

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



***“LA ACTIVACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LAS
VÍAS TRANSDUCCIONALES DEPENDIENTES DEL
RECEPTOR B1 DE CININAS REDUCEN LA EXPRESIÓN
DE COLÁGENO I EN MIOFIBROBLASTOS
CARDIACOS.”***

Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado de Doctora en Farmacología por:

MABEL ELIZABETH CATALÁN DÍAZ

Directores de Tesis

Dr. Guillermo Díaz Araya

Dra. María Victoria Velarde

SANTIAGO - CHILE
2014

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

Mabel Elizabeth Catalán Díaz

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día

Directores de Tesis:

Dr. Guillermo Díaz Araya

Dra. María Victoria Velarde

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Hernán Lara (Presidente)

Dr. Carlos Figueroa

Dr. Andrew Quest

Dr. Juan Carlos Prieto

Dr. Ramón Rodrigo

La presente tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Farmacoquímica, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, bajo la Dirección del Dr. Guillermo Díaz Araya y de la Dra. María Victoria Velarde.

Este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- Beca para la realización de Doctorado en Chile CONICYT (2008-2012)
- Beca de Apoyo a la realización de Tesis Doctoral CONICYT N° 24100079
- Proyecto FONDECYT 110044

Los resultados obtenidos durante la realización de la presente tesis, así como las metodologías desarrolladas, han sido publicados y presentados en Congresos y Publicaciones de la especialidad

Congresos

Catalán M, Boza, P, Olmedo I, Velarde MV, Díaz-Araya G. “Kinin B1 receptor activation through PKC-PLA2-COX2 and PGI2 secretion reduces collagen I expression in rat neonate cardiac myofibroblast”. XX reunión anual sección latinoamericana international society for heart research. Santiago, Chile, 2012.

Catalán M, Boza, P, Olmedo I, Velarde MV, Díaz-Araya G. “Kinin B1 receptor activation through PKC-PLA2-COX2 and PGI2 secretion reduces collagen I expression in rat neonate cardiac myofibroblast “IUBMB y FEBS. Sevilla, España, 2012.

Boza P., **Catalán M.**, Muñoz C., Díaz-Araya G. “TGF- β 1 modula la expresión del receptor B1 de cininas en fibroblastos cardiacos a través de la activación de las vías MAPK. XXXIII Congreso de la Sociedad de Farmacología de Chile, Olmué, Chile, 2011.

Catalán M., Boza P., Ayala P., Contreras A., Olmedo I., Vivar R., Humeres C., Velarde M.V., Díaz-Araya G. “Receptor B1 de cininas en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos: Regulación de la expresión de colágeno I” XXXIII Congreso de la Sociedad de Farmacología de Chile, Olmué, Chile, 2011.

Catalán M., Ávalos Y., Olmedo I., Aránguiz-Urroz P., Velarde M.V., Díaz-Araya G. “La activación de los receptores B1 y B2 de cininas en miofibroblastos cardiacos de ratas neonatas reduce la secreción de colágeno I”. XXXII Congreso de la Sociedad de Farmacología de Chile, Valdivia, Chile, 2010.

Publicación derivada de la tesis

“Differential regulation of collagen secretion by kinin receptors in cardiac fibroblast and myofibroblast.” **Catalán M**, Smolic C, Contreras A, Ayala P, Olmedo I, Copaja M, Boza P, Vivar R, Avalos Y, Lavandero S, Velarde V, Díaz-Araya G. Toxicology and Applied Pharmacology, 2012, 15: 261(3), 300-308.

Otras publicaciones

“EPAC expression and function in cardiac fibroblasts and myofibroblasts”. Olmedo, I., Munoz, C., Guzman, N., **Catalan, M.**, Vivar, R., Ayala, P., Humeres, C., Aranguiz, P., Garcia, L., Velarde, V., and Diaz-Araya, G., Toxicol Appl Pharmacol 272, 414-422.

“Cardiac fibroblast death by ischemia/reperfusion is partially inhibited by IGF-1 through both PI3K/Akt and MEK-ERK pathways.” Vivar R, Humeres C, Varela M, Ayala P, Guzmán N, Olmedo I, **Catalán M**, Boza P, Muñoz C, Díaz Araya G. Experimental and Molecular Pathology, 2012, 93(1), 1-7.

“Simvastatin disrupt cytoskeleton and decreases cardiac adhesión, migration and viability”. Copaja M, Venegas D, Aránguiz P, Canales J, Vivar R, Ávalos Y, García L, Chiong M, Olmedo I, **Catalán M**, Leyton L, Lavandero S, Díaz-Araya G. Toxicology, 2012, 29: 294(1), 42-49.

“Simvastatin induces apoptosis by a Rho-dependent mechanism in cultured cardiac fibroblasts and myofibroblasts”. Copaja M, Venegas D, Aránguiz P, Canales J, Vivar R, **Catalán M**, Olmedo I, Rodríguez AE, Chiong M, Leyton L, Lavandero S, Díaz-Araya G. Toxicology and Applied Pharmacology, 2012, 15: 255(1), 57-64.

Índice general

	Páginas
Índice de figuras	5
Índice de tablas	8
Abreviaturas	9
Resumen	13
Summary	15
1. Introducción	17
1.1. Enfermedades cardiovasculares	17
1.2. Remodelamiento cardiaco	17
1.3. Fibrosis cardiaca	18
1.4. Principales tipos celulares involucrados en el desarrollo de fibrosis cardiaca	20
1.4.1. Fibroblastos cardiacos	20
1.4.2. Miofibroblastos cardiacos	20
1.5. Fibroblastos y miofibroblastos cardiacos: Participación en la secreción de proteínas de la MEC en el desarrollo de fibrosis cardiaca	22
1.6. Sistema cinina-caliceína en el desarrollo de fibrosis cardiaca.	24
1.6.1. Sistema Cinina-caliceína.	24
1.6.2. Participación del sistema caliceína-cinina en el desarrollo de fibrosis.	25
1.6.3. Participación del sistema caliceína-cinina en el desarrollo de fibrosis cardiaca.	26
1.7. Señalización intracelular de los receptores de cininas	27
1.8. Receptores de cininas en miofibroblastos cardiacos	29
1.9. Efectos de las cininas sobre la secreción de proteínas de la MEC en miofibroblastos cardiacos	31
2. Hipótesis del trabajo	32
3. Objetivos específicos	32
4. Metodología	33
4.1. Reactivos	33

4.2. Modelo animal	34
4.2.1. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos ventriculares de ratas neonatas y diferenciación a miofibroblastos	34
4.3. Ensayo de desplazamiento y unión de radioligando	34
4.4. Determinación de movimientos de calcio intracelulares	35
4.5. Extracción de núcleos celulares	36
4.6. Preparación de extractos de proteínas totales	36
4.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida	37
4.8. Electrotransferencia	37
4.9. Western blot	37
4.10. Inmunofluorescencia	38
4.11. Cuantificación de los niveles de PGI ₂ y PGE ₂	39
4.12. Ensayos de viabilidad celular	39
4.13. Análisis estadísticos	40
5. Resultados	41
5.1. Relacionados al objetivo 1: Caracterizar farmacológicamente los receptores B1 y B2 de cininas en miofibroblastos cardíacos de ratas neonatas.	41
5.1.1. Presencia de receptor B1 y B2 de cininas en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos	41
5.1.2. Evaluación de la movilización intracelular de calcio mediada por activación del B1R y el B2R en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos.	48
5.2. Resultados relacionados al objetivo 2: Determinar las vías de señalización intracelular activadas por DAKD al interactuar con el B1R y su efecto en la expresión de colágeno I.	53
5.2.1. Determinación de los niveles de colágeno I en fibroblastos y miofibroblastos cardíacos.	53
5.2.2. Efecto de las cininas en los niveles de Col I en fibroblastos cardíacos	54
5.2.3. Efectos de las cininas en los niveles de Col I en miofibroblastos cardíacos	56

5.2.4. Vías de señalización activada por los receptores de cininas en miofibroblastos cardiacos	59
5.2.4.1. Participación de B1R en la disminución de Col I producida por cininas en miofibroblastos cardiacos	60
5.2.4.2. Participación de PLC en la disminución de Col I producida por cininas en miofibroblastos cardiacos	61
5.2.4.3. Participación de PKC en la disminución de Col I producida por cininas en miofibroblastos cardiacos	61
5.2.4.4. Participación de PLA2 en la disminución de los niveles de expresión de Col I inducida por cininas en miofibroblastos cardiacos	62
5.2.4.5. Participación de COX2 en la disminución de Col I producida por cininas en miofibroblastos cardiacos	64
5.2.4.6. Liberación de PGI2 tras la estimulación de B1R y B2R por sus respectivos agonistas en miofibroblastos cardiacos	67
5.2.4.7. Participación del receptor de prostaciclina en la disminución de los niveles de Col I producida por cininas en miofibroblastos cardiacos.	68
6. Discusión	70
6.1. Utilización de cultivo de fibroblastos de ratas neonatas	70
6.2. Presencia de receptores de cininas	71
6.3. Localización subcelular del receptor B1 de cininas	72
6.4. Funcionalidad de receptores de cininas en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos	75
6.5. Relocalización y funcionalidad de B1R en fibroblastos cardiacos	76
6.6. Efectos de las cininas en la expresión de colágeno I en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos	80
6.7. Participación de componentes de la vía clásica de activación de los receptores de cininas en la disminución de la expresión de colágeno I en miofibroblastos cardiacos	82
7. Conclusión	90
8. Anexos	91

8.1. Anexo 1: Controles de inmunofluorescencias de FC y MFC	91
8.2. Anexo 2: Controles de inmunofluorescencias de FC y MFC tras el tratamiento con DAKD	92
8.3. Anexo 3: Viabilidad celular de miofibroblastos cardiacos frente a la acción de inhibidores proteicos	93
9. Bibliografía	95

Índice de figuras

	Páginas
Figura 1. Esquema general de la progresión del daño cardiaco	19
Figura 2. Funciones celulares de fibroblastos cardiacos	23
Figura 3. Sistema calicreína-cininas	25
Figura 4. Vía de señalización de B1R y B2R descrita en células endoteliales	29
Figura 5. Presencia de B1R y B2R en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos	42
Figura 6. Esquema del tratamiento de FC con TGF- β 1	42
Figura 7. Efecto de TGF- β 1 en la inducción de B1R en MFC	43
Figura 8. Identificación de B1R en membranas plasmáticas de fibroblastos y miofibroblastos cardiacos	44
Figura 9. Curvas de desplazamiento de B1R en membranas plasmáticas de fibroblastos y miofibroblastos cardiacos	45
Figura 10. Inmunofluorescencia de B1R en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos	46
Figura 11. Fraccionamiento subcelular de fibroblastos y miofibroblastos cardiacos	47
Figura 12. Inmunofluorescencia de B1R en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos tras la estimulación con DAKD	48

Figura 13.	Señales de calcio intracelular en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos por acción de BK	50
Figura 14.	Señales de calcio en miofibroblastos cardiacos por acción de DAKD	51
Figura 15.	Señales de calcio en fibroblastos cardiacos por acción de DAKD	52
Figura 16.	Niveles de Col I en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos	53
Figura 17.	Efecto de cininas en niveles de Col I en fibroblastos cardiacos	55
Figura 18.	Niveles de Col I tras la estimulación con DAKD en fibroblastos cardiacos	56
Figura 19.	Efecto de cininas en niveles de Col I en miofibroblastos Cardiacos	57
Figura 20.	Esquema del protocolo de tratamiento de MFC para evaluar la vía de señalización involucrada en la reducción de los niveles de Col I	58
Figura 21.	Vía de señalización intracelular de B1R propuesta en la disminución de Col I en miofibroblastos cardiacos	59
Figura 22.	Participación de B1R en disminución de Col I en MFC	60
Figura 23.	Participación de PKC en la disminución de los niveles de expresión de Col I en MFC	62
Figura 24.	Participación de PLA2 en disminución de Col I en MFC	63

Figura 25.	Participación de COXs en disminución de Col I en MFC	64
Figura 26.	Participación de COX-2 en disminución de Col I en MFC	65
Figura 27.	Participación de COX-1 en disminución de Col I en MFC	66
Figura 28.	Liberación de PGI2 por acción de las cininas en MFC	67
Figura 29.	Participación de IPR en disminución de Col I en MFC	69
Anexo 1.	Controles inmunofluorescencia de B1R en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos	91
Anexo 2.	Controles inmunofluorescencia de B1R en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos tras tratamiento con DAKD	93
Anexo 3.	Viabilidad de miofibroblastos cardiacos frente a inhibidores	94

Índice de tablas

	Páginas
Tabla 1: Anticuerpos	30

Abreviaturas

[3H]-Antg B1R:	[3H][Leu-9]des-Arg10-[3,4-propil-3,4H(N)]Calidina
[Ca+2]i :	Calcio intracelular
[Ca+2]e :	Calcio extracelular
α -SMA :	α - actina del músculo liso
μ L :	Microlitro
μ M :	Micromolar
AA :	Ácido araquidónico
AAT1 :	Antagonistas de receptores AT1 de angiotensina II
AC :	Adenilato ciclasa
AMPc :	Adenosin monofostafo cíclico
Ang II :	Angiotensina II
AP-1 :	Proteína activadora 1
B1R :	Receptor B1 de cininas
B2R :	Receptor B2 de cininas
BK :	Bradicinina
Bmax :	Número de receptores
Col I :	Colágeno tipo I
COX :	Ciclooxigenasa
DABK :	des-Arg 9 BK

DAG	:	Diacilglicerol
DAKD	:	des-Arg10-Lys-BK
DMEM	:	Medio de mantención modificado Dulbecco
DMSO	:	Dimetil sulfóxido
ECL	:	Quimioluminiscencia aumentada
ECV	:	Enfermedades cardiovasculares
ECA	:	Enzima convertidora de angiotensina
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético
eNOS	:	Óxido nítrico sintasa endotelial
EPAC-1	:	Proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina
ERK	:	Proteína kinasa regulada extracelularmente
ET-1	:	Endotelina 1
FBS	:	Suero fetal de bovino
FC	:	Fibroblasto cardiaco
FCS	:	Suero fetal caprino
Gi	:	Proteína G tipo i
GMPc	:	Guanosin monofosfato cíclico
GPCR	:	Receptores acoplados a proteína G
Gq	:	Proteína G tipo q
ICAM-1	:	Molécula de adhesión intercelular
iECA	:	Inhibidor de enzima convertidora de angiotensina

IGF-1	:	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL-1 β	:	Interleucina 1 beta
IL-4	:	Interleucina 4
iNOS	:	Óxido nítrico sintasa inducible
IP3	:	Inositol trifosfato
IPR	:	Receptor de prostaciclina
JNK	:	Cinasa c-Jun N-terminal
KD	:	Calidina
Kd	:	Constante de afinidad
kDa	:	Kilo Dalton
LisBK	:	Lis-bradicinina
LPS	:	Lipopolisacárido
MAFP	:	Metil araquídonil fluorofosfonato
MAPK	:	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MCP-1	:	Proteína quimioatrayente de macrófagos
MEC	:	Matriz extracelular
MFC	:	Miofibroblasto cardiaco
mL	:	Mililitro
MPM	:	Metaloproteinasas de la matriz
NF-kB	:	Factor nuclear kappa B
ng	:	Nanogramo

nM	:	Nanomolar
nNOS	:	Óxido nítrico sintasa neurona
OMS	:	Organización mundial de la salud
PDGF	:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE ₂	:	Prostaglandina E 2
PGI ₂	:	Prostaciclina
PKA	:	Proteín cinasa A
PKC	:	Proteín cinasa C
PLA ₂	:	fosfolipasa A2
PLC	:	fosfolipasa C
SA	:	Sistema adrenérgico
SDS	:	Dodecilsulfato de sodio
SRAA	:	Sistema renina angiotensina aldosterona
STAT	:	Transductor de la activación de la transcripción
TBS	:	Tampón fosfato salino
TGF-β1	:	Factor de crecimiento transformante beta 1
TNFα	:	Factor de necrosis tumoral alfa

Resumen

La fibrosis cardiaca se genera por un depósito exagerado de proteínas de matriz extracelular (MEC) producto de la activación de los fibroblastos (FC). Estas células, representan cerca de un 60 a 70% de las células del corazón, y en respuesta a un daño, son activadas por diversas citoquinas y factores de crecimiento (entre ellas, TGF- β 1, Ang II, etc.), los que desencadenan en ellas un cambio estructural y funcional que las diferencia a miofibroblastos cardiacos (MFC). Los MFC tienen como principal función la de secretar proteínas de la MEC con el fin de contraer y reparar la zona dañada en el caso de un infarto al corazón. Así, el MFC juega un papel crucial en la respuesta frente a un daño en el tejido cardiaco. A pesar de ello, es muy poco lo que se sabe con respecto al comportamiento de este tipo celular frente al remodelado cardiaco. Además, se tiene un escaso conocimiento acerca de los receptores celulares que presenta este tipo celular, pudiendo ser piezas claves en la regulación de la secreción exacerbada de MEC y por tanto, de la generación de fibrosis del tejido.

En la fibrosis cardiaca, adquiere gran importancia la participación del sistema caliceína-cinina. Se ha propuesto que la ausencia de los receptores de cininas es deletérea a nivel del tejido cardiaco, especialmente en la respuesta frente a una injuria. Dentro de este sistema, se encuentran bradicinina (BK) que actúa sobre el receptor B2 de cininas (B2R) y lis-des-Arg-BK (DAKD) que ejercen su acción sobre el receptor B1 (B1R). En FC se ha demostrado que, BK produce liberación de NO y de prostaglandinas, además de reducir la secreción de colágeno. Sin embargo, en MFC se desconocen que subtipos de receptores están presentes, así como las vías transduccionales que se activan tras la estimulación de ambos subtipos de receptores.

En la presente tesis y de acuerdo con el contexto, se realizaron diversos experimentos para demostrar la existencia y funcionalidad de los receptores de cininas tanto en FC como en MFC. Por western blot (WB) se evidenció la presencia de ambos receptores tanto en FC como en MFC, no obstante, la expresión de B1R es mayor en MFC que FC; mientras que B2R permanece constante. La expresión de B1R aumentó tras el tratamiento de FC con TGF- β 1, principal diferenciador a MFC. Además mediante las técnicas de inmunofluorescencia y ensayos de radioligando, se determinó que en FC

el B1R se encuentra localizado principalmente a nivel intracelular, mientras que en MFC se localiza marcadamente en las membranas plasmáticas.

Por otro lado, mediante el análisis de los movimientos de calcio intracelular, se demostró que B2R es funcional en ambos tipos celulares, mientras que B1R es funcional en MFC y no así en FC. Sin embargo, en FC la preincubación con el agonista de B1R (DAKD), y la posterior estimulación (30 min) con el mismo agonista, mostró que estos receptores son también funcionales. Mediante inmunofluorescencia se evidenció que tras la preincubación con el agonista existe una relocalización de B1R hacia las membranas plasmáticas, dónde son capaces de generar movimientos de calcio intracelular, demostrando que también son receptores activos.

Además, en MFC se demostró que la activación de B1R y B2R por sus respectivos agonistas induce una reducción en la expresión de colágeno I (Col I). En FC, la activación de B2R induce la disminución en los niveles de Col I, mientras que la activación de B1R que provoca la reducción en la expresión de Col I, requiere de un estímulo previo que redistribuya este receptor hacia la membrana plasmática.

Finalmente, el uso de distintos inhibidores permitió demostrar que en MFC, tanto la activación de B1R como B2R, conducen a la disminución en la expresión de Col I a través de la activación de una vía transduccional que es compartida por ambos receptores, y que corresponde a: PKC/PLA2/COX-2/PGI₂/IPR.

En resumen, los resultados de esta tesis sostienen que en MFC la activación de B1R y B2R conduce a la disminución de la expresión de Col I, lo cual se relaciona a los efectos antifibróticos de las cininas en el progreso de patologías como la fibrosis cardiaca.

Summary

Cardiac fibrosis is generated by an excessive deposit of extracellular matrix proteins (ECM) product of fibroblast (CF) activation. These cells account for about 60 to 70% of the cells in the heart. In response to injury, fibroblasts are activated by various cytokines and growth factors (including TGF- β 1, Ang II, etc.), which trigger in them structural and functional changes, differentiating to cardiac myofibroblasts (CMF). The main function of CMF is to secrete ECM proteins to repair the damaged area in the case of a heart attack. Thus CMF play a crucial role in the response to injury in the heart tissue. However, very little is known about the behavior of this cell type versus cardiac remodeling. Furthermore, the knowledge on the receptors present on this cell type is scarce, and they could be key elements in the regulation of the exacerbated secretion of MEC and therefore the generation of tissue fibrosis.

In cardiac fibrosis, the participation of the kallikrein-kinin system is very important. It has been proposed that the absence of kinin receptors is deleterious for cardiac tissue, especially in response to an injury. Within this system are bradykinin (BK) which acts on the B2 kinin receptor (B2R) and lis-des-Arg-BK (DAKD) that exerts its action on the B1 receptor (B1R). In CF, it has been shown that BK induces NO release and prostaglandins production, which reduce collagen secretion. However, in CMF it is not known which kinin receptor subtype is present and what signal transduction pathways are activated by these receptors.

In this thesis and in accordance with the context, various experiments were conducted to prove the existence and functionality of kinin receptors in both CF and CMF the presence of both receptors in both CF as MFC was observed by Western blot (WB), however, expression of B1R in CMF was greater than in FC, while B2R remained constant. B1R expression increased after treatment of CF with TGF- β 1, the main differentiator to CMF. By immunofluorescence techniques and radioligand assays, it was determined that CF B1R was located primarily intracellularly, whereas CMF was markedly located in the plasma membranes.

Moreover, by analyzing intracellular calcium movements, B2R was shown to be functional in both cell types, while B1R was functional in CMF, but not in CF. However, when CF were preincubated with the B1R agonist (DAKD) and subsequently stimulated (30 min) with the same agonist, these receptors were also functional. By Immunofluorescence it was shown that after preincubation with the agonist the B1R was relocated to plasma membranes, where they were able to generate intracellular calcium movements, showing they are active receptors.

Furthermore, it was demonstrated that B1R and B2R activation in CMF by their respective agonists, induces a reduction in the expression of collagen I (Col I). In contrast in CF, B2R activation induced a decrease in Col I levels, whereas a previous stimulus that redistributes B1R receptor to the plasma membrane is required to induce a reduction in Col I expression after B1R stimulation.

Finally, the use of various inhibitors shows that CMF allowed both B1R activation and B2R, leading to a decrease in Col I expression through activation of a signal transduction pathway which is shared by both receptors, and that is mediated by PKC/PLA2/COX-2/PGI₂/IPR.

In summary, the results of this study argue that B1R and B2R activation in CMF leads to decreased expression of Col I, which is related to antifibrotic effects of kinins in the progress of diseases such as cardiac fibrosis.

1. Introducción

1.1. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares constituyen unas de las principales causas de muerte tanto en Chile como en muchos países industrializados, lo cual ha generado un importante problema de salud pública a lo largo del tiempo. A pesar de que desde el año 1970 se ha reducido la mortalidad por enfermedades cardiovasculares comparada con enfermedades como el cáncer (1), según lo estimado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor de 16,7 millones de personas en el mundo, mueren anualmente víctimas de estas patologías. Dentro de estas enfermedades, se incluyen los accidentes cerebrovasculares y cardiopatías tales como la insuficiencia cardíaca, la hipertensión arterial, las enfermedades coronarias, entre otras. Desde el punto de vista demográfico, en los países desarrollados y en aquellos en vías de desarrollo, la pirámide poblacional tiende a aumentar en aquellos grupos de mayor edad y con ello la prevalencia de este tipo de enfermedades (2, 3).

1.2. Remodelamiento cardíaco

Ya desde hace unos años se ha acuñado el término remodelamiento cardíaco para describir a aquel proceso caracterizado por cambios moleculares, celulares, histológicos y anatómicos geométricos del miocardio, que se observan secundariamente a una sobrecarga de presión, volumen o daño miocárdico (4, 5). Esos cambios conducen a una función cardíaca alterada, y macroscópicamente se observa un cambio de la forma del corazón (de elipsoide a una más esférica), hipertrofia cardíaca y fibrosis cardíaca. Las alteraciones producidas en el tejido conducen finalmente a una falla del órgano, donde hay pérdida de la función contráctil debido principalmente a la dilatación ventricular, lo que lleva a la progresión de la insuficiencia cardíaca (6).

El proceso es complejo, pero una definición más detallada debiera incluir cambios genómicos, con subsecuentes cambios moleculares, celulares y tisulares.

Posterior a un daño del tejido cardiaco (infarto agudo al miocardio, sobrecarga de presión o volumen, inflamación, cardiomiopatía idiopática, etc.), se activan distintos mediadores neurohormonales (Sistema Renina Angiotensina Aldosterona: SRAA, Sistema Adrenérgico: SA, endotelina), citoquinas (TGF- β 1, IL-1 β), estrés oxidativo e isquemia, etc., los cuales en forma orquestada ponen en movimiento los procesos genéticos, moleculares y celulares que conducen al remodelamiento (figura 1) (4, 6). Indudablemente, la causa más común de fibrosis cardiaca es el infarto al miocardio; y en este sentido, el miofibroblasto en la zona dañada, y el fibroblasto en la zona remota son los principales elementos celulares responsables de su desarrollo. Aunque el remodelamiento cardiaco y con ello la fibrosis ocurre por diferentes condiciones etiológicas, las vías que conducen a remodelamiento, en términos de cambios moleculares, bioquímicos, y mecánicos, son en general comparables (7). Estos procesos tisulares están regulados por un delicado balance entre señales endógenas estimuladoras (p.e. catecolaminas, angiotensina II (Ang II), etc.), e inhibitorias, (p.e. cininas y óxido nítrico).

1.3. Fibrosis cardiaca

Las cardiopatías generan comúnmente cambios en la estructura cardiaca que conlleva un remodelamiento del tejido. El remodelamiento cardiaco puede ser de carácter reactivo, o sea, que se presenta en compensación a fenómenos patológicos, como por ejemplo, la fibrosis en la zona perivascular producida por sobrecarga de volumen; o reparativo, como el que sucede en respuesta a pérdida de células parenquimáticas (cardiomiocitos y fibroblastos cardiacos) por muerte celular, reparando el tejido cardiaco destruido (8).

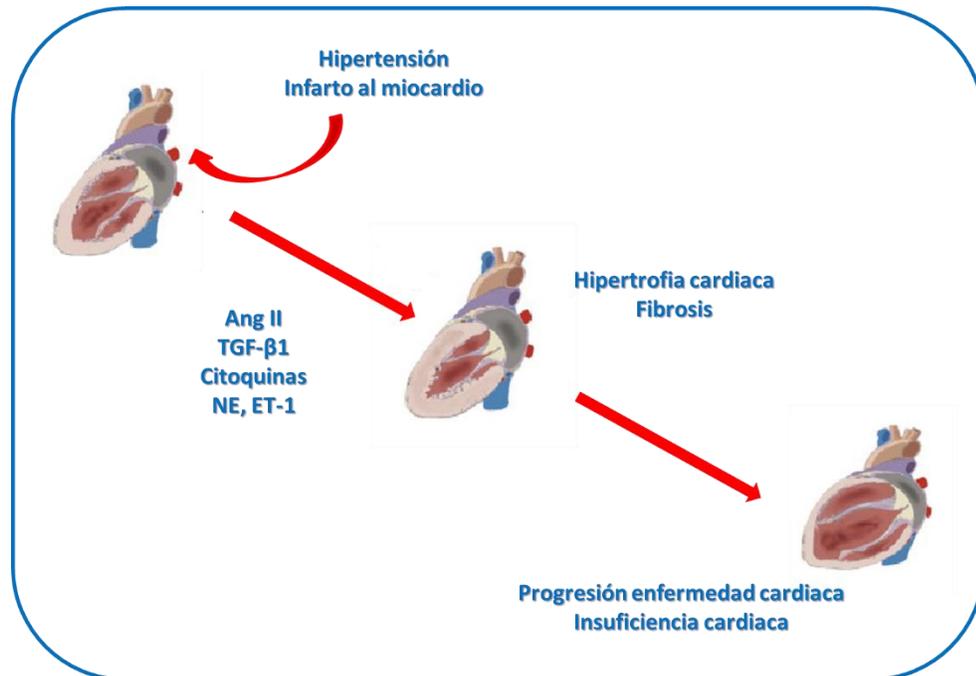


Figura 1. Esquema general de la progresión del daño cardíaco. Diferentes patologías (hipertensión y el infarto al miocardio), pueden conducir al deterioro del tejido cardíaco, donde numerosas citoquinas y factores de crecimiento están implicados en el proceso que conduce a alteraciones en la morfología del corazón (hipertrofia y fibrosis).

La figura 1 describe los cambios estructurales producidos en el tejido cardíaco frente a una condición patológica. Esta condición conduce a una función cardíaca alterada, generando hipertrofia y fibrosis, las que finalmente generan insuficiencia cardíaca (6). La fibrosis cardíaca se produce por la expresión de diferentes mediadores tales como moléculas de adhesión intercelulares (ICAM-1), proteína quimioatractora de macrófagos (MCP-1), endotelina-1 (ET-1), el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), Ang II, etc. Estos componentes participan en el desarrollo del proceso fibrótico.

1.4. Principales tipos celulares involucrados en el desarrollo de fibrosis cardiaca

1.4.1. Fibroblastos cardiacos

La función cardiaca normal del corazón de mamíferos es regulada por la interacción y coordinación dinámica de los cardiomiocitos y fibroblastos cardiacos (FC), que en su conjunto, constituyen el 90% de las células del miocardio. Los FC, que representan el 60-70% de las células en el corazón humano, son los que permiten la secreción de las proteínas de matriz extracelular (MEC) con el fin de regular la estructura del corazón, además actúan como células centinelas capaces de sensar y transmitir señales químicas, mecánicas y eléctricas entre los componentes celulares y no celulares (9).

En condiciones fisiológicas, los FC secretan proteínas de la MEC que dan soporte a los cardiomiocitos, previenen su deslizamiento, y así el corazón puede cumplir su función normal. En condiciones patológicas, como por ejemplo, un infarto al miocardio, los FC son activados y participan como células claves en el proceso de cicatrización de la herida producida por el fenómeno patológico (10). Esta activación se lleva a cabo por la producción de diversas citoquinas y factores de crecimiento, que pueden actuar en forma paracrina o autocrina, facilitando la acción de los fibroblastos en la reparación de la herida cardiaca.

Se ha demostrado que los FC aislados de un corazón con una insuficiencia cardiaca transforman su fenotipo celular a uno más activo llamado miofibroblasto cardiaco (MFC) (11).

1.4.2. Miofibroblastos cardiacos

Morfológicamente, los MFC se caracterizan por la presencia de un aparato contráctil que contiene haces de microfilamentos de actina asociados con proteínas contráctiles tales como miosina no muscular. Los haces de microfilamentos terminan uniéndose en la superficie del miofibroblasto a los fibronexus –un complejo de

adhesión altamente especializado- que se asocian a integrinas para ligar la actina intracelular con las fibras de la matriz extracelular, formando así un sistema de mecano-transducción celular (12). Se han postulado distintas fuentes precursoras de MFC, como lo son las células endoteliales, epiteliales, musculares, fibrocitos y FC residentes (13, 14). En general, frente a un proceso adaptativo por causa de una agresión al tejido cardíaco, el FC se diferencia expresando la α -actina del músculo liso (α -SMA), adquiriendo así el fenotipo secretor de MFC, un estado que se correlaciona con el incremento de la secreción de moléculas profibróticas tales como colágeno y fibronectina (15). En una primera instancia, debido a la tensión mecánica, el FC se transdiferencia a un fenotipo intermedio el cual es llamado protomiofibroblasto, teniendo como característica la ausencia de la formación de los microfilamentos por falta de α -SMA y de fibronexus de menor tamaño o inmaduros (16). Por otro lado, este tipo celular se transforma en MFC mediante la acción de la tensión mecánica, fibronectina celular segmento ED-A y TGF- β 1.

Además de secretar grandes niveles de proteínas de la MEC, los MFC liberan citoquinas, factores de crecimiento, como Ang II, TGF- β 1, IGF-1, PDGF e IL-4 y en forma adicional, incrementan el número de receptores para estos mismos, que finalmente son los mediadores de la diferenciación (17).

A nivel cardíaco, los MFC están presentes en las válvulas cardíacas y en la formación de la cicatriz post-daño cardíaco, específicamente posterior a un infarto al miocardio, habiendo sido demostrado que este tipo celular está presente en mayor proporción en el sitio del daño (18). Este tipo celular además presenta una alta actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y un elevado número de receptores AT1 de Ang II, y de TGF- β 1 (19). Estos antecedentes sugieren que el SRAA cardíaco regula en forma local el proceso de cicatrización a través de la liberación de estos factores, aumentando la secreción y depósito de proteínas de la MEC.

En condiciones experimentales *in vitro* y sin ningún estímulo de por medio, se ha visto que en cultivo de FC, cerca del 14 % corresponden a MFC (20). Por otro lado, otros investigadores han observado que transcurridos 14 días, el cultivo de FC

presenta alrededor de 50% de MFC. Esto se podría explicar por el efecto combinado de diferentes tipos de sueros utilizados, además de la secreción y efecto autocrino de TGF- β 1. De acuerdo a esta investigación, además la transformación de FC a MFC estaría siendo producida también por el estrés mecánico durante ese periodo de tiempo y la secreción de fibronectina ED-A (21). Por otro lado, se ha demostrado ampliamente que TGF- β 1 induce la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto, aumentando la secreción de proteínas de MEC. Además, se ha descrito *in vitro* que el tratamiento con este factor de crecimiento no produce pérdida en la viabilidad celular de MFC, sugiriendo que TGF- β 1 ejercería un papel citoprotector (20). Por otro lado, existen antecedentes en cultivo de fibroblastos de corazón de rata adulta, que la transdiferenciación de FC a MFC *in vitro* depende principalmente del pasaje de cultivo celular, donde pasajes elevados determinan un mayor porcentaje de MFC. De acuerdo a esta investigación, el principal agente involucrado es la fibronectina ED-A (22).

Como se puede observar, los MFC juegan un papel crucial en lo que corresponde a la generación de una respuesta frente a un daño en el tejido cardíaco. A pesar de ello, es muy poco lo que se sabe con respecto al comportamiento de este tipo celular frente al remodelado cardíaco. Además, se tiene un escaso conocimiento acerca de los receptores celulares que presenta este tipo celular, pudiendo ser piezas claves en la regulación de la secreción exacerbada de MEC y por tanto, de la generación de fibrosis del tejido.

1.5. Fibroblastos y miofibroblastos cardíacos: Participación en la secreción de proteínas de la MEC en el desarrollo de fibrosis cardíaca

Independiente del tipo de tejido, fibroblastos y miofibroblastos están activamente involucrados en el proceso dinámico de cicatrización. Se ha descrito que FC y MFC tienen una serie de funciones, pudiendo migrar a la herida, proliferar, sintetizar componentes de MEC, formar el tejido de granulación, secretar componentes inflamatorios, degradar MEC y generar fuerzas mecánicas en la herida para comenzar con su contracción (ver Figura 2) (9, 23).

En general, la contracción de la herida puede ser benéfica para la reparación de la misma, por la reducción del tamaño y de la formación de una cicatriz reparativa mecánicamente fuerte. A pesar de ello, en ciertas circunstancias la presencia y la actividad excesiva de fibroblastos y miofibroblastos, puede conducir a una mala reparación de la herida, generando fibrosis y una contracción defectuosa de la cicatriz (24). Es por eso que es importante conocer los mecanismos moleculares involucrados (cambios en el número y tipo de receptores, cambios en la secreción de MEC, etc.) que ocurren en FC y MFC que conducen al desarrollo de la fibrosis cardíaca.

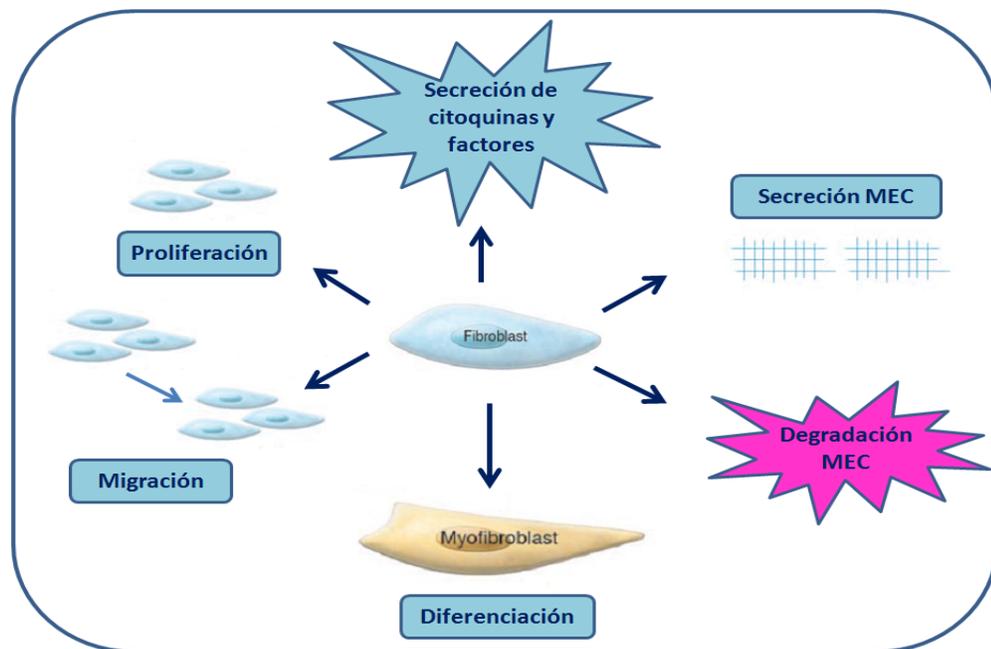


Figura 2. Funciones celulares de fibroblastos cardíacos. FC están involucrados en una serie de eventos celulares donde pueden proliferar, migrar, diferenciarse a MFC, degradar y sintetizar MEC, además de secretar citoquinas y factores de crecimiento. (Esquema modificado de Porter y cols. (9)).

1.6. Sistema cinina-caliceína en el desarrollo de fibrosis cardiaca.

1.6.1. Sistema Cinina-caliceína.

Las cininas son polipéptidos farmacológicamente activos, liberados en los tejidos y fluidos corporales como resultado de la acción enzimática de caliceínas sobre cininógenos (25). Estos componentes pertenecen al sistema caliceína-cinina, y han sido identificados en el tejido cardiaco al igual que los receptores de cininas, B1 y B2 (26). Este sistema es adicional al SRAA, presentando una interacción directa y contraria, lo cual hace que las cininas adquieran un importante rol en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular (27). Las cininas de relevancia son: la bradicinina endógena (BK) y la Lis-bradicinina (Lis-BK), también llamada calidina (KD) (28) que actúan sobre el receptor B2 (B2R); mientras que des-Arg-BK (DABK) y des-Arg-LisKD (DAKD), actúan como agonistas del receptor B1 (B1R) (29). En la figura 3, se muestra un esquema de la síntesis de cininas y su acción en los distintos receptores.

Las cininas BK y KD son sustrato de la ECA, la cual remueve el carboxilo terminal de ambas moléculas, generando fragmentos inactivos. La mayoría de los efectos biológicos de la cininas se concentran en producir vasodilatación, aumentar la permeabilidad vascular, inducir inflamación y contribuir en la reparación del tejido, producido mayoritariamente a través de la activación de B2R, el que es expresado de manera constitutiva en una serie de tipos celulares (30). Por otro lado, B1R en la mayoría de los tejidos es de carácter inducible (29).

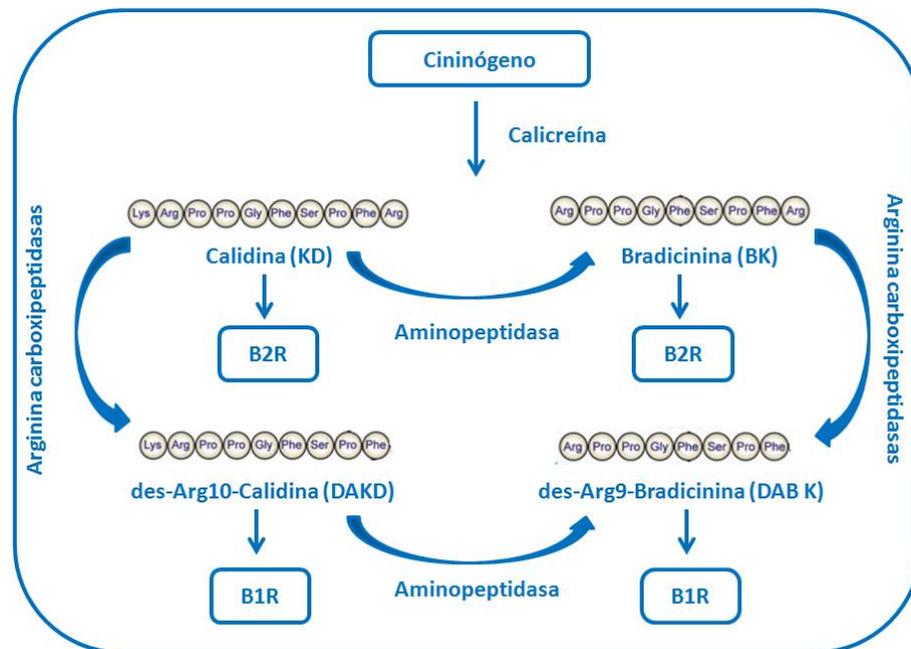


Figura 3. Sistema calicreína-cinina. El cininógeno a través de la enzima calicreína se transforma en péptidos vasoactivos como la calidina y la bradicinina que actúan en los receptores B2 de cininas. La calidina a través de aminopeptidasas genera bradicinina. Por la acción de argininas carboxipeptidasas, estos péptidos pierden su arginina en posición 10 (DAKD) y 9 (DABK), haciéndolos selectivos sobre receptores B1 de cininas.

1.6.2. Participación del sistema calicreína-cinina en el desarrollo de fibrosis.

Existen antecedentes en la literatura que muestran evidencias de la participación del sistema calicreína-cinina en la regulación de la expresión y secreción de MEC. Se ha descrito, en ensayos *in vitro*, que en fibroblastos de pulmón la acción de BK sobre su receptor desarrolla la transdiferenciación a miofibroblasto contribuyendo al aumento de la síntesis y liberación de colágeno tipo I (Col I), principal proteína de la MEC (31). Además, se ha estudiado en un modelo de nefropatía obstructiva que el bloqueo de B1R disminuye la inflamación y la fibrosis del tejido, evidenciando la participación de este receptor en procesos fibróticos (32). En forma adicional, se ha estudiado que en ratas deficientes en B1R, disminuye la expresión de agentes profibróticos como TGF- β 1 e IL-6, previniendo la fibrosis renal (33). Sin embargo, también existen antecedentes que en un modelo de hipertensión, B1R estaría

sobreexpresado en el tejido renal, teniendo un importante rol antifibrótico debido a la liberación de óxido nítrico y a la supresión de la liberación de TGF- β 1(34). Por otro lado, se ha estudiado en un modelo crónico de daño al hígado, que BK produce una disminución del daño hepatocelular como también provoca una reducción de MEC y de agentes profibróticos como el TGF- β 1 (35).

De acuerdo a estos antecedentes, existe controversia sobre los efectos de las cininas en procesos fibróticos, observándose que podrían ser tanto profibróticas como antifibróticas y que su efecto sería tejido específico.

1.6.3. Participación del sistema caliceína-cinina en el desarrollo de fibrosis cardíaca.

Se ha descrito que la expresión de tanto de B1R como B2R esta incrementada después de una isquemia miocárdica (36). Además, en un estudio relacionado con la edad, se demostró que en ratas jóvenes BK a través de B2R tuvo un efecto cardioprotector mientras que los niveles de B1R solo eran inducidos por daño del tejido. A medida que las ratas envejecían, disminuían los niveles de B2R, dejándolas vulnerables a daños isquémicos, aumentando de esta forma los niveles de B1R, con una función compensatoria en la cardioprotección (37). En forma adicional a estos antecedentes, se ha establecido que la señalización activada a través de B2R tendría un efecto cardioprotector disminuyendo la dilatación ventricular, reduciendo la muerte por apoptosis de los cardiomiocitos y atenuando la disfunción cardíaca. Por otro lado, en animales knock out (KO) para el receptor B1R, se ha establecido que la presencia de ese receptor no tendría efecto cardioprotector. Sin embargo, se ha estudiado que B1R si tendría efectos protectores del tejido, especialmente cuando se ha evaluado el efecto de inhibidores de la ECA (iECA) y de antagonistas de los receptores AT1 (AAT1) de Ang II (38). Existen varios reportes de los efectos cardioprotectores de las cininas, dados principalmente por el uso de los iECA (39, 40). Se ha establecido en ratas KO para ambos receptores de cininas que éstos influyen en el remodelamiento post-infarto tras el tratamiento con iECA, estableciéndose que el B2R tendría un efecto positivo a nivel agudo mientras el B1R los tendría a nivel crónico (41). Adicionalmente, se ha demostrado que el tratamiento

crónico con fármacos iECA, incrementa los niveles circulantes de cininas cardíacas, a pesar de no mantener una sostenida inhibición de los niveles de Ang II, sugiriendo que los efectos benéficos de los iECA pueden estar mediados por las cininas. Estos efectos han sido corroborados por estudios en ratones KO para B2R, donde se evidenció hipertrofia cardíaca, déficit microvascular e insuficiencia cardíaca asociado con fibrosis (42). Por otro lado, en pacientes hipertensos, la coadministración de un antagonista selectivo de B2R (icatibant), disminuye significativamente el efecto hipotensor del captopril (iECA) (43).

En su conjunto, estos antecedentes muestran que la ausencia de los receptores de cininas es deletérea a nivel del tejido cardíaco, especialmente en la respuesta frente a un daño. Esto sugiere que el sistema calcireína-cinina podría tener un efecto protector previniendo o contrarrestando el desarrollo de fibrosis cardíaca.

1.7. Señalización intracelular de los receptores de cininas

Está descrito que los receptores de cininas están acoplados a proteína G (GPCR), las cuales median los efectos celulares de estos péptidos (44). El tipo celular más estudiado ha sido el endotelial, en el cual se ha descrito que los receptores de cininas están acoplados a proteínas Gq y Gi, cuya activación lleva a la liberación de óxido nítrico y a la producción de prostaglandinas como prostaciclina (PGI₂), lo cual desencadena la respuesta de relajación del músculo liso, a través de la acción de estas moléculas (45). En la figura 4, se puede observar la vía de transducción de señales de B1R y B2R, donde se puede notar que ambos receptores comparten la misma vía transduccional. Uno de los principales segundos mensajeros intracelulares es el calcio (Ca⁺²), el cual media la activación de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), que lleva finalmente a la producción de NO en este tipo celular. Además, a través de la activación de la proteína fosfolipasa A2 (PLA2) por medio de señales de calcio, se puede liberar ácido araquidónico (AA) desde los fosfolípidos de membrana activando la producción de prostaglandinas (44). En forma adicional, se ha descrito que la activación del B2R promueve, en forma transitoria, la fosforilación en tirosina de las proteínas MAP-kinasa (MAPK), PLC y Hsp 90. Lo

anterior tiene una relación directa con la eNOS y óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) permitiendo la fosforilación de la NOS, lo que conduce a la producción de NO. Incluso, la activación del B2R permite que tirosinas kinasas de la familia de JAK fosforilen a las proteínas STAT las cuales directamente regulan la transcripción de genes específicos (45).

A pesar de que ambos receptores comparten las vías transduccionales, los patrones de señalización son diferentes. En las células de la musculatura lisa vascular, la estimulación del B2R trae un incremento transitorio del calcio intracelular con una baja participación de calcio extracelular, mientras que la estimulación de B1R evidencia un aumento sostenido y significativo del calcio intracelular con una fuerte dependencia de calcio extracelular (46). Estos diferentes patrones de señalización son probablemente influenciados por las características de ambos receptores en cuanto a la des-sensibilización e internalización que ellos puedan sufrir (44). Además, el B1R se asocia principalmente con la activación de PLC y con la vía de fosfoinositol, aun cuando también puede activar las vías de PLA2 y MAPK (29).

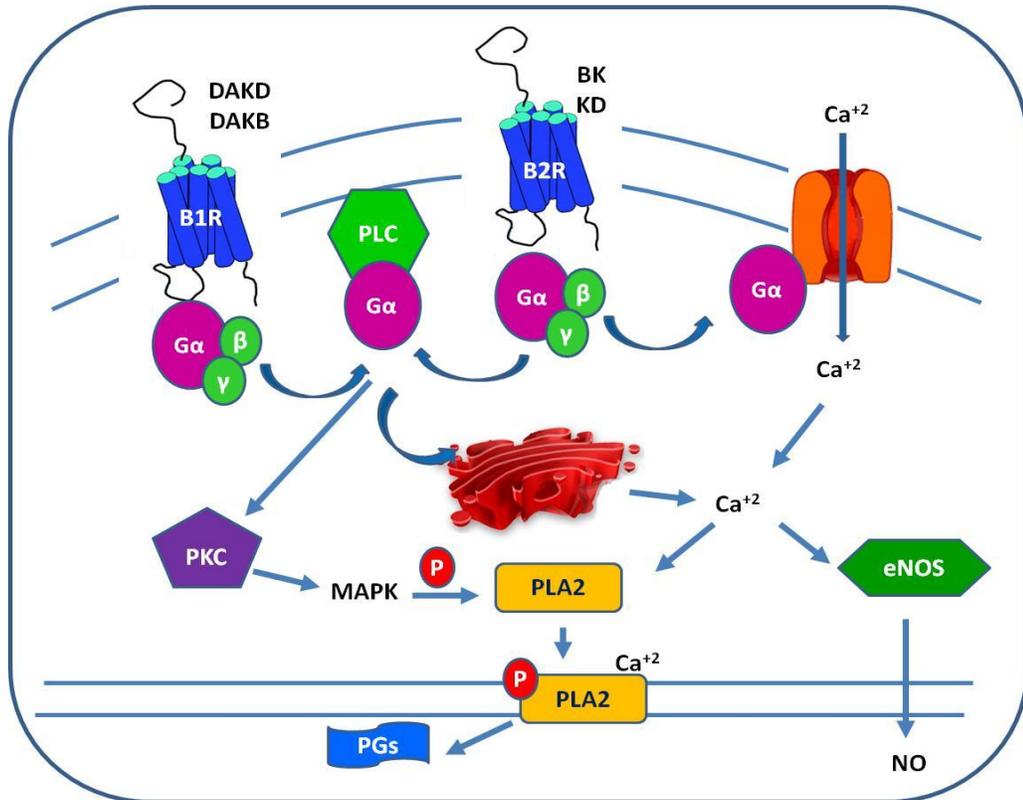


Figura 4. Vía de señalización de B1R y B2R descrita en células endoteliales. Activación de receptores de cininas con señalización intracelular a través de PLC, PKC, Ca²⁺, PLA2, eNOS Prostaglandinas (PGs) y NO (Esquema modificado de Moreau et al. (45))

1.8. Receptores de cininas en miofibroblastos cardiacos

En muchos tipos celulares se ha descrito la expresión de manera constitutiva del receptor B2 de cininas (células endoteliales, fibroblastos pulmonares, y diferentes líneas de fibroblastos) (44, 47, 48), cuya expresión es modulada por citoquinas y factores de crecimiento. Se ha demostrado en modelo de artritis que la acción de citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e IL-1 β desencadenan una sobreexpresión tanto de B2R como de B1R (49). En relación a B1R, se ha establecido en la mayoría de los tipos celulares, como un receptor de carácter inducible, expresándose mayoritariamente en condiciones patológicas, y también en respuesta a citoquinas y factores de crecimiento, producto de isquemia, y en

enfermedad ateromatosa (48, 50, 51). IL-1 β es una de las citoquinas, que ha demostrado ser capaz de inducir B1R en arterias umbilicales humanas (52). Por otro lado, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en células de fibroblasto de pulmón (HEL 299), aumenta la expresión tanto del B2R como del B1R (48). En células pulmonares, se ha caracterizado que frente a infecciones bacterianas aumenta la expresión del B1R mediada principalmente por activación de NF κ B (53). Además, se ha descrito en células vasculares, que Ang II y ET-.1 aumentan el B1R a través de la participación de vías activadas del estrés oxidativo (54). En forma adicional, existen antecedentes en modelos de daño pulmonar agudo por LPS, que el B1R sería inducido, participando del proceso inflamatorio del tejido (55). Por otro lado, en línea celular de fibroblastos de pulmón se ha descrito que el B2R una vez activado por su agonista, sufre des-sensibilización e internalización. Esta activación ha demostrado ser condicional para inducir la expresión de B1R (56). En forma adicional, se ha estudiado a través de ensayos de unión de ligando, en línea celular de ovario de hamster chino (CHO), que B1R no se desensibiliza ni se internaliza producto de su activación con sus ligandos específicos en comparación a la activación de B2R (57, 58). Por otro lado, la acción y el efecto de las cininas sobre ambos receptores dependerá exclusivamente del tipo celular que se esté estudiando, así, se ha visto que en células de la musculatura vascular y en fibroblastos pulmonares, las cininas producen aumento de la producción de MEC (31, 59), mientras que en otros tejidos como el renal (60) o el cardiaco (61, 62), producen el efecto contrario.

En el tejido cardiaco se ha descrito la presencia de ambos receptores de cininas. B2R ha sido caracterizado tanto en cardiomiocitos como en FC de ratas neonatas y adultas (63). Se ha demostrado que en FC, BK produce liberación de NO (64) y de prostaglandinas (65), además de reducir la secreción de colágeno (61, 66). En forma adicional, en modelos de isquemia, la acción de BK sobre B2R, presente en MFC, mejora el efecto de sobrevida post-isquemia (67). Por otro lado, la vía transduccional activada por las cininas en FC, es similar a la descrita en la figura 3. En este tipo celular se ha descrito que la activación por BK del receptor acoplado a proteína G α q, induce un aumento en IP3 que consecutivamente produce un aumento transitorio en

la concentración de calcio intracelular (68). Estos antecedentes permiten establecer la presencia de B2R en FC y la importancia que adquiere en el remodelamiento cardiaco y por consiguiente, en la fibrosis.

En comparación al B2R, el B1R ha sido estudiado en menor grado en el tejido cardiaco. Se ha descrito en FC, que el B1R compensaría el efecto antiproliferativo producido por el B2R (69). Además, se ha establecido la presencia del B1R en cardiomiocitos y células endoteliales cardiacas (70). Por otro lado, se ha descrito un aumento transitorio de calcio intracelular por influjo desde el medio extracelular en línea celular de miofibroblastos de pulmón, a diferencia del aumento transitorio producido por BK al activar el B2R, el cual proviene de compartimentos intracelulares (71).

Hasta la realización de este trabajo de tesis, la presencia, vía de señalización y función del B1R en MFC era prácticamente desconocida.

1.9. Efectos de las cininas sobre la secreción de proteínas de la MEC en miofibroblastos cardiacos.

Como se describió anteriormente, la activación del B2R en FC por BK, modula negativamente la secreción y expresión de colágeno, efecto que esta mediado por la liberación de NO y PGI₂ (61, 66). Sin embargo, en MFC no se ha evaluado el efecto que tendrían las cininas en la reducción de proteínas componentes de la MEC.

De acuerdo a lo descrito con anterioridad, los efectos de las cininas a nivel de la producción de MEC principalmente miofibroblastos cardiacos resultan desconocidos. Lo anterior nos ha llevado a plantear la siguiente hipótesis.

2. Hipótesis del trabajo

“La activación del receptor B1 de cininas en miofibroblastos cardiacos de ratas neonatas disminuye la expresión de colágeno I a través de la vía de señalización intracelular que involucra PKC, PLA2, COX-2, PGI₂ e IPR”.

3. Objetivos específicos

Objetivo específico 1: Caracterizar farmacológicamente los receptores B1 y B2 de cininas en miofibroblastos cardiacos de ratas neonatas.

Objetivo específico 2: Determinar los componentes de las vías de señalización intracelular activadas por DAKD al interactuar con el B1R y su efecto en la expresión de colágeno I.

4. Materiales y métodos

4.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): inhibidor de PKC (GÖ6983), inhibidor de PLC (U73122) azul de tripán, NP-40, tinción de núcleo HOECHST, los anticuerpos contra la proteína α -SMA, GAPDH y β -tubulina. De Gibco BRL (Carlsbad, California EEUU) se adquirieron la tripsina-EDTA, los estándares de pesos moleculares de proteínas pre-teñidas y el suero fetal de bovino (FBS). El material plástico estéril para la obtención y cultivo de fibroblastos y miofibroblastos cardiacos se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania.). Todos los compuestos orgánicos e inorgánicos fueron obtenidos desde Winkler Ltda. El reactivo quimioluminiscente para western blot (Western Lightning) y [³H][Leu9]des-Arg10-[3,4-propil-3,4H(N)]calidina fueron adquiridos en PerKinElmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA, EEUU). Los anticuerpos secundarios anti-IgG ratón y anti-IgG conejo conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La jolla, CA, EEUU). El anticuerpo contra Lamin A/C fue adquirido en Cell Signaling Technology (Boston, MA, EEUU). El Accutase®, el TGF- β 1 y anticuerpo contra pro-colágeno se adquirieron en Chemicon (Tamecula, USA). El anticuerpo contra TFIIIB se obtuvo desde Santa Cruz Biotechnology Inc. Anticuerpos fluorescentes ALEXA 488 ratón y conejo, y la sonda Fluo4-AM fueron adquiridos de Life technology (Carlsbad, CA, USA). El medio de montaje para fluorescencia DAKO se obtuvo de DAKO Corporation (CA, EEUU). Anticuerpo contra B1R fue adquirido de Enzo Life Science (USA). El antagonista del receptor IP (RO1138452), inhibidor de PLA2 (MAFP), kit 6-ceto prostaglandina F_{1 α} EIA y kit Prostaglandina E₂ EIA fueron adquiridos de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI). Inhibidores de proteasas y fosfatasas adquiridos de Roche, (Switzerland). Los agonistas BK y DAKD a AnaSpec EGT Group (San José, CA, EEUU).

4.2. Modelo Animal

Se utilizaron ratas neonatas Sprague-Dawley (2 a 3 días de edad), provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Todos los estudios se realizaron siguiendo las guías aprobadas por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

4.2.1. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos ventriculares de ratas neonatas y diferenciación a miofibroblastos.

Se utilizó el procedimiento descrito por Díaz-Araya et al (72). Las ratas se decapitaron e inmediatamente se les removió el corazón bajo condiciones de asepsia. Se separaron las aurículas de los ventrículos, y éstos últimos se trituraron para posteriormente someterlos a sucesivas digestiones con pancreatina y colagenasa II. El producto de las digestiones, se pre-plaqueó por 2 h a 37° C en medio de cultivo conteniendo 5 % FBS y 10 % FCS en placas plásticas de cultivo. Por adhesión diferencial al plástico se separaron fibroblastos de cardiomiocitos. Luego de las 2 h, se cambió el medio por DMEM-F12 + 10 % FBS, los fibroblastos se dejaron proliferar hasta confluencia y los cambios de pasaje se realizaron mediante tripsinización (hasta pasaje 2 como máximo). Para la obtención de MFC *in vitro* se utilizaron fibroblastos en pasaje 2, los cuales se estimularon con TGF- β 1 5 ng/ml (20) en medio DMEM-F12 carente de suero durante 96 hrs. Transcurrido el tiempo, las células se mantuvieron en medio DMEM-F12 antes de ser sometidas a las distintas condiciones de estudio.

4.3. Ensayo de desplazamiento y unión de radioligando.

Para determinar la presencia del B1R en FC y MFC de rata neonata se realizaron ensayos de unión de radioligando utilizando para ello el antagonista específico de B1R [3 H][Leu9]des-Arg10-[3,4-propil-3,4H(N)]calidina ([3 H]-Antg B1R). Por otro lado, se aislaron membranas plasmáticas de FC y MFC mediante el lisado

de estas células con *buffer* de lisis (1 mM Tris-HCl pH 7.5 y 2 mM EGTA), sometiéndose a diferentes centrifugaciones. En un inicio, se centrifugó dos veces a 15000 rpm por 15 minutos a 4°C, donde el *pellet* fue resuspendido para ser centrifugado en una ultracentrífuga a 38500 rpm (100000g). Las membranas plasmáticas se resuspendieron en *buffer* SET (Sacarosa 0,25, EDTA 1mM, Tris-HCl 5mM). El ensayo de desplazamiento se realizó con DAKD 10µM, agonista selectivo de la unión total de [³H]-Antg B1R (10 nM). Por otro lado, para determinar B_{max} (número de receptores) y K_d (afinidad) se realizaron curvas de desplazamiento utilizando distintas concentraciones de DAKD. Las muestras se incubaron a 37°C por 30 minutos y luego se filtraron al vacío sobre filtros Whatman GF/C. Para detener la reacción, cada muestra se diluyó con 10 volúmenes de tampón Tris-HCl/MgCl₂. El [³H]-Antg B1R unido a las membranas celulares quedó retenido en el filtro, el cual se colocó en un vial donde se le adicionaron 0,5 mL de agua destilada y 4 mL de mezcla de centelleo. Finalmente se midió la radioactividad de las muestras en un contador de centelleo 24 h después de terminado el ensayo.

4.4. Determinación de movimientos de calcio intracelulares

Los FC y MFC se cultivaron en cubreobjetos. En estas condiciones, se cargaron con una sonda sensible a calcio, Fluo-4/AM, durante 30 minutos a 37°C. Durante este periodo, en algunos experimentos se incubó con agonista de B1R y antagonistas específicos de B1R y B2R. Las células se lavaron con una solución con calcio, Krebs (NaCl 145 mM, KCl 5mM, CaCl₂ 2,6 mM, MgCl₂ 1 mM, Hepes-Na 10 mM, glucosa 5,6 mM, pH 7.4) para sacar el exceso de sonda. Posteriormente, las células se conservaron en esta solución y se estimularon con los agonistas de los receptores de cininas, BK y DAKD. A través de microscopia confocal se observaron cambios en la fluorescencia de la sonda debido a movilización de calcio intracelular.

4.5. Extracción de núcleos celulares

Se preparó un *buffer* común para la extracción de núcleos celulares el cual estaba constituido por EDTA 1μM, EGTA 1μM, DTT 1mM, inhibidores de proteasas. Para el *buffer A*, a esta solución se adicionó además KCl 10mM, HEPES 1mM. Por otro lado, para el *buffer C*, se adicionó HEPES 1mM y NaCl 400mM. Los FC y MFC se lisaron con *buffer A* en hielo. Se añadió NP-40 10%, detergente que mantiene la integridad de núcleos celulares. Los lisados se centrifugaron a 13000 rpm por 1 min, recuperando posteriormente el sobrenadante (resto del contenido celular). El *pellet* se lavó con *buffer A* y centrifugó descartando el sobrenadante. Se añadió posteriormente *buffer C*, agitando el contenido durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras centrifugar por 5 min a 13000 rpm a 4°C, se obtuvo el sobrenadante que correspondía al extracto nuclear.

4.6. Preparación de extractos de proteínas totales

Se prepararon extractos de proteínas totales para evaluar los niveles de B1R, B2R, Col I, TFIIB, Lamin A/C, α-SMA, GAPDH y β-tubulina en respuesta a los diferentes tratamientos experimentales. Las células se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de 3×10^5 o 2×10^5 células/pocillo según fueran FC o MFC. Una vez estimuladas, las células se lavaron tres veces con PBS frío y luego se lisaron con 60 μL de *buffer* de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,2; EDTA 5 mM; NaCl 150 mM; Tritón X-100 1%(v/v); SDS 0,1% (v/v); deoxicolato 1%; inhibidores de proteasas y fosfatasas). El homogenizado se sonicó por 5 minutos y luego se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante o extracto de proteínas se recuperó en un tubo plástico y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry. Las proteínas se denaturaron en *buffer* de carga 4X (glicerol 20%, β-mercaptoetanol 20%, SDS 5%, 125 mM Tris y 0,1% azul de bromofenol, pH 6,8), para ser almacenadas a -20°C.

4.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación y resolución de las proteínas de acuerdo a su masa se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida preparados a partir de una solución 29,2:0,8 de acrilamida: bisacrilamida. Los geles se cargaron con 30-50 µg de extracto proteico. Los geles concentradores y separadores fueron de 5% y 6-10%, respectivamente. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 100 V en tampón de electroforesis.

4.8. Electrotransferencia

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm de poro. Para los geles de Col I, la electrotransferencia se realizó durante 180 min a una corriente constante de 400 mA. El resto de las transferencias se realizó durante 90 a 120 min a una corriente constante de 350 mA en tampón de transferencia.

4.9. Western blot

Una vez transferidas las proteínas a las membranas, estas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con leche descremada al 5% y posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C y agitación suave, las diluciones de los anticuerpos se presentan en la tabla 1.

Posterior a la incubación, las membranas se lavaron durante 30 min en TBS 1X que contenía Tween-20 al 0,1% e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo o ratón conjugado con peroxidasa según correspondiera, en tampón de bloqueo TBS 1X/Tween-20 al 0,1%.

Anticuerpo	Dilución
B1R	1:1000
B2R	1:1000
TFIIB	1:1000
Lamin A/C	1:1000
α -SMA	1:10000
β - tubulina	1:10000
Col I	1:1000
Secundario anti-conejo	1:10000
Secundario anti-ratón	1:5000

Tabla 1. Anticuerpos

Las membranas, previamente lavadas, se incubaron 1 min con el reactivo “Western Lightning” con el fin de detectar las proteínas y se expusieron a la película de fotografía Kodak-Biomax. Las películas se digitalizaron y las imágenes se procesaron con ayuda de los programas computacionales Image-J y Photoshop 7.0.

4.10. Inmunofluorescencia

La técnica de inmunofluorescencia se utilizó para visualizar localización de B1R. Para ello, FC y MFC se sembraron a una densidad de 1×10^5 y $0,8 \times 10^5$ células/pocillo, respectivamente, sobre cubreobjetos de vidrio. Un grupo de células se estimuló con DAKD, agonista de B1R durante 30 min. Posteriormente, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con paraformaldehído 4% por 20 min, se permeabilizaron con tritón 0,1% durante 10 min y se bloquearon con BSA al 3% en PBS durante 30 min. Transcurrido el tiempo, las células se incubaron en presencia de una dilución de anticuerpo contra B1R 1:100 durante toda la noche a 4°C. Luego se incubaron por 2 h a temperatura ambiente y protegidas de la luz, con un anticuerpo secundario ALEXA 488 anti-conejo en una dilución 1:300 y en algunos experimentos con marcador de núcleo, HOECHST 1:600. Finalmente, las células se montaron sobre DAKO en portaobjetos, para retardar el decaimiento de la fluorescencia y se

observaron mediante microscopía confocal, en un microscopio Karl-Zeiss. El análisis de las imágenes se realizó con el software Image J.

4.11. Cuantificación de los niveles de PGI₂ y PGE₂

Los niveles de ambas prostaglandinas se determinaron mediante el kit enzima inmunoensayo desarrollado por Cayman Chemical Company. Los MFC se incubaron en placas de 35 mm en una confluencia de $0,8 \times 10^5$ y estimuladas con DAKD, BK y LPS durante 24 h. Transcurrido el tiempo, los sobrenadantes se depositaron en tubos plásticos y se guardaron a -80°C . Por otro lado, las células se disociaron del plástico mediante la utilización de acutase® y se contaron con azul de tripán en una cámara de Neubauer. Los sobrenadantes se utilizaron para cuantificación utilizando el kit donde se colocaban 50 μL de cada muestra, por pocillo en duplicado. Además, se adicionó 50 μL de 6-ceto PGF_{1 α} (metabolito estable de PGI₂) o PGE₂ AChE tracer y 50 μL de antisuero 6-ceto PGF_{1 α} o PGE₂, y se dejó incubando por 18 h a 4°C . Este experimento al ser una reacción colorimétrica, fue necesario realizar el siguiente procedimiento de revelado: Los pocillos se lavaron cinco veces con *buffer* de lavado, luego se adicionó 200 μL de reactivo de Ellman's (revelador) a cada pocillo, y se incubó agitando la placa protegida de la luz durante 90 min. Transcurrido el tiempo, la placa se leyó a una absorbancia de 405 y 420 nm de longitud de onda en un lector de placas.

4.12. Ensayos de viabilidad celular

Con el fin de conocer la concentración a la cual, los inhibidores a utilizar en experimentos de larga duración no eran tóxicos para las células, se realizaron estudios de viabilidad por exclusión de azul de tripán. Los MFC se cultivaron a una densidad de $0,8 \times 10^5$ células/placa, donde las células se trataron por 48 horas con concentraciones crecientes de los diferentes inhibidores utilizados. Los MFC se disociaron de las placas de cultivo utilizando Acutase®. Posteriormente se tomó una alícuota de 40 μL de la suspensión de células y se le adicionaron 10 μL de solución

de azul de tripán, se homogeneizó y de esta nueva suspensión se tomaron 20 μ L que se colocaron en una cámara de Neubauer doble y se contaron las células vivas.

4.13. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar (SEM) para al menos tres experimentos independientes. Las comparaciones entre los distintos grupos experimentales versus el control se realizó utilizando t-Student de dos colas para análisis de dos grupos o ANOVA de una vía para más de tres grupos, seguido de post test Tukey para comparaciones entre grupos y test Dunnet, para comparaciones de grupos versus control. Se estableció como nivel de significancia un $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Relacionados al objetivo 1: Caracterizar farmacológicamente los receptores B1 y B2 de cininas en miofibroblastos cardiacos de ratas neonatas.

5.1.1. Presencia de receptor B1 y B2 de cininas en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos.

La presencia de receptores de cininas en FC ha sido previamente estudiada, identificándose el B2R (63, 64). En la literatura se menciona la inducción del receptor B1 de cininas (B1R) en algunos tipos celulares o la presencia de este en forma constitutiva en otros tejidos (50), sin embargo, se desconoce si el B1R está presente en FC o en MFC.

Para evaluar la presencia de B1R y B2R en FC y MFC se realizó western blot (WB) con anticuerpos específicos para ambos receptores. Los resultados obtenidos, muestran en la figura 5A, la presencia de B1R en ambos tipos celulares, siendo mayor en MFC con respecto a FC. La figura 5B, muestra la presencia de B2R tanto en FC como en MFC, no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos tipos celulares.

En la transformación de FC a MFC se induce el aumento de diferentes proteínas y receptores regulado principalmente por TGF- β 1 (9). El aumento de la expresión de B1R en MFC comparado con FC nos sugirió que este proceso ocurría durante la diferenciación de FC a MFC. Para evaluar esta hipótesis, se realizó un experimento tiempo dependiente para determinar el efecto de TGF- β 1, principal factor involucrado en la diferenciación de FC a MFC, en el aumento de los niveles de proteína de B1R según el esquema adjunto (Figura 6).

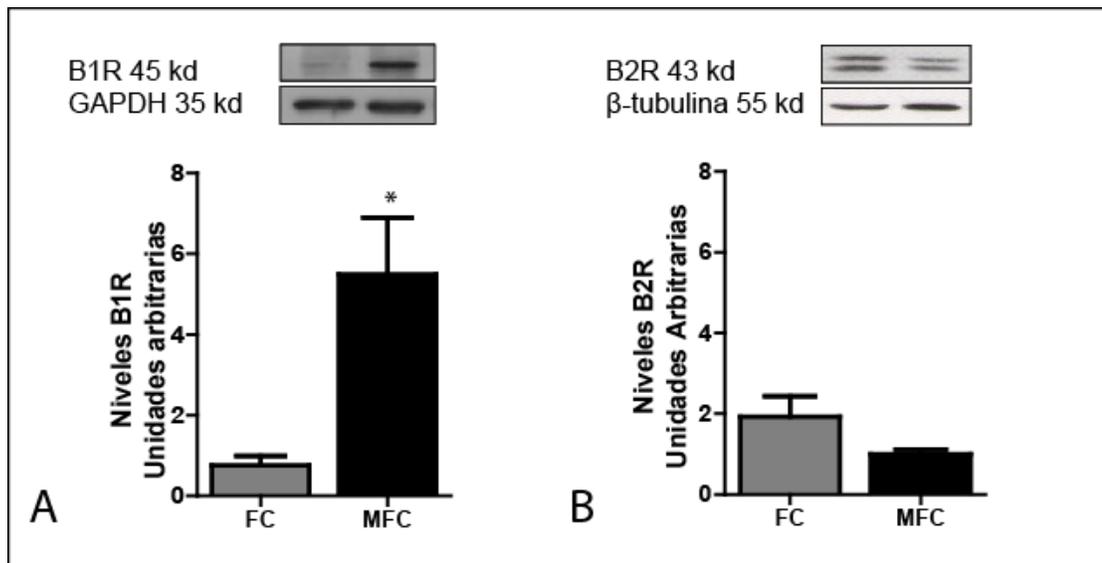


Figura 5. Presencia de B1R y B2R en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos. Se lisaron FC y MFC para la obtención de proteínas las cuales se fraccionaron por SDS-PAGE al 10%. Posteriormente se realizaron los WB con anticuerpos específicos para A) B1R y B) B2R. Los resultados se expresaron como el promedio \pm SEM de A) $n=4$ y B) $n=3$ experimentos independientes. * $p<0,05$. Unidades arbitrarias establecidas por la razón entre B1R o B2R versus GAPDH o β -tubulina, respectivamente

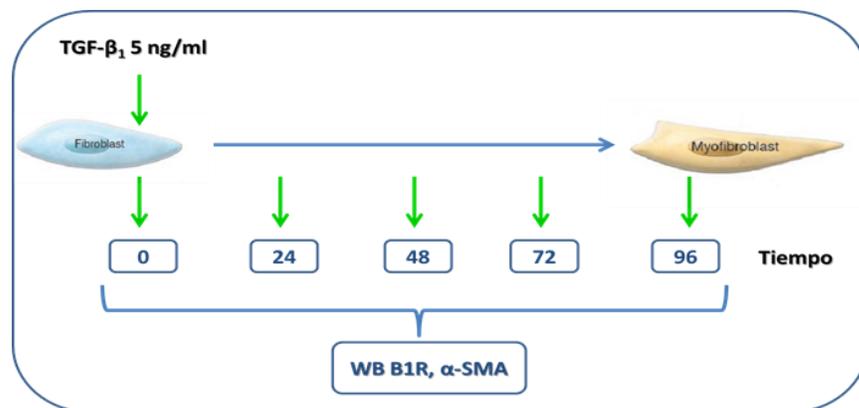


Figura 6: Esquema del tratamiento de FC con TGF-β1. Estimulación de FC con TGF-β1 5 ng/ml. Obtención de muestra cada 24 h, para evaluación de B1R y α-SMA.

Los resultados obtenidos de este ensayo (figura 7A), mostraron que la incubación de FC con TGF- β 1 (5 ng/ml), indujo un aumento de los niveles de B1R en forma proporcional al tiempo, encontrándose un aumento estadísticamente significativo desde las 48 horas de estimulación. En la figura 7B, se muestra la diferenciación de FC a MFC representado por el aumento de α -SMA.

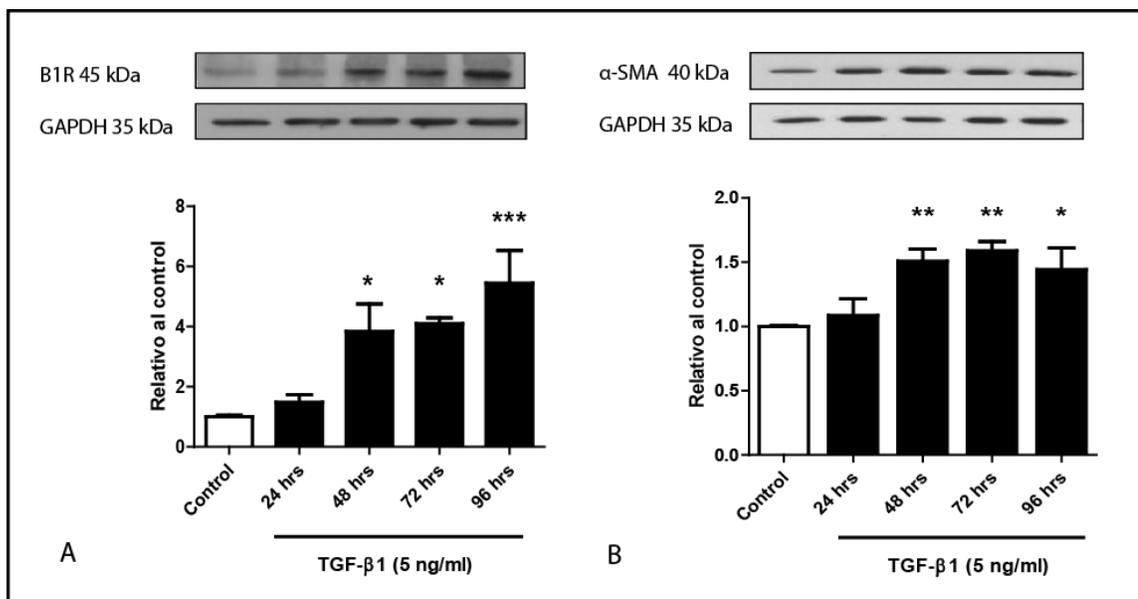


Figura 7. Efecto de TGF- β 1 en la inducción de B1R en MFC. Las células tratadas con TGF- β 1 se lisaron a diferentes tiempos para la obtención de proteínas las cuales se fraccionaron por SDS-PAGE al 10%. Posteriormente se realizó WB con anticuerpo específico para A, B1R y B, α -SMA. Experimentos independientes A, n=5 y B, n=5 expresados por el promedio \pm SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs control.

Por otro lado, para evaluar la presencia de B1R en membranas celulares, se realizaron ensayos de desplazamiento de unión a radioligando, mediante la utilización de un antagonista específico del receptor B1R marcado radioactivamente ($[^3\text{H}]$ -Antg B1R). Se quiso determinar la presencia de B1R específicamente en las membranas plasmáticas en los distintos tipos celulares. Mediante una serie de centrifugaciones, se separaron las membranas plasmáticas del resto del contenido

celular de FC y MFC. Los resultados mostraron que tanto FC como MFC presentaron un aumento en la unión total, evidenciándose en ambos tipos de células, desplazamiento de la marca radioactiva de [³H]Antg B1R producto de la acción del agonista DAKD 10µM (figura 8). Por otro lado, la unión total fue mayor para MFC que para FC.

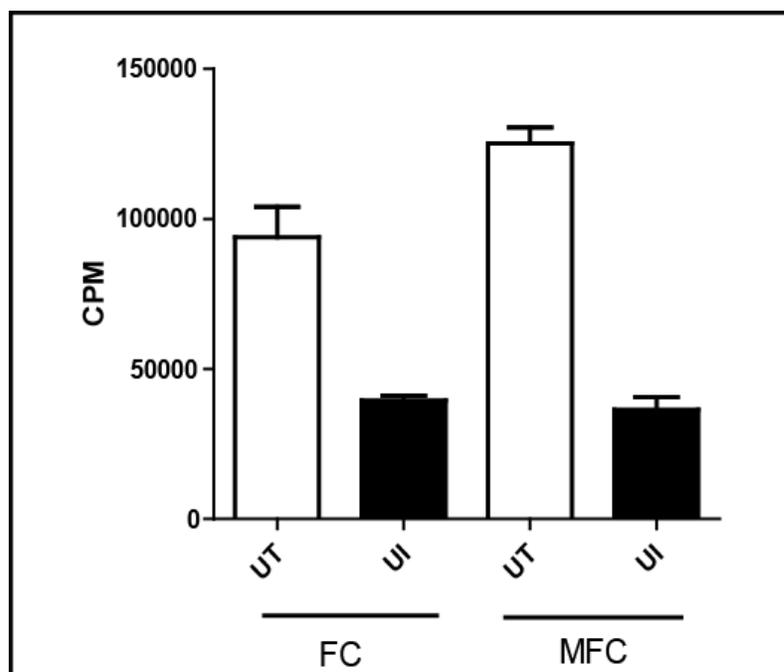


Figura 8. Identificación de B1R en membranas plasmáticas de fibroblastos y miofibroblastos cardiacos. Ensayo de competencia de la unión de [³H]Antg B1R (100 nM), al receptor B1 de cininas siendo desplazado con DAKD 10 µM en membranas plasmáticas de fibroblastos y miofibroblastos cardiacos. La unión específica es la diferencia entre la unión total (UT) y la unión inespecífica (UI). CPM, cuentas por minuto. Los resultados se expresan como promedio ± SEM, n=1; cada réplica realizada por triplicado.

En forma adicional, se realizaron curvas de desplazamiento de la marca radioactiva con distintas concentraciones de DAKD en FC y en MFC. Los resultados mostraron que para ambos tipos celulares hubo desplazamiento (FC, figura 9A y MFC, figura 9B) de [³H]-Antg B1R, corroborando la presencia de B1R en membranas plasmáticas. A través de este experimento se estimaron el número de receptores (Bmax) el cual correspondió para FC a $22,8 \pm 2,6$ fmol/mg de proteína y para MFC a $38,4 \pm 10,6$ fmol/mg de proteína. Además se estimó la Kd, que correspondía para FC a $2,45 \pm 0,9$ nM y para MFC a $1,3 \pm 0,12$ nM.

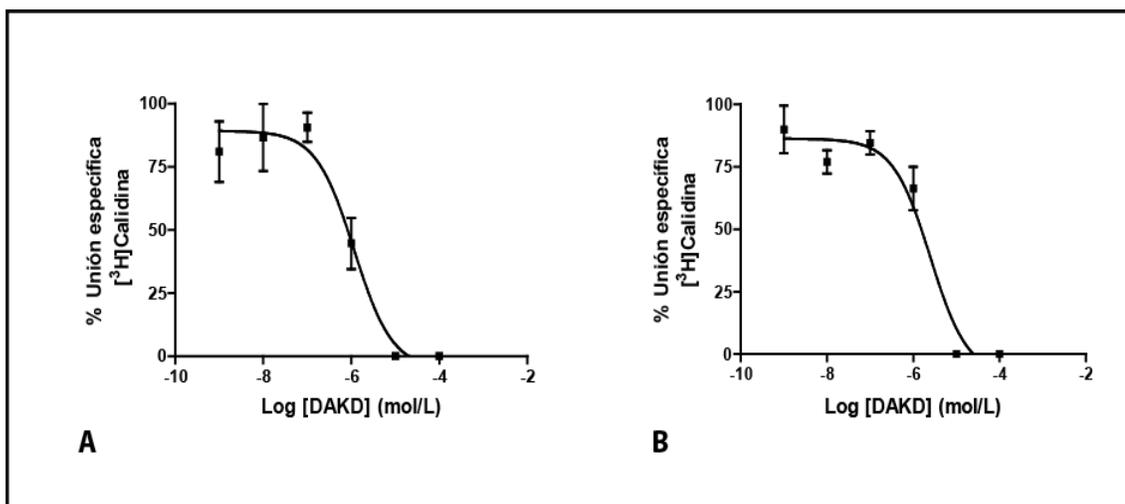


Figura 9. Curvas de desplazamiento de B1R en membranas plasmáticas de fibroblastos y miofibroblastos cardiacos. Ensayo de competencia de la unión de [³H]Antg B1R (100 nM), al receptor B1 de cininas siendo desplazado con distintas concentraciones de DAKD (1nM-10µM) en membranas plasmáticas de A) FC y B) MFC. La unión específica es la diferencia entre la unión total (UT) y la unión inespecífica (UI). CPM, cuentas por minuto. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM, n=1; cada réplica realizada por triplicado.

En forma complementaria se evaluó la localización subcelular del B1R en FC y MFC. Para ello, en primera instancia, se realizó un ensayo de inmuno-fluorescencia con un anticuerpo específico para el B1R. La figura 10A, muestra que en FC la marca para el receptor fue débil y se localizó principalmente a nivel citoplasmático, perinuclear y nuclear, a diferencia de lo que ocurrió en MFC (figura 10B), donde la intensidad de la marca fue mucho más alta y se observó una marcada localización

del B1R en la membrana celular, así como también a nivel citoplasmático, perinuclear y nuclear. Cabe destacar la importante diferencia de tamaño entre los FC y los MFC, siendo estos últimos alrededor de 3 veces más grandes que los FC.

Se realizaron controles del experimento los cuales se pueden visualizar en el anexo 1.

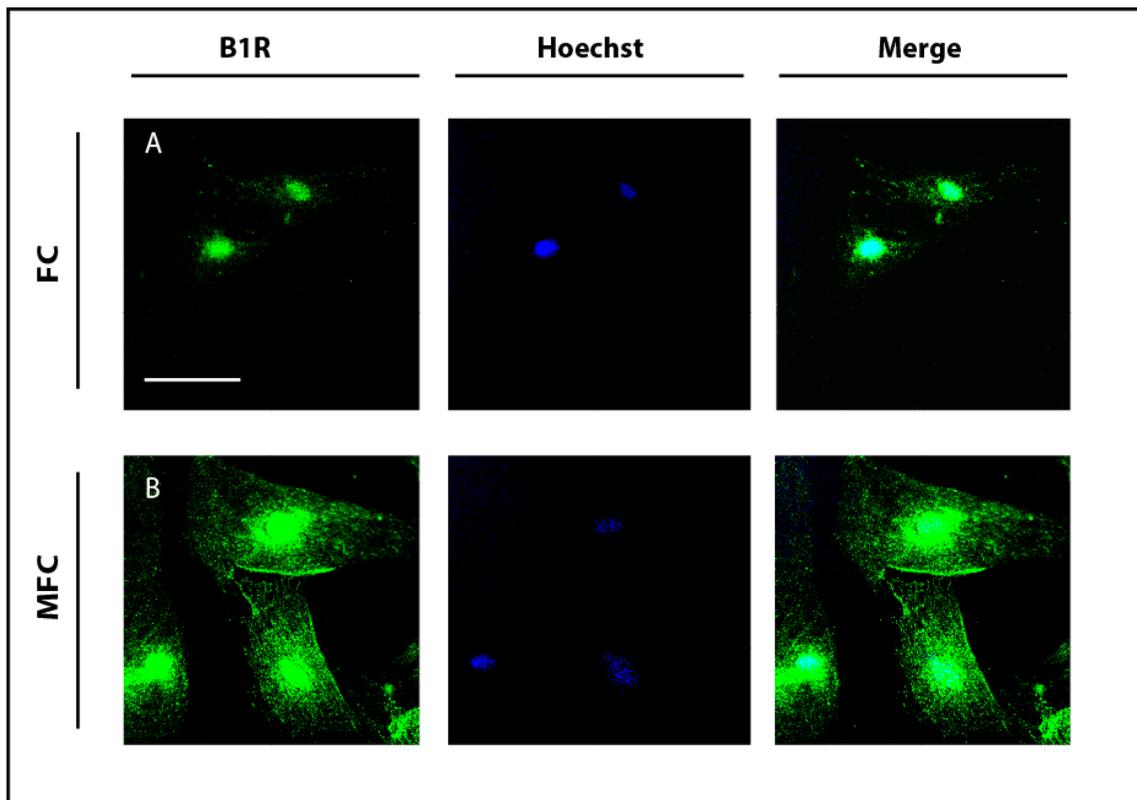


Figura 10. Inmunofluorescencia de B1R en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos. FC y MFC se fijaron y se permeabilizaron en un cubreobjeto. Se incubaron con anticuerpo primario contra B1R y posteriormente sometidos a un anticuerpo secundario ALEXA 488 verde y a una tinción de núcleo con Hoechst. La figura muestra en la fila A FC; columna B, MFC. Fotografías representativas de experimentos independientes n=4, tomadas por microscopio confocal resolución 40X (barra blanca = 50µm).

Por otro lado, y de acuerdo a estos resultados, se quiso identificar si efectivamente el receptor se encontraba a nivel nuclear, debido a que la marca fluorescente en ambos tipos celulares se concentró en dicho compartimento. Para ello, se realizó un fraccionamiento subcelular, separando los núcleos del resto del

contenido celular, en ambos tipos celulares. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 11, donde se observa que el B1R está presente en los núcleos de los FC y MFC. Como controles del fraccionamiento subcelular se identificaron proteínas exclusivas del núcleo (Lamin A/C y TFIIB), además de β -tubulina, utilizada como control del resto del contenido celular.

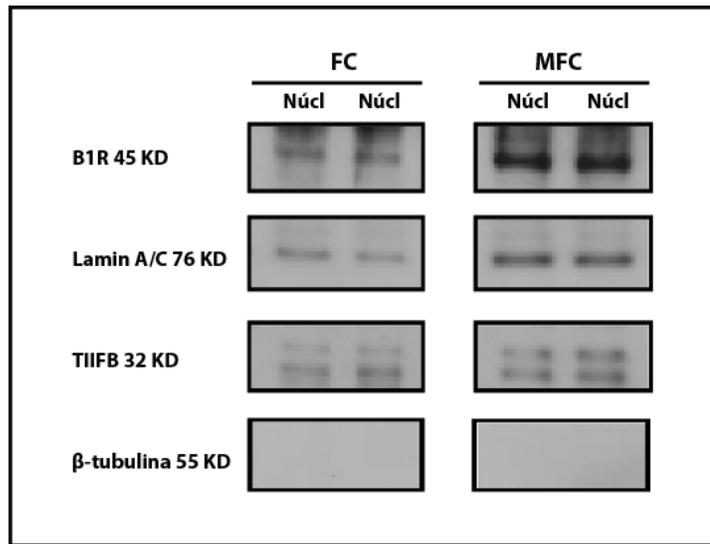


Figura 11. Fraccionamiento subcelular de fibroblastos y miofibroblastos cardiacos. Los FC y MFC se lisaron y se separó núcleos de FC y MFC del resto del contenido celular. Posteriormente, se realizaron WB contra B1R, Lamin A/C, TFIIB y β -tubulina con anticuerpos específicos. Núcl= núcleo. Experimentos independientes n=4.

Por otro lado, en la literatura se ha descrito que la acción del agonista específico del receptor B1R, promueve la expresión y presencia de este mismo en la superficie celular (73). Es por ello, que se evaluó el efecto del pretratamiento con DAKD, agonista específico del B1R, en la distribución intracelular del receptor. La figura 12A, evidenció que la estimulación con DAKD (100 nM) durante 30 minutos, produjo una redistribución de la marca fluorescente en FC, observándose tanto a nivel de la membrana celular como a nivel citoplasmático en comparación con los resultados observados en la figura 12A (ver flechas blancas). Por otro lado, en la figura 12B, se observó que DAKD, aparentemente, no modificó la distribución del B1R sobre los MFC en comparación a la figura 10B.

Además se realizaron controles del experimento que se observan en las figuras del anexo 2.

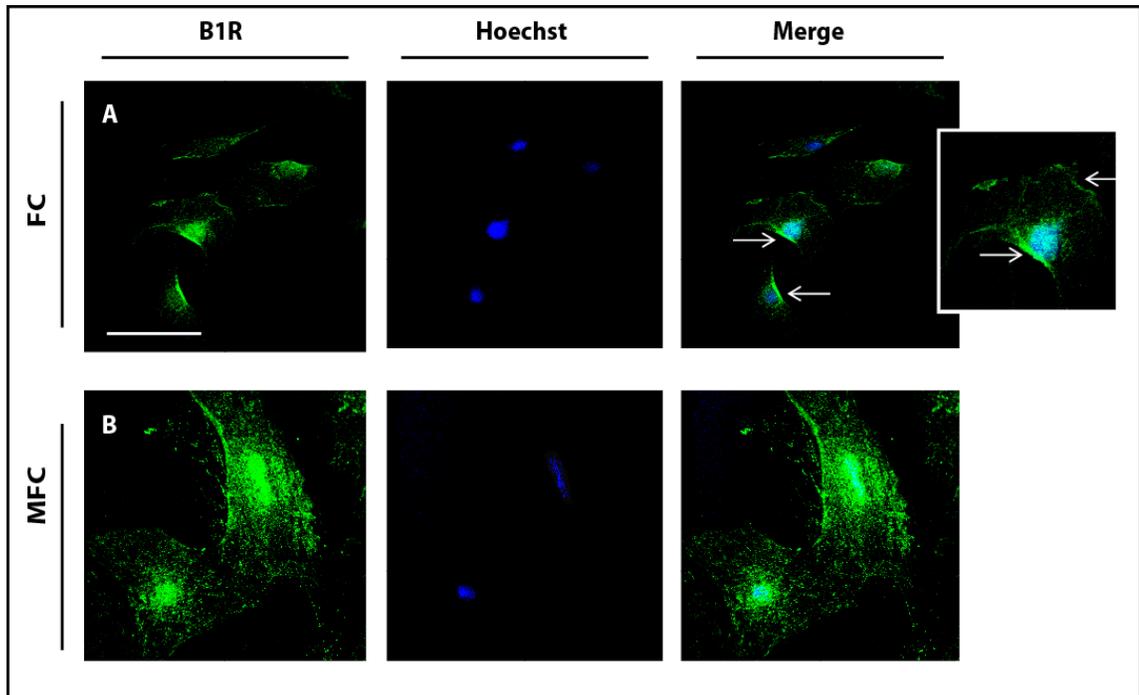


Figura 12. Inmunofluorescencia de B1R en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos tras la estimulación con DAKD. Los FC y MFC se trataron durante 30 minutos con DAKD, agonista de B1R. Posteriormente las células se fijaron y se permeabilizaron en un cubreobjeto. Se incubaron con anticuerpo primario contra el B1R y posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario ALEXA 488 verde y el núcleo se tiñó con Hoechst. La figura muestra en la fila A, FC; fila B, MFC. Fotografías representativas de experimentos independientes n=4, tomadas por microscopio confocal resolución 40X (barra blanca = 50µm).

5.1.2. Evaluación de la movilización intracelular de calcio mediada por activación del B1R y el B2R en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos.

Para evaluar las cinéticas de calcio intracelular ($[Ca^{+2}]_i$) en FC y MFC, las células se preincubaron con Fluo4-AM (5,4 µM), sonda sensible a calcio que permite identificar movimientos o incrementos relativos del calcio intracelular. En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos cuando se estimularon los FC y MFC con BK 100 nM. Tras la estimulación con el agonista del B2R (figura 13A y 13B) se observó

un aumento en la fluorescencia relativa de la sonda correspondiente a una señal de calcio tanto en FC como en MFC. Además, se preincubó con el antagonista específico del B2R, HOE-140 10 μ M, para caracterizar la señal de calcio producida por BK en ambos tipos celulares (figura 13C y 13D). Los resultados obtenidos mostraron que la señal de calcio producida por BK fue prevenida por la acción del antagonista. Por otro lado, se preincubó con el antagonista específico del B1R, Leu-8 10 μ M, donde se observó que los movimientos de calcio producidos por BK sobre los FC y MFC (figura 13E y 13F) persisten, siendo incapaz el antagonista de prevenirlos.

En forma adicional, en MFC se estudió el efecto en los movimientos de calcio intracelular frente a la acción de DAKD. Los resultados obtenidos mostraron que DAKD 100 nM provocó un aumento en la fluorescencia relativa de la sonda, representativo de que se generó una señal de calcio intracelular (figura 14A). Además, se preincubó con el antagonista del B1R, Leu-8 10 μ M mostrándose los resultados en la figura 14B. Este agente previno los efectos generados por DAKD, a diferencia de lo que sucedió cuando se preincubó con HOE-140, donde la señal de calcio provocada de DAKD persistió.

El mismo estudio de los movimientos de calcio generados por DAKD se realizó en FC. La figura 15A muestra que tras la estimulación de las células con el agonista de B1R no hubo un cambio en la fluorescencia relativa.

Por otro lado, y similar a los resultados obtenidos en la figura 12, se quiso evaluar el efecto del pretratamiento con DAKD sobre el aumento de la fluorescencia relativa. Para ello se preincubó durante 30 minutos con DAKD 100 nM, y posteriormente, se evaluó el movimiento de calcio por efecto del mismo agonista. Los resultados obtenidos (figura 15B) mostraron que la preincubación con DAKD dio origen a cambios en la fluorescencia relativa de la sonda representando una señal de calcio intracelular provocada por este agente sobre FC.

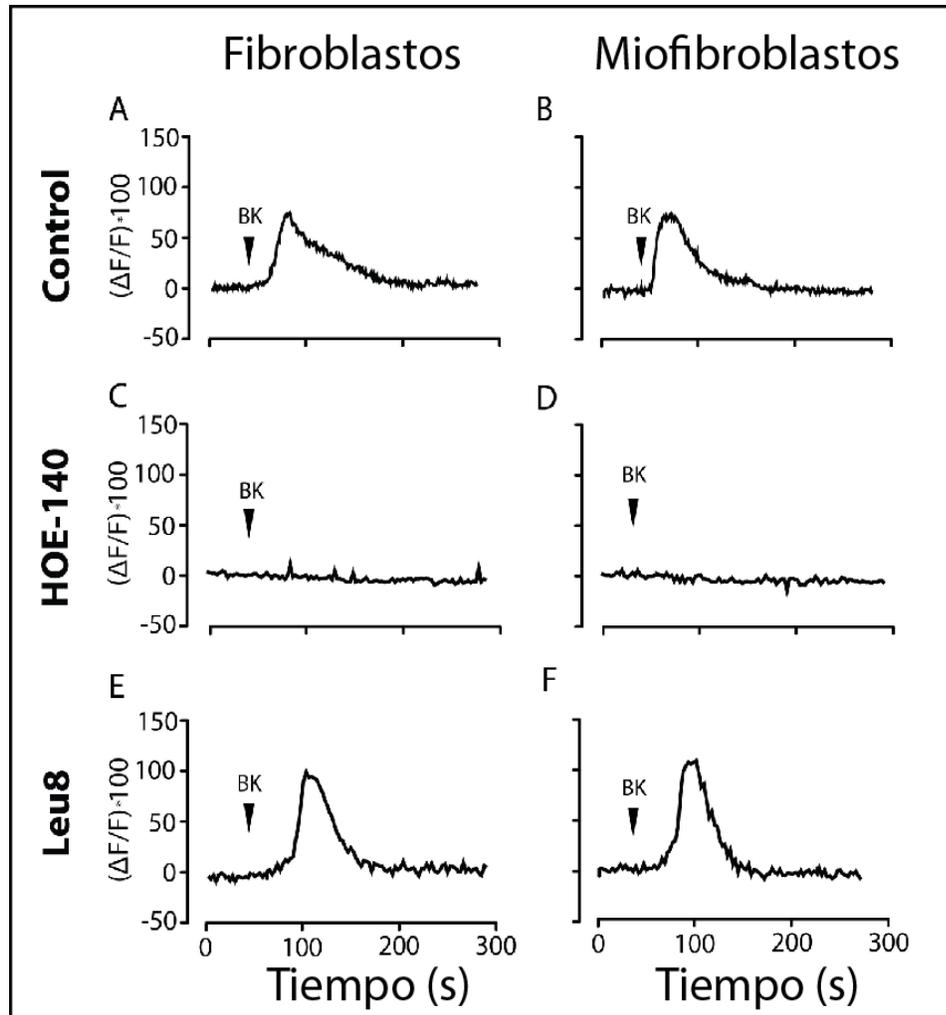


Figura 13. Señales de calcio intracelular en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos por acción de BK. FC y MFC se incubaron con Fluo4-AM (5,4 μ M) durante 30 minutos. A) FC estimulados con BK 100nM; B) MFC estimulados BK 100nM; C) FC preincubados con HOE-140 (10 μ M) y estimulados con BK (100 nM); D) MFC preincubados con HOE-140 (10 μ M) y estimulados con BK (100 nM); E) FC preincubados con Leu-8 (10 μ M) y estimulados con BK (100 nM); F) MFC preincubados con Leu-8 (10 μ M) y estimulados con BK (100 nM). Señal de calcio representada por fluorescencia relativa establecida como el promedio de la fluorescencia. Experimentos independientes n=3.

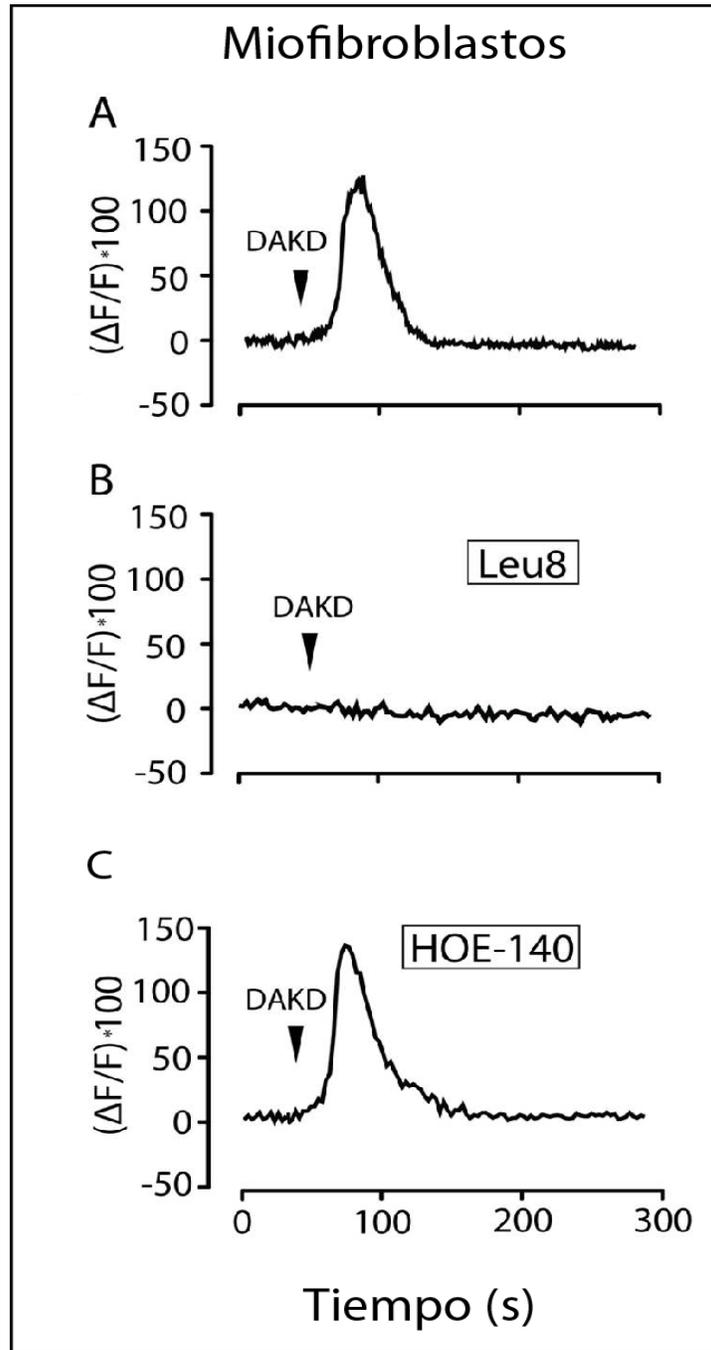


Figura 14. Señales de calcio en miofibroblastos cardiacos por acción de DAKD. MFC se incubaron con Fluo4-AM 5,4 μ M durante 30 minutos. A, MFC estimulados con DAKD 100nM; B, MFC preincubados con Leu-8 10 μ M y estimulados con DAKD 100nM; C, MFC preincubados con HOE-140 10 μ M y estimulados con DAKD 100nM. Señal de calcio representada por fluorescencia relativa establecida como el promedio de la fluorescencia. Experimentos independientes n=3

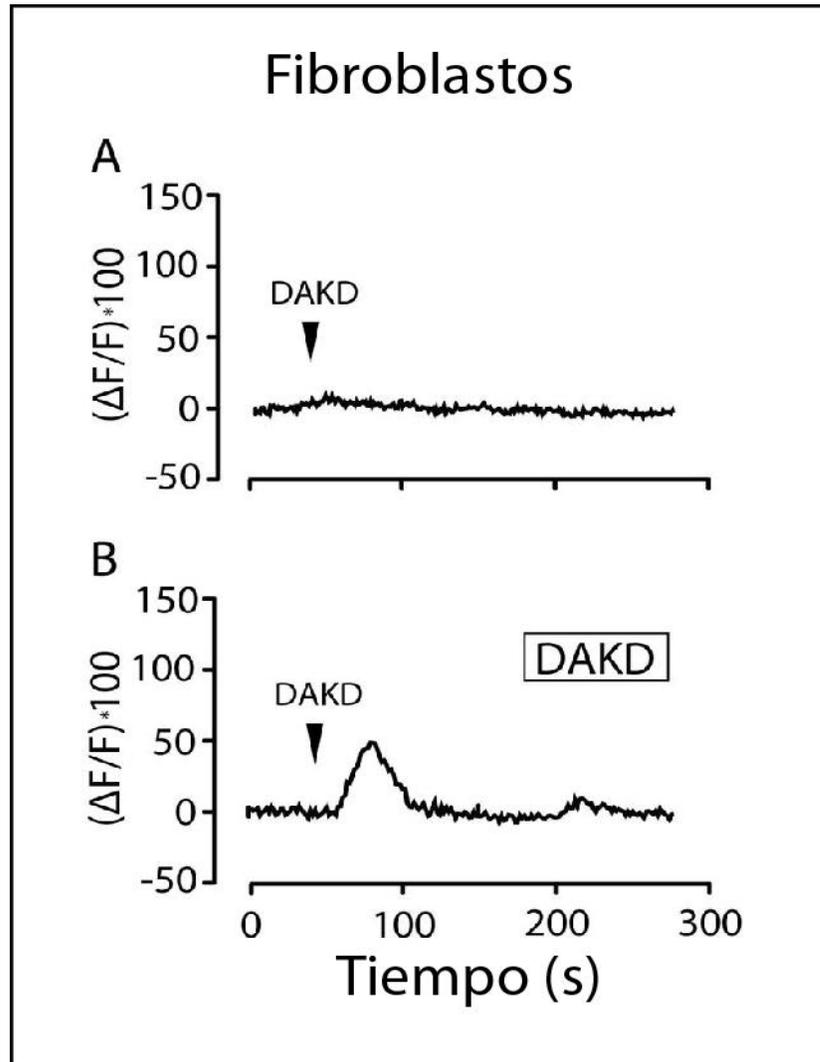


Figura 15. Señales de calcio en fibroblastos cardiacos por acción de DAKD. FC se incubaron con Fluo4-AM 5,4 μ M durante 30 minutos. A, FC estimulados con DAKD 100nM; B, FC preincubados con DAKD 100nM (30 min) y estimulados nuevamente con DAKD 100nM. Señal de calcio representada por fluorescencia relativa establecida como el promedio de la fluorescencia. Experimentos independientes n=5

5.2. Resultados relacionados al objetivo 2: Determinar las vías de señalización intracelular activadas por DAKD al interactuar con el B1R y su efecto en la expresión de colágeno I.

5.2.1. Determinación de los niveles de colágeno I en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos.

El colágeno I es la proteína más abundante dentro de las secretadas tanto por FC como por MFC, la cual requiere de ciertos cofactores para poder ser sintetizada, siendo el más importante de ellos el ascorbato (74). Para evaluar los niveles de colágeno I (Col I), se realizó un WB con un anticuerpo específico contra colágeno tipo $\alpha 1$. Para ello, los FC y MFC se incubaron durante un periodo de 48 horas en presencia de ascorbato de sodio (50 μ M). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 16, donde se observa que los MFC tienen niveles de Col I más altos que los FC, siendo la diferencia entre ambos tipos celulares estadísticamente significativa.

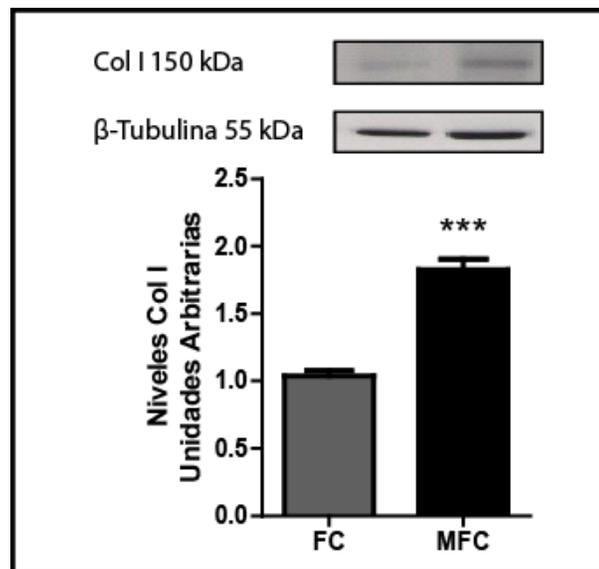


Figura 16. Niveles de Col I en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos. Se estimularon los FC y MFC con ascorbato de sodio 50 μ M. Posteriormente las células se lisaron para la obtención de proteínas las cuales se fraccionaron por SDS-PAGE al 6%. Después, se realizó el WB con anticuerpo específico para Col I. Experimentos independientes n=5 expresados por el promedio \pm SEM. ***p<0,001

5.2.2. Efecto de las cininas en los niveles de Col I en fibroblastos cardiacos.

Posteriormente se evaluó el efecto de las cininas mediado por sus receptores, en los niveles de colágeno en FC. Se realizaron ensayos a dos concentraciones y a dos tiempos distintos, donde los resultados obtenidos muestran que BK 1 μ M (después de 24 h) es capaz de disminuir los niveles de Col I cerca de un 30% con respecto al control (figura 17A), mientras que no se observó efecto con la concentración de 100 nM. Del mismo modo, BK (después de 48 h) reduce los niveles de Col I en un 30 a 40 % con respecto al control, a ambas concentraciones estudiadas (100 nM y 1 μ M), respectivamente (figura 17B).

Por otro lado, en FC también se estudió el efecto de DAKD, y los resultados muestran que durante las 24 h de incubación, este agonista no produjo un efecto en los niveles de Col I a ninguna de las concentraciones estudiadas (figura 17C). Sin embargo, a las 48 h de incubación, se encontró que a la concentración de 1 μ M, DAKD era capaz de reducir en forma estadísticamente significativa los niveles de Col I comparado con el control. Esta disminución fue cerca de un 25% (figura 17D).

Finalmente, estudiamos el efecto del pretratamiento con DAKD en los niveles de Col I en FC. Para ello se preincubaron las células con DAKD 100nM durante 30 minutos para luego ser tratadas con el mismo agonista a la misma concentración durante 48 h. Los resultados obtenidos mostraron que los niveles de Col I disminuyeron frente al pretratamiento con el agonista de B1R en aproximadamente un 45% comparado con el control el cual correspondía a células no tratadas (figura 18).

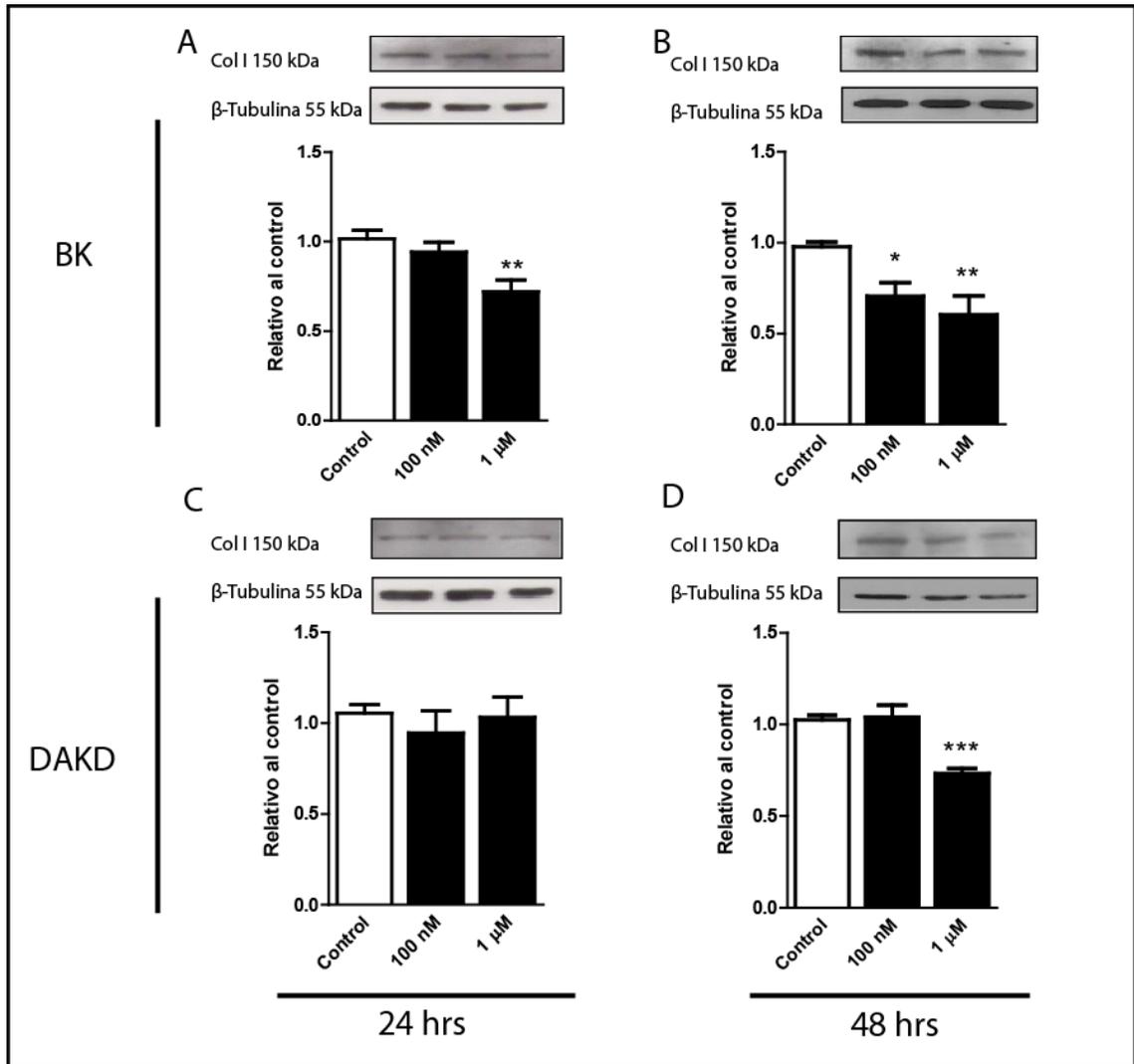


Figura 17. Efecto de cininas en niveles de Col I en fibroblastos cardiacos. Se preincubaron FC con ascorbato de sodio 50 μ M. Posteriormente, las células se estimularon por A, C, 24 horas o por B, D, 48 horas en distintas dosis de A, B, BK 100nM y 1 μ M y C, D, DAKD 100nM y 1 μ M. Las células se lisaron para la obtención de proteínas las cuales se fraccionaron por SDS-PAGE al 6%. Después, se realizaron los WB con anticuerpo específico para Col I. Experimentos independientes A, n=7; B, n=5; C n=5; D n=5 expresados por el promedio \pm SEM. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 vs Control (vehículo).

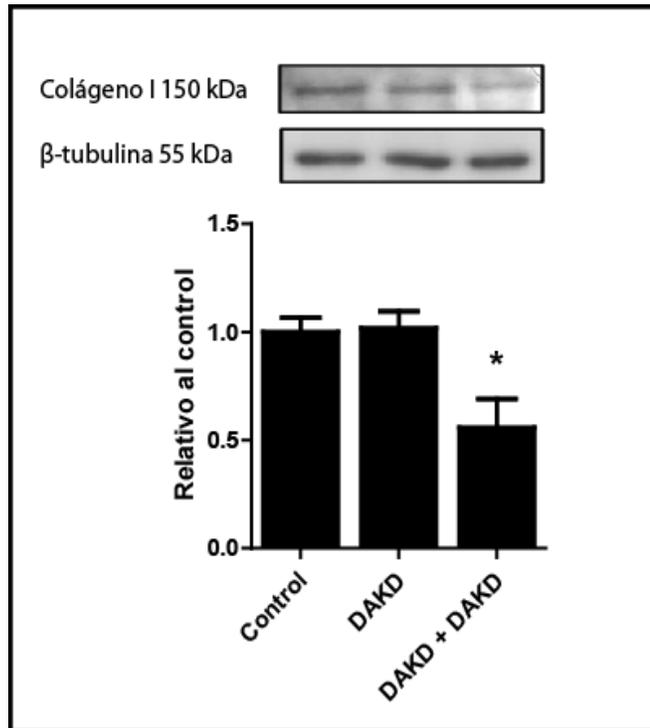


Figura 18. Niveles de Col I tras la estimulación con DAKD en fibroblastos cardiacos. Se preincubaron FC con ascorbato de sodio 50 μ M. Posteriormente, las células se estimularon durante 30 minutos con DAKD 100nM y luego se estimularon nuevamente con este agonista a la misma concentración por 48 h (columna D + D). Las células se lisaron para la obtención de proteínas las cuales se fraccionaron por SDS-PAGE al 6%. Después, se realizaron WB con anticuerpo específico para Col I. Experimentos independientes n=3 expresados por el promedio \pm SEM. *p<0,05 vs Control (vehículo).

5.2.3. Efectos de las cininas en los niveles de Col I en miofibroblastos cardiacos.

Al igual que en el punto 5.2.2, se evaluó el efecto de DAKD y BK en MFC en los niveles proteicos del Col I, de manera concentración y tiempo dependiente. Los resultados obtenidos mostraron que en los MFC, BK a las concentraciones de 100 nM y 1 μ M redujo los niveles de Col I a las 24 y 48 h en cerca de un 40% en forma estadísticamente significativa comparado con el control (figura 19A y 19B). Sin embargo, a concentraciones menores (10 nM) BK fue incapaz de inducir un cambio en la expresión de Col I.

Por otro lado, la estimulación de los MFC con DAKD por 24 h no modificó los niveles de Col I comparados con el control (figura 19C); mientras que a tiempos mayores de incubación (48 h), DAKD a concentración de 100 nM y 1 μ M, produjo una disminución estadísticamente significativa de alrededor del 40% comparada con el control, como muestra la figura 19D. A concentraciones bajas (10 nM), DAKD no modificó los niveles de Col I.

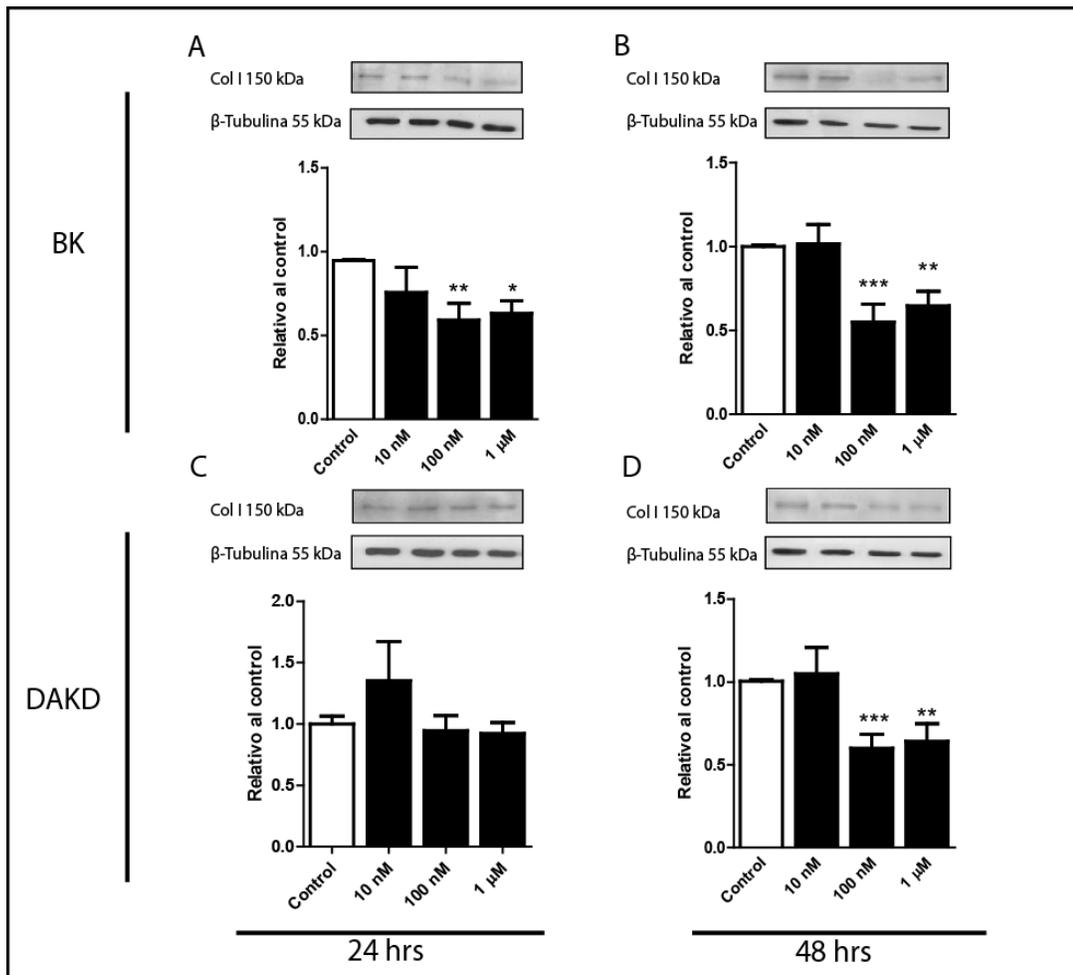


Figura 19. Efecto de cininas en niveles de Col I en miofibroblastos cardiacos. Se preincubaron MFC con ascorbato de sodio 50 μ M. Posteriormente, las células se estimularon por A, C, 24 horas o por B, D, 48 horas en distintas concentraciones de A, B, BK 10 nM, 100nM y 1 μ M y C, D, DAKD 10 nM, 100nM y 1 μ M. Las células se lisaron para la obtención de proteínas las cuales se fraccionaron por SDS-PAGE al 6%. Después, se realizaron los IWB con anticuerpo específico para Col I. Experimentos independientes A, n=8; B, n=8; C n=6; D n=10 expresados por el promedio \pm SEM. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 vs Control (vehículo).

En base a estos resultados, se determinó un protocolo estandarizado para poder evaluar la participación de cada uno de los componentes de la vía señalización activada por ambos receptores de cininas involucrados en la expresión de Col I (figura 20). Las células siempre fueron incubadas simultáneamente con ascorbato de sodio 50 μ M y con los distintos agonistas, ya sea DAKD o BK 100nM durante 48 horas en presencia/ausencia de distintos inhibidores y/o antagonistas. Los distintos inhibidores se agregaron al medio de cultivo de las células 30 minutos antes de estimular con las respectivas cininas; y 48 horas posteriores a la administración de las cininas, se recolectaron las proteínas y se realizó un WB contra Col I.

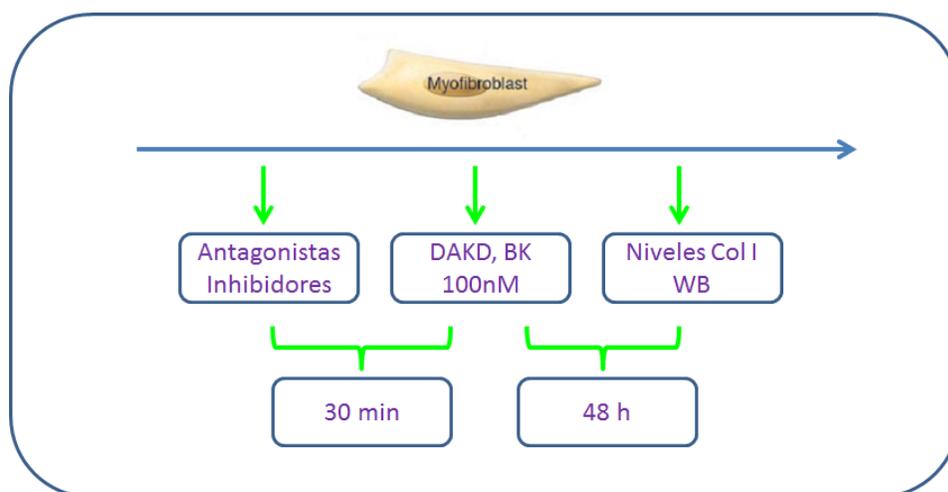


Figura 20. Esquema del protocolo de tratamiento de MFC para evaluar componentes de la vía de señalización involucrada en la reducción de los niveles de Col I.

5.2.4. Componentes de las vías de señalización activada por los receptores de cininas en miofibroblastos cardiacos.

En la figura 21, se muestra un diagrama que propone la vía de señalización intracelular activada por DAKD sobre el B1R en MFC; y de igual modo, ésta misma vía de transducción podría ser activada por BK. La activación de esta vía transduccional rio abajo de los receptores de cininas estaría participando en la disminución de los niveles proteicos de Col I.

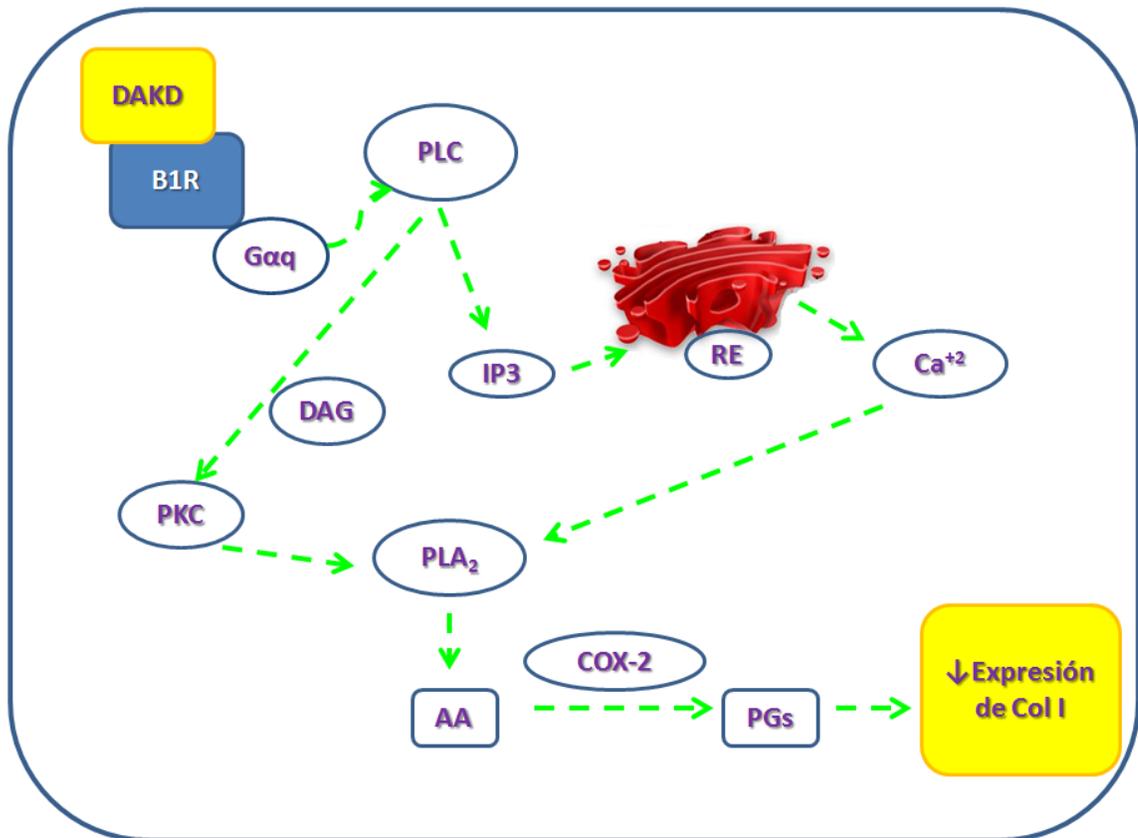


Figura 21. Esquema de los componentes de la vía de señalización intracelular de B1R propuesta en la disminución de Col I en miofibroblastos cardiacos. DAKD, agonista B1R. B1R, receptor B1 de cininas. Gαq, proteína Gq acoplada receptor 7 dominios transmembranas. PLC, fosfolipasa C. IP3, inositol trifosfato. DAG, diacilglicerol. RE, retículo endoplásmico. Ca⁺², calcio. PKC, proteína quinasa C. PLA₂, fosfolipasa A2. AA, ácido araquidónico. COX-2, enzima ciclooxigenasa 2. PGs, prostaglandinas.

5.2.4.1. Participación de B1R en la disminución de Col I producida por cininas en miofibroblastos cardiacos.

Para identificar la participación de B1R en la reducción de la expresión de Col I inducido por DAKD, se preincubaron las células durante 30 minutos con el antagonista específico de B1R, Leu-8 (10 μ M). La figura 22A, muestra que DAKD disminuye los niveles Col I en forma estadísticamente significativa con respecto al control. Este efecto, fue completamente bloqueado por Leu-8 (10 μ M) (barra gris). Por otro lado, la figura 22B muestra los resultados obtenidos tras la estimulación con BK (100 nM), donde se observó una disminución significativa en los niveles de Col I. Sin embargo, Leu-8 fue incapaz de bloquear el efecto de BK (barra gris).

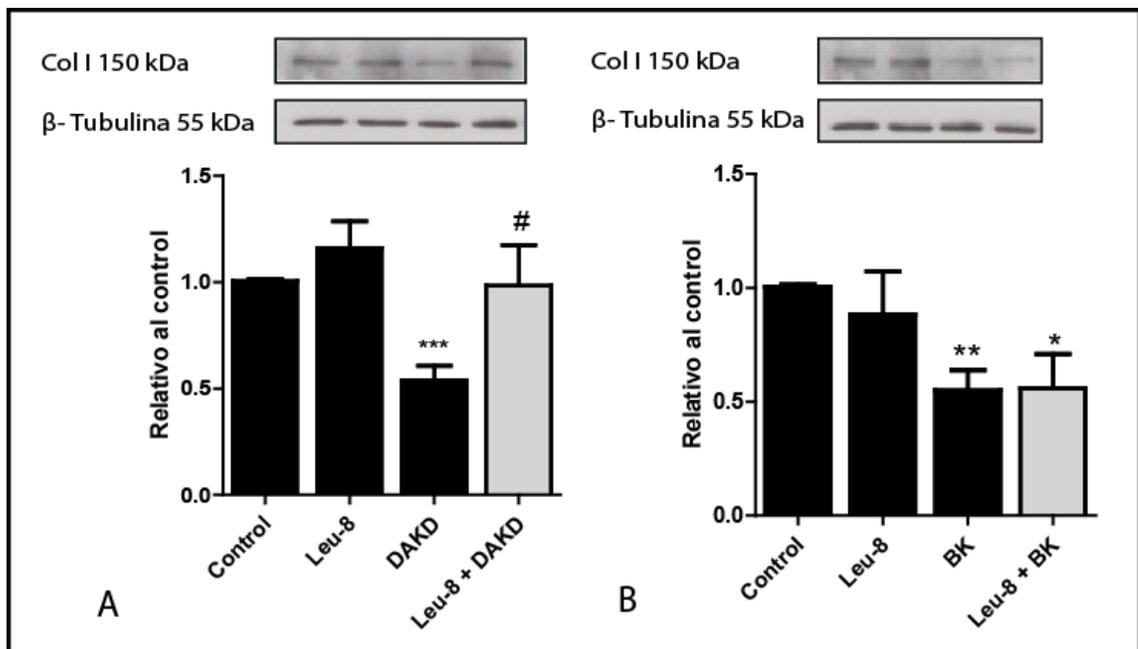


Figura 22. Participación de B1R en disminución de Col I en MFC. Se preincubaron MFC con antagonista específico para B1R, Leu-8 10 μ M. Posteriormente, se incubaron las células con A, DAKD 100nM o B, BK 100nM con ascorbato de sodio 50 μ M por 48 horas. Barras de color negro, estímulos por separados; barras de color gris, estímulos en presencia de antagonista. Las células se lisaron para la obtención de proteínas las cuales se fraccionaron por SDS-PAGE al 6%. Después, se realizaron los WB con anticuerpo específico para Col I. Experimentos independientes A, n=8; B, n=6 expresados por el promedio \pm SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs Control. #p<0,05 DAKD vs Leu-8 + DAKD.

5.2.4.2. Participación de PLC en la disminución de Col I producida por cininas en miofibroblastos cardiacos.

Inicialmente, se realizó un ensayo de viabilidad con el inhibidor inespecífico de las isoformas PLC, U73122 con el fin de determinar una concentración efectiva y no tóxica para inhibir a esta enzima. Los resultados de este ensayo se muestran en el Anexo 3, figura A, donde a todas las concentraciones estudiadas se produce la muerte celular de MFC. Como el tiempo incubación utilizado en los experimentos fue de 48 horas, la toxicidad de este inhibidor impidió observar la participación de PLC en la disminución de los niveles de Col I.

5.2.4.3. Participación de PKC en la disminución de Col I producida por cininas en miofibroblastos cardiacos.

Para evaluar a participación de PKC, se utilizó GÖ 6983 (100 nM), un inhibidor inespecífico de las isoformas de esta proteína ampliamente utilizado. Los resultados obtenidos (figura 23A), muestran que DAKD (100 nM), disminuyó los niveles de Col I comparado con el control; y dicho efecto fue prevenido con el inhibidor de PKC (barra gris). Además, BK (100 nM) indujo una disminución de los niveles de Col I comparado con el control; y dicho efecto también fue prevenido con el inhibidor de PKC en forma estadísticamente significativa como se muestra en la figura 23B (barra gris).

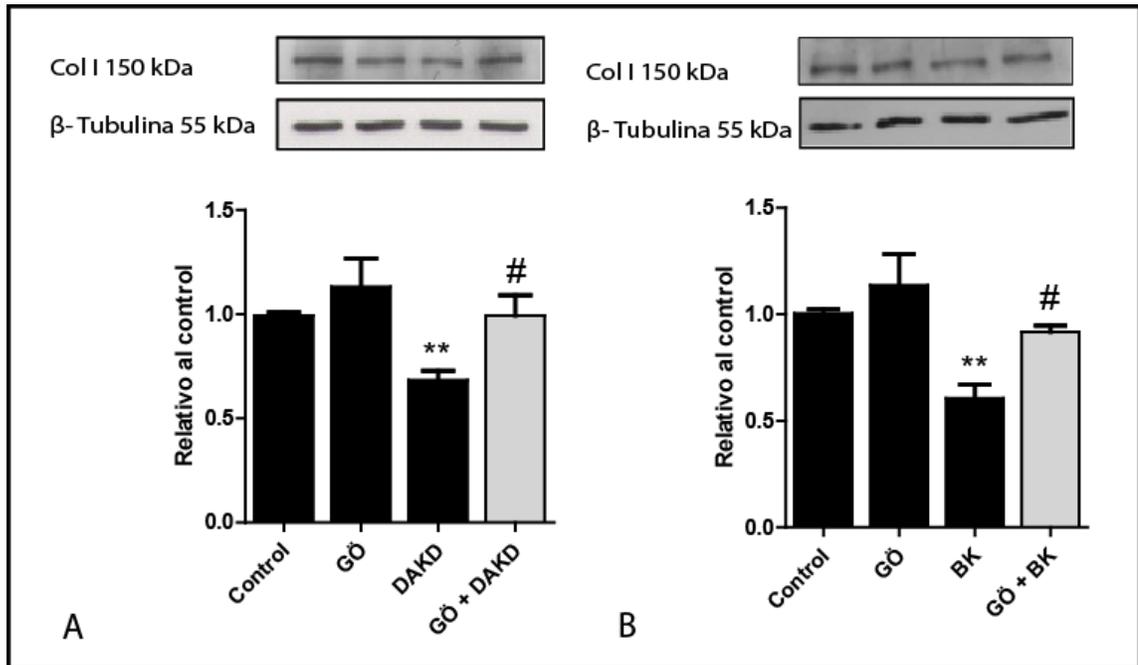


Figura 23. Participación de PKC en la disminución de los niveles de expresión de Col I en MFC. Se preincubaron MFC con el inhibidor inespecífico de las isoformas de PKC, GÖ6983 (100 nM) (GÖ). Posteriormente, se incubaron las células con A) DAKD (100 nM) o B) BK (100 nM) con ascorbato de sodio (50 μ M) por 48 horas. Barras de color negro, estímulos por separados; barras de color gris, estímulos en presencia de inhibidor. Las células se lisaron para la obtención de proteínas las cuales se fraccionaron por SDS-PAGE al 6%. Después, se realizaron los WB con anticuerpo específico para Col I. Experimentos independientes A, n=8; B, n=5 expresados por el promedio \pm SEM. * p <0,05; ** p <0,01 vs Control. # p <0,05 DAKD vs GÖ + DAKD y BK vs GÖ + BK.

5.2.4.4. Participación de PLA2 en la disminución de los niveles de expresión de Col I inducida por cininas en miofibroblastos cardiacos.

Para evaluar la participación de PLA2 en la vía transduccional por la cual las cininas inducen la disminución de los niveles de Col I, se utilizó metil araquidonil fluorofosfonato (MAFP), un inhibidor irreversible e inespecífico de las isoformas de esta fosfolipasa (75, 76). Primero, se realizó un ensayo de viabilidad celular con distintas concentraciones inhibitorias de MAFP para determinar una concentración efectiva y no tóxica. Los resultados (Anexo 3, figura C) mostraron que la incubación por 48 horas con concentraciones muy elevadas del inhibidor (20 μ M) eran letales

para los MFC. De acuerdo a este experimento, se determinó utilizar una concentración de 1 μ M, la cual corresponde a la concentración capaz de inhibir a PLA₂ (77) y que no disminuía la viabilidad celular.

Los resultados mostraron que la preincubación con MAFP (1 μ M) previene completamente la disminución inducida por DAKD (100 nM) en los niveles de expresión de Col I comparado contra el control (figura 24A). Este mismo efecto fue evidenciado cuando se utilizó BK (100 nM), cuyo efecto reductor de los niveles proteicos de Col I en MFC fueron prevenidos por el inhibidor de PLA2 (figura 24B).

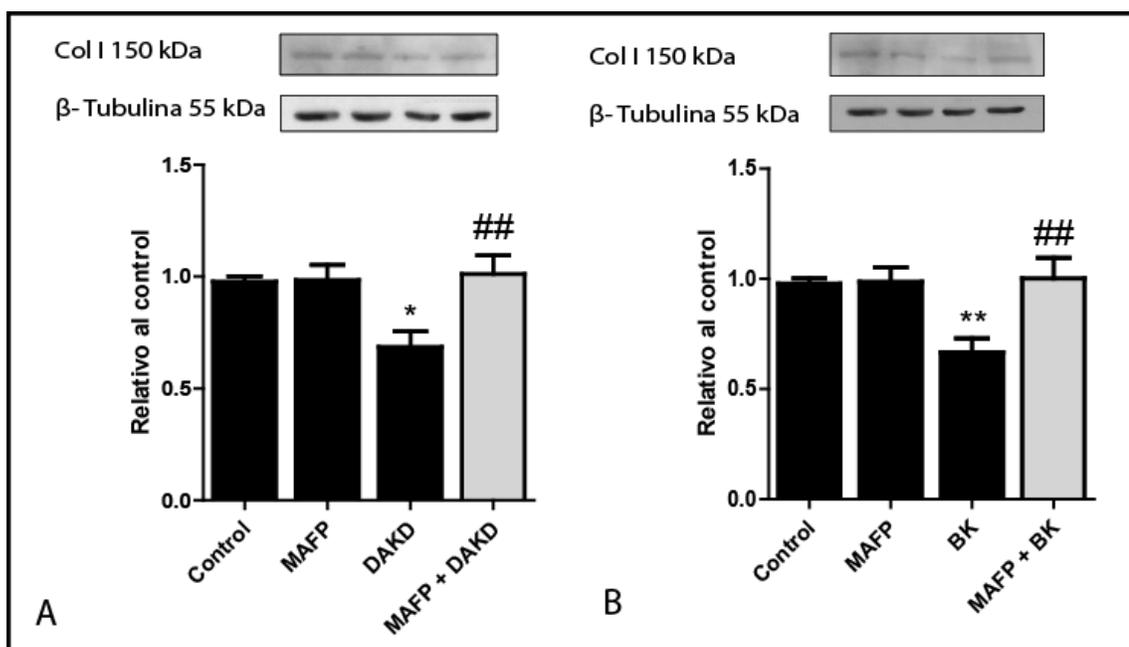


Figura 24. Participación de PLA2 en disminución de Col I en MFC. Se preincubaron MFC con el inhibidor inespecífico de las isoformas de PLA2, MAFP 1 μ M. Posteriormente, se incubaron las células con A, DAKD 100nM o B, BK 100nM con ascorbato de sodio 50 μ M por 48 horas. Barras de color negro, estímulos por separados; barras de color gris, estímulos en presencia de inhibidor. Las células se lisaron para la obtención de proteínas las cuales se fraccionaron por SDS-PAGE al 6%. Después, se realizaron los WB con anticuerpo específico para Col I. Experimentos independientes A, n=7; B, n=8 expresados por el promedio \pm SEM. * p <0,05; ** p <0,01 vs Control. ## p <0,01 DAKD vs MAFP+DAKD y BK vs MAFP+BK.

5.2.4.5. Participación de COX-2 en la disminución de Col I producida por cininas en miofibroblastos cardiacos.

Para determinar la participación de COXs, se comenzó con la utilización de indometacina (10 μ M), inhibidor inespecífico de estas enzimas. Los resultados obtenidos (figura 25A) mostraron que la disminución inducida por DAKD (100 nM) en los niveles de Col I fue prevenida completamente por indometacina (10 μ M) (barra gris). Asimismo, el efecto de BK (100 nM) en disminuir los niveles de expresión de Col I en MFC también fue prevenido por indometacina (10 μ M) (figura 25B).

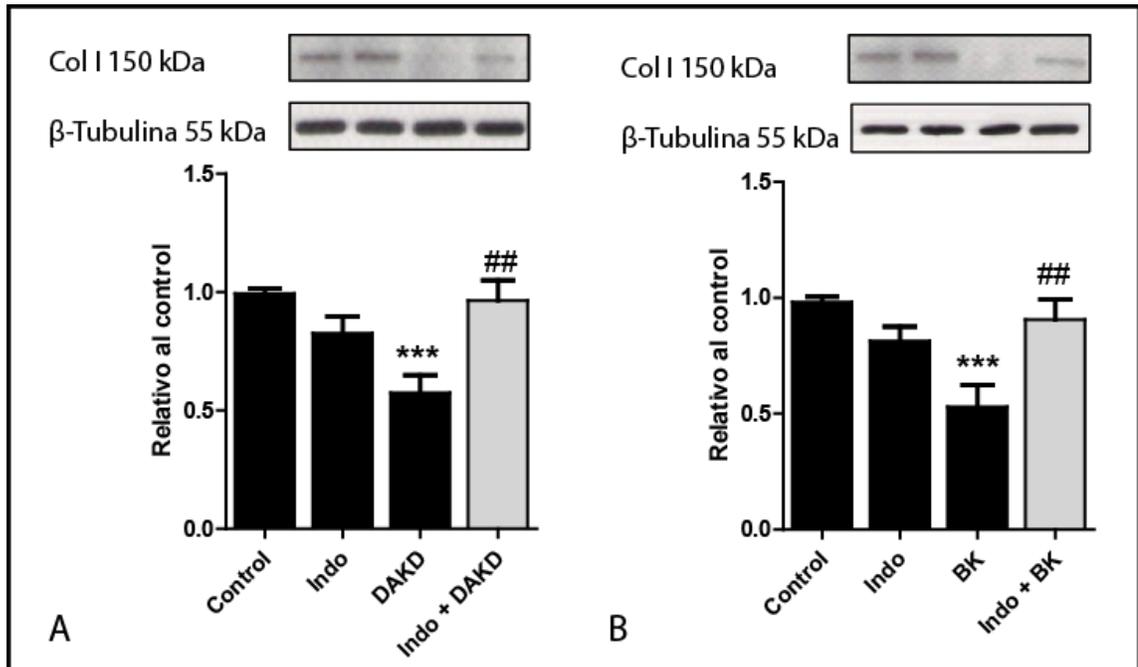


Figura 25. Participación de COXs en disminución de Col I en MFC. Se preincubaron MFC con el inhibidor inespecífico de COXs, indometacina 10 μ M (Indo). Posteriormente, se incubaron las células con A, DAKD 100nM o B, BK 100nM con ascorbato de sodio 50 μ M por 48 horas. Barras de color negro, estímulos por separados; barras de color gris, estímulos en presencia de inhibidor. Las células se lisaron para la obtención de proteínas las cuales se fraccionaron por SDS-PAGE al 6%. Después, se realizaron los WB con anticuerpo específico para Col I. Experimentos independientes A, n=7; B, n=9 expresados por el promedio \pm SEM. ***p<0,001 vs Control. ##p<0,01 DAKD vs Indo+DAKD y BK vs Indo+BK.

Por otro lado, se evaluó de manera más específica la participación de COX-2 utilizando Rofecoxib, un inhibidor específico de esta proteína. Inicialmente, se realizó un ensayo de viabilidad para establecer la dosis adecuada para inhibir COX-2 (78) la cual no fuera tóxica para las células. En el anexo 3, figura B, se muestra que ninguna de las dosis estudiadas fue tóxica para las células, por lo que se decidió utilizar 10 μ M de rofecoxib.

Los resultados observados tras la inhibición de COX-2 con rofecoxib (10 μ M), mostraron la completa prevención del efecto inducido por DAKD (100 nM) en la reducción de los niveles de Col I (figura 26A). De la misma forma, se observó que la disminución de Col I por BK (100 nM) también fue prevenida completamente por rofecoxib como muestra la figura 26B (barra gris).

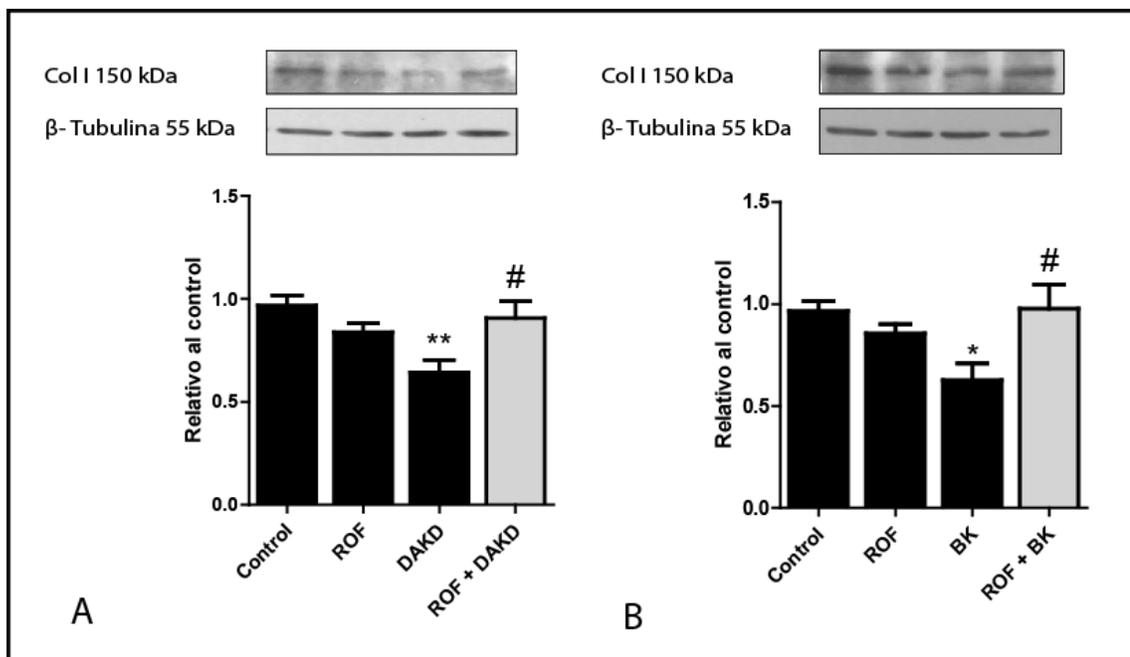


Figura 26. Participación de COX-2 en disminución de Col I en MFC. Se preincubaron MFC con el inhibidor específico de COX-2, Rofecoxib 10 μ M (ROF). Posteriormente, se incubaron las células con A, DAKD 100nM o B, BK 100nM con ascorbato de sodio 50 μ M por 48 horas. Barras de color negro, estímulos por separados; barras de gris, estímulos en presencia de inhibidor. Las células se lisaron para la obtención de proteínas las cuales se fraccionaron por SDS-PAGE al 6%. Después, se realizaron los WB con anticuerpo específico para Col I. Experimentos independientes A, n=7; B, n=7 expresados por el promedio \pm SEM. *p<0,05; **p<0,01 vs Control. #p<0,05 DAKD vs ROF+DAKD y BK vs ROF+BK.

De la misma manera, se determinó la participación de COX-1 con un inhibidor específico de esta proteína, SC-560 1 μM (79). Los resultados obtenidos mostraron que el efecto producido en la reducción de los niveles de Col I desencadenada por DAKD 100 nM (figura 27A) y por BK 100 nM (figura 27B) fue incapaz de ser prevenido por la acción del inhibidor de COX-1.

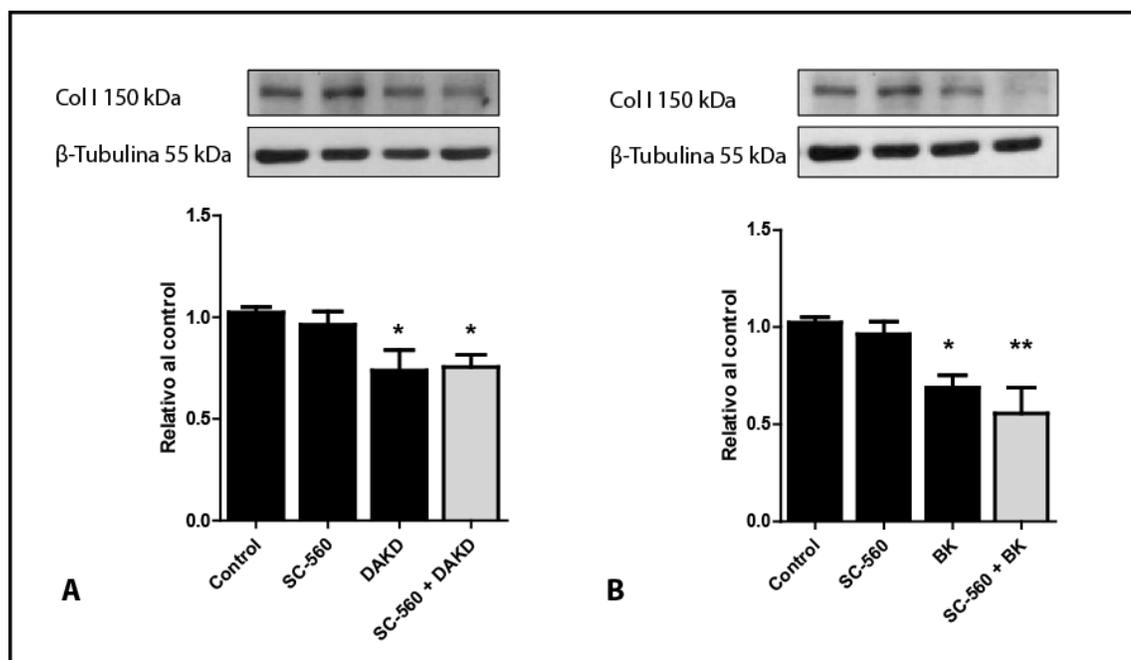


Figura 27. Participación de COX-1 en disminución de Col I en MFC. Se preincubaron MFC con el inhibidor específico de COX-1, SC-560 1 μM . Posteriormente, se incubaron las células con A, DAKD 100 nM o B, BK 100 nM con ascorbato de sodio 50 μM por 48 horas. Barras de color negro, estímulos por separados; barras de gris, estímulos en presencia de inhibidor. Las células se lisaron para la obtención de proteínas las cuales se fraccionaron por SDS-PAGE al 6%. Después, se realizaron los WB con anticuerpo específico para Col I. Experimentos independientes A, n=5; B, n=5 expresados por el promedio \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs Control.

5.2.4.6. Liberación de PGI₂ tras la estimulación de B1R y B2R por sus respectivos agonistas en miofibroblastos cardiacos.

El efecto de las cininas DAKD y BK en la producción de PGI₂ en MFC se evaluó por ensayos de ELISA, donde se determinaron los niveles del metabolito estable de esta prostaglandina, 6-ceto-PGF_{1α}. Los resultados mostraron que en MFC, DAKD (100 nM) y BK (100 nM) aumentaron la producción de 6-ceto-PGF_{1α} en un 50% y 80%, respectivamente comparado con el control (figura 28). Se utilizó LPS (1 µg/ml) como control positivo de la liberación de prostaglandinas. De acuerdo a la literatura LPS actuaría a través de inducir un aumento en la secreción de IL-1β, principal citoquina inductora de la producción de PGI₂ y PGE₂ (80).

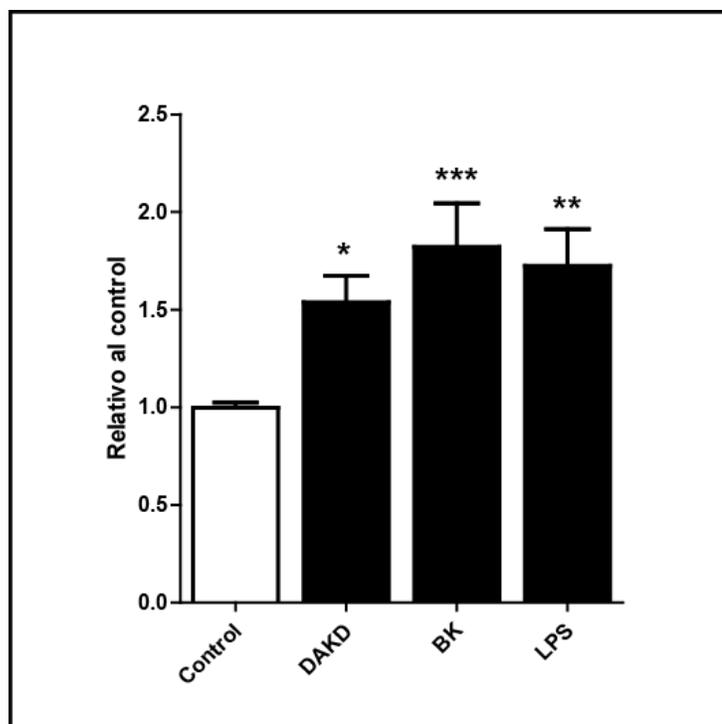


Figura 28. Liberación de PGI₂ por acción de las cininas en MFC. Se incubaron MFC con DAKD 100nM, BK 100nM y LPS 1µg/ml por 24 horas. Se tomaron los sobrenadantes de las células y se analizaron a través de ELISA. Se midió las concentraciones de 6-ceto- PGF_{1α} en los medios, metabolito estable de PGI₂. Experimentos independientes n=6 expresados por el promedio ± SEM. *p<0,05; **p<0,01 ***p<0,001 vs Control.

Por otro lado, se evaluó a través de la misma técnica de inmunoensayo, la liberación de PGE₂. A pesar de los buenos resultados obtenidos con la liberación de PGI₂, no se pudieron detectar diferencias en la producción de PGE₂ tras la estimulación con las cininas. Esto se debió principalmente a que los niveles registrados de esta prostaglandina estaban bajo el límite de detección establecido por el kit tanto para los controles como para las células estimuladas (resultados no mostrados).

5.2.4.7. Participación del receptor de prostaciclina en la disminución de los niveles de Col I producida por cininas en miofibroblastos cardiacos.

Finalmente, se evaluó la participación del receptor de prostaciclina (IPR) en la reducción de los niveles de Col I mediada por las cininas. Para ello se utilizó un antagonista específico de IPR, RO1138452 1μM, concentración utilizada en la literatura (81). Los resultados mostraron que los efectos provocados tanto por DAKD 100 nM (figura 29A) como por BK 100 nM (figura 29B) en la reducción de los niveles proteicos de Col I fueron prevenidos por la acción del antagonista específico de IPR (barras grises) en forma estadísticamente significativa.

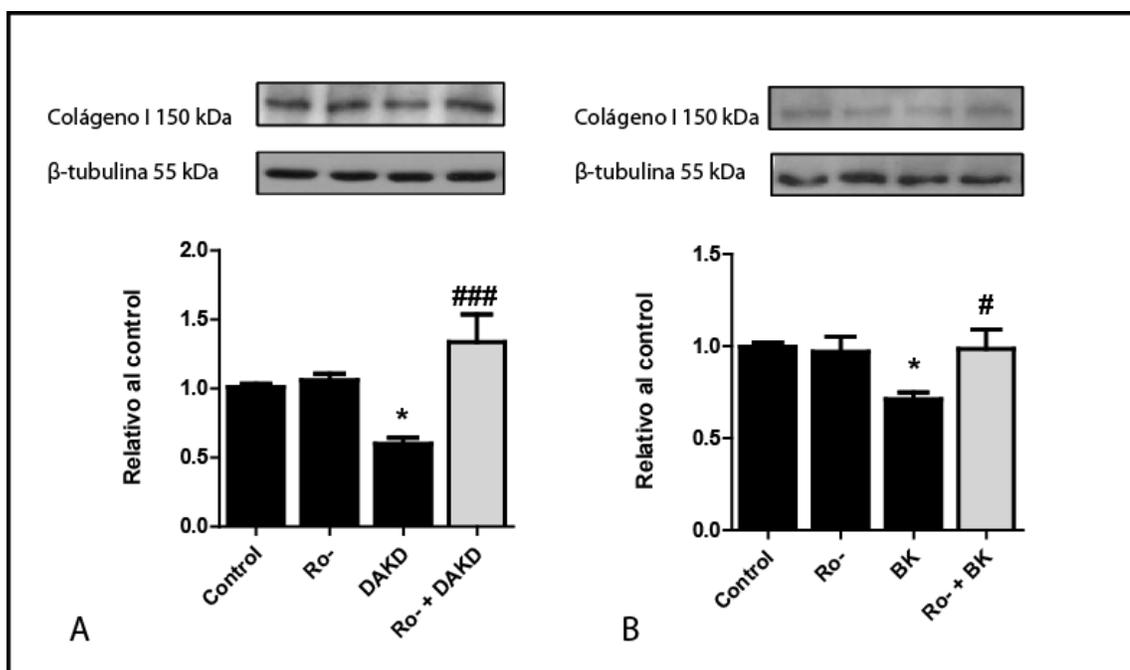


Figura 29. Participación de IPR en disminución de Col I en MFC. Se preincubaron MFC con el antagonista específico de IPR, RO1138452 1 μ M (Ro-). Posteriormente, se incubaron las células con A, DAKD 100nM o B, BK 100nM con ascorbato de sodio 50 μ M por 48 horas. Barras de color negro, estímulos por separados; barras de gris, estímulos en presencia de inhibidor. Las células se lisaron para la obtención de proteínas las cuales se fraccionaron por SDS-PAGE al 6%. Después, se realizaron los WB con anticuerpo específico para Col I. Experimentos independientes A, n=5; B, n=5 expresados por el promedio \pm SEM. *p<0,05 vs Control. #p<0,05, ###p<0,001 DAKD vs Ro- + DAKD y BK vs Ro+ BK.

6. Discusión

6.1. Utilización de cultivo de fibroblastos de ratas neonatas

La experiencia ha demostrado que la utilización de cultivos primarios de fibroblastos de ratas neonatas tiene ventajas experimentales por sobre la fibroblastos de rata adulta. Desde el punto de vista de la extracción de fibroblastos desde el corazón, los de origen neonato son aislados por las enzimas de digestión con mayor facilidad debido a que estas células están rodeadas por menor cantidad de MEC, comparada con las de origen adulto. Además, después de ser aisladas los FC, los neonatos proliferan con mayor rapidez que los adultos. Por otro lado, se ha establecido en la bibliografía, que dependiendo del origen etario de las células (edad del animal del cual provienen), éstas presentan cambios en su funcionamiento. En este sentido, se ha descrito que FC neonatos secretan mayor cantidad de colágeno y que además expresan en forma diferencial distintas integrinas que los FC adultos. Además, se ha observado que estos últimos tendrían potenciados sus efectos en la adhesión celular bajo distintos estímulos comparados con los neonatos (82). Asimismo, se ha descrito que FC neonatos tienen mayor expresión de α -SMA y de integrinas, además de presentar mayor capacidad contráctil, comparado con FC adultos (83). Finalmente, para los fines de ésta tesis, la mejor diferenciación de FC a MFC se logra mejor con FC de ratas neonatas, puesto que debido al menor tiempo de proliferación y de cultivo, se puede trabajar en menores pasajes celulares respecto de los FC de ratas adultas. Por otro lado, se ve disminuida la diferenciación espontánea de FC a MFC debido a que éstas células secretan TGF- β 1, quien de manera autocrina induciría la diferenciación celular la que se ve favorecida por largos períodos de tiempo de incubación y de pasajes celulares, como se ha demostrado en FC de ratas adultas (84). Aun así, estas últimas se utilizan ampliamente, representando un modelo más fidedigno desde el punto de vista de la edad del animal del cual provienen, ya que en la adultez es donde se presentan principalmente las diversas patologías.

La utilización de FC neonatos en esta tesis radicó principalmente en el bajo costo, la facilidad de obtención del cultivo celular, el tiempo de proliferación, la

facilidad de obtención de MFC, la repetitividad de los resultados, pero por sobre todo, las marcadas diferencias entre FC y MFC. Por otro lado, para los fines de ésta tesis el que los FC neonatos secreten más colágeno que los adultos hace más fácil observar diferencias entre los distintos estímulos, y por otro lado, los FC de ratas adultas requieren de un tiempo mayor de incubación con los distintos estímulos para haber podido observar las diferencias vistas en las células neonatas.

6.2. Presencia de receptores de cininas

De acuerdo a los antecedentes bibliográficos, la presencia de receptores de cininas en el tejido cardiovascular ha sido descrita previamente (1). Este trabajo aporta a este conocimiento en cuanto demuestra la presencia de B1R y B2R no solo en FC sino también en MFC.

En relación a B2R, nuestros resultados en FC son similares a lo establecido por el grupo de Minshall y cols., los cuales describieron la presencia de este receptor en FC de ratas neonatas y adultas (63). Sin embargo, nuestro grupo describió por primera vez la presencia del B2R en MFC. Por otro lado, y en relación al B1R, nuestros resultados mostraron niveles más elevados en MFC comparado con FC, los cuales son dependientes del tiempo de tratamiento con TGF- β 1. Este resultado sugiere que la sobreexpresión de este receptor se relaciona con el proceso de diferenciación de FC a MFC, lo cual fue sustentado por un aumento paralelo en la expresión de α -SMA.

De acuerdo a los antecedentes expuestos en la introducción, distintos agentes podrían estar influenciando el aumento del B1R en FC y en diferentes tipos celulares. En relación a la diferenciación de FC a MFC, se tiene conocimiento que el principal agente involucrado es TGF- β 1 (9, 20), factor de crecimiento que además tiene otras funciones como regular la expresión de distintas proteínas. En cuanto a la proteína α -SMA, esta corresponde a una de las proteínas que se expresan y se reorganizan intracelularmente una vez que los fibroblastos se diferencian a miofibroblastos (9). Se ha establecido que el B1R es inducible y que estaría

mediando la respuesta inflamatoria de manera crónica; mientras que el B2R al tener un carácter constitutivo, mediaría la respuesta inflamatoria aguda (85). Lo anterior podría correlacionar con la presencia de MFC en el tejido dañado, ya que estas células estarían asociadas a procesos patológicos, y específicamente en la reparación de las zonas dañadas en el corazón (9).

Por otro lado, en nuestro laboratorio se ha estudiado que la sobreexpresión del B1R por TGF- β 1 estaría sucediendo a través de la activación de diferentes vías de señalización intracelular activadas por el factor de crecimiento. Se ha determinado que la activación del receptor de TGF- β 1 de tipo 1 (T β R1) promueve la activación de vías no canónicas y que estas estarían involucradas en la sobreexpresión del B1R. Las vías transduccionales que participarían son las que activan las MAPK como JNK, P38 y ERK1/2. En forma adicional, otros estudios han descrito que estas tres MAPK activan a la familia de proteínas AP-1, factor transcripcional esencial para la activación del gen del B1R, y que tanto las vías ERK como p38 están relacionadas con la expresión génica del B1R (86). De manera similar, otro estudio demostró que p38 y JNK están críticamente involucradas en la regulación de la expresión del ARN mensajero del B1R, durante trauma vascular (51).

6.3. Localización subcelular del receptor B1 de cininas.

Distintas publicaciones han descrito la presencia y localización de los receptores de cininas principalmente en la membrana citoplasmática. Como se indicó anteriormente, se ha establecido que el B2R sería un receptor de carácter constitutivo sensible a la acción de su agonista BK, y su activación provocaría la generación de segundos mensajeros intracelulares los que activarían distintas proteínas quinasas que fosforilan residuos de serinas y treoninas en la cola citoplasmática carboxilo terminal. Esta fosforilación se traduce en la internalización del B2R junto a la participación de proteínas como la β -arrestina, los cuales posteriormente son reciclados o degradados por complejos lisosómicos (58, 87, 88). A este respecto, se ha establecido que la conservación de la hélice 8 intracelular en la región carboxilo terminal, sería importante para la interacción con la proteína G, y

en el proceso de internalización del B2R es crucial, debido a la fosforilación por distintas quinasas las que finalmente desencadenan el proceso de internalización (89).

Del mismo modo, y como se comentó anteriormente, en distintos tipos celulares se ha descrito que el B1R es inducible; y se ha establecido, en un estado fisiológico normal, la inexistencia o baja cantidad de B1R en membranas plasmáticas (29). Por otro lado, se ha descrito que la acción de agonistas específicos del B1R, provocarían la preservación de estos en la membrana, generando señales intracelulares, las cuales no activan fenómenos de internalización, debido a la falta de residuos fosforilables en la cola citoplasmática del B1R (44, 58).

Ya habiéndose establecido la presencia de este receptor en FC y MFC, nos enfocamos en estudiar y obtener los parámetros farmacológicos de B_{max} y K_d . Los resultados obtenidos mostraron que el B1R se encontraba en membranas plasmáticas de ambos tipos celulares, y a través de las curvas de desplazamiento demostramos que los MFC poseían mayor número de receptores respecto de los FC; sin embargo, los valores de K_d fueron similares. Por otro lado, los resultados de inmunolocalización nos mostraron que en fibroblastos, el B1R se encontraba principalmente a nivel citoplasmático, perinuclear y nuclear; patrón que también se observó en MFC, en los cuáles el B1R se encontraba marcadamente en la membrana celular. En forma adicional, nuestros resultados de fraccionamiento subcelular nos confirmaron que el receptor se encontraba presente en el núcleo de FC y MFC, corroborando los resultados obtenidos en los experimentos de inmunolocalización celular. Estos hallazgos mostraron cierta discordancia con los ensayos de radioligandos, principalmente en lo que compete a la existencia del B1R en las membranas plasmáticas de FC, debido a que utilizando este tipo de metodologías fue posible detectar la presencia del receptor en la membrana citoplasmática; mientras que por técnicas de inmunolocalización fue imposible discriminar su existencia en la membrana celular de los FC. La posible razón que explicaría esta discordancia, radica principalmente a las sensibilidades de las técnicas utilizadas, debido a que los ensayos de desplazamiento con radioligando son mucho más sensibles que otras técnicas para evaluar proteínas en membranas plasmáticas,

sugiriendo efectivamente la presencia del receptor a nivel de la membrana plasmática tanto en FC como en MFC.

La mayoría de los experimentos descritos en los antecedentes bibliográficos que se refieren a la activación de los receptores acoplados a proteína G (GPCR), se ha realizado con receptores localizados en la membrana citoplasmática, generando una cascada de respuestas intracelulares. Sin embargo, recientemente se ha establecido que varios GPCRs se localizan y señalizan en la membrana nuclear en diferentes tipos celulares como neuronas, hepatocitos y cardiomiocitos (90). En cardiomiocitos de rata adulta, se ha descrito la existencia de receptores α 1-adrenérgicos a nivel nuclear, los cuales han evidenciado que presentan señalización intranuclear y por tanto, una funcionalidad dentro de la célula, activando proteínas como ERK1/2 (91). Por otro lado, también se ha demostrado que los receptores β -adrenérgicos estarían localizados en el núcleo de cardiomiocitos, señalizando a través de diversas proteínas que tienen tráfico hacia esta estructura celular, como adenilato ciclasa (AC), PKA, PLC, lo que daría cuenta de la funcionalidad de estos receptores a nivel nuclear (92). En forma adicional, se ha establecido la existencia de receptores AT1 de Ang II y de receptores B2 de cininas en el nucleoplasma del núcleo de líneas celulares de pulmón (HEK293), los cuales se ubican en ésta estructura celular independiente de la acción de sus respectivos agonistas (93).

A pesar de los antecedentes, la presencia y la función de los GPCR en estructuras nucleares son poco claras en relación a los procesos celulares que ellos pueden regular. Respecto de su localización nuclear, se ha hipotetizado que la existencia de GPCR sucedería mediante la incorporación de estos al nucleoplasma a través de micelas, donde quedarían retenidos en la membrana nuclear para generar señalización en el núcleo celular (93). En relación a esto, la presencia del B1R en distintos compartimentos celulares estaría de acuerdo al comportamiento de algunos tipos de GPCRs. La función que tendría el B1R dentro del núcleo celular de FC y MFC, permanece desconocida, por lo que se requeriría de un estudio más acabado para encontrar dicha función.

6.4. Funcionalidad de receptores de cininas en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos.

La funcionalidad de los receptores de cininas en distintos tipos celulares, ha sido descrita mediante la observación de cambios a nivel intracelular de mediadores de la señalización de B1R y B2R, siendo uno de ellos el estudio de movimientos de calcio intracelular ($[Ca^{+2}]_i$). Se ha demostrado que la activación de los receptores de cininas induce un aumento transitorio de $[Ca^{+2}]_i$, en diferentes tipos celulares. Del mismo modo, se ha establecido que en las células de la musculatura lisa vascular, la estimulación del B2R trae consigo un incremento transitorio de $[Ca^{+2}]_i$ con una baja participación de Ca^{+2} extracelular ($[Ca^{+2}]_e$), indicando que se debe mayoritariamente a la liberación desde compartimentos intracelulares; mientras que la estimulación del B1R evidencia un aumento sostenido y significativo de $[Ca^{+2}]_i$ con una fuerte dependencia de $[Ca^{+2}]_e$ (44, 46).

Para estudiar la funcionalidad de los receptores de cininas en FC y MFC, las células se incubaron con una sonda sensible a calcio. Los resultados mostraron que BK (100 nM) era capaz de producir movimientos de $[Ca^{+2}]_i$ tanto en FC como MFC, sugiriendo la presencia y funcionalidad del B2R en ambos tipos celulares. Además, la señal de calcio provocada por BK se caracterizó mediante la utilización de antagonistas del B2R, Hoe-140 y del B1R, Leu-8. Los resultados establecieron que la señal de calcio producida por BK era exclusivamente a través del B2R. Estos resultados concuerdan con lo ya establecido en la literatura acerca de la presencia y función del B2R en FC. Sin embargo, en MFC no se había descrito la presencia y función de este receptor. Estos antecedentes corroboran que el B2R sería un receptor constitutivo.

Por otro lado, al estudiar los movimientos de $[Ca^{+2}]_i$ en MFC, los efectos de DAKD (100 nM) mostraron que hubo cambios en la fluorescencia relativa de la sonda, sugiriendo la presencia y funcionalidad de este receptor en estas células. Además, esta señal fue bloqueada por Leu-8, pero no por Hoe-140, indicando la especificidad de los agonistas sobre sus respectivos receptores. En FC, no hubo aumento de

[Ca²⁺]_i tras la estimulación con DAKD, lo que estaría sugiriendo que B1R, a pesar de estar en la membrana como se discutió en el punto 6.2, no sería funcional.

Cabe mencionar, que no se realizaron experimentos para caracterizar el origen de la señal de calcio, es decir si fue de origen, intracelular o extracelular; sin embargo, se ha demostrado ampliamente la participación al menos del calcio de origen intracelular en la activación de los receptores de cininas (44).

6.5. Relocalización y funcionalidad de B1R en fibroblastos cardiacos.

En términos generales, la activación de los GPCRs por sus agonistas desencadena una serie de efectos transduccionales que llevan a la activación de diversas proteínas intracelulares que gatillan variados efectos celulares. Estos receptores reclutan distintos agentes para finalizar la activación, tales como la β-arrestina que permite la redistribución de estas estructuras por efectos de desensibilización e internalización. En general, tras la estimulación se genera un tráfico fluido de receptores a nivel celular, llevándolos a procesos de degradación por complejos lisosomales o por el proteosoma, además de poder ser reciclados para su relocalización en la membrana plasmática (94). En este sentido, el B2R, es un receptor que tiene un determinado tráfico celular, provocado por su agonista, llevándolo a procesos de desensibilización e internalización, donde algunos han descrito que depende de proteínas como la β-arrestina (44), mientras que otros grupos han establecido que depende de caveolas (88). Por otro lado, existen algunos GPCR que sufren escasa desensibilización provocada por agonistas por la falta de residuos fosforilables en la cola citoplasmática, ejemplo de ello es el B1R (44). A pesar de ello, estos tipos de receptores sufren cambios de distribución dentro de las células provocados por la estimulación por sus propios agonistas, siendo fundamental a la hora de generar una respuesta celular.

De los resultados obtenidos en esta tesis, destaca que en FC, DAKD (100 nM) fue incapaz de inducir un aumento en el calcio intracelular (punto 6.2). En este sentido, y para determinar si la redistribución del receptor hacia la membrana plasmática podría dar cuenta de la funcionalidad del receptor, los FC se preincubaron

durante 30 min con DAKD, y luego se volvió a estimular con el mismo agonista, dando como resultado aumento de calcio intracelular. Además, por inmunofluorescencia, determinamos que la preincubación de FC con DAKD, agonista del B1R, cambiaba la marca fluorescente, dando cuenta de una mayor localización del receptor en la membrana plasmática. Estos resultados en su conjunto sugieren, que en FC el B1R está presente en distintas estructuras celulares incluso en la membrana plasmática; pero no tendría una funcionalidad aparente debido a que no se desencadenaría respuesta frente a una estimulación con el agonista específico del receptor hasta no alcanzar una concentración de receptor umbral en dicha membrana.

La posible razón de no observar señales de calcio provocadas por la acción de DAKD puede deberse a que la presencia de B1R en membrana plasmáticas es muy baja, siendo incapaz de provocar cambios significativos a nivel de señalización intracelular. Sin embargo, la preincubación con DAKD estaría produciendo redistribución del receptor aumentando su localización en la membrana para así producir efectos celulares, representados por señales de calcio. Desde este punto de vista, estos resultados son similares a los descritos por otros autores, aunque en otros tipos celulares. En este sentido, el grupo de Enquist y cols., encontraron que en líneas celulares de pulmón, la presencia del B1R estaría principalmente en compartimientos celulares (vesículas) y no en la membrana celular. A través de la activación del B1R con su propio agonista se estaría promoviendo el tránsito vesicular del receptor y esto estaría aumentando el número de receptores en la membrana celular permitiendo su exposición en la superficie celular. El principal argumento de este grupo, refiere a que en este tipo de células, la acción de DAKD impide que el B1R sea degradado por el proteosoma, ya que el receptor se encuentra constantemente bajo este proceso cuando está en estado inactivo y localizado intracelularmente (73). Además, bajo el punto de vista de la degradación de B1R a través del proteosoma, se ha descrito que este receptor requeriría la formación de homodímeros para poder salir del retículo plasmático y ser presentados en la membrana plasmática. Este reporte da cuenta que sería necesaria la formación de dímeros para la estabilización en la membrana plasmática de B1R y salir de la constante degradación que estaría sufriendo por parte del proteosoma (95). Por otro

lado, el mismo grupo reportó recientemente que B1R espontáneamente está bajo el proceso degradativo debido a que este se está internalizando constantemente sin previa estimulación. El agonista provocaría la estabilización en la membrana, pero no impediría la endocitosis del receptor, siendo este proceso participante de la señalización celular. Es por ello, que se ha descrito en algunos tipos celulares que B1R provocaría una señalización sostenida a diferencia de B2R, donde el proceso de activación mediada por el agonista, rápidamente genera la desensibilización del receptor (96). En forma adicional, se ha reportado que la acción de DAKD en células IMR-90 no solo aumenta la cantidad de receptores B1 en la superficie celular, sino que también induce su expresión (56). Asimismo, el grupo de Sabourin y cols., describió en células HEK 293 la observación de un patrón similar de distribución del B1R, evidenciándose el aumento de este receptor en la superficie celular tras la incubación con DAKD. Además, se describió que el tránsito vesicular estaría asociado a caveolas, específicamente a caveolina-1 (97). Estos hallazgos han sido fortalecidos por el estudio de la expresión del B1R en la superficie celular mediante la utilización de ligandos fluorescentes descrito en el trabajo del grupo Bawolak y cols., donde en células HEK 293 se ligaron distintos tipos de agonistas del receptor con fluoróforos, estableciéndose que la utilización de ellos en estas células, provocaba una distribución del receptor asociándose a caveolas y con un pequeño porcentaje de B1R internalizado (98).

A pesar de los antecedentes expuestos que fortalecen los resultados obtenidos en esta tesis, existen divergencias como las tratadas por el mismo grupo de Sabourin y cols., quienes en investigaciones previas, y en células de la musculatura lisa (SMC) de aorta de conejo, demostraron que la acción de un agonista de B1R no induce el aumento de éstos en la membrana plasmática (99). De la misma forma, Moureau y cols., describieron en cultivo primario de SMC humano que la acción de DAKD no tendría efecto en el aumento de B1R en la superficie celular (52).

Por otro lado, el tráfico celular de GPCR requiere de la participación concertada de distintos agentes, siendo de trascendental importancia para que este tipo de receptores sean expresados en la superficie celular y lleven a cabo las distintas funciones que les competen. En este sentido, se ha descrito recientemente

en la bibliografía que existirían distintas proteínas intracelulares que se unirían a GPCR con el fin de modificar la localización de estos en los diferentes compartimentos celulares, además de estabilizarlos en ellos. En relación a ello, se ha descrito en los receptores de calcitonina, que unirían ciertas proteínas llamadas RAMPs (proteínas modificadoras de la actividad del receptor) que tienen la capacidad de regular la expresión de estos receptores en la membrana plasmática. Estas proteínas accesorias, se asocian a un sitio alostérico de la cola citoplasmática de este tipo de receptor, permitiendo que sea glicosilado, estado que lo lleva a salir desde el retículo endoplásmico, estabilizándolo en la membrana plasmática (100). Asimismo, se han descrito otro tipo de proteínas que presentan dominios PDZ, las cuales se han observado que estarían también interactuando con GPCR, uniéndose en ciertas regiones de la cola citoplasmática permitiendo la estabilización de estos receptores en la membrana. Estos antecedentes, se han establecido principalmente en el sistema nervioso, específicamente en receptores de glutamato y serotonina, reflejando aumento en la respuesta mediada por estos neurotransmisores. Es más, se ha descrito que receptores que forman heterodímeros con dominios PDZ pueden generar sensibilidad heteróloga, aumentando la respuesta de uno de estos receptores por la unión de estas proteínas accesorias (100-102). En forma adicional, se han establecido la participación de GTPasas en la maduración de receptores encontrados en el sistema de Golgi. En este sentido, se ha descrito que la activación de la proteína Rab, estaría involucrada en promover que los receptores α -adrenérgicos sean expresados en la membrana plasmática (103).

En relación a los antecedentes expuestos, los resultados encontrados en esta tesis, reflejarían en parte que la activación de B1R desencadenaría cambios en su distribución, permitiendo la actividad de éstos en la membrana plasmática. Esto podría estar ligado, a que la acción del agonista de B1R estaría inhibiendo la constante degradación por parte del proteosoma, a que se podría estar favoreciendo la generación de homodímeros que llevarían a la salida de éste desde los complejos intracelulares, provocando la maduración de B1R, o la influencia de otros complejos de proteínas accesorias que llevarían a favorecer el aumento y la estabilización de este tipo de receptor en la membrana plasmática. Sin embargo, faltan estudios para

clasificar el porqué de estos resultados, los cuales quedan en pausa para futuras investigaciones.

Por otro lado, se encontraron divergencias entre la acción de los agonistas en promover el tráfico de B1R hacia la membrana plasmática, datos que nos sugieren que los efectos serían específicos para cada célula.

6.6. Efectos de las cininas en la expresión de colágeno I en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos.

En los reportes científicos se ha descrito ampliamente los efectos de las cininas y su participación en procesos fibróticos de algunos tejidos. En tejido pulmonar se ha establecido que las cininas tendrían un efecto proinflamatorio y profibrótico, estableciéndose que en las células pulmonares aumentarían los niveles de colágeno (31, 104, 105). Por otro lado, en el tejido cardiovascular, las cininas tendrían efectos cardioprotectores debido a que provocarían vasodilatación y disminución de procesos fibróticos, en el caso de producirse daño tisular, y se ha establecido que las cininas son capaces de disminuir los niveles de Col I y III, principales proteínas componentes de la MEC del corazón (106). A nivel celular, y específicamente en FC se ha descrito que tras la estimulación con BK, se gatilla una disminución de los niveles de mRNA y proteínas de Col I y III (61, 66).

En relación a los resultados obtenidos en esta tesis, se observó que los MFC presentan mayores niveles proteicos de Col I comparados con los FC, lo cual tiene concordancia con la literatura, la que señala una diferencia importante entre MFC y FC en cuanto a la producción de MEC, siendo la primera más secretora de estas proteínas (9). El tratamiento con las cininas evidenció que en MFC, la estimulación con BK al actuar sobre el B2R, era capaz de disminuir los niveles de Col I en aproximadamente un 40% comparado con células no tratadas. Este resultado fue en un amplio rango de concentración (nM y μ M), así como también de manera tiempo dependiente (24 y 48 h). En FC, la BK disminuyó el Col I a las 24 h a concentraciones micromolares, mientras que a las 48 h su efecto se observó a concentraciones nano y micromolares. Estos datos concuerdan con lo descrito en la bibliografía para BK en

los FC, donde se estudiaron los efectos de BK sobre estas células en los mismos rangos de concentración. Sin embargo, no se había establecido hasta ahora los efectos de esta cinina en MFC, resultados que se encuentran publicados por nuestro laboratorio (107). Por otro lado, al estudiar los efectos de DAKD sobre el B1R de manera concentración y tiempo dependiente, se observó una disminución de la expresión del Col I. La disminución de Col I fue cerca de un 40% comparado con células no tratadas. Sin embargo, en FC, DAKD solo fue capaz de producir una disminución significativa de Col I, a concentraciones altas (μM) y tiempo largos (48 h), comparados con células control. De acuerdo a lo discutido en los puntos 6.3 y 6.4, la estimulación de los FC por DAKD no presentó efectos celulares a concentraciones del orden nanomolar, en concordancia con lo descrito anteriormente. Los resultados observados en FC a concentraciones elevadas de DAKD, nos sugirió realizar experimentos de preincubación de las células con DAKD 100 nM, pensando que concentraciones elevadas micromolares podría estar redistribuyendo el B1R. Los resultados mostraron que a través de este tratamiento, hubo una disminución significativa de los niveles de proteína de Col I respecto de los FC no tratados y tratados con DAKD en una única concentración. En resumen, los resultados sugieren que en MFC, las cininas BK y DAKD, disminuyen los niveles de Col I comparados con células control y que estos efectos se producirían de manera concentración y tiempo dependiente. BK induce la reducción de Col I a tiempos tempranos de incubación lo cual permanece constante a tiempos mayores. Adicionalmente, DAKD produce el mismo efecto a tiempos mayores de incubación.

Los efectos diferentes en la disminución de Col I en MFC de ambas cininas, podría deberse a la presencia de distinto número de B1R en comparación con B2R en este tipo celular. El B1R tendría una baja presencia en la membrana celular comparado con B2R, por lo que BK estaría ejerciendo su efecto a tiempos más tempranos. De acuerdo a lo descrito en la literatura, y a pesar de que el B1R es inducible en una serie de tipos celulares, los niveles de este receptor permanecerían por debajo del número de receptores de B2R (48).

Por otro lado, el efecto en la disminución de los niveles de Col I en FC es diferencial a la hora de hablar de B1R o B2R, ya que en el primero se requiere de

una preincubación con el agonista para que el B1R esté disponible en la membrana plasmática, mientras que a través del B2R los efectos son inmediatos en este tipo celular.

Los hallazgos encontrados dan cuenta de que las cininas tendrían efectos reductores de MEC en FC y MFC, especialmente del Col I, que es la proteína más importante dentro del tejido cardiaco. Los resultados en MFC son la primera vez que se describen, contribuyendo al conocimiento de estas células, que en términos generales se han estudiado poco, pero que son de gran importancia a la hora de establecer la patogénesis de enfermedades como la fibrosis cardiaca. Estos datos han sido publicados recientemente por nuestro laboratorio (107).

6.7. Participación de componentes de la vía clásica de activación de los receptores de cininas en la disminución de la expresión de colágeno I en miofibroblastos cardiacos.

En relación al estudio de la activación de componentes de la cascada transduccional de los receptores de cininas, se ha visto que en líneas celulares la activación de éstos mediante sus agonistas específicos promueve, en tiempos cortos de tratamiento, la acumulación de inositol fosfato, indicando con ello la activación de la PLC y sus segundos mensajeros río abajo, es decir IP3 y diacilglicerol (89). Además, en FC la estimulación con BK ha mostrado aumentar también la producción de inositol fosfato (68). En forma adicional, se ha estudiado distintos componentes de la vía intracelular para evaluar la actividad de los receptores de cininas, como lo son la producción de NO, liberación de AA, producción de prostaglandinas y aumentos intracelulares de GMPc (61, 85, 108-110). Por otro lado, se ha estudiado ampliamente la funcionalidad de receptores de cininas mediante la observación de los cambios en los movimientos intracelulares de calcio, como se mencionó en el punto 6.2.

En relación a los componentes de las vías transduccionales que participan en la disminución de los niveles de Col I, se ha descrito en FC de rata adulta que la

activación de B2R por BK reduce el Col I con la participación de AA, COX y PGI₂ (66). Sin embargo en MFC, la información que se conoce es prácticamente nula.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, en primera instancia, se evaluó la selectividad de cada agonista sobre su respectivo receptor, observándose que la utilización del antagonista específico de B1R previno los efectos reductores del Col I provocados por DAKD, mientras que los efectos de BK se mantuvieron. Posteriormente, se utilizaron diversos inhibidores de los componentes de la vía transduccional activada a través de los receptores de cininas. En primera instancia, se utilizó un inhibidor de PLC, el cual fue letal para los MFC, no pudiendo evaluar la participación directa de esta proteína en los efectos de las cininas en la reducción de la expresión de Col I. Sin embargo, a través de los resultados obtenidos de la estimulación de las células con las cininas para evaluar las señales de calcio, se puede deducir que PLC estaría participando de la activación de los receptores debido a que es necesario un aumento de IP₃, producto de la activación de PLC, para producir liberación intracelular de calcio desde los reservorios del retículo endoplasmático, como describe la literatura para la activación de los receptores de cininas (44). De igual forma, la participación del calcio tampoco se evaluó directamente debido a que el tratamiento de las células con quelantes de calcio por largos periodos de tiempo, produce muerte celular. Por otro lado, se estableció que cuando se preincubaron MFC con inhibidores de PKC y PLA₂, los efectos provocados por BK y DAKD en la disminución del Col I fueron prevenidos, evidenciando la participación de estas proteínas en la reducción de la expresión de Col I. Asimismo, se quiso establecer la participación de COX-2 en el proceso, para lo cual se utilizaron tres inhibidores. En primer lugar, se usó un inhibidor inespecífico de COX, indometacina, y la preincubación de las células con este agente impidió los efectos de las cininas sobre la reducción de los niveles de Col I. Además, para establecer la participación exclusiva de COX-2 en la activación de la vía transduccional de los receptores de cininas, se utilizó un inhibidor específico de esa isoforma, rofecoxib, el cual previno los efectos de las cininas en la reducción del Col I. Por otro lado, para determinar que COX-1 no participaba del efecto de las cininas, se utilizó un inhibidor específico de esta proteína, SC-560, el cual fue incapaz de

impedir la acción de las cininas en MFC en la disminución del Col I. De acuerdo a estos resultados, sólo COX-2 participaría en la vía de activación de los receptores de cininas que reducen los niveles de expresión de Col I. En este sentido, en nuestro laboratorio se ha establecido en FC y MFC, mediante WB, la presencia de COX-2, siendo estadísticamente mayor en MFC, dando cuenta del carácter inducible de esta proteína. Por otro lado y en relación a COX-1, los antecedentes de nuestro laboratorio establecen que esta enzima no se encuentra presente en MFC, corroborando los resultados obtenidos (107).

Por otro lado, uno de los productos de la enzima COX-2 es la producción de prostaglandinas como la prostaciclina (PGI_2). La activación de B1R y B2R desencadena al final aumentos en los niveles de PGI_2 , por lo que se decidió estudiar el efecto de las cininas en la producción de elementos inflamatorios. Nuestros resultados mostraron que tanto DAKD como BK fueron capaces de aumentar la liberación de PGI_2 desde MFC; mientras que los niveles de PGE_2 , otra prostaglandina que pudiera estar participando en el proceso, estaba por debajo del límite de detección de la metodología utilizada. Estos resultados sugieren por un lado, que en MFC, la activación de B1R y B2R no promovería la liberación de esta prostaglandina, y por otro lado, que la producción basal de PGE_2 sería mínima en este tipo celular

Finalmente, al evaluar la participación de los receptores de prostaciclina (IPR) en la disminución de los niveles de Col I, nuestros resultados mostraron que al ocupar un antagonista específico de este receptor, los efectos de DAKD y BK sobre los niveles de Col I fueron prevenidos, dando cuenta de su participación en la vía transduccional. En relación a lo reportado en la bibliografía, Gallager y cols., describieron que en FC, los efectos de BK fueron prevenidos con indometacina. Además, se describió que BK promovía la liberación de PGI_2 (66). Sin embargo, en MFCs no se habían descrito estos efectos.

A nivel del tejido cardíaco se ha sugerido que el efecto de las cininas sería principalmente de tipo antifibrótico tanto in vitro como in vivo (61, 66, 106). Por otro lado, se ha estudiado que B1R y B2R (en distintos tipos celulares), comparten la

misma vía transduccional, la cual estaría descrita por la activación río abajo de proteínas como PLC/PKC/PLA2/COX-2, las que llevan a la liberación de prostaglandinas, además de la liberación de óxido nítrico por la activación de las enzimas eNOS e iNOS (45), las cuales también han sido descritas como las vías clásicas de activación intracelular. En relación a lo establecido en la literatura, no solo se ha establecido la liberación de elementos inflamatorios como las prostaglandinas, sino que también la liberación de NO por FC (61). Antecedentes de nuestro laboratorio han demostrado que en relación a las NOS, iNOS solamente estaría presente en FC. Por otro lado, la proteína eNOS, no se presentaría ni en FC ni en MFC (107). La acción de las cininas BK y DAKD en MFC estaría disminuyendo la secreción de Col I solo a través de la participación de COXs, ya que los inhibidores de iNOS fueron incapaces de bloquear el efecto de estos péptidos (107). Estos datos, están de acuerdo con los hallazgos de esta tesis, en relación a la participación de COX-2, ya que solo esta enzima estaría en MFC. Sin embargo, se ha demostrado que la acción de BK en FC estaría reduciendo la secreción de Col I a través de la participación de COXs (1 y 2), mediante la utilización de indometacina para inhibir esta proteína, y también a través de iNOS, donde se utilizó un inhibidor inespecíficos de NOS, L-NAME y un inhibidor específico de iNOS, 1400W (107). Estos resultados indicarían que en FC tanto el NO como la PGI₂ serían los mediadores responsables de disminuir la síntesis de Col I. En su conjunto estos resultados remarcan las notables diferencias que existirían entre FC y MFC en la disminución de Col I, inducido por las cininas. A pesar de estos hallazgos, hace falta estudiar en más detalle si las COXs estaría efectivamente participando en la disminución de los niveles de Col I en FC y además si sería la misma vía transduccional la involucrada en la liberación de NO. Además, estos resultados solo muestran una aproximación a la vía transduccional clásica activada por cininas, debido a que no se determinó la temporalidad de la activación de cada componente estudiado. Para ello, habría sido necesario evaluar la actividad o la producción de distintas sustancias por cada uno de éstos tras la activación de los receptores de cininas por sus agonistas específicos

Por otro lado, en la literatura se han descrito muchos trabajos en los cuales se destaca la importancia que tendría la participación de COX-2 en la síntesis de

prostaglandinas que favorecen los procesos antifibróticos. En este sentido, se ha descrito que la acción de COX-2 induce un aumento de los niveles de PGE₂ y PGI₂ (66, 111). En relación a la primera, se ha descrito en fibroblastos de pulmón que PGE₂ estaría provocando supresión de la proliferación y de la producción de colágeno (112). Además, se ha demostrado que el engrosamiento de las paredes pulmonares y con ello la fibrosis pulmonar, se relaciona con la supresión de la expresión de COX-2 y de la síntesis de PGE₂ (113, 114). Del mismo modo, Kolodsick y cols., describieron que en líneas fibroblastos pulmonares, el tratamiento con PGE₂ era capaz de inhibir la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, inducida por TGF-β1, lo que correlaciona con una disminución en la síntesis de MEC (115). Por otro lado, en otros tejidos, se ha estudiado que los efectos de PGE₂ serían los mismos a los observados en el pulmón. De manera análoga, en células de las cuerdas vocales, esta misma prostaglandina disminuiría la secreción de colágeno y la tasa de migración celular, efectos que previenen la fibrosis de ese tejido (116). En el tejido cardiovascular también se han descrito efectos beneficiosos de PGE₂. En cardiomiocitos de rata neonata, los efectos de esta prostaglandina serían de carácter hipertrófico. Mendez y cols., describieron que el tratamiento de estas células con PGE₂ aumentaba los niveles de proteínas contráctiles. Estos efectos se relacionaban con procesos inflamatorios y se observó un aumento en la expresión de COX-2. Además este mismo grupo, describió que en FC, que los efectos de esta prostaglandina era mínimos debido a una baja producción basal (80). Por otro lado, Harding y cols., han estudiado que la PGE₂ (a tiempos cortos de tratamiento) produce un aumento trascendental de la proliferación celular de los FC neonatos, lo cual estaría conduciendo a un aumento en la síntesis de colágeno (117). En relación específicamente a estos antecedentes en FC, podemos decir que los resultados de esta tesis en MFC, sugiere que en ambos tipos celulares PGE₂ no sería secretado y aparentemente no tendría efectos antifibróticos.

En relación a la producción de PGI₂, se ha descrito en el tejido renal y cardiaco, que esta prostaglandina sería importante para la mantención del órgano, ya que la ausencia de COX, disminuye los niveles de PGI₂, generado diversos problemas en el tejido dentro de los cuales está la formación de fibrosis (118). Por

otro lado, en líneas celulares de piel se ha descrito que análogos de esta prostaglandina suprimen procesos fibróticos, específicamente disminuyendo los niveles de colágeno (119). Se ha establecido en el tejido pulmonar, que la presencia de PGI₂ previene la fibrosis mediante la disminución de infiltrados inflamatorios al tejido como también disminuyendo los depósitos de colágeno (120). En forma adicional, se ha establecido que la acción de agentes inhibidores específicos de COX-2 tendrían un efecto deletéreo a nivel cardiovascular radicado principalmente por el desacople de esta enzima con PGI sintasa, proteína encargada de la producción de PGI₂ (121).

Además de lo expuesto anteriormente, se ha establecido que la liberación de estos prostanoides tendría un efecto diferencial en las células mesenquimáticas, como lo son los fibroblastos. En estas células, PGE₂ estaría actuando a tiempos tempranos promoviendo la fase inflamatoria de la cicatrización de la herida y secundariamente, activando los fibroblastos. Por otro lado, PGI₂ estaría siendo liberado a tiempos más largos, antagonizando los efectos secretores que se producen por la inhibición de los fibroblastos activados vía MAPkinasa (111).

En su conjunto y de acuerdo a los resultados encontrados, la participación de la vía canónica de activación de los receptores de cininas por sus agonistas en MFC, estaría permitiendo la liberación de prostaciclina y ésta en forma autocrina estaría actuando a través de IPR desencadenando la disminución de Col I. De acuerdo a esto, en la literatura se ha descrito que el principal mediador involucrado en el efecto antifibrótico en FC es AMPc (adenosin monofosfato cíclico), el cual se encuentra río abajo de la activación de los receptores de PGI₂ (122). En forma adicional, el grupo de Chan y cols., ha demostrado la supresión de la fibrosis cardiaca por PGI₂ a través de la participación de CREB en el proceso, proteína que se encuentra río debajo de la activación de PKA (123). Además, se ha determinado en FC de conejo que AMPc podría estar directamente relacionado con la reducción de la respuesta fibrótica desencadenada por TGF-β1, particularmente con la activación de la transcripción génica de colágeno, así como también por la reducción de la transformación de FC a MFC (124). Por otro lado, en otros tejidos también se ha descrito la participación de AMPc en la disminución de procesos fibróticos. Kamio y cols., describieron en

células pulmonares que la estimulación con análogos de PGI₂, disminuiría la secreción de fibronectina, componente de la MEC, mediante el aumento de los niveles de AMPc y de la activación de PKA (125).

En nuestro laboratorio y en forma paralela a este trabajo de tesis, se ha estudiado el efecto en FC y en MFC de distintos agonistas β -adrenérgico en los niveles de expresión de Col I. Se ha determinado que existe una disminución estadísticamente significativa con respecto a células control de los niveles proteicos de Col I en respuesta a estos agonistas (126). Además, se ha observado el mismo efecto con activadores de la adenilato ciclasa, como forskolina, el cual induce un aumento de AMPc. Por otro lado, también se ha estudiado la participación de EPAC-1 (proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina) en la expresión de Col I. EPAC-1 es regulado principalmente por los niveles intracelulares de AMPc (al igual que PKA), y se ha descrito que su activación en FC disminuye la expresión de Col I y III, además de estar participando en otros procesos celulares como la migración (122). Los resultados de nuestro laboratorio evidencian que tanto en FC como en MFC, EPAC-1 estaría participando en la disminución de los niveles de proteína de Col I (127).

Desde otro punto de vista, el aumento en la secreción de prostaglandinas inducido por las cininas en MFC observado en esta tesis, no solo disminuiría los niveles de Col I a través de la activación de sus receptores, sino que además, podría llevar a otros efectos celulares, en los cuales se exagera la respuesta inflamatoria, una de las principales respuestas fisiológicas mediadas por las cininas y las prostaglandinas. Estos efectos no han sido estudiados aún en MFC.

Por otro lado, es importante destacar que los agentes inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECAs), se han descrito como antifibróticos a nivel renal y cardiovascular, y se ha propuesto en la literatura, que estarían ejerciendo sus efectos no solo disminuyendo los niveles de Ang II si no que principalmente por el aumento local de cininas. Además, se ha propuesto que los iECAs potencian los efectos antifibróticos de las cininas. Por otro lado, se ha descrito que la utilización de antagonistas de B2R contrarrestan los efectos relacionados a los iECA (45).

Finalmente, los resultados mostrados en esta tesis, permiten sugerir que el receptor B1 de cininas estaría activando componentes de una vía transduccional similar a la activada por el B2R en MFC. En esta señal, estarían participando $[Ca^{+2}]_i$ /PKC/PLA2/COX-2/PGI₂/IPR, a través de la cual se previene la síntesis de Col I, teniendo un marcado efecto antifibrótico

7. Conclusiones

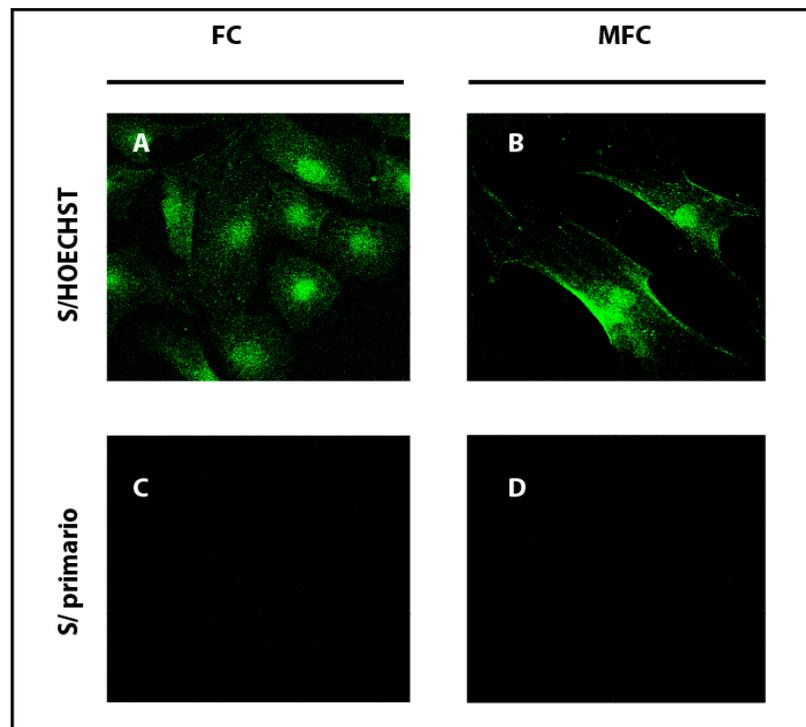
Los resultados obtenidos en esta tesis permiten concluir que:

- En FC y MFC se encuentran ambos subtipos de receptores de cininas, los cuáles tras su activación producen movimientos de calcio.
- B1R se halla mayoritariamente en miofibroblastos, concentrándose a nivel de la membrana plasmática, perinuclear y nuclear; mientras que en FC, el B1R se encuentra principalmente a nivel intracelular.
- En FC la preincubación con un agonista del B1R promueve la redistribución de B1R, favoreciendo su localización en la membrana plasmática.
- La activación de los receptores de cininas en MFC produce una disminución de la expresión del Col I.
- Al ser activado el B2R, este fenómeno sucede a tiempos tempranos de incubación, mientras que la activación del B1R reduce los niveles de Col I en periodos más largos de tratamiento.
- Al realizar una preincubación con el agonista, se evidencia que la activación del B1R produce reducción del Col I, resultado relacionado a la redistribución del receptor.
- Al estudiar los componentes de la vía transduccional que estaría involucrada en la disminución del Col I en MFC mediado por cininas, se establece que tanto B1R como B2R comparten los mismos donde participan: PKC, PLA2, COX-2, PGI₂ e IPR.
- Además, se establece la participación de los receptores de prostaciclina en la disminución de Col I mediada por cininas.

8. Anexos

8.1. Anexo 1: Controles de inmunofluorescencias de FC y MFC

Se realizaron algunos controles de las inmunofluorescencias. En la figura Anexo 1, se muestra el resultado del experimento realizada contra B1R sin incluir la tinción de núcleo Hoechst, la cual se pensó que podía estar influenciando la marca nuclear fluorescente. Los resultados evidenciaron que la marca nuclear permaneció tanto para FC (Anexo 1A) como para MFC (Anexo 1B), mostrándose el mismo patrón que la inmunofluorescencia de la figura 11.

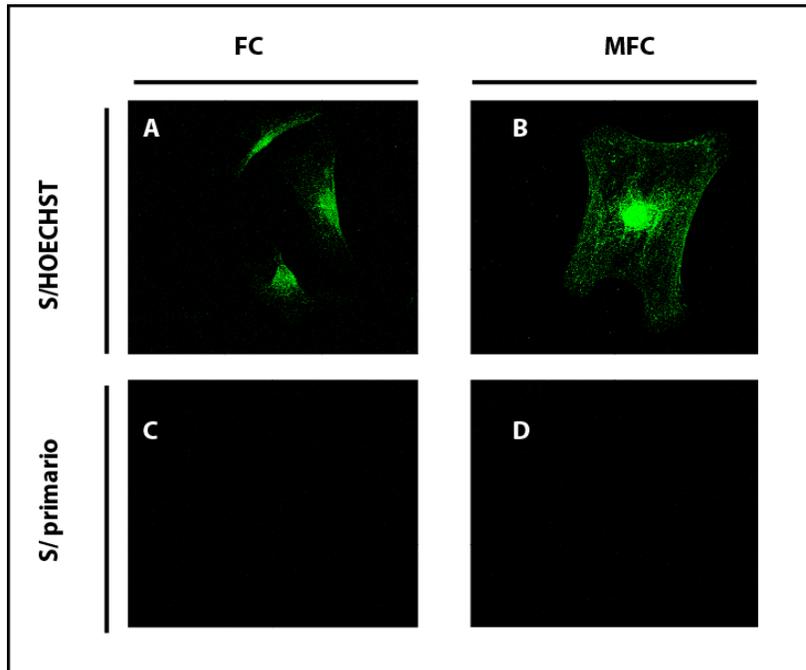


Anexo 1. Controles inmunofluorescencia de B1R en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos. FC y MFC se fijaron y se permeabilizaron en un cubreobjeto. A, FC B, MFC se incubaron con anticuerpo primario contra B1R y posteriormente sometidos a un anticuerpo secundario ALEXA 488 verde. C, FC D, MFC se incubaron con un anticuerpo secundario ALEXA 488 verde. Fotografías tomadas por microscopio confocal resolución 40X.

Además, se realizó el control del anticuerpo primario contra B1R, excluyéndolo del experimento. En la figura Anexo 1C y Anexo 1D, muestra a FC y MFC respectivamente, donde los resultados evidenciaron la inexistencia de una marca fluorescente lo que da cuenta de la especificidad del anticuerpo por B1R.

8.2. Anexo 2: Controles de inmunofluorescencias de FC y MFC tras el tratamiento con DAKD.

En la figura del anexo 2 se muestran los resultados obtenidos de los controles realizados de las inmunofluorescencias tras el tratamiento con DAKD 100 nM de FC y MFC. En el anexo 2, la figura A y B representan las inmunofluorescencias en las cuales no se incluyó la tinción de núcleo HOECHST. Los resultados evidenciaron que tras el tratamiento con el agonista de B1R se presenta el mismo patrón de distribución celular del receptor en FC, encontrándose en membranas plasmáticas y citoplasma (figura A). Además, no se observaron cambios en la distribución de B1R tras la incubación con DAKD en MFC (figura B). En las figuras C y D, se muestra las inmunofluorescencias que representan los experimentos realizados sin el anticuerpo primario. Los resultados evidenciaron tanto para FC como MFC que la marca fluorescente fue exclusiva para el B1R.

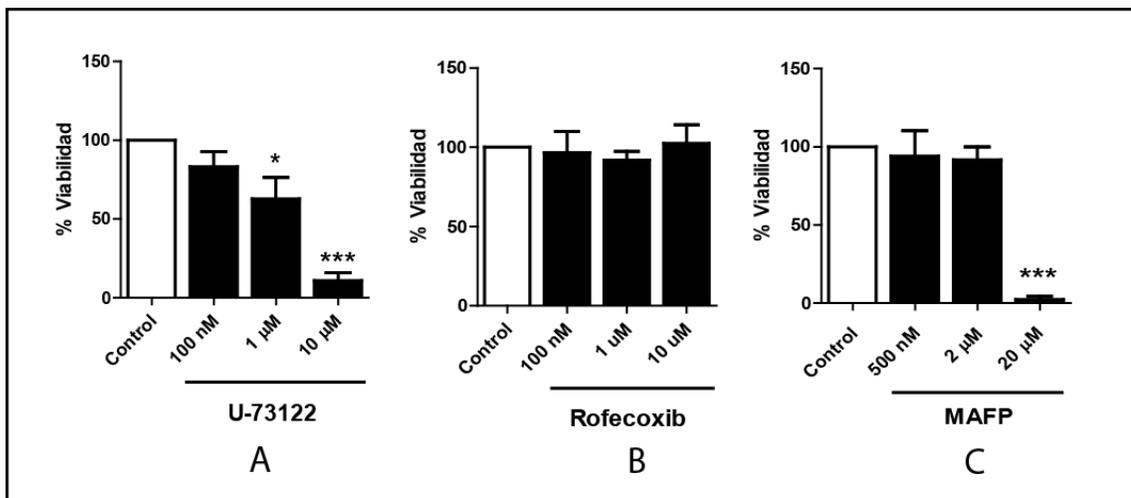


Anexo 2. Controles inmunofluorescencia de B1R en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos tras tratamiento con DAKD. FC y MFC se fijaron y se permeabilizaron en un cubreobjeto. A, FC B, MFC se incubaron con anticuerpo primario contra B1R y posteriormente sometidos a un anticuerpo secundario ALEXA 488 verde. C, FC D, MFC se incubaron con un anticuerpo secundario ALEXA 488 verde. Fotografías tomadas por microscopio confocal resolución 40X.

8.3. Anexo 3: Viabilidad celular de miofibroblastos cardiacos frente a la acción de inhibidores proteicos.

Se realizaron estudios de viabilidad celular de MFC frente a distintos inhibidores para evaluar la concentración efectiva y no tóxica para las células, al tratar MFC durante 48 h con estos agentes. En la figura Anexo 3, se observa el estudio de viabilidad realizado para tres inhibidores utilizados en los experimentos. La figura A, muestra el uso de U-73122, inhibidor de la PLC, donde se evidenció que era letal para MFC a las concentraciones registradas en la literatura. La figura B, muestra la gráfica de viabilidad para la utilización de rofecoxib como inhibidor específico de COX-2. Los resultados mostraron que ninguna de las concentraciones utilizadas disminuyó la viabilidad de MFC. Finalmente, en la figura C, se muestra la gráfica de viabilidad para evaluar los efectos de MAFP, inhibidor de PLA2. Los

resultados mostraron que a concentraciones elevadas este agente era prácticamente letal para MFC, pero a concentraciones de 2 μ M, el inhibidor no producía muerte de estas células, concentración registrada en la bibliografía como inhibitoria de la proteína.



Anexo 3. Viabilidad de miofibroblastos cardiacos frente a inhibidores. MFC fueron tratados por 48 h con distintos inhibidores: A, U73122 inhibidor de PLC; B, Rofecoxib inhibidor específico de COX-2; C, MAFP, inhibidor de PLA2. Las células se soltaron con Acutase® y se contaron a través del microscopio de luz con azul de tripan en una cámara de Neubauer. Experimentos independientes n=5. *p<0,05 vs control; ***p<0,001 vs control.

9. Bibliografía

1. Regoli, D., Plante, G. E., and Gobeil, F., Jr. (2012) Impact of kinins in the treatment of cardiovascular diseases, *Pharmacol Ther* 135, 94-111.
2. Prieto, J. C., Corbalan, R., Chavez, E., Lanús, F., Cumsille, F., and Nazzari, C. (1999) [Acute myocardial infarction in Chilean hospitals. Final results of the GEMI study], *Rev Med Chil* 127, 763-774.
3. Barry, S. P., Davidson, S. M., and Townsend, P. A. (2008) Molecular regulation of cardiac hypertrophy, *Int J Biochem Cell Biol* 40, 2023-2039.
4. Takano, H., Hasegawa, H., Nagai, T., and Komuro, I. (2003) Implication of cardiac remodeling in heart failure: mechanisms and therapeutic strategies, *Intern Med* 42, 465-469.
5. Weber, K. T., and Brilla, C. G. (1991) Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system, *Circulation* 83, 1849-1865.
6. Remme, W. J. (2003) Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy, *Cardiovasc Drugs Ther* 17, 349-360.
7. Sun, Y., Zhang, J. Q., Zhang, J., and Lamparter, S. (2000) Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats, *J Lab Clin Med* 135, 316-323.
8. Kai, H., Kuwahara, F., Tokuda, K., and Imaizumi, T. (2005) Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis, *Hypertens Res* 28, 483-490.
9. Porter, K. E., and Turner, N. A. (2009) Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling, *Pharmacol Ther* 123, 255-278.
10. Brown, R. D., Ambler, S. K., Mitchell, M. D., and Long, C. S. (2005) The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 657-687.
11. Flack, E. C., Lindsey, M. L., Squires, C. E., Kaplan, B. S., Stroud, R. E., Clark, L. L., Escobar, P. G., Yarbrough, W. M., and Spinale, F. G. (2006) Alterations in cultured myocardial fibroblast function following the development of left ventricular failure, *J Mol Cell Cardiol* 40, 474-483.

12. Gabbiani, G. (1998) Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept, *Cardiovasc Res* 38, 545-548.
13. van den Borne, S. W., Diez, J., Blankesteyn, W. M., Verjans, J., Hofstra, L., and Narula, J. (2010) Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts, *Nat Rev Cardiol* 7, 30-37.
14. Keeley, E. C., Mehrad, B., and Strieter, R. M. (2011) The role of fibrocytes in fibrotic diseases of the lungs and heart, *Fibrogenesis Tissue Repair* 4, 2.
15. Tomasek, J. J., McRae, J., Owens, G. K., and Haaksma, C. J. (2005) Regulation of alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts is dependent on the intronic CArG element and the transforming growth factor-beta1 control element, *Am J Pathol* 166, 1343-1351.
16. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R. A. (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 349-363.
17. Powell, D. W., Mifflin, R. C., Valentich, J. D., Crowe, S. E., Saada, J. I., and West, A. B. (1999) Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease, *Am J Physiol* 277, C1-9.
18. Willems, I. E., Havenith, M. G., De Mey, J. G., and Daemen, M. J. (1994) The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars, *Am J Pathol* 145, 868-875.
19. Weber, K. T., and Sun, Y. (2000) Recrutable ACE and tissue repair in the infarcted heart, *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 1, 295-303.
20. Petrov, V. V., Fagard, R. H., and Lijnen, P. J. (2000) Transforming growth factor-beta(1) induces angiotensin-converting enzyme synthesis in rat cardiac fibroblasts during their differentiation to myofibroblasts, *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 1, 342-352.
21. Staufenberg, S., Jacobs, M., Brandstatter, K., Hafner, M., Regitz-Zagrosek, V., Ertl, G., and Schorb, W. (2001) Angiotensin II type 1 receptor regulation and differential trophic effects on rat cardiac myofibroblasts after acute myocardial infarction, *J Cell Physiol* 187, 326-335.
22. Santiago, J. J., Dangerfield, A. L., Rattan, S. G., Bathe, K. L., Cunnington, R. H., Raizman, J. E., Bedosky, K. M., Freed, D. H., Kardami, E., and Dixon, I. M. (2010)

- Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts, *Dev Dyn* 239, 1573-1584.
23. Grinnell, F. (1994) Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction, *J Cell Biol* 124, 401-404.
 24. Redden, R. A., and Doolin, E. J. (2003) Collagen crosslinking and cell density have distinct effects on fibroblast-mediated contraction of collagen gels, *Skin Res Technol* 9, 290-293.
 25. Sharma, J. N. (2006) Role of tissue kallikrein-kininogen-kinin pathways in the cardiovascular system, *Arch Med Res* 37, 299-306.
 26. McLean, P. G., Perretti, M., and Ahluwalia, A. (2000) Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function, *Cardiovasc Res* 48, 194-210.
 27. Tschöpe, C., Spillmann, F., Altmann, C., Koch, M., Westermann, D., Dhayat, N., Dhayat, S., Bascands, J. L., Gera, L., Hoffmann, S., Schultheiss, H. P., and Walther, T. (2004) The bradykinin B1 receptor contributes to the cardioprotective effects of AT1 blockade after experimental myocardial infarction, *Cardiovasc Res* 61, 559-569.
 28. Regoli, D., and Barabe, J. (1980) Pharmacology of bradykinin and related kinins, *Pharmacol Rev* 32, 1-46.
 29. Marceau, F., Hess, J. F., and Bachvarov, D. R. (1998) The B1 receptors for kinins, *Pharmacol Rev* 50, 357-386.
 30. Xu, J., Carretero, O. A., Shesely, E. G., Rhaleb, N. E., Yang, J. J., Bader, M., and Yang, X. P. (2009) The kinin B1 receptor contributes to the cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in mice, *Exp Physiol* 94, 322-329.
 31. Vancheri, C., Gili, E., Failla, M., Mastruzzo, C., Salinaro, E. T., Lofurno, D., Pistorio, M. P., La Rosa, C., Caruso, M., and Crimi, N. (2005) Bradykinin differentiates human lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the B2 receptor, *J Allergy Clin Immunol* 116, 1242-1248.
 32. Klein, J., Gonzalez, J., Duchene, J., Esposito, L., Pradere, J. P., Neau, E., Delage, C., Calise, D., Ahluwalia, A., Carayon, P., Pesquero, J. B., Bader, M., Schanstra,

- J. P., and Bascands, J. L. (2009) Delayed blockade of the kinin B1 receptor reduces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy, *FASEB J* 23, 134-142.
33. Wang, P. H., Cenedeze, M. A., Campanholle, G., Malheiros, D. M., Torres, H. A., Pesquero, J. B., Pacheco-Silva, A., and Camara, N. O. (2009) Deletion of bradykinin B1 receptor reduces renal fibrosis, *Int Immunopharmacol* 9, 653-657.
34. Hagiwara, M., Murakami, H., Ura, N., Agata, J., Yoshida, H., Higashiura, K., and Shimamoto, K. (2004) Renal protective role of bradykinin B1 receptor in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Hypertens Res* 27, 399-408.
35. Sancho-Bru, P., Bataller, R., Fernandez-Varo, G., Moreno, M., Ramalho, L. N., Colmenero, J., Mari, M., Claria, J., Jimenez, W., Arroyo, V., Brenner, D. A., and Gines, P. (2007) Bradykinin attenuates hepatocellular damage and fibrosis in rats with chronic liver injury, *Gastroenterology* 133, 2019-2028.
36. Campbell, D. J. (2001) The kallikrein-kinin system in humans, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28, 1060-1065.
37. Kintsurashvili, E., Duka, A., Ignjacev, I., Pattakos, G., Gavras, I., and Gavras, H. (2005) Age-related changes of bradykinin B1 and B2 receptors in rat heart, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H202-205.
38. Savvatis, K., Westermann, D., Schultheiss, H. P., and Tschope, C. (2010) Kinins in cardiac inflammation and regeneration: insights from ischemic and diabetic cardiomyopathy, *Neuropeptides* 44, 119-125.
39. Stauss, H. M., Zhu, Y. C., Redlich, T., Adamiak, D., Mott, A., Kregel, K. C., and Unger, T. (1994) Angiotensin-converting enzyme inhibition in infarct-induced heart failure in rats: bradykinin versus angiotensin II, *J Cardiovasc Risk* 1, 255-262.
40. Chao, J., Yin, H., Gao, L., Hagiwara, M., Shen, B., Yang, Z. R., and Chao, L. (2008) Tissue kallikrein elicits cardioprotection by direct kinin b2 receptor activation independent of kinin formation, *Hypertension* 52, 715-720.
41. Duka, A., Kintsurashvili, E., Duka, I., Ona, D., Hopkins, T. A., Bader, M., Gavras, I., and Gavras, H. (2008) Angiotensin-converting enzyme inhibition after experimental myocardial infarct: role of the kinin B1 and B2 receptors, *Hypertension* 51, 1352-1357.

42. Maestri, R., Milia, A. F., Salis, M. B., Graiani, G., Lagrasta, C., Monica, M., Corradi, D., Emanuelli, C., and Madeddu, P. (2003) Cardiac hypertrophy and microvascular deficit in kinin B2 receptor knockout mice, *Hypertension* 41, 1151-1155.
43. Tschope, C., Gohlke, P., Zhu, Y. Z., Linz, W., Scholkens, B., and Unger, T. (1997) Antihypertensive and cardioprotective effects after angiotensin-converting enzyme inhibition: role of kinins, *J Card Fail* 3, 133-148.
44. Leeb-Lundberg, L. M., Marceau, F., Muller-Esterl, W., Pettibone, D. J., and Zuraw, B. L. (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences, *Pharmacol Rev* 57, 27-77.
45. Moreau, M. E., Garbacki, N., Molinaro, G., Brown, N. J., Marceau, F., and Adam, A. (2005) The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets, *J Pharmacol Sci* 99, 6-38.
46. Mathis, S. A., Criscimagna, N. L., and Leeb-Lundberg, L. M. (1996) B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells, *Mol Pharmacol* 50, 128-139.
47. Bellucci, F., Cucchi, P., Santicioli, P., Lazzeri, M., Turini, D., and Meini, S. (2007) Characterization of kinin receptors in human cultured detrusor smooth muscle cells, *Br J Pharmacol* 150, 192-199.
48. Haddad, E. B., Fox, A. J., Rousell, J., Burgess, G., McIntyre, P., Barnes, P. J., and Chung, K. F. (2000) Post-transcriptional regulation of bradykinin B1 and B2 receptor gene expression in human lung fibroblasts by tumor necrosis factor-alpha: modulation by dexamethasone, *Mol Pharmacol* 57, 1123-1131.
49. Brechter, A. B., Persson, E., Lundgren, I., and Lerner, U. H. (2008) Kinin B1 and B2 receptor expression in osteoblasts and fibroblasts is enhanced by interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. Effects dependent on activation of NF-kappaB and MAP kinases, *Bone* 43, 72-83.
50. Marceau, F., Larrivee, J. F., Saint-Jacques, E., and Bachvarov, D. R. (1997) The kinin B1 receptor: an inducible G protein coupled receptor, *Can J Physiol Pharmacol* 75, 725-730.

51. Calixto, J. B., Medeiros, R., Fernandes, E. S., Ferreira, J., Cabrini, D. A., and Campos, M. M. (2004) Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes, *Br J Pharmacol* 143, 803-818.
52. Moreau, M. E., Bawolak, M. T., Morissette, G., Adam, A., and Marceau, F. (2007) Role of nuclear factor-kappaB and protein kinase C signaling in the expression of the kinin B1 receptor in human vascular smooth muscle cells, *Mol Pharmacol* 71, 949-956.
53. Shin, H. S., and Ha, U. H. (2011) Up-regulation of human bradykinin B1 receptor by secreted components of *Pseudomonas aeruginosa* via a NF-kappaB pathway in epithelial cells, *FEMS Immunol Med Microbiol* 63, 418-426.
54. Morand-Contant, M., Anand-Srivastava, M. B., and Couture, R. (2010) Kinin B1 receptor upregulation by angiotensin II and endothelin-1 in rat vascular smooth muscle cells: receptors and mechanisms, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, H1625-1632.
55. Campanholle, G., Landgraf, R. G., Borducchi, E., Semedo, P., Wang, P. H., Amano, M. T., Russo, M., Pacheco-Silva, A., Jancar, S., and Camara, N. O. (2010) Bradykinin inducible receptor is essential to lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice, *Eur J Pharmacol* 634, 132-137.
56. Phagoo, S. B., Poole, S., and Leeb-Lundberg, L. M. (1999) Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts, *Mol Pharmacol* 56, 325-333.
57. Austin, C. E., Faussner, A., Robinson, H. E., Chakravarty, S., Kyle, D. J., Bathon, J. M., and Proud, D. (1997) Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways, *J Biol Chem* 272, 11420-11425.
58. Faussner, A., Proud, D., Towns, M., and Bathon, J. M. (1998) Influence of the cytosolic carboxyl termini of human B1 and B2 kinin receptors on receptor sequestration, ligand internalization, and signal transduction, *J Biol Chem* 273, 2617-2623.
59. Douillet, C. D., Velarde, V., Christopher, J. T., Mayfield, R. K., Trojanowska, M. E., and Jaffa, A. A. (2000) Mechanisms by which bradykinin promotes fibrosis in

vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta and MAPK, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H2829-2837.

60. Chao, J., Li, H. J., Yao, Y. Y., Shen, B., Gao, L., Bledsoe, G., and Chao, L. (2007) Kinin infusion prevents renal inflammation, apoptosis, and fibrosis via inhibition of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase activity, *Hypertension* 49, 490-497.
61. Kim, N. N., Villegas, S., Summerour, S. R., and Villarreal, F. J. (1999) Regulation of cardiac fibroblast extracellular matrix production by bradykinin and nitric oxide, *J Mol Cell Cardiol* 31, 457-466.
62. Koike, M. K., de Carvalho Frimm, C., and de Lourdes Higuchi, M. (2005) Bradykinin B2 receptor antagonism attenuates inflammation, mast cell infiltration and fibrosis in remote myocardium after infarction in rats, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32, 1131-1136.
63. Minshall, R. D., Nakamura, F., Becker, R. P., and Rabito, S. F. (1995) Characterization of bradykinin B2 receptors in adult myocardium and neonatal rat cardiomyocytes, *Circ Res* 76, 773-780.
64. Shindo, T., Ikeda, U., Ohkawa, F., Takahashi, M., Funayama, H., Nishinaga, M., Kawahara, Y., Yokoyama, M., Kasahara, T., and Shimada, K. (1994) Nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes and fibroblasts, *Life Sci* 55, 1101-1108.
65. Weber, K. T. (2004) Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts, *J Hypertens* 22, 47-50.
66. Gallagher, A. M., Yu, H., and Printz, M. P. (1998) Bradykinin-induced reductions in collagen gene expression involve prostacyclin, *Hypertension* 32, 84-88.
67. Cooper, M., and Ytrehus, K. (2004) Cell survival signalling in heart derived myofibroblasts induced by preconditioning and bradykinin: the role of p38 MAP kinase, *Mol Cell Biochem* 259, 83-90.
68. Meszaros, J. G., Gonzalez, A. M., Endo-Mochizuki, Y., Villegas, S., Villarreal, F., and Brunton, L. L. (2000) Identification of G protein-coupled signaling pathways in cardiac fibroblasts: cross talk between G(q) and G(s), *Am J Physiol Cell Physiol* 278, C154-162.
69. Zou, J., Ren, J. H., Feng, D., Wang, H., and Xu, J. (2008) Compensatory function of bradykinin B1 receptor in the inhibitory effect of captopril on cardiomyocyte

- hypertrophy and cardiac fibroblast proliferation in neonatal rats, *Chin Med J (Engl)* 121, 1220-1225.
70. Riad, A., Walther, T., Yang, J., Altmann, C., Escher, F., Westermann, D., Spillmann, F., Schultheiss, H. P., and Tschöpe, C. (2008) The cardiovascular influence of interleukin-1 beta on the expression of bradykinin B1 and B2 receptors, *Int Immunopharmacol* 8, 222-230.
 71. Romero, J. R., Rivera, A., Lanca, V., Bicho, M. D., Conlin, P. R., and Ricupero, D. A. (2005) Na⁺/Ca²⁺ exchanger activity modulates connective tissue growth factor mRNA expression in transforming growth factor beta1- and Des-Arg10-kallidin-stimulated myofibroblasts, *J Biol Chem* 280, 14378-14384.
 72. Vivar, R., Soto, C., Copaja, M., Mateluna, F., Aranguiz, P., Munoz, J. P., Chiong, M., Garcia, L., Letelier, A., Thomas, W. G., Lavandero, S., and Diaz-Araya, G. (2008) Phospholipase C/protein kinase C pathway mediates angiotensin II-dependent apoptosis in neonatal rat cardiac fibroblasts expressing AT1 receptor, *J Cardiovasc Pharmacol* 52, 184-190.
 73. Enquist, J., Skroder, C., Whistler, J. L., and Leeb-Lundberg, L. M. (2007) Kinins promote B2 receptor endocytosis and delay constitutive B1 receptor endocytosis, *Mol Pharmacol* 71, 494-507.
 74. Shalitin, N., Schlesinger, H., Levy, M. J., Kessler, E., and Kessler-Icekson, G. (2003) Expression of procollagen C-proteinase enhancer in cultured rat heart fibroblasts: evidence for co-regulation with type I collagen, *J Cell Biochem* 90, 397-407.
 75. Lio, Y. C., Reynolds, L. J., Balsinde, J., and Dennis, E. A. (1996) Irreversible inhibition of Ca(2+)-independent phospholipase A2 by methyl arachidonyl fluorophosphonate, *Biochim Biophys Acta* 1302, 55-60.
 76. Balsinde, J., and Dennis, E. A. (1996) Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A2 enzymes present in P388D1 macrophages, *J Biol Chem* 271, 6758-6765.
 77. Meyer, M. C., Rastogi, P., Beckett, C. S., and McHowat, J. (2005) Phospholipase A2 inhibitors as potential anti-inflammatory agents, *Curr Pharm Des* 11, 1301-1312.

78. Wang, B. H., Bertucci, M. C., Ma, J. Y., Adrahtas, A., Cheung, R. Y., and Krum, H. (2010) Celecoxib, but not rofecoxib or naproxen, attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis induced in vitro by angiotensin and aldosterone, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37, 912-918.
79. Qu, C., Leung, S. W., Vanhoutte, P. M., and Man, R. Y. (2010) Chronic inhibition of nitric-oxide synthase potentiates endothelium-dependent contractions in the rat aorta by augmenting the expression of cyclooxygenase-2, *J Pharmacol Exp Ther* 334, 373-380.
80. Mendez, M., and LaPointe, M. C. (2002) Trophic effects of the cyclooxygenase-2 product prostaglandin E(2) in cardiac myocytes, *Hypertension* 39, 382-388.
81. Orie, N. N., and Clapp, L. H. (2011) Role of prostanoid IP and EP receptors in mediating vasorelaxant responses to PGI₂ analogues in rat tail artery: Evidence for Gi/o modulation via EP₃ receptors, *Eur J Pharmacol* 654, 258-265.
82. Diaz-Araya, G., Borg, T. K., Lavandero, S., Loftis, M. J., and Carver, W. (2003) IGF-1 modulation of rat cardiac fibroblast behavior and gene expression is age-dependent, *Cell Commun Adhes* 10, 155-165.
83. Wilson, C. G., Stone, J. W., Fowlkes, V., Morales, M. O., Murphy, C. J., Baxter, S. C., and Goldsmith, E. C. Age-dependent expression of collagen receptors and deformation of type I collagen substrates by rat cardiac fibroblasts, *Microsc Microanal* 17, 555-562.
84. Driesen, R. B., Nagaraju, C. K., Abi-Char, J., Coenen, T., Lijnen, P. J., Fagard, R. H., Sipido, K. R., and Petrov, V. V. Reversible and irreversible differentiation of cardiac fibroblasts, *Cardiovasc Res*.
85. Kuhr, F., Lowry, J., Zhang, Y., Brovkovich, V., and Skidgel, R. A. (2010) Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B₁ and B₂ receptors, *Neuropeptides* 44, 145-154.
86. Yang, X., Taylor, L., Yu, J., Fenton, M. J., and Polgar, P. (2001) Mediator caused induction of a human bradykinin B₁ receptor minigene: participation of c-Jun in the process, *J Cell Biochem* 82, 163-170.
87. Simaan, M., Bedard-Goulet, S., Fessart, D., Gratton, J. P., and Laporte, S. A. (2005) Dissociation of beta-arrestin from internalized bradykinin B₂ receptor is necessary for receptor recycling and resensitization, *Cell Signal* 17, 1074-1083.

88. Lamb, M. E., De Weerd, W. F., and Leeb-Lundberg, L. M. (2001) Agonist-promoted trafficking of human bradykinin receptors: arrestin- and dynamin-independent sequestration of the B2 receptor and bradykinin in HEK293 cells, *Biochem J* 355, 741-750.
89. Faussner, A., Bauer, A., Kalatskaya, I., Schussler, S., Seidl, C., Proud, D., and Jochum, M. (2005) The role of helix 8 and of the cytosolic C-termini in the internalization and signal transduction of B(1) and B(2) bradykinin receptors, *FEBS J* 272, 129-140.
90. Wright, C. D., Wu, S. C., Dahl, E. F., Sazama, A. J., and O'Connell, T. D. (2012) Nuclear localization drives alpha1-adrenergic receptor oligomerization and signaling in cardiac myocytes, *Cell Signal* 24, 794-802.
91. Wright, C. D., Chen, Q., Baye, N. L., Huang, Y., Healy, C. L., Kasinathan, S., and O'Connell, T. D. (2008) Nuclear alpha1-adrenergic receptors signal activated ERK localization to caveolae in adult cardiac myocytes, *Circ Res* 103, 992-1000.
92. Vaniotis, G., Allen, B. G., and Hebert, T. E. (2011) Nuclear GPCRs in cardiomyocytes: an insider's view of beta-adrenergic receptor signaling, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H1754-1764.
93. Lee, D. K., Lanca, A. J., Cheng, R., Nguyen, T., Ji, X. D., Gobeil, F., Jr., Chemtob, S., George, S. R., and O'Dowd, B. F. (2004) Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors, *J Biol Chem* 279, 7901-7908.
94. Marchese, A., and Trejo, J. (2013) Ubiquitin-dependent regulation of G protein-coupled receptor trafficking and signaling, *Cell Signal* 25, 707-716.
95. Sanden, C., and Leeb-Lundberg, L. M. Kinin B1 receptor homo-oligomerization is required for receptor trafficking to the cell surface, *Int Immunopharmacol* 15, 121-128.
96. Enquist, J., Sanden, C., Skroder, C., Mathis, S. A., and Leeb-Lundberg, L. M. Kinin-Stimulated B1 Receptor Signaling Depends on Receptor Endocytosis Whereas B2 Receptor Signaling Does Not, *Neurochem Res*.
97. Sabourin, T., Bastien, L., Bachvarov, D. R., and Marceau, F. (2002) Agonist-induced translocation of the kinin B(1) receptor to caveolae-related rafts, *Mol Pharmacol* 61, 546-553.

98. Bawolak, M. T., Gera, L., Morissette, G., Bouthillier, J., Stewart, J. M., Gobeil, L. A., Lodge, R., Adam, A., and Marceau, F. (2009) Fluorescent ligands of the bradykinin B1 receptors: pharmacologic characterization and application to the study of agonist-induced receptor translocation and cell surface receptor expression, *J Pharmacol Exp Ther* 329, 159-168.
99. Sabourin, T., Guay, K., Houle, S., Bouthillier, J., Bachvarov, D. R., Adam, A., and Marceau, F. (2001) Absence of ligand-induced regulation of kinin receptor expression in the rabbit, *Br J Pharmacol* 133, 1154-1162.
100. Magalhaes, A. C., Dunn, H., and Ferguson, S. S. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins, *Br J Pharmacol* 165, 1717-1736.
101. Paquet, M., Asay, M. J., Fam, S. R., Inuzuka, H., Castleberry, A. M., Oller, H., Smith, Y., Yun, C. C., Traynelis, S. F., and Hall, R. A. (2006) The PDZ scaffold NHERF-2 interacts with mGluR5 and regulates receptor activity, *J Biol Chem* 281, 29949-29961.
102. Kitano, J., Kimura, K., Yamazaki, Y., Soda, T., Shigemoto, R., Nakajima, Y., and Nakanishi, S. (2002) Tamalin, a PDZ domain-containing protein, links a protein complex formation of group 1 metabotropic glutamate receptors and the guanine nucleotide exchange factor cytohesins, *J Neurosci* 22, 1280-1289.
103. Li, C., Fan, Y., Lan, T. H., Lambert, N. A., and Wu, G. Rab26 modulates the cell surface transport of alpha2-adrenergic receptors from the Golgi, *J Biol Chem* 287, 42784-42794.
104. Veillard, F., Lecaille, F., and Lalmanach, G. (2008) Lung cysteine cathepsins: intruders or unorthodox contributors to the kallikrein-kinin system?, *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1079-1094.
105. Ricupero, D. A., Romero, J. R., Rishikof, D. C., and Goldstein, R. H. (2000) Des-Arg(10)-kallidin engagement of the B1 receptor stimulates type I collagen synthesis via stabilization of connective tissue growth factor mRNA, *J Biol Chem* 275, 12475-12480.
106. Yao, Y. Y., Yin, H., Shen, B., Chao, L., and Chao, J. (2007) Tissue kallikrein and kinin infusion rescues failing myocardium after myocardial infarction, *J Card Fail* 13, 588-596.

107. Catalan, M., Smolic, C., Contreras, A., Ayala, P., Olmedo, I., Copaja, M., Boza, P., Vivar, R., Avalos, Y., Lavandero, S., Velarde, V., and Diaz-Araya, G. (2012) Differential regulation of collagen secretion by kinin receptors in cardiac fibroblast and myofibroblast, *Toxicol Appl Pharmacol* 261, 300-308.
108. Filipovich-Rimon, T., and Fleisher-Berkovich, S. (2010) Protein synthesis dependent effects of kinins on astrocyte prostaglandin synthesis, *Peptides* 31, 651-656.
109. Datar, R., Kaesemeyer, W. H., Chandra, S., Fulton, D. J., and Caldwell, R. W. (2010) Acute activation of eNOS by statins involves scavenger receptor-B1, G protein subunit Gi, phospholipase C and calcium influx, *Br J Pharmacol* 160, 1765-1772.
110. Hecquet, C., Biyashev, D., Tan, F., and Erdos, E. G. (2006) Positive cooperativity between the thrombin and bradykinin B2 receptors enhances arachidonic acid release, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H948-958.
111. Stratton, R., and Shiwen, X. (2010) Role of prostaglandins in fibroblast activation and fibrosis, *J Cell Commun Signal* 4, 75-77.
112. Ghosh, M., Stewart, A., Tucker, D. E., Bonventre, J. V., Murphy, R. C., and Leslie, C. C. (2004) Role of cytosolic phospholipase A(2) in prostaglandin E(2) production by lung fibroblasts, *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 91-100.
113. Liu, F., Mih, J. D., Shea, B. S., Kho, A. T., Sharif, A. S., Tager, A. M., and Tschumperlin, D. J. (2010) Feedback amplification of fibrosis through matrix stiffening and COX-2 suppression, *J Cell Biol* 190, 693-706.
114. Huang, S. K., and Peters-Golden, M. (2008) Eicosanoid lipid mediators in fibrotic lung diseases: ready for prime time?, *Chest* 133, 1442-1450.
115. Kolodsick, J. E., Peters-Golden, M., Larios, J., Toews, G. B., Thannickal, V. J., and Moore, B. B. (2003) Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation, *Am J Respir Cell Mol Biol* 29, 537-544.
116. Zhou, H., Felsen, D., Sandulache, V. C., Amin, M. R., Kraus, D. H., and Branski, R. C. (2011) Prostaglandin (PG)E2 exhibits antifibrotic activity in vocal fold fibroblasts, *Laryngoscope* 121, 1261-1265.

117. Harding, P., and LaPointe, M. C. (2011) Prostaglandin E2 increases cardiac fibroblast proliferation and increases cyclin D expression via EP1 receptor, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 84, 147-152.
118. Nasrallah, R., and Hebert, R. L. (2005) Prostacyclin signaling in the kidney: implications for health and disease, *Am J Physiol Renal Physiol* 289, F235-246.
119. Stratton, R., Rajkumar, V., Ponticos, M., Nichols, B., Shiwen, X., Black, C. M., Abraham, D. J., and Leask, A. (2002) Prostacyclin derivatives prevent the fibrotic response to TGF-beta by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway, *FASEB J* 16, 1949-1951.
120. Zhu, Y., Liu, Y., Zhou, W., Xiang, R., Jiang, L., Huang, K., Xiao, Y., Guo, Z., and Gao, J. (2010) A prostacyclin analogue, iloprost, protects from bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, *Respir Res* 11, 34.
121. Ruan, C. H., So, S. P., and Ruan, K. H. (2011) Inducible COX-2 dominates over COX-1 in prostacyclin biosynthesis: mechanisms of COX-2 inhibitor risk to heart disease, *Life Sci* 88, 24-30.
122. Yokoyama, U., Patel, H. H., Lai, N. C., Aroonsakool, N., Roth, D. M., and Insel, P. A. (2008) The cyclic AMP effector Epac integrates pro- and anti-fibrotic signals, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6386-6391.
123. Chan, E. C., Dusting, G. J., Guo, N., Peshavariya, H. M., Taylor, C. J., Dilley, R., Narumiya, S., and Jiang, F. (2010) Prostacyclin receptor suppresses cardiac fibrosis: role of CREB phosphorylation, *J Mol Cell Cardiol* 49, 176-185.
124. Liu, X., Sun, S. Q., Hassid, A., and Ostrom, R. S. (2006) cAMP inhibits transforming growth factor-beta-stimulated collagen synthesis via inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Smad signaling in cardiac fibroblasts, *Mol Pharmacol* 70, 1992-2003.
125. Kamio, K., Liu, X., Sugiura, H., Togo, S., Kobayashi, T., Kawasaki, S., Wang, X., Mao, L., Ahn, Y., Hogaboam, C., Toews, M. L., and Rennard, S. I. (2007) Prostacyclin analogs inhibit fibroblast contraction of collagen gels through the cAMP-PKA pathway, *Am J Respir Cell Mol Biol* 37, 113-120.
126. Aranguiz-Urroz, P., Canales, J., Copaja, M., Troncoso, R., Vicencio, J. M., Carrillo, C., Lara, H., Lavandero, S., and Diaz-Araya, G. (2011) Beta(2)-

adrenergic receptor regulates cardiac fibroblast autophagy and collagen degradation, *Biochim Biophys Acta* 1812, 23-31.

127. Olmedo, I., Munoz, C., Guzman, N., Catalan, M., Vivar, R., Ayala, P., Humeres, C., Aranguiz, P., Garcia, L., Velarde, V., and Diaz-Araya, G. EPAC expression and function in cardiac fibroblasts and myofibroblasts, *Toxicol Appl Pharmacol* 272, 414-422.