



UNIVERSIDAD DE CHILE  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**EFFECTO DE TGF- $\beta$ 1 SOBRE LOS NIVELES DE  
LOS RECEPTORES TIPO 1 Y TIPO 2 PARA ANGIOTENSINA II  
EN CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS Y MÚSCULO ESQUELÉTICO.**

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico  
PAULA ANDREA PAINEMAL DUARTE

Patrocinante:  
Dra. María Antonieta Valenzuela  
Depto. de Bioquímica y Biología  
Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas.  
Universidad de Chile

Director:  
Dr. Claudio Cabello Verrugio  
Depto. Biología Celular y  
Molecular  
Facultad de Ciencias Biológicas  
P. Universidad Católica de Chile

Co-Director:  
Dr. Enrique Brandan  
Depto. Biología Celular y  
Molecular  
Facultad de Ciencias Biológicas  
P. Universidad Católica de Chile

Santiago, Chile

2011

A mis padres, Olga y Lisandro

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Claudio Cabello quien guió esta investigación, por su apoyo, paciencia y dedicación. De él aprendí mucho sobre la rigurosidad y el compromiso con el trabajo, no podría haber tenido un mejor tutor.

Al Dr. Enrique Brandan por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por sus sugerencias y opiniones.

A Víctor Troncoso, por enseñarme los primeros pasos en cultivo, a todos los miembros del laboratorio con los que compartí durante este tiempo, en especial a Gabriela Morales, María José Acuña y Ana Vásquez.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

Proyecto FONDECYT -11080212 adjudicado al Dr. Claudio Cabello, y al Proyecto Basal PFB 12/2007.

## ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>i</b>
<b>FINANCIAMIENTO</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE GENERAL</b>	<b>ii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>iii</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>1. Fibrosis</b>	<b>5</b>
<b>2. Factores profibróticos</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Factor de crecimiento de tipo transformante (TGF-<math>\beta</math>1)</b>	<b>6</b>
2.1.1. Vías de señalización dependientes de TGF- $\beta$ 1	6
2.1.1.1 Vía canónica	6
2.1.1.2 Vías no canónicas	7
2.1.2. Músculo esquelético y TGF- $\beta$ 1	8
<b>2.2. Angiotensina II</b>	<b>9</b>
2.2.1. Receptores para Angiotensina II y vías de señalización	10
2.2.2. RAS y músculo esquelético	11
2.2.3. Regulación de niveles de receptores para Angiotensina II	11
<b>II. HIPÓTESIS</b>	<b>13</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>14</b>
<b>1. Materiales</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Reactivos</b>	<b>14</b>
1.1.1. Medios de cultivo	14

1.1.2 Citoquina e inhibidores	14
1.1.3. Marcadores de masa molecular	14
1.1.4. Reactivos generales	15
<b>1.2. Material Biológico</b>	<b>15</b>
1.2.1. Células eucarióticas	15
1.2.2. Animales	16
1.2.3. Anticuerpos utilizados	17
<b>2. Métodos</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Cultivo y mantenimiento de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub></b>	<b>19</b>
2.1.1. Crecimiento	19
2.1.2. Diferenciación	19
2.1.3. Incubación de células	19
<b>2.2. Inyección de TGF-<math>\beta</math> en músculo esquelético dañado</b>	<b>19</b>
<b>2.3. Ensayos enzimáticos</b>	<b>20</b>
2.3.1. Actividad creatina quinasa	20
<b>2.4. Técnicas bioquímicas generales</b>	<b>21</b>
2.4.1. Extractos proteicos totales de células C <sub>2</sub> C <sub>12</sub>	21
2.4.2. Extractos proteicos de tejidos	21
2.4.3. Cuantificación de proteínas	21
2.4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	22
2.4.5. Electrotransferencia y visualización de proteínas	22
2.4.6. Inmunoblot	23
<b>2.5. Estadística</b>	<b>23</b>
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>24</b>
<b>1. Determinar el efecto de TGF-<math>\beta</math> sobre los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 para Angiotensina II en células musculares esqueléticas y músculo esquelético.</b>	<b>24</b>
1.1. Analizar la cinética y el efecto dosis dependiente de TGF- $\beta$ sobre los niveles proteicos de AT-1 y AT-2 en células musculares esqueléticas.	24
1.2. Estudiar el efecto de TGF- $\beta$ sobre los niveles de los receptores AT-1 y AT-2 en músculo esquelético de ratón.	26

<b>2. Determinar el mecanismo de regulación mediado por TGF-<math>\beta</math> sobre los niveles de AT-2 en células musculares esqueléticas.</b>	<b>31</b>
2.1. Estudiar la participación del receptor tipo I de TGF- $\beta$ en la regulación de los niveles de AT-2 mediada por TGF- $\beta$ 1.	31
2.2. Establecer la participación de vías de señalización dependientes de TGF- $\beta$ en la regulación de los niveles de AT-2 mediados por TGF- $\beta$ .	33
<b>3. Determinar los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 para Angiotensina II durante la diferenciación de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> a miotubos.</b>	<b>37</b>
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
<b>1. Aumento en los niveles proteicos del receptor AT-2 en respuesta a TGF-<math>\beta</math>1.</b>	<b>39</b>
<b>2. Mecanismos involucrados en la modulación de los niveles proteicos de AT-2 por TGF-<math>\beta</math>1.</b>	<b>42</b>
<b>3. Disminución de los receptores AT-1 y AT-2 durante la diferenciación.</b>	<b>43</b>
<b>VII. PROYECCIONES</b>	<b>44</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>45</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>46</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Los niveles del receptor AT-2, no así los de AT-1, aumentan en respuesta a TGF- $\beta$ 1 en células musculares esqueléticas	25
<b>FIGURA 2.</b> Los niveles del receptor AT-2 aumentan en forma dependiente de la dosis de TGF- $\beta$ 1 en células musculares esqueléticas.	27
<b>FIGURA 3.</b> Los niveles proteicos de AT-2 aumentan en respuesta a TGF- $\beta$ 1 en músculo esquelético de ratón C57/BL10.	29
<b>FIGURA 4.</b> Los niveles proteicos del receptor AT-2 están aumentados en músculos esqueléticos distróficos.	30
<b>FIGURA 5.</b> Aumento de los niveles del receptor AT-2 inducidos por TGF- $\beta$ .	32
<b>FIGURA 6.</b> TGF- $\beta$ activa las vías MAPK p38 y ERK-1/2 en células musculares esqueléticas.	35
<b>FIGURA 7.</b> El aumento de los niveles del receptor AT-2 inducidos por TGF- $\beta$ 1 requiere de la actividad de la p38 MAPK.	36
<b>FIGURA 8.</b> Los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 son disminuidos durante la diferenciación de células musculares esqueléticas.	38

## **ABREVIACIONES UTILIZADAS EN EL TEXTO.**

**ACE:** enzima convertidora de Angiotensina

**Ang II:** Angiotensina II

**AraC:**  $\beta$ -D-arabinofuranósido de citosina

**AT-1:** receptor de Angiotensina II del tipo 1

**AT-2:** receptor de Angiotensina II del tipo 2

**BSA:** albúmina de suero bovino

**CTGF:** factor de crecimiento de tejido conectivo

**CK:** creatina quinasa

**DMD:** distrofia muscular de Duchenne

**DMEM:** medio Eagle modificado por Dulbecco

**DMSO:** dimetil sulfóxido

**EDTA:** ácido etilén-diamino tetra-acético

**EGTA:** ácido etilén-glicol tetra-acético

**IGF-I:** factor de crecimiento insulínico tipo I

**MAPK:** proteína quinasa activada por mitógeno

**PBS:** buffer fosfato salino

**MEC:** matriz extracelular

**PMSF:** fenil metil sulfonil metilo

**PVDF:** polivinil diamino fenil

**RAS:** sistema renina-angiotensina

**SDS:** dodecil sulfato de sodio

**SDS-PAGE:** eletroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

**TA:** tibial anterior

**T $\beta$ RI:** receptor tipo I para TGF- $\beta$ I

**TEMED:** 1,2-bis-(dimetil amino)-etano

**TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento de transformante tipo  $\beta$

## RESUMEN.

La deposición excesiva de proteínas de matriz extracelular (MEC) se conoce como fibrosis y es una de las características de las enfermedades musculares degenerativas como la distrofia muscular de Duchenne (DMD). En esta enfermedad, la función muscular se pierde cuando las miofibras son reemplazadas por deposición de colágeno y otras proteínas de MEC. Entre los factores que desencadenan la fibrosis muscular se encuentran el Factor de Crecimiento Transformante tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y Angiotensina II (Ang II), éste último perteneciente al Sistema Renina-Angiotensina (RAS). Los principales efectos biológicos ejercidos por Ang II están mediados a través de los receptores tipo 1 y tipo 2 para Ang II denominados AT-1 y AT-2. El receptor AT-1 es responsable de mediar los efectos fibróticos dependientes de Ang II mientras que AT-2 participa como inductor de los efectos antifibróticos. En fibrosis de tejidos cardíaco, pulmonar y renal, TGF- $\beta$ 1 aumenta los niveles de AT-1 y AT-2, adicionando mayor complejidad a los mecanismos que regulan la fibrosis. Los efectos de TGF- $\beta$ 1 sobre los niveles de los receptores de Ang II en el músculo esquelético aún no se conocen.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de TGF- $\beta$ 1 sobre los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 en mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> y en músculo esquelético de ratón.

Los resultados que se obtuvieron de los análisis *in vitro* en células musculares esqueléticas expuestas a TGF- $\beta$ 1, mostraron un aumento en los niveles proteicos de AT-2 de una manera dependiente de la dosis de TGF- $\beta$ 1 con un efecto máximo a las 48 h en paralelo a la inducción de fibrosis determinada por la acumulación de fibronectina y colágeno III. Sin embargo, los niveles proteicos de AT-1 no fueron afectados. Experimentos *in vivo* de inyección de TGF- $\beta$ 1 a músculo esquelético dañado de ratón, mostraron un aumento en los niveles del receptor AT-2, sin cambios en los niveles del receptor AT-1. Utilizando inhibidores farmacológicos de la actividad quinasa del receptor tipo I de TGF- $\beta$  y de la actividad p38 MAPK se pudo establecer que ambos eran requeridos para el aumento de los niveles proteicos de AT-2 inducido por TGF- $\beta$ 1, sugiriendo que el efecto es directamente mediado por los receptores de TGF- $\beta$  y por la vía MAPK p38. En un modelo murino de la distrofia muscular de Duchenne (ratones *mdx*), el cual presenta fibrosis y niveles aumentados de TGF- $\beta$ 1, se observó un aumento de los niveles proteicos del receptor AT-2 en diversos músculos esqueléticos comparados a los niveles observados en un ratón normal, sin embargo, los niveles del receptor AT-1 no se observó cambios. Durante la diferenciación de los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, proceso en el cual la vía de

señalización de TGF- $\beta$ 1 se encuentra disminuida, los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2, disminuyó.

Estos resultados sugieren que los niveles proteicos de AT-2, y no los de AT-1, son modulados por el factor profibrótico TGF- $\beta$ 1 en células musculares esqueléticas y en músculo esquelético, y que, durante la diferenciación, tanto AT-1 como AT-2 son modulados, sugiriendo así que estos receptores tienen un papel en el desarrollo y fisiopatología de la DMD.

## **EFFECT OF TGF- $\beta$ 1 ON ANGIOTENSIN II RECEPTORS TYPE 1 AND 2 IN MYOBLASTS AND SKELETAL MUSCLE.**

### **SUMMARY.**

The excessive deposition of extracellular matrix (ECM) proteins is known as fibrosis and is a key hallmark of degenerative muscle diseases such as Duchenne muscular dystrophy (DMD). In this disease, muscle function is lost when myofibers are replaced by deposition of collagen and other ECM proteins. Among the factors that triggers muscle fibrosis are Transforming Growth Factor Type beta (TGF- $\beta$ ) and Angiotensin II (Ang II) from the Renin-Angiotensin System (RAS). Ang II exerts its biological effects mainly through two receptors, AT-1 and AT-2, where AT-1 is responsible for Ang II fibrotic effects and AT-2 mediates antifibrotic effects. In cardiac, pulmonary and renal fibrotic tissues TGF- $\beta$ 1 increases AT-1 and AT-2 levels adding more complexity to the mechanisms that regulate fibrosis. The effects of TGF- $\beta$  on the AngII receptor levels in skeletal muscle are not know.

The aim of this work was to evaluate the effect of TGF- $\beta$ 1 on protein levels of AT-1 and AT-2 receptors.

The results were determined by western blot assays, and they show that TGF- $\beta$ 1 increases fibronectin and collagen III expression in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells. We also determined that AT-2 protein levels were increased in a dose-dependent manner with a maximal effect at 48 h. However, levels of AT-1 remain unchanged. *In vivo* experiments in a mice damage skeletal muscle model injected with TGF- $\beta$ 1 shown an increase of AT-2 protein level and no changes were observed in AT-1 protein level. TGF- $\beta$ 1-dependent increase of AT-2 is abolished when cells were treated with a specific inhibitor of the TGF- $\beta$  receptor I kinase activity and with an inhibitor of p38 MAPK pathway, suggesting that the effect is directly mediated by TGF- $\beta$  receptors and p38 MAPK pathway. In a murine model of DMD (*mdx* mice), which presents fibrosis and augmented TGF- $\beta$ 1 levels, AT-1 and AT-2 receptors were evaluated in several muscles, AT-1 levels remain unchanged and AT-2 levels were augmented in dystrophic muscles. However, during differentiation, in which TGF- $\beta$  pathway is downregulated, C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myoblasts, diminished the expression of AT-1 and AT-2 receptors.

These results suggest that AT-2 protein levels, and not AT-1 levels, are differentially modulated by the profibrotic factor TGF- $\beta$ 1 in skeletal muscle cells and skeletal muscle, and during differentiation AT-1 and AT-2 are modulated, suggesting that these receptors have a role in the development and pathophysiology of DMD.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1. Fibrosis.**

La fibrosis es la respuesta exagerada de cicatrización frente a un daño crónico, caracterizado por un aumento excesivo de proteínas de la matriz extracelular (MEC) tales como colágeno y fibronectina. Frente a un daño crónico, tal como una infección, reacciones autoinmunes o daño mecánico, el proceso típico de reparación presenta dos fases, uno de regeneración donde las células dañadas son reemplazadas, y otra fase de fibrosis en el cual el tejido conectivo reemplaza el tejido normal. Si estos procesos se mantienen en el tiempo ocurre un remodelamiento de la MEC y la formación de un tejido de cicatrización permanente que reemplaza el tejido normal (Wynn, 2007, y Kisseleva y Brenner, 2008). La fibrosis puede afectar diversos órganos tales como corazón, pulmón, hígado, riñón y músculo esquelético. En todos estos casos, el reemplazo del tejido normal por tejido conectivo implica una disminución importante de la funcionalidad tisular normal.

Dentro de las enfermedades que afectan al tejido muscular esquelético y que conllevan la aparición y desarrollo de fibrosis, se encuentra la distrofia muscular de Duchenne (DMD). La DMD se expresa por la ausencia de distrofina, proteína del citoesqueleto, asociada al sarcolema; la distrofina se expresa principalmente en el músculo esquelético, y forma junto al complejo de proteínas asociadas a ella la unión entre la MEC y el citoesqueleto intracelular que es de importancia vital para el mantenimiento de las fibras musculares (Zanotti y cols. 2009). La principal consecuencia de la ausencia de distrofina en el músculo esquelético es la inestabilidad del sarcolema y el aumento de vulnerabilidad a estrés mecánico, originando ciclos continuos de degeneración y regeneración. Esto causa inflamación con constante producción de citoquinas profibróticas y excesiva síntesis y deposición de proteínas de la MEC que dan lugar a fibrosis, una acumulación de MEC y tejido conectivo el cual reemplaza a las células musculares disminuyendo progresivamente la masa muscular y la funcionalidad (Zhou y cols., 2010). Una característica importante de la DMD es el desarrollo de fibrosis en los tejidos determinado por los altos niveles de expresión del factor de crecimiento de tipo transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que promueve la producción de colágeno y la proliferación y diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos (Bernasconi y cols. 1995).

Entre los principales factores involucrados en la fibrosis se encuentran TGF- $\beta$  (Bataller y Brenner, 2005), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) (Rupérez y cols., 2003) y Angiotensina II (Ang II), el principal péptido efector del sistema renina-angiotensina (RAS) (Jonsson y cols., 2001).

## **2. Factores profibróticos.**

### **2.1. Factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

La familia TGF- $\beta$  pertenece a una familia de factores de crecimiento polipeptídicos que pueden presentar 3 isoformas TGF- $\beta$ 1, 2 y 3. TGF- $\beta$ 1 es la isoforma más abundante en mamíferos (Kettler y cols., 1995). Los efectos de TGF- $\beta$ 1 abarcan la proliferación celular, el destino celular, diferenciación, motilidad, adhesión y muerte (Massagué y cols., 1998).

Una de las propiedades biológicas más importantes de TGF- $\beta$  es la inducción de fibrosis en estados patológicos a través de la acumulación de proteína de la MEC, tales como fibronectina y colágeno. Los mecanismos por los que TGF- $\beta$  aumenta la MEC son: 1) inducción de la transcripción, síntesis y acumulación de proteínas de MEC, 2) disminución de la síntesis de metaloproteasas y aumento de la síntesis de inhibidores de estas proteasas, 3) aumenta la expresión de receptores de proteínas de adhesión que regulan el ensamblaje de la MEC (Kettler y cols., 1995).

#### 2.1.1. Vías de señalización dependientes de TGF- $\beta$

##### 2.1.1.1. Vía Canónica:

La principal vía de señalización de TGF- $\beta$  es la vía canónica dependiente de proteínas intracelulares denominadas Smad. Este proceso comienza cuando TGF- $\beta$  se une con dos receptores de transmembrana denominados receptores de tipo I y II para TGF- $\beta$  los cuales forman un complejo heteroligomérico. Ambos receptores se caracterizan por poseer actividad serina-treonina quinasa en su dominio intracelular, y por tener la capacidad de formar homo u heterodímeros (Dernyck y Feng, 1997). La unión de TGF- $\beta$  al receptor tipo II desencadena su

autofosforilación en aminoácido serina, y la posterior unión con el receptor de tipo I al cual fosforila en aminoácidos serina y treonina. Una vez que el receptor de tipo I ha sido activado interactúa con dos proteínas intracelulares que participan del proceso de señalización intracelular: Smad-2 y Smad-3. Las proteínas Smad-2/3, también denominadas R-Smad (Smads activadas por receptor) actúan como factores de transcripción, para lo cual poseen tres dominios estructurales y funcionalmente distintos: un dominio N-terminal de unión al DNA, un dominio C-terminal que se une a factores coactivadores o corepresores de la transcripción, y una región linker que donde se han identificado distintos sitios de fosforilación por quinasas que regulan la actividad de las proteínas Smad. El receptor tipo I para TGF- $\beta$  (T $\beta$ RI) fosforila a las R-Smads en el dominio C-terminal (Whitman, 1998; Itoh y cols., 2000).

Una vez que el receptor de tipo I fosforila a las R-Smad, estos adquieren la capacidad de interactuar con la proteína Smad-4, un tercer miembro de la familia de proteínas Smad, también denominado Co-Smad. Esta proteína es un componente intracelular que es compartido por las vías de señalización de varios miembros de la familia TGF- $\beta$ . R-Smad fosforilado junto a Smad-4 forman un complejo oligomérico que transloca al núcleo para regular la expresión de genes blanco de TGF- $\beta$  (Inman y cols., 2002). Existe una proteína intracelular inhibidora de la vía de transducción de señales de TGF- $\beta$  denominada Smad-7, la cual inhibe la fosforilación de Smad-2 y -3 por el receptor I de TGF- $\beta$ , además puede interactuar con Smad-4, y provocar la ubiquitinación del receptor tipo I para su posterior degradación (Itoh y Ten Dijke, 2007).

Varios estudios demuestran que la vía Smad activada por TGF- $\beta$  está involucrada en la fibrosis del hígado (Kaimori y cols., 2007), riñón (Schnaper y cols., 2002) y pulmón (Zhao y cols., 2001).

#### 2.1.1.2. Vías No Canónicas:

Además de la señalización canónica dependiente de proteínas Smad, existen otras vías de señalización de TGF- $\beta$  independiente de Smad pero con la participación del receptor I de TGF- $\beta$  (Zhang, 2009). Estas vías pueden ser MAPK ERK-1/2, p38, JNK, AKT y PI3K (Hartsough y Mulder, 1995; Engel y cols., 1999; Bhowmick y cols., 2001; Zhang, 2009), los efectos de TGF- $\beta$  en estas vías pueden variar en magnitud y cinética (Yu y cols., 2002). Algunos de los efectos

mediados por la activación de estas vías por TGF- $\beta$  son la inducción en la expresión de TGF- $\beta$ , transdiferenciación epitelio-mesénquima y alteración de la respuesta en la transcripción de genes blanco de TGF- $\beta$  a través de efectos directos sobre los factores de transcripción que interactúan con Smad (Derynck y Zhang, 2003). Además estas vías estarían mediando el desarrollo de fibrosis desencadenado por TGF- $\beta$ 1 (Li y cols., 2008; Yang y cols., 2009).

### 2.1.2. Músculo esquelético y TGF- $\beta$ 1.

El crecimiento y desarrollo del músculo esquelético está mediado por células de reserva denominadas células satélites que son células mononucleadas ubicadas entre el sarcolema y la lámina basal que rodea las fibras musculares; estas células son las encargadas del crecimiento del músculo y de mediar la formación de la masa muscular en el adulto, además constituyen la principal fuente de células precursoras musculares destinadas a formar y reparar las fibras frente a daño (Seale y Rudnicki, 2000). El proceso de la diferenciación muscular esquelética está comandado por un conjunto de factores de transcripción reguladores del músculo esquelético, los primeros factores en expresarse son MyoD y miogenina, éste último lleva a la fusión de las células precursoras del músculo y a la expresión de proteínas específicas del músculo tales como creatina quinasa y cadenas pesadas de miosina (Casar y cols., 2004).

Diversos estudios han demostrado que TGF- $\beta$ 1 es un potente inhibidor de la diferenciación de las células musculares esqueléticas (Massagué y cols., 1986; Riquelme y cols., 2001). Más aún, se ha establecido que la formación de músculo y por lo tanto el proceso de miogénesis, ocurre en presencia de TGF- $\beta$ . Esta evidencia ha permitido describir que existen diversos mecanismos de atenuación de la actividad biológica de TGF- $\beta$  durante la diferenciación muscular esquelética tales como la disminución de las proteínas Smad y la disminución de la biodisponibilidad del ligando a sus receptores a través del proteoglicán decorina (Droguett y cols., 2006; Droguett y cols., 2010). Además de la actividad eléctrica está asociada con los cambios en los niveles de T $\beta$ RI en la membrana celular (Ugarte y Brandan, 2006)

Otro de los efectos de TGF- $\beta$  en músculo esquelético es la inducción de fibrosis. A través de estudios *in vitro* se ha demostrado que TGF- $\beta$  es capaz de inducir el aumento de los niveles de proteínas de MEC y factores profibróticos tales como CTGF en mioblastos y fibroblastos

obtenidos de músculo esquelético (Vial y cols., 2008; Cabello-Verrugio y cols., 2011). *In vivo*, la inyección de TGF- $\beta$ 1 recombinante en el músculo esquelético de ratones, estimula a las miofibras a expresar TGF- $\beta$ 1 y a la formación de tejido fibrótico en la zona de la inyección (Li y cols., 2004). Estos datos correlacionan bien con los niveles aumentados de TGF- $\beta$ 1 reportados en los ratones distróficos *mdx* lo que explica en parte el fenotipo fibrótico observado en estos ratones distróficos (Bernasconi y cols., 1995).

## **2.2. Angiotensina II**

Ang II es el principal péptido efector de RAS. Ang II regula la presión sanguínea, el volumen plasmático, la actividad nerviosa simpática y las respuestas a la sed. También juega un papel importante en patologías cardiovasculares, incluyendo hipertrofia cardíaca, infarto al miocardio, hipertensión y aterosclerosis. Una serie de estudios también le atribuyen a Ang II características de citoquina y de factor de crecimiento (Touyz y Berry, 2002), por lo que Ang II a nivel celular regula la contracción, crecimiento celular, apoptosis, diferenciación, migración celular y deposición de MEC, es proinflamatoria y promueve la expresión de otros factores de crecimiento y vasoconstrictores, y transactiva receptores de factores de crecimiento (Kim e Iwao, 2000).

Se ha demostrado que los componentes de RAS, incluido su principal péptido efector, está involucrado en la patogénesis de fibrosis pulmonar (Bullock y cols., 2001), hepática (Jonsson y cols., 2001), cardíaca y renal (Sun y cols., 2009).

Diversos estudios han señalado que Ang II ejerce sus efectos biológicos a través de sus receptores transductores AT-1 y AT-2. En células musculares esqueléticas se ha descrito que Ang II produce hipertrofia, y detención del ciclo celular en G<sub>1</sub> (Hlaing y cols., 2002). En nuestro laboratorio se ha descrito recientemente que Ang II actúa como un potente agente pro-fibrótico en mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (Datos no publicados Proyecto Fondecyt Dr. Claudio Cabello).

### 2.2.1. Receptores para Angiotensina II y Vías de Señalización

Los efectos de Ang II son mediados por dos receptores transmembrana denominados AT-1 y AT-2, los cuales poseen siete dominios que atraviesan la membrana y se acoplan a proteína G (De Gasparo y cols., 2000) y que tan sólo presentan un 30% de homología aminoacídica.

El receptor AT-1 en ratas y ratones presenta dos subtipos: a y b originados por splicing alternativo, los cuales presentan un 95% de identidad aminoacídica. Es posible localizar AT-1 en glándula adrenal, riñones, corazón, aorta, pulmón, hígado, testículo, glándula pituitaria, cerebro, ovario, tejido adiposo y músculo esquelético (Burson y cols., 1994). La expresión de AT-1 puede estar regulada por glucocorticoides (Guo y cols., 1995), estrógenos (Kakar y cols., 1992), insulina (Nickenig y cols., 1998) y óxido nítrico (Ichiki y cols., 1998). La disrupción del gen que codifica para AT-1 en ratón, desencadena un retardo en el crecimiento, disminución de la presión sanguínea además de anomalías en la estructura y función renal (Oliverio y cols., 1998). Esta evidencia por lo tanto, indica que los efectos biológicos mediados por el receptor AT-1 comprenden la regulación de la presión arterial sanguínea, balance electrolítico e hídrico, secreción de hormonas, y función renal (De Gasparo y cols., 2000). A nivel intracelular, AT-1 está acoplado a la proteína  $G_{q/11}$ . La unión de Ang II a AT-1 desencadena la activación de la fosfolipasa C (PLC) que conlleva a la hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ) y la estimulación de la señalización de inositol trifosfato ( $IP_3$ )/ $Ca^{+2}$ . También induce la activación de proteínas MAPK y aumento en la expresión de varios genes de respuesta temprana como *c-fos*, *c-jun* y *c-myc* (De Gasparo y cols., 2000).

El receptor AT-2, en humanos y ratones, tiene 363 aminoácidos y presenta sólo una isoforma (De Gasparo y cols., 2000). El receptor AT-2 se localiza abundantemente en tejido fetal, en tejido adulto es casi indetectable y sólo aumenta sus niveles de expresión cuando está presente alguna patología tal como infarto al miocardio, aterosclerosis, hipertofia cardiaca, e insuficiencia cardiaca (Okhubo y cols., 1997; Tsutsumi y cols., 1998). Los ratones nulos para el receptor AT-2 presentan presión arterial elevada y alta sensibilidad vascular a Ang II (Hein y cols., 1995; Ichiki y cols., 1995).

El receptor AT-2 está acoplado a  $G_{i\alpha 2}$  o  $G_{i\alpha 3}$ , la unión al ligando activa a GMP cíclico por un mecanismo dependiente de bradicinina, activa proteína tirosina fosfatasa, serina/treonina fosfatasa 2A y proteína quinasa fosfatasa. El receptor AT-2 actúa de forma contraria a AT-1, por

lo que estas fosfatasas están destinadas a desfosforilar las proteínas fosforiladas por AT-1 (De Gasparo y cols., 2000).

### **2.2.2. RAS y músculo esquelético.**

Qi y cols., por ensayos de unión a radioligando demostró que células musculares esqueléticas presentan ambos receptores para Ang II, siendo predominante AT-1. Pero no sólo están presentes los receptores AT-1 y AT-2 en el músculo esquelético, sino que también otros miembros de RAS, como la enzima convertidora de Angiotensina (ACE), Angiotensina I y Ang II (Johnston y cols., 2010). La función de ambos receptores para Ang II en el músculo esquelético aún es desconocida.

Por primera vez Sun y cols., 2009, determinó el aumento en la expresión proteica de ACE en músculo esqueléticos distróficos en humanos, principalmente en fibroblastos, macrófagos y fibras (no en tejido endotelial). La principal consecuencia, según los autores, de la sobreexpresión de ACE en los músculos distróficos es el aumento de los niveles de Ang II con lo que se favorecería la inducción de TGF- $\beta$ 1 y así también de los efectos fibróticos de este último.

### **2.2.3. Regulación de niveles de Receptores para Angiotensina II**

En fibrosis se ha demostrado que AT-1 presenta elevados niveles de expresión en diferentes tejidos tales como pulmón (Bullock y cols., 2001), corazón (Ozono y cols., 2000) e hígado (Leung y cols., 2003). Por ejemplo en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, patología en la cual existe fibrosis, los niveles de expresión de AT-1 aumentan 10 veces y los de AT-2 más de 5 veces (Bullock y cols., 2001), otro caso es el de las células hepáticas Kupffer que tienen una acción fibrótica conocida en la cirrosis hepática. En estas células es posible detectar Ang II y el receptor AT-1 predominantemente, en este caso se postula que las acciones fibróticas de Ang II estarían mediadas por el receptor AT-1 desencadenando un aumento en la expresión del mRNA de TGF- $\beta$  y fibronectina (Leung y cols., 2003). Sin embargo, también se ha detectado un aumento en la expresión del receptor AT-2 en biopsias de pacientes con daño al corazón causado por cardiomiopatía dilatada idiopática, en las zonas con deposición prominente de componentes de MEC. Las células responsables de este aumento en los niveles de AT-2 fueron fibroblastos

presentes en las regiones intersticiales (Tsutsumi y cols., 1998). Entre los factores que regulan la expresión y los niveles proteicos de ambos receptores para Ang II se encuentra factor profibrótico TGF- $\beta$ 1 (Li y cols., 1999; Martin y cols., 2007).

Los antecedentes en su conjunto permiten plantear que:

## **II. HIPÓTESIS.**

Los niveles de los receptores AT-1 y AT-2 para Ang II son regulados por TGF- $\beta$ 1 en células musculares esqueléticas y en el músculo esquelético.

## **III. OBJETIVOS**

### **1. Determinar el efecto de TGF- $\beta$ en los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 para Ang II en células musculares esqueléticas y músculo esquelético.**

- 1.1. Analizar la cinética y el efecto dosis dependiente de TGF- $\beta$  sobre los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 en células musculares esqueléticas.
- 1.2. Estudiar el efecto de la inyección de TGF- $\beta$  sobre los niveles de los receptores AT-1 y AT-2 en músculo esquelético de ratón.

### **2. Determinar el mecanismo de regulación mediado por TGF- $\beta$ sobre los niveles de AT-1 y AT-2 en células musculares esqueléticas.**

- 2.1. Estudiar la participación del T $\beta$ RI de TGF- $\beta$  en la regulación de los niveles de los receptores AT-1 y AT-2 mediada por TGF- $\beta$ .
- 2.2. Establecer la participación de vías de señalización canónica o no canónica de TGF- $\beta$  en la regulación de los niveles de los receptores AT-1 y AT-2 mediados por TGF- $\beta$ .

### **3. Determinar los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 para Ang II durante la diferenciación de mioblastos a miotubos.**

## **IV. MATERIALES Y METODOS**

### **1. MATERIALES**

#### **1.1. Reactivos.**

##### 1.1.1. Medios de cultivo.

De Invitrogen Life Technologies, MD, Estados Unidos, son el medio de cultivo DMEM alta glucosa, mezcla de antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomycin y anfotericina B) y la solución de tripsina 0,5% (10X).

De Thermo Scientific Hyclone, UT, Estados Unidos, son el suero fetal bovino y suero de caballo.

##### 1.1.2. Citoquinas e inhibidores.

De Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido, son el inhibidor de la fosforilación de p38 SB-203580 y el inhibidor de la fosforilación de Smad 3 dependiente de TGF- $\beta$ , SIS3.

De R&D Systems, MN, Estados Unidos, se obtuvo TGF- $\beta$ 1 e IGF-I

De Alomone Labs., Jerusalén, Israel se obtuvo el inhibidor de la actividad quinasa de MEK1 y MEK2, U0126.

De Sigma Chemical Co., MO, Estados Unidos, se obtuvo el inhibidor de la actividad quinasa del receptor tipo I para TGF- $\beta$  (T $\beta$ RI) SB-431542 y el inhibidor de la replicación arabinosilcitosina (AraC).

##### 1.1.3. Marcadores de masa molecular.

De Fermentas, MD, Estados Unidos, fueron obtenidos los estándares preteñidos para electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

#### 1.1.4. Reactivos generales

De Valtek Diagnostics, Santiago, Chile es el kit CK-total (NAC).

De Merck son EDTA, EGTA, NaCl y los solventes de grado analítico etanol, isopropanol y metanol.

De US Biological, MA, Estados Unidos, son SDS, Tris base y glicina.

De Sigma, MO, Estados Unidos, son el ortovanadato de sodio, PMSF, desoxicolato de sodio, persulfato de amonio, DMSO, anisomicina y rojo Ponceau S.

De Winkler, Santiago, Chile son Tween 20, TEMED,  $\beta$ -mercaptoetanol, acrilamida y bisacrilamida.

De Millipore, MA, Estados Unidos, es la solución de stripping Re-blot Plus Strong Solution 10X.

De Centrovvet, Santiago, Chile es la Xilazina 2%.

De DragPharma, Santiago, Chile es la Ketamina al 10%.

De Thermo Scientific, IL, Estados Unidos, es la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF).

De Pierce, IL, Estados Unidos, es el kit Micro BCA Protein Assay, la albúmina de suero bovino (BSA) y los sustratos quimioluminiscentes SuperSignal.

## **1.2. Material Biológico.**

### 1.2.1. Células Eucarióticas

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (ATCC CRL-1772, American Type /cultura /collection): es un subclon producido por Blau y cols. de la línea celular de mioblastos de ratón (Blau y cols., 1985; Yaffe y Saxel, 1977). La línea celular C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se diferencia formando miotubos contráctiles y produciendo proteínas características del músculo (Blau y cols., 1985).

### 1.2.2. Animales.

Los estudios con animales se realizaron utilizando ratones C57/BL10 y ratones deficientes en distrofina (C57/BL10-*mdx*), siendo aprobados los protocolos de trabajo por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

### 1.2.3. Anticuerpos utilizados.

ANTICUERPO	ANTÍGENO	ORIGEN	TÉCNICA Y DILUCIÓN	MARCA
anti-AT-1	Receptor del tipo 1 para Angiotensina II	Conejo	WB/ 1:500	Santa Cruz, Estados Unidos
anti- AT-2	Receptor del tipo 2 para Angiotensina II	Conejo	WB /1:500	Alomone, Israel
anti- fibronectina	Fibronectina	Conejo	WB / 1:5000	Sigma, Estados Unidos
anti- GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Ratón	WB / 1:10000	Millipore, Estados Unidos
Anti-tubulina	alfa-tubulina	Ratón	WB / 1:10000	Sigma, Estados Unidos
Anti- fosfo Smad-2	Fosfoserinas 465 y 467 de Smad-2	Conejo	WB / 1/1000	Calbiochem, Estados Unidos
anti-fosfo JNK	Treonina 183 y Tirosina 185 fosforiladas de p43 y p54 de SAPK/JNK	Conejo	WB / 1:500	Cell Signaling, Estados Unidos
anti- JNK total	SAPK/JNK	Conejo	WB / 1:500	Cell Signaling, Estados Unidos
Anti- fosfo ERK-1/2	Treonina 202 y Tirosina 204 fosforiladas de ERK-1 y/o Treonina 185 y Tirosina 187 fosforiladas de ERK-2	Conejo	WB / 1:1000	Cell Signaling, Estados Unidos
Anti- ERK-1/2 total	ERK-1/ERK-2	Conejo	WB / 1:1000	Cell Signaling, Estados Unidos
Anti- fosfo AKT	Fosfoserina 473 de AKT	Conejo	WB / 1:500	Cell Signaling, Estados Unidos

Anti- AKT total	AKT	Conejo	WB / 1:500	Cell Signaling, Estados Unidos
Anti- fosfo p38	Treonina 180 y Tirosina 182 fosforiladas	Conejo	WB / 1:500	Cell Signaling, Estados Unidos
Anti-miosina	Cadena pesada de miosina	Ratón	WB / 1:5000	Sigma, Estados Unidos
Anti-miogenina	Miogenina	Conejo	WB / 1:500	Santa Cruz, Estados Unidos
Anti-ratón IgG	IgG (H+L) de ratón	Cabra	WB/ 1:10000	Thermo, Estados Unidos
Anti-conejo IgG	IgG (H+L) de conejo	Cabra	WB/ 1:10000	Thermo, Estados Unidos

WB: Western Blot

## **2. MÉTODOS**

### **2.1. Cultivo y mantención de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.**

2.1.1. Crecimiento: las células se crecieron en placas de 55 cm<sup>2</sup> con medio de crecimiento (DMEM alta en glucosa con mezcla de antibióticos-antimicóticos suplementado con suero fetal bovino 10%) en estufa a 37°C y 8% CO<sub>2</sub> (Brandan y cols., 1991; Brandan y cols., 1996).

2.1.2. Diferenciación: las células crecidas hasta un 80% de confluencia se indujeron a diferenciar, para lo cual se lavaron 3 veces con medio mínimo, y se les agregó 5 ml medio de diferenciación (DMEM con mezcla de antibióticos-antimicóticos suplementado con suero de caballo 5%) y se llevaron a la estufa 37°C, 8% CO<sub>2</sub> (día 0). Después de 48 h de inducida la diferenciación se cambió el medio de cultivo por medio de diferenciación suplementado con Ara C 1 mM final. Este procedimiento se repitió cada 2 días hasta el término del experimento (Larraín y cols., 1997).

2.1.3. Incubación de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> con TGF-β1 e inhibidores. Se plaquearon mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 35 mm. A las 24 horas después de ser plaqueadas, las células se lavaron dos veces con medio mínimo y se dejaron en ausencia de suero durante 18 horas. Después de este tiempo éstas se incubaron con TGF-β1 10 ng/ml por 12, 24 y 48 horas a diferentes concentraciones de TGF-β1 durante 48 horas.

En el caso del uso de inhibidores de la actividad quinasa del receptor TβRI (SB-431542 10 μM), de la actividad de MEK1/2 (UO126 10 μM) o de la actividad de p38 (SB-203580 10 μM), las células se preincubaron durante 1 hora antes del tratamiento con TGF-β1.

### **2.2. Inyección de TGF-β en músculo esquelético dañado.**

Ratones C57/BL10 de 4 meses se anestesiaron con ketamina (80 mg/Kg) y xilazina (12 mg/Kg). Posteriormente se realizó una pequeña incisión en la piel de la extremidad inferior cerca de la rodilla y se inyectó 50 μl BaCl<sub>2</sub> 1,2% diluido en suero fisiológico a lo largo del

tibial anterior (Casar y cols., 2004). La extremidad inferior contraria se usó como control y se le inyectó 50 µl de suero fisiológico. Luego de las inyecciones, las incisiones de la piel se suturaron. Al tercer día post-inyección de BaCl<sub>2</sub>, a un grupo de ratones se les inyectó 50 µl de TGF-β1 20 ng/ml en las 2 extremidades a lo largo del tibialis anterior (usando el mismo procedimiento quirúrgico descrito arriba) al otro grupo de ratones se le inyectó suero fisiológico en ambas extremidades. Los animales se sacrificaron 24 y 48 horas después de la inyección con TGF-β1 por dislocación cervical y se extrajeron los tibialis anterior congelándose a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

### **2.3. Ensayos enzimáticos.**

2.3.1. Actividad creatina quinasa: se utilizó el kit de Valtek CK-total (NAC), para la cuantificación de la actividad creatina quinasa. El método se basa en una secuencia de reacciones acopladas a través de las cuales se determina la concentración de NADPH, cuya formación es proporcional a la actividad de la enzima presente en la muestra (Szasz, G, 1977). Se hicieron extractos proteicos de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> inducidas a diferenciación durante distintos tiempos plaqueadas en placas de 55 cm<sup>2</sup>, utilizando una solución tampón (Tris 100 mM, pH 7,4, NaCl 200 mM y Triton X-100 0,5%) con inhibidores de proteasas (PMSF 1mM). Se mezclaron 10 µl de muestra con 750 µl de sustrato provisto por el kit y se incubaron dos minutos a 37°C. Posteriormente se leyó la absorbancia a 370 nm en espectrofotómetro UV Shimadzu 1601PC. La actividad se expresó en U/ml según la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad CK (U/ml)} = \text{Pendiente (DO / min)} \times V_r / (V_m \times 6,22)$$

V<sub>r</sub>: volumen total de la reacción

V<sub>m</sub>: volumen de la muestra

6,22: coeficiente de extinción micromolar del NADPH a 340 nm

## **2.4. Técnicas bioquímicas generales.**

### 2.4.1. Extractos proteicos totales de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.

Para cuantificar proteínas y hacer los extractos para los western blots, las células se lavaron 3 veces con PBS frío y posteriormente se incubaron con el respectivo tampón de lisis (según se describe más abajo) por 5 minutos en frío, para después desprenderlas de la placa por raspaje, homogeneizarlas 10 veces con una jeringa y clarificarlas por centrifugación a 9.600 x g por 10 min a 4°C, a excepción de los extractos hechos con SDS los cuales se centrifugan a temperatura ambiente. Los tampones utilizados para lisar las células fueron: solución tampón Tris 100 mM, pH 7,4, NaCl 200 mM y Tritón X-100 0,5%. Para células diferenciadas; solución tampón RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, EGTA 2 mM, EDTA 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 1 mM, pirofosfato de Na 30 mM, pH 7,4) para obtener los extractos para identificar proteínas fosforiladas, solución tampón Tris 100 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM y SDS 1% para moléculas de matriz extracelular.

### 2.4.2. Extractos proteicos de tejidos.

Músculos esqueléticos congelados a -80 °C inmediatamente después de ser disectados se homogeneizaron en tampón de extracción frío Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8,3 utilizando una relación de 1 gramo de tejido con 10 volúmenes (10 ml). La homogenización se realizó mecánicamente con Ultra- Turrax T25 Basic, IKA Laboratechnik, NC, Estados Unidos, durante 30 segundos y 30 segundos de descanso 3 veces. Inmediatamente después se sacó una alícuota de 500 µl y se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se agregó 500 µl del tampón de tratamiento 2X (Tris 0,125 M, SDS 4%, glicerol 20%, pH 6,8) y se mezcló bien con pipeta. Las muestras se calentaron en un baño termostático a 50°C por 20 minutos y posteriormente se clarificaron mediante centrifugación a 18.800 x g a temperatura ambiente.

### 2.4.3. Cuantificación de proteínas.

Se utilizó el kit micro BCA que se basa en el método del ácido bicinconínico, en el cual se detecta la formación de Cu<sup>+1</sup> que proviene de la reducción del Cu<sup>+2</sup> por proteínas en un medio alcalino (Smith y cols., 1985). Una alícuota de 2 µl de la muestra se diluyeron

en agua tridestilada a un volumen final de 150  $\mu$ l, se agregaron a pocillos de 0,32 cm<sup>2</sup> y se mezclaron con 150  $\mu$ l de la solución del kit. Luego se incubaron a 37°C por 2 horas, se enfriaron por 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente medir la absorbancia a 550 nm en el lector de ELISA 960 Metertech. La concentración de proteínas se midió en base a una curva estándar de albúmina de suero de bovino (BSA) en un rango lineal que abarca desde 0 a 20  $\mu$ g/ml utilizando un estándar de BSA provisto por el fabricante.

#### 2.4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Los geles se hicieron en vidrios 20 x 14 x 0,15 cm (Laemmli, 1970). El gel concentrador se hizo al 3% y el separador al 10% de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida (30:1). La preparación de las proteínas para la electroforesis se efectuó agregando la cuarta parte de su volumen de tampón de carga (Tris 0,125 M, pH 6.8, SDS 6%, glicerol 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0,07%) para posteriormente calentarse a 100°C por 5 minutos. Una vez aplicada la muestra al gel, ésta se separó aplicando 85 V (gel concentrador) y 110 V (gel separador) en tampón Tris 25 mM, glicina 0,125 M y SDS 1%.

#### 2.4.5. Electrotransferencia y visualización de proteínas.

Las proteínas separadas por electroforesis SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) que previamente se bloqueó por 5 minutos en metanol según instrucciones del fabricante. Brevemente el procedimiento de transferencia implica que el gel y la membrana se colocaron entre dos papeles Whatman, y dos esponjas dentro de un soporte, el cual se puso en la cámara de transferencia con la membrana en dirección al polo positivo en tampón Tris 25 mM, glicina 0,125 M y 20% metanol por 2 horas a 70 V.

Para visualizar el resultado de la transferencia de proteínas las membranas se incubaron con rojo Ponceau S en ácido acético 1%. Luego la membrana se lavó en agua destilada, se bloqueó por 5 minutos en metanol y posteriormente se secó antes de la incubación con los anticuerpos.

#### 2.4.6. Inmunoblot

Para el procedimiento de inmunoblot se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido en solución Blotto (Tris 0,02 M, pH 7,4, NaCl 0,1 M, leche descremada 5% y Tween-20 1%). Posteriormente la membrana se lavó 3 veces por 10 minutos con Blotto y luego se incubó con el anticuerpo secundario dirigido contra el anticuerpo primario y acoplado a peroxidasa de rábano diluido en el mismo tampón usado para el anticuerpo primario por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavó la membrana 3 veces con Blotto, 3 veces con Blotto sin leche y 3 veces con PBS. La visualización de las bandas se realizó utilizando distintos sustrato quimioluminiscentes (West pico, West dura y West femto) y las imágenes se capturaron por medio del ChemiDoc-It, BioRad Systems. Las imágenes digitales obtenidas se procesaron mediante el programa de edición de imágenes Photoshop.

#### 2.5. Estadística.

Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM. Cuando se compararon dos grupos, la significancia estadística se estableció usando el *t*-test Student. Cuando se hicieron varias comparaciones se usó test ANOVA de una vía. Todos los test estadísticos se hicieron con el programa de análisis estadístico Sigma Stat.

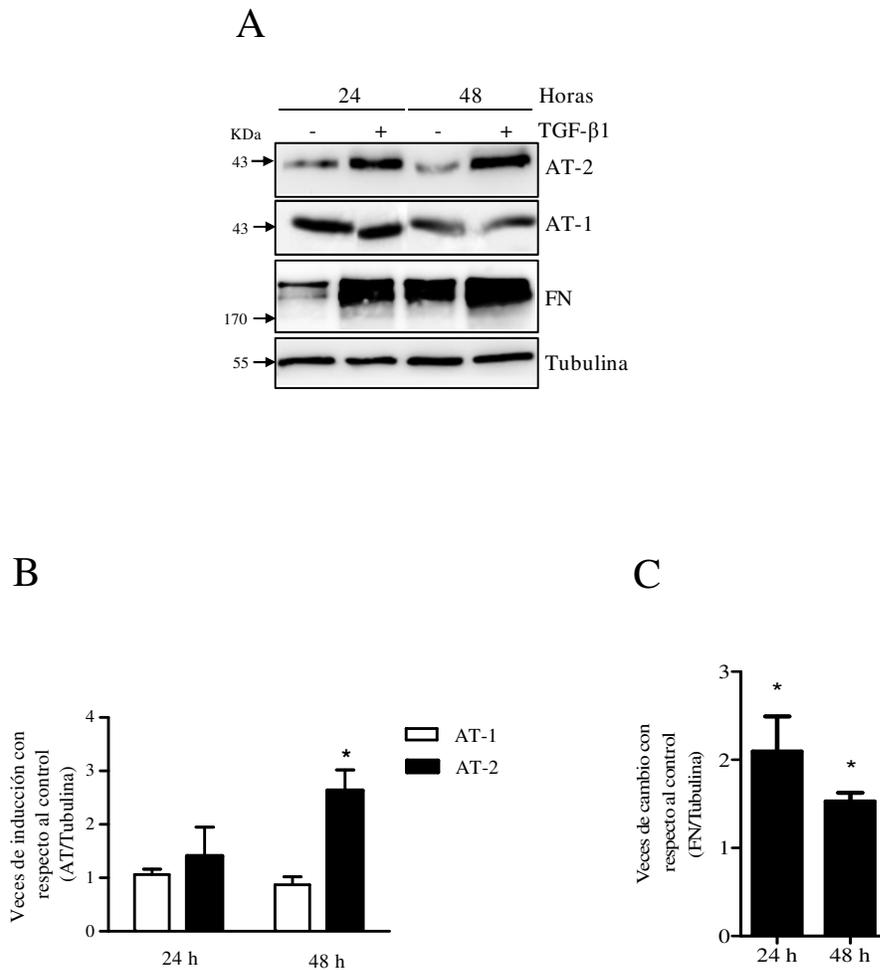
## V. RESULTADOS

### 1. Determinar el efecto de TGF- $\beta$ sobre los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 para Angiotensina II en células musculares esqueléticas y músculo esquelético.

1.1. Analizar la cinética y el efecto dosis dependiente de TGF- $\beta$  sobre los niveles proteicos de AT-1 y AT-2 en células musculares esqueléticas.

Tal como se mencionó en la introducción, TGF- $\beta$  tiene un papel importante en el desarrollo de fibrosis en diferentes tejidos, caracterizado por aumento de moléculas de MEC (Polhers y cols., 2009). En estos sistemas también se ha reportado que RAS está fuertemente involucrado en la génesis y progresión del proceso fibrótico, siendo Ang II y su receptor AT-1 los principales componentes moleculares involucrados (Leung y cols., 2003; Renzoni y cols., 2004). Además diversos estudios han descrito que TGF- $\beta$ 1 aumenta la expresión y niveles proteicos del receptor AT-1 (Leung y cols., 2003; Renzoni y cols., 2004; Tower y cols., 2005; Martin y cols., 2007), y que el receptor AT-2 ha demostrado tener actividad antifibrótica en el infarto al miocardio (Ohkubo y cols., 1997). Algo similar ocurre en la enfermedad obstructiva pulmonar, en la cual existe fibrosis y aumento en los niveles de expresión de TGF- $\beta$ , y de AT-2 (Bullock y cols., 2001).

Para evaluar los efectos de TGF- $\beta$  sobre los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 en células musculares esqueléticas, mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se incubaron con TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) durante los tiempos indicados en la figura 1A. Los resultados muestran que los niveles proteicos del receptor AT-2 aumentan en respuesta a TGF- $\beta$ 1 después de 24 y 48 horas de incubación con el factor de crecimiento, mientras que los niveles proteicos del receptor AT-1 no se ven alterados. En la figura 1B se muestra el análisis densitométrico de los western blots para los receptores AT-1 y AT-2 donde se muestra un aumento de 2 y 3 veces en los niveles de AT-2 a las 24 y 48 horas de incubación con TGF- $\beta$ 1 respectivamente, mientras que TGF- $\beta$ 1 no produce cambios en los niveles del receptor AT-1 con respecto al control.



**Figura 1. Los niveles del receptor AT-2, no así los de AT-1, aumentan en respuesta a TGF- $\beta$ 1 en las células musculares esqueléticas.** A) Los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se plaquearon y se cultivaron en ausencia de suero durante 18 h, posteriormente fueron incubadas con 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 durante 24 y 48 h. Los niveles de los receptores AT-2 y AT-1, y fibronectina (FN) se evaluaron por ensayos de western blot. Los niveles de tubulina se muestran como control de carga. B) Los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 se cuantificaron por análisis densitométricos. Cada barra representa el promedio de los niveles proteicos del receptor normalizado con respecto a los niveles proteicos de los controles respectivos sin TGF- $\beta$ 1 (n=3; \**p* < 0,05). C) Los niveles proteicos de FN se cuantificaron por análisis densitométricos (n=3; \**p* < 0,05 respecto al control sin TGF- $\beta$ 1).

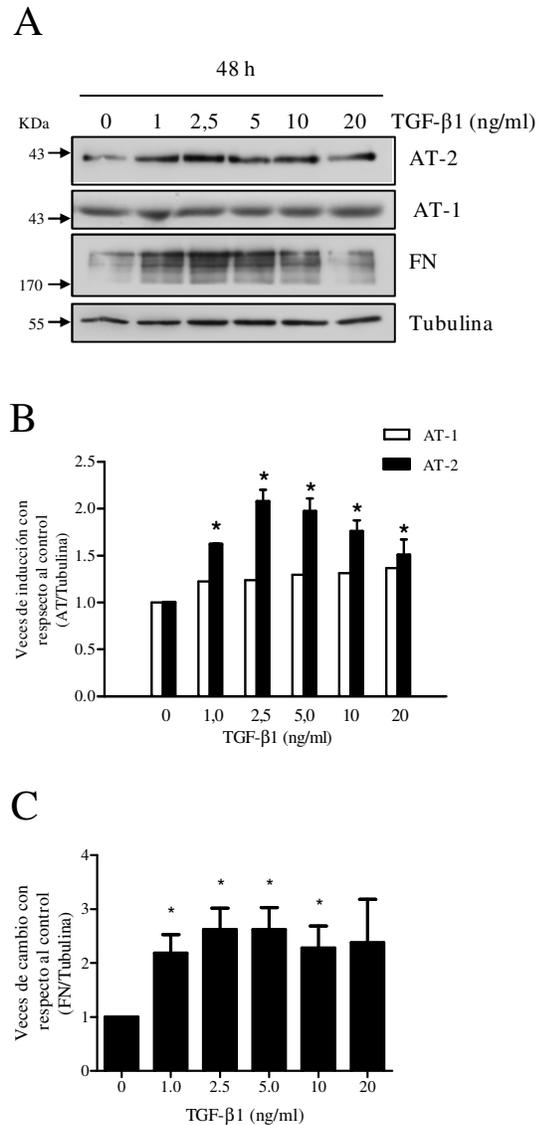
La figura 1A muestra que TGF- $\beta$ 1 aumenta los niveles de fibronectina a las 24 y 48 horas post incubación con el factor de crecimiento. La figura 1C muestra la cuantificación de las bandas del western blot para fibronectina donde se observa un aumento de 3 veces a las 24 horas y luego una caída a niveles basales.

Para evaluar si los niveles de los receptores AT-1 y AT-2 son modulados en forma dependiente de la dosis de TGF- $\beta$ 1 utilizada, mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se incubaron con diferentes concentraciones de este factor de crecimiento durante 48 horas y los extractos obtenidos se separaron por SDS-PAGE para determinar mediante ensayos de western blot. La figura 2A muestra que TGF- $\beta$ 1 aumenta los niveles del receptor AT-2 con todas las concentraciones de TGF- $\beta$ 1 utilizadas en el rango entre 1 y 20 ng/ml. El análisis densitométrico de las bandas (figura 2B) muestra que el mayor aumento (casi 2,5 veces) en los niveles del receptor AT-2 ocurre cuando las células fueron incubadas con 2,5 y 5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1, y a concentraciones más altas de TGF- $\beta$ 1 el incremento de los niveles de AT-2 es más discreto (1,5 veces), en cambio no se observan cambios en los niveles del receptor AT-1. En la figura 2A se observa el aumento de los niveles de fibronectina en respuesta a TGF- $\beta$ 1, corroborando el efecto pro-fibrótico de este factor de crecimiento sobre los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. En a figura 2C, se muestra la cuantificación de las bandas de fibronectina como control positivo de lo efectos fibróticos de TGF- $\beta$ 1.

En conclusión, los niveles proteicos del receptor AT-2 para Ang II aumentan en respuesta a TGF- $\beta$ 1 de manera dosis dependiente, sin embargo los niveles proteicos de AT-1 no son afectados.

1.2. Estudiar el efecto de TGF- $\beta$  sobre los niveles de los receptores AT-1 y AT-2 en músculo esquelético de ratón.

La modulación diferencial de los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 por TGF- $\beta$ 1 en células musculares esqueléticas abre la pregunta de si estos eventos reguladores pueden ser observados *in vivo*. Para evaluar el efecto de TGF- $\beta$ 1 sobre los niveles de AT-1 y AT-2 en músculo esquelético se utilizó un modelo de inyección intramuscular de TGF- $\beta$ 1 al músculo tibial anterior (TA) previamente dañado con BaCl<sub>2</sub> (Caldwell y cols., 1999).



**Figura 2. Los niveles del receptor AT-2 aumentan en forma dependiente de la dosis de TGF- $\beta$ 1 en células musculares esqueléticas.** A) Las células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se incubaron con concentraciones diferentes de TGF- $\beta$ 1 durante 48 h. Los niveles de los receptores AT-2, AT-1, fibronectina (FN) y tubulina se evaluaron por ensayos de western blot. B) El gráfico muestra la cuantificación de AT-1 y AT-2 normalizados con respecto al control sin TGF- $\beta$ 1 (AT-2, n=3; AT-1 n=2) (\* $p < 0.05$ ; respecto al control sin TGF- $\beta$ 1). C) Los niveles de fibronectina (FN; n=3) se cuantificaron por análisis densitométricos (\* $p < 0.05$ ; respecto al control sin TGF- $\beta$ 1)

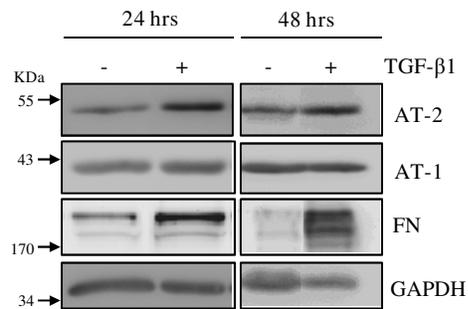
La inyección intramuscular con BaCl<sub>2</sub> induce la necrosis y posterior regeneración de las fibras musculares (Casar y cols., 2004 b). La figura 3A muestra la detección de los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 mediante ensayos de western blot en extractos obtenidos de músculos TA a las 24 y 48 horas posterior a la inyección de TGF-β1 (20 ng/ml). Los resultados muestran que TGF-β1 aumenta los niveles proteicos del receptor AT-2 a las 24 y 48 horas post-inyección, mientras que los niveles de AT-1 no presentan variaciones con respecto a los músculos sin inyección de TGF-β1. Los niveles de fibronectina se muestran como control positivo del efecto pro-fibrótico causado por la inyección de TGF-β1. La figura 3B muestra el gráfico con los resultados del análisis densitométrico de las bandas de los western blots, se puede observar que los niveles del receptor AT-2 se encuentran incrementados 2,5 veces en el músculo 24 horas post-inyección del factor de crecimiento, en tanto 48 horas post-inyección el músculo presenta un menor aumento de 1,5 veces en los niveles de AT-2.

Dado que TGF-β1 es capaz de regular diferencialmente los niveles de los receptores AT-1 y AT-2 *in vivo*, se evaluaron los niveles de estos receptores en diferentes músculos esqueléticos del ratón distrófico *mdx*, el modelo murino de la DMD, enfermedad en la cual se ha reportado que presenta niveles aumentados de TGF-β1 en músculo esquelético (Bernasconi y cols., 1995).

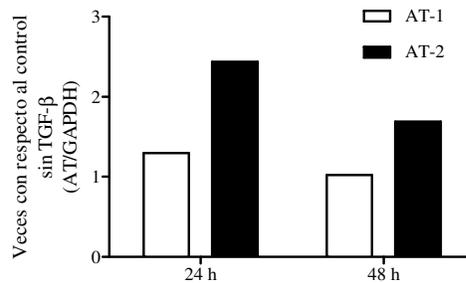
La figura 4 muestra que los niveles del receptor AT-2 están aumentados en los músculos gastrocnemio (A), soleo (B), tibial anterior (C) y diafragma (D) de ratones distróficos de 4 meses de edad en comparación con aquellos músculos de ratones normales. Sin embargo, no se observan cambios en los niveles proteicos del receptor AT-1 en los músculos de ratones distróficos respecto al ratón normal. Los niveles aumentados de fibronectina en músculos del ratón *mdx* respecto a los del ratón normal, se usaron como un marcador de la fibrosis que presentan los músculos distróficos de ratones. La figura 4E muestra el gráfico del análisis densitométrico de los niveles de los receptores AT-1 y AT-2 en los músculos esqueléticos distróficos. Los músculos tibial anterior y gastrocnemio presentan los mayores aumentos, en más de dos veces, en los niveles proteicos del receptor AT-2 con respecto a los mismos músculos de ratones normales.

Tal como se esperaba, siguiendo la línea de los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro*, cuando TGF-β se expresa de manera importante en el músculo esquelético tal como en los músculos distróficos de los ratones *mdx*, y en la inyección de TGF-β1 post-daño con BaCl<sub>2</sub> en el tibial anterior, los niveles proteicos del receptor AT-2 aumentan considerablemente, no así los niveles proteicos del receptor AT-1 que no presenta variaciones importantes.

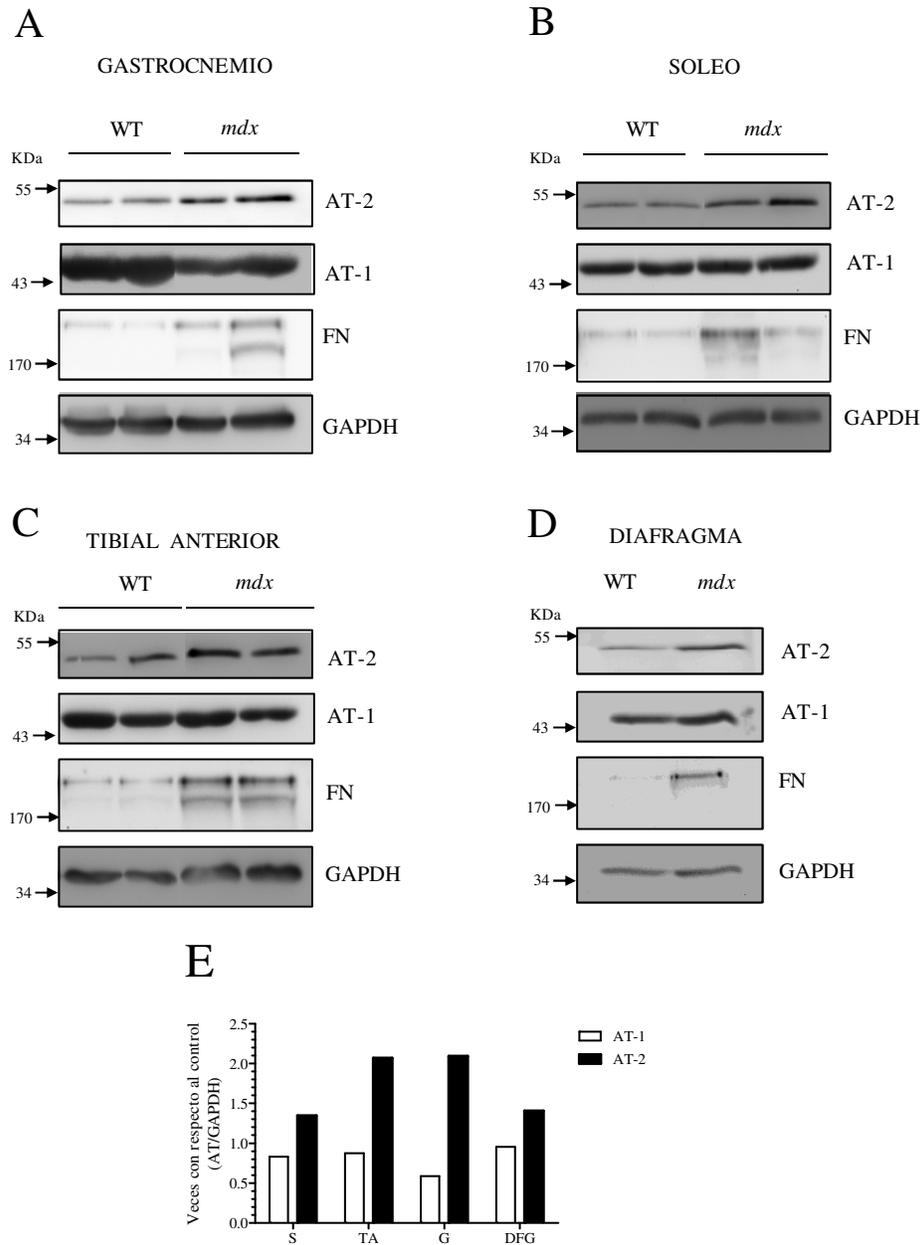
A



B



**Figura 3. Los niveles proteicos de AT-2 aumentan en respuesta a TGF-β1 en músculo esquelético de ratón C57/BL10.** El músculo tibial anterior se le inyectó BaCl<sub>2</sub> y al tercer día de daño se le inyectó 20 ng/ml de TGF-β1, después de 24 y 48 h los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. A) Los niveles de los receptores AT-1 y AT-2 se analizaron por ensayos de western blot. Fibronectina (FN) se usó como control positivo del tratamiento con TGF-β1. Los niveles de GAPDH se usaron como control de carga. B) El gráfico muestra la cuantificación de los receptores AT-1 y AT-2 normalizado con respecto al control que no fue inyectado con TGF-β.



**Figura 4. Los niveles proteicos del receptor AT-2 están aumentados en músculos esqueléticos distróficos.** Los niveles de los receptores AT-2, AT-1, FN y GAPDH se detectaron por análisis de western blot. A),B),C) y D) muestran los músculos gastrocnemio (G), soleo (S), tibial anterior (TA) y diafragma (DFG), respectivamente. E) Gráfico que muestra la cuantificación por análisis densitométrico de las bandas de los western blots. Cada barra representa los niveles de los receptores para angiotensina II en los músculos distróficos normalizado con respecto a GAPDH (n=2).

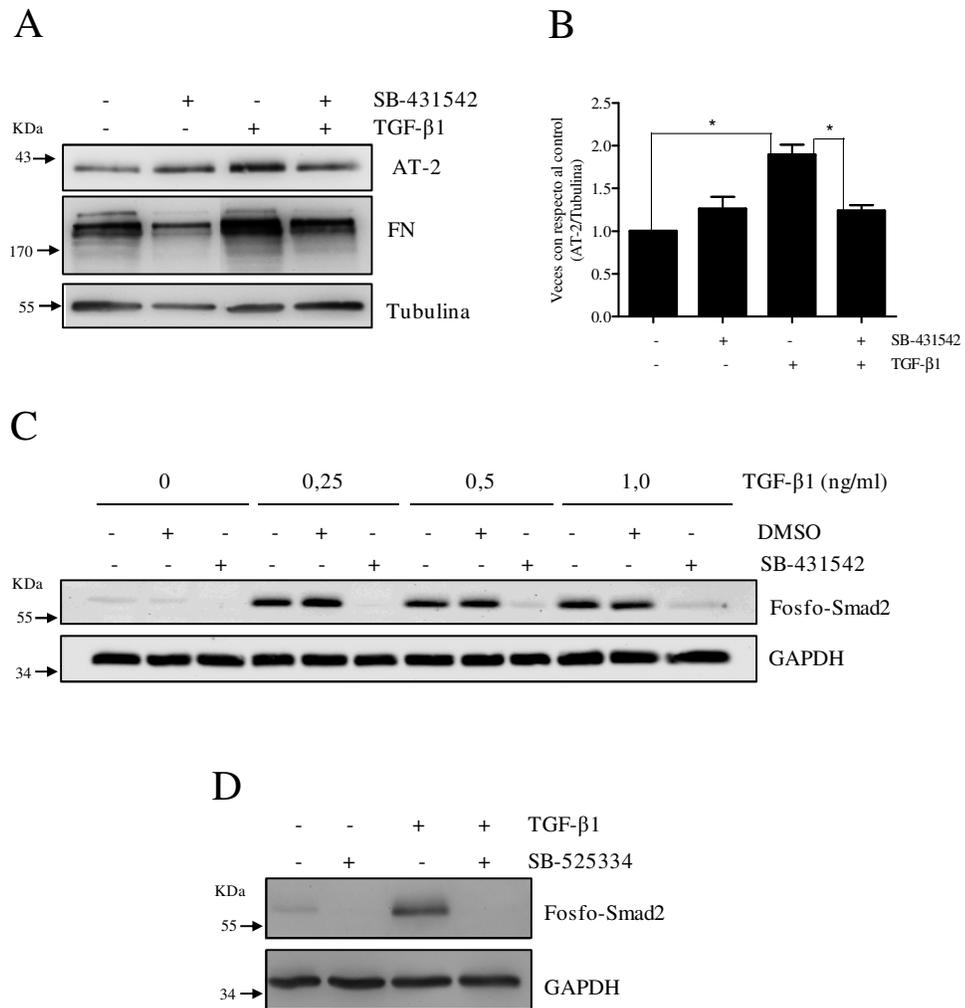
## **2. Determinar el mecanismo de regulación mediado por TGF- $\beta$ sobre los niveles de AT-2 en células musculares esqueléticas.**

2.1. Estudiar la participación del receptor tipo I de TGF- $\beta$  en la regulación de los niveles de AT-2 mediada por TGF- $\beta$ 1.

Para determinar si T $\beta$ RI participa en el aumento de los niveles del receptor AT-2 inducidos por TGF- $\beta$ 1, células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se incubaron con TGF- $\beta$ 1 en ausencia o presencia de los inhibidores de la actividad quinasa del receptor T $\beta$ RI (SB-431542 y SB-525334). En la figura 5A, se observa por análisis de western blot que la inducción de los niveles del receptor AT-2 en respuesta a TGF- $\beta$ 1 se reduce por la inhibición de la actividad quinasa del receptor tipo I de TGF- $\beta$  con SB-431542. La misma figura muestra el aumento de los niveles de fibronectina en respuesta a TGF- $\beta$ 1, la cual fue disminuida en presencia del inhibidor SB-431542. La figura 5B muestra la cuantificación de los niveles del receptor AT-2 en la cual se observa que el aumento de 2 veces en los niveles de AT-2 inducidos por TGF- $\beta$ 1 disminuye a los niveles basales en presencia del inhibidor de la actividad quinasa del receptor T $\beta$ RI.

Para verificar que SB-431542 y SB-525334 inhiben la actividad quinasa del receptor I de TGF- $\beta$ , se evaluó la fosforilación de la proteína Smad-2 en respuesta a TGF- $\beta$ 1 dado que es la primera molécula intracelular junto con Smad-3 en ser fosforilada e interactuar con el receptor T $\beta$ RI. De esta manera células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se incubaron con diferentes concentraciones de TGF- $\beta$ 1 durante 30 minutos, en ausencia o presencia del inhibidor SB-431542 (10  $\mu$ M). En la figura 5C, se muestra la inmunodetección de fosfo-Smad-2 en células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> y se observa que con todas las concentraciones de TGF- $\beta$ 1 utilizadas se produce la fosforilación de Smad-2. Sin embargo, el inhibidor de la actividad quinasa de T $\beta$ RI bloqueó la fosforilación de Smad-2 dependiente de TGF- $\beta$ 1. Para probar el inhibidor SB-525334 (figura 5D), los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se incubaron con 1 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 y con SB-525334 (10  $\mu$ M), la fosforilación de Smad-2 en respuesta a TGF- $\beta$ 1 fue inhibida cuando SB-525334 se utilizó.

En conclusión, la inducción de los niveles proteicos de AT-2 en respuesta a TGF- $\beta$ 1 es dependiente de la actividad serina-treonina quinasa del receptor T $\beta$ RI, ya que la utilización de inhibidores de la actividad quinasa de T $\beta$ RI provocó que los niveles proteicos de AT-2 cayeran hasta los niveles basales.



**Figura 5. Aumento de los niveles del receptor AT-2 inducidos por TGF-β.** A) Las células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se privaron de suero por 18 h, y luego se incubaron con 10 ng/ml de TGF-β1 por 48 h. Los niveles de AT-2, fibronectina (FN) y tubulina se detectaron por ensayos de western blot. B) El receptor AT-2 se cuantificó por métodos densitométricos, el gráfico muestra inhibición de la inducción de AT-2 en respuesta a TGF-β1 cuando SB-431542 se utilizó (n=3; \*p = 0,05). C) Mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se crecieron en ausencia de suero durante 2 h y se incubaron con diferentes concentraciones de TGF-β1 en presencia o ausencia del inhibidor SB-431542. Por ensayos de western blot se analizaron los niveles de fosfo-Smad2 y GAPDH. GAPDH se usó como control de carga. D) Mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se incubaron con 1 ng/ml de TGF-β1 en presencia o ausencia de SB-525334. Por análisis de western blot se determinaron los niveles de fosfo-Smad2 y GAPDH. GAPDH se usó como control de carga.

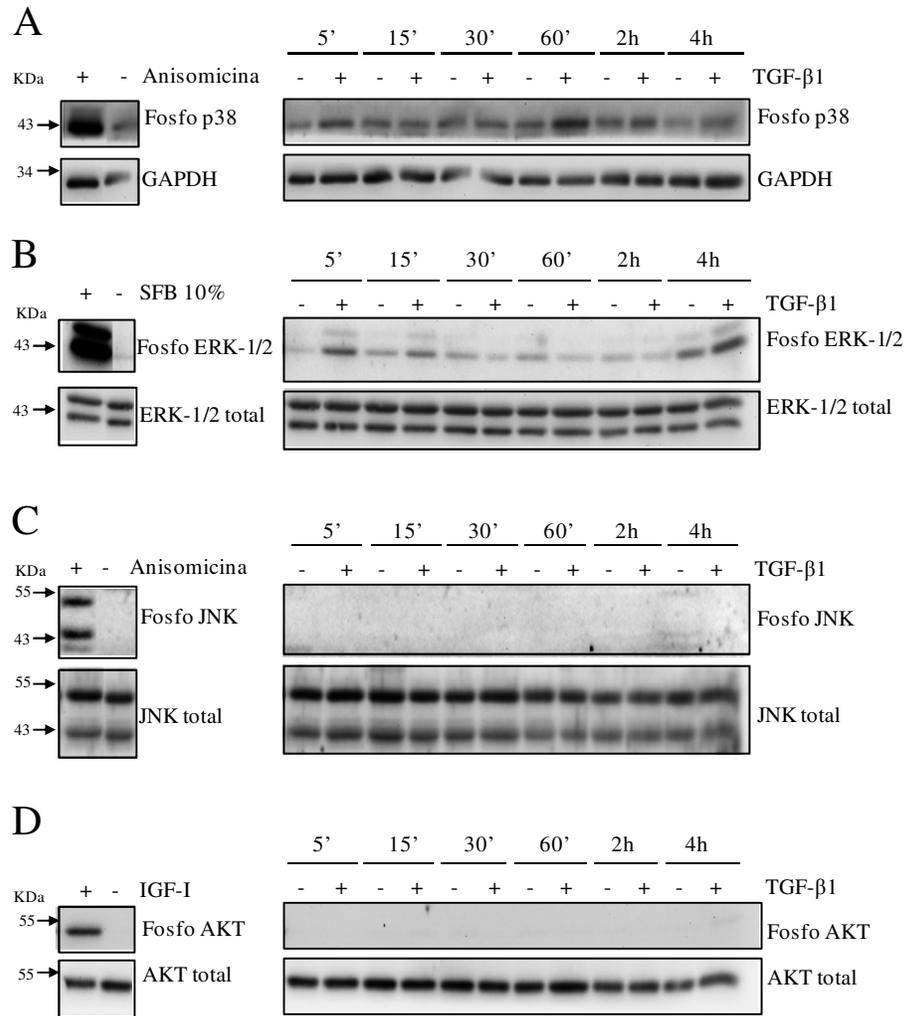
2.2. Establecer la participación de vías de señalización dependientes de TGF- $\beta$  en la regulación de los niveles de AT-2 mediados por TGF- $\beta$ .

Para determinar cuál(es) vía(s) Smad independientes es/son activadas por TGF- $\beta$ 1 en células musculares esqueléticas mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se incubaron con 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 durante distintos tiempos y se evaluaron los niveles proteicos de las proteínas fosforiladas p38, ERK-1/2, JNK y AKT y por ensayos de western blot. La figura 6A muestra la fosforilación de p38 en respuesta a TGF- $\beta$ 1, ésta ocurre a los 5 minutos y a la hora de incubación con el factor de crecimiento. Como control positivo tanto para la activación de la vía p38 como para la vía JNK (figura 6C), los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se incubaron con 25  $\mu$ g/ml de anisomicina durante 30 y 15 minutos, respectivamente (Sampieri y cols., 2008). La figura 6B muestra la fosforilación de ERK-1/2 durante la incubación con TGF- $\beta$ 1 a los 5 minutos, 15 minutos y 4 horas, y el control positivo de la activación de la vía fue incubar las células con SFB 10% durante 5 minutos (Burguess y cols., 2008). En el caso de fosfo JNK (figura 6C), éste no fue detectado a ninguno de los tiempos de incubación con TGF- $\beta$ 1. La figura 6D muestra que TGF- $\beta$ 1 en células musculares esqueléticas C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> no activa la vía de AKT, como control positivo de la activación de la vía en este tipo celular se usó IGF-I 10  $\mu$ M por 5 minutos (Wu y cols., 2006).

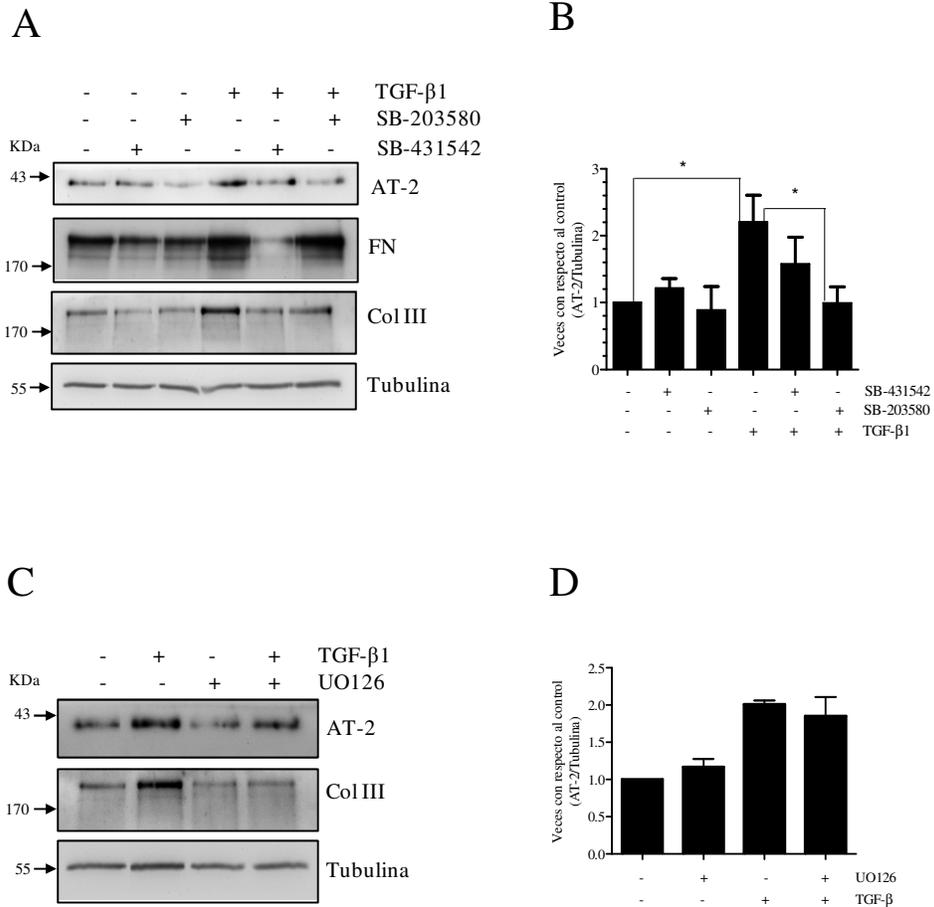
Una vez establecido que las vías activadas por TGF- $\beta$ 1 en los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> son las vías MAPK p38 y ERK-1/2, se evaluó si estas vías están participando del efecto regulador inducido por TGF- $\beta$ 1 en los niveles proteicos de AT-2. Para este fin se utilizaron los inhibidores farmacológicos específicos para cada una de estas vías: UO126 (MAPK ERK-1/2), que inhibe de forma específica las quinasas MEK-1 y MEK-2 bloqueando así la fosforilación y activación de ERK (Favata y cols., 1998), y SB-203580 (MAPK p38), que es un inhibidor de la fosforilación de p38. Las células se incubaron con TGF- $\beta$ 1 durante 48 horas en ausencia o presencia de los inhibidores y se hicieron ensayos de western blot. Los resultados de la figura 7A muestran que la incubación con el inhibidor de la vía MAPK p38 (SB-203580) provoca una notable disminución en la inducción de AT-2. Colágeno III (Col III) y FN se usaron como controles positivos de la respuesta fibrótica de las células en respuesta a TGF- $\beta$ 1. En la figura 7B se presenta la cuantificación por métodos densitométricos del receptor AT-2, se puede apreciar que los niveles de AT-2 vuelven a los niveles basales cuando se utilizó el inhibidor. En la figura 7C, se muestra el ensayo de western blot para las células incubadas con el inhibidor UO126. La figura 7D muestra la cuantificación de los niveles de AT-2 de dos experimentos independientes

de células incubadas con UO126, los resultados muestran que no existen cambios en los niveles proteicos del receptor AT-2 cuando el inhibidor fue utilizado.

Los resultados concluyen que dos vías Smad- independientes son activadas por TGF- $\beta$ 1 en mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>: las vías MAPK p38 y ERK-1/2, y no las vías JNK y AKT. De las vías no canónicas activadas por TGF- $\beta$ 1, sólo la vía MAPK p38 está mediando el aumento en los niveles proteicos del receptor AT-2 en respuesta a TGF- $\beta$ 1, ya que el uso del inhibidor farmacológico específico para esta vía trae como consecuencia la disminución por debajo de los niveles basales del receptor AT-2.



**Figura 6. TGF-β1 activa las vías MAPK p38 y ERK-1/2 en células musculares esqueléticas.** Los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se incubaron con TGF-β1 10 ng/ml por los tiempos indicados en la figura. Las figuras 7A-B-C y D muestran la detección de las proteínas fosforiladas de las vías p38, ERK-1/2, AKT y JNK, respectivamente. Como control positivo de la activación de cada una de las vías en los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se utilizó: en la figura 7A anisomicina 25 μg/ml durante 15 min, en la figura 7B se utilizó SFB 10% por 5 min, en la figura 7C anisomicina 25 μg/ml durante 30 min, en la figura 7D IGF-I 10 μM por 5 min.



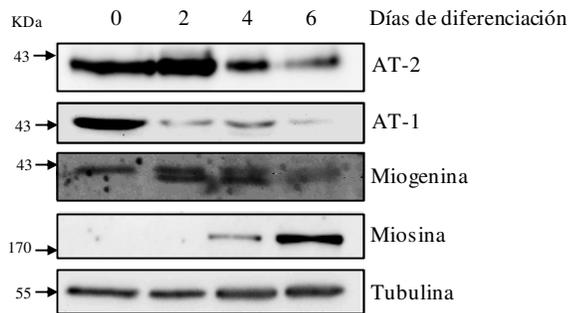
**Figura 7. El aumento de los niveles del receptor AT-2 inducidos por TGF- $\beta$ 1 requiere de la actividad de la p38 MAPK.** A) Los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se preincubaron con 10  $\mu$ M de SB-431542 por 30 min, para luego incubarse con 5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 durante 48 h, las células se lisaron. Se hicieron ensayos de western blot para analizar los niveles de AT-2, fibronectina (FN), colágeno III (Col III) y tubulina. Tubulina se usó como control de carga. B) El gráfico muestra la cuantificación de los niveles de AT-2 normalizado con respecto al control (sin TGF- $\beta$ 1). (n=3; \* $p$  < 0,05). C) Los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se incubaron con TGF- $\beta$ 1 durante 48 h en ausencia o presencia de UO126 10 $\mu$ M. Se detectaron los niveles de AT-2, colágeno III (Col III) y tubulina mediante ensayos de western blot. Tubulina se utilizó como control de carga. D) El gráfico muestra la cuantificación de los niveles del receptor AT-2 obtenidos mediante análisis densitométrico normalizado con respecto al control (sin TGF- $\beta$ 1) (n=2).

### **3. Determinar los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 para Angiotensina II durante la diferenciación de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> a miotubos.**

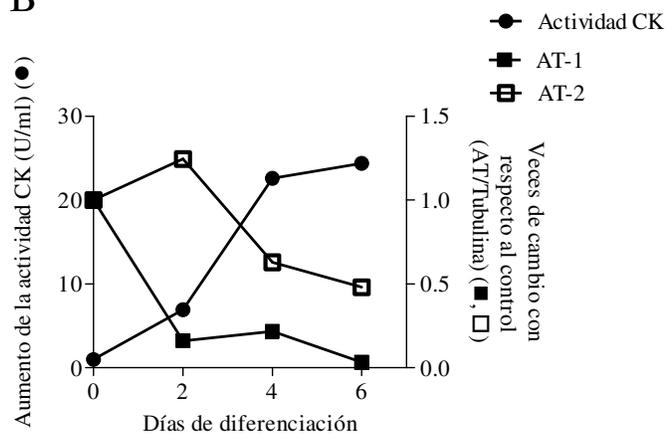
Los mioblastos se caracterizan por diferenciarse y formar miotubos multinucleados que expresan marcadores moleculares del proceso de diferenciación muscular esquelética tales como el factor de transcripción miogenina, la cadena pesada de la miosina y aumento de la actividad de la enzima creatina quinasa (Raws y Olson, 1997; Riquelme y cols., 2001). Otro aspecto importante en la diferenciación de las células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> es la baja activación de la vía de TGF- $\beta$ , a pesar de que los niveles de los receptores I y II para TGF- $\beta$  aumentan; la disminución en la unión de TGF- $\beta$  a sus receptores transductores se debe a la modulación de la biodisponibilidad de TGF- $\beta$  ejercido por Decorina en la matriz extracelular además de la actividad eléctrica (Droguett y cols., 2006; Ugarte y Brandan, 2006; Droguett y cols., 2010). Por este último antecedente resulta bastante interesante analizar los niveles de los receptores para Ang II en células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> durante la diferenciación. Mediante western blot en extractos proteicos obtenidos de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> inducidos a diferenciar durante 0, 2, 4 y 6 días se evaluaron los niveles de AT-1 y AT-2. La Figura 8A muestra que mioblastos sin diferenciar (día 0) presentan inmunoreactividad similar entre los receptores AT-1 y AT-2 para Ang II. La misma figura muestra que los niveles de ambos receptores disminuyen fuertemente durante el transcurso de la diferenciación muscular esquelética. Los niveles del receptor AT-1 disminuyeron en un 80% a partir del día 2 del proceso miogénico para luego ser casi indetectables, mientras que los niveles proteicos de AT-2 disminuyeron aproximadamente en 50% a partir del día 4 para luego mantenerse en esos niveles hasta el día 6 de diferenciación. En la Figura 8B se muestra la cuantificación y cinética diferencial de la disminución de los niveles de los receptores AT-1 y AT-2 durante el proceso miogénico, los cuales se contraponen al aumento de la actividad de la enzima creatina quinasa, un marcador de la diferenciación de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. En la Fig 8A se muestra la inducción temprana y transitoria de los niveles del factor de transcripción miogenina y a partir del día 4 de diferenciación la inducción de los niveles de miosina. Estos resultados indican que los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se diferenciaron exitosamente.

Estos resultados indican que en el proceso de diferenciación, en el cual la vía de TGF- $\beta$  está menos activa, existe una importante disminución en los niveles proteicos de los receptores para Ang II: AT-1 y AT-2.

A



B



**Figura 8. Los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 disminuyen durante la diferenciación de células musculares esqueléticas.** Los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se indujeron a diferenciar durante 0, 2, 4 y 6 días y se obtuvieron los extractos proteicos. A) Niveles proteicos de AT-1 y AT-2 fueron detectados por análisis de western blot. Los niveles proteicos de miogenina y miosina se detectaron como marcadores tempranos y tardíos de diferenciación, respectivamente. Los niveles de tubulina se muestran como control de carga. B) El gráfico muestra la cuantificación de los niveles proteicos de AT-1 y AT-2 durante la diferenciación. Como marcador tardío de la miogénesis se muestra la actividad creatina quinasa.

## VI. DISCUSIÓN.

Ang II juega un rol clave en la regulación de la homeostasis cardiovascular regulando el volumen sanguíneo y la resistencia vascular, aunque el tejido blanco de Ang II no incluye sólo el corazón, sino que también glándulas adrenales, riñón, cerebro, glándula pituitaria, músculo vascular liso y sistema nervioso simpático (De Gasparo y cols., 2000).

Ang II tiene un efecto fibrótico que está bien documentado en el corazón, pulmón, hígado y riñón, que estaría mediado por el receptor AT-1, la evidencia además indica que existe un aumento de este tipo de receptor en estos tejidos fibróticos (Bullock y cols., 2001, Jonsson y cols., 2001).

En el aumento en los niveles de expresión de AT-1 se encuentran involucrados glucocorticoides, insulina, hormona del crecimiento y estrógenos (De Gasparo y cols., 2000), en tanto la expresión de AT-2 es dependiente de factores de crecimiento o estados del crecimiento celular, por ejemplo en las células R3T3, las cuales expresan el receptor AT-2 y no el receptor AT-1, la expresión del ARNm de AT-2 ocurre sólo cuando el crecimiento celular se encuentra detenido en el estado confluyente (De Gasparo y cols., 2000). Existe evidencia que los niveles de ambos receptores pueden ser modulados por TGF- $\beta$ 1 (Li y cols., 1999; Martin y cols., 2007).

Esta memoria tuvo como principal objetivo estudiar el efecto de TGF- $\beta$ 1 sobre los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 para Ang II en células musculares esqueléticas y en músculo esquelético. Los resultados obtenidos muestran que los niveles proteicos del receptor AT-2 aumentan en respuesta a TGF- $\beta$ 1 *in vitro* e *in vivo* mientras los niveles del receptor AT-1 no cambian en respuesta a TGF- $\beta$ 1. El mecanismo por el cual TGF- $\beta$ 1 aumenta los niveles de AT-2 involucra la participación de la actividad quinasa del receptor I de TGF- $\beta$  y la activación de la vía MAPK p38. Interesantemente, los niveles de AT-2 y AT-1 disminuyen durante la diferenciación muscular esquelética, proceso en el cual se ha demostrado previamente que las rutas de señalización activadas por TGF- $\beta$ 1 están disminuidas.

### **1. Aumento en los niveles proteicos del receptor AT-2 en respuesta a TGF- $\beta$ 1.**

Se ha descrito que los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> expresan algunos miembros de RAS, tales como angiotensinógeno, ACE-1, los receptores AT-1 y AT-2 (Sun y cols., 2009; Johnston y cols., 2010), sin embargo, no se ha estudiado el efecto de factores involucrados en eventos fibróticos sobre la expresión y niveles proteicos de los componentes de RAS en músculo esquelético. En

esta memoria se estudió el efecto de un potente factor profibrótico como TGF- $\beta$ 1 sobre los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 en mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> y en músculo esquelético.

Si bien existen datos que indican el efecto modulador de TGF- $\beta$ 1 sobre los niveles proteicos y de ARNm del receptor AT-1 en otros tipos celulares, en nuestro modelo celular, mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, no ocurrió una variación de los niveles proteicos de AT-1 cuando se utilizaron diferentes concentraciones y tiempos de incubación con TGF- $\beta$ 1. Nuestros resultados indican que los niveles proteicos del receptor AT-2 aumentan más de 2 veces en respuesta a TGF- $\beta$ 1. Esta evidencia concuerda con los datos publicados en fibroblastos pulmonares de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Bullock y cols., 2001) y en la isquemia renal (Matavelli y cols., 2011), ambas patologías asociadas a altos niveles de expresión de TGF- $\beta$ 1, en las cuales se observó un aumento de 5 veces en la expresión del receptor AT-2. Dado que en nuestro laboratorio se ha demostrado previamente que los fibroblastos obtenidos de músculo esquelético contribuyen y responden a estímulos fibróticos, se podría especular que fibroblastos musculares podrían presentar un aumento de los niveles proteicos de AT-2, ya que son capaces de responder a TGF- $\beta$ 1. Estudios posteriores evaluando el efecto de TGF- $\beta$ 1 sobre los niveles de AT-1 y AT-2 en fibroblastos deberán realizarse.

El receptor AT-2 ha sido asociado principalmente con efectos antifibróticos, por lo que podría tener un papel importante en el proceso de recuperación de los tejidos. De esta manera, los resultados mostrados en esta memoria podrían establecer que el aumento de los niveles de AT-2 en respuesta al factor profibrótico TGF- $\beta$ 1 representaría un mecanismo de protección del músculo esquelético frente al proceso fibrótico sufrido frente a daño crónico. Resultados similares se han descrito en el tejido cardíaco, en situaciones tales como la insuficiencia cardíaca, post-infarto al miocardio y en el daño vascular (De Gasparo y Siragy, 1999) y en daño renal (Ruiz-Ortega y cols., 2003; Matavelli y cols., 2011) procesos en los cuales existe un aumento en la expresión tanto transcripcional como proteica del receptor AT-2.

Para evaluar el efecto de TGF- $\beta$ 1 sobre los niveles de AT-1 y AT-2 *in vivo* se usaron dos modelos de fibrosis: la inyección de TGF- $\beta$ 1 a un músculo esquelético previamente dañado, y el modelo murino de la DMD, el ratón *mdx*, cuyos músculos esqueléticos presentan elevados niveles de TGF- $\beta$ 1 (Bernasconi y cols., 1995). En el modelo de inyección de TGF- $\beta$ 1 a un músculo previamente dañado con BaCl<sub>2</sub> se observa un aumento en los niveles proteicos de AT-2, mientras que la inducción de daño por sí solo no produjo un aumento de los niveles de AT-2. Esto podría explicarse porque el daño y la fibrosis que se produce con BaCl<sub>2</sub> no es suficiente

para aumentar los niveles de AT-2, y al inyectar TGF- $\beta$ 1 aumenta el de otros moduladores o el efecto fibrótico, tal como se observa al evaluar los niveles proteicos aumentados de fibronectina. Así, esta evidencia concuerda con otros modelos fibróticos revisados en la literatura (Tsutsumi y cols., 1998; Bullock y cols., 2001; Konigshoff y cols., 2007; Matavelli y cols., 2011) donde los niveles proteicos de AT-2 aumentan en fibrosis asociada a aumento en los niveles de TGF- $\beta$ 1 probablemente como un modo de contrarrestar el daño que están sufriendo los tejidos. En los ratones *mdx* se determinó que existen elevados niveles proteicos de AT-2 en diversos músculos esqueléticos analizados comparados con los músculos obtenidos de los ratones silvestres. Este aumento en los niveles de AT-2 pueden explicarse por los niveles de TGF- $\beta$ 1 aumentados en los músculos esqueléticos distróficos del ratón *mdx*.

Los resultados de esta memoria muestran que los niveles del receptor AT-1 no se ven alterados en respuesta a TGF- $\beta$ 1 tanto en los estudios realizados *in vitro* e *in vivo*. Se ha observado que en diversos modelos fibróticos, los niveles de AT-1 están aumentados. Una explicación por la cual no existan variaciones en los niveles de AT-1 en respuesta a TGF- $\beta$ 1 en los experimentos expuestos en esta memoria, es el posible papel modulador del receptor AT-2 sobre la expresión y niveles proteicos del receptor AT-1. De esta manera, el aumento en los niveles proteicos del receptor AT-2 podría estar relacionado en la modulación de la síntesis proteica y/o degradación de AT-1 impidiendo así el incremento en los niveles proteicos de AT-1. Antecedentes sobre la participación del receptor AT-2 en la regulación de los niveles proteicos de AT-1 está descrito por Matavelli y cols., 2011, quien a través del uso de un agonista específico para AT-2, determinó que este receptor regulaba los niveles proteicos de AT-1. También se ha descrito en la literatura, que la activación de la señalización del receptor AT-2, puede regular los niveles de AT-1 por un mecanismo independiente de ligando y con la participación de la vía bradicinina/óxido nítrico (NO) (Jin y cols., 2002). Estudios posteriores para analizar la participación de AT-2 y su señalización en la regulación de los niveles de AT-1 deberán ser realizados.

Los análisis realizados en este estudio acerca del aumento de los niveles proteicos del receptor AT-2, así como los niveles inalterados del receptor AT-1, ambos en respuesta a TGF- $\beta$ , no muestran si existen cambios en la localización de dichos receptores. Para poder definir bien el mecanismo por el cual los niveles de AT-1 se mantienen inalterados y los de AT-2 aumentan en respuesta a TGF- $\beta$ 1 se hace necesario el estudio de los niveles de los receptores para Ang II en la superficie celular con el fin de dilucidar si varían los niveles de ambos receptores, ya que los

extractos proteicos obtenidos en los experimentos de esta memoria representan el total de proteínas y no permite determinar la ubicación celular de éstas. Podría darse, por ejemplo, que el aumento de AT-2 no se refleje en el número de este receptor en la superficie celular, o que los niveles inalterados de AT-1 no signifique que no pueda existir un aumento de este receptor en la superficie celular, se hacen necesarios entonces estudios de funcionalidad de los receptores para Ang II. Dentro de los experimentos que se podrían ejecutar para dilucidar estos puntos, se encuentran ensayos de unión de radioligando o coimmunoprecipitación de proteínas previamente marcadas con biotina.

Otro punto importante que queda por analizar es si la regulación de AT-2 por TGF- $\beta$ 1 involucra mecanismos de regulación a nivel transcripcional y/o traduccional, para lo cual se pueden evaluar los niveles de transcrito de AT-2 a través de northern blot o RT-PCR cuantitativo.

## **2. Mecanismos involucrados en la modulación de los niveles proteicos de AT-2 por TGF- $\beta$ 1.**

La utilización de un inhibidor específico de la actividad quinasa de T $\beta$ RI mostró una inhibición en el aumento de los niveles de AT-2 en respuesta a TGF- $\beta$ 1. A pesar de los requerimientos de la actividad quinasa del receptor tipo I de TGF- $\beta$ , esta modulación podría ser Smad dependiente y/o Smad independiente.

En esta memoria sólo se analizó el papel de las vías Smad independientes activadas por TGF- $\beta$ 1 en los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> y su relación con el aumento en los niveles proteicos de AT-2. Para evaluar las vías Smad independientes se utilizaron inhibidores farmacológicos específicos para las vías AKT, JNK, ERK-1/2 y p38, y se observó que sólo las dos últimas vías eran activadas por TGF- $\beta$ 1 en mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, y que de éstas, la vía MAPK p38, media el aumento de los niveles de los receptores AT-2 inducidos por TGF- $\beta$ 1.

La activación de la vía MAPK p38 en el aumento de los niveles proteicos de AT-2 inducidos por TGF- $\beta$ 1 ya había sido descrita previamente. Los datos obtenidos de un experimento en el cual se analizó el bloqueo del receptor AT-2 después de isquemia aguda en corazones de ratas, donde existe un aumento en los niveles de TGF- $\beta$ 1 (Chen y cols., 2002), el bloqueo de AT-2 traía consigo aumento en los niveles proteicos de AT-2 mediado por la vía p38 (Xu y cols., 2002). Este antecedente concuerda con los resultados obtenidos.

Es de real importancia establecer la existencia de sitios de unión en la zona promotora de AT-2 para factores transcripcionales activados por la vía MAPK p38. La activación de la vía p38 por TGF- $\beta$ 1 trae consigo la activación del factor transcripcional río debajo de la vía: ATF-2 (revisado por Derynck y Zhang, 2003; Itoh y cols., 2000). El estudio de la zona promotora de AT-2 arrojó la existencia de un sitio de unión para ATF-2, lo cual podría estar ligado con el aumento en los niveles proteicos del receptor AT-2 (Xu y cols., 2002).

No fue posible evaluar si la actividad Smad dependiente estaba involucrada en la regulación de AT-2 por TGF- $\beta$ 1. Con el fin de inhibir por completo la vía Smad dependiente podría utilizarse un siRNA para Smad2/3 (Droguett y cols., 2010), y luego determinar los niveles proteicos del receptor AT-2 en respuesta a TGF- $\beta$ 1. Sin bien es cierto que en la secuencia promotora de AT-2 no se encontraron elementos de unión a Smad (SBE) no se puede descartar que probablemente la vía Smad dependiente juega un rol en la modulación de los niveles proteicos de AT-2, ya que la secuencia de unión a Smads en el DNA puede encontrarse río arriba de la secuencia promotora y que por enrollamiento de la cromatina esté en contacto en algún sitio cercano al lugar de inicio de la transcripción. Esto es importante ya que, ATF-2 está descrito que interactúa con Smads unidas a SBE y que finalmente este complejo unido a otros coactivadores son suficientes para el inicio de la transcripción (Derynck y Zhang. 2003).

### **3. Disminución de los receptores AT-1 y AT-2 durante la diferenciación.**

Varios grupos de investigación han establecido que TGF- $\beta$  es un factor de crecimiento que inhibe la diferenciación muscular esquelética, así se ha establecido que TGF- $\beta$  inhibe la diferenciación en cultivos primarios de mioblastos de rata, pollo y ratón (Florini y cols., 1986, Massagué 1986; Riquelme y cols., 2001). Dado que la diferenciación *in vivo* ocurre en presencia de TGF- $\beta$  y que este factor de crecimiento la inhibe, deben existir mecanismos que disminuyan su actividad biológica, tales como la unión de proteoglicanos a TGF- $\beta$ , los cuales regulan la biodisponibilidad de TGF- $\beta$  durante la diferenciación muscular (Droguett y cols., 2006; Droguett 2010). A nivel intracelular se ha observado que durante el proceso de diferenciación muscular esquelética la expresión de las proteínas Smad, encargadas de la transducción de señales a través de la vía canónica de TGF- $\beta$ , disminuye (Droguett y cols., 2010). Dado que TGF- $\beta$ 1 regula los niveles del receptor AT-2, resultó interesante evaluar los niveles proteicos de los receptores para Ang II durante la diferenciación de los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. Los resultados indicaron que ambos

receptores disminuyeron sus niveles proteicos a lo largo de la diferenciación. La disminución en los niveles de AT-1 puede explicarse porque en la diferenciación la actividad proliferativa de la célula se encuentra limitada sólo a las células de reserva, podría plantearse que la actividad proliferativa se ve disminuida, por lo que se hace necesario la regulación de proteínas que conlleven a la proliferación como lo es el receptor AT-1, el cual se hace prácticamente indetectable al sexto día de diferenciación. La disminución de los niveles de AT-2 durante la diferenciación podría explicarse por la disminución en la actividad de la vía de señalización activada por TGF- $\beta$ 1, y que esta disminución llevase a la baja expresión proteica de AT-2 a lo largo de la diferenciación. Este hecho estaría en estrecha concordancia con lo que se observa en los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> incubados con TGF- $\beta$ 1, donde una mayor actividad de la vía TGF- $\beta$ 1 aumenta los niveles de expresión proteica de AT-2, y la disminución en la señalización de la vía de TGF- $\beta$ 1 disminuye los niveles proteicos de AT-2.

## **VII. PROYECCIONES**

Es necesario hacer más estudios que nos ayuden a dilucidar en forma concreta los mecanismos involucrados en la modulación de los niveles de expresión del receptor AT-2, ya que nos podrían conducir a un tratamiento efectivo en la atenuación de la fibrosis muscular por medio de la activación del receptor AT-2, ya sea usando bloqueadores del receptor AT-1 y así Ang II pueda unirse solamente a receptores AT-2, como el uso últimamente de un agonista para AT-2, llamado C21, que es un compuesto no peptídico, oralmente activo, con alta especificidad y selectividad por AT-2 (Wan y cols., 2004), que ha demostrado tener efectos antiinflamatorios y antifibróticos (Rompe y cols., 2010; Gelosa y cols., 2009) y así poder mejorar la función muscular de pacientes con DMD.

## VIII. CONCLUSIONES

Los estudios conducidos durante esta memoria se realizaron bajo la hipótesis general de que los niveles proteicos de los receptores para Ang II AT-1 y AT-2 son regulados por TGF- $\beta$ 1 en mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> y en el músculo esquelético. Los objetivos generales propuestos fueron determinar el efecto de TGF- $\beta$ 1 sobre los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 para Ang II en células musculares esqueléticas y músculo esquelético, determinar el mecanismo de regulación mediado por TGF- $\beta$ 1 sobre los niveles de AT-2 en células musculares esqueléticas y evaluar los niveles proteicos de los receptores AT-1 y AT-2 durante la diferenciación de los mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.

Los siguientes son los hallazgos principales:

1. Los niveles proteicos del receptor AT-2 son aumentados en respuesta a TGF- $\beta$ 1 en mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> y en el músculo esquelético, sin embargo los niveles proteicos del receptor AT-1 no presentan cambios.
2. En músculos esqueléticos distróficos de ratones *mdx*, los cuales expresan más TGF- $\beta$ 1 que los músculos esqueléticos normales, se presentan niveles proteicos del receptor AT-2 aumentados comparados con músculos esqueléticos de ratones normales.
3. El aumento de los niveles proteicos del receptor AT-2 inducido por TGF- $\beta$ 1 requiere de la actividad quinasa del T $\beta$ RI así como también de la actividad de MAPK p38 en mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.
4. Durante la diferenciación celular de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, proceso en el cual la señalización dependiente de TGF- $\beta$  se encuentra disminuida, los niveles de los receptores AT-1 y AT-2 disminuyen.

## IX. BIBLIOGRAFÍA.

- Bataller, R. y Brenner, D.A. (2005). Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.*, 115(2):209-218.
- Bernasconi, P., Torchiana, E., Confalonieri, P., Brugnani, R., Barresi, R., Mora, M., Cornelio, F., Morandi, L. y Mantegazza, R. (1995). Expression of transforming growth factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J. Clin. Invest.*, 96(2):1137-1144.
- Bhowmick, N. A., Zent, R., Ghiassi, M., McDonnell, M. y Moses, H. L. (2001). Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *J. Biol. Chem.*, 276(50):46707-14673.
- Blau, H. M., Pavlath, G. K., Hardeman, E. C., Chiu, C. P., Silberstein, L., Webster, S. G., Miller, S. C., y Webster, C. (1985). Plasticity of the differentiated state. *Science.*, 230(4727):758-66.
- Brandan, E., Fuentes, M. E. y Andrade, W. (1991). The proteoglycan decorin is synthesized and secreted by differentiated myotubes. *Eur. J. Cell Biol.*, 55(2):209-16.
- Brandan, E., Carey, D. J., Larraín, J., Melo, F. y Campos, A. (1996). Synthesis and processing of glypican during differentiation of skeletal muscle cells. *Eur. J. Cell Biol.*, 71(2):170-6.
- Bullock, G. R., Steyaert, I., Bilbe, G., Carey, R. M., Kips, J., De Paepe, B., Pauwels, R., Praet, M., Siragy, H. M. y De Gasparo, M. (2001). Distribution of type-1 and type-2 angiotensin receptors in the normal human lung and in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Histochem. Cell Biol.*, 115(2):117-124.
- Burgess, J. K., Lee, J. H., Ge, Q., Ramsay, E. E., Poniris, M. H., Parmentier, J., Roth, M., Johnson, P. R., Hunt, N. H., Black, J. L. y Ammit, A. J. (2008). Dual ERK and phosphatidylinositol 3-kinase pathways control airway smooth muscle proliferation: differences in asthma. *J. Cell Physiol.*, 216(3):673-679.
- Burson, J. M., Aguilera, G., Gross, K. W. y Sigmund, C. D. (1994). Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. *Am. J. Physiol.*, 267(2 Pt 1):E260-E267.
- Cabello-Verrugio, C., Córdova, G., Vial, C., Zúñiga, L. M. y Brandan, E. (2011). Connective tissue growth factor induction by lysophosphatidic acid requires transactivation of transforming growth factor type  $\beta$  receptors and the JNK pathway. *Cell Signal.*, 23(2):449-457.
- Casar, J. C., Cabello-Verrugio, C., Olguin, H., Aldunate, R., Inestrosa, N. C. y Brandan, E. (2004 a). Heparan sulfate proteoglycans are increased during skeletal muscle regeneration: requirement of syndecan-3 for successful fiber formation. *J. Cell Sci.*, 117(Pt 1):73-84.
- Casar, J. C., McKechnie, B. A., Fallon, J. R., Young, M. F. y Brandan, E. (2004 b). Transient up-regulation of biglycan during skeletal muscle regeneration: delayed fiber growth along with decorin increase in biglycan-deficient mice. *Dev. Biol.*, 268(2):358-71.

- Chen, H., Li, D., Saldeen, T. y Mehta, J. L. 2003. TGF-beta 1 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibition of upregulation of MMP-1. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 284(5):H1612-H1617.
- De Gasparo, M. y Siragy, H. M. 1999. The AT2 receptor: fact, fancy and fantasy. *Regul. Pept.*, 81(1-3):11-24.
- De Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W. y Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.*, 52(3):415-472.
- Derynck, R. y Feng, X. H. (1997). TGF-beta receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1333(2):F105-F150.
- Derynck, R. y Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425(6958):577-584.
- Droguett, R., Cabello-Verrugio, C., Riquelme, C. y Brandan, E. (2006). Extracellular proteoglycans modify TGF-beta bio-availability attenuating its signaling during skeletal muscle differentiation. *Matrix Biol.*, 25(6):332-341.
- Droguett, R., Cabello-Verrugio, C., Santander, C. y Brandan, E. (2010). TGF-beta receptors, in a Smad-independent manner, are required for terminal skeletal muscle differentiation. *Exp. Cell Res.*, 316(15):2487-24503.
- Engel, M. E, McDonnell, M. A, Law, B. K. y Moses, H. L. (1999). Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J. Biol. Chem.*, 274(52):37413-37420.
- Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R.L., Scherle, P. A. y Trzaskos, J. M. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.*, 273(29):18623-18632.
- Florini, J. R. , Roberts, A. B., Ewton, D. Z., Falen, S.L., Flanders, K. C y, Sporn, M. B. (1986). Transforming growth factor-beta. A very potent inhibitor of myoblast differentiation, identical to the differentiation inhibitor secreted by Buffalo rat liver cells. *J. Biol. Chem.*, 261(35):16509-16513.
- Gelosa, P., Pignieri, A., Fändriks, L., De Gasparo, M., Hallberg, A., Banfi, C., Castiglioni, L., Turolo, L., Guerrin, U., Tremoli, E. y Sironi, L. (2009). Stimulation of AT2 receptor exerts beneficial effects in stroke-prone rats: focus on renal damage. *J. Hypertens.*, 27(12):2444-2451.
- Guo, D. F., Uno, S. y Inagami, T. (1995). Steroid hormones upregulate rat angiotensin II type 1A receptor gene: role of glucocorticoid responsive elements in rat angiotensin II type 1A promoter. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 53(1-6):69-73.
- Hartsough, M. T. y Mulder, K. M. (1995). Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 270(13):7117-7124.

- Hein, L., Barsh, G. S., Pratt, R. E., Dzau, V. J. y Kobilka, B. K. (1995). Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature*, 377(6551):744-777.
- Hlaing, M., Shen, X., Dazin, P. y Bernstein, H. S. (2002). The hypertrophic response in C2C12 myoblasts recruits the G1 cell cycle machinery. *J. Biol. Chem.*, 277(26):23794-23799.
- Inman, G. J., Nicolás, F. J. y Hill, C. S. (2002). Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol. Cell*, 10(2):283-294.
- Ichiki, T., Kambayashi, Y. y Inagami, T. (1995). Multiple growth factors modulate mRNA expression of angiotensin II type-2 receptor in R3T3 cells. *Circ. Res.*, 77(6):1070-1076.
- Ichiki, T., Usui, M., Kato, M., Funakoshi, Y., Ito, K., Egashira, K. y Takeshita, A. (1998). Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. *Hypertension*, 31(1 Pt 2):342-348.
- Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M. J. y Ten Dijke, P. (2000). Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur. J. Biochem.*, 267(24):6954-6967.
- Itoh, S. y Ten Dijke, P. (2007). Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 19(2):176-184.
- Johnston, A. P., Baker, J., De Lisio, M. y Parise, G. (2010). Skeletal muscle myoblasts possess a stretch-responsive local angiotensin signalling system. *J. Renin Angiotensin. Aldosterone Syst.*, Oct 4. Aún no publicado.
- Jonsson, J. R., Clouston, A. D., Ando, Y., Kelemen, L. I., Horn, M. J., Adamson, M. D., Purdie, D. M. y Powell, E. E. (2001). Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology*, 121(1):148-155.
- Kaimori, A., Potter, J., Kaimori, J. Y., Wang, C., Mezey, E. y Koteish, A. (2007). Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J. Biol. Chem.*, 282(30):22089-22101.
- Kakar, S. S., Sellers, J. C., Devor, D. C., Musgrove, L. C., Neill, J. D. (1992). Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 183(3):1090-1096.
- Ketteler, M., Noble, N. A. y Border, W. A. (1995). Transforming growth factor-beta and angiotensin II: the missing link from glomerular hyperfiltration to glomerulosclerosis?. *Annu. Rev. Physiol.*, 57:279-295.
- Kim, S. y Iwao, H. (2000). Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol. Rev.*, 52(1):11-34.

- Kisseleva, T. y Brenner, D. A. (2008). Fibrogenesis of parenchymal organs. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 5(3):338-342.
- Königshoff, M., Wilhelm, A., Jahn, A., Sedding, D., Amarie, O. V., Eul, B., Seeger, W., Fink, L., Günther, A., Eickelberg, O. y Rose, F. (2007). The angiotensin II receptor 2 is expressed and mediates angiotensin II signaling in lung fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 37(6):640-650.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 15;227(5259):680-685.
- Larraín, J., Alvarez, J., Hassell, J. R. y Brandan, E. (1997). Expression of perlecan, a proteoglycan that binds myogenic inhibitory basic fibroblast growth factor, is down regulated during skeletal muscle differentiation. *Exp. Cell Res.*, 234(2):405-412.
- Leung, P. S., Suen, P. M., Ip, S. P., Yip, C. K., Chen, G. y Lai, P. B. (2003). Expression and localization of AT1 receptors in hepatic Kupffer cells: its potential role in regulating a fibrogenic response. *Regul. Pept.*, 116(1-3):61-9.
- Li, J. Y., Avallet, O., Berthelon, M. C., Langlois, D. y Saez, J. M. (1999). Transcriptional and translational regulation of angiotensin II type 2 receptor by angiotensin II and growth factors. *Endocrinology*, 140(11):4988-4994.
- Li, Y., Foster, W., Deasy, B. M., Chan, Y., Prisk, V., Tang, Y., Cummins, J. y Huard, J. (2004). Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am. J. Pathol.*, 164(3):1007-1019.
- Li, Z. B., Kollias, H. D. y Wagner, K. R. (2008). Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis. *J. Biol. Chem.*, 283(28):19371-19378.
- Martin, M. M., Buckenberger, J. A., Jiang, J., Malana, G. E., Knoell, D. L., Feldman, D. S. y Elton, T. S. (2007). TGF-beta1 stimulates human AT1 receptor expression in lung fibroblasts by cross talk between the Smad, p38 MAPK, JNK, and PI3K signaling pathways. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 293(3):L790-799.
- Massagué, J., Cheifetz, S., Endo, T. y Nadal-Ginard, B. (1986). Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 83(21):8206-8210.
- Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:753-791.
- Matavelli, L. C., Huang, J. y Siragy, H. M. (2011). Angiotensin AT<sub>2</sub> receptor stimulation inhibits early renal inflammation in renovascular hypertension. *Hypertension*, 57(2):308-313.
- Nickenig, G., Röling, J., Strehlow, K., Schnabel, P. y Böhm, M. (1998). Insulin induces upregulation of vascular AT1 receptor gene expression by posttranscriptional mechanisms. *Circulation*, 98(22):2453-2460.

- Ohkubo, N., Matsubara, H., Nozawa, Y., Mori, Y., Murasawa, S., Kijima, K., Maruyama, K., Masaki, H., Tsutumi, Y., Shibasaki, Y., Iwasaka, T. y Inada, M. (1997). Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation*, 96(11):3954-3962.
- Oliverio, M. I., Kim, H. S., Ito, M., Le, T., Audoly, L., Best, C. F., Hiller, S., Kluckman, K., Maeda, N., Smithies, O. y Coffman, T. M. (1998). Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 95(26):15496-154501.
- Ozono, R., Matsumoto, T., Shingu, T., Oshima, T., Teranishi, Y., Kambe, M., Matsuura, H., Kajiyama, G., Wang, Z. Q., Moore, A. F. y Carey, R. M. (2000). Expression and localization of angiotensin subtype receptor proteins in the hypertensive rat heart. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 278(3):R781-R789.
- Pohlers, D., Brenmoehl, J., Löffler, I., Müller, C. K., Leipner, C., Schultze-Mosgau, S., Stallmach, A., Kinne, R. W. y Wolf, G. (2009). TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim. Biophys. Acta*, 1792(8):746-56.
- Qi, J. S., Minor, L. K., Smith, C., Hu, B., Yang, J., Andrade-Gordon, P. y Damiano, B. (2005). Characterization of functional urotensin II receptors in human skeletal muscle myoblasts: comparison with angiotensin II receptors. *Peptides*, 26: 683–690.
- Rawls, A. y Olson, E. (1997). Myo D meets its maker. *Cell*, 89: 5-8.
- Renzoni, E. A., Abraham, D. J., Howat, S., Shi-Wen, X., Sestini, P., Bou-Gharios, G., Wells, A. U., Veeraraghavan, S., Nicholson, A. G., Denton, C. P., Leask, A., Pearson, J. D., Black, C. M., Welsh, K. I. y du Bois, R. M. (2004). Gene expression profiling reveals novel TGFbeta targets in adult lung fibroblasts. *Respir. Res.*, 5:24.
- Riquelme, C., Larrain, J., Schonherr, E., Henriquez, J. P., Kresse, H. y Brandan, E. (2001). Antisense inhibition of decorin expression in myoblasts decreases cell responsiveness to transforming growth factor beta and accelerates skeletal muscle differentiation. *J. Biol. Chem.*, 276(5):3589-3596.
- Rompe, F., Artuc, M., Hallberg, A., Alterman, M., Ströder, K., Thöne-Reineke, C., Reichenbach, A., Schacherl, J., Dahlöf, B., Bader, M., Alenina, N., Schwaninger, M., Zuberbier, T., Funke-Kaiser, H., Schmidt, C., Schunck, W. H., Unger, T. y Steckelings, U. M. (2010). Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension*, 55(4):924-931.
- Ruiz-Ortega, M., Esteban, V., Suzuki, Y., Ruperez, M., Mezzano, S., Ardiles, L., Justo, P., Ortiz, A. y Egido, J. (2003). Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage. *Kidney Int. Suppl.*, (86):S21-S26.

- Rupérez, M., Lorenzo, O., Blanco-Colio, L. M., Esteban, V., Egido, J. y Ruiz-Ortega, M. (2003). Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation*, 108(12):1499-1505.
- Sampieri, C. L., Nuttall, R. K., Young, D. A., Goldspink, D., Clark, I. M. y Edwards, D. R. (2008). Activation of p38 and JNK MAPK pathways abrogates requirement for new protein synthesis for phorbol ester mediated induction of select MMP and TIMP genes. *Matrix Biol.*, 27(2):128-138.
- Schnaper, H. W., Hayashida, T., Hubchak, S. C. y Poncelet, A. C. (2003). TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 284(2):F243-F252.
- Seale, P., y Rudnicki, M. A. (2000). A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev. Biol.*, 218(2):115-124.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. y Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150(1):76-85.
- Sun, G., Haginoya, K., Dai, H., Chiba, Y., Uematsu, M., Hino-Fukuyo, N., Onuma, A., Iinuma, K. y Tsuchiya, S. (2009). Intramuscular renin-angiotensin system is activated in human muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.*, 280(1-2):40-48.
- Szasz, G., Gruber, W. y Bernt, E. (1976). Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions. *Clin. Chem.*, 22(5):650-6.
- Touyz, R. M. y Berry, C. (2002). Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 35(9):1001-1015.
- Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Ohkubo, N., Mori, Y., Nozawa, Y., Murasawa, S., Kijima, K., Maruyama, K., Masaki, H., Moriguchi, Y., Shibasaki, Y., Kamihata, H., Inada, M. y Iwasaka, T. (1998). Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ. Res.*, 83(10):1035-1046.
- Vial, C., Zúñiga, L. M., Cabello-Verrugio, C., Cañón, P., Fadic, R. y Brandan, E. (2008). Skeletal muscle cells express the profibrotic cytokine connective tissue growth factor (CTGF/CCN2), which induces their dedifferentiation. *J. Cell. Physiol.*, 215(2):410-421.
- Wan, Y., Wallinder, C., Plouffe, B., Beaudry, H., Mahalingam, A. K., Wu, X., Johansson, B., Holm, M., Botoros, M., Karlén, A., Pettersson, A., Nyberg, F., Fändriks, L., Gallo-Payet, N., Hallberg, A. y Alterman, M. (2004). Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT2 receptor agonist. *J. Med. Chem.*, 47(24):5995-6008.
- Whitman, M. (1998). Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes Dev.*, 12(16):2445-2462.

- Wu, D. C., Ré, D. B., Nagai, M., Ischiropoulos, H. y Przedborski, S. (2006). The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 103(32):12132-12137.
- Wynn, T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.*, 214(2):199-210.
- Xu, Y., Kumar, D., Dyck, J. R., Ford, W. R., Clanachan, A. S., Lopaschuk, G. D. y Jugdutt, B. I. (2002). AT(1) and AT(2) receptor expression and blockade after acute ischemia-reperfusion in isolated working rat hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 282(4):H1206-H1215.
- Yaffe, D. y Saxel, O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270(5639):725-7.
- Yang, F., Chung, A. C., Huang, X. R. y Lan, H. Y. (2009). Angiotensin II induces connective tissue growth factor and collagen I expression via transforming growth factor-beta-dependent and -independent Smad pathways: the role of Smad3. *Hypertension*, 54(4):877-884.
- Yu, L., Hébert, M. C. y Zhang, Y. E. (2002). TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J.*, 21(14):3749-3759.
- Zanotti, S., Gibertini, S. y Mora, M. (2010). Altered production of extra-cellular matrix components by muscle-derived Duchenne muscular dystrophy fibroblasts before and after TGF-beta1 treatment. *Cell Tissue Res.*, 339(2):397-410.
- Zhang, Y. E. (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.*, 19(1):128-139.
- Zhao, J., Shi, W., Wang, Y. L., Chen, H., Bringas, P. Jr., Datto, M. B., Frederick, J. P., Wang, X. F. y Warburton, D. (2002). Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 282(3):L585-L593.
- Zhou, L. y Lu, H. (2010). Targeting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 69(8):771-776.