



**Universidad de Chile**

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Laboratorio de Farmacoquímica

**PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN EL DESARROLLO  
DE FIBROSIS CARDIACA EXPERIMENTAL EN RATAS Y SU MODULACIÓN POR LA  
CHAPERONA QUÍMICA 4-FENILBUTIRATO DE SODIO**

**Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico  
PEDRO SEGUNDO AYALA JERIA**

Profesor patrocinante: Dr. Guillermo Díaz-Araya.

Directores de memoria: Dr. Guillermo Díaz-Araya.

Dr. Sergio Lavandero.

Santiago, Chile  
2009

## ÍNDICE GENERAL

### Página

ÍNDICE GENERAL.....	2
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Generalidades.....	11
1.1.1. Corazón.....	11
1.2. Enfermedad cardiaca isquémica.....	12
1.3. Fibrosis cardiaca.....	12
1.3.1. Matriz extracelular.....	12
1.3.2. Modelos de fibrosis.....	13
1.4. Hipertrofia cardiaca.....	13
1.5. Estrés de retículo endoplásmico.....	13
1.5.1. Sensores de estrés.....	14
1.5.2. Chaperonas del retículo endoplásmico.....	16
1.6. PDI y su relación con colágeno.....	17
1.7. Chaperona química.....	17
1.8. Estrés de retículo en el corazón.....	18
2. HIPÓTESIS.....	20
2.1. Objetivo general.....	20
2.2.1. Objetivos específicos.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1. Reactivos.....	21
3.2. Modelo animal.....	21
3.2.1. Tratamiento isoproterenol.....	21
3.2.2. Tratamiento isoproterenol + 4-PBA.....	22
3.3. Tratamiento con tunicamicina.....	22
3.4. Obtención de la muestra.....	22
3.5. Preparación de muestra para electroforesis.....	23

3.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	23
3.5.2. Electrotransferencia de proteínas.....	23
3.5.3. Inmunowesternblot.....	23
3.6. Histoquímica .....	24
3.6.1. Tinción de eosina hematoxilina .....	24
3.6.2. Tinción de Tricromico de Masson.....	25
3.7. Inmunohistoquímica .....	25
3.8. Cuantificación de colágeno soluble .....	26
3.9. Análisis estadístico.....	26
4. RESULTADOS .....	27
4.1. Efecto de isoproterenol 50mg/kg sobre inflamación .....	27
4.2. Efecto de isoproterenol 50mg/kg sobre fibrosis .....	27
4.3. Efecto de isoproterenol sobre la expresión de chaperonas del retículo endoplásmico.....	31
4.3.1. Efecto de isoproterenol sobre la expresión de BIP .....	31
4.3.2. Efecto de isoproterenol sobre la expresión de PDI.....	33
4.4. Efecto de isoproterenol sobre la expresión de CHOP .....	35
4.5. Efecto de 4-PBA 80mg/kg/día sobre inflamación y fibrosis cardiaca en ratas tratadas con isoproterenol 50mg/kg .....	36
4.5.1. Efecto de 4-PBA sobre la inflamación en ratas tratadas con isoproterenol 50mg/kg .....	36
4.5.2. Efecto de 4-PBA sobre la fibrosis en ratas tratadas con isoproterenol 50mg/k	36
4.6. Efecto de 4- PBA 80mg/kg/día sobre la expresión de BIP en ratas tratadas con isoproterenol 50mg/kg .....	40
4.7. Efecto de 4- PBA 80mg/kg/día sobre la expresión de PDI en ratas tratadas con isoproterenol 50mg/kg .....	43
4.8. Efecto de de 4- PBA 80mg/kg/día sobre la expresión de CHOP a las 9 horas luego de la administración de isoproterenol 50mg/kg .....	46
4.9. Colágeno Soluble.....	47
4.10. Efecto de tunicamicina sobre inflamación y fibrosis cardiaca.....	48
4.10.1. Efecto de tunicamicina sobre la expresión de PDI.....	49
4.10.2. Efecto de tunicamicina sobre la expresión de BIP .....	51
5. DISCUSIÓN.....	53

5.1. Fibrosis inducida por isoproterenol.....	53
5.2. Estrés de retículo en corazón.....	54
5.3. La chaperona química 4-PBA previene el desarrollo de fibrosis cardiaca.....	56
6. CONCLUSIONES .....	59
7. BIBLIOGRAFÍA.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Figura 1:

- a) Efecto de isoproterenol 50mg/kg sobre Inflamación en el tiempo ..... 27
- b) Efecto de isoproterenol 50mg/kg sobre fibrosis cardiaca..... 28

### Figura 2:

- a) Efecto de isoproterenol 50mg/kg sobre la expresión de BIP por western blot 31
- b) Efecto de isoproterenol 50mg/kg sobre la expresión de BIP por inmunohistoquímica ..... 32

### Figura 3:

- a) Efecto de isoproterenol 50mg/kg sobre la expresión de PDI por Western blot 33
- b) Efecto de isoproterenol 50mg/kg sobre la expresión de PDI por inmunohistoquímica ..... 34

### Figura 4: Efecto de isoproterenol 50mg/kg sobre la expresión de CHOP ..... 35

### Figura 5:

- a) Efecto de 4-PBA sobre Inflamación en ratas tratadas con isoproterenol a los 2 días ..... 37
- b) Efecto de 4-PBA sobre fibrosis en ratas tratadas con isoproterenol a los 10 días ..... 38

### Figura 6:

- a) Efecto de 4-PBA sobre la expresión de BIP en ratas tratadas con isoproterenol a las 9 horas por western blot..... 41
- b) Efecto de 4-PBA sobre la expresión de BIP en ratas tratadas con isoproterenol a los 2 días por western blot..... 41
- c) Efecto de 4-PBA sobre la expresión de BIP en ratas tratadas con isoproterenol a los 5 días por western blot..... 41
- d) Efecto de 4-PBA sobre la expresión de BIP en ratas tratadas con isoproterenol a los 10 días por inmunohistoquímica ..... 42

### Figura 7:

- a) Efecto de 4-PBA sobre la expresión de PDI en ratas tratadas con isoproterenol a las 9 horas por western blot..... 44
- b) Efecto de 4-PBA sobre la expresión de PDI en ratas tratadas con isoproterenol a los 5 días por western blot..... 44

c) Efecto de 4-PBA sobre la expresión de PDI en ratas tratadas con isoproterenol a los 10 días por western blot.....	44
d) Efecto de 4-PBA sobre la expresión de PDI en ratas tratadas con isoproterenol a los 10 días por inmunohistoquímica .....	45
Figura 8: Efecto de 4-PBA sobre la expresión de CHOP en ratas tratadas con isoproterenol a las 9 horas por western blot.....	46
Figura 9: Colágeno soluble .....	47
Figura 10	
a) Efecto de tunicamicina sobre la expresión de PDI en corazones de ratas a los 10 días por western blot .....	49
b) Efecto de tunicamicina sobre la expresión de PDI en corazones de ratas a los 10 días por inmunohistoquímica.....	50
Figura 11:	
a) Efecto de tunicamicina sobre la expresión de BIP en corazones de ratas a los 10 días por western blot .....	51
b) Efecto de tunicamicina sobre la expresión de BIP en corazones de ratas a los 10 días por inmunohistoquímica.....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Análisis semicuantitativo de inflamación y fibrosis inducida por isoproterenol ....	29
Tabla 2: Análisis semicuantitativo sobre efecto de 4-PBA en inflamación .....	39
Tabla 3: Análisis semicuantitativo sobre efecto de 4-PBA en fibrosis.....	39
Tabla 4: Análisis semicuantitativo sobre efecto de tunicamicina en inflamación y fibrosis cardíaca.....	48

## ABREVIATURAS

**4-PBA:** Acido 4-fenilbutírico del inglés *Phenylbutiryc acid*

**APS:** Persulfato de amonio del inglés *ammonium persulphate*.

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

**BSA:** Albumina de suero bovino del ingles *Bovine serum albumin*

**ATF4:** Factor activador de la transcripción 4 del inglés *Activating Trascription Factor 4*

**ATF6:** Factor activador de la transcripción 6 del inglés *Activating Trascription Factor 6*

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

**D.S.:** Desviación Estándar

**DNA:** Acido desoxirribonucleico.

**ECV:** Enfermedad cardiovascular.

**GTP:** guanosin trifosfato

**HSP:** Proteínas de choque térmico del inglés *Heat shock proteins*

**IgG:** Inmunoglobulina G

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

**kDa:** Kilo daltons

**Kg:** Kilogramo

**IRE:** Proteina requiriente de Inositol del inglés *Inositol requiring*

**ISO:** Isoproterenol

**KCl:** Cloruro de potasio.

**MEC:** Matiz extra celular

**MCP1:** Proteína quimioattractante de monocitos

**mg:** Miligramo

**mL:** Mililitro

**NaCl:** Cloruro de sodio

**PBS:** Solución buffer fosfato

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

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

**PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonil del inglés *Phenylmethylsulfonyl fluoride*

**RE:** Retículo endoplásmico.

**RNA:** Acido ribonucleico

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

**SDS:** Dodecilsulfato sódico del inglés *Sodium Dodecylsulphate*.

**SOD:** Superoxido dismutasa.

**Tn:** Tunicamicina.

**UPR:** Respuesta a proteínas mal plegadas (del inglés *Unfolded Protein Response*)

**UPRE:** Elemento de respuesta a proteínas mal plegadas.

**VI:** Ventrículo izquierdo

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

**μL:** Microlitro

**μg:** Microgramo.



## RESUMEN

El proceso de remodelamiento del miocardio post infarto, está caracterizado por la hipertrofia de los cardiomiocitos, la cicatrización del tejido dañado y por el posterior desarrollo de fibrosis cardíaca. Sin embargo, los eventos moleculares involucrados en estos procesos aún no han sido completamente estudiados. El proceso de fibrosis del tejido dañado se caracteriza por la alta demanda de colágeno necesario para la reparación del tejido que ha sido dañado, para lo cual se necesita una gran maquinaria sintética y de plegamiento de proteínas. El colágeno es una proteína que en su proceso de secreción debe ser plegada en el interior del retículo endoplásmico (RE) y se sabe que cuando se sobrepasa la capacidad de este para plegar las proteínas nacientes, entra en un estrés que gatilla una respuesta llamada Respuesta a Proteínas Mal Plegadas (UPR). Esta respuesta puede llevar a la sobrevida celular, pero cuando no es capaz de devolver la homeostasis a la célula, se ejecuta la apoptosis.

Para Inducir la fibrosis cardíaca y posteriormente evaluar la participación del estrés de retículo endoplásmico durante su evolución, nosotros utilizamos Isoproterenol, un conocido agonista  $\beta$ -adrenérgico capaz de producir lesiones del tipo micro infarto cardíaco. Nuestros resultados muestran una evolución hacia el desarrollo de fibrosis cardíaca, caracterizado por una temprana respuesta inflamatoria. Sin embargo, en forma paralela al proceso inflamatorio y al desarrollo de la fibrosis cardíaca se expresan los marcadores de estrés de retículo endoplásmico como CHOP, BIP y PDI en zonas dañadas o cercanas a ellas.

Para modular la UPR nosotros utilizamos 4-PBA, una conocida chaperona química que ha demostrado ser capaz de modular la UPR en distintos modelos de isquemia/reperfusión, y observamos la disminución de los marcadores de retículo endoplásmico en conjunto con una disminución en la cantidad de colágeno.

Conclusión: el estrés de retículo y la UPR participan en el desarrollo de fibrosis cardíaca, y la chaperona química 4-PBA reduce la fibrosis cardíaca a través de la modulación de la UPR.

## SUMMARY

### ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS PARTICIPATION IN THE CARDIAC EXPERIMENTAL FIBROSIS DEVELOPMENT IN RATS AND ITS MODULATION BY THE CHEMICAL CHAPERONE SODIUM PHENYLBUTYRATE.

Remodeling process after myocardium infarction is characterized by cardiomyocytes hypertrophy and damage tissue cicatrization, however, the molecular events involved in these processes have not been fully studied.

Fibrosis process of Damage tissue is characterized by the high demand for collagen necessary for the damage tissue reparation, which requires great synthetic and folding machinery. Collagen is a protein that in its secretion process must be folded inside the endoplasmic reticulum and it is know that when the endoplasmic reticulum folding nascent proteins capacity is exceed, the endoplasmic reticulum enter in stress and triggers a response called Unfolded Protein Response (UPR). This response can led to cell survival, but when this response is not able to restore the cell homeostasis, apoptosis is executed.

To induce cardiac fibrosis and subsequently evaluate endoplasmic reticulum stress participation during its development, we used isoproterenol, a know  $\beta$ -adrenergic agonist capable to induce micro cardiac infarction lesions.

Ours results show a progressive fibrosis development with an early inflammatory response and parallel emerge of endoplasmic reticulum stress markers as CHOP, BIP, and PDI in damage areas or close to the damage.

To modulate the UPR we used 4-PBA, a know chemical chaperone capable to modulate the UPR in many ischemia/reperfusion models, and we observed a decrease in endoplasmic reticulum stress markers together with a collagen decrease.

Conclusion: endoplasmic reticulum stress and UPR participate in the cardiac fibrosis development and the chemical chaperone 4.PBA decrease the cardiac fibrosis through the UPR modulation.

## **1. INTRODUCCION**

### **1.1 Generalidades**

Un estimado de 16,7 millones o 29,2 % del total de las muertes totales en el mundo son atribuibles a algún tipo de enfermedad cardiovascular (ECV). De los 16,7 millones de muertes por causa de una ECV cada año, 7,2 millones son debido a enfermedad isquémica cardiaca <sup>(1)</sup>.

Las principales ECV incluyen:

- Enfermedad cardiaca coronaria (o isquémica)
- Enfermedad cerebro vascular
- Hipertensión
- Insuficiencia cardiaca
- Enfermedad cardiaca reumática

En Chile, una particular relevancia tiene el grupo de enfermedades cardiovasculares, que muestra que la mortalidad es liderada por la enfermedad isquémica cardiaca con un 9,2% para ambos sexos y más de la mitad de la población adulta chilena tiene un riesgo cardiovascular alto o muy alto (55%), con altas tasas de hipertensión, sobrepeso, obesidad, dislipidemia y tabaquismo <sup>(2)</sup>.

### **1.2 Corazón**

Dentro del sistema circulatorio el corazón es el principal órgano y tiene la función de bombear sangre hacia los demás tejidos del cuerpo para nutrirlos y oxigenarlos, pero como trabaja mucho más que cualquier otro músculo del cuerpo, también necesita suplir su alta demanda de nutrientes y oxígeno por medio de dos arterias coronarias; la izquierda y la derecha, las cuales se ramifican para irrigar todo el tejido.

Cuando estas necesidades de oxígeno y nutrientes no pueden ser suministradas por el corazón se desarrollan eventos que pueden llegar a ser catastróficos <sup>(3)</sup>.

### **1.3 Enfermedad cardiaca isquémica**

La enfermedad cardiaca isquémica probablemente ha afectado a la humanidad a través de la historia, pero es en la última década cuando ha emergido como la más importante causa de muerte en las sociedades modernas.

Para la mayoría de la gente que sufre esta enfermedad el suministro de sangre oxigenada es reducido debido al estrechamiento progresivo del lumen de las arterias coronarias producido principalmente por placas de ateroma.

Los primeros signos de aterosclerosis pueden aparecer a edades tempranas pero los síntomas se manifiestan solo cuando la arteria presenta un estrechamiento de 50 – 70 % produciéndose una privación de oxígeno (isquemia) <sup>(4)</sup>.

El daño producido por isquemia provoca una muerte masiva de cardiomiocitos y como respuesta a esta pérdida celular, el tejido sufre modificaciones donde la hipertrofia y fibrosis son las principales características.

### **1.4 Fibrosis cardiaca**

#### **1.4.1 Matriz extracelular**

Otro evento que ocurre cuando el tejido ha sido dañado por isquemia es la posterior cicatrización. Debido a que el cardiomiocito es una célula incapaz de dividirse, la única alternativa es reemplazarla; tarea realizada por los fibroblastos cardiacos los cuales sintetizan proteínas como el colágeno, la fibronectina, etc. En el lugar en que los cardiomiocitos han muerto.

El colágeno es la proteína más abundante de la matriz extracelular (MEC) y es secretado principalmente por fibroblastos para la cicatrización de heridas, y su exceso conduce al desarrollo de fibrosis cardiaca. El colágeno posee dos regiones, una central, compuesta por regiones repetidas de la secuencia Gly-X-Y donde X e Y pueden ser cualquier residuo que por lo general corresponden a prolina o hidroxiprolina, esta región posee una forma fibrilar, posee también dos regiones terminales conocidas como N y C- propéptidos los cuales carecen de la secuencia tradicional (Gly-X-Y), por esta razón es que estas regiones tienen una forma lobular. El colágeno puede dimerizar o trimerizar dependiendo de su tipo, y la remoción proteolítica de estos propéptidos N y C terminales da origen a la triple hélice la cual es capaz de unirse a otras hélices e ir alargando la hebra <sup>(11)</sup>.

### **1.4.2 Modelos de fibrosis**

Varios modelos experimentales de fibrosis cardiaca se han desarrollado para entender su mecanismo, tanto celular como molecular. Entre estos modelos destacan el desarrollo del infarto cardiaco por el bloqueo de la arteria coronaria izquierda; la administración de angiotensina II por minibombas osmóticas implantadas debajo de la piel de la rata; la administración de aldosterona por el mismo mecanismo junto a la administración simultánea de NaCl y KCl en el agua de beber; la administración de Isoproterenol (un agonista beta adrenérgico) ya sea en dosis única o en multidosis, etc <sup>(30)</sup>. Todos estos modelos desarrollan fibrosis miocárdica con diferente magnitud y localización, siendo una fibrosis reparativa (infarto e isoproterenol) y reactiva (angiotensina, aldosterona, aunque también con muy pequeños focos reparativos), las que se pueden localizar en torno a los vasos sanguíneos o en el espacio intersticial.

Aunque el modelo del isoproterenol no es fisiológico, es uno de los más usados debido a que es un modelo que cursa con un buen desarrollo de fibrosis y en forma temprana, es fácil de realizar de bajo costo y complejidad.

### **1.5 Hipertrofia cardiaca**

La hipertrofia cardiaca se define como un incremento en el grosor de la pared y/o septointraventricular; a nivel celular se caracteriza por un aumento en el tamaño del cardiomiocito con un aumento en la síntesis proteica y una reorganización de la estructura sarcomérica. Aunque inicialmente la hipertrofia cardiaca constituye una respuesta compensatoria que normaliza transitoriamente el estrés biomecánico y optimiza la función de la bomba cardiaca, la hipertrofia miocárdica prolongada es un factor de riesgo de gran importancia para el desarrollo de insuficiencia cardiaca. La dicotomía entre hipertrofia fisiológica y patológica se ha descrito desde hace más de un siglo (Osler, 1892), pese a lo cual los mecanismos que determinan la progresión de hipertrofia a insuficiencia cardiaca aún están poco claros <sup>(9,10)</sup>.

### **1.6 Estrés de retículo endoplásmico**

El retículo endoplásmico (RE), es el responsable de la síntesis y correcto plegamiento de las proteínas, por lo que tan sólo el 5% del total de proteínas dentro del citoplasma corresponde a proteínas mal plegadas y no plegadas. Dentro del lumen del RE existen

chaperonas residentes que junto con toda una maquinaria mantienen un correcto flujo en el plegamiento proteico, pero cuando por diferentes razones como privación de nutrientes, **anoxia e isquemia**, infección por virus, deficiencias de calcio, diferenciación celular, inhibición de la bomba de Ca-ATPasa por Tapsigargina, inhibición de la N-glicosilación por Tunicamicina, etc. <sup>(12)</sup>, se ve alterado el correcto proceso de plegamiento se produce lo que se conoce como estrés de retículo endoplasmático que no es más que un desbalance entre la carga de proteínas no plegadas que entran al RE y la capacidad de la maquinaria celular para manejar esta carga. La respuesta celular a este fenómeno se denomina respuesta a proteínas mal plegadas (del inglés unfolded protein response: **UPR**), cuya función es transmitir la información obtenida a través de los sensores de estrés al núcleo para producir una respuesta que se puede dividir en tres objetivos, disminuir la carga proteica que entra al retículo, aumentar la capacidad del retículo para manejar las proteínas mal plegadas y por último si la homeostasis no puede ser restablecida, activar la maquinaria de muerte <sup>(13,14,15,16,17)</sup>, aunque los tres fenómenos son activados al mismo tiempo <sup>(17)</sup>.

### 1.6.1 Sensores de estrés

Los sensores de estrés de retículo son bastante similares en las células eucariontes y están compuestos por tres proteínas transmembrana del RE, que poseen su extremo amino terminal en el lumen del retículo, y su extremo carboxilo terminal hacia el citoplasma. Las tres proteínas que han sido identificadas son IRE-1 (inositol requiring protein-1), ATF6 (activating transcription factor-6) y PERK (protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase) <sup>(16, 17, 18, 19)</sup>.

IRE-1 posee dos actividades diferentes en sus dominios luminales y citosólicos. Con su porción luminal censa el ambiente de proteínas plegadas mientras que en su porción citosólica contiene un dominio Ser/Thr quinasa. Cuando aumenta la cantidad de proteínas mal plegadas, IRE1 se activa produciéndose su dimerización, lo que lleva a la fosforilación de los dominios quinasas yuxtapuestos gracias a la actividad de su dominio citosólico cuyo único sustrato conocido es la misma proteína. La activación puede ocurrir por la unión directa de las proteínas mal plegadas a la zona luminal de IRE1 o por la liberación desde esta zona de la chaperona residente del retículo BiP (GRP78) que reprime a IRE1, o por ambos efectos al mismo tiempo. La transfosforilación que ocurre después de la

dimerización, activa la función endoribonucleasa de este sensor, para que se produzca el corte del único sustrato que se conoce, el mRNA que codifica para el factor XBP-1. IRE1 corta 2 veces este mRNA, quitando un trozo intermedio, lo que lleva a un cambio en el marco de lectura para que se produzca una proteína más estable de 41 kDa denominada XBP-1s, que es un potente activador de los genes de la UPR y que pertenece a la familia de los factores de transcripción bZIP. Por otro lado, el mRNA que no ha sido cortado, codifica una proteína lábil (XBP-1u), pero que tiene por función reprimir la expresión de los genes involucrados en la UPR <sup>(16, 17, 19, 20)</sup>. XBP-1s heterodimeriza con la proteína NF-Y y se une a lo menos a 2 zonas regulatorias en los promotores de los genes de la UPR, siendo las principales zonas de unión la zona ERSE (ER stress enhancer) y la zona UPRE (unfolded protein response element) <sup>(15,18)</sup>. Principalmente XBP-1 produce la transcripción de genes que están involucrados con su autorregulación, con la diferenciación y el metabolismo, con la síntesis de proteínas chaperonas como BiP, GRP94, PDI, etc , y con la expresión de genes del sistema de degradación asociada al retículo (ERAD). Junto con lo anterior, el dominio citosólico activado de IRE1, interactúa con la proteína adaptadora TRAF2 que producirá la señalización de una serie de quinasa río abajo que llevarán a la activación de NF- $\kappa$ B y JNK, causando la expresión de genes asociados con respuestas de alarma e incluso de muerte <sup>(17, 18, 22)</sup>.

PERK, el segundo sensor de estrés de RE, es muy similar a IRE-1 ya que con su extremo amino terminal también puede sentir los cambios en el ambiente proteico y, además, se activa de la misma forma. Una vez que PERK es activada también homodimeriza y se autofosforila produciéndose la activación de su dominio citoplasmático que tiene actividad quinasa y que tiene como sustrato a la subunidad  $\alpha$  del factor de iniciación de la traducción (eIF2- $\alpha$ ), fosforilándolo en la serina 51. Al producirse la fosforilación de eIF2- $\alpha$  se inhibe al factor intercambiador de nucleótidos de guanina eIF2B ya que este no puede retornar a su forma activa que es capaz de unir GTP y, bajos niveles de eIF2B llevan a un bajo nivel de la traducción por lo que se produce una disminución en la síntesis proteica. Por otro lado, la fosforilación de eIF2- $\alpha$  lleva a un aumento en la traducción del factor de transcripción ATF4, que es capaz de inducir la expresión de genes relacionados con la privación de aminoácidos, con la resistencia al estrés oxidativo y junto con esto induce la expresión de chaperonas de la familia GRP, como BiP (GRP78), al heterodimerizar con XBP-1, y la expresión del factor de transcripción CHOP que a su vez induce la traducción de ERO1, GADD34 y de proteínas que llevarán a la muerte celular. GADD34 es la

subunidad regulatoria de la fosfatasa PP1 que tiene por función defosforilar a eIF2- $\alpha$  y así terminar la señalización de la vía PERK; en este proceso también interviene una fosfatasa constitutiva (CReP) que asiste a GADD34 en la defosforilación de eIF2- $\alpha$  <sup>(17, 20, 21, 22)</sup>

El último sensor de estrés de retículo es la proteína transmembrana ATF6. Este sensor es sintetizado como un precursor inactivo que se encuentra anclado al retículo a través de su segmento transmembrana y, al igual que los otros dos sensores, tiene una porción luminal que censa el estrés por la liberación desde esa zona de la proteína BiP. Una vez que esto último sucede, ATF6 es transportada hacia el aparato de golgi donde sufre la acción de la proteasa S1P (proteasa del sitio 1) y luego de la endoproteasa S2P (proteasa del sitio 2) para producir el fragmento que se unirá al DNA, denominado ATF6f, y que producirá el aumento en la expresión de ciertos genes, entre ellos los que codifican para el mRNA de XBP-1 <sup>(17, 18, 23)</sup>.

### **1.6.2 Chaperonas de retículo endoplasmático**

Las chaperonas pueden ser clasificadas en tres grupos:

- a) De la familia de las Proteínas de shock térmico (heat shock proteins) que incluyen a GRP78 o BIP, GRP94.
- b) Chaperonas lectinas tales como la calnexina, calreticulina.
- c) Las chaperonas sustrato específicas tales como la HSP47 específica para colágeno.

Además, existen al menos dos grupos de chaperonas catalizadoras del plegamiento de proteínas o también llamadas tiol oxidoreductasa pertenecientes a la familia de la Proteína disulfuro isomerasa (PDI) <sup>(24)</sup>.

GRP78 o también conocida como BIP, posee un conservado dominio ATPasa y un dominio de unión a péptidos. Reconoce y se une a residuos hidrofóbicos de proteínas mal plegadas, por ejemplo péptidos que son sustrato del sistema calnexina/calreticulina pueden unirse al GRP78 si la N-glicosilación se encuentra bloqueada <sup>(24)</sup>. También se ha descrito que se une a procolágeno en su dominio C-Propéptido para dar lugar al correcto plegamiento de esta proteína de matriz <sup>(25)</sup>.



## 1.7 PDI y su relación con colágeno

PDI corresponde a una proteína catalizadora de la formación de puentes disulfuros en péptidos recién sintetizados, posee 4 subunidades a,b,b'y a' de las cuales la primera y la última región (a, a') son las que poseen el sitio catalítico, mientras que el principal sitio de unión a sustratos se encuentra en el dominio b' el cual es capaz de unir sustratos peptídicos cortos<sup>(26)</sup>. Además PDI funciona como una subunidad de la enzima prolil 4-Hidroxilasa (C-P4H), encargada de la hidroxilación de los residuos de prolina presentes en la estructura del colágeno. C-P4H esta compuesta de 4 subunidades 2 $\alpha$  y 2 $\beta$  de las cuales la subunidad  $\beta$  corresponde a PDI. El rol de PDI en este tetrámero es la de mantener las subunidades  $\alpha$  en solución. Podemos encontrar distintos tipos de C-P4H en los cuales la única variable es la subunidad  $\alpha$ , mientras que la subunidad  $\beta$  siempre es PDI <sup>(26)</sup>. PDI también tiene una función directa sobre el correcto plegamiento del colágeno ya que se encarga de catalizar la formación de puentes disulfuro en el C-propéptido para así asegurar la unión entre las unidades monoméricas de procolágeno <sup>(11)</sup>.

## 1.8 Chaperona Química

El ácido 4 fenilbutírico (4-PBA) corresponde a un ácido graso de bajo peso molecular que ha sido aprobado para el uso clínico en niños con desórdenes en el ciclo de la urea. En los últimos años algunas publicaciones han descrito el uso de 4-PBA como una chaperona química para revertir la agregación de proteínas mal plegadas. El ejemplo más clásico es la reversión del mal plegamiento de la proteína de membrana reguladora de la conductancia para el ión Cl<sup>-</sup> implicado en la fibrosis quística <sup>(29)</sup>. Por otro lado, se ha demostrado, en un modelo *in vivo* de isquemia cerebral, que el volumen del infarto disminuía significativamente con dosis de 40 y 120 mg/kg de 4 -PBA pero no con 15mg/kg de 4-PBA <sup>(29)</sup>. Junto a ello observaron una disminución paralela en fosfo-eIF2 $\alpha$  (una de las principales rutas de señalización intracelular activadas por estrés de retículo), sugiriendo que es esta vía por la cual 4-PBA tendría acción protectora en infartos cerebrales. Sin embargo, a la fecha se desconoce si la chaperona química 4-PBA es capaz de modular el desarrollo de fibrosis cardiaca.

## 1.9 Estrés de RE en corazón

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

Actualmente se ha encontrado en ratones transgénicos para MCP-1 (proteína quimiotractante de monocitos-1) un aumento en los marcadores de estrés de retículo (BIP, ERO, PDI, CHOP) <sup>(27)</sup>. Por otro lado, Thuerauf et al., utilizando técnicas de transfección con adenovirus para BIP (in vivo) reportó un gran aumento en la expresión de ese marcador en corazón de ratas infartadas <sup>(28)</sup>. Finalmente, en el fibroblasto cardiaco la síntesis de colágeno tipo I, principal proteína sintetizada en el desarrollo de fibrosis, es acompañada de un aumento en la expresión de BIP, PDI, ERO y la chaperona HSP47. Los fibroblastos cardiacos están continuamente desafiados a plegar apropiadamente y eficientemente los polipéptidos nacientes, moviéndolos a sus ubicaciones celulares. Debido a que el desarrollo de proteínas mal plegadas o no plegadas puede ser desastroso, las células, en general, han desarrollado un ordenado sistema de control de calidad de proteína para mantener la conformación apropiada de proteína y para reorganizar y eliminar las proteínas mal plegadas o polipéptidos agregados. Debido a que hoy en día se sabe que en muchas enfermedades está involucrado en forma directa o indirecta el estrés de retículo endoplásmico, es necesario estudiar si estos tipos celulares responden frente a estrés RE, y si este controla o modula los procesos de cicatrización o remodelado tisular.

Finalmente, no está estudiado si el estrés de RE puede ser modulado con fármacos, por lo tanto, este estudio permitirá sentar las bases que conduzcan a una manipulación farmacológica del estrés RE, con el fin de conseguir un correcto proceso de cicatrización, pues en muchas células la respuesta a un estrés de retículo muy elevado o incontrolable por diferentes razones puede causar la muerte de la célula por apoptosis <sup>(15)</sup>, lo que conduciría a una inadecuada cicatrización o remodelado cardiaco de características patológicas.

En base a estos antecedentes se plantearon las siguientes interrogantes:

¿Durante el desarrollo de fibrosis cardíaca existe la activación de la UPR?

¿La expresión de chaperonas de retículo endoplásmico es paralela al desarrollo de fibrosis cardíaca?

¿La chaperona química 4-PBA Es capaz de modular el proceso de fibrosis cardíaca experimental?

## **2. HIPOTESIS**

En el desarrollo de fibrosis cardiaca experimental se produce un alto nivel de estrés de retículo endoplásmico, induciendo la expresión de chaperonas del retículo endoplásmico; y la chaperona química 4-PBA previene la fibrosis disminuyendo la UPR.

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar si en desarrollo de fibrosis cardiaca experimental inducida por isoproterenol se produce estrés de retículo, UPR y su reversión por el uso de 4-PBA.

#### **2.1.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Determinar si isoproterenol, induce la expresión de los distintos marcadores de estrés de retículo (BIP, PDI, CHOP).
2. Determinar por inmunohistoquímica si las proteínas marcadoras de estrés de retículo (BIP, PDI) se expresan principalmente sobre fibroblastos o cardiomiocitos.
3. Determinar si el estrés de retículo y la fibrosis cardiaca son revertidos por 4-PBA

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1 Reactivos**

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, EEUU): Isoproterenol Clorhidrato, 4- Phenylbutyric Acid. En Gibco BRL (Carlsbad, California EEUU): Estándares de pesos moleculares de proteínas pre-teñidas. Los compuestos inorgánicos y orgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en MERCK (Darmstadt, Alemania). El reactivo quimioluminiscente para western blot (Western Lightning) fue adquirido en PerKinElmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA, EEUU). Los anticuerpos primarios anti-BiP, anti-PDI, se obtuvieron de Cell Signaling Technology (Boston, MA, EEUU), el anticuerpo anti-CHOP fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, EEUU). La tunicamicina (Tn) se obtuvo de BIOMOL International Inc. (Plymouth Meeting, PA, EEUU).

#### **3.2 Modelo animal**

Ratas Sprague-Dawley Adultas de aproximadamente 2 meses de vida con un peso entre 150g - 200g, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, en cumplimiento de todas las normas éticas referidas a la utilización de animales.

##### **3.2.1 Tratamiento con isoproterenol.**

Se utilizaron 5 grupos de ratas compuestos por 4 animales cada uno, 4 de los grupos fueron tratados con una dosis sub-cutánea única de 50mg/kg de Isoproterenol disuelto en solución isotónica estéril y un grupo fue tratado solo con solución salina para utilizarlas como control.

El primer grupo fue sacrificado a las 9 horas luego de la administración de Isoproterenol, el segundo a los 2 días luego de la inyección, el tercer grupo a los 5 días, y el cuarto grupo fue sacrificado a los 10 días, el grupo control fue sacrificado a los diez días luego de la inyección de suero fisiológico.

### **3.2.2 Tratamiento Isoproterenol + 4-PBA**

Se utilizaron 8 grupos de ratas compuesto por 4 animales cada uno, 4 de los grupos fueron tratados con una dosis sub-cutánea de 80mg/kg/día de 4-PBA disuelto en una solución equimolar de NaOH y 30 minutos después fueron tratados con una dosis sub-cutánea única de 50mg/kg de Isoproterenol disuelto en solución isotónica estéril, el primer grupo fue sacrificado a las 9 horas luego de la inyección de Isoproterenol, el segundo grupo a los 2 días luego de la inyección de Isoproterenol, el tercer grupo a los 5 días y el cuarto grupo a los 10 días luego de la inyección de Isoproterenol.

Los restantes 4 grupos fueron tratados con una dosis de 80mg/kg/día de 4-PBA disuelto en una solución equimolar de NaOH para ser utilizados como control, el primer grupo fue sacrificado a las 9 horas luego de la inyección, el segundo a los 2 días, el tercer grupo a los 5 días y el cuarto grupo a los 10 días.

### **3.3 tratamiento con tunicamicina**

Un grupo compuesto por 3 ratas fueron tratadas con una dosis única de 1mg/kg S.C. de tunicamicina disuelta en solución isotónica estéril, y sacrificadas a los 10 días de tratamiento

### **3.4 Obtención de muestra**

Las ratas fueron sacrificadas mediante eutanasia, se extrajo el corazón en su integridad, posteriormente fue lavado con PBS estéril para extraer la mayor cantidad de sangre de las cámaras, luego se separaron las aurículas y el ventrículo derecho para dejar aislado el ventrículo izquierdo. Una vez obtenido el ventrículo izquierdo se le hizo 2 cortes; uno transversal en la parte media del corazón y otro corte vertical en la zona apical. Los cortes fueron mantenidos en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -80°C hasta su utilización.

La porción del tejido obtenida del corte transversal y una de las obtenidas del corte apical fueron utilizadas para realizar inmunohistoquímica y la sección apical restante fue utilizada para realizar inmuno-westernblot

### **3.5 Preparación de las muestras para electroforesis.**

La sección apical del tejido fue tratado con HEPES±Triton-X100 buffer (20mM HEPES, pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Triton-X100, 10% glicerol, 1mM EDTA, 10mM difosfato de sodio, 100mM NaF, 17.5mM B-glicerofosfato, 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, leupeptina 2 µg/mL; 10mM aprotinina; 1mM PMSF y 100 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). Luego fue homogeneizado con Ultra-turrax T8 IKA Labortechnik hasta completa destrucción del tejido. El homogeneizado se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay). Las proteínas se desnaturaron en tampón SDS-PAGE 4X (glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%, SDS 5%, Tris base 1,51%, Azul de bromofenol 0,01%, Agua csp. 100 mL, ajustar a pH 6.8 con HCL), y se almacenaron a -20°C.

#### **3.5.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida**

La separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y 12%. Para la detección se cargaron 50µg de extracto proteico. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 70 Voltios en tampón de electroforesis 1X (Tris base 30,25 g, Glicina 144 g, SDS 10 g, agua 1000 mL para tampón de electroforesis 10X).

#### **3.5.2 Electrotransferencia de proteínas.**

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) a 350 Miliamperes durante 90 min en tampón de transferencia (Tris-base 0,03%, Glicina 1,4%, Metanol 20% SDS 0,05%, ajustar pH 8,3)

#### **3.5.3 Inmunowestern blot.**

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

- BIP, PDI, en tampón de incubación BSA (TBS 1X; Tween-20 0,1%, BSA 5% p/v) a una dilución 1:1000, toda la noche a 4°C con agitación suave.

- CHOP, en tampón de incubación leche PBS (PBS 1X; leche descremada 5% p/v) a una dilución 1:2000 toda la noche a 4°C con agitación suave.
- Tubulina (como control de carga), en tampón de incubación con leche descremada a una dilución 1:5000 por dos horas a temperatura ambiente con agitación suave.

Posterior a la incubación, las membranas se lavaron 3 veces por 5 min en TBS 1X / Tween-20 al 0,1%, e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa, a un título de 1:5000 para tubulina; anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa a un título de 1:1000 toda la noche a 4°C para BiP y PDI; y 1:7000 para CHOP, todos en tampón de incubación con leche descremada. Para la detección de las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en solución de ECL (enhanced chemiluminescence) y se expusieron a la película de fotografía Kodak-Biomax. Las películas se digitalizaron y las imágenes fueron sometidas a densitometría mediante el programa ImageJ 1.40g. Después de realizar los ensayos de inmunowestern blot, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 60 min a temperatura ambiente en una solución de rojo ponceau (rojo ponceau 2%, TCA 30%, ácido sulfosalicílico 30%) para desprender los anticuerpos, posteriormente se lavaron en TBS 1X / Tween-20 al 0,1% por tres veces. Luego de este tratamiento, las membranas pudieron ser reutilizadas para nuevos ensayos de western blot.

### **3.6 Histoquímica.**

Las muestras fueron fijadas en formalina tamponada a pH 7,2 durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se deshidrataron en batería de etanoles de concentración creciente de 70, 96 y 100%, se aclararon en xileno y se impregnaron en parafina en procesador automático de tejido. De las inclusiones en parafina se obtuvieron cortes de 5 micrones de espesor en micrótopo rotatorio utilizando navajas desechables.

#### **3.6.1 Tinción de hematoxilina y eosina.**

Los cortes se desparafinaron en xileno y se hidrataron en batería de etanoles de concentración decreciente hasta agua destilada. A continuación los núcleos celulares fueron teñidos con hematoxilina de Harris durante 5 minutos, seguido de lavado y viraje al azul en agua corriente. Luego se tiñó el citoplasma con eosina acuosa al 1% durante 2 minutos. Finalmente los cortes se deshidrataron en etanoles, se aclararon en xileno y se montaron con medio hidrófobo permanente.



### **3.6.2 Tinción de tricrómico de Masson.**

Los cortes de hidrataron hasta el agua destilada y fueron teñidos con hematoxilina de Weighert recién preparada durante 10 minutos. A continuación, se escurre el exceso de colorante y los cortes se tratan con solución alcohólica saturada de ácido pícrico durante 4 minutos. Se lava rápidamente y se realiza tinción con solución de fucsina-ponceau por 4 minutos, seguida de incubación con ácido fosfomolibdico 1% durante 10 min. Finalmente, se tiñen con solución de azul de anilina al 0,5% en ácido acético al 2%. Se lava en agua destilada, se realiza deshidratación rápida en etanol absoluto, se aclara en xileno y se cubre con medio de montaje hidrófobo permanente.

### **3.7 Inmunohistoquímica.**

Los cortes de tejido se adhirieron a los portaobjetos utilizando silano (3 hidroximetil trietoxisilane, Sigma) se secaron en estufa a 60°C por 2 horas y se desparafinan e hidratan hasta agua destilada. Se realiza recuperación de reactividad de antígenos con buffer citrato a pH 6,0 durante 20 min a 96°C en baño termostático.

A continuación, los cortes se lavan con TBST (buffer tris salino 0,01M, pH 7,2 con 200ml de Tween 20/litro) 3 veces por 2 min cada una (TBST 3x2) y se realiza bloqueo de peroxidada endógena mediante incubación con peróxido de hidrógeno al 3% acuoso durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Luego se realiza bloqueo de reactividad inespecífica mediante incubación con suero normal de caballo al 3% durante 10 minutos TA. Se escurre el exceso de suero de bloqueo.

- BIP: Se incuba durante 1 hora a 37°C con anticuerpo policlonal de conejo anti BiP (C50B12, cat.:#3177 Cell Signaling Inc.) 1:50.
- PDI: Se incuba durante 1 hora a 37°C con anticuerpo policlonal de conejo anti PDI (Cat.:#2446, Cell Signaling Inc.), 1:25 o suero normal de conejo 1:50 y 1:25 respectivamente como control negativo.

La reacción antígeno-anticuerpo se revela con un kit listo para usar Vectastain PK7100 (Vector, California, USA), que comprende anticuerpo secundario biotinilado anti IgG de conejo/ratón y complejo avidina-biotina-peroxidasa. Las incubaciones con ambos reactivos se realizan durante 20 minutos a temperatura ambiente. Entre cada reactivo se realizan lavados con buffer (TBST 3x2). Finalmente, la peroxidasa unida al sitio de

reacción con el antígeno se demuestra por incubación con solución de sustrato-cromógeno (peróxido de hidrógeno al 0,003% en PBS pH7.6, con 0,02% de cromógeno DAB (3,3`diaminobenzidina)), durante 2 minutos TA. Los núcleos celulares se contrastan con hematoxilina de Mayer por 1 minuto, se lava y vira al azul con agua corriente y los cortes se deshidratan en batería de etanoles, se aclaran con xileno y montan con medio hidrófobo permanente.

### **3.8 Cuantificación de colágeno soluble.**

Para la medición de colágeno soluble se utilizo kit de colágeno “SIRCOL ® soluble collagen assay”. Extracto de tejido apical fue homogeneizado en tubo Eppendorf y las proteínas fueron determinadas mediante el método de Bradford, luego en tubos Eppendorf se agregaron 300µL de Dye Reagent y una cantidad equivalente de 31µg proteínas de cada muestra. Se homogeniza durante 30 minutos en mezclador mecánico a temperatura ambiente, posteriormente se centrifuga a 15.000rpm durante 10 minutos y el sobrenadante es descartado. El pellet es resuspendido en 500µL de “Alkali reagent” y homogeneizado en vortex. La solución obtenida es leída a 540nm.

### **3.9 Análisis estadístico**

Los resultados mostrados corresponden al promedio  $\pm$  S.D. de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism5 realizándose ANOVA y la prueba Tuckey para determinar la significancia estadística de los resultados.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Efecto del ISO 50mg/kg sobre la Inflamación.**

La evaluación morfológica del VI se realizó en cortes histológicos transversales, los que fueron teñidos con hematoxilina-eosina (figura 1A). En ella se observan las imágenes de microfotografías de VI de ratas tratadas con dosis única de Isoproterenol 50 mg/kg-peso, y sacrificadas a las 9 horas y a los 2, 5 y 10 días. El tratamiento con ISO desarrolló remodelamiento del tejido ventricular, consistente en zonas de daño en los que se observa pérdida de cardiomiocitos y su reemplazo por tejido de granulación (Área encerrada) el que aísla a células musculares viables (figura. 1A ver 2d y 5d respecto control). El tejido de granulación se caracterizó por infiltración celular y vascularización. En esta zona de granulación, se observaron distintos tipos de núcleos, destacando los núcleos alargados, del tipo fibroblasto cardiaco (+), y otros más bien redondeados característicos de células infiltrantes que podrían corresponder a macrófagos (\*). El nivel de daño se caracterizó por un score semicuantitativo (tabla 1), en la cual observamos que la inflamación se presenta principalmente a los 2 días.

### **4.2 Efecto del ISO 50mg/kg sobre la fibrosis cardiaca**

La evaluación de la fibrosis del VI se realizó en cortes histológicos transversales, los que fueron teñidos con tinción tricromo Masson (figura 1B). En ella se observan las imágenes de microfotografías de zona apical de VI de ratas tratadas con dosis única de Isoproterenol 50 mg/Kg-peso, y sacrificadas a las 9 horas y a los 2, 5 y 10 días. El tratamiento con ISO desarrolló remodelamiento del tejido ventricular, consistente en zonas de daño en los que se observa pérdida de cardiomiocitos y su reemplazo por depósito de colágeno (color azul) presente en el tejido de granulación el que aísla a células musculares viables (Fig. 1B ver 5d y 10d respecto control). El tejido fibrótico se caracteriza por presentarse en las zonas de daño caracterizadas por infiltración celular y vascularización. (El nivel de fibrosis cardiaca se analizó por un score semicuantitativo (tabla 1), en la cual observamos que el mayor grado de fibrosis se presenta principalmente a los 10 días.

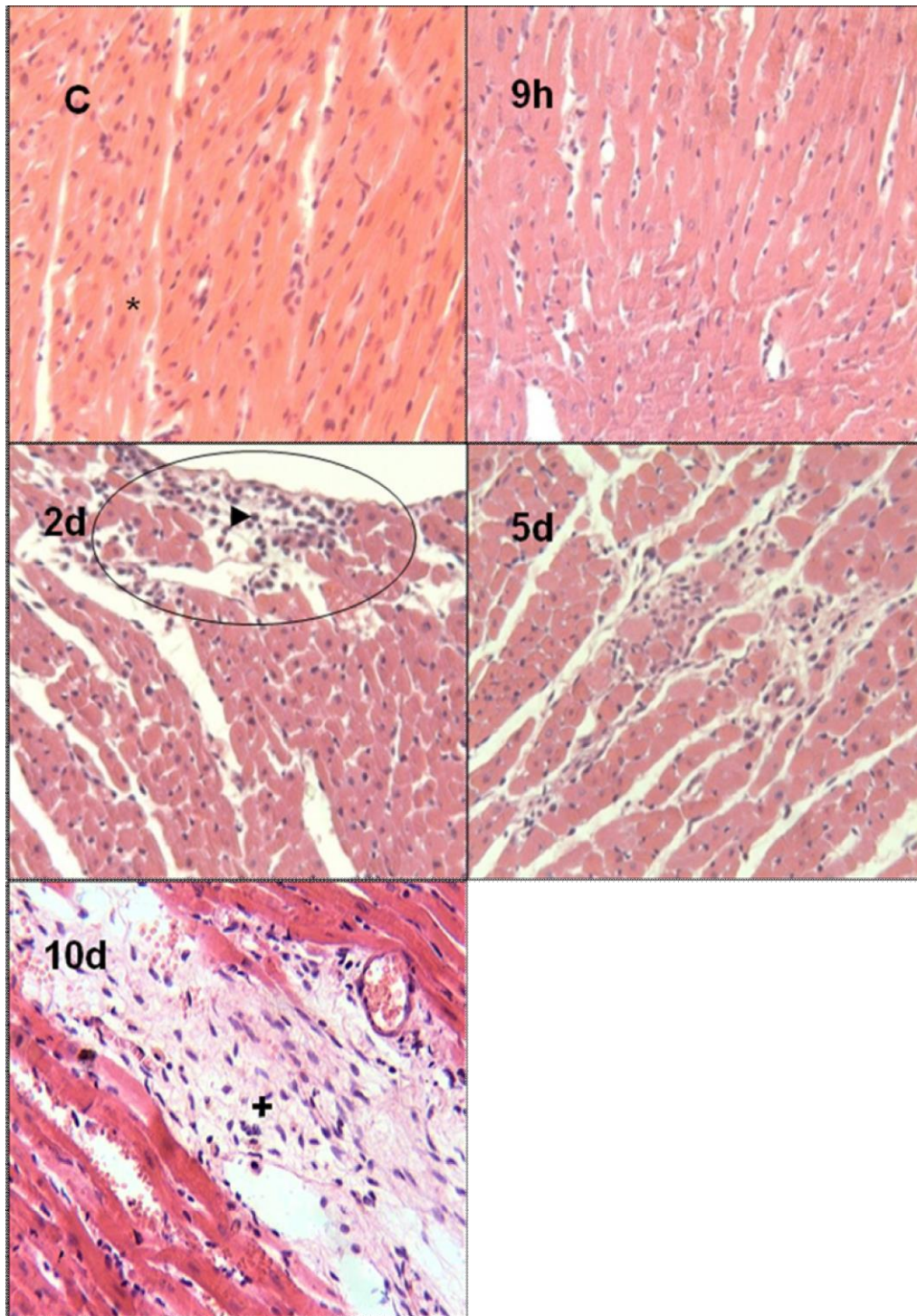


Fig1A. Efecto de ISO sobre la inflamación: Microfotografía en tinción de eosina/Hematoxilina de corte transversal de corazón de rata tratadas con ISO 50mg/kg en dosis única y sacrificadas a las 9 horas (9h), 2 días (2d), 5 días (5d), 10 días (10d), y control (C) tratadas con solución salina. Cabeza de flecha: célula infiltrante con característica de macrófago, +: célula intersticial con características de fibroblasto cardiaco, \*: cardiomiocitos Ampliación 20X.

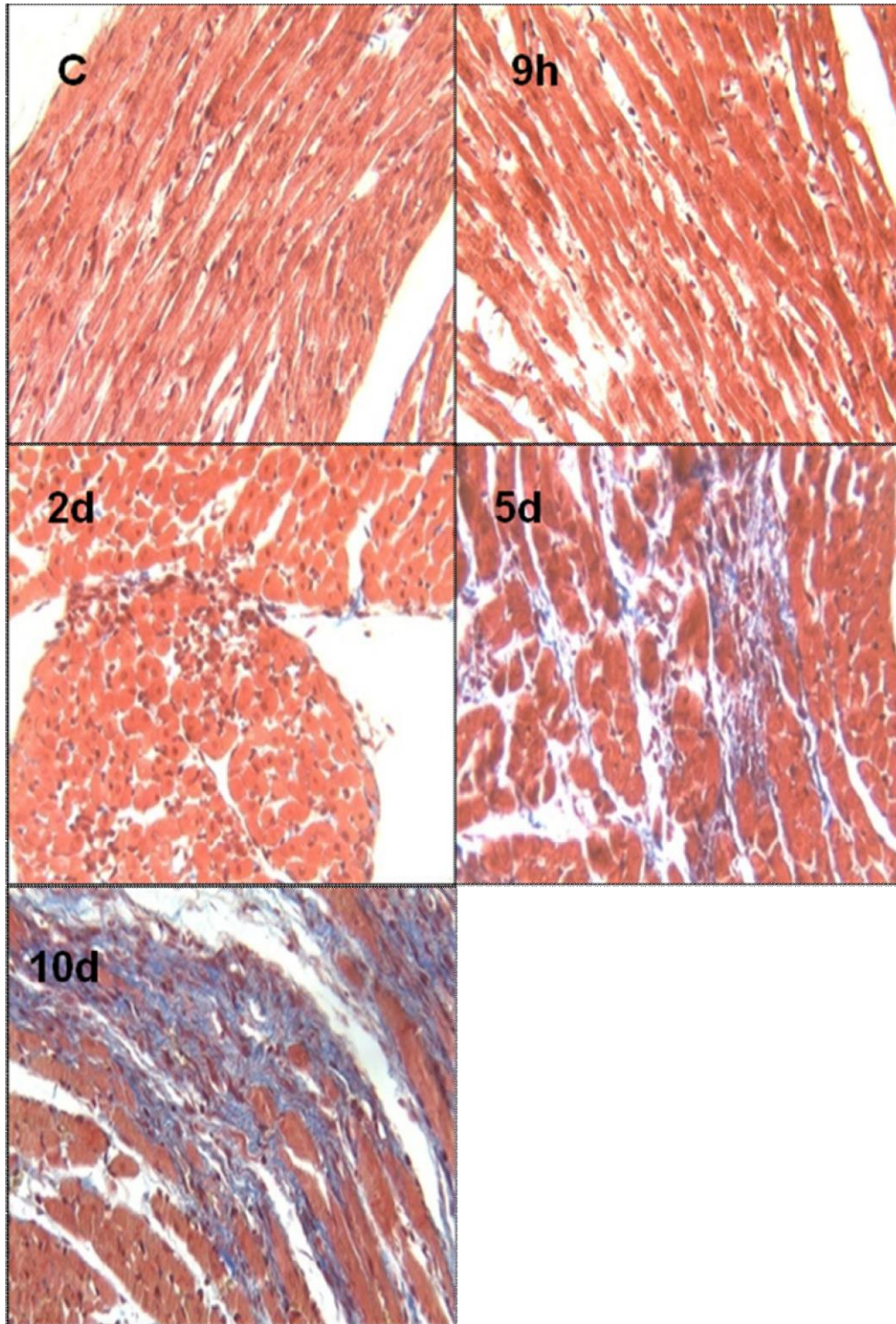


Fig1B. Efecto de ISO sobre la fibrosis cardiaca: microfotografía en tinción de Tricromo masson en cortes transversales de corazón de ratas tratadas con una dosis única de ISO 50mg/kg y sacrificadas a las 9 horas, 2 días, 5 días y 10 días. Para observación de focos fibróticos (color Azul) Ampliación 20X.

Tiempo de tratamiento	Inflamación	Fibrosis
C	0	0
9h	1	0
2d	2	1
5d	1	2
10d	1	3

Tabla1. Efecto del ISO sobre la inflamación y fibrosis cardiaca a las 9 horas, 2 días (2d), 5 días (5d) y 10 días (10d) observada por microscopia en cortes de tejido de corte transversal. Score: 0= sin daño, 1= lesión vascular y peri vasculares sin daño de cardiomiocitos. 2= clara área de necrosis e infiltrado, 3= múltiples focos necróticos y depósitos de colágeno.

#### **4.3. Efecto de ISO sobre la expresión de chaperonas del retículo endoplásmico.**

El proceso de fibrosis cardiaca se caracteriza por la secreción de una gran cantidad de proteínas de la matriz extracelular las cuales para poder ser secretadas deben estar correctamente plegadas función desempeñada por chaperonas residentes de RE y que son sobre expresadas cuando se desencadena la UPR.

### 4.3.1 Efecto de ISO sobre la expresión de BIP

En la figura 2 A podemos observar la sobreexpresión de BIP en homogeneizado de tejido apical del VI a los distintos tiempos de tratamiento mediante la técnica de western blot, observándose solo a los 10 días un aumento estadísticamente significativo (alrededor de 3 veces sobre el control) ( $p < 0.001$ ,  $n=4$ ). En la figura 2B observamos mediante la técnica de inmunohistoquímica la sobreexpresión diferencial de esta proteína en los distintos tipos de células que constituyen el tejido, como fibroblastos, Cardiomiocitos, células vasculares. Todas ubicadas principalmente en zonas dañadas o vecinas

Fig. 2

A)

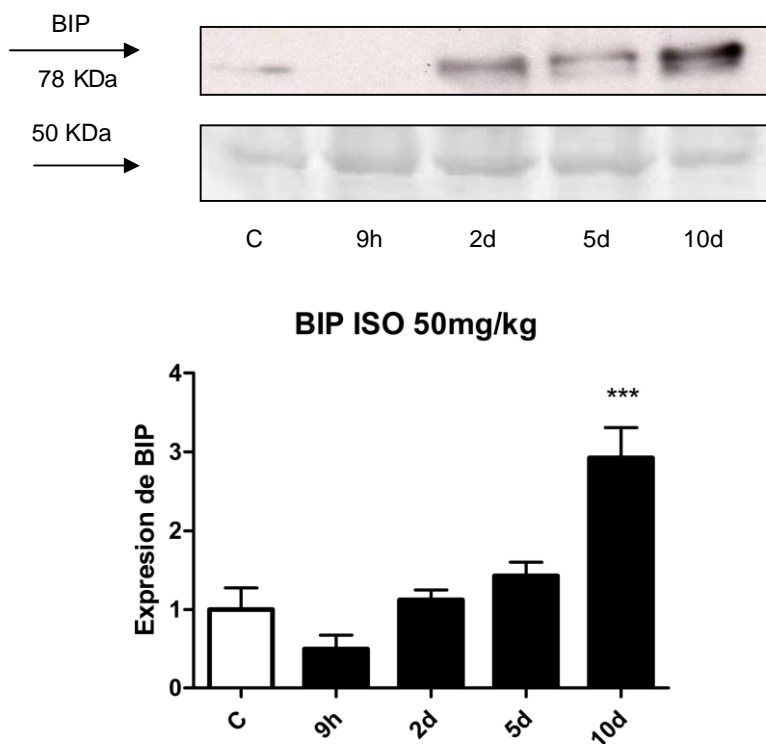


Fig2A. Efecto de una dosis única de ISO sobre la expresión de la proteína BIP mediante la técnica de inmunowesternblot en tejido apical, C= Control, 9h= 9 horas, 2d= 2 días, 5d= 5 días, 10d= 10 días. Promedio  $\pm$  D.S. \*\*\*=  $p < 0.001$  respecto al control,  $n=4$

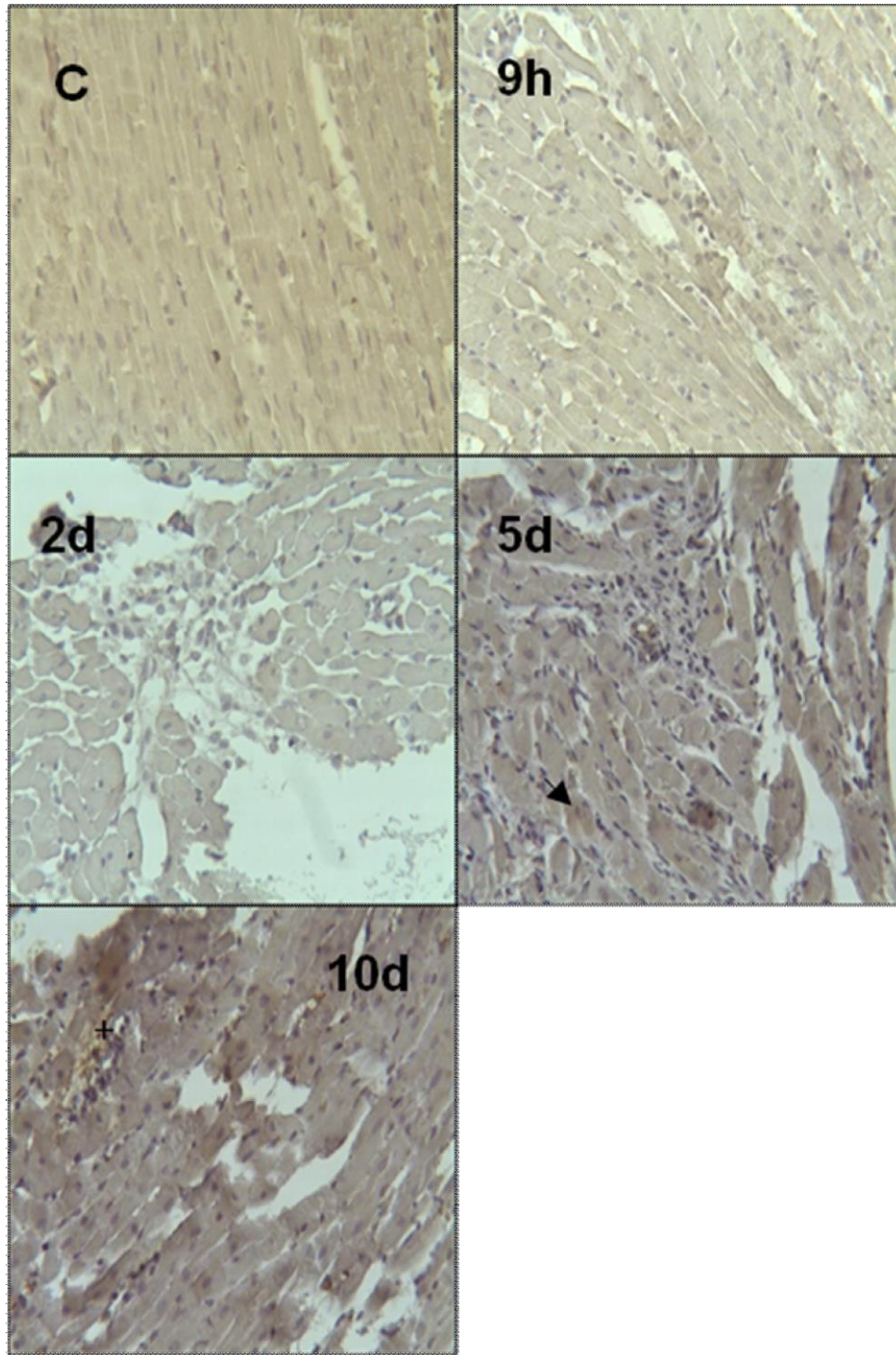


fig2B. Microfotografía de cortes transversales de corazón de ratas tratadas con ISO 50mg/kg dosis única y sacrificadas a las 9 horas (9h), 2 días (2d), 5 días (5d), 10 días (10d) y solución salina (C). Inmunohistoquímica para la proteína BIP (tinción café). +: Célula intersticial con característica de fibroblasto, cabeza de flecha: Cardiomiocitos. Ampliación 20X.



### 4.3.2 Efecto de ISO sobre la expresión de PDI

En la figura 3A podemos observar la sobreexpresión de PDI en homogeneizado de tejido apical del ventrículo izquierdo a los distintos tiempos de tratamiento mediante la técnica de western blot observándose solo a los 10 días un aumento estadísticamente significativo (alrededor de 2,5 veces sobre el control) ( $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ). En la figura 3B se muestra la expresión diferencial, de PDI sobre los distintos tipos celulares, mediante la técnica de inmunohistoquímica en cortes de tejido apical. A los 2 días cuando la respuesta inflamatoria esta en su punto mas alto podemos observar su sobreexpresión sobre células de infiltrado inflamatorio, y a medida que pasa el tiempo podemos observar esta sobreexpresión principalmente sobre cardiomiocitos vecinos al daño y fibroblastos cardiacos.

Fig. 3

A)

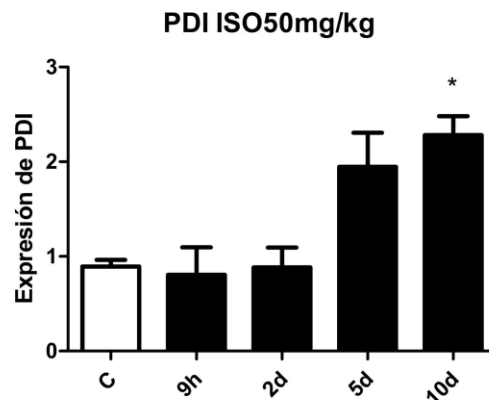
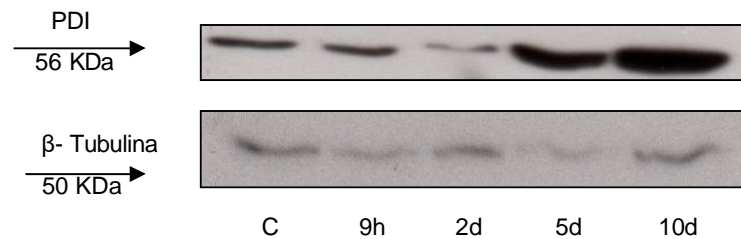


Fig3A. Efecto de una dosis única de ISO sobre la expresión de la proteína PDI mediante la técnica de inmunowesternblot en tejido apical, C= Control, 9h= 9 horas, 2d= 2 días, 5d= 5 días, 10d= 10 días. Promedio  $\pm$  D.S. \* =  $p < 0.05$  Respecto al control,  $n = 4$ .

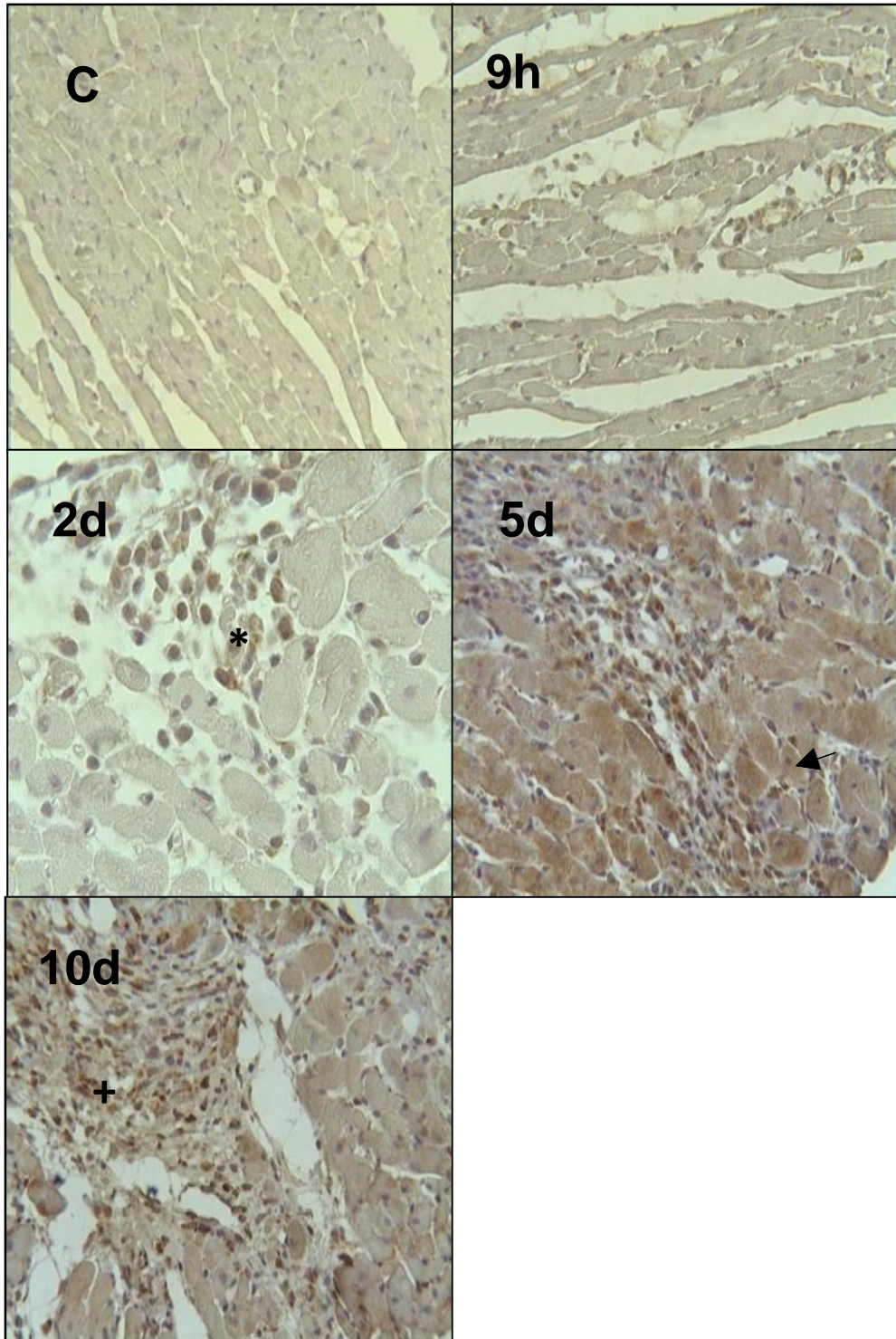


Fig3B. Microfotografía de cortes transversales de corazón de ratas tratadas con ISO 50mg/kg dosis única y sacrificadas a las 9 horas (9h), 2 días (2d), 5 días (5d), 10 días (10d) y solución salina (C). Inmunohistoquímica para la proteína PDI (tinción café). Flecha: Cardiomiocitos, +: célula intersticial con características de fibroblastos cardiacos.\*: célula infiltrante con características de macrófago. Ampliación 20X.

#### 4.4. Efecto de ISO sobre la expresión de CHOP

CHOP corresponde a un marcador de la respuesta UPR relacionado con la muerte por apoptosis inducida por estrés de retículo endoplásmico, la determinación se realizó sobre tejido homogeneizado de la zona apical de VI en ratas tratadas con ISO 50mg/kg, en la figura 4 podemos observar la expresión de esta proteína a los distintos tiempos de tratamiento mediante la técnica de western blot, observándose que el aumento es estadísticamente significativo a las 9 horas (alrededor de 2,5 veces sobre el control) ( $p < 0.001$ ,  $n = 4$ ) luego de administrado el ISO, sugiriendo que ISO induce una temprana activación de UPR.

Fig. 4

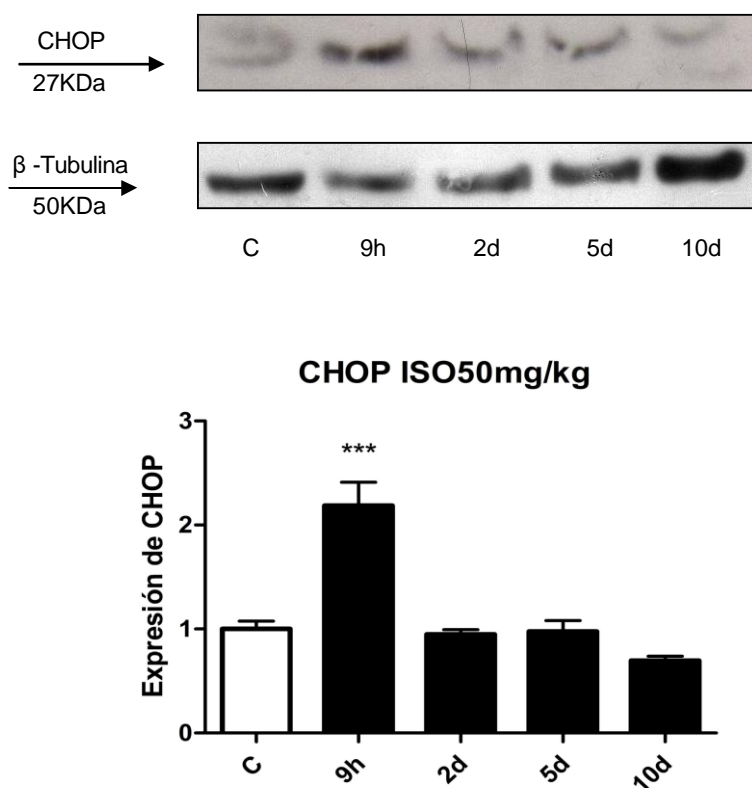


Fig4. Efecto de una dosis única de ISO sobre la expresión de la proteína CHOP mediante la técnica de inmuno-westernblot en tejido apical, C= Control, 9h= 9 horas, 2d= 2 días, 5d= 5 días, 10d= 10 días. Promedio  $\pm$  D.S. \*\*\*=  $p < 0.001$  respecto al control,  $n = 4$

#### **4.5 Efecto de 4-PBA 80mg/kg/día sobre inflamación y fibrosis cardiaca en ratas tratadas con ISO50mg/kg.**

4-PBA corresponde a un ácido graso de bajo peso molecular y se ha descrito que tiene la capacidad de actuar como una chaperona química.

##### **4.5.1. Efecto de 4-PBA sobre la inflamación en ratas tratadas con ISO 50mg/kg.**

La evaluación morfológica sobre el VI se realizó a través de cortes histológicos transversales del mismo, los que fueron teñidos con hematoxilina-eosina. En la Fig.5A, se observa que el tratamiento con ISO desarrolló remodelamiento del tejido ventricular mostrando una temprana aparición de infiltración celular (2 días), la cual no fue revertida por el tratamiento con 4-PBA (tabla 2). El nivel de inflamación se evaluó a través de un score semicuantitativo.

##### **4.5.2 Efecto de 4.PBA sobre la fibrosis cardiaca en ratas tratadas con ISO 50mg/kg**

Para determinar el impacto de 4-PBA sobre la fibrosis cardiaca, las ratas tratadas con 4-PBA 80mg/kg/día + ISO 50mg/kg y sacrificadas a los 10 días fueron analizadas por tinción con tricromo Masson. En la Fig.5B, se observa que 4-PBA tiene la capacidad de retrasar y la aparición y disminuir el tamaño de focos fibróticos (tabla 3). Para evaluar el nivel de daño se utilizó un score semicuantitativo.

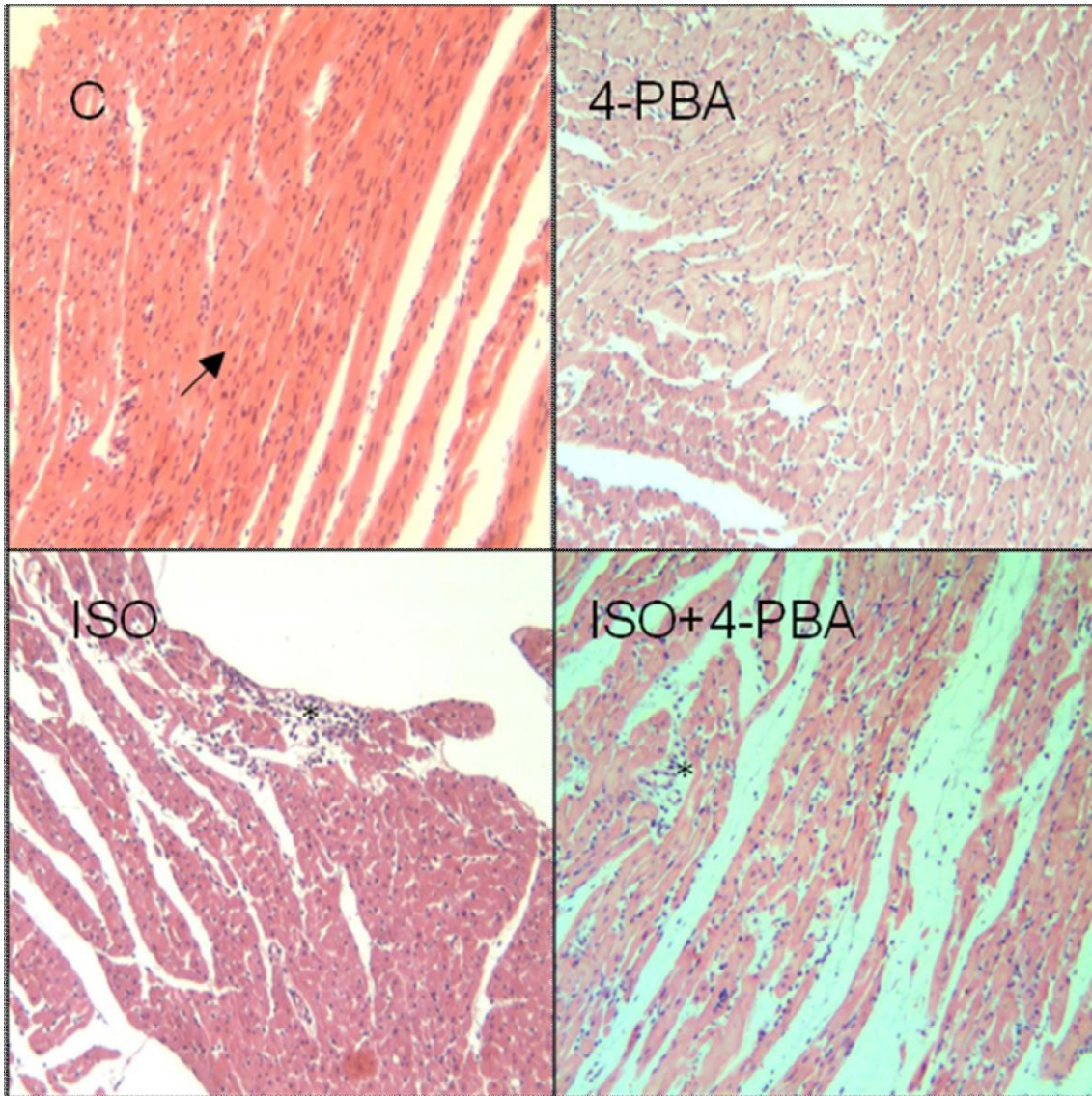


Fig5A. Efecto de 4-PBA sobre la inflamación en ratas tratadas con ISO: Microfotografía en tinción de eosina/Hematoxilina de corte transversal de corazón de rata tratadas con ISO 50mg/kg + 4-PBA 80mg/kg/día en dosis única y sacrificadas a los 2 días (2d), y control (C) tratadas con solución salina. +: Célula intersticial con características de fibroblasto cardiaco, \*: célula infiltrante con característica de macrófago, flecha: cardiomiocitos. Ampliación 20X

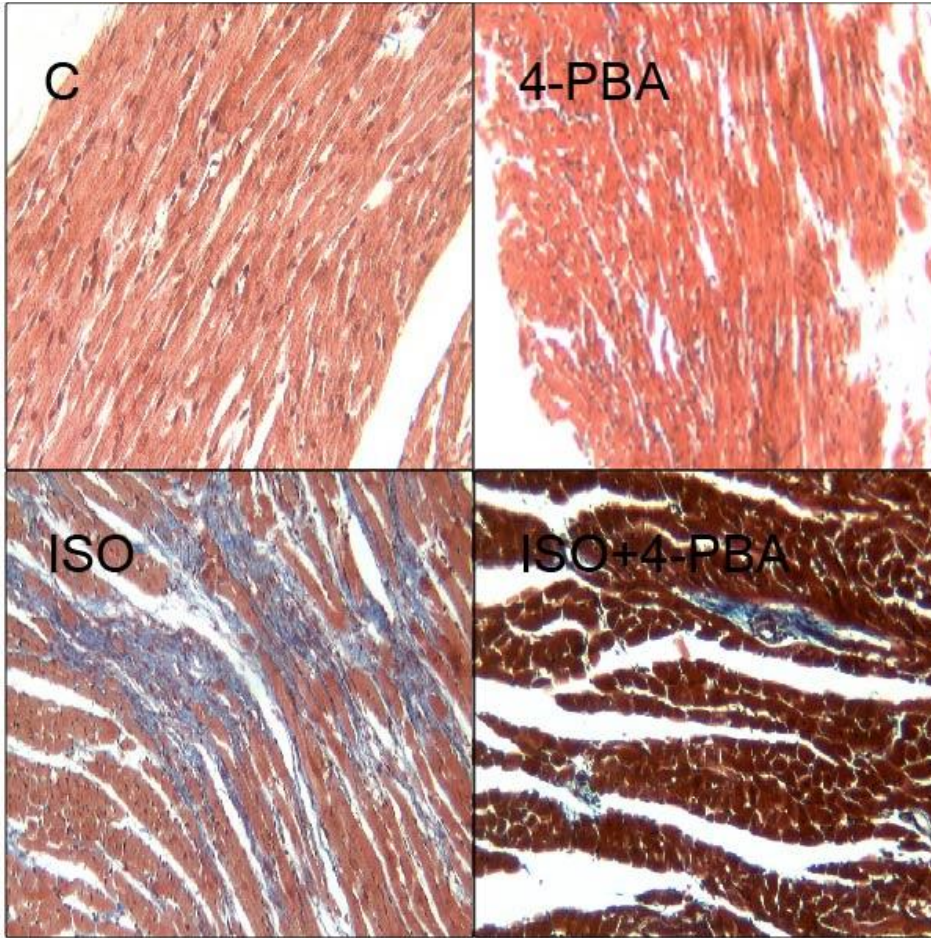


Fig5B. Efecto de 4-PBA 80mg/kg/día sobre la fibrosis cardiaca en ratas tratadas con ISO 50mg/kg: microfotografía en tinción de Tricromo masson en cortes transversales de corazón de ratas tratadas con una dosis única de ISO 50mg/kg + 4-PBA 80mg/kg/día y sacrificadas a los 10 días para observación de focos fibróticos (color Azul). Ampliación 20X.

INFLAMACION APICAL				
Tiempo	C	4-PBA	ISO	ISO + 4PBA
9h	0	1	1	1
2d	0	1	2	2
5d	0	1	1	1
10d	0	1	1	2

Tabla2. Efecto del 4-PBA 80mg/kg/día + ISO 50 mg /kg sobre la inflamación en tejido apical de VI a las 9 horas, 2 días (2d), 5 días (5d) y 10 días (10d) observada por microscopia. Score: 0= sin daño, 1= lesión vascular y peri vasculares sin daño de cardiomiocitos. 2= clara área de necrosis e infiltrado, 3= múltiples focos necróticos y depósitos de colágeno

FIBROSIS APICAL				
Tiempo	C	4-PBA	ISO	ISO + 4PBA
9h	0	0	0	0
2d	0	0	0	0
5d	0	0	2	1
10d	0	0	3	2

Tabla3. Efecto del 4-PBA 80mg/kg/día + ISO 50 mg /kg sobre la fibrosis en tejido apical de VI a las 9 horas, 2 días (2d), 5 días (5d) y 10 días (10d) observada por microscopia. Score: 0= sin daño, 1= lesión vascular y peri vasculares sin daño de cardiomiocitos. 2= clara área de necrosis e infiltrado, 3= múltiples focos necróticos y depósitos de colágeno

#### **4.6 Efecto de 4- PBA 80mg/kg/día sobre la expresión de BIP en ratas tratadas con ISO 50mg/kg**

Para evaluar el efecto que tiene 4-PBA sobre la expresión de la proteína chaperona BIP se tomaron muestras de VI de la zona apical y se analizó por medio de western blot a los distintos tiempos de tratamiento (Fig.6 A-C) observándose un aumento estadísticamente significativo solo a los 10 días (Fig.6C) ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ) para el tratamiento con ISO 50 mg/kg. El tratamiento con 4-PBA + ISO muestra una tendencia a la disminución en el tiempo respecto del control, sin embargo, esta no alcanza a ser estadísticamente significativa (Fig. 6C). Para determinar la expresión diferencial de esta proteína se tomaron muestras de la zona apical y fueron analizadas por inmunohistoquímica donde las imágenes muestran un aumento en zonas dañadas y cercanas al daño concentrándose principalmente sobre cardiomiocitos para el tratamiento con ISO 10d. Para el tratamiento con ISO + 4-PBA 10d se observa una respuesta similar con un leve descenso en la expresión de BIP (Fig.6D).



Fig. 6

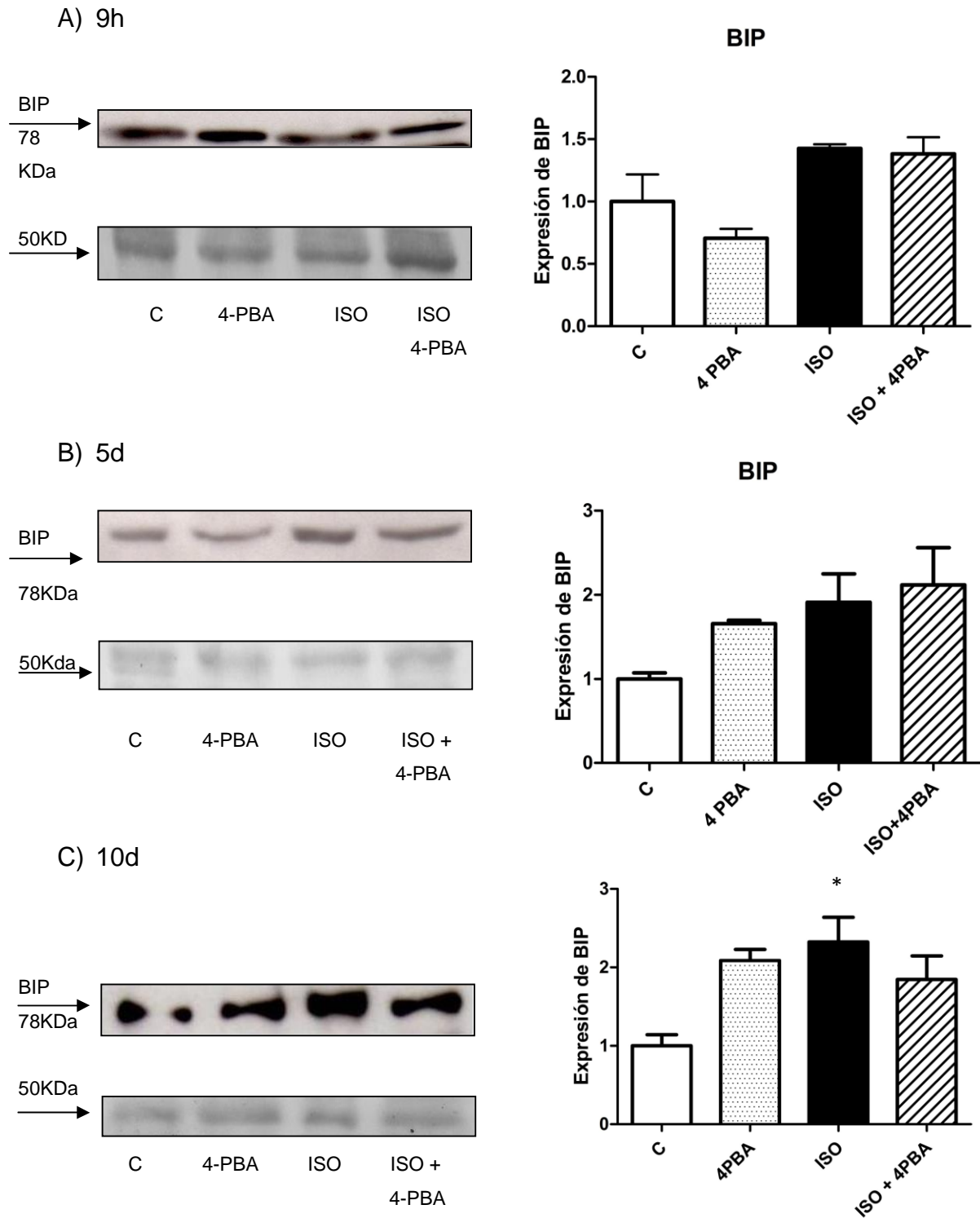


Fig6. Efecto de 4-PBA en ratas tratadas con ISO y sacrificadas a las A) 9 horas, B) 5 días y C) 10 días, sobre la expresión de la proteína BIP mediante la técnica de inmuno-westernblot en tejido apical. Promedio  $\pm$  D.S. \*;  $p < 0,05$ , respecto al control,  $n=3$ .

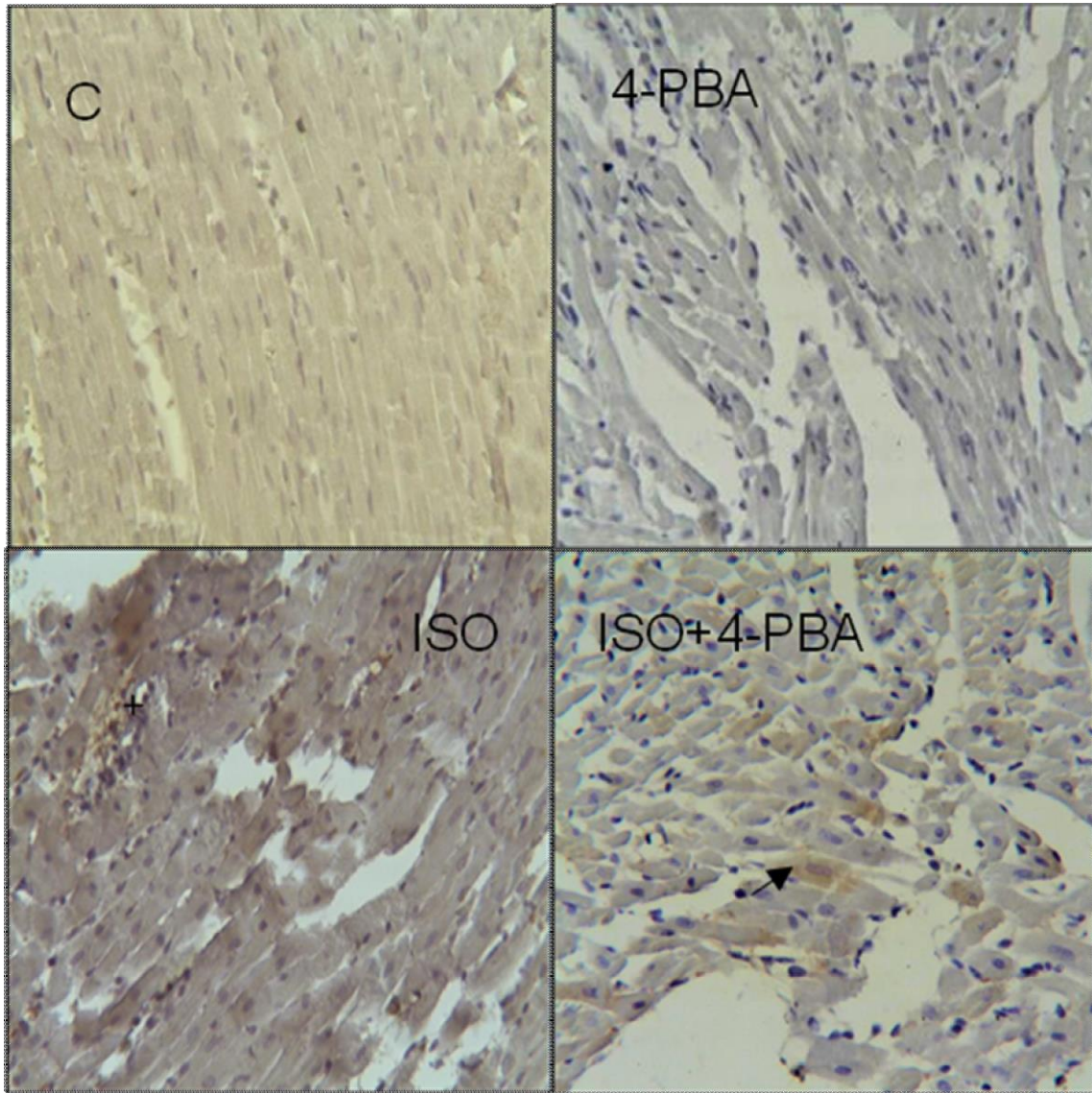


Fig6 D. Microfotografía de cortes transversales de corazón de ratas tratadas con ISO 50mg/kg + 4-PBA 80mg/kg/día sacrificadas a los 10 días (10d) y solución salina (C). Inmunohistoquímica para la proteína BIP. Flecha: Cardiomiocitos; +: fibroblasto. Ampliación 20X.

#### **4.7 Efecto de 4- PBA 80mg/kg/día sobre la expresión de PDI en ratas tratadas con ISO 50mg/kg.**

Para evaluar el efecto que tiene 4-PBA sobre la expresión de la proteína chaperona PDI se tomaron muestras de VI de la zona apical y se analizó por western blot a los distintos tiempos de tratamiento (Fig.7A-C) observándose un aumento estadísticamente significativo solo a los 10 días (Fig. 7C) ( $p < 0,05$   $n=3$ ) para el tratamiento con ISO 50 mg/kg. El tratamiento con 4-PBA + ISO a los 10 días muestra una disminución estadísticamente significativa respecto al tratamiento con ISO 50mg/kg ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ) sugiriendo que 4-PBA tiene la capacidad de modular la expresión de PDI (Fig. 7C). Para determinar la expresión diferencial de esta proteína en los distintos tipos celulares se tomaron muestras de la zona apical y analizaron por inmunohistoquímica donde las imágenes muestran un aumento en zonas dañadas y cercanas al daño concentrándose principalmente sobre cardiomiocitos para el tratamiento con ISO 10d. Para el tratamiento con ISO + 4-PBA 10d se observa una respuesta similar con un marcado descenso en la expresión de PDI (Fig.7D), sugiriendo que 4-PBA puede tener la capacidad de modular la expresión de PDI.

Fig. 7

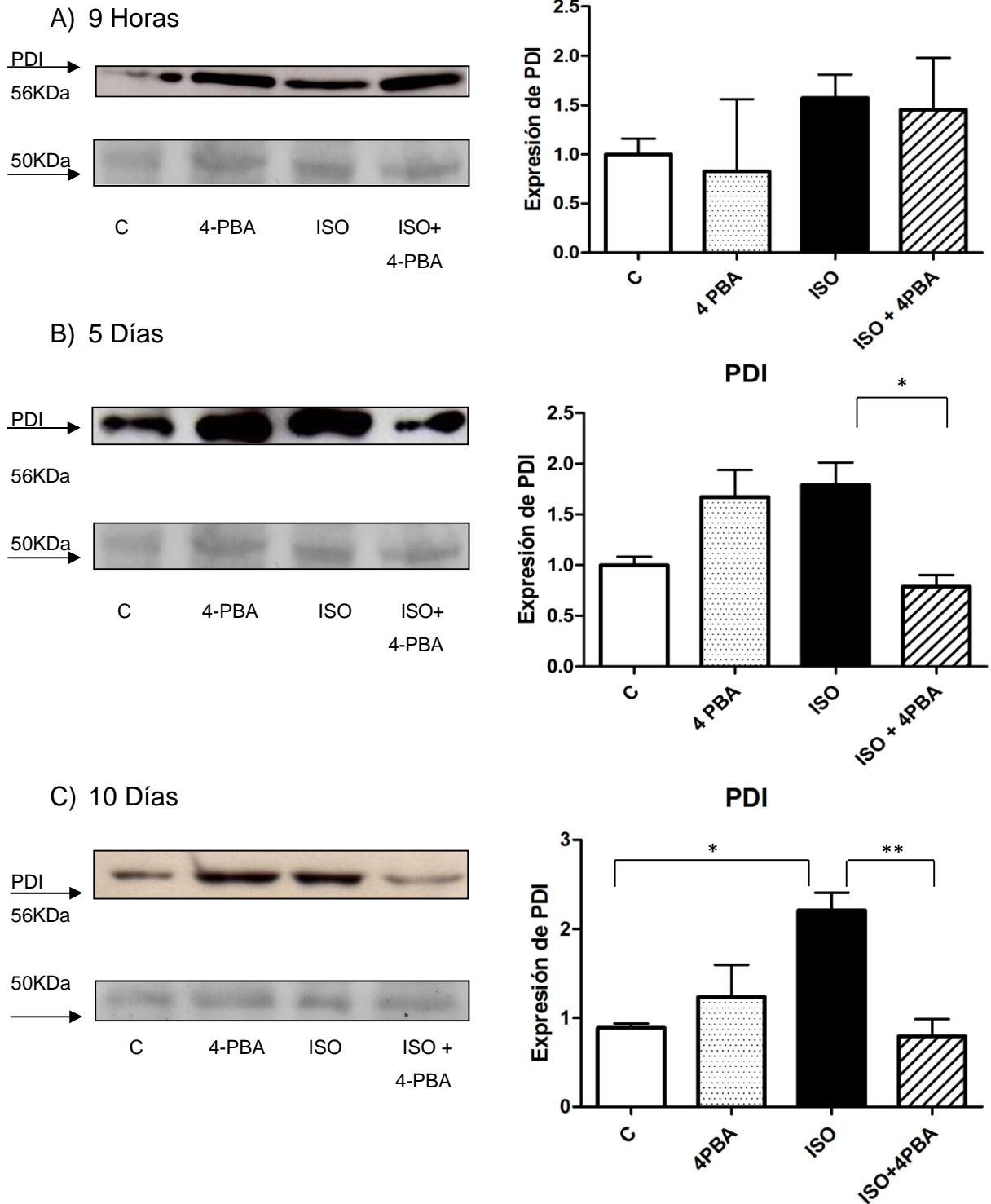


Fig7. Efecto de 4-PBA en ratas tratadas con ISO y sacrificadas a las A) 9 horas, B) 5 días y C) 10 días, sobre la expresión de la proteína PDI mediante la técnica de inmuno-westernblot en tejido apical. Promedio  $\pm$  D.S. \*\*,  $p < 0,01$ , \*,  $p < 0,05$  respecto al control,  $n=3$ .

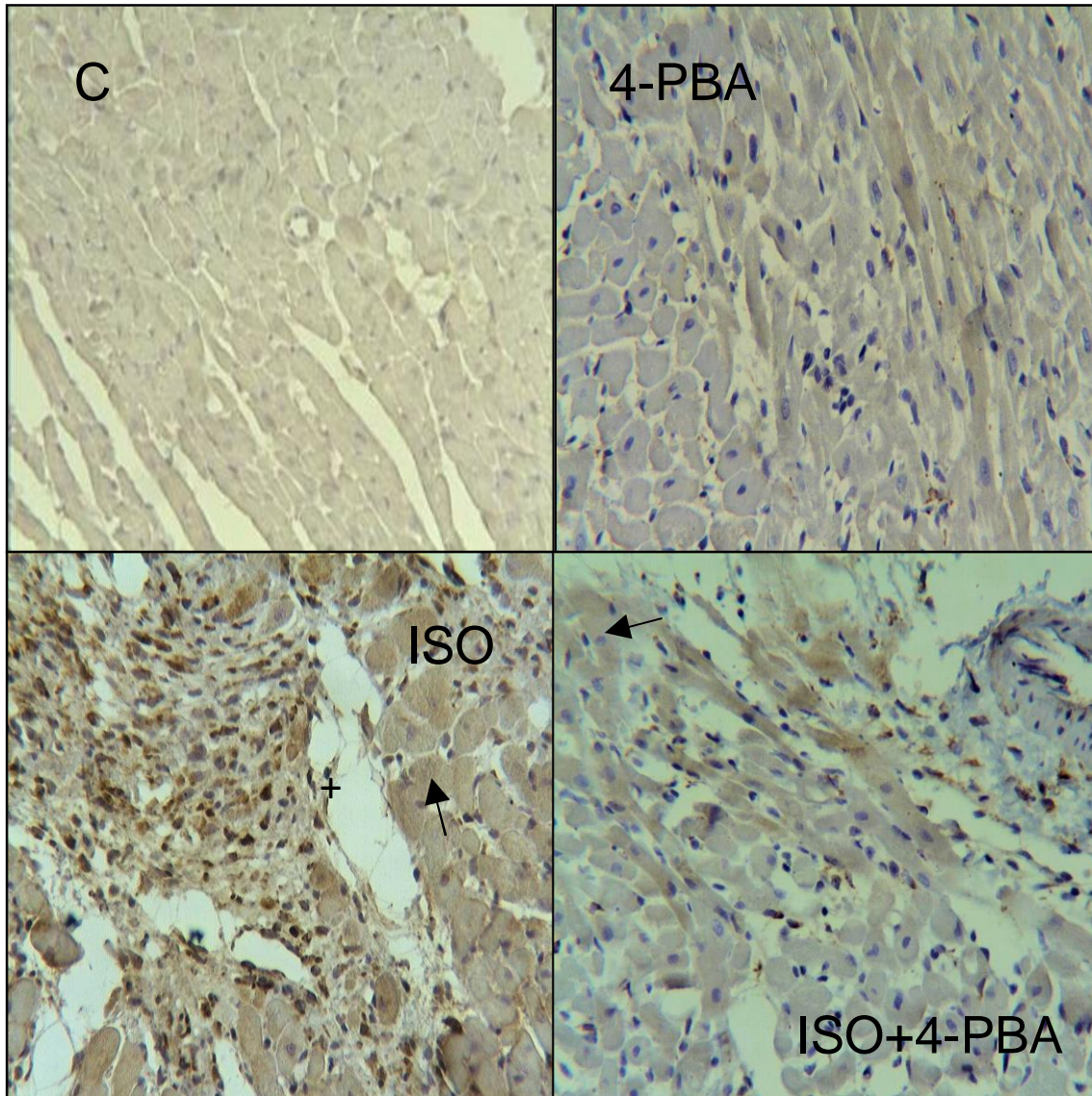


Fig7D. Microfotografía de cortes transversales de corazón de ratas tratadas con ISO 50mg/kg + 4-PBA 80mg/kg/día sacrificadas a los 10 días (10d) y solución salina (C). Inmunohistoquímica para la proteína PDI (tinción café). Flecha: Cardiomiocitos, +: Fibroblastos cardiacos. Ampliación 20X.

#### 4.8 Efecto de de 4- PBA 80mg/kg/día sobre la expresión de CHOP a las 9 horas luego de la administración de ISO 50mg/kg.

Para confirmar que 4-PBA está actuando como una chaperona química y es capaz de modular la UPR activada por el modelo del isoproterenol se tomaron muestras de zona apical de VI de ratas tratadas con ISO 50mg/kg + 4-PBA 80mg/kg sacrificadas a las 9 horas de tratamiento y analizaron los niveles de la proteína CHOP mediante western blot. Los resultados muestran que ISO induce un aumento estadísticamente significativo en su expresión a las 9 horas (Fig. 8) ( $p < 0,01$ ,  $n=3$ ) y que este aumento no se produce cuando se administra en conjunto a 4-PBA ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ), confirmando que 4-PBA es capaz de modular la respuesta UPR en tejido apical inducida por ISO.

Fig. 8

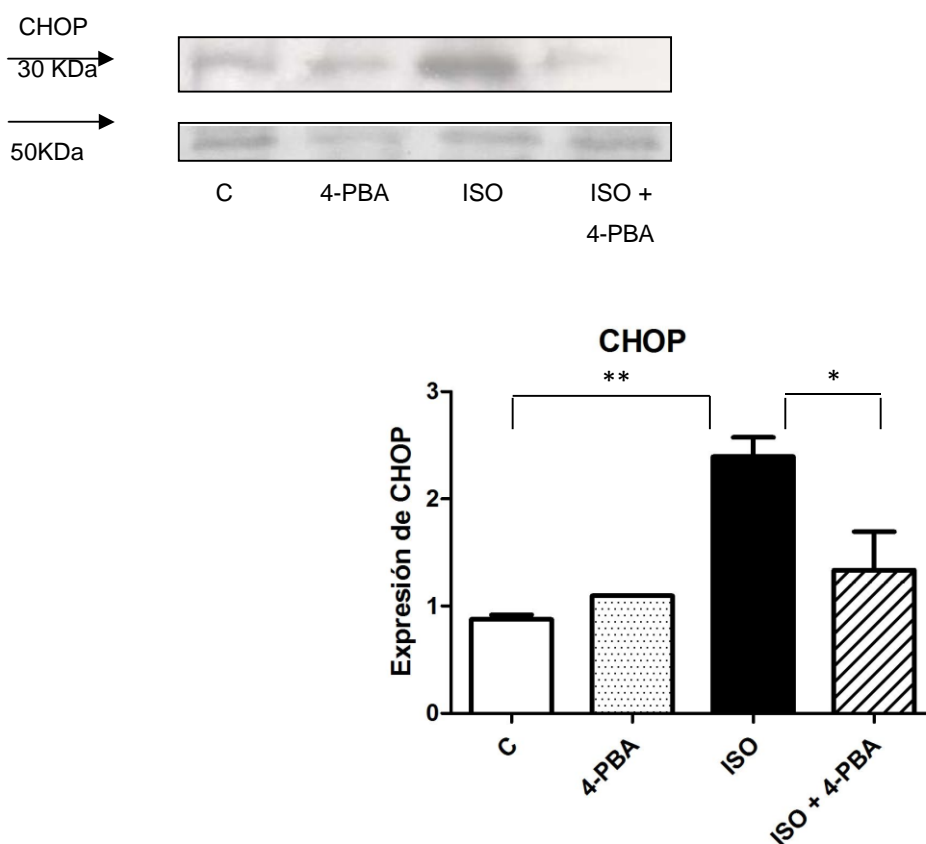


Fig8. Efecto de 4-PBA en ratas tratadas con ISO y sacrificadas a las 9 horas, sobre la expresión de la proteína CHOP mediante la técnica de inmuno-westernblot en tejido apical. Promedio  $\pm$  D.S. \*\*;  $p < 0,01$ , \*= $p < 0,05$  respecto al control,  $n=3$ ,

#### 4.9 Colágeno soluble.

Para determinar la el nivel de fibrosis cardiaca, utilizamos homogeneizado de tejido apical de VI de ratas tratadas con dosis única de ISO 50mg/kg o ISO 50mg/kg + 4-PBA 80mg/kg/día y sacrificadas a los 10 días y se midió la cantidad de colágeno soluble. Los resultados mostraron un significativo aumento de colágeno para la dosis única de 50mg/kg respecto del control (alrededor 0,5 veces) (\*\*:p>0,01; n=4) y 4-PBA disminuye de manera significativa (\*:p>0,05; v/s ISO, n=4) la cantidad de colágeno respecto del tratamiento solo con ISO.

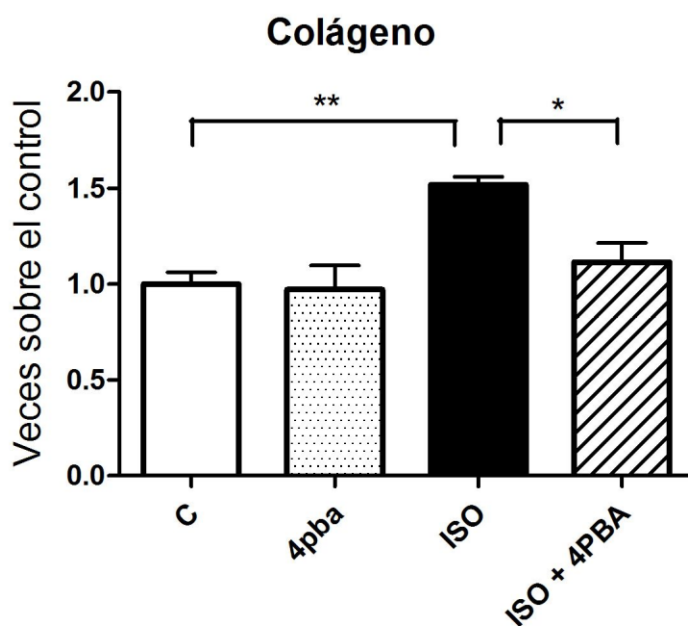


Fig9. Efecto de 4-PBA en ratas tratadas con ISO y sacrificadas a los 10 días, sobre la cantidad de colágeno soluble mediante espectrofotometría en tejido apical. n=3, \*=p<0,05.

#### 4.10 Efecto de tunicamicina sobre inflamación y fibrosis cardiaca.

Tunicamicina es un conocido estresor para el retículo endoplásmico capaz de impedir la N-glicosilación de proteínas desencadenando la UPR, para determinar si el estrés de retículo endoplásmico es capaz de dañar el tejido conduciendo a un desarrollo de fibrosis cardiaca se trataron ratas con tunicamicina 1mg/kg y se sacrificaron a los 10 días de tratamiento, se tomaron muestras de corte transversal de VI y mediante tinción de Hematoxilina/eosina se obtuvo la tabla 4 donde se observa una leve respuesta inflamatoria después de 10 días. Para la determinación de la fibrosis se utilizó la tinción de tricromo Masson donde los resultados muestran leve presencia de focos fibróticos después de 10 días de la inyección.

Tejido Central		
	Inflamación	Fibrosis
C	0	0
Tn	1	1
Tn	1	1
Tn	1	1

Tabla4. Efecto del Tn 1mg/kg sobre la inflamación y fibrosis cardiaca a los 10 días, observadas por microscopia en cortes de tejido apical y central. Score: 0= sin daño, 1= lesión vascular y peri vasculares sin daño de cardiomiocitos. 2= clara área de necrosis e infiltrado, 3= múltiples focos necróticos y depósitos de colágeno



#### 4.10.1 Efecto de tunicamicina sobre la expresión de PDI

Para confirmar que tunicamicina es capaz de activar la UPR en tejido cardíaco se tomaron muestras de tejido apical de VI de ratas tratadas con tunicamicina 1mg/kg y sacrificadas a los 10 días para determinación mediante western blot de la proteína PDI. Los resultados muestran un aumento estadísticamente significativo en la expresión de PDI de alrededor de 2,5 veces respecto al control ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ) luego de 10 días de la inyección y para observar la expresión diferencial de esta proteína según el tipo celular las muestras fueron sometidas a inmunohistoquímica donde se observa la expresión principalmente sobre cardiomiocitos y células inflamatorias.

Figura 10A

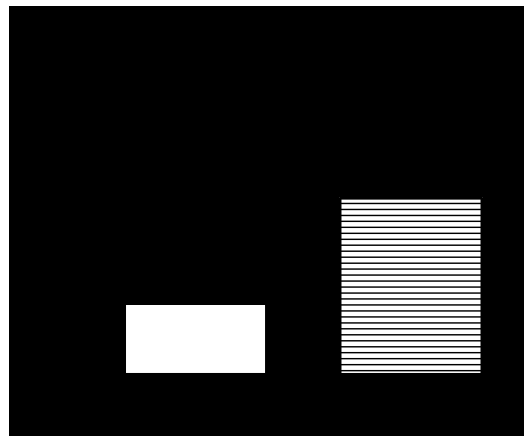
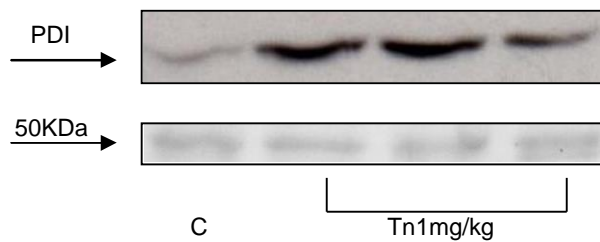


Fig10A. Efecto de Tunicamicina sobre la expresión de la proteína PDI en ratas sacrificadas a los 10 días luego de la administración. Inmuno-westernblot en tejido apical. Promedio  $\pm$  D.S. \*;  $p < 0,05$  respecto al control,  $n=3$

Figura 10B

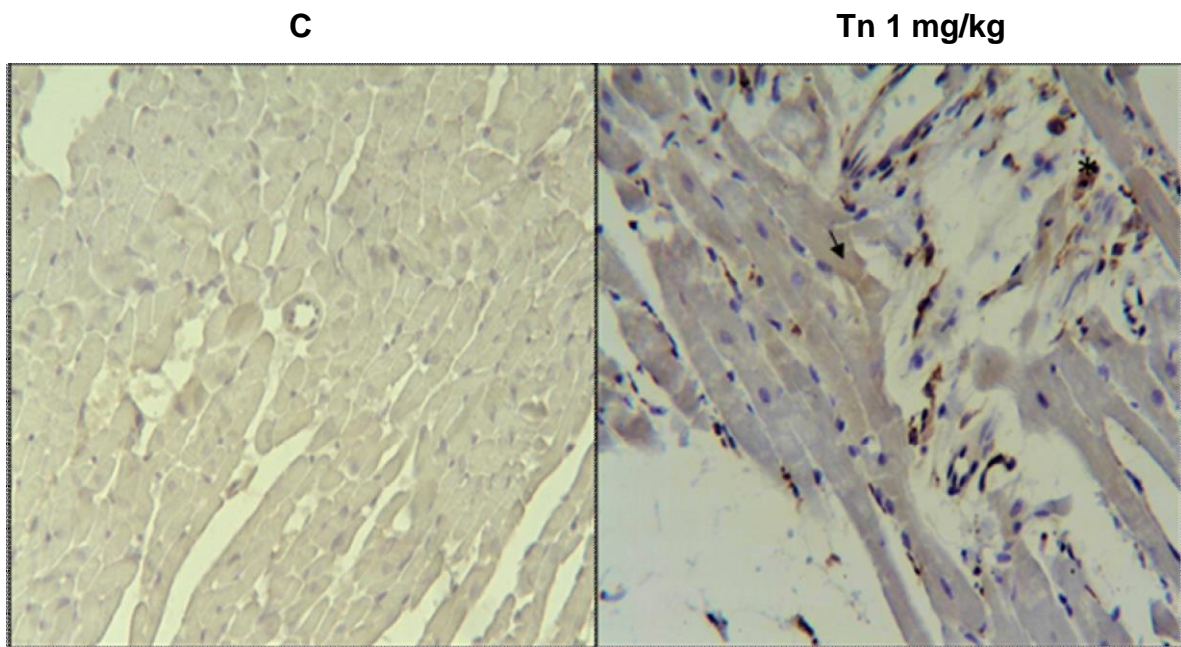


Fig10B. Microfotografía de cortes transversales de corazón de ratas tratadas con Tn 1 mg/kg sacrificadas a los 10 días (10d) y solución salina (C). Inmunohistoquímica para la proteína PDI (tinción café). Flecha: Cardiomiocitos, \*: células inflamatorias. Ampliación 20X.

#### 4.10.2 Efecto de tunicamicina sobre la expresión de BIP

Para confirmar que tunicamicina es capaz de activar la UPR en tejido cardíaco se tomaron muestras de tejido apical de VI de ratas tratadas con tunicamicina 1mg/kg y sacrificadas a los 10 días para determinación mediante western blot. Los resultados muestran un aumento estadísticamente significativo en la expresión de BIP de alrededor de 2,5 veces respecto al control ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ) y para observar la expresión diferencial de esta proteína según el tipo celular las muestras fueron sometidas a inmunohistoquímica donde se observa la expresión principalmente sobre cardiomiocitos y células inflamatorias

Figura 11A

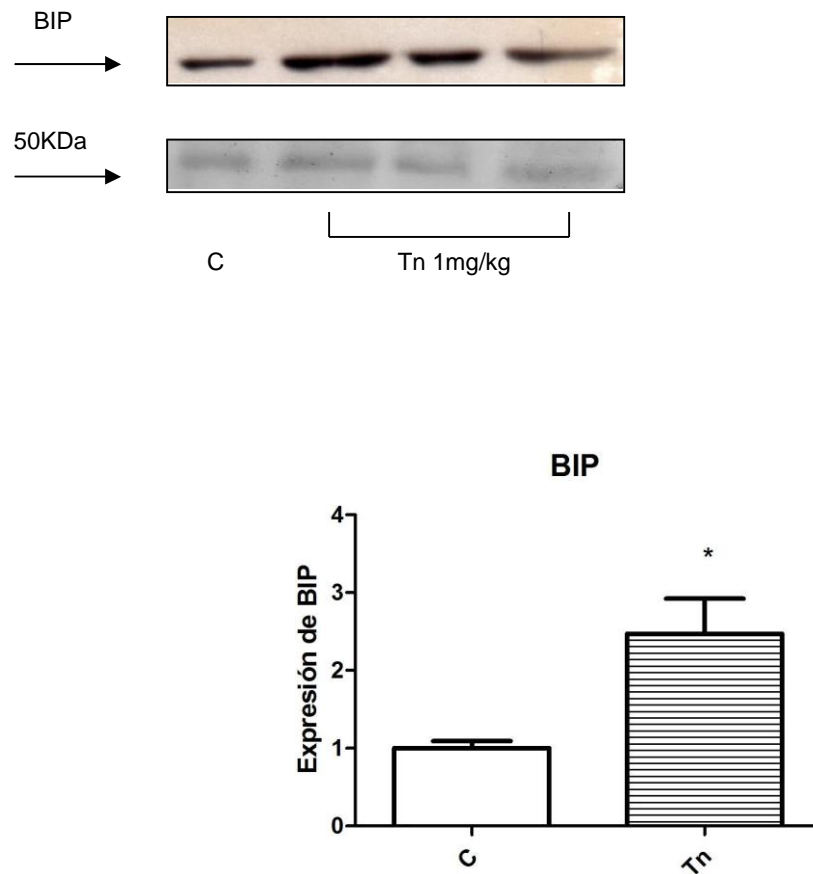


Fig11A. Efecto de Tunicamicina sobre la expresión de la proteína BIP en ratas sacrificadas a los 10 días luego de la administración. Inmuno-westernblot en tejido apical. Promedio  $\pm$  D.S. \*;  $p < 0,05$  respecto al control,  $n=3$

Figura 11B.

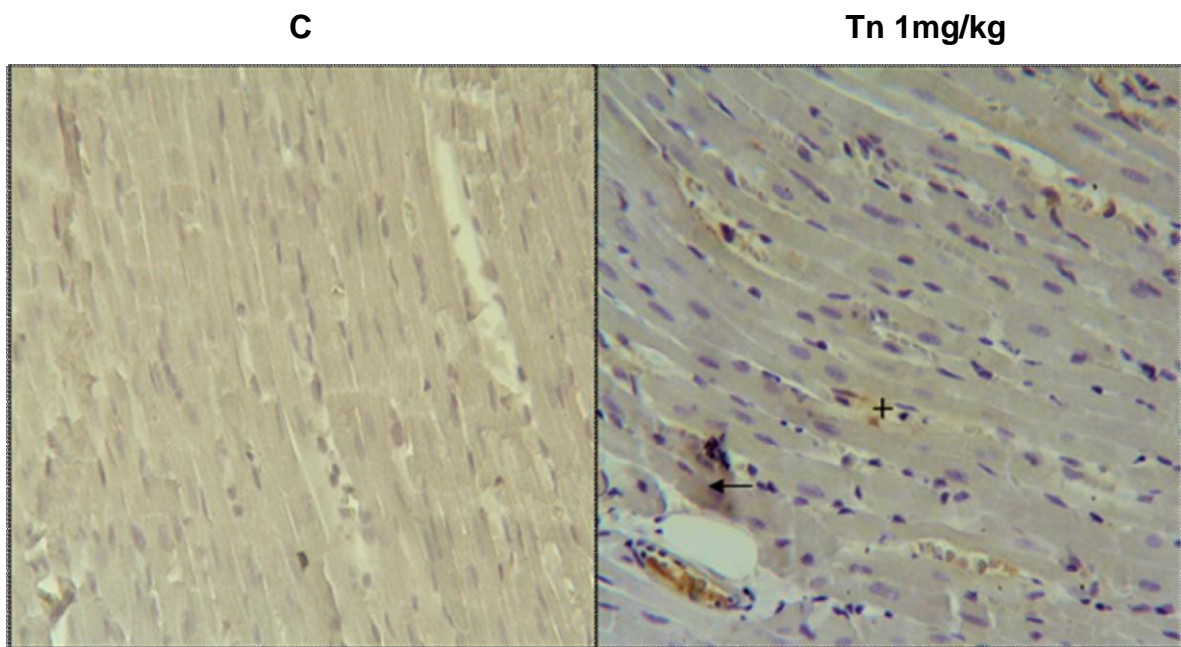


Fig11B. Microfotografía de cortes transversales de corazón de ratas tratadas con Tn 1 mg/kg sacrificadas a los 10 días (10d) y solución salina (C). Inmunohistoquímica para la proteína BIP. Flecha: Cardiomiocitos, +: célula intersticial con características de fibroblasto. Ampliación 20X

## 5. DISCUSIÓN

Los resultados mas importantes de la presente memoria fueron: ISO indujo fibrosis cardiaca, y de forma paralela aumentó la expresión de las proteínas marcadoras de estrés de retículo, caracterizada por una temprana y transitoria expresión de la proteína CHOP, y la tardía expresión de las proteínas BIP y PDI, las cuales alcanzan su máxima expresión de manera paralela al máximo desarrollo de fibrosis. El pretratamiento con 4-PBA previene el aumento en la expresión de CHOP y de PDI, y reduce el desarrollo de fibrosis cardiaca.

### 5.1 Fibrosis inducida por ISO

El tratamiento de ratas con ISO genera distintas repuestas a nivel cardiaco dependiendo de la dosis que se emplee, siendo también importante el tiempo de exposición a este xenobiótico. Los dos principales efectos de ISO a nivel cardiaco son el desarrollo de hipertrofia y de fibrosis cardiaca. Este modelo experimental ha sido ampliamente utilizado en el laboratorio <sup>(41, 42)</sup> y nuestros resultados por histoquímica confirman que en nuestro modelo se indujo hipertrofia y fibrosis cardíaca. Este modelo difiere de otros modelos de inducción aguda de hipertrofia en términos del estímulo hemodinámico <sup>(43)</sup> y la abundancia de tejido fibrótico, esta última característica hacen de este modelo el de elección para nuestro objetivo, el estudiar la relación entre fibrosis cardiaca y la participación del estrés de retículo. Aunque la fibrosis intersticial es evidente en varios modelos de hipertrofia y está asociada a la regulación positiva de los genes de fibronectina y del TGF- $\beta$ 1. En este modelo tanto la pérdida de miocitos, así como también la reacción inflamatoria son factores claves para el desarrollo de fibrosis cardíaca, la cual preserva la integridad estructural del miocardio, aunque también se ha observado acumulación de colágeno en ausencia de pérdida de miocitos, la que corresponde a fibrosis reactiva, que incluye además, un realineamiento de las fibras de colágeno y miocitos donde las fibras de colágeno comienzan a rodear al músculo. Se ha reportado que bajas dosis de ISO (0.3mg / Kg peso / 7 días) no producen cambios en la expresión tanto del factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) como de fibronectina y colágeno tipo I y III. Por otro lado, altas dosis de ISO (3 mg /Kg peso/7 días) producen un incremento en la expresión de los factores nombrados anteriormente, esta respuesta resulta como consecuencia de necrosis y apoptosis de las células cardiacas producto de los microinfartos que ISO produce en el corazón, asociado a un significativo proceso inflamatorio. En este caso la

dosis de 50 mg/Kg Peso, aunque esta fuera de los rangos fisiológicos, nos asegura el desarrollo de focos fibróticos adecuados a fin de este estudio. Cabe destacar que en el desarrollo de este modelo no hubo muerte de ninguna rata.

Está reportado en la literatura que el ISO produce lesiones tipo microinfartos, lo que significa pequeñas (micro) isquemias/reperfusión, generando pequeñas lesiones que afectan de manera importante la viabilidad celular, específicamente localizados en el ápice del tejido cardiaco. Por otro lado, resultados previos del laboratorio han demostrado que ISO (5 mg/Kg peso), induce apoptosis al día 1 del tratamiento con dosis 10 veces menores a las que se utilizaron en el presente estudio <sup>(42)</sup>. Este resultado es coincidente con modelos experimentales de isquemia/reperfusión en los cuales también se ha observado apoptosis en forma temprana <sup>(29)</sup>.

## **5.2 Estrés de retículo en corazón**

Hasta la fecha no hay estudios que relacionen directamente la fibrosis cardiaca con el estrés de retículo. Nuestro modelo cursa con pequeños focos de isquemia/reperfusión que producen un temprano proceso inflamatorio localizado principalmente en el endocardio y caracterizado por presentar tejido de granulación el que tiende a desaparecer al cabo de los 10 días y es reemplazado por tejido fibrótico. Por otro lado, se ha demostrado que en modelos de ischemia/reperfusión se induce estrés de RE. Está descrito en la literatura el rol que desempeña este proceso en el corazón y los mecanismos que pueden llegar a activar la UPR, como por ejemplo la isquemia <sup>(19)</sup>. Sin embargo, no hay antecedentes en la literatura, si en la fibrosis cardiaca que se desarrolla como consecuencia del daño producido por isquemia, existe participación de este. Varios estudios han correlacionado el estrés RE con daños al miocardio. Por ejemplo, el estrés de RE se activa en respuesta al daño inflamatorio crónico en corazones de ratones transgénicos que sobre expresan la proteína MCP-1 y que desarrollan insuficiencia cardiaca <sup>(27)</sup>, la sobreexpresión del gen p53-upregulated modulador de la apoptosis (PUMA), en los cuales se activa la apoptosis cardiaca. En contraste con los estudios anteriormente citados, otros estudios sugieren que el estrés de RE puede proteger el corazón, e incluso fomentar el crecimiento hipertrófico del miocardio <sup>(44, 45)</sup>.

Nuestros resultados obtenidos por Western blot muestran que paralelo al desarrollo de fibrosis cardiaca hubo una mayor expresión de proteínas marcadoras del estrés de RE. El marcador mas temprano de esta respuesta fue CHOP, el cual aumentó

de manera significativa a las 9 horas, y posteriormente regresó a un estado basal. Nuestro resultado coincide con Samali A et al., quienes describieron que el estrés de RE por isquemia indujo el aumento en la expresión de CHOP en cardiomiocitos, gatillando su muerte por apoptosis <sup>(33)</sup>. En nuestro trabajo nosotros no podemos atribuir en que tipo celular se observa este aumento en la expresión de CHOP, sin embargo, debido a que los cardiomiocitos corresponden en masa al 66% del peso cardíaco, este tipo celular debería ser el más afectado. Colectivamente estos resultados podrían indicar que el daño tipo infarto que induce isoproterenol podría estar desencadenando la UPR en forma temprana. En la literatura existen antecedentes que indican que la isquemia / reperfusión inducen en forma temprana el estrés de retículo endoplásmico, desencadenando la UPR <sup>(27)</sup>.

Por otro lado, nuestros resultados por western blot también muestran que ISO indujo la expresión de otros marcadores de estrés de RE, los que aparecieron de manera más tardía y que corresponden a las chaperonas del retículo endoplásmico BiP y PDI. Ambas alcanzan el mayor nivel de expresión a los 10 días de tratamiento. Por inmunohistoquímica, nuestros resultados indican una expresión de proteínas en función del tiempo y del tipo celular. BiP aumenta en forma tiempo dependiente y se localiza principalmente en zonas de daño tisular, las que corresponden a zonas de fibrosis cardíaca. En este sentido, podemos decir que la localización de BiP en zonas fibróticas podría explicarse por la participación que tiene esta proteína en la síntesis de colágeno, como una chaperona importante para su síntesis. De nuestros resultados no podemos concluir si BiP aumenta como consecuencia del estrés de RE o como consecuencia de la síntesis de colágeno.

Por otro lado, PDI aumenta desde el día 2, localizándose inicialmente en el tejido de granulación, mientras que al día 5 esta se localiza en cardiomiocitos vecinos a la zona de daño tisular. Estos resultados sugieren que la expresión de PDI en forma temprana podría estar ligada al estrés de RE, puesto que a esa temporalidad no se ha desarrollado aún la fibrosis cardíaca. En este sentido, existe evidencia que PDI se expresa en zonas vecinas a regiones infartadas de corazones humanos <sup>(34)</sup> y no así en áreas no isquémicas. Además, mediante una co-localización para células TUNEL positivas y PDI, se ha observado que en cardiomiocitos de ratas que sobreexpresan intensamente PDI tienen un porcentaje significativamente menor en la tasa de células apoptóticas respecto a cardiomiocitos que tenían una moderada expresión de PDI <sup>(34)</sup>, sugiriendo que esta

sobreexpresión de PDI actuaría como un factor protector frente a la muerte por apoptosis. De esta forma, nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión temprana de PDI en cardiomiocitos vecinos a la zona de daño tisular podría estar ligada a protección de esas células. En este sentido el efecto citoprotector de PDI se cree que se debe a la interacción con la proteína SOD, y, debido a que uno de los eventos que ocurre durante procesos de isquemia y reperfusión es la generación de anión superóxido<sup>(35)</sup>, el cual es dismutado eficientemente por la enzima superóxido dismutasa (SOD) previniendo injurias post isquémicas en el corazón y atenuando la inflamación y apoptosis <sup>(36)</sup>. También se ha demostrado que PDI es sobreexpresado en esclerosis lateral amiotrófica, actuando como factor de supervivencia a través de su interacción física con SOD. Esta interacción previene la formación de agregados insolubles de SOD y de esta manera la neurodegeneración <sup>(32)</sup>. Además, en estudios en cardiomiocitos de corazones humanos infartados que sobreexpresan PDI se observa un aumento en la actividad de la SOD y un efecto protector en el tejido miocárdico frente a la apoptosis <sup>(34)</sup>.

Finalmente, la expresión más tardía podría estar ligada al igual que BIP a la síntesis de colágeno, debido a que PDI es una chaperona importante en la síntesis de esa proteína de la MEC. Nuestros resultados muestran que PDI se expresa de manera intensa en zonas de fibrosis cardíaca, sugiriendo que en zonas de daño producido por ISO se requiere de una elevada síntesis de colágeno, y que para ello se requiere una alta presencia de chaperonas del RE a fin de plegar correctamente la gran cantidad de colágeno requerido para la cicatrización. Estos resultados en su conjunto, indicarían que la activación de la UPR modula la expresión de las chaperonas BIP y PDI. De forma temprana en cardiomiocitos indicando un efecto citoprotector, mientras que en forma tardía en células encargadas de la cicatrización (siendo los fibroblastos y miofibroblastos cardíacos).

### **5.3 La chaperona química 4-PBA previene el desarrollo de fibrosis cardíaca**

Una vez determinado el importante rol que juega el estrés de retículo endoplásmico durante la evolución de la fibrosis cardíaca, quisimos modular esta respuesta con una conocida chaperona química denominada ácido 4-fenilbutírico (4-PBA) que ha demostrado ser un modulador de la UPR.

El efecto que tiene 4-PBA (80mg/kg/día) sobre el estrés de RE, fue evaluado sobre la expresión de las proteínas CHOP, BIP y PDI. La dosis de 4-PBA está dentro de los



límites de uso de esta chaperona, y previamente se ha demostrado que el rango de dosis in vivo varía entre los 20 y 120 mg/kg peso día. En este rango de concentración los resultados óptimos se obtuvieron con la dosis que se utilizó en esta memoria <sup>(29, 38)</sup>. Nuestros resultados muestran que el pretratamiento con 4-PBA induce una significativa disminución de CHOP respecto al tratamiento con ISO. Este resultado es coincidente con lo descrito en la literatura, donde se ha demostrado que 4-PBA tiene la capacidad de prevenir la activación de la UPR y la expresión de CHOP, aumentando la resistencia de la célula a los efectos apoptóticos del estrés de RE <sup>(29)</sup>.

Por western blot observamos que 4-PBA es capaz de disminuir significativamente la expresión de PDI, observada a los 10 días de tratamiento con ISO. Sin embargo, por inmunohistoquímica nuestros resultados muestran que esta disminución en la expresión de PDI se observó tanto en cardiomiocitos vecinos a las regiones dañadas, así como también en las células presentes en las zonas fibróticas. Lo anterior podría indicar que el menor estrés de RE producido por ISO en presencia de 4-PBA gatillaría la menor expresión de PDI en respuesta a la menor condición de estrés en los cardiomiocitos, y con ello, que no se activan los mecanismos de defensa o de sobrevivencia. En este sentido, Nomura Y et al, (2007) describieron en un modelo de isquemia cerebral que 4-PBA a una dosis de 120mg/kg disminuye el tamaño del área infartada <sup>(29)</sup>. En este mismo estudio se determinó mediante TUNEL que en las ratas tratadas con 4-PBA disminuye significativamente el número de células apoptóticas en la región dañada. De la misma manera, hubo una disminución de todos los marcadores de estrés de retículo endoplásmico sugiriendo que esta protección es gracias a la capacidad de 4-PBA de actuar como una chaperona química y modular la UPR. Por otro lado, nuestros resultados muestran que en las zonas dañadas la reducción en la expresión de PDI, previamente inducida por ISO, estaría ligada a una reducción en la secreción de colágeno, ello debido a que el menor daño producido por ISO en presencia de 4-PBA requiere de menos áreas a ser reparadas o cicatrizadas. Este resultado es consistente con los datos de la presente memoria en los que demostramos que el pretratamiento con 4-PBA reduce la fibrosis inducida por ISO. Nuestros resultados muestran que existe un significativo aumento en la cantidad de colágeno luego de 10 días de tratamiento con ISO y cuando las ratas fueron pre-tratadas 4-PBA y posteriormente con ISO, observamos una disminución en la cantidad de colágeno respecto del tratamiento solo con ISO. En este sentido, este dato podría tener varias probables explicaciones. Una de ellas indicaría que 4-PBA es capaz

de disminuir la producción de colágeno en fibroblastos. De hecho, Goldstein RH et al, demostraron en fibroblastos de pulmón que 4-PBA reduce la secreción de colágeno por una vía independiente del estrés de retículo endoplásmico <sup>(37)</sup>. Otra probable explicación recae en la capacidad de 4-PBA para reducir la expresión de las chaperonas necesarias para la síntesis de colágeno (BiP y PDI), con la consecuente reducción en la secreción de colágeno. Finalmente, debido a que la fibrosis de tejido se produce principalmente para reemplazar células necróticas y/o apoptóticas, y 4-PBA, como hemos descrito anteriormente, tiene la capacidad de ser un factor protector frente a la muerte por apoptosis, es que nosotros pensamos que este descenso en el colágeno podría también deberse a una menor área dañada para reparar. Sin embargo, en esta memoria no se estudió si el 4- PBA es capaz de disminuir el porcentaje células apoptóticas. Estas interrogantes deberán ser desarrolladas en un futuro en el laboratorio.

Para establecer más directamente la relación del estrés de RE con el desarrollo de la fibrosis cardiaca nosotros utilizamos tunicamicina, un conocido estresor del RE, y determinamos si era capaz de producir lesiones del tipo fibróticas en el tejido cardiaco. Los resultados nos mostraron que el tratamiento con dosis única de tunicamicina induce estrés de retículo, caracterizado por un aumento en la expresión de BIP y PDI a los 10 días. PDI se expresó principalmente en cardiomiocitos, y en células de zonas dañadas. Por otro lado, BIP se expresó en menor medida en cardiomiocitos y en células vecinas a daño tisular. Ambos resultados en menor medida evidencian claramente la activación de la UPR. Al igual que en el modelo de ISO, estas regiones de sobreexpresión de chaperonas coincide con zonas vecinas a regiones dañadas, confirmando que la activación de la UPR tiene un importante rol en el remodelamiento del miocardio. Sin embargo, faltó realizar ensayos en presencia de 4-PBA, lo que habría resaltado más aún la importancia del estrés de RE y de la UPR en el desarrollo de fibrosis cardiaca. Estos ensayos se realizarán próximamente en el laboratorio.

## 6. CONCLUSIONES

- Isoproterenol 50mg/kg induce una temprana respuesta inflamatoria caracterizada por tejido de granulación y un marcado desarrollo de fibrosis cardiaca observándose su mayor nivel a los 10 días.
- Isoproterenol 50mg/kg Induce la sobre expresión de CHOP a 9 horas de la administración y posterior descenso a un nivel basal y la chaperona química 4-PBA es capaz de disminuir significativamente esta sobreexpresión.
- Isoproterenol 50mg/kg induce la sobre expresión de la chaperona del retículo endoplásmico BIP en paralelo al desarrollo de fibrosis cardiaca en zonas vecinas al daño y en la zona de reparación teniendo su máxima expresión a los 10 días y 4-PBA 80mg/kg/día no es capaz de disminuir significativamente esta sobre expresión.
- Isoproterenol 50mg/kg induce la sobre expresión de la chaperona del RE PDI en forma paralela al desarrollo de fibrosis cardiaca en zonas vecinas a regiones dañadas y en la zona de reparación teniendo su máxima expresión a los 10 días y 4-PBA 80mg/kg/día es capaz de disminuir significativamente esta sobre expresión.
- Conclusión general: en el desarrollo de fibrosis cardiaca hay una clara participación del estrés de retículo endoplásmico y de la UPR.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Organización mundial de la Salud (OMS).  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>
- 2.- Encuesta nacional de salud (2003), ministerio de salud, chile 2004.
3. - Heart book, Yale University, Pag: 3-10; 133-148.
4. - Skalická H Jr, Horák J, Aschermann M, Linhart A, Palecek T, Kobyłka P. Myocardial infarction, left ventricle remodeling and cellular therapy. Vnitr Lek. 2009; 55: 37-44.
5. -. Avkiran M, Protection of the ischemic myocardium by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitors: potential mechanisms of action. Basic Res. Cardiol. 2001; 96: 306–311.
6. - Cascio W.E, Johnson T.A, Gettes L.S, Electrophysiologic changes in ischemic ventricular myocardium: I. influence of ionic, metabolic, and energetic changes, J. Cardiovasc. Electrophysiol. 1995; 56: 1039–1062.
7. - Opie L.H., Myocardial metabolism and heart disease. Circ. J. 1978; 42: 1223–1247.
8. - Iwai T, Tanonaka K, Inoue R, Kasahara S, Kamo N, Takeo S, Mitochondrial damage during ischemia determines post-ischemic contractile dysfunction in perfused rat heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 2002; 34: 725–738.
9. - Hilfiker-Kleiner D, Landmesser U, Drexler H. Molecular mechanisms in heart failure, J. Am. Col. Card. 2006;48:Supply 6.
10. - Mahesh P, Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. J. Mol. Cel. Cardiol. 2007; 43: 388–403.
11. - G Elizabeth Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. J. Cel Sci. 2005; 118: 1341-1353.

12. - Bernales S, Papa FR, Walter P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.* 2006; 22:487-508.
13. - DuRose JB, Tam AB, Niwa M. Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress. *Mol. Bio. Cel.* 2006; 17: 3095–3107.
14. - Lecca MR, Wagner U, Patrignani A, Berger EG, Hennet T. Genome-wide analysis of the unfolded protein response in fibroblasts from congenital disorders of glycosylation type-I patients. *The FASEB Journal.* 2005; 19: 240-2.
15. - Sriburi R, Jackowski S, Mori K, Brewer JW. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 2004; 167: 35-41.
16. - Allen JR, Nguyen LX, Sargent KE, Lipson KL, Hackett A, Urano F. High ER stress in b-cells stimulates intracelular degradation of misfolded insulin. *Biochem. Biophys. Res Comm.* 2004; 324: 166–170.
17. - Ron D., Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 2007, 8: 519-529
18. - Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clinic. Investig.* 2005; 115: 2658-2664.
19. - Glembotski CC. Endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ. Res.* 2007; 101: 975-984
20. - Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, Shokat KM, Lavail MM, Walter P. IRE1 Signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Sci.* 2007; 318: 944-948.

21. - Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 2005; 74: 739-789.
22. - Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee AH, Bassik MC, Antonsson B, Brandt GS, Iwakoshi NN, Schinzel A, Glimcher LH, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1a. *Sci.* 2006; 312: 572-576.
23. - Anken E. Endoplasmic reticulum stress and the making of professional secretory cell. *Crit. Rev. Biochem. Mol Biol.* 2005; 40: 269-283.
24. - Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases; *FEBS Lett.* 2007; 581: 3641–3651.
25. - Lamandé SR, Chessler SD, Golub SB, Byers PH, Chan D, Cole WG, Sillence DO, Bateman JF. Endoplasmic reticulum-mediated quality control of type I collagen production by cells from osteogenesis imperfecta patients with mutations in the pro alpha 1 (I) chain carboxyl-terminal propeptide which impair subunit assembly; *J Biol Chem.* 1995 14; 270: 8642-9.
- 26.- Koivunen P, Kirsi E. H. Salo, Myllyharju J, and Ruddock W.; Three binding sites in protein-disulfide isomerase cooperate in collagen prolyl 4-hydroxylase tetramer assembly. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 5227–5235.
27. - Asim A, Jianli N, Rogers L, Adamski F, and Kolattukudy P. Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291:1411-1420.
28. - Thuerauf D, Marcinko M, Gude N, Rubio M, Mark A, Glembotski C.; Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes. *Circ. Res.* 2006; 99: 275-282.

29. - Xin Q, Hosoi T, Okuma Y, Kaneko M, and Nomura Y; Sodium 4-phenylbutyrate protects against cerebral ischemic injury; *Mol Pharmacol.* 2004; 66: 899–908.
30. – Sun Y. Animal models of cardiac fibrosis. *Methods Mol Med.* 2005; 117: 273-90.
31. - Zhang K, Kaufman R. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response; *Nat.* 2008; 454: 455-462.
- 32.- Atkin JD, Farg MA, Turner BJ; Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *J Biol Chem* 2006; 281: 152–65.
- 33.- Szegezdi E, Duffy A, O'Mahoney M, Logue S, Mylotte L, O'Brien T, Samali A. ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis; *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 349: 1406–1411.
- 34.- Severino A., Campioni M., Straino S, Salloum F, Schmidt N, Herbrand U, Frede S, Toietta G., Di Rocco G., Bussani R., Silvestri F, Piro M., Liuzzo G., Biasucci L., Mellone P., Feroce F., Capogrossi M, Baldi F., Fandrey J, Ehrmann M., Crea F., AbbateA., Baldi A.; Identification of protein disulfide isomerase as a cardiomyocyte survival factor in ischemic cardiomyopathy; *J. Am. Col. Cardiol.* 2007; 50: 1029-1037.
- 35.- Becker LB, Vanden Hoek TL, Shao ZH, Li CQ, Schumaker PT. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *Am J Physiol.* 1999; 277: 2240–6.
- 36.- Wang P, Chen H, Qin H, et al. Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents postischemic injury. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95: 4556–60.
- 37.- Rishikof D, Ricupero D, Liu H, and Goldstein R; Phenylbutyrate decreases Type I collagen reduction in human lung fibroblasts. *J. Cel. Biochem..* 2004; 91:740–748.

- 38.- Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Smyth C, Jenkins S, J. Thompson A, Eckhoff D, and Contreras J; Sodium 4-phenylbutyrate protects against liver ischemia reperfusion injury by inhibition of endoplasmic reticulum-stress mediated apoptosis. *Surgery*, 2005; 138: 342-351.
- 39.- Lijnen P , Petrov V. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor – b1. *Mol. Gen. Metab.* 2000; 71: 418 – 435.
- 40.- Singh K, Communal C, Douglas B. Adrenergic regulation of myocardial apoptosis. *C. Res.* 2000; 45: 713 – 719.
- 41.- Ocaranza M, Diaz Araya G, Chiong M. Isopreterenol and angiotensin I- enzyme in lung, left ventricle and plasma during myocardial hypertrophy and fibrosis. *J Card. Pharm.* 2002; 40: 246-254.
- 42.- Galvez A, Fiedler J, Ocaranza M, Jalil J, Lavandero S, Diaz Araya G. Perindopril regulate  $\beta$ -agonist induced cardiac apoptosis, *J. Cardio. Pharm.* 2005; 46: 255-261.
- 43.- Carreño J, Apablaza F, Ocaranza M y Jalil J. Hipertrofia cardiaca: eventos moleculares y celulares; *Rev Esp Cardiol.* 2006; 59: 473-486.
- 44.- Nickson P, Toth A, Erhardt P. PUMA is critical for neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Cardiovasc Res.* 2007; 73: 48–56.
- 45.- Toth A, Jeffers JR, Nickson P, Min JY, Morgan JP, Zambetti GP, et al. Targeted deletion of Puma attenuates cardiomyocyte death and improves cardiac function during ischemia–reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291: 52–60.