



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Laboratorio Farmacoquímica

EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES DE CININAS EN FIBROBLASTOS Y MIOFIBROBLASTOS CARDIACOS

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

Pía de los Ángeles Boza Fuentes

Director de memoria: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

Co- tutor: Mabel Elizabeth Catalán Díaz

Santiago, Chile

2012

Agradecimientos

A los miembros del Laboratorio de Farmacoquímica:

Dr. Guillermo Díaz.

Mabel Catalán.

Ivonne Olmedo.

Pedro Ayala.

Raúl Vivar.

Diego Humeres.

Claudia Muñoz.

Por toda su paciencia y comprensión... muchas gracias

Así mismo, también quiero agradecer a Diego Arce por su apoyo incondicional durante todos los años de universidad que hemos superado juntos.

Tabla de contenido

Agradecimientos	2
Tabla de contenido	3
Índice de figuras	6
Abreviaturas	7
Resumen	9
Summary	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Generalidades	11
1.2 Corazón	11
1.3 Fibroblastos	13
1.4 Miofibroblastos	14
1.5 TGF- β 1	15
1.6 Sistema cinina-caliceína	17
1.7 Rol de las cininas	18
1.8 Cininas y fibroblastos	20
2. HIPÓTESIS	23
3. OBJETIVO GENERAL	23
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 Reactivos	24
5.2 Animales	24
5.3. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos ventriculares de ratas neonatas	25
5.4 Obtención Miofibroblastos	25

5.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida	25
5.6. Electrotransferencia de proteínas	26
5.7. Western blot.	26
5.8. Protocolo de estímulo con TGF- β 1 a través del tiempo	26
5.9. Protocolo inhibición de las vías transduccionales de TGF- β 1.	27
5.10. Adhesión celular	27
5.11. Migración celular	27
5.12. Inmunocitoquímica	28
5.13. Análisis estadístico	28
6. RESULTADOS	29
6.1. Resultados del Objetivo específico 1	29
6.1.1. Identificación del fenotipo celular	29
6.1.2. Expresión del B1R y de α -SMA a través del tiempo	29
6.2 Resultados Objetivo específico 2	32
6.2.1. Inhibición de las vías transduccionales de TGF- β 1	32
6.2.1.1. Inhibición de la vía canónica de TGF- β 1	32
6.2.1.2. Inhibición de la vía no canónica de TGF- β 1	33
6.3. Resultados Objetivo específico 3	38
6.3.1. Adhesión celular.	38
6.3.1.1. Adhesión fibroblastos cardiacos.	38
6.3.1.2. Adhesión miofibroblastos cardiacos.	39
6.4. Resultados Objetivo específico 4	40
6.4.1. Migración fibroblastos	40
6.4.2. Migración miofibroblastos	42
7. DISCUSIÓN	44

8. CONCLUSIÓN	54
9. BIBLIOGRAFÍA	55
10. MATERIAL ANEXO	59

Índice de figuras

Figura 1. Cascada de señalización de TGF- β 1.	17
Figura 2. Inmunocitoquímica de α -SMA en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos	30
Figura 3. Efecto de TGF- β 1 en la expresión de B1R en fibroblastos cardiacos	31
Figura 4. Participación del receptor de TGF- β 1 y de Smad 2/3 en la expresión de B1R en fibroblastos cardiacos	33
Figura 5. Participación de las vías MAPK JNK y p38 en la expresión de B1R	35
Figura 6. Participación de la vía MEK-ERK sobre la expresión de B1R en fibroblastos cardiacos	36
Figura 7. Participación de la vía no canónica PI3K-Akt sobre la expresión de B1R en fibroblastos cardiacos.	37
Figura 8. Participación de los agonistas BK y DAKD en la adhesión celular de fibroblastos cardiacos	38
Figura 9. Participación de BK en la adhesión celular de fibroblastos cardiacos	39
Figura 10. Participación de BK y DAKD en la adhesión celular de miofibroblastos cardiacos	40
Figura 11. Participación del suero en la proliferación celular	41
Figura 12. Participación de BK y DAKD en la migración de fibroblastos cardiacos	41
Figura 13. Participación de BK y DAKD en la migración de miofibroblastos cardiacos	43
Figura 14. Esquema de las vías transduccionales de TGF- β implicadas en la expresión B1R en fibroblastos cardiacos	47
Figura 15. Esquema representativo de la expresión de B1R debida a la activación de sus factores transcripcionales	50

Abreviaturas

μM	:	Micromolar
Ang II	:	Angiotensina II
AP-1	:	Proteína activadora 1
B1R	:	Receptor B1 de cininas
B2R	:	Receptor B2 de cininas
BDOU	:	Bromodeoxiuridina
BK	:	Bradicinina
COX	:	Ciclooxigenasa
DABK	:	des-Arg 9 BK
DAKD	:	des-Arg10-Lys-BK
DMEM	:	Medio de mantención modificado Dulbecco
DMSO	:	Dimetil sulfóxido
ECL	:	Potenciador de la quimioluminiscencia
ECV	:	Enfermedades cardiovasculares
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK	:	Proteína cinasa regulada extracelularmente
FBS	:	Suero fetal de bovino
FCS	:	Suero fetal caprino

IL-1 β	:	Interleuquina 1 beta
JNK	:	Cinasa de c-Jun N-terminal
kDa	:	Kilo Dalton
LPS	:	Lipopolisacárido
MAPK	:	Proteín cinasas activadas por mitógenos
MEC	:	Matriz extracelular
mL	:	Mililitro
MPM	:	Metaloproteinasas de la matriz
NF-kB	:	Factor nuclear kappa B
ng	:	Nanogramo
OMS	:	Organización mundial de la salud
PBS	:	Tampón fosfato salino
PGI ₂	:	Prostaciclina
SDS	:	Dodecilsulfato de sodio
TGF- β 1 :		Factor de crecimiento transformante beta 1
TNF α	:	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF	:	Factor asociado al receptor de TNF
α -SMA	:	α - actina del músculo liso

Resumen

Los fibroblastos son las principales células impulsoras del proceso fibrótico en el corazón. Estas células son activadas tanto por estrés mecánico, como también por citoquinas, entre ellas TGF- β 1, que actúa promoviendo la diferenciación celular a miofibroblastos y la síntesis de diferentes proteínas y sustancias que originan el proceso fibrótico. Antecedentes de nuestro laboratorio han revelado que el receptor B1 de cininas se encuentra levemente expresado en fibroblastos y su expresión se induce en los miofibroblastos cardiacos. Este receptor es parte del sistema cinina-calicleína, que de modo general, actúa de manera opuesta al sistema renina-angiotensina, y que contrarresta el efecto pro-fibrótico de angiotensina II, tanto en los fibroblastos como en los miofibroblastos cardiacos.

Utilizando técnicas de western blot determinamos que TGF- β 1 induce la expresión de B1R a las 48 horas y que este fenómeno estaría mediado por la vía de las MAPK y también por ALK5.

Utilizando técnicas de adhesión sobre placa demostramos que tanto BK o DAKD no aumentan la adhesión de fibroblastos o miofibroblastos cardiacos. Por otro lado, utilizando el método de migración en placa (método de la herida), BK aumenta el comportamiento de migración en los fibroblastos, no así de los miofibroblastos.

Finalmente, a partir de este trabajo concluimos que TGF- β 1, a través de las vías transduccionales MAPK y ALK5; y no por la vía PI3-Akt ni a través de Smad 3; induce la expresión de B1R. Por otro lado, las cininas no median el comportamiento de adhesión celular de fibroblastos ni de miofibroblastos cardiacos. Sin embargo, BK induce la migración celular solo en fibroblastos cardiacos, mientras que DAKD, no media migración en fibroblastos ni miofibroblastos cardiacos.

Estos resultados en conjunto, fortalecen el concepto de que las cininas son importantes mediadores del remodelado cardiaco.

Summary

EXPRESSION AND FUNCTION OF KININS' RECEPTORS IN CARDIAC FIBROBLASTS AND MYOFIBROBLASTS

Fibroblasts are the main drivers of cells in the heart fibrotic process. These cells are activated either by mechanical stress as well as by cytokines, including TGF- β 1, which acts by promoting cell differentiation to myofibroblasts and the synthesis of different proteins and substances that originate the fibrotic process. History of our laboratory has shown that the kinin B1 receptor is slightly expressed in fibroblasts and its expression is induced in cardiac myofibroblasts. This receptor is part of the kinin-kallikrein system, which in general, acts opposite to the renin-angiotensin system, and counteracts the pro-fibrotic effect of angiotensin II in fibroblasts and cardiac myofibroblasts.

Using western blot techniques, we determined that TGF- β 1 induces the expression of B1R at 48 hours and that this phenomenon would be mediated by the MAPK pathway and by ALK5.

Using plate adhesion techniques demonstrated that either BK or DAKD not increase the adhesion of cardiac fibroblasts or myofibroblasts. Furthermore, using the migration plate method (wound healing), BK increases the migration behavior in fibroblasts, but not of myofibroblasts.

Finally, from this work, we conclude that TGF- β 1, through MAPK signal transduction pathways and ALK5, and not through PI3-Akt or Smad 3, induces the expression of B1R. Furthermore, kinins do not mediate cell adhesion behavior of cardiac fibroblasts or myofibroblasts. However, BK induces cell migration only in cardiac fibroblasts, while DAKD doesn't mediate migration in fibroblasts and myofibroblasts heart.

These results, taken together reinforce the concept that kinins are important mediators of cardiac remodeling.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

Según datos de la OMS las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en todo el mundo. Cada año mueren más personas por ECV que por cualquier otra causa [1]. Según la Encuesta Nacional de Salud de Chile 2009-2010, un 54,6% de la población chilena de 15 años y más presenta, según el criterio ATP III Update, un riesgo cardiovascular bajo; el 27,6% un riesgo cardiovascular moderado o moderadamente alto y el 17,72% un riesgo cardiovascular alto o muy alto [2]. Es por esto que las ECV son y serán un problema de salud en nuestra sociedad y es de suma importancia su estudio y comprensión.

1.2 Corazón

La principal función del corazón es impulsar la sangre al resto del cuerpo, a través de secuenciales contracciones y relajaciones. El tejido cardíaco está compuesto por una matriz extracelular bastante compleja en estructura y composición; y por distintos tipos celulares que incluyen cardiomiocitos, fibroblastos, células neuronales, células endoteliales, etc.; siendo los cardiomiocitos y los fibroblastos los mayoritarios en el corazón [3].

1.3 Fibrosis cardiaca

La mayoría de las enfermedades cardíacas están asociadas a la fibrosis cardíaca. La fibrosis, en general, corresponde a un proceso que se caracteriza por una excesiva acumulación de proteínas de la matriz extracelular (MEC), que finalmente resulta en una arquitectura y función distorsionada del corazón [4]. La acumulación de las proteínas de la MEC y en particular de colágeno I, el principal colágeno encontrado en fibrosis cardíaca, endurece los ventrículos e impide tanto la contracción como la relajación cardíaca [5]. Esta acumulación exagerada, puede deberse a un desproporcionado aumento en la síntesis y/o en la inhibición de la degradación de ellas [5].

1.4 Matriz extracelular

La MEC es una red organizacional que rodea e interconecta estructuras celulares, proveyendo de un andamio para las poblaciones celulares de tipo cardiomiocito y no miocito. Distribuye los esfuerzos mecánicos a través del miocardio, transmite señales de tipo mecánicas a las células individuales y participa en el movimiento de los fluidos extracelulares [6]. La MEC es una matriz que varía en cantidad y composición según el tejido en que se encuentre. En el corazón incluye: colágenos, glicoproteínas (ej. fibronectina), proteoglicanos, glicosaminoglicanos, proteínas matricelulares y proteasas, las cuales pueden estar unidas a la matriz, en variados tipos celulares o circulando por la sangre [7]. La densidad de la MEC es un factor íntimamente relacionado con la función cardíaca, ya que la expresión y acumulación de colágeno está aumentada en cierto número de enfermedades cardiovasculares [6].

1.5 Principales tipos celulares en el músculo cardíaco

1.5.1 Cardiomiocitos:

Los miocitos son las células más voluminosas, pero no las más numerosas, siendo aproximadamente un 90% de la masa del miocardio [8]. La función bombeadora del corazón depende de la contracción de los cardiomiocitos [9], los que se caracterizan por responder a una señal eléctrica en la membrana celular, y se contraen en respuesta a un potencial de acción, tal como ocurre en todas las fibras musculares. Pero, a diferencia de las fibras musculares esqueléticas, las cardíacas son más cortas y más ramificadas, lo que le confiere la capacidad de ejercer su función: contraer, como parte de una unidad funcional y eyectar la sangre desde las cámaras del corazón [9]. Como se mencionó anteriormente no sólo de cardiomiocitos está compuesto el tejido cardíaco. Existen también otros tipos de células que son importantes para el correcto funcionamiento del corazón.

1.5.2 Fibroblastos

Los fibroblastos han sido vistos como un tipo celular uniforme con funciones comparables sin importar si se originan del corazón, piel u otro tejido. Esta visión reduccionista ha sido desafiada por datos que demuestran un gran heterogeneidad fenotípica entre fibroblastos de distintos tejidos y frente a un tejido en particular bajo diferentes condiciones fisiológicas [10]. Los fibroblastos cardiacos son reconocidos como el tipo celular responsable de la mantención homeostática de la MEC en el corazón normal [11]. Morfológicamente los fibroblastos poseen un núcleo oval, un extenso retículo endoplásmico rugoso, un aparato de golgi prominente y abundante material citoplasmático granular [6]. También cumplen otros importantes roles como sensores intermedios y amplificadores de señales de las células del sistema inmune y de los cardiomiocitos, a través de la producción de mediadores autocrinos y paracrinos como citoquinas, factores de crecimiento, prostaglandinas y óxido nítrico [11]. Corresponden a alrededor de dos tercios de las células intersticiales del corazón y activamente conversan con los cardiomiocitos para determinar la cantidad y composición de la MEC [12]. Los fibroblastos están ubicados en láminas y hebras que corren en paralelo a las fibras musculares y mantienen la continuidad entre las células en las diferentes capas del miocardio. Esta organización celular les permite poder mantener la integridad de la MEC y también poder responder a una gran variedad de estímulos mecánicos, eléctricos y químicos importantes para una función cardiaca normal [13].

Investigaciones han demostrado que los fibroblastos se ven envueltos en fenómenos que van más allá de la deposición de MEC y del remodelado. Estos estudios los han re-bautizado como “células centinelas”, y han propuesto que juegan importantes roles en la respuesta miocárdica a señales químicas y mecánicas. Esta nueva terminología se basa principalmente en la interconexión existente entre estas células y otros tipos celulares, a través de conexiones de tipo célula-célula [6]. En respuesta al daño miocárdico o a un infarto, los fibroblastos se activan y migran a la zona infartada liberando metaloproteinasas de matriz (MPM), provocando la degradación de la MEC dañada. La repuesta de estos fibroblastos es mediada por citoquinas proinflamatorias, que incluyen a IL-1 β y TNF- α , que son sintetizadas por células residentes situadas en

los sitios de daño, donde se encuentran los mismos fibroblastos, y también por células infiltradas de sistema inmune e inflamatorio [14]. Cabe destacar que son los mayores contribuyentes de la fibrosis cardiaca asociada a la hipertrofia y falla cardiaca [12].

1.5.3 Miofibroblastos

Los miofibroblastos son descritos como un fenotipo especializado de fibroblastos activos, que presentan la proteína contráctil α -actina del músculo liso (α -SMA), además de vimentina y desmina, y son capaces de contraer geles de colágeno in-vitro [11]. Como su nombre lo indica, los miofibroblastos corresponden a células que combinan características estructurales y funcionales del músculo liso (mio-) debido a la expresión de fibras de estrés contráctiles de actina/miosina, combinado con el extenso retículo endoplásmico de los fibroblastos sintéticamente activos [15]. Los fibroblastos son activados en respuesta a un infarto al miocardio, daño o por sobrecarga hemodinámica debido a la hipertensión [11]. Posterior al daño, se activa el proceso de cicatrización en el que ocurre la activación de los fibroblastos, proceso impulsado por citoquinas y factores de crecimiento liberados por otros tipos celulares como también por los mismos fibroblastos [11]. Existen varias citoquinas fibrogénicas que han sido indicadas como las responsables de esta activación, entre ellas, IL-1, TNF- α , PDGF, FGF y TGF- β 1; pero, es esta última la más importante causante del desarrollo de las fibras de α -SMA y de la activación fenotípica. Así también, se han descrito otros requerimientos para la transformación, como lo es la presencia del dominio ED-A de fibronectina, sitio de unión para las membranas celulares y otras moléculas de la matriz [16] y la existencia de tensión mecánica [17].

Los fibroblastos que residen en el tejido son la principal fuente de origen de miofibroblastos, pero no es la única [15]. Los miofibroblastos no son observados en el miocardio normal, pero son abundantes en los sitios infartados donde la síntesis y deposición de colágeno promueve la formación de una cicatriz y fibrosis [13]. En respuesta a estímulos patológicos, tales como daño miocárdico, estrés oxidativo, tensión mecánica, aumento en la producción de mediadores autocrinos y/o paracrinos

y estímulos inflamatorios, los fibroblastos proliferan, migran y experimentan cambios fenotípicos, como la diferenciación a miofibroblastos [18].

¿Pero cuál es el criterio para identificar a un miofibroblasto? La expresión de α -SMA es el marcador de miofibroblastos más ampliamente usado en investigación y diagnóstico clínico [15]. Pero también existen otros criterios de identificación, como la presencia de adhesiones focales supermaduras (in vitro), fibras de estrés, entre otras, características que le brindan una gran capacidad de fuerza contráctil [19].

Con respecto a su función, los miofibroblastos poseen un rol activo durante la fibrosis por su habilidad de poder expresar altos niveles de MEC y citoquinas fibrogénicas, además de contribuir en las propiedades mecánicas del tejido afectado [20]. Son capaces de brindar tensión mecánica a la matriz a través de anclaje y contracción, hasta cerrar la herida y limitar la cicatriz. Una vez que la herida madura, los miofibroblastos experimentan apoptosis y dejan una cicatriz en la zona dañada por el infarto, compuesta principalmente por colágeno entrecruzado y otras proteínas de matriz [13]. Es por esto, que se piensa que una falla en la apoptosis de los miofibroblastos conduciría a la progresión de la fibrosis [6] y adicionalmente, las citoquinas y otros factores de crecimiento producidos por los miofibroblastos podrían, al mismo tiempo, estimular a otros fibroblastos y desencadenar su diferenciación, perpetuando la cascada fibrogénica [18]. Actualmente, se le considera a los miofibroblastos uno de los blancos farmacológicos más promisorios para prevenir la fibrosis cardiaca, existiendo variadas estrategias para impedir su función y normal desarrollo, entre las cuales se cuenta: impedir la incorporación de α -SMA en las fibras de estrés, disminuir la producción de colágeno tipo I, promover la apoptosis, entre otras [21].

1.6 TGF- β 1

TGF- β 1 es una citoquina pleiotrópica implicada en una amplia variedad de funciones celulares, y es crítica en la regulación de inflamación, deposición de la MEC, proliferación celular, diferenciación y crecimiento [22]. Juega un rol clave en la hipertrofia y el remodelado cardiaco mediante el crecimiento de los cardiomiocitos, activación de los fibroblastos y deposición de MEC [20]. Además, TGF- β 1 aumenta en

gran medida la síntesis de colágeno a nivel cardíaco, produciendo una conducción discontinua entre los cardiomiocitos y fibroblastos [12]. El TGF- β 1, es sintetizado por varios tipos celulares como un gran complejo latente, incapaz de unirse a su receptor y necesita de un activador para poder liberarse.

Los miembros de la super familia TGF- β transducen su señal desde la membrana al núcleo a través de distintas combinaciones de receptores transmembrana serina/treonina tipo I y tipo II y sus efectores rio abajo, como las proteínas Smad. Una vez activo, TGF- β es capaz de unirse al receptor tipo II (T β RII). Este complejo interactúa y transfosforila el dominio citoplásmico del receptor tipo I (T β RI). La fosforilación del T β RI activa al dominio quinasa de ese receptor, que causa la propagación rio abajo de señales intracelulares, a través de las proteínas Smad [23], las que luego de la oligomerización son translocadas al núcleo y actúan como factores transcripcionales, que regulan la expresión de genes blancos. Esta vía es la denominada vía canónica del TGF- β 1. Por otro lado, también el TGF- β 1 es capaz de activar vías de señalización de tipo no-Smad, que incluyen a TAK1, Erk, p38, y PI3/Akt, JNK, GTPasas tipo Rho [24] (ver Figura 1).

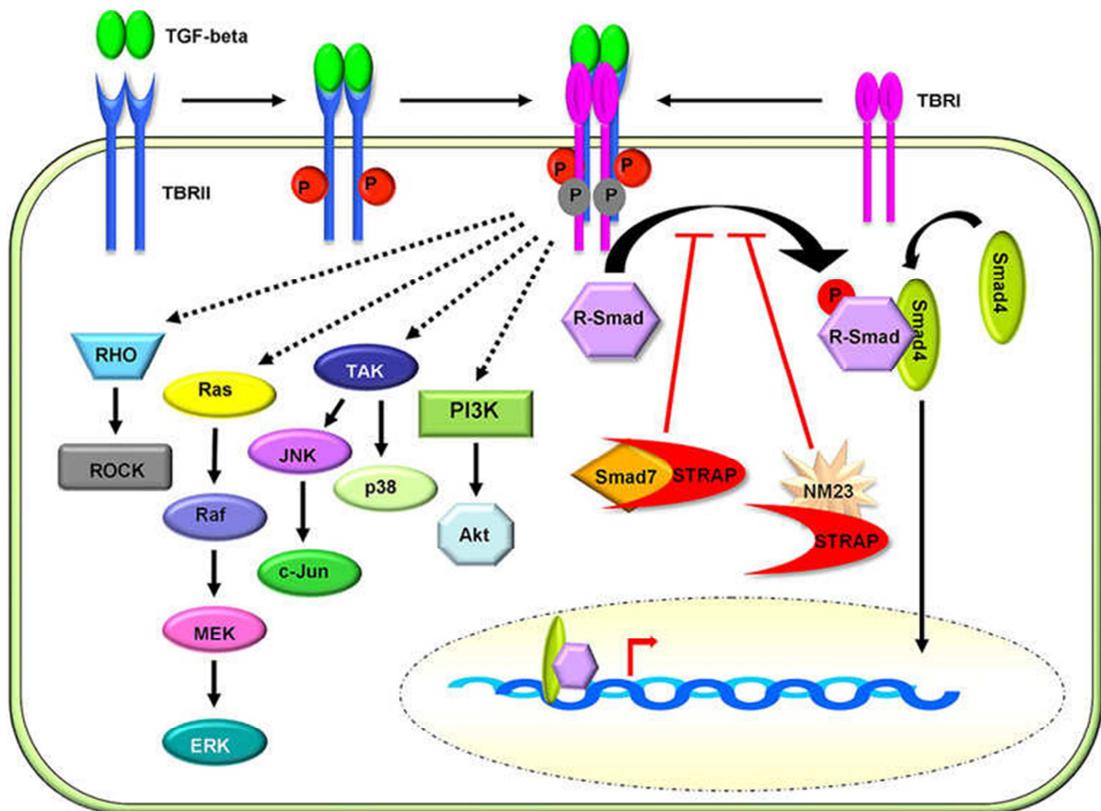


Figura 1. Cascada de señalización de TGF-β1. La señalización puede ser propagada por la vía canónica Smad o de manera independiente, a través de la vía no canónica [25].

1.7 Sistema cinina-caliceína

Las cininas son clásicamente conocidas como péptidos que participan en eventos vasculares e inflamatorios. Tales péptidos son generados por la acción de las caliceínas sobre los cininógenos. Las cininas actúan por la unión a dos tipos de receptores, llamados B1 y B2, los cuales pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G. En contraste a los receptores B2 (B2R) que son expresados constitutivamente en una variedad de células bajo condiciones fisiológicas, los receptores B1 (B1R) están generalmente ausentes o expresados en baja cantidad en los tejidos sanos, pero su expresión rápidamente se incrementa bajo condiciones patológicas y/o por presencia de los agonistas de B1R [26].

En humanos existen cuatro tipos diferentes de cininas que presentan actividad biológica: el nonapéptido bradicinina (BK), el decapeptido Lys- BK y sus metabolitos des-Arg carboxi-terminal. B2R reconoce BK y a Lys-BK, mientras que B1R posee una alta afinidad por des-Arg9-BK (DABK) y por des-Arg10-Lys-BK (DAKD) [27]. Ambos receptores, están acoplados a proteínas $G_{\alpha q/11}$, que llevan a la activación de fosfolipasa C- β (PLC β) y la subsecuente generación de los segundos mensajeros inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), diacilglicerol (DAG) e ión calcio (Ca^{2+}). El aumento en los niveles de Ca^{2+} puede activar la vía óxido nítrico / guanosin monofosfato cíclico (cGMP) que media, principalmente, el fuerte efecto vasodilatador de las cininas en la vasculatura. Es más, DAG y Ca^{2+} solos o en combinación, activan varias isoformas de la proteica cinasa C (PKC) que participan en variadas rutas de señalización celular. En adición a PLC β , los receptores de cininas pueden también activar a fosfolipasa A2 y fosfolipasa D, así como también a la esfingosina cinasa que desencadena un aumento en las concentraciones celulares de los segundos mensajeros lipídicos: ácido araquidónico (que es convertido a prostaglandinas), ácido fosfatídico y esfingosina 1-fosfato. Tanto las prostaglandinas como la esfingosina 1-fosfato pueden ser liberadas por la célula y actuar de manera autocrina y/o paracrina. Sin embargo, esta vía de señalización asociada a los receptores de cininas no sería la única, se ha visto que B2R podría activar a las proteínas G pequeñas Rho, Rac o Cdc42, PKA y al estar acoplada a G_i desencadenaría la cascada de ERK/MAPK [28]. Como se indicó inicialmente, B1R está expresado débilmente en varios tipos celulares y su expresión aumenta durante eventos inflamatorios, presencia de lipopolisacárido (LPS), citoquinas y durante condiciones in vitro. El promotor del gen de B1R tiene numerosas secuencias de unión para factores de transcripción, incluyendo NF- κ B y AP-1, y en concordancia con lo anterior se ha visto que el uso de diferentes inhibidores de protein- quinasas mitógeno activado (MAPKs) y de NF- κ B pueden reducir el incremento de la expresión de los receptores B1 [27].

1.7.1 Rol de las cininas

Las cininas son clásicamente conocidas por ser péptidos que participan en eventos vasculares e inflamatorios. Pero actualmente se conoce que este sistema juega roles

más amplios que los clásicos descritos [26]. Aunque las cininas son mediadores de vida media corta, están implicados en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. Activan a las células endoteliales, inducen a la vasodilatación y contracción del músculo liso, aumentan la permeabilidad microvascular, estimulan la producción de radicales superóxido y de óxido nítrico, modulan la movilización y liberación de histamina, ácido araquidónico, prostaglandina E2, IL-1 y TNF- α . En conjunto con lo anteriormente mencionado las cininas están también envueltas en la homeostasis cardíaca, en la regulación de la función renal y presión sanguínea, y en varios desórdenes de tipo inmune e inflamatorio [29].

1.7.2 Inflamación

Desde su descubrimiento BK ha demostrado inducir los cuatro signos clásicos de inflamación: calor, enrojecimiento, hinchazón y dolor. Hoy en día está bien establecido que las cininas son generadas rápidamente después de un daño tisular y que las cininas endógenas tienen un rol esencial en el desarrollo y mantención del proceso inflamatorio. La activación de B2R, lleva a la transducción de varias vías de señalización, que conducen finalmente a la liberación de sustancias como citoquinas y otros mediadores inflamatorios (por ejemplo eicosanoides), y también una tardía y sostenida liberación de prostaglandina E2, probablemente por un aumento en la expresión de COX-2. Este evento, inicialmente atribuido a la activación de B2R, ha sido también relacionado con el B1R, principalmente actuando de manera sinérgica con las citoquinas. La capacidad de BK de activar a NF- κ B fuertemente evidencia una conexión entre BK y citoquinas. La expresión de varias citoquinas es mediada por este factor, al mismo tiempo que este factor transcripcional también regula la expresión de B1R [29]. La correlación entre las cininas, TNF- α e IL1- β es también observada en la biosíntesis de prostaglandinas en osteoblastos, involucrando una regulación positiva de COX-2 [29].

1.7.3 Enfermedades cardiovasculares

Uno de los sistemas en que las cininas juegan un rol mediador importante es en las enfermedades cardiovasculares. Calicreína aumenta el flujo sanguíneo coronario, disminuye el tamaño del infarto y disminuye el remodelado ventricular izquierdo post infarto al miocardio [30]. Como se mencionó anteriormente, el B1R se expresa bajo condiciones patológicas, lo que indicaría que este receptor tiene un rol diferente durante la progresión y el desarrollo de la enfermedad cardiaca con respecto al B2R [30]. En cultivos celulares experimentales, B2R responde a su estimulación con una señal fuerte y corta de activación, pero es también caracterizado por una inmediata y rápida pérdida de la respuesta funcional e internalización del receptor, todo esto acompañado de una regulación negativa del ARN mensajero y de la proteína. Por otro lado, se ha establecido que B1R en algunos tipos celulares estaría siendo sintetizado de *novo* bajo condiciones de estrés. Además, el agonismo sobre el receptor no causaría internalización o desensibilización del receptor B1R, por lo que lleva a una señalización de tipo persistente, en células de ovario de hámster chino (CHO) [31]. Experimentos han revelado que tanto el B1R y el B2R son aumentados tanto en la fase inflamatoria temprana (6 y 24 horas post infarto al miocardio) como en la fase tardía (6 días post infarto al miocardio). Es más, se ha estudiado que a la tercera semana ocurrido el infarto, aún aparecían niveles aumentados de ambos receptores comparado con los controles [31].

1.8 Cininas y fibroblastos

Los receptores de cininas se encuentran presentes en fibroblastos de diferentes tejidos, entre los cuales se cuentan: pulmonar [32], de piel [33] y cardiaco [34]. Se ha descrito que en fibroblastos pulmonares embrionales de humano, DABK induce la formación de colágeno, síntesis de proteínas y proliferación celular, las cuales fueron inhibidas al usar el antagonista B1R, desArg⁹[Leu⁸]-BK. Por su parte BK también estimuló la formación de prostaglandina en ese tipo celular [35]. Otro antecedente, con respecto a la producción de colágeno, es que el agonismo del receptor B1, en fibroblastos pulmonares embrionales de humano, genera un estímulo en la producción de colágeno tipo I, al mismo tiempo que estos efectos no fueron observados al

estimular el B2R [36]. Por el contrario, en fibroblastos cardiacos, la literatura indica que existe una reducción en la expresión de colágeno inducida por BK, asociada a un aumento en la formación de metabolitos pertenecientes a la ruta de la ciclooxigenasa, particularmente PGI₂ [37]. Así también, existen referencias que indican que la expresión de procolágeno- α 1(I), uno de los principales componentes de la MEC que se acumula durante la fibrosis hepática, se ve disminuida al estimular con BK el tejido hepático, además de disminuir la expresión de la citoquina TGF- β 1; evidenciando que BK tendría efectos antifibróticos en el hígado [38].

Con respecto al comportamiento celular, la literatura indica que las cininas tienen efectos sobre la migración/invasión celular y se ha visto que BK estimula la migración, en la línea celular tipo fibroblasto Swiss 3T3, proceso crítico en la restauración de heridas. Así también, se ha visto que BK induciría la formación de micropúas de actina periférica, filopodios y lamelipodios en Swiss 3T3, indicando su relevancia como fenotipo invasivo [39]. En conjunto con esto, las cininas estarían actuando sobre la adhesión celular de los fibroblastos, al estimular la fosforilación transitoria de tirosina cinasas y la activación de las cinasas de adhesión focal, así como también en varios fosfotirosin- sustratos asociados a adhesión focal (por ejemplo paxilina), eventos que han sido relacionados a la regulación de la proliferación, adhesión, migración y apoptosis [40].

Otro aspecto relevante corresponde a liberación de citoquinas y otras sustancias relacionadas, durante episodios inflamatorios. BK activa múltiples factores de transcripción y regula la inducción de varias citoquinas envueltas en inflamación y daño de tejidos, así como la inducción de B1R; además de estimular la activación de NF- κ B lo que conduce a la expresión del gen de IL-1 β y también estimular la expresión de IL-6 e IL-8 [40]. Del mismo modo, a lo antes mencionado se añade que, estudios en fibroblastos gingivales humanos han demostrado que las citoquinas IL-1 β y TNF- α aumentan la expresión de los receptores B1 y B2, a través de un aumento del ARN mensajero y en la unión al receptor [27]. Por lo que existiría una conversación muy estrecha entre las cininas y las citoquinas durante el proceso inflamatorio.

Como se puede apreciar son escasos los estudios de la acción de las cininas en fibroblastos y es aún menor la información con respecto al rol que jugarían en fibroblastos y miofibroblastos que residen a nivel cardiaco, parte importante en la etiología de la enfermedad cardiaca. Nuestro laboratorio ha obtenido antecedentes con respecto a la presencia de B1R y B2R en fibroblastos o miofibroblastos cardiacos, donde B2R se encontraría en ambos fenotipos celulares y el receptor B1 se encontraría en miofibroblastos y en menor medida en fibroblastos cardiacos, pero acerca de su función sobre el comportamiento celular no se tienen mayores referencias.

2. HIPÓTESIS

TGF- β 1 induce la expresión del receptor B1 de cininas en fibroblastos de rata neonata, a través de las vías JNK y/o p38; y la activación de los receptores de cininas en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos, disminuye la adhesión y migración celular, demostrando con ello un efecto antifibrótico.

3. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que TGF- β 1 induce la expresión del receptor B1 de cininas en fibroblastos cardíacos por las vías JNK y/o p38 y que la activación de los receptores de cininas reduce la adhesión y migración de fibroblastos y miofibroblastos cardíacos de rata neonata.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Demostrar un aumento en la expresión del receptor B1 y de α -SMA en fibroblastos cardíacos estimulados con TGF- β 1.
- 2) Demostrar que las vías transduccionales de TGF- β 1 implicadas en la expresión del receptor B1 son JNK y/o p38.
- 3) Demostrar que las cininas reducirían la adhesión celular de fibroblastos y miofibroblastos.
- 4) Demostrar que las cininas reducirían la migración celular de fibroblastos y miofibroblastos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron de Sigma Aldrich Company (St. Louis, MO, EEUU): Azul de tripán, En Gibco BRL (Carlsbad, California, EEUU) se adquirieron tripsina-EDTA, estándares de masas moleculares de proteínas preteñidas, suero fetal de bovino (FBS) y Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (D-MEM/F-12). Los compuestos inorgánicos y orgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en MERCK (Darmstadt, Alemania). El reactivo quimioluminiscente para Western blot (Western Lightning) se adquirió a Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek 25115 Israel). El material de plástico estéril para la obtención y cultivo de fibroblastos cardíacos se adquirieron de Corning Incorporated (New York, EEUU), Plastibrand y Falcon (EEUU).

Los inhibidores: SP600125, SB202190 PD98059, Ly294002, SB431542 y SIS3 fueron comprados a Sigma Aldrich Company, (Reino Unido). El anticuerpo primario del receptor B1 de cininas fue adquirido a Enzo Live Sciences y los anticuerpos primarios α -SMA y GAPDH a Sigma Aldrich Company (Reino Unido). Los anticuerpos anti mouse y anti rabbit a Calbiochem Merck Chemicals International. El cristal violeta fue adquirido a Merck Chemicals International (Alemania). Los agonistas BK y DAKD a AnaSpec EGT Group (San José, CA, EEUU) y Angiotensina II a Sigma Aldrich (Reino Unido). El análogo de timidina Bromodeoxiuridina y el reactivo Folin-Ciocalteu a Merck KGaA (Darmstadt, Alemania).

5.2 Animales

Ratas Sprague-Dawley neonatas (2 a 3 días de edad), se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, cumpliendo con todas las normas bioéticas referidas a la utilización de animales y de acuerdo al Comité de Ética de la Facultad.

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

Se utilizó el procedimiento descrito por Foncea y cols [41], el cual da cuenta de la posibilidad de separar cardiomiocitos de fibroblastos cardíacos por la diferente capacidad de adherencia a las placas de cultivo. 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).

5.4 Obtención de miofibroblastos

Se utilizaron fibroblastos en pasaje 2, los que fueron estimulados con TGF- β 1 (5ng/mL) e incubados durante 5 días en medio de mantención (DMEM-F12).

5.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%. Para la detección se cargaron entre 75 a 15 μ g de extracto proteico según la proteína a determinar. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 70V los primeros 30 minutos y luego a 100V en tampón de electroforesis 1X (Tris base 30,25 g, Glicina 144 g, SDS 10 g, agua 1.000 mL para tampón de electroforesis 10X).

5.6. Electrotransferencia de proteínas

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) 350 mA durante 90 min en tampón de transferencia 1X (tris base y glicina disuelto en agua destilada).

5.7. Western blot.

Una vez transferidas las proteínas, las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (TBS 1X; Tween-20 0,1%; leche sin grasa 5% p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de tres lavados con TBS 1X de 10 minutos cada uno. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes según el ensayo: Anti B1R (dilución 1:1000 en TBS 1X) o Anti α -SMA (dilución 1:10000 en TBS 1X) toda la noche a 4°C con agitación suave. Para el control de carga GAPDH y tubulina se usó una dilución de los anticuerpos específicos de 1:10000 y se dejó la membrana toda la noche a 4°C con agitación suave. Posterior a la incubación, las membranas se lavaron 3 veces por 5 min en TBS 1X / Tween-20 al 0,1%, e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios anti rabbit o anti mouse, a un título de 1:10000 e 1:5000 respectivamente en tampón de incubación. Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en solución de EZ-ECL y se expusieron a la película de fotografía AGFA. Las películas se digitalizaron y las imágenes se cuantificaron por densitometría con ayuda del programa computacional Image J. Después de realizar los ensayos de Western blot, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 45 min en una solución de Mild Stripping (dilución de glicina, SDS y Tween 20 en agua nanopura ajustada a pH 2,2) para desprender los anticuerpos, posteriormente se lavaron en TBS 1X / Tween-20 al 0,1% por tres veces. Luego de este tratamiento, las membranas pudieron ser reutilizadas para nuevos ensayos de Western blot.

5.8. Protocolo de estímulo con TGF- β 1 a través del tiempo

Fibroblastos en pasaje 2 fueron privados de suero, dejándolos con el medio de mantención (DMEM-F12). Posteriormente fueron estimulados con TGF- β 1 logrando

una concentración de 5 ng/mL. Finalmente las placas fueron incubadas y raspadas a través del tiempo, desde 0 a 96 horas.

5.9. Protocolo inhibición de las vías transduccionales de TGF- β 1.

Fibroblastos en pasaje 2 fueron privados de suero, dejándolos con el medio de mantención (DMEM-F12). Posteriormente, las células fueron estimuladas tanto con los inhibidores de la vía no-canónica de TGF- β 1 (SP600125 10 μ M, SB202190 10 μ M, PD98059 10 μ M y Ly294002 10 μ M), como de la vía canónica (SB431542 0,5 μ M y SIS3 1 μ M). Luego, las células se estimularon con TGF- β 1 5ng/mL. Como controles, se utilizaron cada estímulo por sí solo, evaluado finalmente los niveles de proteína mediante Western Blot (WB).

5.10. Adhesión celular

Se utilizaron fibroblastos y miofibroblastos cardíacos. Se privaron las células por 24 horas con DMEM F-12. Una vez privadas, las células fueron incubadas con una serie de estímulos durante 24 horas. Para la adhesión se utilizó una placa de 24 pocillos, cada pocillo fue sembrado con 10.000 células en duplicado durante 2 horas. Para la tinción se ocupó cristal violeta. Se midió la absorbancia a 595 nm mediante la disolución de las células teñidas con SDS 10%.

5.11. Migración celular

Las células utilizadas para este estudio fueron fibroblastos y miofibroblastos cardíacos. Se privaron las células por 24 horas con DMEM F-12. Una vez privadas, a las placas se les hizo una herida con una punta de pipeta p1000, se aspiró el medio y se agregó medio de mantención. Transcurridas 2 horas se estimularon las placas por 48 horas con diversos estímulos. Transcurrido el periodo de tiempo las placas fueron lavadas con PBS tibio y se tiñeron con cristal violeta durante 20 minutos, finalmente las placas fueron sumergidas en agua, secadas y fueron fotografiadas a través de microscopio. El

análisis se hizo a través de la medición del cierre de la herida por una cuantificación de área usando el programa ImageJ.

5.12. Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica fue realizada para fibroblastos y miofibroblastos cardiacos. Las células fueron inicialmente fijadas con paraformaldehído 4% e incubadas con glicina 100 μ M. Luego fueron permeabilizadas con tritón x 0,1% por 10 minutos y bloqueadas por 20 minutos. La incubación del anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a temperatura ambiente, y el anticuerpo secundario se dejó incubando durante 2 horas a temperatura ambiente en total oscuridad. Finalmente se montó la muestra ubicada en un cubre objeto sobre un porta objeto con DAKO. Una vez secas se observaron y fotografiaron las muestras en un microscopio.

5.13. Análisis estadístico

Los resultados mostrados corresponden al promedio \pm error estándar (SEM) de al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA y la prueba Tuckey para determinar la significancia estadística de los resultados, se consideró significativa la diferencia entre dos grupos cuando su valor de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Resultados del Objetivo específico 1

6.1.1. Identificación del fenotipo celular

Como se aprecia en la Figura 2, los fibroblastos cardiacos de rata neonata exhiben una tenue y desorganizada expresión de α -SMA. Sin embargo, luego de un estímulo con TGF- β 1 durante 96 horas se observan cambios entre ellos: las células son de mayor tamaño, presentando una forma angulosa y las fibras de α -SMA aparecen de manera organizada e intensa.

6.1.2. Expresión del B1R y de α -SMA a través del tiempo

Para determinar si la transformación celular de los fibroblastos a miofibroblastos, mediada por la citoquina TGF- β 1, influye en la expresión del receptor B1 de cininas en estos tipos celulares, fibroblastos privados de suero se estimularon con TGF- β 1 5 ng/mL. Los resultados mostraron que, a tiempo 24 horas se observó un leve aumento en los niveles de expresión de B1R con respecto al control, los que a partir de las 48 horas, aumentaron de forma significativa. Este aumento sería de tipo tiempo dependiente y se mantendría hasta las 96 horas de estímulo con respecto al control. (Figura 3A). En relación a los niveles de expresión de α -SMA, a partir de las 48 horas se evidenció un aumento en la expresión de esta proteína, el cual fue estadísticamente significativo con respecto al control. Dicho aumento se mantiene a través del tiempo hasta las 96 horas de estímulo con respecto a control (Figura 3B). El tiempo de 48 de estimulación con TGF- β 1 se determinó como, tiempo mínimo para poder obtener una respuesta estadísticamente significativa en la expresión de B1R con respecto al control, que coincide con el período que exhibe un aumento en la expresión de α -SMA.

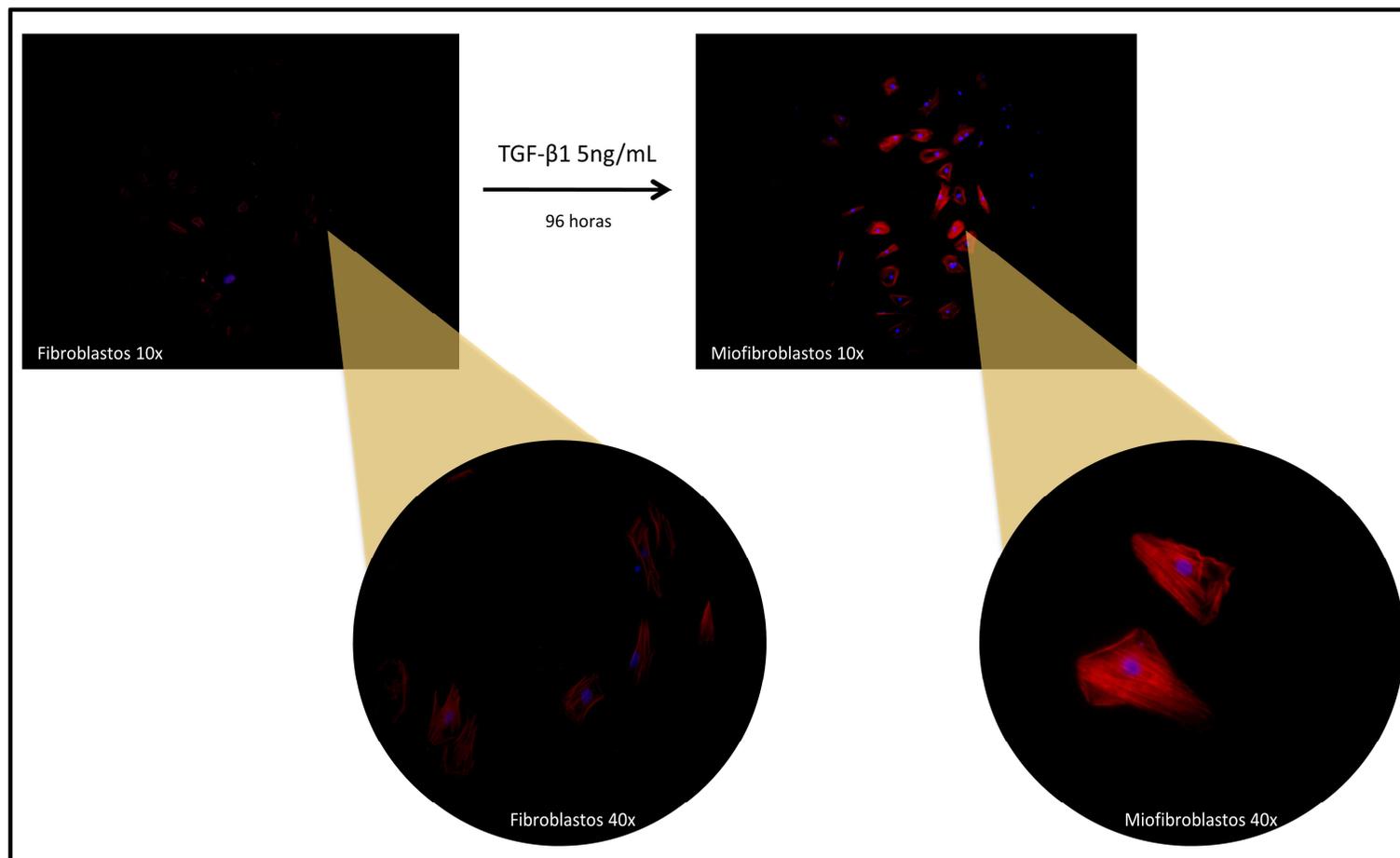


Figura 2: Inmunocitoquímica de α -SMA en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos. Las fibras de α -SMA aparecen de color rojo y el núcleo de color azul. Las imágenes superiores corresponden a una amplificación 10x y las inferiores a 40x. Los fibroblastos fueron transformados a miofibroblastos a través de un estímulo de TGF- β 1 5ng/mL e incubados por 96 horas. El anticuerpo secundario utilizado para α -SMA corresponde a Alexa Fluo 568 Donkey Anti-mouse y la tinción de núcleo corresponde a Hoesch.

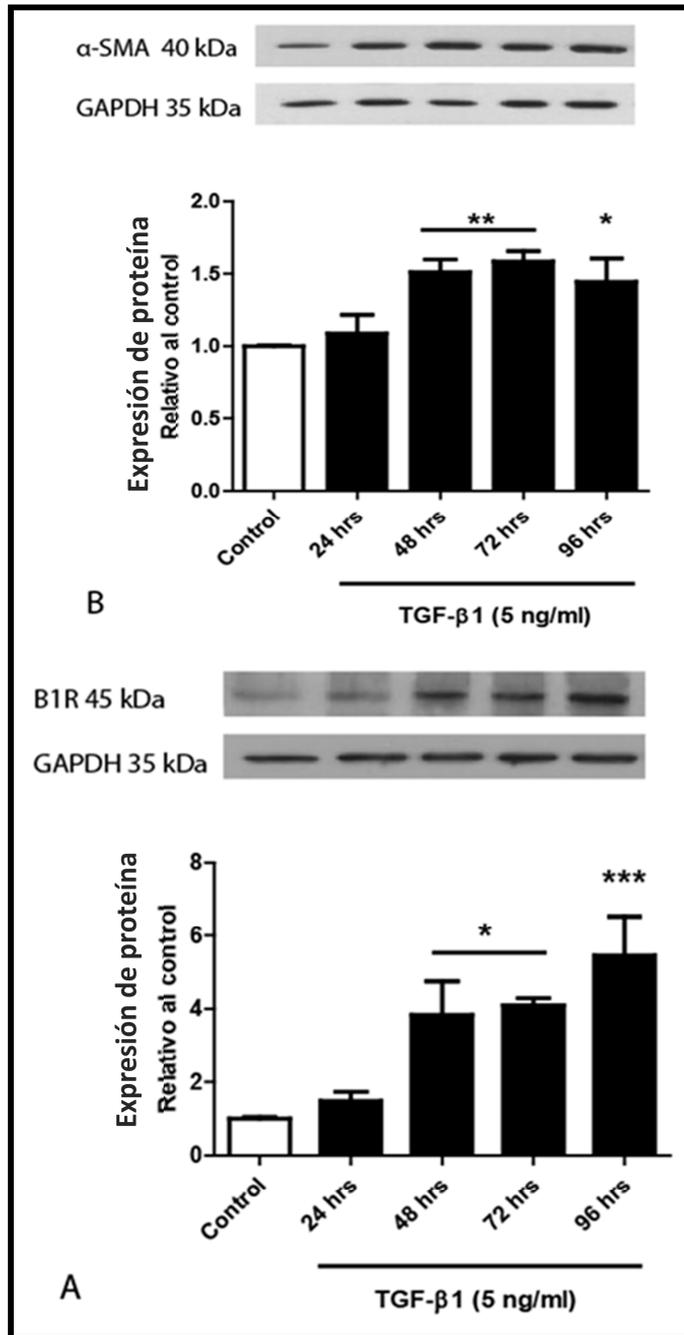


Figura 3. Efecto de TGF-β1 en la expresión de B1R en fibroblastos cardiacos. (A) Expresión del receptor B1 de cininas en fibroblastos cardiacos a través del tiempo, al ser pre-estimulados con TGF-β1 5ng/mL. (B) Expresión de la proteína α-SMA a través del tiempo. Experimentos expresados como el promedio ± el error estándar. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 con respecto al control. Experimentos n=6.

6.2 Resultados Objetivo específico 2

6.2.1. Inhibición de las vías transduccionales de TGF- β 1

Según los resultados anteriormente presentados, un estímulo de TGF- β 1 desencadenaría dos importantes hechos durante diferenciación fenotípica de fibroblastos a miofibroblastos: intensificar la expresión y reorganizar las fibras de α -SMA, e inducir la expresión de B1R.

6.2.1.1. Inhibición de la vía canónica de TGF- β 1

Para el estudio de la participación de la vía canónica de TGF- β 1 sobre la expresión del receptor B1 de cininas, se utilizaron los inhibidores: SB431542, inhibidor de ALK5, que impide la fosforilación de Smad 2/3 [42] y SIS3 inhibidor de la fosforilación de Smad 3 [43]. Una vez pasado los 30 minutos de haber adicionado los inhibidores, se estimuló con TGF- β 1 5ng/mL y las células fueron incubadas por 48 horas, tiempo mínimo en el cual se aprecia un aumento significativo en la expresión de B1R inducido por TGF- β 1. Al cabo de 48 horas las muestras fueron recogidas y se realizó con ellas un WB, utilizando un anticuerpo primario específico para B1R. En la Figura 4, se observa que la pre-incubación con SIS3 seguida del estímulo con TGF- β 1 fue incapaz de revertir la acción del péptido en la expresión del B1R comparado con el control. Por otro lado, también se observa que al utilizar SB431542 en conjunto con TGF- β 1, suscitó una reversión del efecto de TGF- β 1 en la expresión del receptor. Esta reversión del efecto es estadísticamente significativa. Adicionalmente se observa que no hay un efecto en la expresión del receptor al incubar las células sólo con los inhibidores.

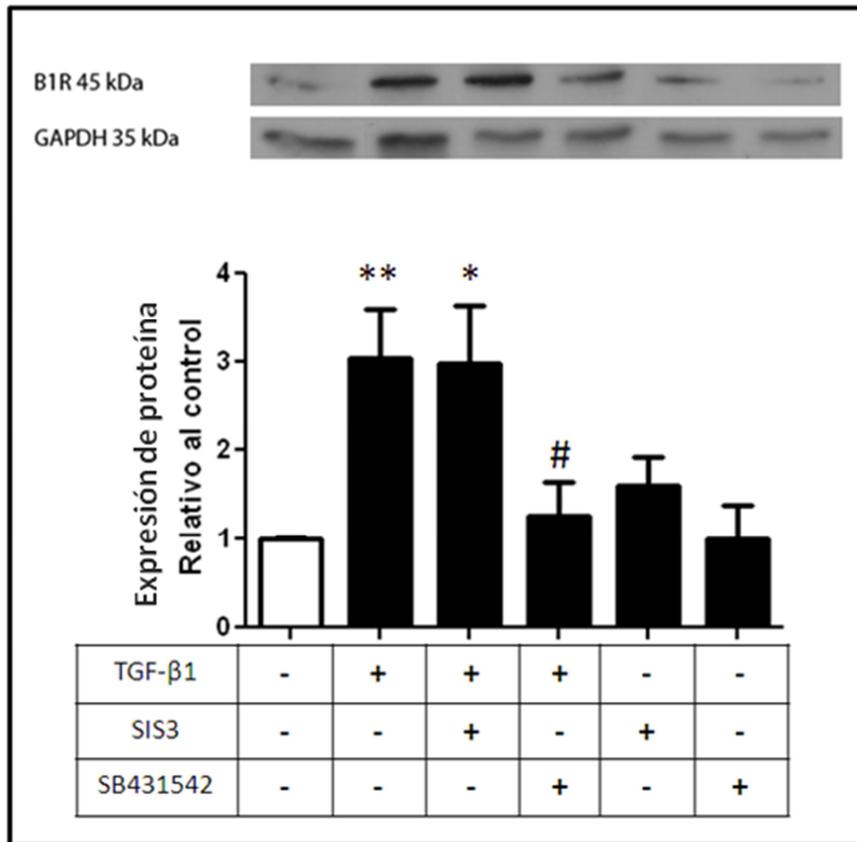


Figura 4. Participación del receptor de TGF-β1 y de Smad 2/3 en la expresión de B1R en fibroblastos cardiacos. Los fibroblastos cardiacos fueron pre estimulados con los inhibidores de la vía Smad SIS3 (1μM) o SB431542 (0,5μM), seguido de una incubación con TGF-β1 5ng/mL durante 48 horas. Experimentos expresados como el promedio ± el error estándar. *p<0,05 con respecto al control, **p<0,01 con respecto al control y #p<0,05 con respecto a TGF-β1. Experimentos n=5.

6.2.1.2. Inhibición de la vía no canónica de TGF-β1

Para estudiar si las vías no canónicas de TGF-β1 participan en la expresión del receptor B1 de cininas, se realizaron ensayos con los siguientes inhibidores: SP600125 10μM, inhibidor reversible competitivo de ATP, que impide la fosforilación de c-Jun [44]; SB202190 10μM, inhibidor de la MAPK p38, se une tanto a la forma activa e inactiva de la enzima y compite por el mismo sitio de unión con ATP [45]; PD-98059 10 μM, inhibidor selectivo de MEK1, se une a la forma inactiva de MEK1 y previene su activación [46] o Ly-294002 10μM, inhibidor selectivo de fosfatidilinositol 3 cinasa

(PI3K), bloqueando la fosforilación de Akt dependiente de PI3K [47]. Cumplido ese tiempo de pre-estímulo, fue adicionado TGF- β 1 (5ng/mL) y se incubaron las células por 48 horas. Finalmente, con las muestras que se obtuvieron se realizaron WB utilizando un anticuerpo primario específico para B1R.

6.2.1.2.1. Vías MAPK

JNK: La pre-estimulación con el inhibidor de la vía JNK, SP600125, seguido de un estímulo con TGF- β 1 de 48 horas demostró revertir significativamente la expresión del B1R con respecto a TGF- β 1, llegando a niveles del control. (Figura 5). El inhibidor, por sí mismo, no mostró efecto 0125 sobre la expresión de B1R.

p38: La misma situación ocurrió con el inhibidor de la vía p38 SB202190, donde la presencia de este inhibidor fue capaz de revertir la expresión de B1R provocada con TGF- β 1, también llegando a niveles del control (Figura 5). El inhibidor, por sí mismo, no mostró un efecto sobre la expresión de B1R.

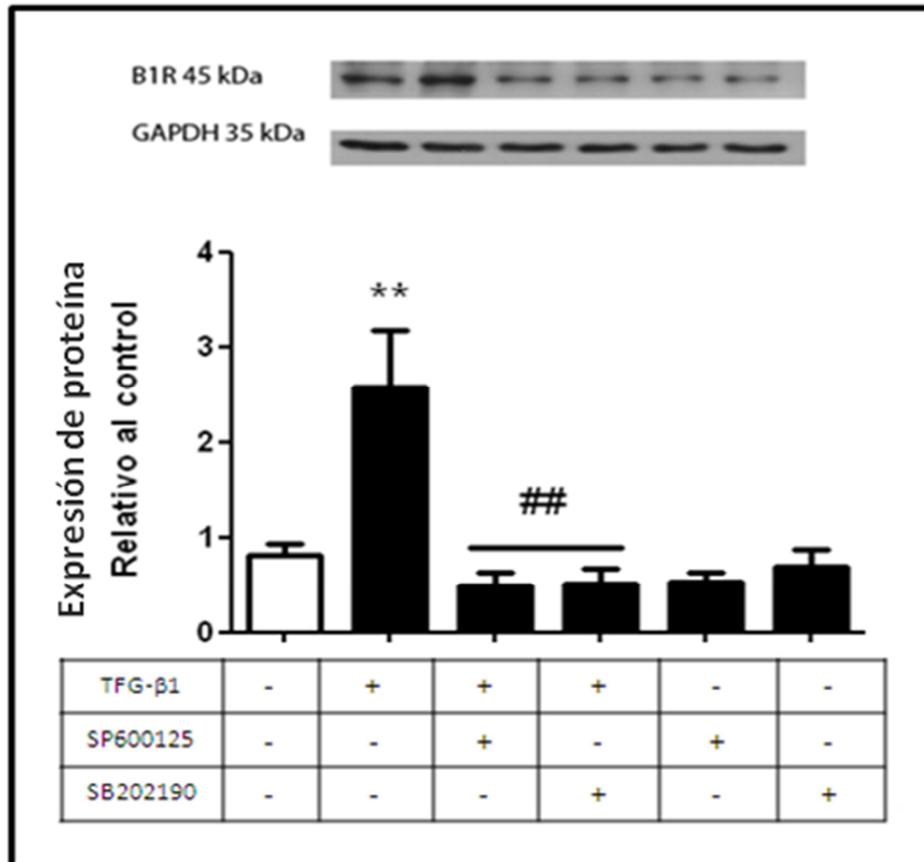


Figura 5. Participación de las vías MAPK JNK y p38 en la expresión de B1R. Los fibroblastos cardiacos fueron pre-estimulados con inhibidores de la vía no canónica MAPK, SP600125 inhibidor de JNK (10 μ M) o SB202190 inhibidor de p38 (10 μ M) y posteriormente incubados con TGF- β 1 5ng/mL durante 48 horas. Experimentos expresados como el promedio \pm el error estándar. ** $p < 0,01$ con respecto al control. ## $p < 0,01$ con respecto a TGF- β 1. Experimentos $n=6$.

ERK: La pre-estimulación con el inhibidor de la vía ERK, PD 98059 y la posterior estimulación con TGF- β 1 causa una reversión, estadísticamente significativa, del efecto del TGF- β 1 en la expresión del B1R (Figura 6). El inhibidor, por sí mismo, no mostró efecto sobre la expresión de B1R.

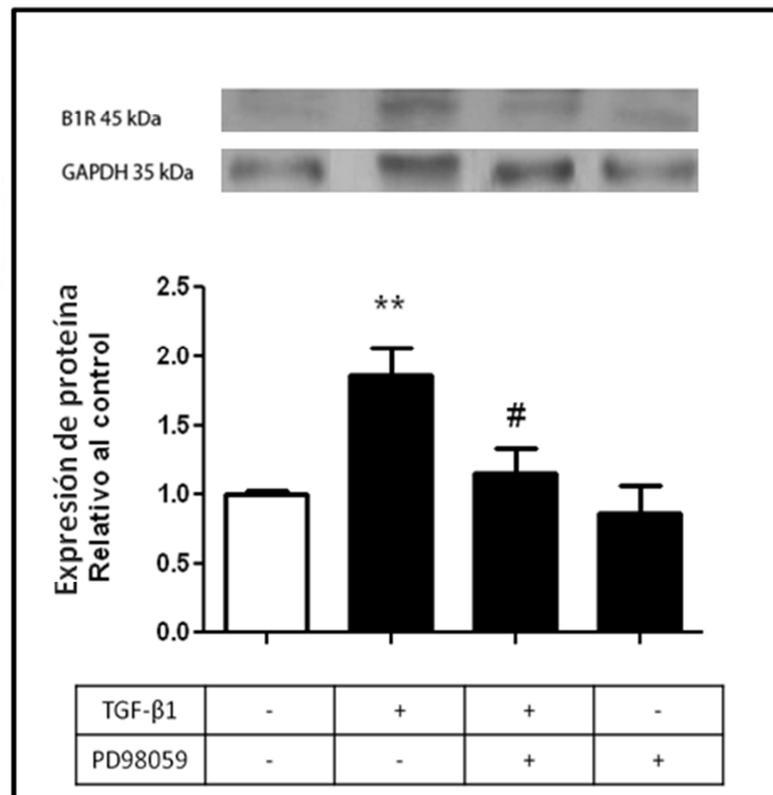


Figura 6. Participación de la vía MEK-ERK sobre la expresión de B1R en fibroblastos cardiacos. Las células fueron pre-estimuladas con PD-98059 (10 μ M), inhibidor de la vía ERK y luego fueron incubadas con TGF- β 1 durante 48 horas. Experimentos expresados como el promedio \pm el error estándar. ** $p < 0,01$ con respecto al control. # $p < 0,05$ con respecto a TGF- β 1 Experimentos n=6.

6.2.1.2.2. Vía PI3K-Akt.

La inhibición de esta vía transduccional reveló que, al utilizar el inhibidor LY294002, inhibidor específico de la vía PI3K-Akt, en conjunto con TGF- β 1, no existe una reversión del efecto con respecto a la acción propia del TGF- β 1, siendo la expresión del receptor significativamente diferente al control, tal como se muestra en la Figura 7.

El inhibidor, por sí mismo, no mostró efecto sobre la expresión del receptor B1.

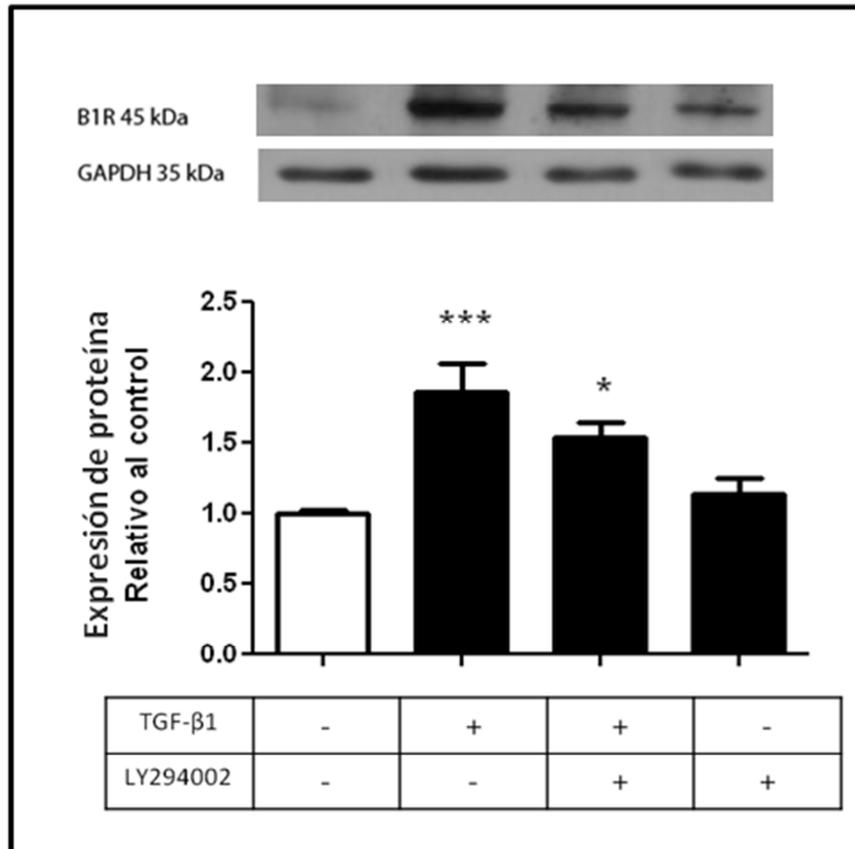


Figura 7. Participación de la vía no canónica PI3K-Akt sobre la expresión de B1R en fibroblastos cardiacos. Las células fueron pre-estimuladas con el inhibidor de la vía no canónica PI3K-Akt, LY294002 (10 μ M) e incubadas con TGF- β 1 5ng/mL durante 48 horas. Experimentos expresados como el promedio \pm el error estándar. * p < 0,05 con respecto al control. *** p <0,001 con respecto al control. Experimentos n=6.

Una vez establecido que los fibroblastos cardiacos expresan receptores de cininas, surge la interrogante: ¿Qué función tienen estos receptores presentes en los fibroblastos, durante la enfermedad cardiaca? Para responder esta incógnita se realizaron estudios de comportamiento celular, evaluando la adhesión, migración y secreción de colágeno I en fibroblastos como en miofibroblastos cardiacos.

6.3. Resultados Objetivo específico 3

6.3.1. Adhesión celular.

6.3.1.1. Adhesión de fibroblastos cardiacos.

La adhesión de los fibroblastos se realizó sobre plástico, con células privadas de suero que fueron estimuladas con agonistas para B1R (DAKD 100 nM) o B2R (BK 100 nM) durante 24 horas. Como control positivo de adhesión celular se utilizó suero, dado que este estímulo se ha establecido que aumenta la adhesión de los fibroblastos cardiacos, según datos de nuestro laboratorio. En la Figura 8, se observa un aumento, estadísticamente significativo con respecto al control, en la adhesión celular de los fibroblastos al ser estimulados con suero. Por otro lado, cuando las células fueron incubadas con los agonistas DAKD o BK, no se observaron variaciones con respecto al control de la adhesión celular.

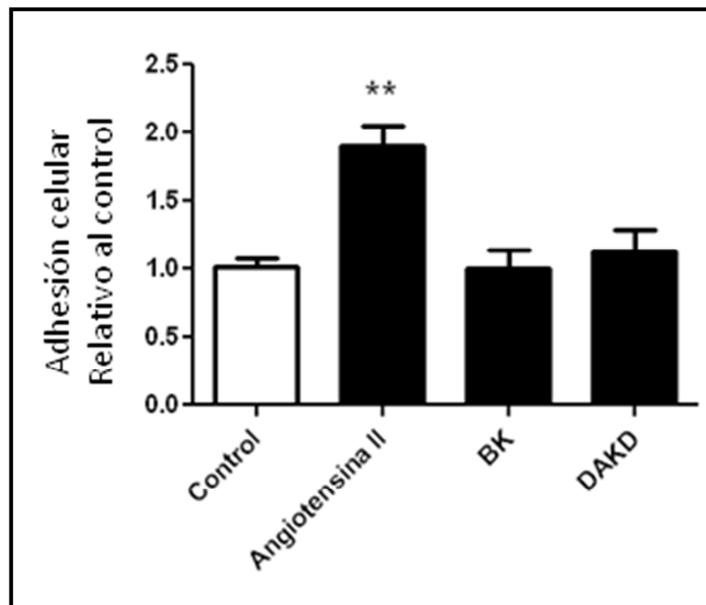


Figura 8. Participación de los agonistas BK y DAKD en la adhesión celular de fibroblastos cardiacos. La células fueron incubadas con el agonista de B2R, BK 100nM o con el agonista de B1R, DAKD 100 nM y cultivadas sobre placas de plástico durante 24 horas. Experimentos expresados como el promedio \pm el error estándar. ** $p < 0,01$ con respecto al control. Experimentos $n = 7$.

Como las cininas no presentaron efectos sobre la adhesión por sí mismas, surgió la idea de poder verificar si eran capaces de revertir la acción de angiotensina II, debido a la contraposición de los sistemas renina-angiotensina y cinina-caliceína. Para ello, se realizó el mismo experimento, pero un grupo de células se pre incubaron con BK durante 30 minutos y luego se adicionó el estímulo angiotensina II. Como se muestra en la Figura 9, BK fue incapaz de prevenir el efecto de angiotensina II en la adhesión celular.

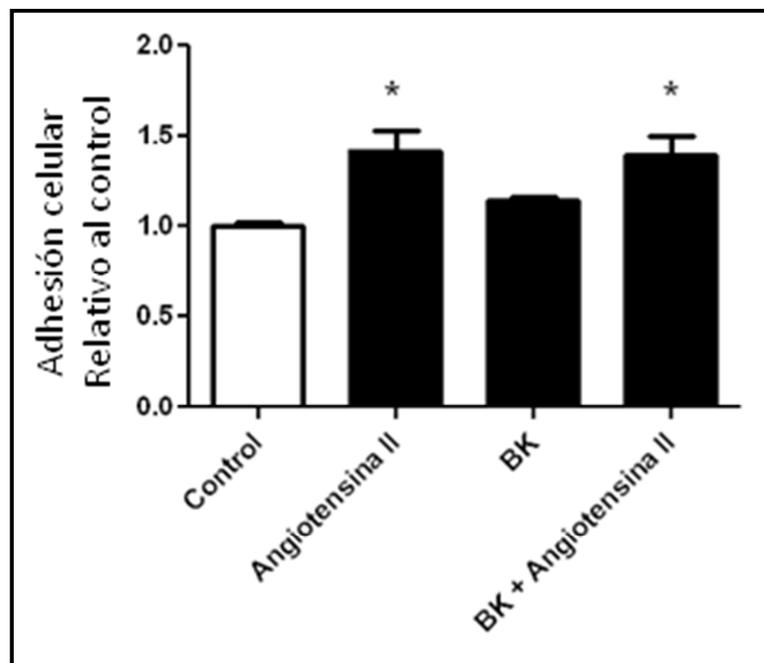


Figura 9. Participación de BK en la adhesión celular de fibroblastos cardiacos. Las células fueron pre-estimuladas con BK 100nM por 30 minutos, luego se adicionó angiotensina II y se incubaron las células en placas de plástico durante 24 horas. Experimentos expresados como el promedio \pm el error estándar. * $p < 0,05$ con respecto al control. Experimentos $n = 6$.

6.3.1.2. Adhesión de miofibroblastos cardiacos.

Para el estudio de la adhesión celular de los miofibroblastos, al igual que en el caso de los fibroblastos cardiacos, se utilizó una placa de plástico como soporte, al cual los miofibroblastos debían adherirse. Al estimular con los agonistas, BK o DAKD, no hubo cambios en la capacidad de adhesión celular desplegado por los miofibroblastos cardiacos (Figura 10). El control positivo de adhesión corresponde a medio de cultivo

suero DMEM-F12 + FBS 10%, que demuestra un aumento significativo en la adhesión con respecto al control.

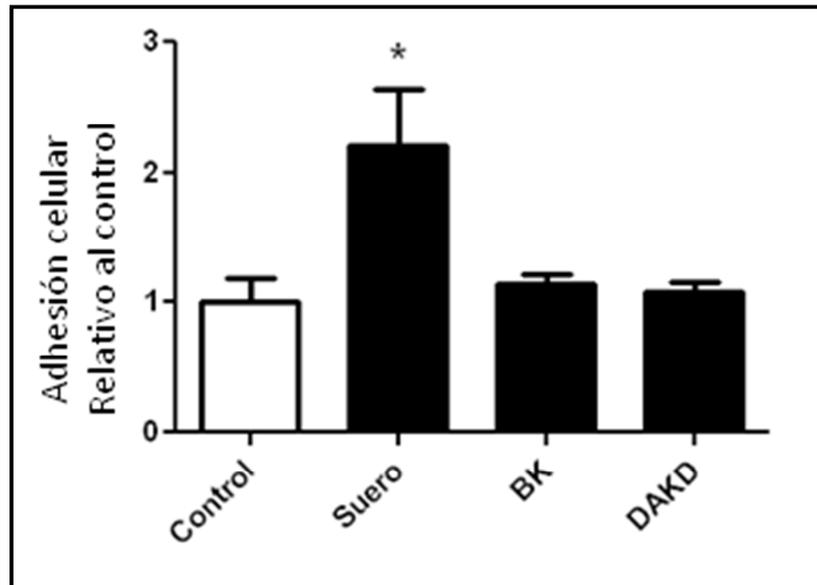


Figura 10. Participación de BK y DAKD en la adhesión celular de miofibroblastos cardiacos. Las células fueron incubadas con el agonista de B1R, DAKD 100 nM o con el agonista B2R, BK 100nM e incubadas durante 24 horas sobre placas de plástico. Experimentos expresados como el promedio \pm el error estándar.* $p < 0,05$ con respecto al control. Experimentos $n = 5$.

6.4. Resultados Objetivo específico 4

6.4.1. Migración de fibroblastos

El estudio de migración de los fibroblastos se realizó por medio del método de la herida, técnica utilizada en el laboratorio para poder medir la capacidad de una célula de poder migrar hacia la herida y así repoblar la zona del daño.

La migración de los fibroblastos se realizó con los estímulos BK o DAKD, sobre células privadas de suero. Se utilizó como control positivo medio con suero DMEM-F12 + FBS 10%, pero como era posible que las células proliferaran frente a este estímulo, se realizó un experimento previo para determinar la capacidad de proliferación celular en presencia de suero. La Figura 11 muestra que los fibroblastos en presencia de suero proliferan y que al agregar bromodeoxiuridina (BDOU) 100 μ M, análogo sintético de

timidina que es comúnmente utilizado para detener la proliferación celular [48], la proliferación decayó. A partir de este resultado, se consideró el uso de suero con BDOU como control positivo de migración para fibroblastos.

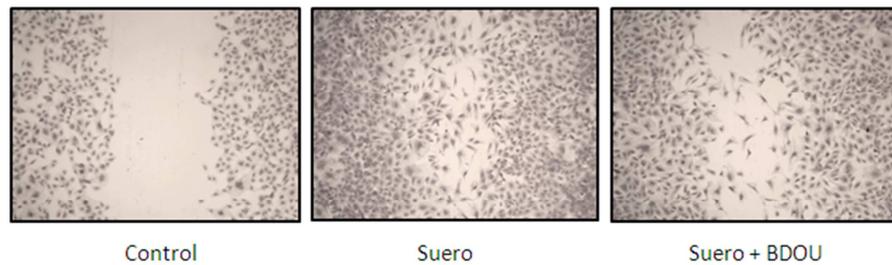
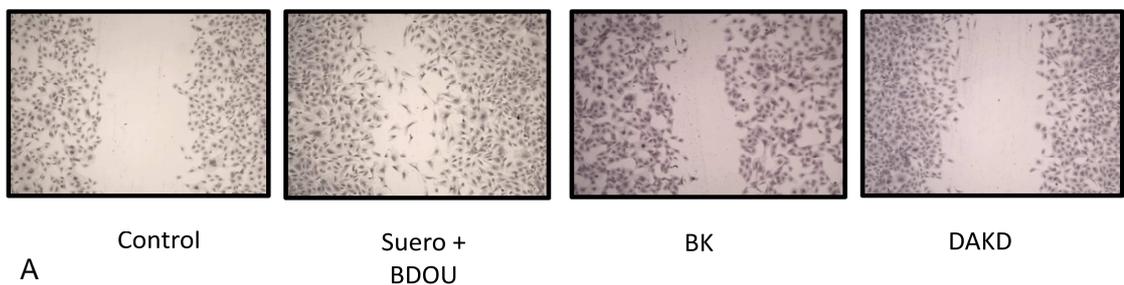
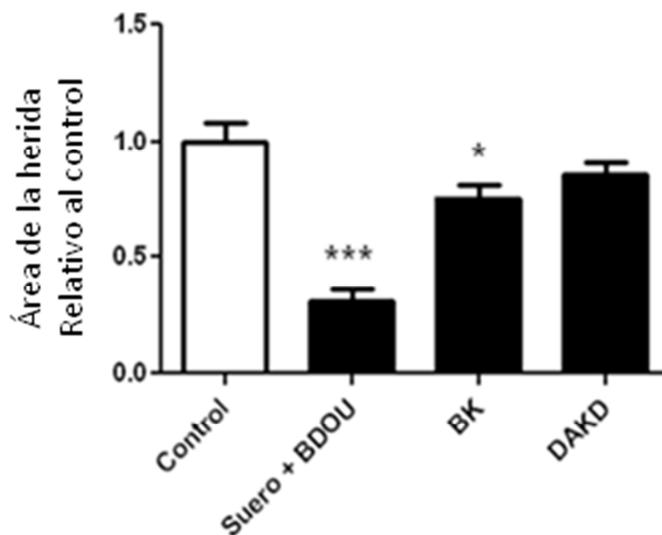


Figura 11. Participación del suero en la proliferación celular. Imágenes obtenidas a través de microscopía.

La Figura 12 B, muestra que BK es capaz de aumentar la capacidad migratoria de los fibroblastos, los cuales pudieron reducir el área de la herida (ver Figura 12 A) de manera estadísticamente significativa con respecto al control en aproximadamente en un 25%. Sin embargo, DAKD no produjo una modificación de la migración de los fibroblastos cardiacos, siendo el área de herida similar al área que muestra el control, según revela la cuarta imagen de la Figura 12.





B

Figura 12. Participación de BK y DAKD en la migración de fibroblastos cardíacos. (A) Imágenes obtenidas a través de microscopía, de la capacidad migratoria de los fibroblastos cardíacos utilizando el método de la herida. Amplificación 10X. (B) Gráfico que cuantifica el área al que se redujo la herida una vez que las células migraron al incubarlas con el agonista BK 100nM o con el agonista DAKD 100nM. Experimentos expresados como el promedio \pm el error estándar. * $p < 0,05$ con respecto al control, *** $p < 0,001$ con respecto al control. Experimentos $n=7$.

6.4.2. Migración de miofibroblastos

Para corroborar la capacidad migratoria de los miofibroblastos, se realizaron ensayos a través del método de la herida y se esperó 24 horas para que ocurriera la migración celular. Como control positivo de migración se utilizó suero, ya que a diferencia de los fibroblastos, los miofibroblastos son incapaces de proliferar debido a un daño en su ADN [49]. La cuantificación del cierre de la herida se realizó al calcular el área de la herida que quedó sin cerrar y se relativizó con respecto al control. Como se puede observar en la Figura 13 B, los datos arrojan que no existiría una influencia de las cininas sobre la migración celular que sea significativa con respecto al control, ya sea al estimular con los agonistas BK o DAKD no se observó un cierre de la herida para ningún estímulo.

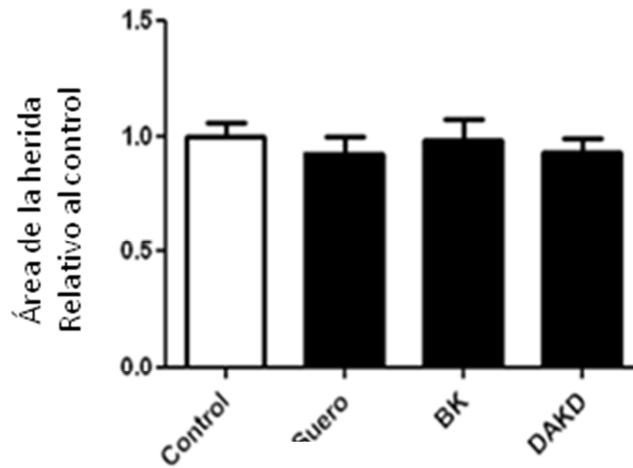
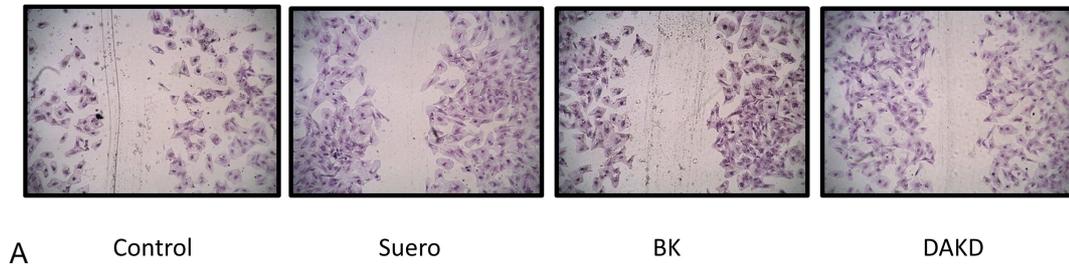


Figura 13. Participación de BK y DAKD en la migración de miofibroblastos cardíacos. (A) Imágenes de la migración de los miofibroblastos cardíacos, a través del método de la herida. Las imágenes fueron obtenidas por microscopia con una amplificación 10X. (B) Gráfico correspondiente al área al que se redujo la herida una vez ocurrida la migración celular, los miofibroblastos fueron estimulados con BK 100nM o con DAKD 100nM durante 24 horas. Experimentos expresados como el promedio \pm el error estándar.

7. DISCUSIÓN

Los fibroblastos y miofibroblastos cardiacos son fenotipos celulares no muy estudiados, y siguen representando un desafío en la búsqueda de nuevas y mejores terapias. Por otro lado, las cininas son un sistema que se vislumbra como clave en la etiología de la enfermedad cardiaca, especialmente por su rol durante los procesos inflamatorio y fibrótico. Con estos factores descritos, es claro que el estudio de los receptores de cininas presentes en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos, y el rol que cumplen en estos tipos celulares, es una fuente de información novedosa que brinda nuevos antecedentes a la enfermedad cardiaca.

Varios estudios han demostrado que las citoquinas proinflamatorias son capaces de producir una regulación positiva de B1R en varios tejidos y bajo condiciones tanto in vitro como in vivo. Por ejemplo, en un modelo in vivo de inflamación de la pata de rata, se ha demostrado la capacidad de IL-1 β de actuar en cooperación con TNF- α para inducir una regulación positiva de B1R [50]. Como sabemos, TGF- β 1 es una citoquina que se libera durante la fibrosis y que se ve envuelta en los procesos de crecimiento celular, inflamación, síntesis de matriz y necrosis [51], y que corresponde a un agente que contribuye a la reparación del tejido, pero que en otras condiciones puede llevar a un exceso de deposición de tejido fibrótico, que compromete el normal funcionamiento del órgano [52]. Varios estudios avalan la participación de TGF- β 1 durante el proceso fibrótico, sin embargo, la expresión de B1R en fibroblastos cardiacos mediada por TGF- β 1 se vislumbraría como un contrapeso que brindaría un balance entre la respuesta fibrótica y antifibrótica.

Primeramente hemos determinado que los fibroblastos cardiacos de rata neonata expresarían el receptor B1R de manera débil y que un estímulo con TGF- β 1 5ng/mL sería capaz de aumentar la expresión de la proteína B1R de manera tiempo dependiente, siendo 48 horas de incubación el tiempo en que se observa una diferencia significativa en la expresión del receptor con respecto al control, manteniéndose a lo largo del tiempo. La misma situación se presentaría durante la expresión de α -SMA, siendo a las 48 horas el tiempo al cual su expresión aumentaría

de manera significativa con respecto al control, perdurando ese aumento en el tiempo. Como se indicó anteriormente α -SMA corresponde a una de las proteínas que se expresan y se reorganizan intracelularmente una vez que los fibroblastos se diferencian a miofibroblastos y que reflejaría la capacidad citoquina TGF- β 1 de ser un promotor de la activación de los fibroblastos. Este fenómeno revelaría que el aumento en la expresión del B1R, de manera tiempo dependiente, se correlacionaría con la diferenciación celular. B1R es un receptor descrito como inducible, capaz de aumentar su expresión frente a condiciones patológicas y los miofibroblastos a la vez son células especializadas que se diferencian para actuar frente a situaciones patológicas [53]. La presencia de este receptor en los miofibroblastos se explicaría posiblemente a que este fenotipo celular especializado contaría con diferentes estructuras y receptores (en este caso, sería B1R) que le ayudarían a cumplir sus actividades durante situaciones patológicas. Por lo que la expresión de este receptor en este fenotipo celular, dejaría entrever que su presencia contaría con una participación importante durante la enfermedad cardiaca.

El agonismo sobre T β R genera distintas cascadas de señalización que podrían desencadenar finalmente la expresión de B1R. Datos de nuestro laboratorio, han demostrado que el estímulo de TGF- β 1 sería capaz de causar la fosforilación/activación de las proteínas Smad 2 y Smad 3, de manera estadísticamente significativa con respecto al control, a los 30 minutos de incubación y se mantendría constante a través del tiempo. Una vez activado T β RI (también denominado ALK5) es capaz de fosforilar a las R-Smad (Smad 2 y 3) [24]. Una vez activas las Smad 2/3 se homo-oligomerizan o se hetero-oligomerizan, ligándose a Smad 4 (Co-Smad) y una vez en el núcleo este complejo regularía la expresión génica [54]. Nuestros resultados indicarían que la activación de ALK5 se vislumbraría como una de las responsables de la señalización que llevaría a la expresión de B1R mediada por TGF- β 1 y que la activación de proteína Smad 3 no participaría de este fenómeno. Como se indicó anteriormente, una vez activadas, Smad 2/3 se homo o hetero-dimerizan, por lo que la cascada de las Smad podría ser desencadenada por la activación única a partir de las Smad 2 y no necesariamente requerir de la activación de Smad 3. Por esta razón, no se descarta la participación de Smad 2 en la expresión del receptor y tampoco se

descarta la posibilidad de que ALK-5 no fuese una quinasa exclusiva de Smad 2 y Smad 3, sino que también poseería a otras proteínas o mensajeros como sustratos que potencialmente podrían participar en la expresión de B1R.

Por otro lado, el agonismo sobre el receptor T β R desencadenaría la activación de otras cascadas transduccionales, distintas a las Smad, y que en conjunto se denominan la vía no canónica de TGF- β 1. Datos de nuestro laboratorio demuestran que las fosforilaciones/activaciones de cada una de estas vías se llevarían a cabo, a distintos tiempos, al estimular a los fibroblastos cardiacos con TGF- β 1. Se ha visto que las vías JNK y p38 se activarían a los 10 minutos de realizado el estímulo con TGF- β . Nuestros resultados indicarían que tanto la vía JNK como p38 estarían participando de la expresión de B1R mediada por TGF- β 1, debido a una reversión del efecto de esa citoquina al pre-incubar con los inhibidores correspondientes. Así mismo, los datos de nuestro laboratorio indicarían que la vía MAP-ERK (que junto con JNK y p38 corresponden a las MAPK) se activaría tempranamente y, al igual que JNK y p38, se apreciaría que el uso del inhibidor sería capaz de prevenir el efecto de TGF- β 1, lo que demostraría que la vía MAP-ERK estaría también mediando la expresión de B1R por TGF- β 1. Estudios han revelado que las tres MAPK: ERK, JNK y p38 activan a la familia de proteínas AP-1, factor transcripcional esencial para la activación del gen de B1R, y que tanto las vías ERK y p38 están relacionadas con la expresión génica de B1R [55]. Es más, se ha visto que p38 y JNK están críticamente envueltas en la regulación de la expresión del ARN mensajero de B1R, durante trauma vascular [56]. Por otro lado, también es importante mencionar que existen estudios que sugieren que la quinasa ALK5 sería también capaz de activar a JNK en diferentes tipos celulares [57]. Esto indicaría que los resultados obtenidos durante la inhibición de ALK5 podrían deberse a una inhibición de la vía JNK y no necesariamente estar vinculados a Smad2.

Finalmente, la vía PI3-Akt también se activaría al cabo de 10 minutos por acción de TGF- β 1, luego ocurriría una desactivación y finiquitaría con una reactivación de esta vía transduccional a las 24 horas de incubadas las células con TGF- β 1. Contrario a lo ocurrido con las MAPK, la ruta PI3-Akt no tendría participación en la expresión del receptor, debido a que la inhibición de esta vía no fue capaz de revertir la acción de

TGF- β 1 sobre la expresión de B1R. Este antecedente revelaría que la vía PI3-Akt no estaría participando o no sería crítica, en la expresión de B1R inducida por TGF- β 1 y por ende tendría otro rol en los fibroblastos. Akt tiene una multitud de proteínas efectoras y está envuelta en un número de procesos celulares, como proliferación y supervivencia, a través de la inhibición de proteínas pro-apoptóticas [58]. Se ha relacionado a Akt con procesos como la proliferación y la producción de colágeno en fibroblastos pulmonares, sugiriendo que esta vía participaría durante el proceso fibrótico [59]. Es más, en fibroblastos cardiacos senescentes, se ha demostrado que Akt cumpliría un importante rol en la proliferación celular [60]. Además, se ha visto que estaría activa durante la estimulación con angiotensina II, donde se cree que participaría finalmente en la regulación y organización del colágeno en fibroblastos cardiacos [61].

La Figura 14, resume las vías transduccionales que podrían estar implicadas en la expresión de B1R mediada por el estímulo de TGF- β 1.

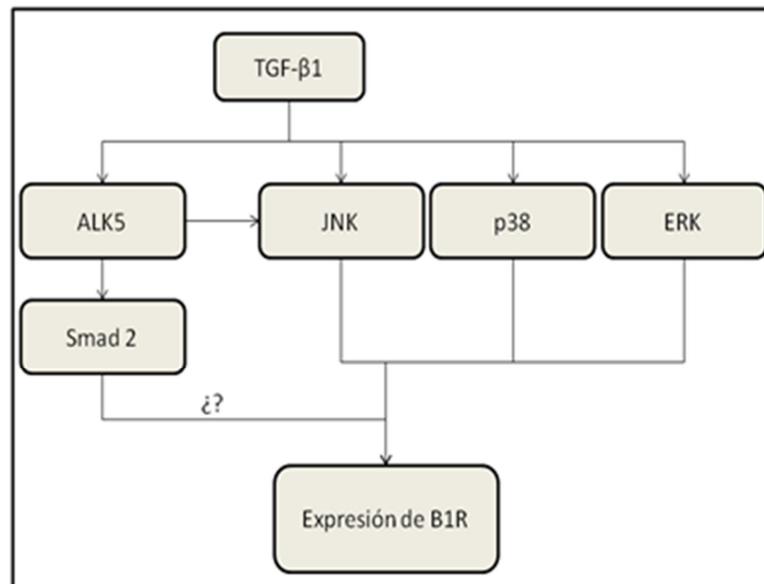


Figura 14. Esquema de las vías transduccionales de TGF- β implicadas en la expresión B1R en fibroblastos cardiacos. Los estudios realizados revelaron que serían ALK5, JNK, p38 y ERK los involucrados en la expresión del receptor.

Como se mencionó anteriormente, estudios han revelado que B1R es un receptor inducible, capaz de aumentar su expresión bajo ciertas condiciones. IL, TNF- α y LPS,

son citoquinas que serían capaces de regular a los factores transcripcionales responsables de la expresión de B1R. Este receptor posee varios factores transcripcionales que regulan su expresión. El factor transcripcional NF- κ B, corresponde al principal factor transcripcional responsable de la regulación positiva de B1R durante los procesos inflamatorios. Asimismo, existen también otros factores que, aparte de NF- κ B, regulan la expresión de B1R, entre ellos se encuentra AP1 (proteína activadora 1), que corresponde a un heterodímero formado por c-Jun y c-Fos [62] y que junto con NF- κ B han demostrado ser importantes mediadores en la regulación de B1R [27].

La bibliografía indicaría que es posible que estos factores transcripcionales, fuesen regulados por algunas de las proteínas estudiadas en este trabajo. Las MAPK ERK y p38, estarían relacionadas con un aumento en la expresión del ARN mensajero de B1R en vena porta de rata, donde aumentarían la actividad de los factores transcripcionales NF- κ B y AP-1, sin embargo ERK no produciría este efecto debido seguramente a que en este tejido no tendría acciones relacionadas con el aumento en la expresión de B1R [63]. Del mismo modo, otros estudios sugieren que TGF- β induciría la activación de TAK1, siendo TAK1 una MAPKKK que a través de p38 activa la vía NF- κ B en osteoclastos, y así también, podría haber una probable activación de AP-1, debido a que las MAPK activarían a los factores transcripcionales c-Jun y c-Fos de AP1 [24].

Con respecto la temporalidad de los sucesos, hay publicaciones que mostrarían un aumento en el ARN mensajero de la proteína B1R presente en fibroblastos pulmonares, estadísticamente significativo respecto al control, a las 6 horas de haber sido estimulados con un agente que activaba la vía p38, lo que representaría un efecto directo sobre la expresión de B1R por parte de aquel agente [32]. Este fenómeno, que tardaría pocas horas, se debería que no existiría la participación de otros intermediarios en el proceso. Es por esto que el tiempo de 48 horas, que fue necesario para obtener una inducción de la expresión del receptor en nuestros experimentos, es más que suficiente para ser parte de un efecto directo de TGF- β 1, por lo que se plantea la posibilidad de que TGF- β 1 induciría la expresión de ciertos intermediarios, y que serían estos últimos quienes mediarían finalmente la expresión de B1R.

La temporalidad de los hechos antes expuestos, señala que existe un gran intervalo de tiempo entre el estímulo inicial con TGF- β 1 y la inducción de la expresión B1R. En ese intervalo de 48 horas, podrían ocurrir diferentes activaciones y liberaciones de intermediarios, los cuales podrían conducir de una manera indirecta a la expresión de B1R. Estos intermediarios podrían ser las citoquinas proinflamatorias, que son los principales inductores de la expresión de B1R y como se mencionó previamente, son capaces de activar a los factores transcripcionales implicados en la regulación del receptor. En concordancia con esto, está descrito que el rol esencial de NF- κ B fue primero demostrado en fibroblastos humanos, donde la inhibición de NF- κ B bloqueaba la expresión de B1R inducida por IL-1 β [64]. De hecho, estudios han revelado la existencia de un sitio de unión tipo NF- κ B situado en el promotor del receptor B1 humano, esencial para el control de la transcripción del receptor, que se activaría por la exposición a ciertos agentes inflamatorios como IL-1 β , TNF- α o LPS [56]. Así también, la activación de B1R por sí misma es capaz de estimular la activación *per se* de NF- κ B, resultando en una elevación de la síntesis de IL-1 β y TNF- α [64]. Este mismo estudio nos muestra un escenario similar al que se plantea en este trabajo, la administración de LPS genera un aumento en la liberación de IL-1 β y TNF- α y el bloqueo de éstas previene la expresión de B1R. Es más, se cree que la cooperación existente entre IL-1 β y TNF- α se debería a su habilidad de aumentar la activación del factor NF- κ B [50].

TNF- α , al interactuar con sus receptores TNF-R1 y TNF-R2 puede generar una cascada, a través de la cual, diferentes proteínas que interactúan directa o indirectamente con los dominios citoplasmáticos de TNF-R1 y TNF-R2 habrían dado ideas de cómo esos receptores estarían conectados a la cascada de señalización que conducen a la activación de NF- κ B y JNK. Especial interés existiría en el factor asociado al receptor de TNF, TRAF-1 y TRAF-2, que se definen como un nuevo grupo de proteínas adaptadoras envueltas en la transducción de señales de la familia de receptores TNF, receptor de IL-1, como también de la familia receptor tipo TOLL. En la actualidad, TRAF-2 es el miembro mayormente caracterizado de la familia TRAF, y posee un rol clave en mediar la activación de NF- κ B y JNK inducida por TNF-R1 [65].

Estos antecedentes apoyarían la idea de que no sería necesariamente TGF- β 1, el regulador directo de la expresión de la proteína B1R, sino que actuaría como un agente que desencadenaría la activación o liberación de sustancias (como lo serían IL-1 β y TNF- α), y serían estas últimas las que actuarían de manera directa sobre la regulación de la expresión de B1R. Pero, a la vez de ninguna manera se descartaría la participación directa de las vías de TGF- β 1 como las encargadas de actuar frente a la regulación de la expresión del receptor B1R (ver Figura 15).

En último lugar, es importante destacar que los resultados expuestos señalan que la hipótesis inicial planteada, que indicaba que las vías implicadas en la serían JNK y/o p38, es válida, pero también se agregaría a esta señalización ERK y la quinasa ALK5 como claves para que TGF- β 1 mediase la expresión de B1R en fibroblastos cardiacos.

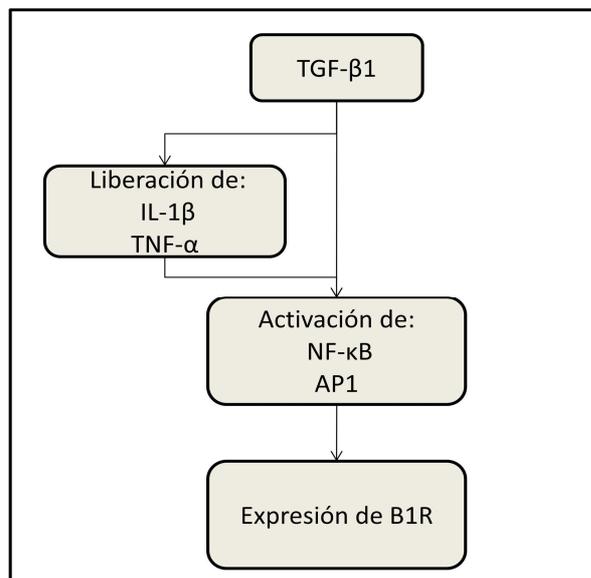


Figura 15. Esquema representativo de la expresión de B1R debida a la activación de sus factores transcripcionales. TGF- β 1 podría, a través de su cascada transduccional, activar directamente a los factores de B1R o podría, indirectamente, activar o liberar citoquinas, siendo éstas las que activarían a los factores como NF- κ B o AP1.

En las enfermedades cardiovasculares, los fibroblastos juegan un rol central y dinámico durante los procesos de remodelado cardiaco, debido a sus capacidades para migrar y la proliferar en el sitio del daño tisular, y por producir cambios en la extensión y composición de la MEC [66]. Las células in vivo forman contactos con sus vecinos y con la MEC, para así formar tejidos y órganos, y son estas interacciones de adhesión celular con la MEC cruciales para el desarrollo de diversos procesos celulares [67].

La adhesión de anclaje de los fibroblastos a una superficie, que soportará su crecimiento, está acompañada por el desarrollo de un organizado citoesqueleto, que presenta componentes individuales, como microtúbulos, estructuras de actina, entre otras, que difieren en su composición y/o forma geométrica. Además, de que la adhesión de algunos fibroblastos estaría confinada a zonas especializadas denominadas adhesiones focales, que al parecer estarían siempre asociadas al término de una fibra de estrés [68].

Nuestros resultados mostraron que las cininas BK y DAKD no tienen participación sobre este proceso de adhesión de fibroblastos y miofibroblastos cardiacos. Así mismo, BK tampoco tendría la capacidad de revertir el efecto de angiotensina II sobre la adhesión. Estos hallazgos revelan que las cininas no tienen una función determinante en el comportamiento celular de adhesión, y que sus roles en estos fenotipos celulares cardiacos, serían distintos a los que se plantearon inicialmente en la hipótesis. Por otro lado, existen antecedentes que mostrarían que los miofibroblastos, a diferencia de los fibroblastos, presentarían una mayor capacidad de adhesión, debido al desarrollo de estructuras que le ayudan a mantener conexiones de tipo matriz-célula. Dentro de estas estructuras se encuentran las denominadas adhesiones focales súper maduras y el fibronexus [69]. Los datos que obtuvimos, revelan que la adhesión de los miofibroblastos fue mayor a la de los fibroblastos en cada estímulo y control realizado, lo que demostraría que los miofibroblastos sí se adhirieron más, en comparación a los fibroblastos (ver Anexo 1) Este fenómeno de adhesión celular es seguramente desarrollado debido a la presencia de las estructuras de adhesión que despliegan los miofibroblastos (fibronexus in vivo, y adhesiones focales supermaduras in vitro) [70], por lo que el aumento en la adhesión de los miofibroblastos con respecto a los fibroblastos, sería una resultante de la activación de aquellos y este aumento en la

capacidad de adhesión tendría como función el poder permitirle a la célula fijarse en un lugar y posteriormente, a través de las fibras especializadas, contraer el tejido favoreciendo la cicatrización.

Así también, es la migración un proceso clave dentro de las funciones que ejerce un fibroblasto. Este fenómeno corresponde al traslado que realiza una célula desde un lugar a otro, donde se asienta para poder ejercer una función específica, y que se desencadena a partir de estímulos o condiciones, capaces de gatillar este traslado celular hacia una zona determinada. En respuesta a un daño o a un infarto, los fibroblastos cardiacos activados migran a la zona infartada y liberan MPM, que llevan a la degradación de la MEC dañada. Este proceso migratorio es regulado por sustancias presentes una vez ocurrido el daño del miocardio, como lo son las citoquinas [14].

El agonismo de BK sobre su receptor B2R aumentó la migración celular, promoviendo el cierre de la herida. En cambio, el ensayo de migración de fibroblastos incubados con el agonista B1R, DAKD, generó un leve cierre de la herida, pero no fue de manera estadísticamente significativa con respecto al control, por lo que DAKD no afectaría la capacidad migratoria celular en este fenotipo celular. Estos datos obtenidos, concuerdan con estudios presentes en la literatura con el tipo celular trofoblasto, donde el agonismo sobre B2R con BK aumentó la migración celular de manera significativa a las 18 horas. Es más, a las 24 horas se observaría que la herida se encontraría cerrada; resultado que se corroboró con el uso HOE-140 (antagonista de B2R), donde hubo un bloqueo del efecto de BK sobre la migración celular. Así también, la incubación con el agonista B1R, LDBK, con o sin pre incubación con su antagonista AB1R, no tendría efecto en la capacidad migratoria celular [39]. Estos resultados se explicarían debido a la capacidad de BK de inducir la polarización celular y estimular la formación de filopodio y otras estructuras, pasos previos a la migración celular, en células progenitoras endoteliales. Donde este fenómeno esta mediado por proteínas Cdc42 y Rac-1- provocadas por PGE₂. Siendo BK un inductor de la liberación de PGE₂ inducida por la activación de COX-2 [39]. Así también, es importante destacar que BK genera una activación en las MPM, lo que llevaría a la proteólisis, parte importante de los procesos invasivos y que la exposición de las células a BK llevaría a oscilaciones

de Ca^{2+} intracelulares, mostrando ser un patrón subyacente de migración de células granulares cerebelares [71].

También, la bibliografía avala que los fenotipos altamente adhesivos, como los miofibroblastos, pierden en parte su capacidad migratoria. Durante la diferenciación a miofibroblastos, los fibroblastos pierden su fenotipo migratorio y se vuelven sésiles. Este cambio es promovido por la formación de adhesiones focales largas, que brindan fuertes uniones entre las fibras de estrés intracelulares y las proteínas de la MEC como colágeno y fibronectina [72]. Estos datos, coinciden los ensayos realizados: los miofibroblastos no migrarían y las cininas tampoco participarían modificando este proceso.

Pero a pesar de lo expuesto, la migración es un proceso que ha sido documentado en algunos estudios científicos. Por ejemplo, los miofibroblastos de humano son capaces de migrar hacia la zona de la herida al estimularlos con BK durante 48 horas [73]. Sin duda, estos resultados se contradicen con los nuestros y puede deberse a diferencias entre las especies. Pero a la vez, siempre existe la interrogante de si las células con las que se trabaja en los otros estudios serían realmente miofibroblastos y no fibroblastos. Esto toma importancia, ya que al trabajar en un corazón infartado, como lo hace el estudio citado, no necesariamente todos los fibroblastos residentes se habrían activado y transformado a miofibroblastos, por lo que se podría estar viendo una migración de fibroblastos o de protomiofibroblastos. Además de que la presencia de estructuras como las adhesiones focales supermaduras, podría explicar en parte la incapacidad de los miofibroblastos de migrar hacia la zona de la herida, debido a una fuerte adhesión, imposibilitando el movimiento [69].

Finalmente se plantea que los resultados de los ensayos de migración, se contradicen con lo que se planteó originalmente en la hipótesis y que BK podría favorecer el proceso de migración en los fibroblastos. Por lo que las cininas tendrían otro rol durante el desarrollo de la enfermedad cardíaca en los fibroblastos y miofibroblastos.

En nuestro laboratorio, además se han realizado experimentos adicionales con otro ámbito del proceso fibrótico impulsado por los fibroblastos y miofibroblastos, que corresponde a la síntesis de colágeno I, principal componente de la MEC. Estos experimentos han revelado que, ambas cininas serían capaces de reducir síntesis de colágeno en miofibroblastos cardiacos de rata neonata, a las 48 horas de ser incubadas con los agonistas BK y DAKD [74]. Este fenómeno sería el principal rol que tendrían las cininas en el comportamiento celular, que contrabalancearía el proceso fibrótico propiciado por estas células debido a angiotensina II.

Estos resultados, tomados en conjunto, dan a pensar que, las cininas, los fibroblastos y miofibroblastos, son un blanco farmacológico claro para los procesos de fibrosis, en que se ven envueltas una gran cantidad de enfermedades cardiovasculares. Es más, la bibliografía ya sitúa a los miofibroblastos como uno de blancos terapéuticos ampliamente estudiados, tal como se mencionó en el inicio de este trabajo. El tratar de entender cómo reducir o controlar el proceso fibrótico, desde una arista nueva, ha sido la motivación de este trabajo y se espera que esto contribuya al desarrollo de nuevas terapias que, eventualmente, podrían mejorar la calidad de vida de los pacientes que sufren de estas afecciones.

8. CONCLUSIÓN

A partir de los resultados que se obtuvieron de este trabajo realizado, se concluye que:

- TGF- β 1 aumenta la expresión de B1R, de manera significativa, a las 48 horas de estímulo.
- TGF- β 1 regula la expresión de B1R a través de las vías transduccionales MAPK y por la quinasa ALK5; y no por la vía PI3-Akt ni a través de Smad 3.
- Las cininas no median el comportamiento de adhesión celular de fibroblastos ni de miofibroblastos cardiacos.
- La cinina BK induce la migración celular solo en fibroblastos cardiacos. Mientras que DAKD, no media migración en fibroblastos ni miofibroblastos cardiacos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Salud, O.M.d.l. *Enfermedades cardiovasculares*. 2011 [cited 2012 16/02/2012]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>.
2. Minsal, *Encuesta Nacional de Salud ENS 2009-2010*. 2010, Gobierno de Chile: Chile.
3. *Patient-Specific modeling of the cardiovascular system*, R. Kerckhoffs, Editor. 2010, Springer: London. p. 242.
4. Weber, K.T., *Fibrosis and hypertensive heart disease*. *Curr Opin Cardiol*, 2000. **15**(4): p. 264-72.
5. Manabe, I., T. Shindo, and R. Nagai, *Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy*. *Circ Res*, 2002. **91**(12): p. 1103-13.
6. Baudino, T.A., et al., *Cardiac fibroblasts: friend or foe?* *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **291**(3): p. H1015-26.
7. Zamilpa, R. and M.L. Lindsey, *Extracellular matrix turnover and signaling during cardiac remodeling following MI: causes and consequences*. *J Mol Cell Cardiol*, 2010. **48**(3): p. 558-63.
8. Villarreal, F., *Interstitial fibrosis in heart failure*. 2005, Springer: USA.
9. Smith, D., *Advanced Cardiovascular Exercise Physiology*, in *Advanced Exercise Physiology Series*. 2011, Champaign, IL: USA.
10. Souders, C.A., S.L. Bowers, and T.A. Baudino, *Cardiac fibroblast: the renaissance cell*. *Circ Res*, 2009. **105**(12): p. 1164-76.
11. Brown, R.D., et al., *The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005. **45**: p. 657-87.
12. Asazuma-Nakamura, Y., et al., *Cx43 contributes to TGF-beta signaling to regulate differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts*. *Exp Cell Res*, 2009. **315**(7): p. 1190-9.
13. Porter, K.E. and N.A. Turner, *Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling*. *Pharmacol Ther*, 2009. **123**(2): p. 255-78.
14. Brown, R.D., et al., *Cytokines regulate matrix metalloproteinases and migration in cardiac fibroblasts*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **362**(1): p. 200-5.
15. Hinz, B., *The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell*. *J Biomech*, 2010. **43**(1): p. 146-55.
16. Powell, D.W., et al., *Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(1 Pt 1): p. C1-9.
17. Wang, J., et al., *Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **285**(5): p. H1871-81.
18. Yue, L., J. Xie, and S. Nattel, *Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation*. *Cardiovasc Res*, 2011. **89**(4): p. 744-53.
19. Chaponnier, C.D., A and Gabbiani, G, *Tissue repair, contraction and the myofibroblast*. 2006, Springer: USA.
20. Phan, S.H., *Biology of fibroblasts and myofibroblasts*. *Proc Am Thorac Soc*, 2008. **5**(3): p. 334-7.

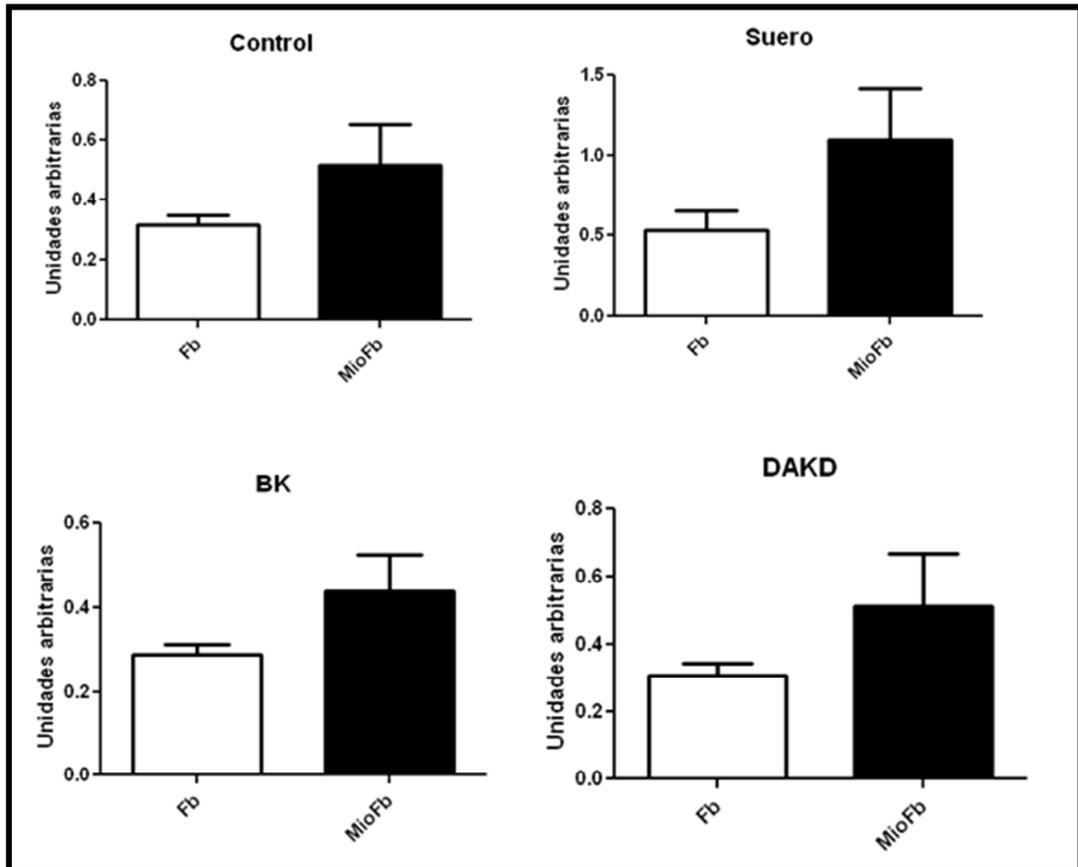
21. Hinz, B. and G. Gabbiani, *Fibrosis: recent advances in myofibroblast biology and new therapeutic perspectives*. F1000 Biol Rep, 2010. **2**: p. 78.
22. Yan, X., Z. Liu, and Y. Chen, *Regulation of TGF-beta signaling by Smad7*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2009. **41**(4): p. 263-72.
23. Bujak, M. and N.G. Frangogiannis, *The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(2): p. 184-95.
24. Mu, Y., S.K. Gudey, and M. Landstrom, *Non-Smad signaling pathways*. Cell Tissue Res, 2012. **347**(1): p. 11-20.
25. Reiner, J.E. and P.K. Datta, *TGF-beta-dependent and -independent roles of STRAP in cancer*. Front Biosci, 2011. **16**: p. 105-15.
26. Costa-Neto, C.M., et al., *Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies*. Int Immunopharmacol, 2008. **8**(2): p. 135-42.
27. Brechter, A.B., et al., *Kinin B1 and B2 receptor expression in osteoblasts and fibroblasts is enhanced by interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. Effects dependent on activation of NF-kappaB and MAP kinases*. Bone, 2008. **43**(1): p. 72-83.
28. Blaukat, A., *Structure and signalling pathways of kinin receptors*. Andrologia, 2003. **35**(1): p. 17-23.
29. Lalmanach, G., et al., *Kininogens: More than cysteine protease inhibitors and kinin precursors*. Biochimie, 2010. **92**(11): p. 1568-79.
30. Westermann, D., H.P. Schultheiss, and C. Tschöpe, *New perspective on the tissue kallikrein-kinin system in myocardial infarction: role of angiogenesis and cardiac regeneration*. Int Immunopharmacol, 2008. **8**(2): p. 148-54.
31. Spillmann, F., et al., *Regulation of cardiac bradykinin B1- and B2-receptor mRNA in experimental ischemic, diabetic, and pressure-overload-induced cardiomyopathy*. Int Immunopharmacol, 2002. **2**(13-14): p. 1823-32.
32. Phagoo, S.B., et al., *Infection-induced kinin B1 receptors in human pulmonary fibroblasts: role of intact pathogens and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **313**(3): p. 1231-8.
33. Ochsenbein, R.M., et al., *Differential regulation of bradykinin receptor density, intracellular Ca²⁺, and prostanoid release in skin and foreskin fibroblasts. Effects of cell density and interleukin-1alpha*. Br J Pharmacol, 1999. **127**(2): p. 583-9.
34. Catalán, M., *Estudio de la vías transduccionales dependientes del receptor b1 de cininas en miofibroblastos cardiacos que reducen la secreción de colágeno*, in *Escuela de graduados*. 2008, Universidad de Chile.
35. Farmer, S.G. and R.M. Burch, *Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1992. **32**: p. 511-36.
36. Ricupero, D.A., et al., *Des-Arg(10)-kallidin engagement of the B1 receptor stimulates type I collagen synthesis via stabilization of connective tissue growth factor mRNA*. J Biol Chem, 2000. **275**(17): p. 12475-80.
37. Gallagher, A.M., H. Yu, and M.P. Printz, *Bradykinin-induced reductions in collagen gene expression involve prostacyclin*. Hypertension, 1998. **32**(1): p. 84-8.
38. Sancho-Bru, P., et al., *Bradykinin attenuates hepatocellular damage and fibrosis in rats with chronic liver injury*. Gastroenterology, 2007. **133**(6): p. 2019-28.
39. Erices, R., et al., *Bradykinin promotes migration and invasion of human immortalized trophoblasts*. Reprod Biol Endocrinol, 2011. **9**: p. 97.

40. Leeb-Lundberg, L.M., et al., *International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(1): p. 27-77.
41. Foncea, R., et al., *Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes*. J Biol Chem, 1997. **272**(31): p. 19115-24.
42. Laping, N.J., et al., *Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(1): p. 58-64.
43. Jinnin, M., H. Ihn, and K. Tamaki, *Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor-beta1-induced extracellular matrix expression*. Mol Pharmacol, 2006. **69**(2): p. 597-607.
44. Bennett, B.L., et al., *SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13681-6.
45. SIGMA, *SB 202190*, S.-. Aldrich, Editor: USA.
46. Signaling, C., *PD98059*, C.S. Technology, Editor. 2009.
47. Signaling, C., *LY294002*, C.S. Technology, Editor. 2007.
48. Pharmingen, B. *Technical data sheet bromodeoxyuridine (BrdU)*. [cited 2012 18/02/2012]; Available from: http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/ihc/live/web_enabled/7581KZ_550891.pdf.
49. Petrov, V.V., et al., *TGF-beta1-induced cardiac myofibroblasts are nonproliferating functional cells carrying DNA damages*. Exp Cell Res, 2008. **314**(7): p. 1480-94.
50. Passos, G.F., et al., *Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1839-47.
51. Annes, J.P., J.S. Munger, and D.B. Rifkin, *Making sense of latent TGFbeta activation*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 2): p. 217-24.
52. Branton, M.H. and J.B. Kopp, *TGF-beta and fibrosis*. Microbes Infect, 1999. **1**(15): p. 1349-65.
53. Tschope, C., S. Heringer-Walther, and T. Walther, *Regulation of the kinin receptors after induction of myocardial infarction: a mini-review*. Braz J Med Biol Res, 2000. **33**(6): p. 701-8.
54. Moustakas, A., *Smad signalling network*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 17): p. 3355-6.
55. Yang, X., et al., *Mediator caused induction of a human bradykinin B1 receptor minigene: participation of c-Jun in the process*. J Cell Biochem, 2001. **82**(1): p. 163-70.
56. Calixto, J.B., et al., *Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes*. Br J Pharmacol, 2004. **143**(7): p. 803-18.
57. Itoh, S., et al., *Elucidation of Smad requirement in transforming growth factor-beta type I receptor-induced responses*. J Biol Chem, 2003. **278**(6): p. 3751-61.
58. Olson, E.R., et al., *Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(3): p. H1131-8.
59. Lu, Y., et al., *Phosphatidylinositol-3-kinase/akt regulates bleomycin-induced fibroblast proliferation and collagen production*. Am J Respir Cell Mol Biol. **42**(4): p. 432-41.
60. Diez, C., et al., *Down-regulation of Akt/PKB in senescent cardiac fibroblasts impairs PDGF-induced cell proliferation*. Cardiovasc Res, 2001. **49**(4): p. 731-40.

61. Lijnen, P., *Modulation of Reactive Oxygen Species and Collagen Synthesis by Angiotensin II in Cardiac Fibroblasts*. The Open Hypertension Journal, 2011.
62. Eiden, L., *Activator protein 1 (AP-1)*. 2012, Science/AAAS.
63. Medeiros, R., et al., *Bradykinin B1 receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein: a critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB signaling pathways*. Circ Res, 2004. **94**(10): p. 1375-82.
64. Duchene, J. and A. Ahluwalia, *The kinin B(1) receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(2): p. 125-31.
65. Verrecchia, F. and A. Mauviel, *TGF-beta and TNF-alpha: antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression*. Cell Signal, 2004. **16**(8): p. 873-80.
66. Camelliti, P., T.K. Borg, and P. Kohl, *Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(1): p. 40-51.
67. Seller, Z., *Cellular Adhesion and Adhesion Molecule*. Turk J Bio, 1998: p. 1-15.
68. Badley, R.A., et al., *Cytoskeleton changes in fibroblast adhesion and detachment*. J Cell Sci, 1980. **43**: p. 379-90.
69. Hinz, B., *Formation and function of the myofibroblast during tissue repair*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(3): p. 526-37.
70. Hinz, B., et al., *Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(6): p. 2508-19.
71. Montana, V. and H. Sontheimer, *Bradykinin promotes the chemotactic invasion of primary brain tumors*. J Neurosci, 2011. **31**(13): p. 4858-67.
72. Castella, L.F., et al., *A new lock-step mechanism of matrix remodelling based on subcellular contractile events*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 10): p. 1751-60.
73. Riches, K., et al., *Hypoxic remodelling of Ca²⁺ stores does not alter human cardiac myofibroblast invasion*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **403**(3-4): p. 468-72.
74. Catalan, M., et al., *Differential regulation of collagen secretion by kinin receptors in cardiac fibroblast and myofibroblast*. Toxicol Appl Pharmacol. **261**(3): p. 300-8.

10. MATERIAL ANEXO

Anexo 1



Gráficos de adhesión celular de fibroblastos y miofibroblastos para cada estímulo. Las barras de color blanco corresponden a fibroblastos y las negras a miofibroblastos.