos simultáneos el H-89 se puso media hora antes).

Como se ve en la figura 5 no hubo cambios significativos en la adhesión de FC al plástico, independiente de los estímulos utilizados.

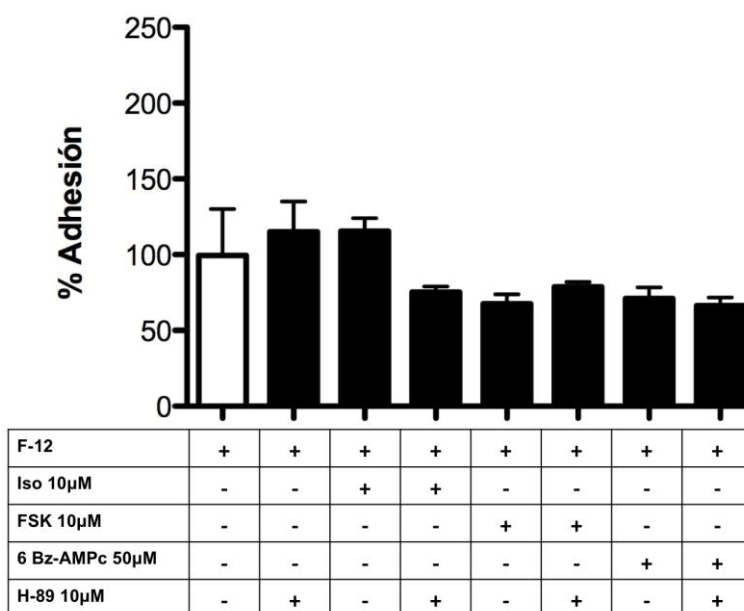


Fig.5: Efecto del AMPc sobre la adhesión de FC sobre plástico. Se evaluó la adhesión de FC sobre plástico, estimulando 24 horas antes de realizar el protocolo de adhesión. Los estímulos utilizados fueron Iso 10µM, FSK 10µM, 6-Bz-AMPc 50µM y H-89 10µM. Como control se usó DMEM-F-12 n=7 ±DE.

5.2.2 Adhesión de fibroblastos cardíacos neonatos sobre fibronectina:

Al no observarse diferencias en la adhesión de FC a plástico se decidió funcionalizar la placa con fibronectina. Ésta es una proteína de la matriz extracelular y está demostrado que aumenta la adhesión celular debido a que estimula el ensamblaje de las proteínas de adhesión a la matriz como las integrinas. Con este antecedente podemos pensar que la adhesión de los fibroblastos debería aumentar para todos los estímulos utilizados.

Como se ve en la figura 6, esta vez si hubo aumento de la adhesión celular con todos los estímulos utilizados. Al estimular con ISO y FSK aumentó significativamente en aproximadamente un 80%, y al estimular con FSK+H-89 el aumento fue de casi un 90% más con respecto al control. Con respecto al 6-Bz-AMPc, no se observó un cambio significativo de la adhesión.

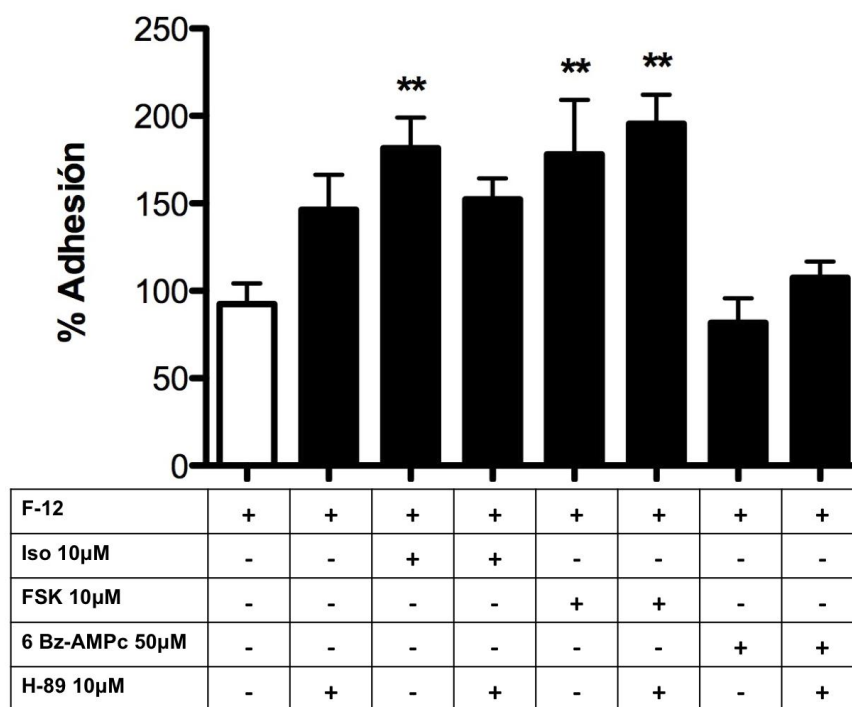


Fig.6: Efecto del AMPc sobre la adhesión de FC sobre fibronectina. Se evaluó la adhesión de FC sobre fibronectina, estimulando 24 horas antes de realizar el protocolo de adhesión. Los estímulos utilizados fueron ISO 10µM, FSK 10µM, 6-Bz-AMPc 50µM y H-89 10µM. Como control se utilizó DMEM-F-12 n=5 ±DE, **p<0,01.

5.2.3 Adhesión de miofibroblastos cardíacos neonatos sobre plástico:

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en FC, se espera que la adhesión sobre plástico de los MCN sea mayor porque corresponden a un fenotipo celular que abarca mayor superficie y que tiene más complejos de adhesión focal y de mayor tamaño, por lo que deberían adherirse más al plástico que los FC. Al igual que en el caso de los FC, el experimento se realizó de la misma forma con MCN bajo las mismas condiciones. Al analizar la figura 7, se puede decir que hubo un aumento significativo de la adhesión en un 100% tanto para ISO como para FSK. Pero, cuando se estimuló con el agonista de la PKA, 6-Bz-AMPc se observó una disminución significativa en la adhesión cercana al 50% respecto al control.

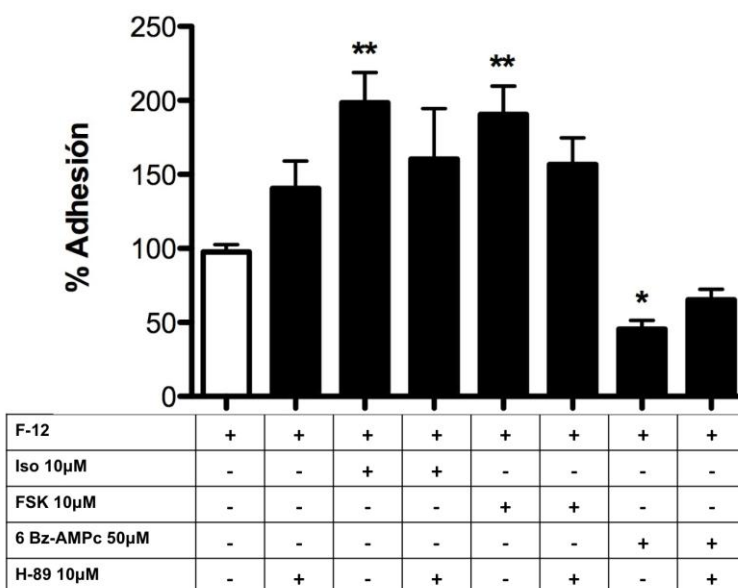


Fig.7: Efecto del AMPc sobre la adhesión de MCN sobre plástico. Se evaluó la adhesión de MCN sobre plástico, estimulando 24 horas antes de realizar el protocolo de adhesión. Los estímulos utilizados fueron ISO 10µM, FSK 10µM, 6-Bz-AMPc 50µM y H-89 10µM. Como control se utilizó DMEM-F-12. n=5 ±DE. *p<0,05; **p<0,01.

5.2.4 Adhesión de miofibroblastos cardíacos neonatos sobre fibronectina

Los MCN se adhieren a plástico mejor que los FCN. Pese a esto, es necesario realizar el experimento funcionalizando las placas con fibronectina para ver su efecto sobre la adhesión de MCN. Con los antecedentes anteriores podemos predecir que la adhesión debiese aumentar para todos los estímulos utilizados.

Para poder ver la magnitud del incremento de la adhesión en MCN al cambiar de matriz, se agregó un control de DMEM-F-12 sobre un pocillo de la placa no funcionalizado.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 8, en donde se observa que al estimular con ISO, ISO+H-89, FSK y FSK+H-89 la adhesión aumentó significativamente. Más en detalle, con ISO e ISO+H-89 el aumento de la adhesión fue cercano a un 80%; y para FSK y FSK+H-89 el incremento fue cercano a un 110% con respecto al control. Una vez más al utilizar 6-Bz-AMPc se observó una disminución significativa de la adhesión cercana al 50% respecto al control.

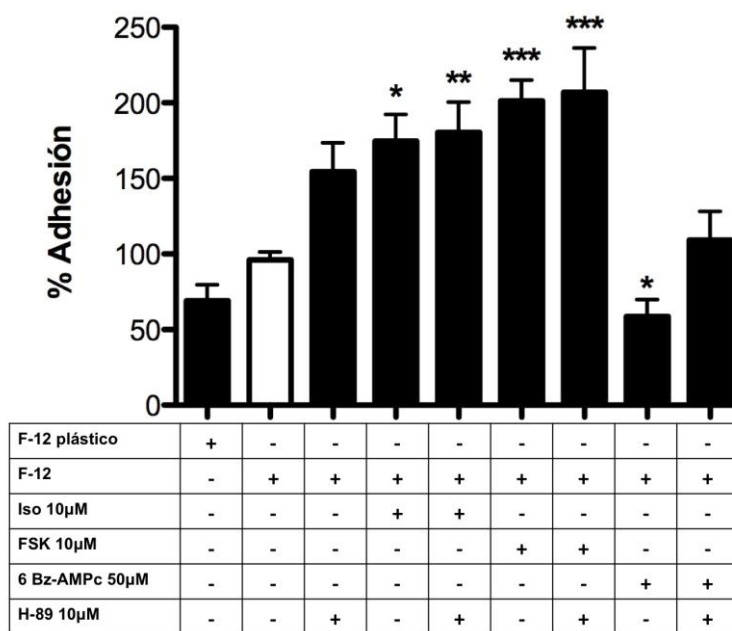


Fig.8: Efecto del AMPc sobre la adhesión de MCN sobre fibronectina. Se evaluó la adhesión de MCN sobre fibronectina, estimulando 24 horas antes de realizar el protocolo de adhesión. Los estímulos utilizados fueron ISO 10µM, FSK 10µM, 6-Bz-AMPc 50µM y H-89 10µM. Como control se utilizó DMEM-F-12, y el control DMEM-F-12 plástico no fue considerado al realizar los análisis estadísticos. n=6 ±DE. *p<0,05; **p<0,01 y ***p<0,001.

5.3 Migración:

5.3.1 Migración de fibroblastos cardíacos neonatos:

La migración es un proceso celular muy importante. Cuando se produce un daño es necesario que las células se muevan y se dirijan al lugar de la herida para comenzar con el proceso reparativo incluyendo expresión y secreción de proteínas de la MEC y proliferación celular. Los antecedentes en la literatura señalan que los FC migran cuando se incrementan los niveles de AMPc. Entonces a partir de esto se evaluó la capacidad migratoria de los FC con estímulos que aumentan el AMPc ya sea por estimulación del receptor β -adrenérgico, con agonista de la AC como FSK y con el agonista e inhibidor de PKA .

Para ver el efecto sobre la migración, se cuantificó el cierre de las heridas por medición del área de éstas (ver figura 9a). La figura 9b ilustra los porcentajes de disminución en el tamaño de la herida, observándose migración de FC con DMEM F-12 + 10% FBS y con DMEM F-12+ 10%FBS + 5-Bromo deoxiuridina (controles positivos para migración). Del mismo modo, ISO reduce el área de la herida en un 40% y FSK en aproximadamente un 30-35%, pero cuando estimulamos con H-89 y 6-Bz-AMPc no se observó cierre de la herida.

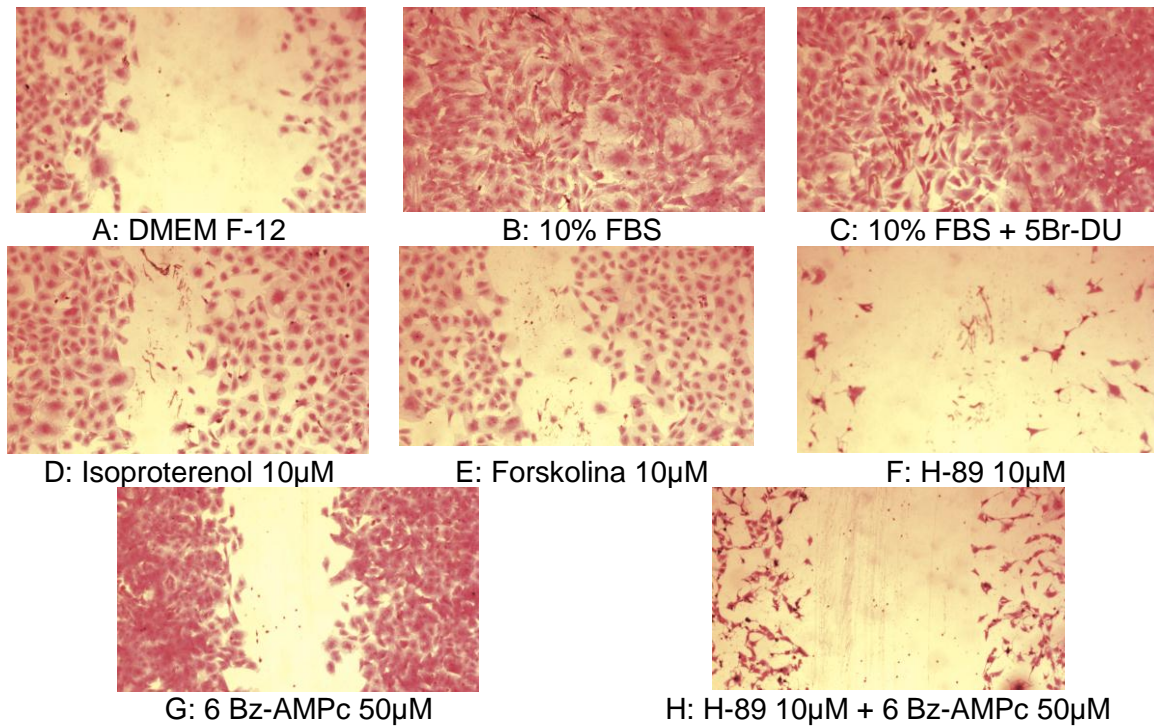


Fig.9a: Fotografías de FC tomadas con microscopio (40x).

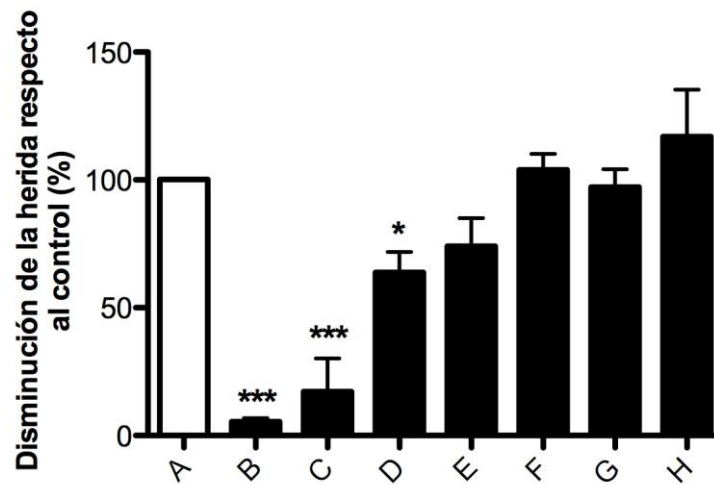


Fig.9b: Efecto de la migración celular sobre el cierre de la herida en FC.

En la parte superior se muestran fotos de un experimento representativo. A: DMEM F-12; B: DMEM F-12 +10%FBS; C: DMEM F-12 +10%FBS + 5 Br-DU; D: ISO 10µM; E: FSK 10µM; F: H-89 10µM; G: 6-Bz-AMPc 50µM y H: H-89 10µM+ 6-Bz-AMPc 50µM. n=3 ± DE. * p< 0,05 y ***p<0,001

5.3.2 Migración de miofibroblastos cardíacos neonatos:

Como se vio anteriormente que los FC migraban se quiso estudiar lo que ocurría en la migración de MCN. Pese a que hay antecedentes que señalan que los MCN son incapaces de migrar *in vitro*, sí son capaces de migrar *in vivo*.

Como se observa a simple vista en la figura 10a, no hubo cierre de la herida significativo, sin importar los estímulos utilizados. En la figura 10b se cuantificó el porcentaje de cierre de la herida y finalmente se observó que no hubo diferencias significativas respecto al control independiente de los estímulos utilizados.

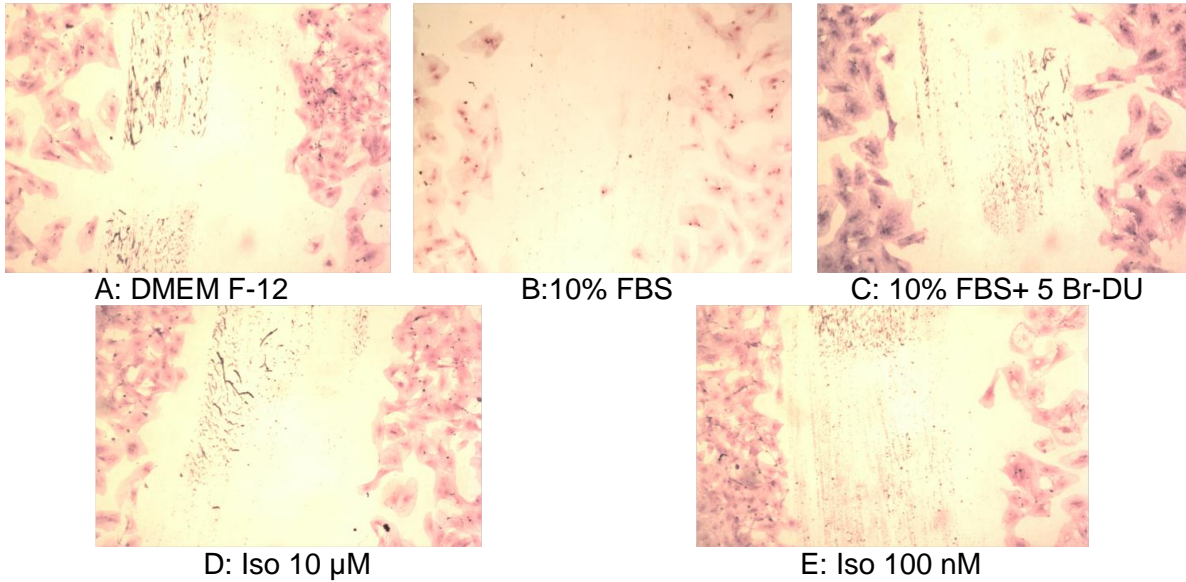


Fig.10a: Fotografías de MCN tomadas con microscopio (40x)

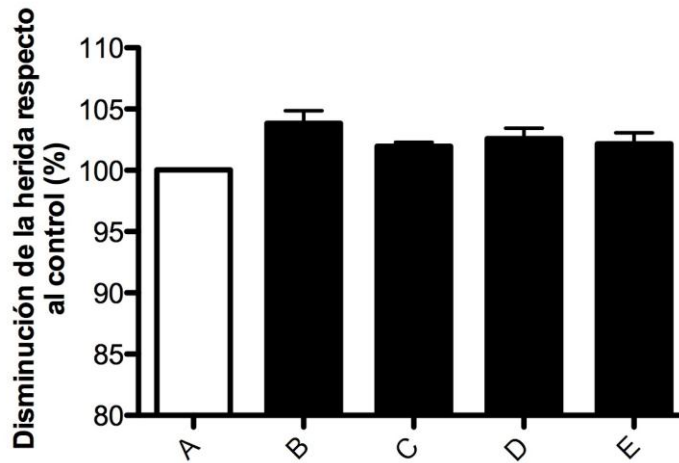


Fig.10b: Efecto de la migración celular sobre el cierre de la herida en MCN.

En la parte superior se muestran fotos de un experimento representativo. A: DMEM F-12; B: DMEM F-12 +10%FBS; C: DMEM F-12 +10%FBS + 5 Br-DU; D: ISO 10μM; E: ISO 100 nM. n=3 ± DE.

5.4 Expresión de colágeno:

5.4.1 Expresión de colágeno en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos neonatos, efecto de isoproterenol:

Como último objetivo queda saber qué es lo que ocurre con la expresión de colágeno tanto en FC como en MCN. La importancia de medir la expresión de colágeno en FC y MCN se debe a que ambos fenotipos celulares están relacionados e involucrados en el proceso de fibrosis cardíaca, haciendo énfasis en que los MCN a comparación de los FC secretan proteínas de la MEC en mayor cantidad. Hay antecedentes que señalan que el ISO disminuye la expresión de colágeno y que PKA y Epac también inhiben la expresión de colágeno.

Para comprobar si efectivamente el ISO disminuía la expresión de colágeno, se hizo el ensayo con dos concentraciones (10 μ M y 100 nM) estimulando durante 48 h. El objetivo de utilizar dos concentraciones distintas de Iso fue para tener una idea preliminar de la participación de Epac y PKA en el proceso, porque hay antecedentes que señalan que Epac se activa a bajas concentraciones de AMPc mientras que PKA se estaría activando a altas concentraciones.

Posteriormente se realizó inmunowesternblot (IWB) y se cuantificó la expresión de colágeno.

En la figura 11 se observa que hubo un aumento en la expresión de colágeno cuando se estimuló con Ang II (control positivo de expresión de colágeno) cercano un 50% para FC y de un 30-35% para MCN, y cuando se estimuló con ISO hubo disminución en la expresión de colágeno de un 20% para ISO 10 μ M y de un 30% para ISO 100 nM en FC, mientras que esta disminución fue mucho más marcada en MCN, con valores cercanos al 40% para ISO μ M y 50% para ISO 100 nM (cuadro B).

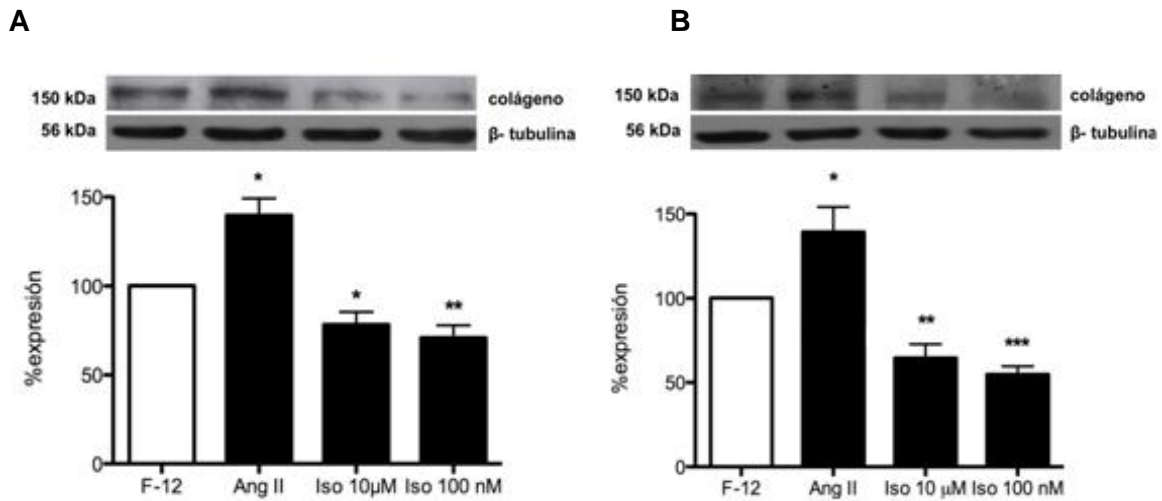


Fig.11: Expresión de colágeno en FCN y MCN estimulados con isoproterenol.

A): IWB de los niveles de colágeno en FCN después de 48 h de tratamiento. $n=6 \pm SD$. * $p<0,05$ y ** $p<0,01$ versus control DMEM-F-12 .

B): IWB de los niveles de colágeno en MCN después de 48 h de tratamiento. $n=7 \pm SD$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$ versus control DMEM-F-12.

5.4.2 Expresión de colágeno en fibroblastos cardíacos neonatos:

Como se pudo apreciar en el experimento anterior, ISO disminuyó la expresión de colágeno en concentraciones de 10 μ M y de 100 nM. Ahora es necesario dilucidar qué ocurre cuando se activa Epac y PKA. Para esto se estimuló con ISO, FSK, Me-AMPc y 6-Bz-AMPc durante 48 horas y luego mediante IWB se observó y cuantificó la expresión de colágeno.

La figura 12 muestra que Ang II aumentó la expresión de colágeno en un 50% mientras que ISO, FSK, Me-AMPc y 6-Bz-AMPc disminuyeron significativamente la expresión de colágeno. Con ISO la expresión de colágeno decreció en un 20%, con FSK un 35%, con Me-AMPc un 55% y con 6-Bz-AMPc disminuyó en un 50% con respecto al control.

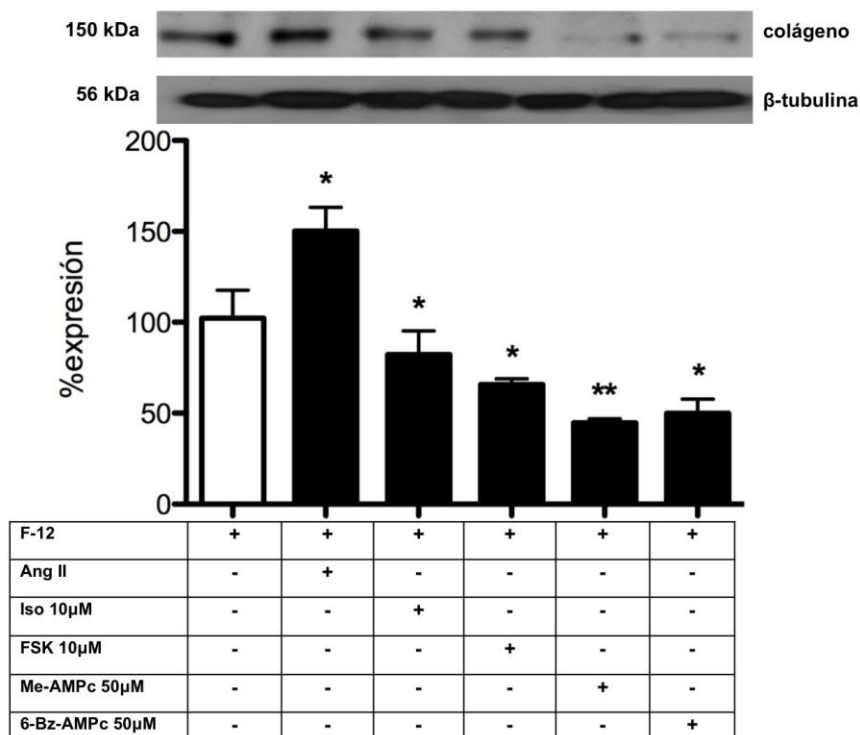


Fig.12: Expresión de colágeno en FC estimulados con isoproterenol, forskolina, Me-AMPc y 6-Bz-AMPc.

IWB de los niveles de expresión de colágeno en FC después de 48h. n=4 \pm DE. *p<0,05 y **p<0,01 versus el control DMEM-F-12.

5.4.3 Expresión de colágeno en miofibroblastos cardíacos neonatos

Teniendo en cuenta lo que ocurre con los FC, finalmente queda ver qué ocurre cuando se activa Epac y PKA en los MCN; para esto, al igual que en el experimento anterior se estimuló con ISO, FSK, Me-AMPc y 6-Bz-AMPc durante 48 horas y luego mediante IWB se observó y cuantificó la expresión de colágeno.

Como se ve en la figura 13, Ang II aumentó la expresión de colágeno significativamente en un 50%, mientras que el resto de estímulos utilizados disminuyeron la expresión de colágeno de forma significativa. Tanto para ISO como para FSK la disminución fue de un 25%, mientras que para Me-AMPc corresponde a un 30% y en el caso de 6-Bz-AMPc, la disminución de la expresión de colágeno fue de un 50% con respecto al control.

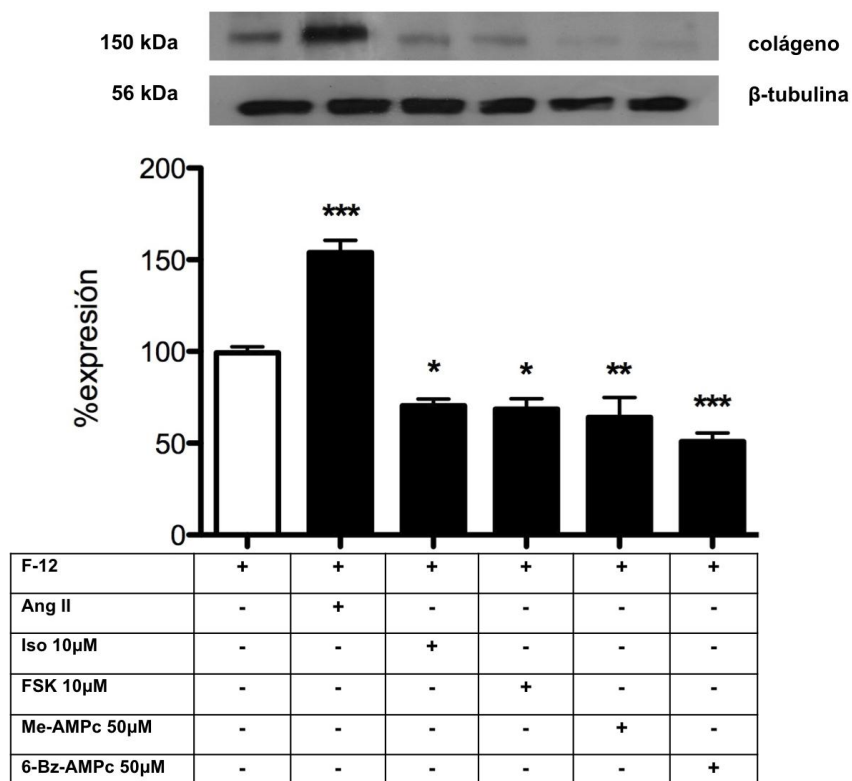


Fig.13: Expresión de colágeno en MCN estimulados con isoproterenol, forskolina, Me-AMPc y 6-Bz-AMPc. IWB de los niveles de expresión de colágeno en MCN después de 48 h. n=4 ± DE. *p<0,05; **p<0,01 y ***p<0,001 versus el control DMEM-F-12.

6. Discusión:

6.1 Influencia del H-89 sobre la viabilidad celular de fibroblastos cardíacos de rata neonata:

El objetivo de nuestro estudio es determinar el rol desempeñado por la PKA sobre los procesos celulares implicados en el RC. Para esto, dentro del diseño experimental se incluyó el uso del compuesto H-89 (inhibidor de la PKA) para ser capaces de observar la influencia de la activación de la PKA en adhesión, migración y expresión de colágeno. Un factor importante a tener en cuenta es que gracias a trabajos previos del laboratorio está el antecedente de que el H-89 afectaría la viabilidad de los FC. Para observar y cuantificar la magnitud de la muerte celular causada por el H-89 se realizó el estudio de viabilidad a las 14 y a las 24 horas. Se probó con 3 concentraciones distintas (1, 5 y 10 μM), para ver si efectivamente había pérdida de la viabilidad y si ésta era concentración dependiente. Como se mostró en la figura 4, hubo pérdida de la viabilidad cuando se incubaron los FC con concentraciones de 5 y 10 μM de H-89. Pese a que a la concentración H-89 1 μM no se observó pérdida de viabilidad tanto a 14 como a 24 horas, finalmente se decidió trabajar con una concentración de H-89 10 μM puesto a que es la que aparece descrita en la literatura además que se ha reportado que a esta concentración de H-89 la PKA efectivamente está inhibida. Cuando se llevaron a cabo los ensayos de adhesión se realizó conteo celular por exclusión de azul de tripán y aunque la disminución en el número de células era muy significativa, los FC que sobrevivieron a la estimulación con H-89 se adhirieron sin problemas a plástico y a fibronectina.

Otro punto importante a tener en consideración es la duración del período de incubación con H-89. Como se mostró en la figura 4, la pérdida de viabilidad a la concentración utilizada es cercana a un 70% en FC a las 24 h. Una vez realizado el experimento de migración fue imposible determinar si la PKA efectivamente participa o no en el proceso migratorio porque el período de incubación era demasiado largo (48 h) y al final casi no quedaban células adheridas en las placas (ver figura 9a). Con los experimentos de expresión de colágeno el problema fue el mismo debido a la duración de la incubación con el H-89 que también fue de 48 h. ¿Cuál es la diferencia entonces con los experimentos descritos en la literatura? El tiempo que permanece el estímulo en el cultivo. Los tiempos de estimulación con H-89 descritos por la literatura son del orden de minutos (al menos para síntesis de colágeno). [48,49]

Finalmente, para poder ver la influencia de la PKA sobre la migración celular y la expresión de colágeno sería necesario realizar otros experimentos para ver migración celular, en donde no sea necesario utilizar estímulos durante períodos de tiempo prolongados (superiores a 14 h) y para expresión de colágeno una alternativa sería ver la inclusión de prolina marcada radioactivamente para cuantificar la síntesis de colágeno. Y como una alternativa al uso del H-89 está el Wiptide® que corresponde a un péptido que inhibe a la PKA [42] pero quedó pendiente en futuros trabajos del laboratorio.

6.2 Adhesión de fibroblastos y miofibroblastos cardíacos de ratas neonatas:

El proceso de adhesión es importante para la cicatrización y RC. Para que ésta se lleve a cabo es necesario que los fibroblastos migren hacia el sitio de la herida, se adhieran a la matriz, proliferen y posteriormente secreten componentes de la MEC a fin de reparar la zona dañada. Por otro lado, estas células se diferencian a miofibroblastos por acción de las citoquinas liberadas por las células del sistema inmune que son atraídas a la zona del daño. Los MCN aparecen solo en las condiciones de daño tisular y específicamente en la zona del daño, donde se adhieren fuertemente a través de sus complejos de adhesión focal supermaduros, donde secretan proteínas de la MEC. El proceso de adhesión a la MEC depende de varios factores, entre ellos de los niveles de AMPc. En el corazón hay una gran cantidad de receptores, y de particular interés son los receptores β -adrenérgicos, debido a que representan un blanco farmacológico importante. Además se sabe que cuando se estimulan los receptores β -adrenérgicos aumentan los niveles de AMPc. En fibroblastos y miofibroblastos cardíacos se ha descrito la presencia de sólo este subtipo de receptor adrenérgico. Por lo tanto, los estímulos que conducen al aumento del AMPc agonista β 2-adrenérgico, agonista de la AC (FSK) y un agonista de la PKA (6-Bz-AMPc) podrían modular la adhesión de FC y MCN, aunque este efecto no está completamente claro respecto de la participación de la PKA, no así respecto de la Epac, que ya ha sido estudiada.

La evidencia en la literatura señala que Epac regula los niveles de expresión de las integrinas, encargadas de mediar la adhesión célula-matriz y que este efecto es tiempo dependiente, tal como se observa en células OVCAR3 [48]. Con respecto al rol de la PKA sobre este tipo celular se dice que no tiene influencia sobre la adhesión, pero existe evidencia que describe a la PKA como un regulador negativo de adhesión en varios tipos

celulares tales como glóbulos rojos falciformes, plaquetas, leucocitos, etc. [50].

Resultados anteriores de nuestro laboratorio [51] mostraron que AMPc induce un aumento en la adhesión en fibroblastos y miofibroblastos va a través de la activación de la Epac. En general, los resultados obtenidos con los estímulos que aumentan los niveles de AMPc mostraron un aumento en la adhesión celular, sin importar si se trató de FC o MCN, siendo este efecto mucho más importante y marcado sobre la matriz fibronectina. El que los FC se adhirieran menos al plástico pero sí más a la fibronectina sugiere que el proceso de adhesión depende de la expresión de proteínas de adhesión como integrinas ($\alpha\beta3$ o $\alpha\beta1$) [14], las cuales son específicas para reconocer a la fibronectina, las que permiten un correcto ensamblaje de los complejos de adhesión focal. Este hecho no se observa bien en plástico, porque aunque el plástico es un polímero, como muchas proteínas de la matriz extracelular, no existen integrinas específicas que permitan una mayor adhesión a este tipo de polímero, como sí ocurre sobre fibronectina. Por otro lado, el correcto ensamblaje del complejo de adhesión focal (integrinas, vinculina, tensina, paxilina, quinasas de adhesión focal, etc.) es regulado por procesos de fosforilación/defosforilación de proteínas como la paxilina y son regulados por períodos cortos de activación. El ensamblaje de las adhesiones focales depende de Rho [52], relacionándose más con Epac, demostrando y comprobando que el aumento de la adhesión vista en FC y MCN es mediado por Epac, y la activación de PKA por aumento del AMPc conlleva a una desorganización de las adhesiones focales y del citoesqueleto de actina en fibroblastos a través de la down-regulación de la MLCK. Con esto se comprueban los resultados obtenidos ya que la PKA estaría impidiendo la adhesión. [53,54]

La adhesión de FC sobre fibronectina y MCN en plástico y fibronectina mostró que ISO y FSK, aumentaron la adhesión tanto en presencia como en ausencia de H-89. Lo que en cierta manera sugiere y apoya nuestros resultados anteriores en relación a que la adhesión es mediada por Epac y no por PKA. Una cosa que llama la atención es que pese a que el H-89 mostró que afecta de forma importante la viabilidad de los FC (ver figura 4), no impide que éstos se adhieran a la matriz fibronectina. Con respecto al rol que esta última desempeña sobre la adhesión, nuestros resultados mostraron que la PKA no estaría modulando el proceso de adhesión de FC en la matriz fibronectina, porque pese a que se observó una ligera disminución en la adhesión, ésta no alcanzó a ser significativa y en plástico la adhesión de los FC no fue significativa independiente de los estímulos

utilizados. Pero en el caso de los MCN el efecto de la PKA sobre la adhesión fue mucho más marcado observándose una disminución estadísticamente significativa en la adhesión independiente de la matriz a la cual se estaban adhiriendo. Cuando estimulamos con 6-Bz-AMPC se vio una disminución en la adhesión y al incubarse en conjunto con H-89 se vio que los niveles de adhesión eran muy parecidos a los del control DMEM-F-12. A partir de esto se puede afirmar que la PKA no está participando dentro del proceso de adhesión tanto en FC como en MCN. Pero no se puede dejar de lado el efecto del 6-Bz-AMPC sobre la adhesión en FC sobre FN, y MCN sobre plástico y FN puesto que hay una disminución significativa cuando estimulamos con el agonista de PKA, lo que podría deberse a la desorganización de las adhesiones focales y del citoesqueleto de actina mencionado anteriormente. Esto es importante porque el efecto de la PKA es contrario al de Epac (comparando con los antecedentes anteriores obtenidos en el laboratorio), y podemos considerarlo un nuevo punto de intervención para detener y/o revertir el proceso de RC y la posterior fibrosis cardíaca.

Ahora, si comparamos la adhesión (al estimular con ISO, FSK, ambos con H-89 y H-89 solo) entre FC y MCN, la de los MCN es mucho mayor independiente de la matriz lo que podría deberse a que se estaría regulando la adhesión célula-matriz, probablemente a través de un reforzamiento del fibronexus y de las adhesiones suFA de los MCN.

6.3 Migración en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos de rata neonata:

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

Gracias a estudios anteriores realizados en el laboratorio y a la literatura se sabe que la migración celular, al igual que el proceso de adhesión depende de los niveles de AMPc. Hay evidencias en la literatura que indican que la PKA tiene un rol paradójico sobre la motilidad celular, ya sea facilitando o inhibiendo la dinámica del citoesqueleto de actina y la migración celular [55]. En fibroblastos cardíacos de rata adulta Epac y PKA regulan de manera opuesta el proceso de migración, siendo este efecto dependiente de la concentración de AMPc. Mientras Epac modula positivamente la migración, PKA por su lado la inhibe. [42]

Adicionalmente hay evidencias que plantean que según la compartimentalización intracelular de los efectores de la vía del AMPc, PKA no estaría participando en el proceso de migración en fibroblastos debido a que no tendría relación con proteínas que regulan la migración, como las FAK. [56,57].

En FC nuestros resultados mostraron que el 6-Bz-AMPc no estaría favoreciendo el proceso de migración puesto que no se observó una disminución en el tamaño de la herida. Para ver la influencia de la PKA sobre la migración se decidió utilizar H-89 ya que al ser un inhibidor de la PKA, debería mostrar una reversión en el efecto, pero no se pudo determinar el rol de este inhibidor sobre la migración ya que afecta severamente la viabilidad del fibroblasto. Hay que considerar que la viabilidad de los fibroblastos a las 24h de estímulo con H-89 10 μ M disminuyó aproximadamente en un 75%, y para este experimento el estímulo estuvo durante 48 h, quedando muy pocas células vivas, tal como se ve en la figura 5. Curiosamente al estimular con 6-Bz-AMPc y H-89 al mismo tiempo, se pudo apreciar un ligero aumento en la sobrevivencia, pero no tendría mayor relevancia sobre los resultados obtenidos puesto a que la cantidad de células adheridas a la placa fue insuficiente como para poder notar algún tipo de efecto sobre la herida.

Paralelamente en MCN no hubo efecto migratorio, independiente del estímulo utilizado. Por esta razón se discutió y se decidió no estimular con los agonistas de Epac y PKA en este experimento porque no se observó migración, aun cuando se emplearon los controles positivos (DMEM-F-12 +10% FBS y DMEM-F-12 +10%FBS + 5Br-DU). Como no hubo migración al estimular con ISO se podría pensar que Epac y PKA no participan del proceso migratorio, pero también existe la posibilidad de que los miofibroblastos *in vitro* no migran debido a sus características fenotípicas, ya que se vio que su capacidad adhesiva es muy grande y posiblemente el efecto de adhesión sea predominante por sobre el de migración porque en los MCN la cantidad de adhesiones focales es mucho más alta que en el FC, las que maduran originando las suFAs y éstas se fusionan dando origen al fibronexus (por esto la capacidad de adhesión de los MCN es mayor a comparación de los FC). Además no se cuenta con un tejido soporte, ya que en el corazón no sólo hay MCN (a diferencia de un cultivo aislado) y al estar ubicados en la zona remota de la herida el efecto migratorio no alcanza a ser significativo si lo comparamos con los FC.

El ensayo de migración por método de la herida presenta muchas limitaciones. La primera de ellas es el período de tiempo por el cual permanecen los estímulos, siendo crítico cuando éstos afectan la viabilidad celular (como ya se vio que ocurría con el H-89).

En segundo lugar, al ver el control en FCN con DMEM-F-12 + 10%FBS se ve un cierre completo de la herida lo cual podría deberse a que los fibroblastos están proliferando, aunque para eso se utilizó el control de DMEM-F-12 + 10%FBS + 5-Br-DU (inhibidor de la proliferación celular) para descartar que el cierre de la herida se deba al efecto proliferativo del suero. Finalmente para poder saber qué ocurre en la migración al activar la PKA es necesario realizar otro tipo de ensayo migratorio en donde se utilice H-89 durante un período de tiempo mucho más corto, como sería en el caso de la migración por Transwell, ya que la viabilidad del fibroblasto no se vería afectada de forma tan severa.

6.4 Expresión de colágeno en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos de rata neonata:

Los resultados obtenidos mostraron que todos los estímulos que aumentan los niveles de AMPc disminuyeron la expresión de colágeno, siendo este efecto mucho más significativo cuando se utilizaron los agonistas de Epac y de PKA. En este sentido, datos de la literatura indican que la expresión de colágeno disminuye en fibroblastos cardíacos de rata adulta y que esta disminución va por vía Epac y PKA [41], lo cual vendría a apoyar nuestros resultados. Otros artículos indican que en fibroblastos de pulmón, la estimulación de las células con agentes que incrementen los niveles de AMPc llevan a la inhibición de la síntesis de colágeno y proliferación, aunque estos efectos son mediados por Epac y no por la PKA [58]. Por otro lado, la disminución en la expresión de colágeno va por vía Epac solamente aunque en ese estudio es estimularon los receptores de adenosina, (los que al activarse también aumentan los niveles de AMPc) [49]. Sin embargo, en este trabajo no se discutió y analizó la participación de la PKA. No se descarta completamente el rol de la PKA sobre la disminución en la expresión de colágeno, porque se sabe que la activación β -adrenérgica en fibroblastos cardíacos de rata adulta resulta en la activación de vías de señalización importantes dentro de las cuales está la vía de la PKA [59], siendo consecuente con los resultados obtenidos. Además, tanto Liu X y cols, como Villarreal y cols [49,58] midieron secreción de colágeno mediante inclusión de prolina marcada a colágeno, a diferencia nuestra que medimos expresión de colágeno mediante IWB. Entonces, a partir de estos resultados se puede decir que la activación de los receptores β -adrenérgicos en FC y MCN disminuye la expresión de colágeno porque al estimular con ISO se vio una disminución en la expresión de colágeno en ambos fenotipos celulares,

siendo más marcado este efecto cuando la concentración fue de 100nM (fig.11). Teniendo esto presente podemos corroborar lo que indica la literatura con respecto a que la vía Epac es la más involucrada en la expresión y síntesis de colágeno porque se activa a menores concentraciones de AMPc a diferencia de la PKA.

En MCN el mayor efecto en la disminución de la expresión se ve con 6-Bz-AMPc, lo que podría deberse a una mayor predominancia en la activación de esta vía en vez de la vía Epac, pero esto queda pendiente para un trabajo posterior. Finalmente nuestros resultados indican que tanto Epac como PKA están participando en la regulación de la expresión de colágeno, tanto en FCN como en MCN siendo importantes en el proceso de fibrosis.

7. Conclusiones:

De este trabajo se puede decir que la PKA no participa en los procesos de adhesión y migración, pero sí en la expresión de colágeno tanto en fibroblastos como en miofibroblastos cardíacos de rata neonata.

- Primeramente se realizó un estudio de viabilidad celular con H-89, en donde se ve que a la concentración que se describe y se utiliza en la literatura (10 μ M) se afecta severamente la viabilidad celular de fibroblastos. Esto se vio reflejado en la migración principalmente pudiendo apreciarse claramente la disminución en la población celular del cultivo.
- En los ensayos de adhesión ISO y FSK aumentaron la adhesión a fibronectina en FC y MCN, mientras que el 6-Bz-AMPC disminuyó la adhesión en MCN sobre plástico y FC y MCN sobre fibronectina.
- Pese a que el H-89 afecta severamente la viabilidad de los FC no modifica su capacidad de adhesión.
- En migración no se pudo determinar el rol de la PKA. Mientras no se vea que es lo que ocurre con su inhibidor H-89, no se puede afirmar si PKA participa o no en la modulación de este proceso. Para dilucidar esto es necesario realizar otro tipo de ensayo, como es la migración por Transwell. Aunque preliminarmente se podría decir que PKA no participa sobre la migración en FC.
- Por último, la disminución en la expresión de colágeno está regulada tanto por Epac como por PKA y ambas modulan la expresión de forma negativa.

Estos resultados son consecuentes con la hipótesis planteada inicialmente. Finalmente es Epac quien tiene mayor participación en los procesos de adhesión y migración celular, mientras que en expresión de colágeno tanto Epac como PKA participan disminuyendo la expresión.

8. Limitaciones:

Dentro de las limitaciones que se tuvieron al realizar este trabajo podemos mencionar que al ser un modelo *in vitro*, se trabaja con células aisladas y con condiciones y estímulos controlados, pudiendo ser muy distinto a lo que realmente podría ocurrir *in vivo*, donde FC y MCN están conviviendo con otros tipos celulares como los cardiomiocitos, además de estar en contacto con diversas citoquinas que influyen en las diversas respuestas de estas células frente a los estímulos estudiados.

Otro punto a considerar es que el empleo de cultivos primarios de ratas neonatas no reflejaría en su totalidad lo que ocurre en la realidad puesto que las enfermedades cardíacas por lo general tienen su aparición en edades más avanzadas, sin embargo este modelo igual ayuda a dar un acercamiento de lo que realmente ocurre.

Finalmente el mayor inconveniente de que se trabaje con cultivos celulares, es la gran variabilidad que se presentó entre un cultivo y otro, teniendo una gran dispersión en los datos además de no poder establecer resultados tan concretos a nivel cuantitativo, a comparación de lo que pudiera obtenerse trabajando con líneas celulares.

Bibliografía:

1. Luque C, Cisternas F, Araya M. “*Cambio del patrón de enfermedad en la post transición epidemiológica en salud en Chile 1950-2000*”. Rev Med Chile 2006; 134: 703-12.
2. Medina E, Kaempffer A, “*Enfermedades cardiovasculares en Chile. Aspectos epidemiológicos*”. Revista Chilena de Cardiología, 2007, 26(2), 219-226.
3. Gabbiani G. “*The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases*”. J Pathol. 2003; 200:500-503.
4. Desmoulière A, Darby IA, Gabbiani G. “*Normal and Pathologic Soft Tissue Remodeling: Role of the Myofibroblast, with Special Emphasis on Liver and Kidney Fibrosis*”. Lab Invest. 2003;83:1689-707
5. Takano H., Hasegawa H, Nagai T, and Komuro I. “*Implication of cardiac remodeling in heart failure: mechanisms and therapeutic strategies*”. Intern Med, 2003, 42(6), 465-469
6. Remme WJ. “*Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy*”. Cardiovasc Drugs Ther, 2003, 17(4), 349-360
7. Kai H, Kuwahara F, Tokuda K, and Imaizumi T. “*Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis*”. Hypertens Res, 2005, 28(6), 483-490.
8. Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. “*Tissue repair, contraction, and the myofibroblast*”. Wound Rep Reg, 2005, 13, 7-2.
9. Remme WJ, Kruijssen HACM, Look MP, Bootsma M, de Leeuw PW. “*Systemic and cardiac neuroendocrine activation and severity of myocardial ischemia in humans*”. J Am Coll Cardiol 1994;23:82–91.
10. Redden RA and Doolin EJ. “*Collagen crosslinking and cell density have distinct effects on fibroblast-mediated contraction of collagen gels*”. Skin Research Technology. 2003; 9: 290- 293
11. Porter KE and Turner NA. “*Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling*”. Pharmacol Ther, 2009, 123, 255-278.
12. Mc Anulty RJ. “*Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease*”. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2006, 39(4), 666-667.

13. Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Lamparter S. "Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats". J Lab Clin Med, 2000, 135(4), 316-323.
14. Copaja M. "Participación de Rho en la muerte inducida por estatinas de fibroblastos y miofibroblastos cardiacos de rata". Grado de Doctor en Farmacología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile, 2010
15. MacKenna, D., et al. "Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis". Cardiovasc Res, 2000. 46(2): p. 257-63
16. Wynn, T.A. "Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases". J Clin Invest, 2007. 117(3): p. 524-9.
17. Powell, D.W., et al. "Myofibroblasts. Paracrine cells important in health and disease". Am J Physiol, 1999. 277(1 Pt 1): p. C1-9
18. Clarke, M.S., et al. "Contraction-induced cell wounding and release of fibroblast growth factor in heart". Circ Res, 1995. 76(6): p. 927-34
19. Camelliti, P., et al. "Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts." Cardiovasc Res, 2005. 65(1): p. 40-51.
20. De Rooij, J et al. "Epac is a Rap1 guanine-nucleotide- exchange factor directly activated by cyclic AMP". Nature 1998; 3; 474-7
21. De Rooij J. et al "Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP- dependent RapGEFs". J. Biol.Chem.2000; 275: 20829- 20836
22. Chai, Q., et al. "Localisation and phenotypical characterisation of collagen-producing cells in TGF-beta 1-induced renal interstitial fibrosis". Histochem Cell Biol, 2003. 119(4): p. 267-80
23. Sun, Y. et al. "RAS and connective tissue in the heart". Int J Biochem Cell Biol, 2003. 35(6): p. 919-31
24. Dugina, V., et al. "Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors". J Cell Sci, 2001. 114(Pt 18): p. 3285-96.
25. Lamba S, Abraham WT "Alterations in adrenergic receptor signaling in heart failure" Heart Failure Reviews, 2000, 5,7-16.

26. Tang CH and Insel PA. "GPCR Expression in the Heart, "New" Receptors in Myocytes and Fibroblasts" TCM, 2004,14 (3) 94-99.
27. Bassiakou E, Xanthos T, Papadimitriou L "The potential beneficial effects of beta adrenergic blockade in the treatment of ventricular fibrillation" European Journal of Pharmacology, 2009, 616, 1-6.
28. Turner, N.A., et al. "Chronic beta2-adrenergic receptor stimulation increases proliferation of human cardiac fibroblasts via an autocrine mechanism". Cardiovasc Res, 2003. 57(3): p. 784-92.19.
29. Meszaros, J.G., et al. "Identification of G protein-coupled signaling pathways in cardiac fibroblasts: cross talk between G(q) and G(s)". Am J Physiol Cell Physiol, 2000. 278(1): p. C154-62.
30. Rosenbaum, D.M., et al. "The structure and function of G-protein-coupled receptors". Nature, 2009. 459(7245): p. 356-63.
31. Tang, C.M. et al. "GPCR expression in the heart; "new" receptors in myocytes and fibroblasts". Trends Cardiovasc Med, 2004. 14(3): p. 94-9.
32. Xiao, R.P., et al. "Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction". Circ Res, 1999. 85(11): p. 1092-100
33. Mio, T., et al. "Human bronchial epithelial cells modulate collagen gel contraction by fibroblasts". Am J Physiol, 1998. 274(1 Pt 1): p. L119-26.
34. Copaja Soto, M., et al. "Early expression of monocyte chemoattractant protein-1 correlates with the onset of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in rats with distinct angiotensin-converting enzyme polymorphism". J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2008. 9(3): p. 154-62.
35. Liu, X., et al. "cAMP inhibits transforming growth factor-beta-stimulated collagen synthesis via inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Smad signaling in cardiac fibroblasts". Mol Pharmacol, 2006. 70(6): p. 1992-03.
36. Lizuka, K., et al. "Transforming growth factor beta-1 modulates the number of beta-adrenergic receptors in cardiac fibroblasts". J Mol Cell Cardiol, 1994. 26(4): p. 435-40.
37. Mak, J.C.W., et al. "Transforming growth factor beta-1 inhibits beta-2-adrenoceptor gene transcription". Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2000. 362(6): p. 520-25.

38. Holz, G.G., et al., "Cell physiology of cAMP sensor Epac". J Physiol, 2006. 577(Pt 1): p. 5-15.
39. Tamayo JM. et al. <<http://psicofarmacologia.info/cursos/farmacodinamia/Fig24.html>> [consulta 27 marzo de 2011]
40. Walsh D. et al. "An adenosine 3',5'- monophosphate- dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle". J. Biol. Chem. 1968; 278: 38548- 38556
41. Holz, G.G., et al. "Epac-selective cAMP analogs: new tools with which to evaluate the signal transduction properties of cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors". Cell Signal, 2008. 20(1)
42. Yokoyama U, Patel HH, Lai NC, Aroonsakool N, Roth DM, Insel PA. "The cyclic AMP effector Epac integrates pro- and anti-fibrotic signals". PNAS. 2008; 105: 6386-6391
43. Mendoza Patiño N. "Farmacología Médica" Editorial Panamericana , 2008, 1008 p, Pág. 69.
44. Zhenyu Ji, Tamara Tsalkova, and Fang Mei. Epac and PKA: "a tale of two intracellular cAMP receptors", Xiaodong Cheng*, Acta Biochim Biophys Sin (2008): 651-662
45. Bossemeyer D. "Protein kinases- structure and function" Department of Pathochemistry, German Cancer Research Centre, INF 280, D-69120 Heidelberg, German~FEBS Letters 369 (1995) 57 6.
46. <http://www.als.lbl.gov/als/science/sci_archive/111pka.html> visita 6/03/2012
47. R Vandenberghe, J Tournoy. "Review Cognitive aging and Alzheimer's disease" Postgrad Med J 2005;81:343-352
48. Rangarajan, S., et al. "Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor". J Cell Biol, 2003. 160(4): p. 487-93
49. Villareal P, Epperson S. A, Ramirez-Sánchez I, Yamazaki K, Brunton L.L "Regulation of cardiac fibroblast collagen synthesis by adenosine: Roles for Epac and PI3K" Am J Physiol Cell Physiol (March 11, 2009). Doi:10.1152/ajpcell.00291.2008
50. Patrick C., et al. "Novel epinephrine and cyclic AMP-mediated activation of BCAM/Lu-dependent sickle (SS) RBC adhesion". Blood 2003 Hines 3281-7

51. Guzmán N. *“Participación de Epac en procesos de adhesión, migración y contracción de geles de colágeno en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos de ratas neonatas”*. Tesis de pregrado para optar al título de Químico farmacéutico, 2011.
52. Johannes L.Bos *“Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research”*. Mol. Cel. Biology. 2003
53. Maruyama T., Yoshimura Y., Sabe H. *“Tyrosine phosphorylation and subcellular localization of focal adhesion proteins during In vitro decidualization of human endometrial stromal cells”* Endocrinology 140:5982-5990, 1999.
54. Burridge K., Chrzanowska-Wodnicka M. Review: *“Focal adhesions, contractility and signaling”* Annu. Rev. Cell Dev.Biol 12:463-519. 1996.
55. Alan K. Howe, Linda C. Baldor, and Brian P. Hogan. *“Spatial regulation of the cAMP-dependent protein kinase during chemotactic cell migration”*.
56. Bers, D.M. et al. *“When Is cAMP Not cAMP?: Effects of Compartmentalization”*. Circ Res, 2001. 89(5): p. 373-375
57. Manso, A.M., et al. *“Cardiac fibroblasts require focal adhesion kinase for normal proliferation and migration”*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2009. 296(3): p. H627-H638
58. Liu X, Ostrom RS, Insel PA. *“cAMP-elevating agents and adenylyl cyclase overexpression promote an antifibrotic phenotype in pulmonary fibroblasts”*. Am J Physiol Cell Physiol 286: C1089–C1099, 2004.
59. Aránguiz, P., *“Estudio de los mecanismos moleculares de la autofagia inducida por agonistas β -adrenérgicos en el fibroblasto cardiaco”*. Tesis de doctorado para la obtención del grado de Doctor en Farmacología, 2011.