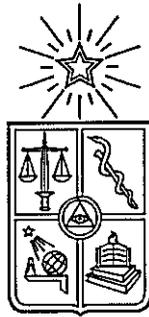


UCH-FC  
Biotecnología  
R 594  
C 1



UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO

## **Interacción mioblasto – matriz extracelular mediada por integrinas es requerida para la expresión de CTGF/CCN2**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

### **Camilo Sebastián Riquelme Guzmán**

Director del Seminario de Título:  
Dr. Enrique Brandan

Patrocinante:  
Dr. Christian González-Billaault

Agosto 2015 – Santiago – Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el Seminario de Título presentado por el Sr. **Camilo Sebastián Riquelme Guzmán**.

**“Interacción mioblasto – matriz extracelular mediada por integrinas es requerida para la expresión de CTGF/CCN2”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**Dr. Enrique Brandan:**

Firma manuscrita en tinta negra del Dr. Enrique Brandan, sobre una línea horizontal.

**Dr. Christian González-Billault:**

---

**Comisión Revisora y Evaluadora**

**Dr. Marco Tulio Núñez:**

Firma manuscrita en tinta azul del Dr. Marco Tulio Núñez, sobre una línea horizontal.

**Dr. Jorge Martínez:**

Firma manuscrita en tinta azul del Dr. Jorge Martínez, sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, 10 de Agosto de 2015

*“Somos lo que hacemos repetidas veces.*

*La excelencia, por lo tanto, no es un acto sino un hábito”*

*Aristóteles*

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar agradeciendo al Dr. Enrique Brandan por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este Seminario de Título en su laboratorio. Por su guía, apoyo y confianza durante este proceso de formación, los cuales han sido esenciales para llevar a cabo este trabajo.

Muy agradecido de todos y cada uno de los integrantes del laboratorio: Víctor, Daniela, Roger, David, María José, Cecilia, Osvaldo, Catalina, Andrés, Darling, Lina, Tamara y Anita, quienes han aportado a mi crecimiento como científico y persona, siempre estando presentes cuando he necesitado ayuda. Muchas gracias a Don Víctor por toda su labor de “Lab-manager”, la cual es esencial para todos los que integramos este equipo. Mención especial para Cecilia y Osvaldo, los cuales siempre se han dado una pausa en sus labores para escucharme y ayudarme.

Quisiera mencionar a todos mis amigos y compañeros que me han acompañado en este viaje por la Universidad: Toty, Arantza, Carlos, Floro, Salomé, Mancilla, Nía, Luisfe, Tente, Papi, con los cuales he vivido innumerables e inolvidables momentos, forjando amistades que ciertamente perdurarán en el tiempo.

Finalmente, quisiera agradecer a mi Familia por su constante apoyo, críticas, consejos y conversaciones que han sido imprescindibles para forjar la persona que soy, en especial a mi madre que siempre ha buscado lo mejor para mi y mi hermano.

Gracias.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>ii</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS.....</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>I. RESUMEN .....</b>	<b>x</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. El microambiente tisular: la matriz extracelular.....</b>	<b>1</b>
<b>2. La matriz extracelular en la regeneración muscular.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Interacción célula – matriz extracelular: integrinas.....</b>	<b>4</b>
<b>4. Fibrosis muscular .....</b>	<b>6</b>
<b>4.1 Factores pro-fibróticos.....</b>	<b>8</b>
4.1.1 Factor de Crecimiento Transformante Tipo Beta (TGF- $\beta$ ) .....	8
4.1.2 Ácido Lisofosfatídico (LPA) .....	8
4.1.3 Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF).....	10
<b>III. HIPÓTESIS.....</b>	<b>13</b>
<b>IV. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>Objetivo general .....</b>	<b>14</b>
<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>14</b>

<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
<b>1. Materiales.....</b>	<b>15</b>
1.1. Líneas Celulares.....	15
1.2. Material de cultivo celular .....	15
1.3. Anticuerpos y compuestos fluorescentes .....	15
1.4. Partidores para RT-PCR cuantitativo.....	17
<b>2. Reactivos .....</b>	<b>17</b>
2.1. Medios de cultivo celular .....	17
2.2 Reactivos de biología molecular .....	17
2.3 Reactivos para extracción de proteínas, electroforesis SDS-PAGE y western blot.....	18
2.4. Reactivos generales.....	18
2.5. Sistemas comerciales .....	19
2.6. Proteínas recombinantes, péptidos, lípidos e inhibidores .....	19
<b>3. Metodología .....</b>	<b>20</b>
3.1. Cultivo celular.....	20
3.1.1. Mantenimiento de línea celular y siembra de experimentos .....	20
3.1.2. Incubación con LPA, TGF- $\beta$ 1, péptido RGDS e inhibidor PF-228.....	20
3.2. Extracción de RNA y síntesis de cDNA .....	21
3.3. RT-PCR cuantitativo.....	22
3.4. Extracción de proteínas y cuantificación .....	23
3.5. Electroforesis SDS-PAGE y western blot.....	24
3.6. Inmunofluorescencia indirecta y tinción fluorescente .....	25

3.7. Análisis estadístico.....	26
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
1. LPA induce CTGF en cultivos <i>in vitro</i> de mioblastos C2C12 .....	28
2. Inhibición de la interacción célula - MEC reduce la inducción de CTGF por LPA en mioblastos C2C12.....	33
3. Inhibición de la fosforilación de FAK reduce la inducción de CTGF por LPA en mioblastos C2C12.....	40
4. Inhibición de la interacción célula – MEC reduce la inducción de CTGF por TGF- $\beta$ 1 en mioblastos C2C12.....	45
5. Inhibición de la interacción célula – MEC y de la fosforilación de FAK conllevan a cambios en la cantidad de fibras de estrés en respuesta a LPA en mioblastos C2C12.....	50
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>61</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>62</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Anticuerpos y compuestos fluorescentes utilizados por técnica y características (WB: Western Blot, IFI/TF: Inmunofluorescencia Indirecta o tinción fluorescente).....	16
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>ctgf</i> es rápidamente inducido por LPA en mioblastos C2C12.....	29
Figura 2: <i>ctgf</i> es inducido de manera dosis dependiente por LPA en mioblastos C2C12.....	30
Figura 3: CTGF es rápidamente inducido por LPA en mioblastos C2C12.....	32
Figura 4: Inducción de <i>ctgf</i> por LPA es reducida de manera dosis dependiente por péptido RGDS en mioblastos C2C12.....	35
Figura 5: Inducción de CTGF por LPA es reducida en presencia de péptido RGDS en mioblastos C2C12.....	36
Figura 6: Integrina $\beta 1$ y p-FAK Y397 disminuyen en presencia de péptido RGDS en mioblastos C2C12 inducidos con LPA.....	39
Figura 7: PF-228, inhibidor específico de FAK, inhibe fuertemente la fosforilación de FAK en Tirosina 397 (p-FAK Y397) en mioblastos C2C12.....	41
Figura 8: Inducción de <i>ctgf</i> por LPA es reducida por inhibición en la fosforilación de FAK en tirosina 397 en mioblastos C2C12.....	42
Figura 9: Inducción de CTGF por LPA es reducida por inhibición en la fosforilación de FAK en tirosina 397 en mioblastos C2C12.....	44
Figura 10: Inducción de <i>ctgf</i> por TGF- $\beta 1$ es reducida en presencia de péptido RGDS en mioblastos C2C12.....	46
Figura 11: Vía de señalización canónica de TGF- $\beta 1$ es activada en presencia de péptido RGDS.....	48

Figura 12: Cantidad de fibras de estrés de actina varía en presencia del péptido RGDS o inhibidor PF-228.....	52
Figura 13: CTGF es regulado por el mecanismo de adhesión celular mediado por integrinas.....	60

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**CTGF / CCN2:** Factor de crecimiento de tejido conectivo.

**DMD:** Distrofia muscular de Duchenne.

**FAK:** Quinasa de adhesión focal.

**LPA:** Ácido lisofosfatídico.

**MEC:** Matriz extracelular.

**RGDS:** Motivo arginina – glicina – ácido aspártico – serina.

**TGF- $\beta$ 1:** Factor de crecimiento transformante tipo  $\beta$ 1.

## I. RESUMEN

En el músculo esquelético, la activación de los progenitores musculares (mioblastos) en los procesos de regeneración y en varias patologías está relacionada con la organización de la MEC, siendo un requerimiento para que el proceso de miogénesis ocurra de manera adecuada. Una gran cantidad de receptores permiten que la célula integre la información proveniente del microambiente en señales intracelulares. Dentro de los receptores ubicados en la superficie celular, las integrinas son una familia de proteínas que abarcan una buena proporción de moléculas que ayudan a reconocer y ensamblar la MEC. Éstas conectan las señales extracelulares en intracelulares por medio del citoesqueleto de actina. Dentro de las moléculas que modulan esta integración se encuentra la quinasa de adhesión focal (FAK), la cual es una tirosina quinasa que funciona como andamio en la formación de las fibras de actina y como transductor de las señales provenientes de las integrinas.

Una acumulación excesiva de componentes de MEC, conocida como fibrosis, es un estado patológico común de diversas enfermedades crónicas, como las distrofias musculares, que afectan el funcionamiento del músculo. Dentro de los factores involucrados, se encuentra el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF/CCN2), el cual está sobre-expresado en músculos que presentan esta patología, induciendo daño y pérdida de fuerza muscular. Diversos estudios han mostrado que este factor pro-fibrótico es regulado por la dinámica del citoesqueleto de actina, la cual se encuentra estrechamente ligada con el medio extracelular.

En este Seminario de Título se investigó la participación de la interacción célula – MEC mediada por integrinas en la regulación de la expresión de CTGF. Para lograr este objetivo se inhibió esta interacción por medio del péptido RGDS y por un inhibidor de la fosforilación de FAK. Además, para analizar el factor CTGF, se utilizó el fosfolípido LPA, el cual ha sido descrito como un inductor de la expresión de CTGF. Por medio de análisis de RT-PCR cuantitativo y de western blot, se observó una reducción importante tanto a nivel transcripcional como traduccional de CTGF en presencia de estos tratamientos. Más aún, al utilizar TGF- $\beta$ 1, uno de los factores más involucrados en fibrosis, como inductor de CTGF, la misma reducción en su transcripción fue observada en presencia del péptido RGDS, sin afectar la vía de señalización Smad-dependiente. Dado que la dinámica de actina ha sido relacionada con la expresión de CTGF, se analizó la formación de fibras de actina observándose una disminución en la cantidad de éstas en respuesta a RGDS, pero un aumento en la presencia del inhibidor de FAK.

Estos resultados nos sugieren la importancia de una adecuada interacción célula – MEC para la regulación de la expresión de CTGF. Interesantemente, la formación de fibras de actina varía en ambos casos de inhibición, aún cuando el efecto en la expresión del factor pro-fibrótico es el mismo. Estos resultados nos sugieren otro participante en la regulación de CTGF. Además, en un contexto fibrótico, dado que la MEC aumenta en cantidad y varía en calidad respecto a la de un músculo sano, estudios de cómo ésta afecta la expresión de CTGF requieren ser llevados a cabo.

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. El microambiente tisular: la matriz extracelular

El microambiente tisular está definido principalmente por la matriz extracelular (MEC), que es un componente esencial que influye directamente en el comportamiento celular (Watt y Huck, 2013). La MEC provee de un sostén estructural para que las células se unan y el órgano se desarrolle (Byron y col., 2013). Además, su composición y organización es única para cada tipo de tejido, siendo formada por un proceso dinámico entre diversos componentes celulares (Frantz y col., 2010).

En el contexto del músculo esquelético, la MEC es una estructura con una alta complejidad geométrica, que afecta el funcionamiento celular, el reservorio de progenitores musculares (Bentzinger y col., 2013) y la transmisión de la fuerza (Purslow y Trotter, 1994).

La MEC muscular está formada por diversas moléculas y proteínas. El mayor componente es colágeno, el cual comprende cerca del 10% del peso seco total (Gillies y Lieber, 2011). Diversos tipos de colágeno son expresados en el músculo esquelético, pero los tipos fibrilares I y III predominan (Light y Champion, 1984). No obstante, la lámina basal muscular está formada principalmente por colágeno tipo IV (Sanes, 1982).

Los proteoglicanos (PGs) se encuentran ampliamente en el tejido conectivo. En la lámina basal se puede encontrar PGs de heparán sulfato (PGHSs), los cuales unen factores de crecimiento (ver revisión (Brandan y Gutierrez, 2013)) y ayudan a la unión de la lámina basal a glicoproteínas (Eklund y col., 2001). Los PGs más abundantes son

los de condroitín sulfato / dermatán sulfato (PG – CS/DS), como decorina y biglicano, los cuales se unen a colágeno I (Andrade y Brandan, 1991, Svensson y col., 1995).

El último grupo de moléculas que componen la MEC muscular son las glicoproteínas, como laminina y fibronectina. Estas proteínas sirven de puente entre el colágeno IV, que se encuentra en la lámina basal, y el sarcolema (membrana de la fibra muscular). Laminina se une al sarcolema a través de integrinas y  $\beta$ -dístroglicano (von der Mark y col., 1991, Ervasti y Campbell, 1993), y puede unirse directamente a colágeno IV o mediante la acción de fibronectina (Rao y col., 1985). Esta última, también se une al sarcolema a través de integrinas (Wu y col., 1995). Colágeno IV en conjunto con estas glicoproteínas forman la estructura básica de la lámina basal.

## **2. La matriz extracelular en la regeneración muscular**

El músculo esquelético adulto es un tejido dinámico que puede remodelarse, repararse y regenerarse (Ceafalan y col., 2014). Además de la ya descrita MEC, el músculo esquelético adulto está compuesto por diversos grupos celulares. El principal grupo son las fibras musculares, o miotubos, que permiten la contracción muscular. Estas fibras se encuentran rodeados de células mononucleadas denominadas células satélite, que se encuentran bajo la lámina basal, sobre el sarcolema, y constituyen la mayor población de progenitores musculares (Mauro, 1961).

Las células satélites, en el músculo esquelético adulto, se encuentran en un estado quiescente, y son constantemente reclutadas para la mantención o regeneración del

órgano (Schultz y col., 1978, Zammit, 2008). Estos progenitores musculares llevan a cabo una división asimétrica que permite la auto-mantenimiento y la proliferación de células comprometidas que, una vez activadas (denominadas mioblastos), se diferenciarán y fusionarán formando miotubos (Bentzinger y col., 2012).

Se ha demostrado que la MEC cumple un rol esencial en la diferenciación del músculo esquelético adulto. Las interacciones entre las moléculas presentes en la MEC cambian durante la diferenciación del músculo, ya que los patrones de expresión de los componentes involucrados varían. Se ha descrito que las células satélites, durante la regeneración, remodelan su nicho de forma transitoria con la glicoproteína fibronectina, modulando la expansión de este grupo de progenitores musculares (Bentzinger y col., 2013).

En nuestro laboratorio se investigó la participación de la MEC en el proceso de regeneración muscular, y se describió la importancia de ésta para la diferenciación terminal de células musculares (Melo y col., 1996). La presencia de la MEC es esencial para que el proceso de miogénesis ocurra (Hauschka y Konigsberg, 1966), y ésta debe estar organizada (Melo y col., 1996, Osses y Brandan, 2002), es decir, la disposición aleatoria de los componentes no es suficiente para que las células se diferencien. No obstante, en presencia de una MEC desorganizada, donde no se reportó formación de miotubos al inducir la diferenciación, los mioblastos presentaban una localización y expresión normal de factores como MyoD y miogenina, los cuales son reguladores transcripcionales que determinan el compromiso de las células con el linaje muscular y la síntesis de productos músculo – específicos, respectivamente (Osses y Brandan, 2002). Además, al interrumpir la interacción célula – MEC mediada por integrinas,

también se inhibió la diferenciación muscular, por lo que se sugirió que el requerimiento de una MEC organizada se debe a la necesidad de que los mioblastos posean sitios de unión a la MEC a través de integrinas, para que el proceso de regeneración ocurra de manera correcta (Osses y Brandan, 2002).

### **3. Interacción célula – matriz extracelular: integrinas**

Con muy pocas excepciones, las células en los organismos multicelulares se encuentran rodeadas de MEC, y ésta es reconocida por diversos receptores que se ubican en la superficie de la membrana celular, integrando la información proveniente del microambiente extracelular en señales intracelulares. La mayor proporción de receptores de la superficie celular que reconocen y ensamblan la MEC pertenecen a la familia de las integrinas (Wickstrom y col., 2011).

Las integrinas son proteínas heterodiméricas comprendidas por una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ . Se conocen 18 subunidades  $\alpha$  y 8  $\beta$ , las cuales se pueden ensamblar en 24 receptores descritos, que tienen distribuciones tejido – específicas y propiedades de unión diferentes (Campbell y Humphries, 2011). Las interacciones integrina – ligando pueden ser divididas en cuatro grandes clases (Humphries y col., 2006), siendo una de las más caracterizadas las integrinas que se unen al motivo RGD, un tripéptido de arginina – glicina – ácido aspártico. Este grupo está conformado por las cinco integrinas  $\alpha$ V y las integrinas  $\alpha$ 5 $\beta$ 1,  $\alpha$ 8 $\beta$ 1 y  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, y corresponden a uno de las clases más

promiscuas de esta familia de receptores, uniéndose a diversos componentes de la MEC, como fibronectina, fibrinógeno, vitronectina, entre otros (Humphries y col., 2006).

Para que la interacción de las integrinas con sus ligandos tenga un efecto en la función celular, el evento de unión debe poder regular la transducción de señales. La señalización vía integrinas se conecta, en la mayoría de los casos, con el citoesqueleto de actina (Mitra y col., 2005, Wickstrom y col., 2011) en zonas llamadas contactos focales. Éstos son sitios de adhesión celular donde existe una alta densidad de integrinas, produciéndose una conexión del medio extracelular con el intracelular. El principal modulador de esta unión y vía de señalización es la quinasa de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés) (Tomakidi y col., 2014).

FAK es una tirosina quinasa que actúa como un modulador de la señalización proveniente de las integrinas y como un proteína andamio en la formación de las fibras de estrés de actina en respuesta a estímulos provenientes del medio extracelular. La asociación de FAK con las integrinas ocurre de manera indirecta por medio de dos proteínas, talina y paxilina (Mitra y col., 2005). Posterior a esta asociación, ocurre el reclutamiento de una serie de factores que contribuyen a la formación de las fibras de actina, permitiendo los cambios mecánicos necesarios para que la célula responda a los estímulos exteriores. Sin embargo, la respuesta a los estímulos provenientes de la MEC no solo puede involucrar el movimiento celular, si no también la proliferación, apoptosis o diferenciación (Tomakidi y col., 2014).

La activación de FAK ocurre mediante la fosforilación de múltiples residuos de tirosina, siendo el más importante y estudiado, la auto-fosforilación del residuo de

tirosina 397 (Tyr397 o Y397) (Mitra y col., 2005), el cual esta directamente relacionado con la formación de los contactos focales (Tomakidi y col., 2014).

En el contexto del músculo esquelético, los estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron que la diferenciación de mioblastos se inhibió cuando la interacción célula – MEC mediada por integrinas fue interrumpida. Esto se llevó a cabo utilizando el péptido RGDS, el cual es análogo al motivo RGD (Osses y Brandan, 2002). Dentro del mismo estudio, se observó que al producir una desorganización de la MEC, la fosforilación de FAK en Y397 disminuyó, sugiriendo que la ausencia de una MEC estructurada produce una inhibición en la señalización de integrinas a través de FAK, impidiendo la diferenciación de los progenitores musculares (Osses y Brandan, 2002). Además, se ha demostrado que la diferenciación de mioblastos en miotubos es dependiente de una temprana reducción transitoria y un sostenido aumento tardío en la fosforilación de FAK en Y397 (Clemente y col., 2005), y que la activación de FAK regula la expresión de genes, como  $\beta$ 1D integrina y caveolina 3, involucrados en la fusión de los mioblastos (Quach y col., 2009), proceso esencial en la formación de miotubos.

#### **4. Fibrosis muscular**

La fibrosis corresponde a un estado patológico común de diversas enfermedades crónicas. Ésta es definida como una acumulación excesiva de componentes de la MEC, como colágeno y fibronectina, dentro y alrededor del tejido inflamado y/o dañado,

conllevando a una cicatrización permanente, fallas en órganos e incluso la muerte (Wynn y Ramalingam, 2012). La acumulación de MEC puede ser una consecuencia de dos procesos: un aumento en la expresión y deposición de proteínas de tejido conectivo y/o una disminución en la degradación de proteínas pertenecientes a esta matriz (Wynn, 2008, Cabello-Verrugio y col., 2011).

En el músculo esquelético, la fibrosis está comúnmente asociada a una serie de enfermedades crónicas que a largo plazo conllevan a fallas en el funcionamiento del órgano (Lieber y Ward, 2013). Dentro de estas enfermedades se encuentran las distrofias, las cuales son una serie de patologías genéticas que están ligadas con una gran pérdida de la función muscular, afectando el movimiento, postura y conllevando a fallas cardíacas y respiratorias, siendo generalmente letales para el paciente (McNally y Pytel, 2007).

Un ejemplo de estas patologías es la distrofia muscular de Duchenne (DMD), que corresponde al trastorno ligado al cromosoma X más común (McNally y Pytel, 2007). Es producida por una mutación en el gen de la distrofina, una proteína que se localiza en la cara citoplasmática del sarcolema, y que es parte del complejo distrofina – glicoproteína, el cual estabiliza las fibras musculares frente a los movimientos típicos de este órgano. En su ausencia, las fibras sufren constante daño producido por las contracciones musculares, conllevando a ciclos de necrosis y reparación hasta que la masa muscular es reemplazada por tejido fibrótico, es decir, una acumulación excesiva de MEC (Kharraz y col., 2014).

Por otro lado, un amplio número de enfermedades han sido englobadas en las denominadas distrofias musculares congénitas. Los genes mutados en estas distrofias

son enzimas encargadas de la glicosilación de  $\alpha$ -dístroglicano o proteínas que participan directamente en la interacción célula – MEC, como laminina  $\alpha 2$  y la integrina  $\alpha 7\beta 1$ . Estas mutaciones producen una alteración en la unión de la célula con su entorno, conllevando al desarrollo de un fenotipo fibrótico y fallas propias de este tipo de patologías (Davies y Nowak, 2006, McNally y Pytel, 2007).

#### **4.1 Factores pro-fibróticos**

##### **4.1.1 Factor de Crecimiento Transformante Tipo Beta (TGF- $\beta$ )**

TGF- $\beta$  es uno de los factores pro-fibróticos más potentes. Éste está altamente expresado durante la regeneración del músculo luego de ser dañado y también en aquellos que presentan fibrosis (Kharraz y col., 2014). Este factor estimula la deposición de componentes de la MEC y disminuye la degradación de ésta (Leask y Abraham, 2004, Kharraz y col., 2014). Los efectos pro-fibróticos de TGF- $\beta$  son mediados principalmente por la vía de señalización canónica dependiente de la familia de proteínas Smad (Leask y Abraham, 2004). Sin embargo, existen diversos mecanismos alternativos por los cuales se ha descrito un efecto pro-fibrótico de TGF- $\beta$  (Kharraz y col., 2014).

##### **4.1.2 Ácido Lisofosfatídico (LPA)**

LPA es un lípido bioactivo presente en el suero, el cual actúa sobre diversos procesos inter- como intra-celulares, como la proliferación, migración, formación de

fibras de estrés, entre otros (Moolenaar y col., 2004, Okudaira y col., 2010). La señalización de LPA puede ocurrir a través de seis diversos receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés), los cuales son específicos para este fosfolípido (LPA<sub>1-6</sub>) (Okudaira y col., 2010).

Se ha descrito que LPA tiene un efecto pro-fibrótico en diversos tejidos. Específicamente, se ha establecido que los niveles de LPA aumentan durante la fibrosis pulmonar idiopática, reclutando a fibroblastos por medio de su receptor LPA<sub>1</sub> (Tager y col., 2008) y, a través de este mismo receptor, se demostró un efecto pro-fibrótico de LPA en fibrosis renal (Pradere y col., 2007). Por otro lado, se ha descrito que LPA, por medio de su receptor LPA<sub>2</sub>, transactiva TGF- $\beta$ , el cual promueve la expresión de factores pro-fibróticos (Geng y col., 2012).

En el contexto del músculo esquelético, existe evidencia de que los progenitores musculares expresan por lo menos tres receptores de LPA (LPA<sub>1,2,4</sub>) (Jean-Baptiste y col., 2005). En nuestro laboratorio, se ha mostrado que los mioblastos responden a LPA induciendo la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF / CCN2), un importante factor pro-fibrótico (Vial y col., 2008, Cabello-Verrugio y col., 2011), y que esta inducción puede ocurrir mediante dos mecanismos: uno dependiente de la vía de señalización de TGF- $\beta$  y otro que requeriría de la activación de la vía de señalización JNK (Cabello-Verrugio y col., 2011).

#### 4.1.3 Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF)

El factor de crecimiento de tejido conectivo es una proteína matricelular de 38 kDa, modular y rica en cisteína, que ha sido descrita como un potente factor pro-fibrótico (Leask y Abraham, 2006, Morales y col., 2011). Si bien no se conoce un receptor para CTGF, esta proteína modula diversos procesos celulares como la adhesión, migración, proliferación, desarrollo óseo, entre otros (Leask y Abraham, 2006).

Las proteínas de la familia CCN no tienen, necesariamente, una función específica, si no que sus efectos fisiológicos dependerían de la molécula con la que interactúan (Leask y Abraham, 2006). En este contexto, se ha demostrado que CTGF sinergiza con TGF- $\beta$  para inducir fibrosis (Mori y col., 1999, Holmes y col., 2001, Wang y col., 2011), y que, en conjunto con el factor de crecimiento epidérmico o insulina, induce la diferenciación de miofibroblastos y la deposición de colágeno (Leask y Abraham, 2006). En contraposición, la unión con el PG decorina actuaría como un regulador negativo de la actividad de CTGF (Vial y col., 2011).

CTGF puede ser inducido por TGF- $\beta$  (Igarashi y col., 1993, Holmes y col., 2001), y en un órgano fibrótico, CTGF está sobre-expresado, reproduciendo y amplificando los efectos pro-fibróticos de TGF- $\beta$  (Leask y Abraham, 2006, Kharraz y col., 2014), funcionando como un cofactor esencial de la actividad de éste. En nuestro laboratorio se ha investigado el rol de CTGF en la fibrosis muscular. Los progenitores musculares y las fibras musculares expresan este factor pro-fibrótico en respuesta a TGF- $\beta$  y LPA (Vial y col., 2008, Cabello-Verrugio y col., 2011), induciendo la expresión de componentes de la MEC, como fibronectina, e inhibiendo la expresión de

marcadores de diferenciación como desmina, MyoD y miogenina (Vial y col., 2008). Por otro lado, en un modelo de ratón sano (*wild type*), la sobre-expresión exógena de CTGF en músculo, conlleva a la inducción de daño en el órgano, deposición excesiva de componentes de MEC y una reducción en la fuerza muscular, siendo semejante a lo observado y descrito en un músculo fibrótico (Morales y col., 2011). Finalmente, en un modelo de DMD en ratón (*mdx*), en donde CTGF está aumentado, la reducción de la expresión de CTGF frena la progresión del fenotipo distrófico, aumentando la fuerza muscular y disminuyendo el daño en el tejido y la deposición de elementos de MEC (Morales y col., 2013).

Llamativamente la expresión de CTGF es sensible a los cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina. Se ha observado que un aumento en la polimerización de este microfilamento, que conlleva a un aumento en la concentración de actina F y una disminución en la de actina G, activa factores de transcripción que inducen la expresión de CTGF (Ott y col., 2003, Muehlich y col., 2007). Por otro lado, al inhibir la polimerización de los microtúbulos, la expresión de CTGF aumenta, sin embargo, este efecto se debería a una mayor polimerización de actina, actuando como un efecto compensatorio (Ott y col., 2003). Finalmente, la expresión de CTGF, como se mencionó anteriormente, puede ser inducida por TGF- $\beta$ . Esto se debe a la presencia de elementos en las zonas promotoras y regiones UTR que responden a este factor pro-fibrótico, como sitios de unión de Smad (SBE, Smad binding element), los cuales involucran la participación del factor de transcripción Smad 3 (Holmes y col., 2001, Cordova y col., 2015).

Siendo de vital importancia la MEC y su estrecha relación con el citoesqueleto para el correcto funcionamiento del músculo, en un contexto fibrótico, los cambios en la composición y estructura de la MEC, y en la interacción de ésta con la célula, podrían estar afectando la regulación de factores como CTGF. Nosotros proponemos estudiar el efecto de la interacción célula – MEC sobre la expresión de este factor pro-fibrótico.

### III. HIPÓTESIS

La interacción célula – matriz extracelular mediada por integrinas es necesaria para la expresión de CTGF inducido por el ácido lisofosfatídico (LPA) en mioblastos.



## IV. OBJETIVOS

### Objetivo general

Estudiar si la interacción Célula – Matriz Extracelular mediada por integrinas afecta la expresión de CTGF inducido por LPA en mioblastos.

### Objetivos específicos

1. Evaluar la inducción de CTGF por LPA en cultivos *in vitro* de mioblastos C2C12.
2. Estudiar el efecto del péptido RGDS sobre la inducción de CTGF por LPA en mioblastos C2C12.
3. Estudiar el efecto de la inhibición de la fosforilación FAK sobre la inducción de CTGF por LPA en mioblastos C2C12.
4. Estudiar el efecto del péptido RGDS sobre la inducción de CTGF por TGF- $\beta$ 1 en mioblastos C2C12.
5. Estudiar el efecto del péptido RGDS y de la inhibición de FAK sobre la organización del citoesqueleto de actina en mioblastos C2C12.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materiales

#### 1.1. Líneas Celulares

La siguiente línea celular fue obtenida de ATCC, American Type Culture Collection (VA, USA).

a) **C2C12 (ATCC CRL-1772)**: Subclón derivado de Blau y colaboradores (Blau y col., 1985), utilizando la línea celular establecida por Yaffe y Saxel a partir de músculo esquelético de la extremidad posterior de un ratón C3H silvestre (Yaffe y Saxel, 1977).

#### 1.2. Material de cultivo celular

Los siguientes materiales utilizados en cultivo celular se obtuvieron de Corning (NY, USA): Placas de 100 mm, placas de 150 mm, placa de 6 pocillos y placa de 24 pocillos.

De Biologix (KS, USA): Tubos cónicos de polipropileno de 15 mL y 50 mL, y rastrillos estériles desechables.

#### 1.3. Anticuerpos y compuestos fluorescentes

Los anticuerpos y compuestos fluorescentes ocupados en el desarrollo experimental de esta tesis se presentan con detalle en la Tabla 1.

**Tabla 1: Anticuerpos y compuestos fluorescentes utilizados por técnica y características (WB: Western Blot, IFI/TF: Inmunofluorescencia Indirecta o tinción fluorescente).**

Nombre	Antígeno / se une a	Origen	Técnica y dilución	Proveedor
Anti-CTGF	CTGF (Humano)	Cabra	WB: 1/500	Sta. Cruz (CA, USA)
Anti-Tubulina	Tubulina (Erizo de Mar)	Ratón	WB: 1/5000	Sigma (MO, USA)
Anti-Integrina $\beta$ 1	Integrina $\beta$ 1 (Humano)	Conejo	WB: 1/500	Sta. Cruz (CA, USA)
Anti-FAK	FAK (Humano)	Conejo	WB: 1/1000	Sta. Cruz (CA, USA)
Anti-pFAK Y397	FAK fosforilado Tirosina 397 (Humano)	Conejo	WB: 1/1000	Cell Signaling (MA, USA)
Anti -- pSMAD3	SMAD 3 fosforilado Serina 423/425	Conejo	IFI: 1/50	Cell Signaling (MA, USA)
Alexa Fluor 568 Phalloidin	Actina F	-	TF: 1/40	Life Technologies (CA, USA)
Hoescht 33258	DNA	-	IFI: 1/5000	Sigma (MO, USA)

#### 1.4. Partidores para RT-PCR cuantitativo

Los partidores para RT-PCR cuantitativo utilizados en el desarrollo experimental de esta tesis fueron obtenidos de Integrated DNA Technologies, IDT, (IA, USA). Estos son:

- a) *ctgf*: Forward: 5' – CAGGCTGGAGAAGCAGAGTCGT – 3'  
Reverse: 5' – CTGGTGCAGCCAGAAAGCTCAA – 3'
- b) *18s*: Forward: 5' – TGACGGAAGGGCACCACCAG – 3'  
Reverse: 5' – CACCACCACCCACGGAATCG – 3'

## 2. Reactivos

### 2.1. Medios de cultivo celular

De Gibco (NY, USA): Medio mínimo de cultivo Dulbecco's Modified Eagle (DMEM), solución de tripsina-EDTA 10X, mezcla de antibióticos y antimicóticos (penicilina, estreptomina y anfotericina).

De Hyclone (UT, USA): Suero fetal bovino (SFB).

De Sigma (MO, USA): DMSO grado biología celular.

### 2.2 Reactivos de biología molecular

Los siguientes reactivos de grado biología molecular se obtuvieron de Invitrogen Life Technologies (CA, USA): RNAsa Out, DNAsa I, 10X Buffer de Reacción DNAsa I, 25 mM EDTA, 5X First Strand Buffer, M-MLV Transcriptasa reversa, Random Primers y el reactivo para extracción de RNA TRIzol.

De Applied Biosystems (CA, USA): Power SYBR Green PCR Master Mix (2X).

De Fermentas (MD, USA): dNTPS Mix 10 mM.

### **2.3 Reactivos para extracción de proteínas, electroforesis SDS-PAGE y western blot.**

De Cell Signalling (MA, USA): RIPA Buffer 10X.

De Sigma (MO, USA): Acrilamida, bisacrilamida, persulfato de amonio (PSA), tetrametiletilendiamina (TEMED), fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), Rojo Ponceau S.

De Pierce (IL, USA): Albúmina estándar.

De Millipore (MA, USA): Membrana de PVDF.

De Bio-Rad (CA, USA): Estándar de proteína *Precision Plus Protein Dual Color*.

### **2.4. Reactivos generales**

De Sigma (MO, USA):  $\beta$ -mercaptoetanol, glicerol, azul de bromofenol, Triton X-100, Tween 20 y albumina de suero bovino (libre de ácidos grasos).

De Merck (Darmstadt, Alemania): NaCl y solventes de grado analítico; isopropanol, etanol, metanol y cloroformo.

De US Biological (MA, USA): Tris base, dodecil sulfato de sodio (SDS) y glicina.

De Winkler (Santiago, Chile): Albúmina de suero de bovino (BSA).

De Dako (Glostrup, Dinamarca): Solución de montaje para inmunofluorescencia Fluoromont.

## **2.5. Sistemas comerciales**

De Pierce (IL, USA): Kit de cuantificación de proteínas *Micro BCA Protein Assay*.

De Thermo Fisher Scientific (MA, USA): Sistemas de detección de quimioluminiscencia utilizados para ensayos de western blot: *West Dura* y *West Femto*.

## **2.6. Proteínas recombinantes, péptidos, lípidos e inhibidores**

De Sigma (MO, USA) se obtuvo ácido Oleoil-L- $\alpha$ -Lisofosfatídico sal de sodio (LPA), el péptido RGDS (Arginina - Glicina - Ácido Aspártico - Serina) y el inhibidor de fosforilación de FAK en tirosina 397 (p-FAK Y397) PF-573228 (PF-228).

De R&D Systems (MN, USA) se obtuvo TGF- $\beta$ 1 en su forma recombinante humana.

### **3. Metodología**

#### **3.1. Cultivo celular**

##### **3.1.1. Mantenimiento de línea celular y siembra de experimentos**

La línea celular de mioblastos C2C12 fue mantenida de forma rutinaria en placas de 100 mm o de 150 mm con medio de cultivo DMEM suplementado con 10% SFB y 1% antibiótico-antimicótico en una estufa de cultivo a 37°C en 8% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad (Larrain y col., 1998). Cuando las células alcanzaban una confluencia de 80% se expandían a una nueva placa en una densidad menor.

Para la realización de la mayoría de los experimentos las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una confluencia aprox. 60% (14.000 cel/cm<sup>2</sup>). Estas células eran utilizadas al día siguiente. Para experimentos que duraban dos días, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una confluencia aprox. 40% (6.000 cel/cm<sup>2</sup>). Para los ensayos de inmunofluorescencia indirecta las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos sobre un cubreobjetos a las confluencias correspondientes.

##### **3.1.2. Incubación con LPA, TGF-β1, péptido RGDS e inhibidor PF-228**

Las células sembradas fueron previamente privadas de suero por 3 horas y luego se les agregó LPA 20 µg/mL, éste fue suspendido en buffer albumina de suero bovino (libre de ácidos grasos) (en la Figura 2, las concentraciones utilizadas fueron de 5, 10, 20

y 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPA) o TGF- $\beta$ 1 5  $\text{ng}/\text{mL}$  por los tiempos indicados. Para los estudios con el péptido RGDS se realizó una pre-incubación de 30 minutos y luego una co-incubación con el péptido en conjunto con LPA o TGF- $\beta$ 1 por los tiempos indicados. El péptido RGDS se utilizó en una concentración de 0,05  $\text{mg}/\text{mL}$  (en la Figura 4, las concentraciones utilizadas fueron de 0,025, 0,05, 0,1 y 0,2  $\text{mg}/\text{mL}$  de RGDS). Para los estudios con el inhibidor de la fosforilación de FAK, PF-228, se realizó una pre-incubación de 30 minutos y luego una co-incubación con el inhibidor en conjunto con LPA. El inhibidor PF-228 se utilizó en una concentración de 3  $\mu\text{M}$  (Slack-Davis y col., 2007).

### **3.2. Extracción de RNA y síntesis de cDNA**

La extracción de RNA a partir de cultivo celular se realizó con el reactivo comercial TRIzol siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se agregó 500  $\mu\text{L}$  de reactivo TRIzol y se dejó 10 minutos a 4°C. Se colectó en un tubo y se agregó 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se mezcló por inversión y el homogenizado se centrifugó a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. La fase transparente se recolectó a otro tubo y se agregó un volumen 1:1 de isopropanol y se dejó precipitar el RNA toda la noche. Luego se centrifugó a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y al precipitado se le agregó 250  $\mu\text{L}$  de etanol 70% para después ser centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Este lavado se repitió dos veces. Finalmente se descartó el sobrenadante y se dejó secar por 5 minutos para después resuspender el precipitado en 10 – 20  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. Para determinar la concentración de RNA

obtenida se agregó 2  $\mu\text{L}$  de muestra en una placa de micro-volumen Take3 y se cuantificó en un equipo Synergy H1 utilizando el software Gen5 (Biotek, VT, USA).

Para la síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó el siguiente protocolo: Primero se realizó una digestión con DNasa I, en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  se agregó una concentración final de 1 X Buffer de Reacción DNasa I, 1 U DNasa I, 100 U RNAsa OUT, 2  $\mu\text{g}$  de RNA y se completó con agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó a 37°C por 30 minutos. Se agregó 0,4 mM EDTA y se incubó por 10 minutos a 65°C.

Finalmente para sintetizar el cDNA se llevó a cabo el siguiente protocolo: En un volumen total de 15  $\mu\text{L}$  se agregó una concentración final de 1 X *First Strand Buffer*, 0,5 mM dNTPS, 100 U RNAsa OUT, 100 U M-MLV, 0,6  $\mu\text{g}$  de *Random Primers* y se completó con 7,55  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. A esta mezcla se le agregó el total de volumen utilizado para la previa digestión con DNasa I. Esta nueva mezcla se incubó por 60 minutos a 37°C y luego se denaturó la enzima a 95°C por 5 minutos. El cDNA sintetizado se guardó a 4°C hasta su utilización (Acuna y col., 2014).

### 3.3. RT-PCR cuantitativo

El ensayo de RT-PCR cuantitativo se realizó en triplicado en el sistema de detección *Eco Real-Time PCR System* (Illumina, CA, USA). Para el caso del gen *ctgf* se utilizó 1  $\mu\text{L}$  directo de la muestra obtenida en la síntesis de cDNA, y para el gen *18s* la muestra obtenida de cDNA fue diluida 1:25 y se utilizó 3  $\mu\text{L}$  de esta dilución. Cada pocillo para realizar el ensayo tenía SYBR Green 1 X, Partidor forward y reverse 0,5  $\mu\text{M}$  cada uno y los volúmenes anteriormente mencionados de cDNA dependiendo del

ensayo realizado (*ctgf* o *18s*), todo en un volumen final de 10  $\mu$ L completado con agua libre de nucleasas. El protocolo del programa utilizado consistió en: Incubación de UDG (50°C / 2 minutos), Activación de Polimerasa (95°C / 10 minutos), Ciclos de PCR (45 ciclos): Denaturación (95°C / 15 segundos) e Hibridación-Extensión (60°C / 1 minuto), Curva de Fusión (95°C / 15 segundos – 55°C / 15 segundos – 95°C / 15 segundos). Los valores de Cq fueron comparados por el método de  $\Delta\Delta Cq$  usando el gen *18s* como referencia.

### 3.4. Extracción de proteínas y cuantificación

Para obtener el extracto de proteínas totales de un cultivo celular, estas fueron lavadas 3 veces con la solución buffer PBS 1 X para luego agregar 120  $\mu$ L de buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NP-40 1%, Deoxicolato Na 0,25%, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 2 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 1 mM, Pirofosfato Na 30 mM, PMSF 1 mM). Las células se removieron con un rastrillo y luego fueron sonicadas utilizando un procesador ultrasónico (Cole Parmer, IL, USA). El extracto se clarificó mediante centrifugación a 14.000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue almacenado a -20°C para su posterior utilización.

Para la determinar la concentración de proteínas se utilizó el ensayo del ácido bicinonínico (Smith y col., 1985) utilizando el kit comercial *Micro BCA Protein Assay* (Pierce, IL, USA). La reacción se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos según las instrucciones del proveedor y se midió la DO<sub>562nm</sub> en un equipo Synergy H1 utilizando el software Gen5 (Biotek, VT, USA). Los valores de absorbancia corregidos por los

blancos respectivos se interpolaron en una curva de calibración preparada a partir de una solución de albúmina estándar de concentración conocida (Acuna y col., 2014).

### **3.5. Electroforesis SDS-PAGE y western blot**

Para realizar la electroforesis SDS-PAGE se utilizó 30  $\mu\text{g}$  de proteína total por muestra. Estas fueron mezcladas con 1/5 de su volumen de buffer de carga (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 25% glicerol, 2% SDS, 0,7 M  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,1% azul de bromofenol). Los volúmenes de todas las muestras fueron igualados con agua destilada y luego fueron denaturadas a 95°C por 5 minutos. Se realizó una electroforesis denaturante en un gel 10% de poliacrilamida 0,1% dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en buffer de corrida (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicina, 0,1% p/v SDS) a 95 V por 2 horas. Luego las muestras de proteína fueron transferidas a una membrana de PVDF (Millipore, MA, USA) en buffer de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicina, 20% v/v metanol) a 300 mA por 2 horas. Después de la transferencia la membrana fue lavada con agua destilada y luego bloqueada con metanol, se secó y se guardó hasta su posterior uso.

Para realizar el ensayo de western blot se siguió el siguiente protocolo: Las membranas fueron bloqueadas por 30 minutos en buffer Blotto (50 mM Tris-HCl pH 7,7, 150 mM NaCl, Tween 20 0,1%) - 5% leche a temperatura ambiente. Luego las membranas fueron incubadas con los distintos anticuerpos en Blotto - 5% leche por toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la membrana se lavó 3 veces con la solución de bloqueo por 5 minutos y luego se incubó con el anticuerpo secundario contra la IgG respectiva

del primario en Blotto - 5% leche por 1 hora a temperatura ambiente (Acuna y col., 2014).

La unión del complejo anticuerpo primario/anticuerpo secundario a las muestras proteicas se visualizó mediante un sistema de detección de quimioluminiscencia (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) y se detectó a través del equipo Chemidoc (UVP, CA, USA). Las señales proteicas detectadas en los ensayos western blot fueron cuantificadas mediante el software ImageJ versión 1.46r (NIH, USA). Los niveles de las proteínas analizadas fueron normalizadas respecto a los niveles de los controles de carga de cada muestra.

### **3.6. Inmunofluorescencia indirecta y tinción fluorescente**

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia indirecta, las células cultivadas fueron lavadas tres veces con solución buffer PBS  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$  1 X para luego ser fijadas por 15 minutos con 500  $\mu\text{L}$  de paraformaldehído 4% por pocillo. Se volvió a lavar tres veces con solución buffer PBS  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$  1 X y se permeabilizaron con PBS-Tritón X100 0,1% por 2 minutos. Se lavó dos veces con PBS  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$  1 X y las células fueron bloqueadas por 1 hora con TBS (150 mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7,5) – 2% BSA. A continuación las células se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 1) en solución de bloqueo por 1 hora. Se lavó tres veces con solución de bloqueo. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo IgG de conejo conjugado con un fluoróforo Alexa 488, el cual se diluyó 1:1.000 en solución de bloqueo. Para la tinción nuclear, en conjunto con el anticuerpo secundario, se agregó

Hoechst 33258 en una concentración 1:5.000. Las células fueron incubadas por 30 minutos (Acuna y col., 2014).

Para el caso de la tinción de actina-F se utilizó el compuesto fluorescente *Alexa Fluor 568 Phalloidin* (Tabla 1). Se agregó la faloidina en una dilución 1:40 en solución de bloqueo en conjunto con Hoechst 33258 (1:5.000) y se incubó por 30 minutos. (Cabello-Verrugio y col., 2011).

Posterior a las incubaciones respectivas, las células fueron lavadas tres veces con PBS  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$  1 X y los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos usando Fluoromont (Dako, Dinamarca). Las muestras correspondientes a pSMAD3<sup>+</sup> fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600 (Acuna y col., 2014). Las muestras correspondientes a actina F fueron observadas en un microscopio confocal espectral Eclipse C2 (Unidad de Microscopía Avanzada, Pontificia Universidad Católica de Chile).

Para analizar la cantidad de fibras de actina F se utilizó el software *Image J* versión 1.46r (NIH, USA).

### **3.7. Análisis estadístico**

La significancia estadística de las diferencias entre los promedios de dos grupos experimentales se evaluó usando el análisis t de student.

Para evaluar la significancia estadística de las diferencias entre los promedios de más de dos grupos experimentales se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía) con una prueba posterior de comparaciones múltiples de Dunnett.

Finalmente, para evaluar la significancia estadística de las diferencias entre los promedios de más de dos grupos experimentales en presencia de dos variables nominales se utilizó el análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías) con una prueba posterior de Bonferroni.

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo en el software Prism 5.0a (GraphPad). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0,05$ .

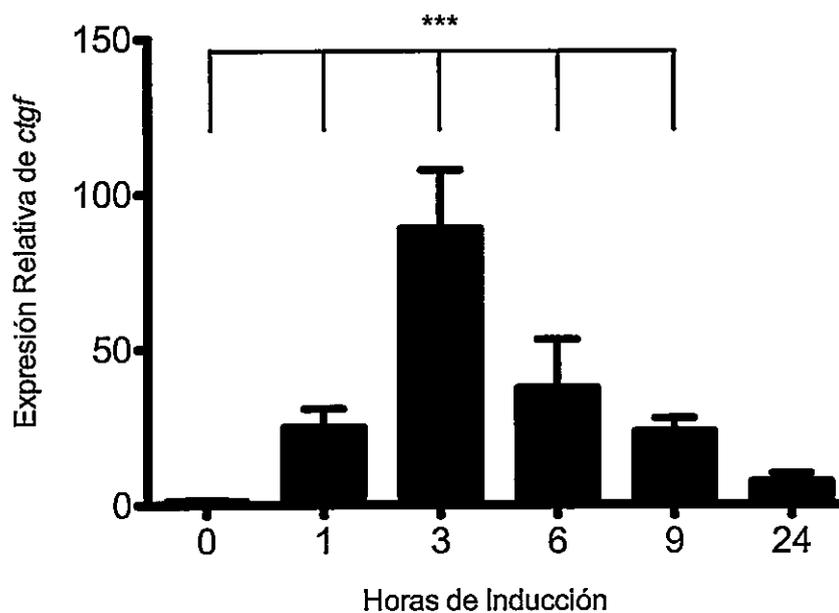
## VI. RESULTADOS

### 1. LPA induce CTGF en cultivos *in vitro* de mioblastos C2C12

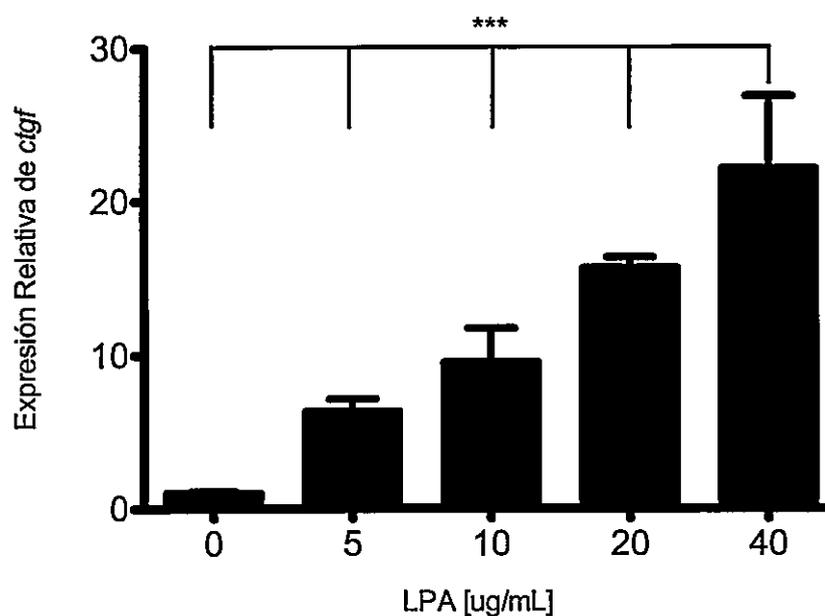
Se ha demostrado que LPA provoca un aumento en CTGF tanto a nivel transcripcional como traduccional en líneas celulares del endotelio humano (Muehlich y col., 2004) y fibroblastos renales humanos (Heusinger-Ribeiro y col., 2001). Además, se ha descrito que LPA puede inducir la transcripción del mRNA de CTGF en mioblastos, evaluado por northern blot (Vial y col., 2008, Cabello-Verrugio y col., 2011). Sin embargo, se desconoce si la traducción de este mRNA estaría ocurriendo de igual manera.

Como primer paso, se corroboraron los resultados anteriormente descritos. Para esto, se evaluó el efecto que tiene LPA en la expresión del gen *ctgf* en mioblastos C2C12 en el tiempo. Se observó por ensayo de RT-PCR cuantitativo que *ctgf* es rápidamente inducido por LPA [20 µg/mL], alcanzando un máximo de expresión a las 3 horas (Figura 1).

Por otro lado, se estudió si la inducción de *ctgf* es dosis dependiente de LPA. Se incubaron mioblastos C2C12 con diferentes concentraciones de LPA por 3 horas y se cuantificó la expresión relativa de *ctgf* por medio de un ensayo de RT-PCR cuantitativo. Se observó que existe una relación dosis dependiente de la expresión relativa de *ctgf* por LPA, aumentando la expresión del gen a medida que aumenta la concentración del inductor (Figura 2).



**Figura 1:** *ctgf* es rápidamente inducido por LPA en mioblastos C2C12. RT-PCR cuantitativo fue realizado para *ctgf*. Se observó que su expresión llega a un máximo a las 3 horas post-inducción. El gen *18s* fue utilizado como gen de referencia. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar;  $n = 3$ . \*\*\*  $P < 0,0001$  en test ANOVA de una vía.

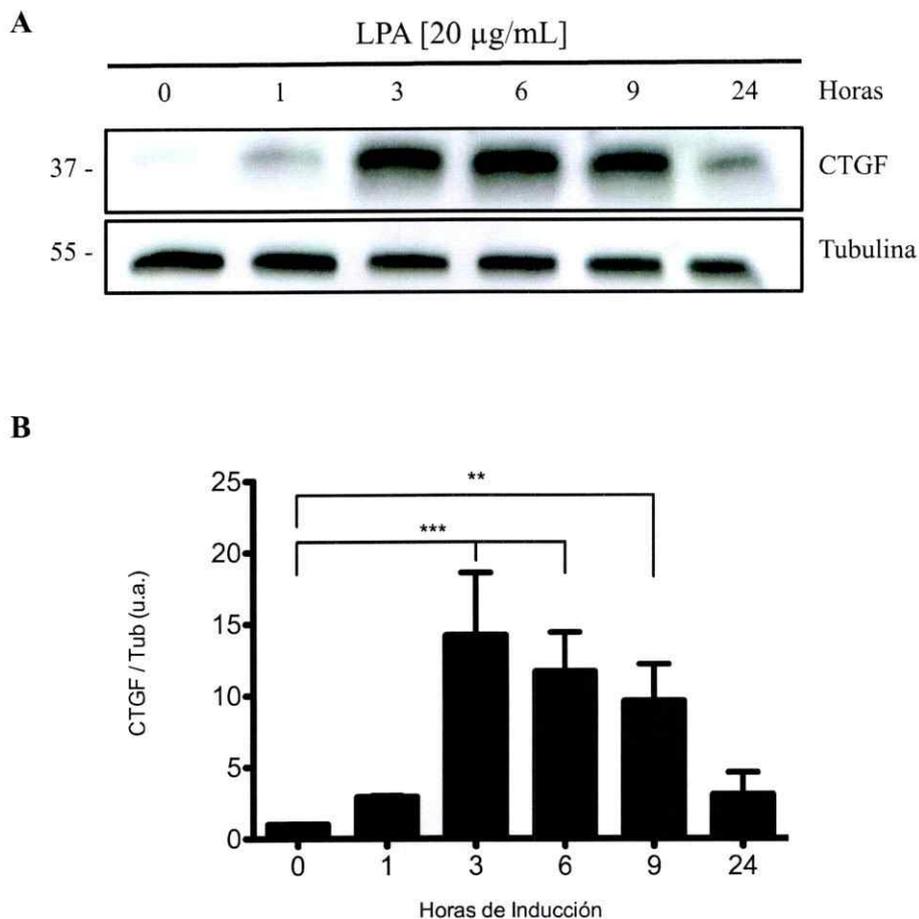


**Figura 2:** *ctgf* es inducido de manera dosis dependiente por LPA en mioblastos C2C12. RT-PCR cuantitativo fue realizado para *ctgf* luego de 3 horas post-inducción. Se observó una dosis dependencia de la inducción de *ctgf* a la concentración de LPA. El gen *18s* fue utilizado como gen de referencia. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar;  $n = 3$ . \*\*\*  $P < 0,0001$  en test ANOVA de una vía.

Los efectos anteriormente mencionados fueron también observados en la proteína CTGF. Los niveles de CTGF aumentan rápidamente en respuesta a LPA [20 µg/mL] en mioblastos C2C12 evaluado por un ensayo de western blot. Estos niveles de la proteína se mantiene desde las 3 hasta las 9 horas post-inducción (Figura 3A). Se cuantificó por densitometría de bandas 3 experimentos independientes, utilizando la proteína tubulina como estándar de carga, y se observó que, aún cuando los niveles de CTGF no varían significativamente entre las 3 y 9 horas, la mayor cantidad de la proteína se registra a las 3 horas post-inducción (Figura 3B), concordando con lo ya observado y descrito para el mRNA.

Con estos resultados se comprueba que LPA es un fuerte y rápido inductor de la expresión de CTGF, tanto a nivel de mRNA como de proteína en mioblastos C2C12.





**Figura 3: CTGF es rápidamente inducido por LPA en mioblastos C2C12. (A)** Niveles de CTGF y Tubulina fueron detectados mediante un ensayo de western blot. Se observa la rápida inducción de la proteína a las 3 horas post-inducción. Tubulina fue utilizado como estándar de carga. **(B)** Los niveles totales de CTGF fueron cuantificados por densitometría de las bandas de 3 experimentos independientes. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar;  $n = 3$ . \*\*\*  $P < 0,0001$ , \*\*  $P < 0,01$  en test ANOVA de una vía.

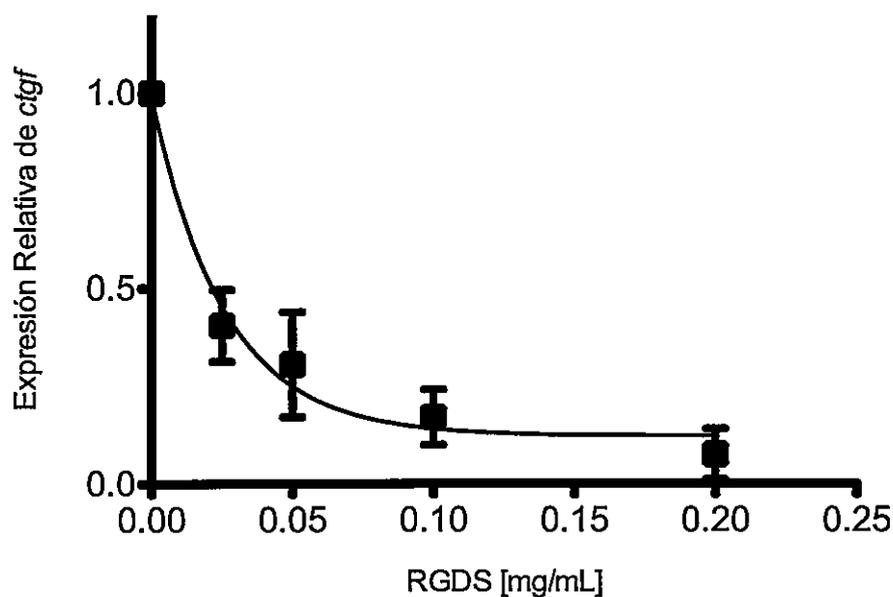
## **2. Inhibición de la interacción célula - MEC reduce la inducción de CTGF por LPA en mioblastos C2C12**

Se sabe que la expresión de *ctgf* es sensible a perturbaciones del citoesqueleto (Ott y col., 2003, Samarakoon y col., 2010) y que CTGF interactúa con moléculas presentes en la MEC, como el proteoglicano decorina (Vial y col., 2011) y proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs) (Gao y Brigstock, 2004). Sin embargo, si la expresión de este factor pro-fibrótico puede ser regulado por eventos externos a la célula, como cambios en la composición de la MEC, se desconoce. Una forma de abordar esta interrogante es inhibiendo la acción de las integrinas, principales mediadores de las interacciones célula - MEC (Campbell y Humphries, 2011), ya que cambios en la composición de la MEC conllevarán a cambios en la interacción de ésta con la célula. Para poder interrumpir esta interacción, se utilizó el péptido RGDS (Arginina - Glicina - Ácido Aspártico - Serina) (Pierschbacher y Ruoslahti, 1984) el cual es un análogo a la secuencia RGD, un motivo presente en diversas proteínas de la MEC (Wang y col., 2013), que es crítico para la adhesión celular vía integrinas (Wickstrom y col., 2011).

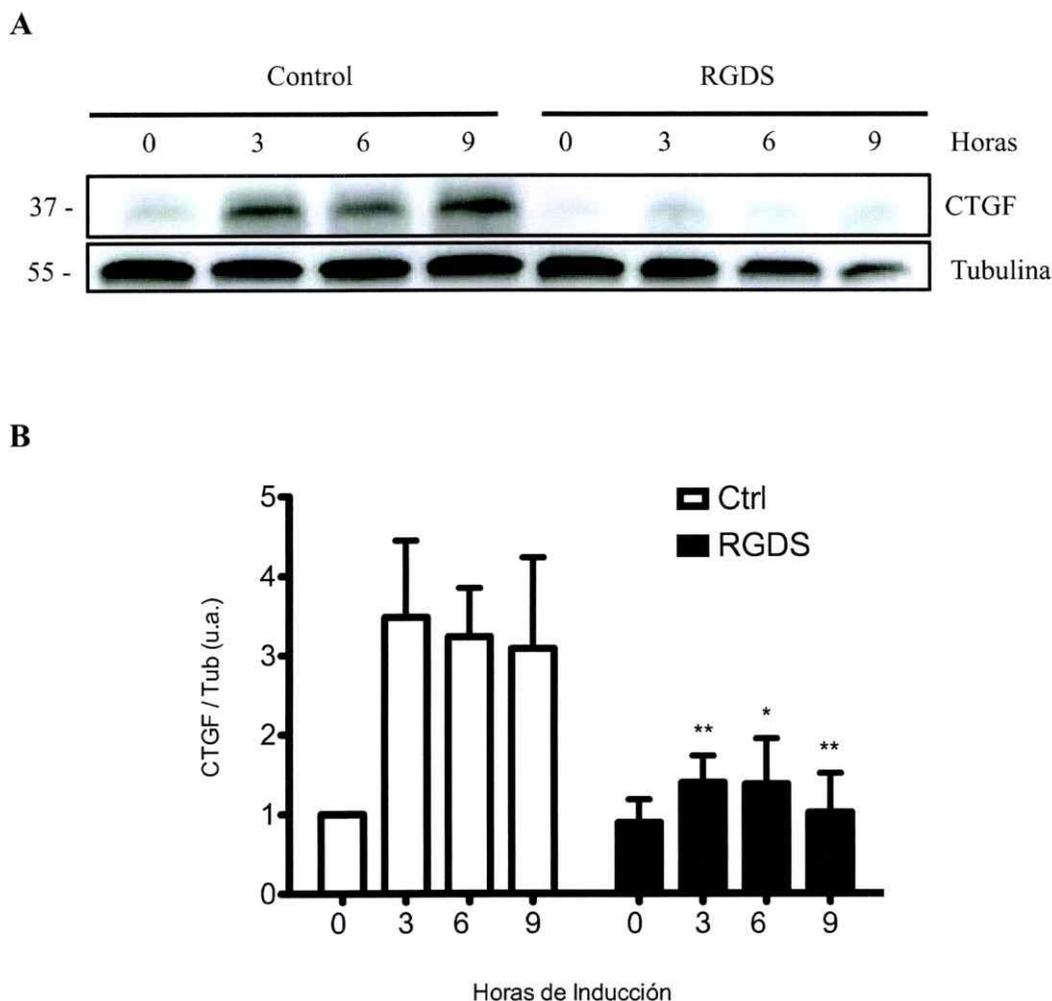
Con este fin, se pre-incubaron mioblastos C2C12 con diferentes concentraciones de RGDS por 30 minutos y luego se co-incubaron con RGDS + LPA [20 µg/mL] por 3 horas. Se cuantificó la expresión relativa de *ctgf* por RT-PCR cuantitativo y se observó que la inducción de *ctgf* por LPA fue reducida de manera dosis dependiente llegando cercano a 0 con 0,2 mg/mL de RGDS (Figura 4). Cerca del 75% de reducción de la

expresión se alcanzó con 0,05 mg/mL de RGDS, por lo que en los próximos experimentos se utilizó esta concentración.

Cómo se observó que los niveles de CTGF aumentaban rápidamente a las 3 horas y se mantenían hasta las 9 horas, se evaluó que estaba pasando con la proteína en estos tiempos en presencia del péptido RGDS. Las células fueron pre-incubadas 30 minutos con 0,05 mg/mL de RGDS para luego co-incubarlas con RGDS + LPA [20 µg/mL] por 0, 3, 6 y 9 horas. Por medio de un ensayo de western blot se observó una caída notable en los niveles de CTGF en presencia de RGDS (Figura 5A). Los niveles de CTGF en 3 experimentos independientes fueron cuantificados, utilizando tubulina como estándar de carga. Como se muestra en la Figura 5B, se comprobó que CTGF cae fuertemente por la acción de RGDS, llegando cercano a los niveles basales.



**Figura 4: Inducción de *ctgf* por LPA es reducida de manera dosis dependiente por péptido RGDS en mioblastos C2C12.** Mioblastos fueron pre-incubados con RGDS en diferentes concentraciones (0,025 mg/mL como mínimo) por 30 minutos. Luego se agregó LPA [20  $\mu$ g/mL]. RT-PCR cuantitativo fue realizado para *ctgf* luego de 3 horas post-inducción. Se observó una reducción dosis dependiente de la expresión de *ctgf* por la acción de RGDS. El gen *18s* fue utilizado como gen de referencia. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar; n = 2.



**Figura 5: Inducción de CTGF por LPA es reducida en presencia de péptido RGDS en mioblastos C2C12.** Mioblastos fueron pre-incubado con RGDS [0,05 mg/mL] por 30 minutos. Luego se agregó LPA [20  $\mu$ g/mL] y se incubaron por los tiempos indicados (0, 3, 6 y 9 horas) **(A)** Niveles de CTGF y Tubulina fueron detectados mediante un ensayo de western blot. Se observa que la inducción de CTGF por LPA es reducida por la acción del péptido RGDS. Tubulina fue utilizado como estándar de carga. **(B)** Los niveles totales de CTGF fueron cuantificados por densitometría de las bandas de 3 experimentos independientes. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar; n = 3. \*\* P < 0,01, \* P < 0,05 en test ANOVA de dos vías.

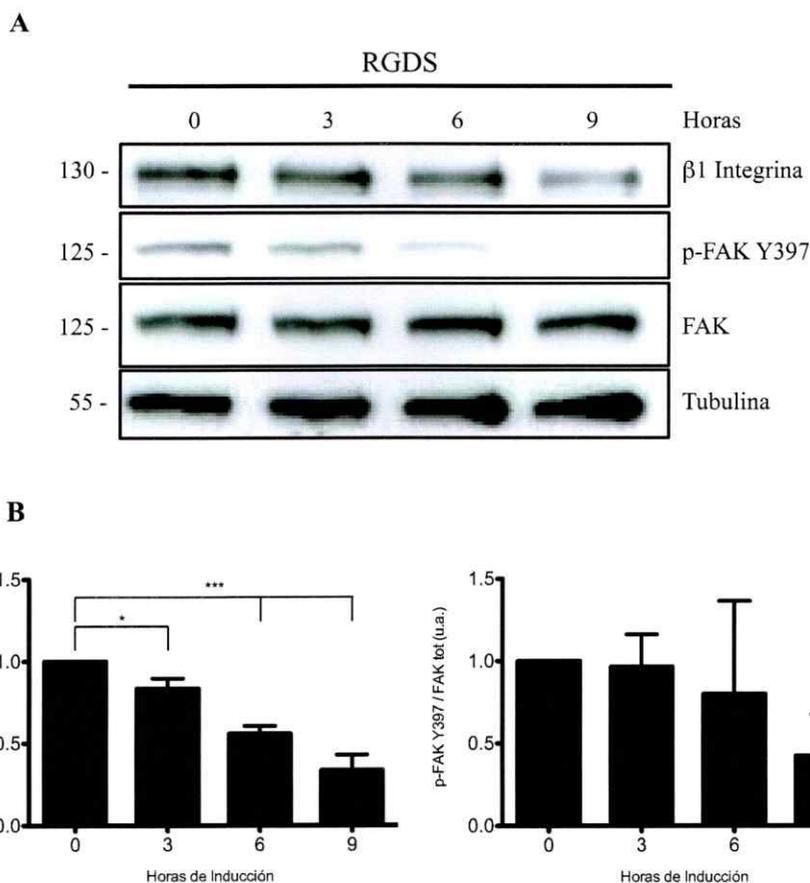
Las integrinas son proteínas heterodiméricas compuestas por una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ . Existen 8 clases de subunidades  $\beta$  (Campbell y Humphries, 2011). Dentro de estas, la subunidad  $\beta 1$  es la más representada en los heterodímeros (Campbell y Humphries, 2011) y se ha descrito que es inducida por el factor pro-fibrótico TGF- $\beta 1$  (Cabello-Verrugio y Brandan, 2007) y CTGF (Vial y col., 2008). Por otro lado, los estímulos externos que son captados por las integrinas requieren de un mediador intracelular que module esta señal. Esta proteína encargada de mediar las señales provenientes de integrinas es la quinasa de adhesión focal (FAK por sus siglas en inglés) (Mitra y col., 2005). Con estos antecedentes, se analizaron las proteínas integrina  $\beta 1$  y FAK en presencia de los tratamientos con el péptido RGDS.

Utilizando las membranas obtenidas en el experimento anterior (Figura 5), se evaluó qué pasaba con integrina  $\beta 1$  en presencia del péptido RGDS. En la Figura 6A se muestra que los niveles de integrina  $\beta 1$  caen en el tiempo en presencia de este péptido. A partir de 3 experimentos independientes se cuantificó los niveles de la integrina, y se corroboró lo mencionado anteriormente (Figura 6B, izquierda), observando una caída de más del 50% de integrina  $\beta 1$  a las 9 horas de incubación con el péptido RGDS.

Por otro lado, se analizó FAK fosforilado en tirosina 397 (p-FAK Y397) en presencia del péptido RGDS. Los niveles de p-FAK Y397 caen en el tiempo en presencia del péptido RGDS (Figura 6A). De igual manera, se cuantificó los niveles de p-FAK Y397 en 3 experimentos independientes, y no se logró establecer una tendencia tan evidente como la descrita para integrina  $\beta 1$  (Figura 6B, derecha). No obstante, se

puede observar que a las 9 horas de incubación con el péptido RGDS, los niveles de fosforilación de FAK han caído cerca de un 40%.

Los resultados mostrados nos indican que la interacción célula – MEC, mediada por integrinas, estaría involucrada en el control de la expresión del factor pro-fibrótico CTGF inducido por LPA en mioblastos. Además, al utilizar el péptido RGDS se observó que los niveles de integrina  $\beta 1$  y de la fosforilación de FAK caen.



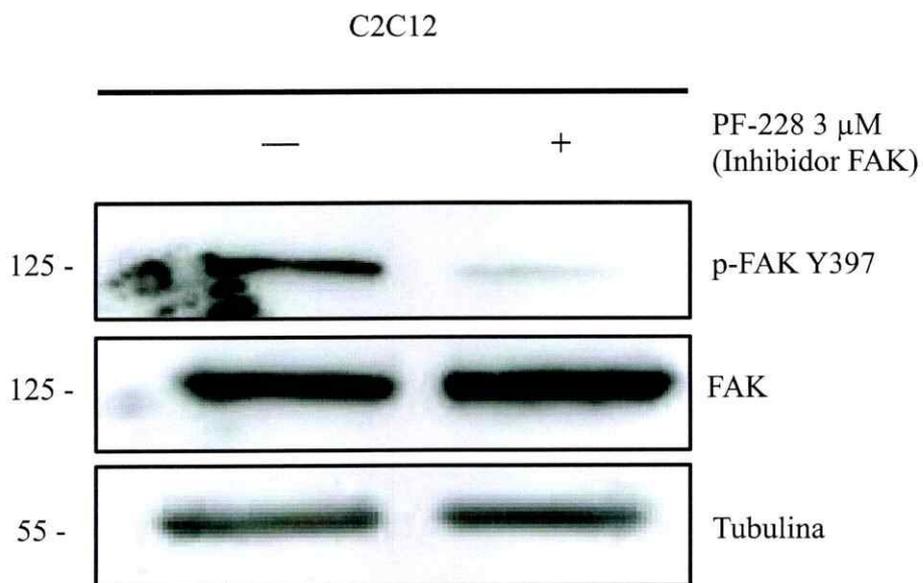
**Figura 6: Integrina  $\beta 1$  y p-FAK Y397 disminuyen en presencia de péptido RGDS en mioblastos C2C12 inducidos con LPA. (A)** Niveles de integrina  $\beta 1$ , FAK fosforilado en tirosina 397 (p-FAK Y397), FAK y tubulina fueron detectados mediante un ensayo de western blot. Se observa que tanto integrina  $\beta 1$  como p-FAK Y397 disminuyen sus niveles al aumentar el tiempo de incubación con el péptido RGDS. Tubulina fue utilizado como estándar de carga. **(B)** Los niveles totales de integrina  $\beta 1$  y p-FAK Y397 fueron cuantificados por densitometría de las bandas. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar;  $n = 3$ . \*\*\*  $P < 0,0001$ , \*  $P < 0,05$  en test ANOVA de una vía.

### 3. Inhibición de la fosforilación de FAK reduce la inducción de CTGF por LPA en mioblastos C2C12

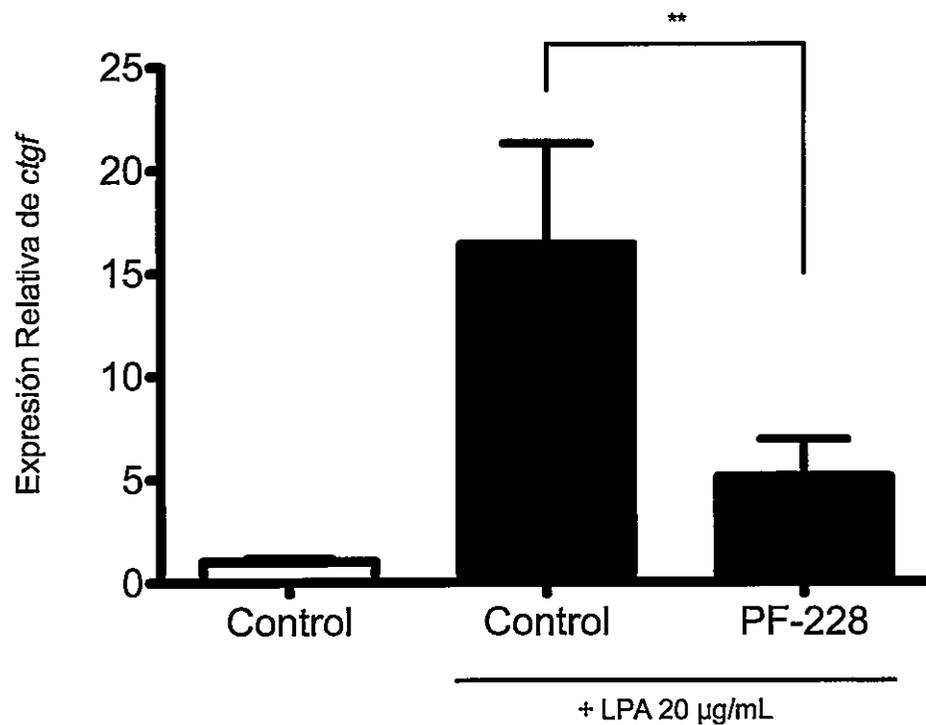
Cómo se describió anteriormente, la quinasa de adhesión focal (FAK) cumple un importante rol en la transducción de vías de señalización iniciadas en los sitios de adhesión celular a la MEC mediadas por integrinas (Mitra y col., 2005). Cómo se observó en la Figura 6, la inhibición de la interacción célula – MEC por medio del péptido RGDS estaría inhibiendo la fosforilación de FAK. Es por esto que se preguntó si la inhibición en la fosforilación de FAK tendría un efecto similar en la expresión del factor pro-fibrótico CTGF.

Para abordar esta pregunta se utilizó el inhibidor de la fosforilación de FAK en tirosina 397, PF-573228 (PF-228) (Slack-Davis y col., 2007). Mioblastos C2C12 fueron incubadas por 1 hora con 3  $\mu$ M del inhibidor. La Figura 7 muestra que el inhibidor de la fosforilación de FAK disminuye los niveles de p-FAK Y397 considerablemente. Con esto se procedió a evaluar que estaba pasando con CTGF en presencia de este inhibidor.

Utilizando el inhibidor PF-228, mioblastos C2C12 fueron pre-incubados por 30 minutos. Luego se co-incubaron con PF-228 + LPA [20  $\mu$ g/mL]. Al cabo de 3 horas post-inducción se cuantificó la expresión relativa de *ctgf* por ensayos de RT-PCR cuantitativo (Figura 8). Se observó que la inducción de *ctgf* por LPA es reducida considerablemente por la inhibición en la fosforilación de FAK, cayendo cerca de un 70% en comparación al control, siendo bastante similar a lo mostrado en la Figura 4 al utilizar el péptido RGDS.



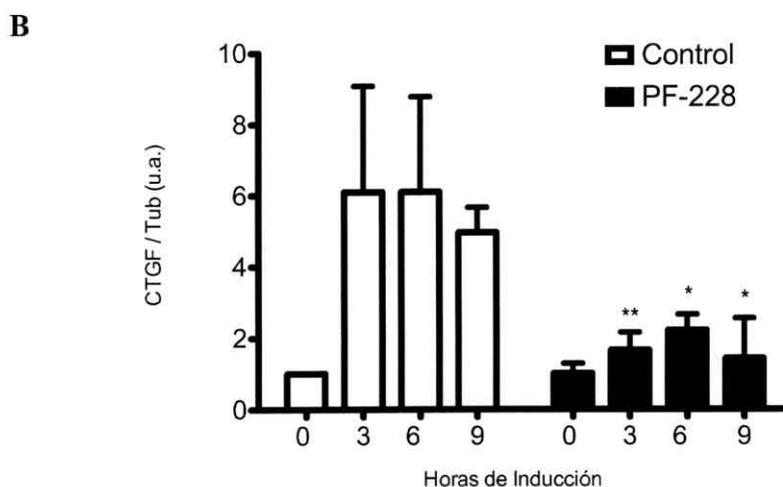
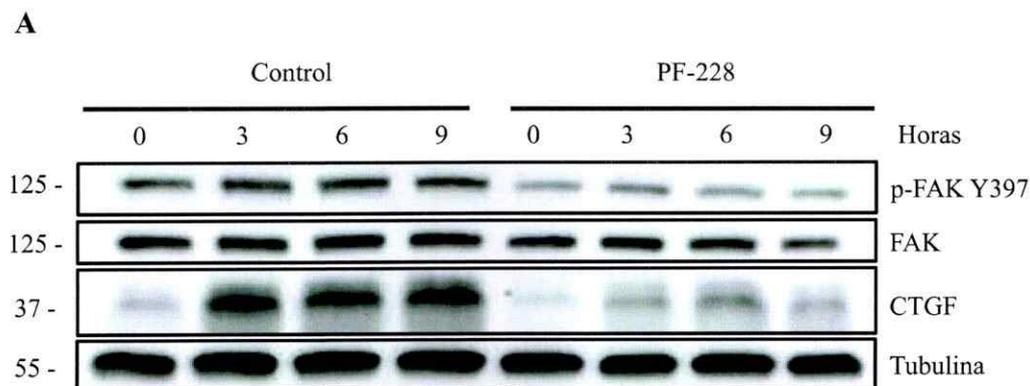
**Figura 7: PF-228, inhibidor específico de FAK, inhibe fuertemente la fosforilación de FAK en Tirosina 397 (p-FAK Y397) en mioblastos C2C12.** Niveles de p-FAK Y397, FAK y tubulina fueron detectados por ensayo western blot. Se observa que p-FAK Y397 disminuye considerablemente luego de 1 hora de tratamiento con el inhibidor PF-228.



**Figura 8:** Inducción de *ctgf* por LPA es reducida por inhibición en la fosforilación de FAK en tirosina 397 en mioblastos C2C12. Mioblastos fueron pre-incubados con PF-228 3 µM por 30 minutos. Luego se agregó LPA [20 µg/mL]. RT-PCR cuantitativo fue realizado para *ctgf* luego de 3 horas post-inducción. Se observó una reducción de la expresión de *ctgf* por la inhibición en la fosforilación de FAK. El gen *18s* fue utilizado como gen de referencia. Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar; n = 3. \*\* P < 0,01.

A continuación, se evaluó si la proteína también estaría siendo reducida por la inhibición de FAK. Mioblastos C2C12 fueron pre-incubados con 3  $\mu$ M de PF-228 y luego se agregó LPA [20  $\mu$ g/mL] para ser incubados por 0, 3, 6 y 9 horas. Mediante un ensayo de western blot se observó que los niveles de CTGF caen fuertemente en presencia del inhibidor. (Figura 9A). Además, se puede ver claramente la inhibición en la fosforilación de FAK en el residuo Y397, como control positivo de la acción del inhibidor. Los niveles de CTGF fueron cuantificados a partir de 3 experimentos independientes utilizando tubulina como estándar de carga. Como se observa en el gráfico de la Figura 9B, los niveles de CTGF son reducidos cuando la fosforilación de FAK es inhibida, llegando muy cercano a los niveles basales.

· Los resultados descritos nos indican que la fosforilación de FAK estaría regulando la expresión de CTGF inducido por LPA en mioblastos.



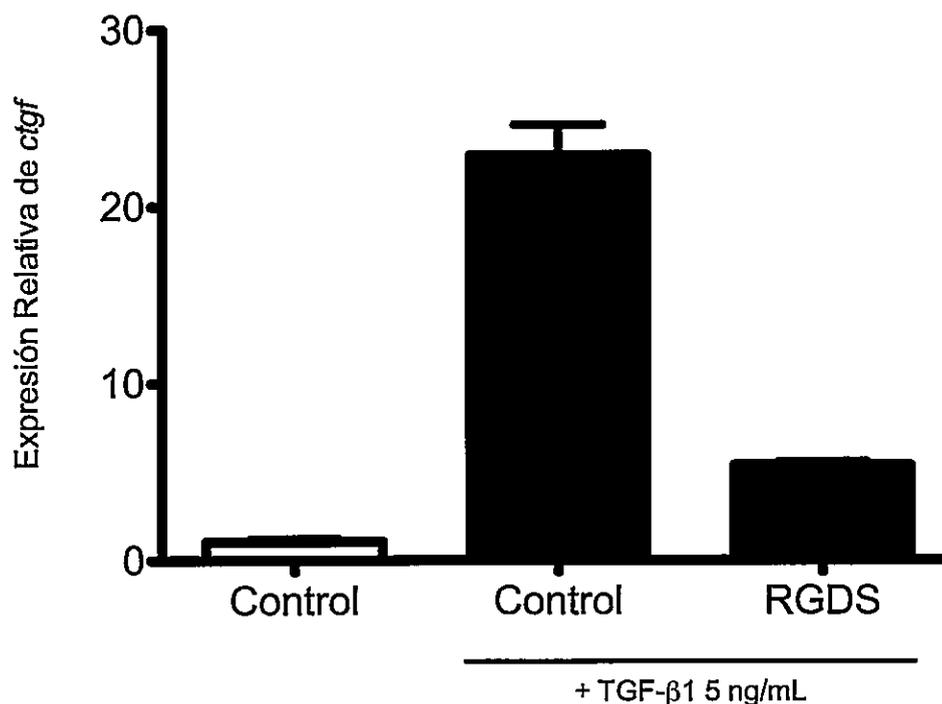
**Figura 9: Inducción de CTGF por LPA es reducida por inhibición en la fosforilación de FAK en tirosina 397 en mioblastos C2C12.** Mioblastos fueron preincubado con PF-228 3  $\mu$ M por 30 minutos. Luego se agregó LPA [20  $\mu$ g/mL] y se incubaron por los tiempos indicados (0, 3, 6 y 9 horas) **(A)** Niveles de CTGF, p-FAK Y397, FAK y tubulina fueron detectados mediante un ensayo de western blot. Se observa que la inducción de CTGF es reducida por el inhibidor PF-228. Tubulina fue utilizado como estándar de carga. **(B)** Los niveles totales de CTGF fueron cuantificados por densitometría de las bandas. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar; n = 3. \*\* P < 0,01, \* P < 0,05 en test ANOVA de dos vías.

#### 4. Inhibición de la interacción célula – MEC reduce la inducción de CTGF por TGF- $\beta$ 1 en mioblastos C2C12

En un contexto fibrótico, el factor de crecimiento transformante tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) esta altamente sobre-expresado e íntimamente ligado con la progresión de la fibrosis (Denton y Abraham, 2001, Kharraz y col., 2014). Además, se ha demostrado que TGF- $\beta$ 1 estimula fuertemente la inducción de CTGF (Holmes y col., 2001, Vial y col., 2008) a través de la vía de señalización Smad – dependiente (Holmes y col., 2001, Cabello-Verrugio y col., 2011). Con los resultados obtenidos, se plantea la interrogante si la inducción de CTGF por TGF- $\beta$ 1 también se vería reducida por la inhibición de la interacción célula – MEC por el péptido RGDS.

Para resolver esta pregunta, mioblastos C2C12 fueron pre-incubados por 30 minutos en presencia de 0,05 mg/mL de RGDS, para luego agregar TGF- $\beta$ 1 [5 ng/mL]. Se cuantificó la expresión relativa de *ctgf* luego de 3 horas de inducción por un ensayo de RT-PCR cuantitativo. Se observó que la inducción de *ctgf* por TGF- $\beta$ 1 cae sobre un 80% en presencia del péptido RGDS (Figura 10), similar a lo ya descrito en la Figura 4, al inducir *ctgf* con LPA.

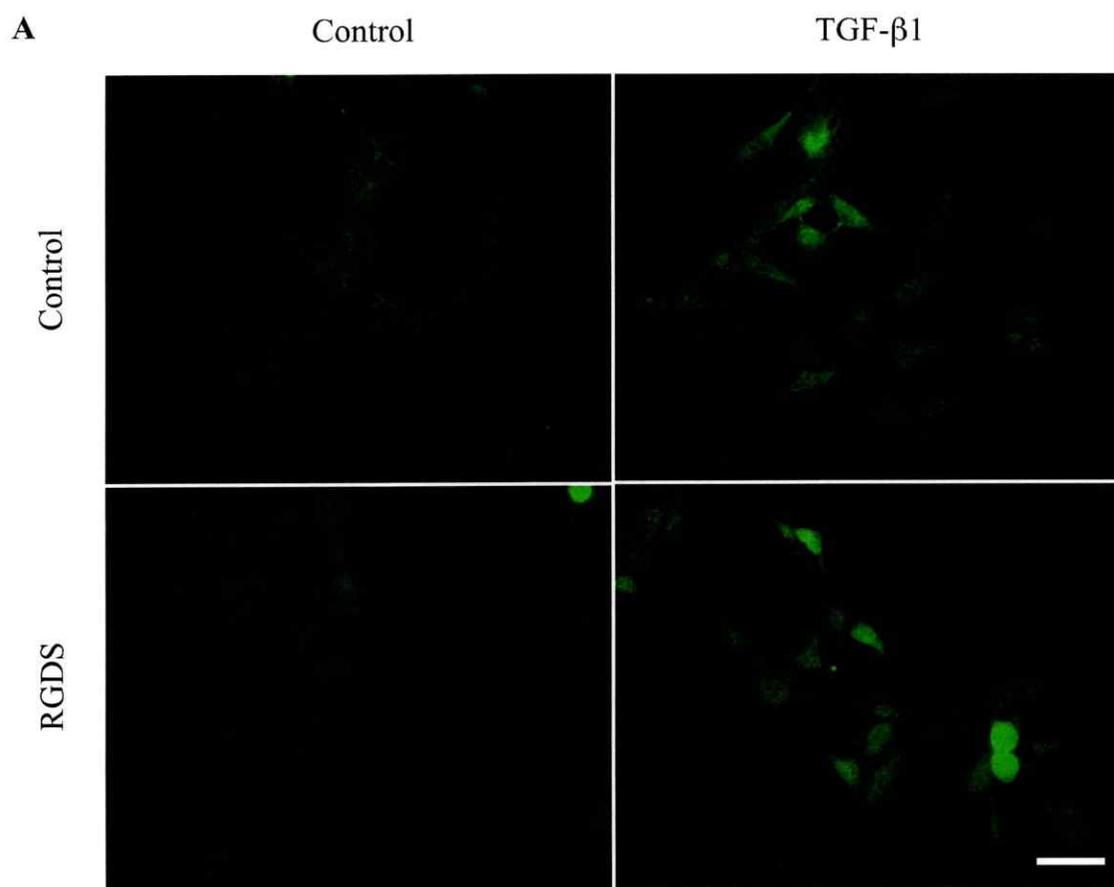
En definitiva, en presencia de dos factores diferentes, la expresión de *ctgf* esta siendo reducida por la inhibición de la interacción célula – MEC por el péptido RGDS.



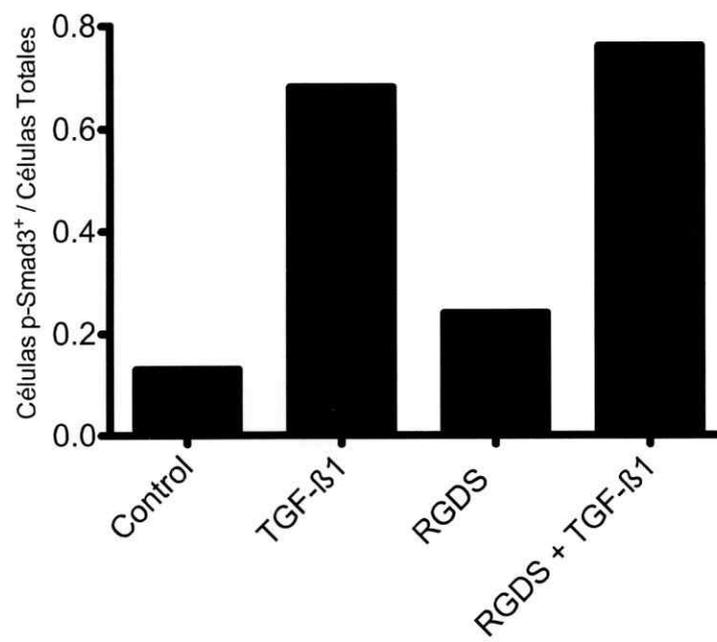
**Figura 10: Inducción de *ctgf* por TGF-β1 es reducida en presencia de péptido RGDS en mioblastos C2C12.** Mioblastos fueron pre-incubados con RGDS 0,05 mg/mL por 30 minutos. Luego se agregó TGF-β1 [5 ng/mL]. RT-PCR cuantitativo fue realizado para *ctgf* luego de 3 horas post-inducción. Se observó una reducción de la expresión de *ctgf* por la acción del péptido RGDS. El gen *18s* fue utilizado como gen de referencia. Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar de tres replicas experimentales.

Sin embargo, la reducción en la expresión de *ctgf* podría deberse a una inhibición en las vías de señalización de los factores. Como se mencionó anteriormente, la inducción de CTGF por TGF- $\beta$ 1 es a través de la vía de señalización Smad – dependiente. Una de las proteínas claves en esta vía es Smad3, cuya fosforilación se ha descrito como esencial para que la inducción de CTGF ocurra (Holmes y col., 2001). Se evaluó, por medio de una inmunofluorescencia indirecta, si RGDS afectaba la translocación nuclear de p-Smad3 en respuesta a TGF- $\beta$ 1. Mioblastos C2C12 fueron pre-incubados con 0,05 mg/mL de RGDS y luego se agregó TGF- $\beta$ 1 [5 ng/mL] por 30 minutos. Como se observa en la Figura 11A, la cantidad de núcleos positivos para p-Smad3 no parece variar en presencia del péptido RGDS. Se cuantificó la relación de células p-Smad3<sup>+</sup> / células totales (Figura 11B) y se comprobó que el péptido RGDS no estaría inhibiendo la vía de señalización de TGF- $\beta$ 1.

Con los resultados mostrados, se observó que al utilizar TGF- $\beta$ 1 en presencia del péptido RGDS se observa la misma reducción en la expresión de *ctgf* que la descrita en los objetivos anteriores al utilizar LPA como inductor. Esta reducción no tendría relación con una inhibición en la vía de señalización de TGF- $\beta$ 1, al observarse que esta no estaría siendo afectada (los niveles de p-Smad3 no caen en presencia del péptido).



**B**



**Figura 11: Vía de señalización canónica de TGF- $\beta$ 1 es activada en presencia de péptido RGDS. (A)** Inmunofluorescencia indirecta de p-Smad3 realizada 30 minutos post-inducción con 5 ng/mL de TGF- $\beta$ 1. Se observa que en presencia del péptido RGDS no hay una variación en la fosforilación y translocación nuclear de la proteína Smad3, para las muestras con TGF- $\beta$ 1. Para el caso de las muestras que no se les agregó TGF- $\beta$ 1, se observa una pequeña marca citoplasmática. **B)** Cuantificación de la cantidad de núcleos p-Smad3<sup>+</sup> en relación a la cantidad de núcleos totales (núcleos teñidos con Hoescht 33258) en 5 campos diferentes de un duplicado experimental para cada condición. Las fotografías fueron obtenidas con un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600 a un aumento 40x. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

## **5. Inhibición de la interacción célula – MEC y de la fosforilación de FAK conllevan a cambios en la cantidad de fibras de estrés en respuesta a LPA en mioblastos C2C12**

Se ha mostrado que la inhibición de la interacción célula – MEC, mediada por integrinas, utilizando el péptido RGDS, reduce fuertemente la expresión del factor pro-fibrótico CTGF. Estas mismas observaciones son realizadas al utilizar un inhibidor de la fosforilación de FAK, PF-228, principal mediador de la señalización por integrinas. Por otro lado, se ha descrito que CTGF es sensible a las alteraciones del citoesqueleto, principalmente a los cambios en la dinámica de actina (Ott y col., 2003, Muehlich y col., 2007). Específicamente, un aumento en la polimerización de este microfilamento se traduce en un aumento en la concentración de actina F y una disminución en la concentración de actina G, lo cual activa factores de transcripción que inducen la expresión de CTGF (Olson y Nordheim, 2010, Samarakoon y col., 2010). Además, se ha descrito que LPA es capaz de inducir la polimerización de fibras de estrés de actina (Graness y col., 2006, Cabello-Verrugio y col., 2011). Con estos antecedentes, se evaluó el citoesqueleto de actina en presencia del péptido RGDS o el inhibidor PF-228 y el factor LPA.

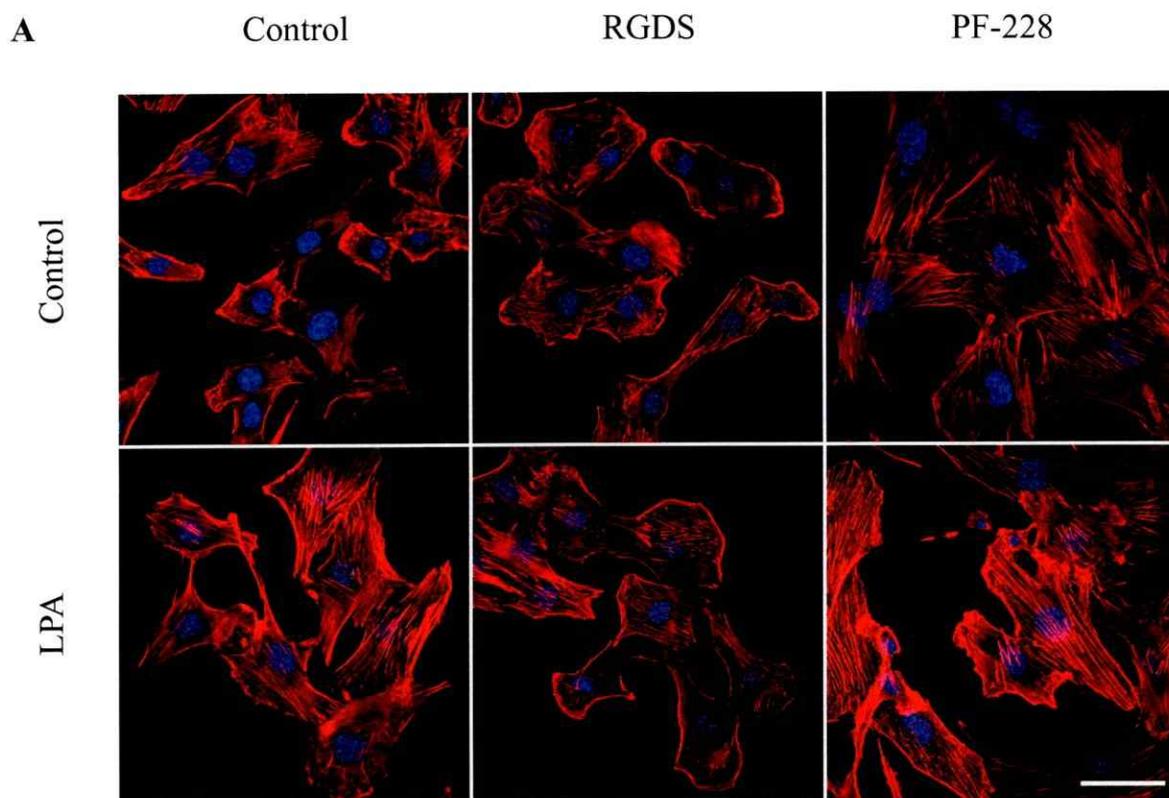
Mioblastos C2C12 fueron pre-incubados con 0,05 mg/mL de RGDS o 3  $\mu$ M de PF-228 por 30 minutos y luego se agregó LPA [20  $\mu$ g/mL]. Al cabo de 24 horas, se realizó una tinción fluorescente para actina F y se observó la formación de fibras de estrés. Como se observa en la Figura 12A, para el caso del control, LPA induce la polimerización de actina al observarse una mayor cantidad de fibras dentro de la célula.

Se contó la cantidad de fibras de estrés por célula (Figura 12B) y se vio éstas se cuadruplicaron en presencia del factor.

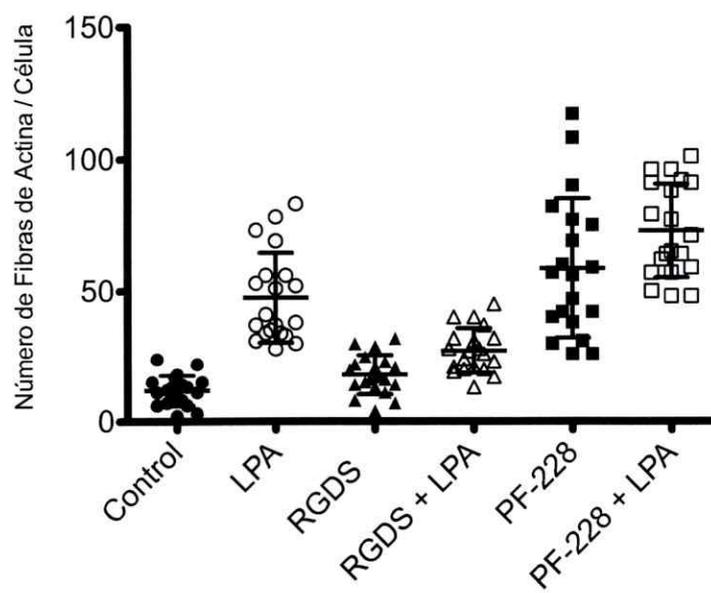
Al ser tratadas con RGDS, la cantidad de fibras de actina, inducidas por LPA, es reducida en presencia de este péptido (Figura 12A). Por otro lado, el tamaño de las células se observó menor. Estas observaciones fueron corroboradas al cuantificar las fibras por célula, observándose una pequeña inducción en respuesta a LPA, pero que no alcanzó los niveles del control (Figura 12B).

Las células tratadas con PF-228, presentaron un tamaño mayor y una gran cantidad de fibras de estrés. La presencia de actina polimerizada fue aún mayor al tratar las células con PF-228 + LPA (Figura 12A). Las cuantificaciones muestran que la cantidad promedio de fibras, en presencia del inhibidor, es levemente mayor a la cantidad observada en las células solamente tratadas con LPA, y que estos niveles de actina F aumenta aún más en presencia de LPA (Figura 12B). Sin embargo, se vio que la inducción de fibras de estrés en respuesta a LPA fue menor que la inducción en el control (Figura 12B).

Los resultados descritos muestran que la dinámica de actina cambia en respuesta a la inhibición de la interacción célula – MEC y a la inhibición de la fosforilación de FAK. Sin embargo, estas variaciones son diferentes, viéndose en un caso una reducción en la polimerización de actina, y en el otro un aumento en ésta.



**B**



**Figura 12: Cantidad de fibras de estrés de actina varía en presencia del péptido RGDS o inhibidor PF-228. (A)** Tinción fluorescente de actina F realizada 24 horas post-inducción con LPA en presencia del péptido RGDS o el inhibidor PF-228. Se observa que LPA induce la formación de fibras de estrés. En presencia del péptido RGDS, la inducción de fibras de actina es mucho menor que el control. Además, el tamaño de las células tratadas con RGDS estaría levemente reducido. Las células tratadas con PF-228 presentan una mayor cantidad de fibras de estrés tanto en el control, como al agregar LPA, al compararlas con las no tratadas. El tamaño de estas células parece aumentado. **(B)** Se contó el número de fibras de estrés presente en las células. Se observa que el número de fibras aumenta alrededor de 4 veces al agregar LPA (promedio control = 12 fibras / célula; promedio control + LPA = 47 fibras / célula). Las células tratadas con RGDS no presentan un aumento considerable en la cantidad de fibras de actina al agregar LPA (promedio RGDS control = 18 fibras / célula; promedio RGDS + LPA = 27 fibras / célula). Por otro lado, las células tratadas con el inhibidor PF-228 poseen mayor cantidad de fibras a nivel basal (promedio PF-228 control = 57 fibras / célula), y esta cantidad aumentan al agregar LPA (promedio PF-228 + LPA = 73 fibras / célula). Cada punto corresponde a una célula independiente. Se graficó el promedio  $\pm$  desviación estándar obtenido a partir de 3 campos aleatorios de un duplicado experimental para cada condición. Las fotografías fueron obtenidas en un microscopio confocal espectral Nikon Eclipse C2 a un aumento de 60 X. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

## VII. DISCUSIÓN

El comportamiento y las funciones celulares están influenciadas por la MEC. En el músculo esquelético, la MEC es una estructura dinámica, compuesta por una gran variedad de moléculas, que se encuentra estrechamente asociada con las fibras musculares, siendo necesaria para que el proceso de miogénesis ocurra de manera apropiada (Osses y Brandan, 2002, Bentzinger y col., 2013). Cuando el músculo sufre un daño reiterado, es decir crónico, el tejido adquiere a un fenotipo fibrótico, el cual se caracteriza por una excesiva deposición de componentes de la MEC dentro y alrededor del tejido inflamado y/o dañado (Wynn y Ramalingam, 2012). Este daño crónico está asociado a una gran variedad de enfermedades que tienen al músculo como su órgano blanco (McNally y Pytel, 2007), alterando los procesos fisiológicos normales, y por ende, su funcionamiento y geometría. Estos cambios producen una MEC que no es igual a la encontrada en un músculo sano, por lo que su interacción con la célula e influencia en los procesos celulares, no será la misma.

Los factores LPA y CTGF han sido estudiados por su relación con la progresión de esta patología. Existe creciente evidencia de que LPA induce la expresión de CTGF, lo que influye directamente en el desarrollo de la fibrosis (Vial y col., 2008, Zuehlke y col., 2012, Sakai y col., 2013). En mioblastos se ha mostrado que LPA induce la transcripción del mRNA de CTGF (Vial y col., 2008) y la expresión de un reportero que contiene el promotor de este factor (Cabello-Verrugio y col., 2011).

Este Seminario de Título comenzó corroborando los resultados descritos anteriormente. Se observó una rápida inducción de CTGF por LPA, tanto a nivel de

mRNA como de proteínas, alcanzando un máximo a las 3 horas post-inducción. Además se mostró que la inducción en la expresión del gen *ctgf*, en respuesta a LPA, es dosis dependiente. De manera notable, la respuesta de CTGF a la acción de LPA es más rápida que la descrita para el factor pro-fibrótico TGF- $\beta$ 1 en mioblastos, el cual induce la transcripción de *ctgf* a tiempos más tardíos (6 horas post-inducción) (Vial y col., 2008). Este efecto también ha sido observado en otros modelos como células epiteliales tubulares renales (Zuehlke y col., 2012).

La MEC esta en constante interacción con el interior de la célula, principalmente por medio de la acción de las proteínas localizadas en la membrana plasmática del músculo, pertenecientes a la familia de las integrinas. Estos receptores captan los estímulos externos transformándolos en señales intracelulares. El principal mediador de la transducción de estas señales es la proteína FAK, la cual actúa como un regulador de esta vía y como un andamio en la formación de las fibras de estrés de actina (Mitra y col., 2005). La expresión de CTGF es sensible a los cambios en la dinámica de actina, induciéndose su expresión cuando existe un aumento en la polimerización de este microfilamento (Ott y col., 2003, Muehlich y col., 2007), pero no se ha reportado si cambios en la interacción de la célula con la MEC puede alterar su expresión. En un fenotipo fibrótico, la MEC del músculo varía, lo que conllevaría a cambios en las interacciones de ésta con la célula.

Durante esta investigación evaluamos el rol de las integrinas y de FAK en la regulación de la expresión de CTGF en mioblastos en respuesta al factor LPA. Para esto, se alteró el funcionamiento normal de estas proteínas por medio de la utilización del

péptido RGDS, un motivo reconocido por una de las clases de integrinas, y un inhibidor de la fosforilación de FAK. Al utilizar tanto el inhibidor de la interacción célula – MEC (RGDS) y de la fosforilación de FAK (PF-228) observamos que la expresión de CTGF se redujo fuertemente, tanto a nivel transcripcional como traduccional, siendo la reducción mediada por el péptido RGDS dosis dependiente. Estos resultados nos indican que la expresión de este factor pro-fibrótico estaría, de alguna manera, siendo regulado por estos componentes pertenecientes a los mecanismos de adhesión celular. Utilizando el factor pro-fibrótico TGF- $\beta$ 1 para inducir la expresión de CTGF, en presencia de RGDS, observamos una disminución similar que la descrita anteriormente. La inducción de CTGF mediada por TGF- $\beta$ 1 involucra la vía de señalización Smad – dependiente, principalmente la fosforilación y translocación al núcleo de la proteína Smad3 (Holmes y col., 2001). Esta proteína fue analizada en los tratamientos con TGF- $\beta$ 1 + RGDS y se observó que no hubo cambios en su activación, por lo que la inhibición de la interacción célula – MEC no estaría afectando el mecanismo de señalización por el cual CTGF es inducido, si no que estaría regulando directamente la expresión de este factor pro-fibrótico, alterando algún mecanismo intracelular o vía de señalización que es importante para que CTGF pueda ser expresado.

Interesantemente, los tratamientos con el péptido RGDS producen una disminución en la cantidad de la integrina  $\beta$ 1 a lo largo del tiempo. Estas proteínas son constantemente recicladas en rápidos ciclos de endo – exocitosis que permiten la regulación de las funciones de estos receptores (Caswell y Norman, 2006). Sin embargo, este ciclo estaría estrechamente ligado con el proceso de degradación (Bottcher y col.,

2012), por lo que se podría sospechar que al inhibir la interacción célula – MEC por medio del péptido RGDS, la subunidad  $\beta 1$  estaría rápidamente siendo degradada. Este proceso podría afectar la fosforilación de FAK, el cual también se observó que estaría disminuyendo sus niveles de fosforilación en Y397 durante este tratamiento.

La señalización vía integrinas se conecta, en la mayoría de los casos, con el citoesqueleto de actina (Mitra y col., 2005, Wickstrom y col., 2011), y como se mencionó anteriormente, la expresión de CTGF es sensible a cambios en la dinámica de este microfilamento (Samarakoon y col., 2010). Además, resultados de nuestro laboratorio han mostrado que LPA induce la polimerización de fibras de estrés (Cabello-Verrugio y col., 2011), y se ha propuesto que este sea un mecanismo por el cual LPA estaría induciendo la expresión de CTGF (Ott y col., 2003). Con los resultados anteriormente mencionados, se esperaba que el citoesqueleto de actina, en presencia de estos dos inhibidores, estuviese interrumpido, y la formación de fibras de estrés en respuesta a LPA no aumentara significativamente con respecto al control. Concordante con esto, la cantidad de fibras en presencia del péptido RGDS, no varía considerablemente. Cuando las integrinas reconocen su ligando se activan diversos mecanismos que producen la formación de fibras de actina (Wickstrom y col., 2011), por lo que en ausencia de este, la formación de estas fibras se ve radicalmente disminuida. No obstante, sorprendentemente observamos que en presencia del inhibidor de FAK, la cantidad de fibras, tanto en el control como en las células tratadas con LPA, es considerablemente mayor a sus respectivos controles. Esto se podría deber a que la fosforilación de FAK ha sido asociada con el desacoplamiento de los contactos focales,

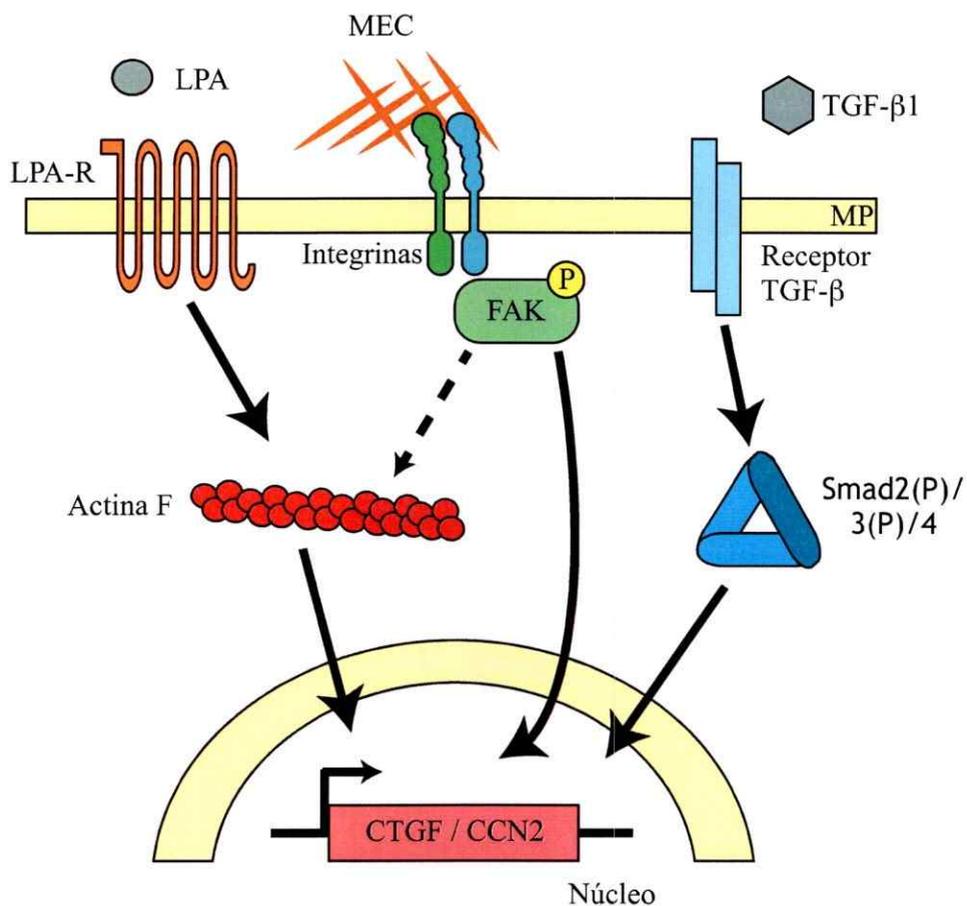
y la inhibición de la fosforilación de esta proteína, estabilizaría estas zonas, y por lo tanto, las fibras formadas (Webb y col., 2004). Estos resultados nos dan luces de que la regulación de la expresión del factor CTGF por integrinas no estaría involucrando la acción del citoesqueleto de actina, si no que estaría asociado a otras vías de señalización que requieran de la fosforilación de FAK pero no de la polimerización de estos microfilamentos (Figura 13).

Como se ha mencionado en reiteradas ocasiones, en un contexto fibrótico existe una gran deposición de componentes de MEC, provocando cambios que estarán afectando la interacción de la célula con ésta. Estos cambios en las interacciones estarían involucrados en la exacerbada expresión de factores pro-fibróticos como TGF- $\beta$  y CTGF, los cuales son esenciales para la progresión de esta patología. Durante este Seminario de Título se mostró que la expresión de CTGF podría estar siendo regulada por elementos pertenecientes a los mecanismos de adhesión celular que involucran la participación de la familia de las integrinas, y que esta regulación no incluiría la participación del citoesqueleto de actina (Figura 13).

A partir de la investigación desarrollada y expuesta, diversas proyecciones pueden ser establecidas. Durante este trabajo, se evaluó la expresión del factor pro-fibrótico CTGF en condiciones de pérdida de función de ciertos componentes celulares, por lo que la siguiente tarea a realizar es evaluar esta proteína en un contexto en que estas funciones sean estimuladas, por ejemplo: en presencia de matriz de colágeno y fibronectina, donde las zonas de adhesión celular son mayores, o de MEC de músculo sano y fibrótico, donde los componentes varían sustancialmente. Por otro lado, la

evidencia indica que este proceso de regulación es independiente del citoesqueleto de actina, el cual ha sido ampliamente relacionado con la expresión de CTGF, por lo que es necesario ahondar en esta arista y determinar qué componentes celulares estarían involucrados en esta regulación del factor pro-fibrótico. En esta línea, diversos mecanismos han sido descritos por el cual FAK puede regular la expresión génica (Schaller, 2010), incluyendo la translocación al núcleo de esta proteína modulando la actividad de factores transcripcionales (Lim y col., 2008). Qué factores estaría modulando FAK, de qué manera y como esto influye en la expresión de CTGF requiere mayor investigación.

Establecer de qué manera las células regulan CTGF es un paso importante para entender el proceso de fibrosis, y así poder determinar blancos terapéuticos que permitan el tratamiento de esta patología, que no solo se enmarca en el músculo esquelético, si no que también afecta a diversos órganos del cuerpo humano.



**Figura 13: CTGF es regulado por el eje integrinas/FAK.** LPA induce a CTGF mediante la formación de fibras de actina (Ott y col., 2003). Por otro lado, TGF- $\beta$ 1 induce a CTGF mediante la vía de señalización canónica Smad-dependiente, que requiere de la fosforilación y translocación al núcleo del factor Smad3 (Holmes y col., 2001). En el presente Seminario de Título se demostró que la señalización mediada por el eje integrinas/FAK regula la expresión de CTGF. Sin embargo, este mecanismo sería independiente de la formación de fibras de actina y paralelo a la vía de señalización canónica Smad-dependiente.

## VIII. CONCLUSIONES

1. CTGF es rápidamente inducido por LPA en cultivos *in vitro* de mioblastos C2C12.

2. La inhibición de la interacción célula – MEC mediada por integrinas reduce la expresión del factor pro-fibrótico CTGF inducido por LPA y TGF- $\beta$ 1 en mioblastos C2C12.

3. La inhibición de la fosforilación de FAK, principal modulador de la vía de señalización de integrinas, reduce la expresión del factor pro-fibrótico CTGF inducido por LPA en mioblastos C2C12.

4. La inhibición de la interacción célula – MEC reduce considerablemente la formación de fibras de actina, mientras que la inhibición de la fosforilación de FAK aumenta la cantidad de estas fibras.

La interacción célula – MEC mediada por integrinas está involucrada en la regulación de la expresión de CTGF en mioblastos C2C12. Esta regulación incluye la participación de la proteína FAK, pero no del citoesqueleto de actina. Que otras moléculas están participando de esta regulación requieren ser estudiadas.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

Acuna, M. J., Pessina, P., Olguin, H., Cabrera, D., Vio, C. P., Bader, M., Munoz-Canoves, P., Santos, R. A., Cabello-Verrugio, C., Brandan, E., (2014). Restoration of muscle strength in dystrophic muscle by angiotensin-1-7 through inhibition of TGF-beta signalling. *Hum Mol Genet.* **23**: 1237-49.

Andrade, W., Brandan, E., (1991). Isolation and characterization of rat skeletal muscle proteoglycan decorin and comparison with the human fibroblast decorin. *Comp Biochem Physiol B.* **100**: 565-70.

Bentzinger, C. F., Wang, Y. X., Rudnicki, M. A., (2012). Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **4**:

Bentzinger, C. F., Wang, Y. X., von Maltzahn, J., Soleimani, V. D., Yin, H., Rudnicki, M. A., (2013). Fibronectin regulates Wnt7a signaling and satellite cell expansion. *Cell Stem Cell.* **12**: 75-87.

Blau, H. M., Pavlath, G. K., Hardeman, E. C., Chiu, C. P., Silberstein, L., Webster, S. G., Miller, S. C., Webster, C., (1985). Plasticity of the differentiated state. *Science.* **230**: 758-66.

Bottcher, R. T., Stremmel, C., Meves, A., Meyer, H., Widmaier, M., Tseng, H. Y., Fassler, R., (2012). Sorting nexin 17 prevents lysosomal degradation of beta1 integrins by binding to the beta1-integrin tail. *Nat Cell Biol.* **14**: 584-92.

Brandan, E., Gutierrez, J., (2013). Role of skeletal muscle proteoglycans during myogenesis. *Matrix Biol.* **32**: 289-97.

Byron, A., Humphries, J. D., Humphries, M. J., (2013). Defining the extracellular matrix using proteomics. *Int J Exp Pathol.* **94**: 75-92.

Cabello-Verrugio, C., Brandan, E., (2007). A novel modulatory mechanism of transforming growth factor-beta signaling through decorin and LRP-1. *J Biol Chem.* **282**: 18842-50.

Cabello-Verrugio, C., Cordova, G., Vial, C., Zuniga, L. M., Brandan, E., (2011). Connective tissue growth factor induction by lysophosphatidic acid requires transactivation of transforming growth factor type beta receptors and the JNK pathway. *Cell Signal.* **23**: 449-57.

Campbell, I. D., Humphries, M. J., (2011). Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **3**:

Caswell, P. T., Norman, J. C., (2006). Integrin trafficking and the control of cell migration. *Traffic*. **7**: 14-21.

Ceafalan, L. C., Popescu, B. O., Hinescu, M. E., (2014). Cellular players in skeletal muscle regeneration. *Biomed Res Int*. **2014**: 957014.

Clemente, C. F., Corat, M. A., Saad, S. T., Franchini, K. G., (2005). Differentiation of C2C12 myoblasts is critically regulated by FAK signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **289**: R862-70.

Cordova, G., Rochard, A., Riquelme-Guzman, C., Cofre, C., Scherman, D., Bigey, P., Brandan, E., (2015). SMAD3 and SP1/SP3 Transcription Factors Collaborate to Regulate Connective Tissue Growth Factor Gene Expression in Myoblasts in Response to Transforming Growth Factor beta. *J Cell Biochem*.

Davies, K. E., Nowak, K. J., (2006). Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **7**: 762-73.

Denton, C. P., Abraham, D. J., (2001). Transforming growth factor-beta and connective tissue growth factor: key cytokines in scleroderma pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol*. **13**: 505-11.

Eklund, L., Piuhola, J., Komulainen, J., Sormunen, R., Ongvarrasopone, C., Fassler, R., Muona, A., Ilves, M., Ruskoaho, H., Takala, T. E., Pihlajaniemi, T., (2001). Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**: 1194-9.

Ervasti, J. M., Campbell, K. P., (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol*. **122**: 809-23.

Frantz, C., Stewart, K. M., Weaver, V. M., (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*. **123**: 4195-200.

Gao, R., Brigstock, D. R., (2004). Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin alpha(v)beta(3) and heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem*. **279**: 8848-55.

Geng, H., Lan, R., Singha, P. K., Gilchrist, A., Weinreb, P. H., Violette, S. M., Weinberg, J. M., Saikumar, P., Venkatachalam, M. A., (2012). Lysophosphatidic acid increases proximal tubule cell secretion of profibrotic cytokines PDGF-B and CTGF through LPA2- and Galphaq-mediated Rho and alphavbeta6 integrin-dependent activation of TGF-beta. *Am J Pathol*. **181**: 1236-49.

Gillies, A. R., Lieber, R. L., (2011). Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve*. **44**: 318-31.

Graness, A., Giehl, K., Goppelt-Struebe, M., (2006). Differential involvement of the integrin-linked kinase (ILK) in RhoA-dependent rearrangement of F-actin fibers and induction of connective tissue growth factor (CTGF). *Cell Signal*. **18**: 433-40.

Hauschka, S. D., Konigsberg, I. R., (1966). The influence of collagen on the development of muscle clones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **55**: 119-26.

Heusinger-Ribeiro, J., Eberlein, M., Wahab, N. A., Goppelt-Struebe, M., (2001). Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: regulatory roles of RhoA and cAMP. *J Am Soc Nephrol*. **12**: 1853-61.

Holmes, A., Abraham, D. J., Sa, S., Shiwen, X., Black, C. M., Leask, A., (2001). CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem*. **276**: 10594-601.

Humphries, J. D., Byron, A., Humphries, M. J., (2006). Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*. **119**: 3901-3.

Igarashi, A., Okochi, H., Bradham, D. M., Grotendorst, G. R., (1993). Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell*. **4**: 637-45.

Jean-Baptiste, G., Yang, Z., Khoury, C., Greenwood, M. T., (2005). Lysophosphatidic acid mediates pleiotropic responses in skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **335**: 1155-62.

Kharraz, Y., Guerra, J., Pessina, P., Serrano, A. L., Munoz-Canoves, P., (2014). Understanding the process of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Biomed Res Int*. **2014**: 965631.

Larrain, J., Carey, D. J., Brandan, E., (1998). Syndecan-1 expression inhibits myoblast differentiation through a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem*. **273**: 32288-96.

Leask, A., Abraham, D. J., (2004). TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J*. **18**: 816-27.

Leask, A., Abraham, D. J., (2006). All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci*. **119**: 4803-10.

Lieber, R. L., Ward, S. R., (2013). Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 4. Structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* **305**: C241-52.

Light, N., Champion, A. E., (1984). Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. *Biochem J.* **219**: 1017-26.

Lim, S. T., Chen, X. L., Lim, Y., Hanson, D. A., Vo, T. T., Howerton, K., Larocque, N., Fisher, S. J., Schlaepfer, D. D., Ilic, D., (2008). Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol Cell.* **29**: 9-22.

Mauro, A., (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* **9**: 493-5.

McNally, E. M., Pytel, P., (2007). Muscle diseases: the muscular dystrophies. *Annu Rev Pathol.* **2**: 87-109.

Melo, F., Carey, D. J., Brandan, E., (1996). Extracellular matrix is required for skeletal muscle differentiation but not myogenin expression. *J Cell Biochem.* **62**: 227-39.

Mitra, S. K., Hanson, D. A., Schlaepfer, D. D., (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**: 56-68.

Moolenaar, W. H., van Meeteren, L. A., Giepmans, B. N., (2004). The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays.* **26**: 870-81.

Morales, M. G., Cabello-Verrugio, C., Santander, C., Cabrera, D., Goldschmeding, R., Brandan, E., (2011). CTGF/CCN-2 over-expression can directly induce features of skeletal muscle dystrophy. *J Pathol.* **225**: 490-501.

Morales, M. G., Gutierrez, J., Cabello-Verrugio, C., Cabrera, D., Lipson, K. E., Goldschmeding, R., Brandan, E., (2013). Reducing CTGF/CCN2 slows down mdx muscle dystrophy and improves cell therapy. *Hum Mol Genet.* **22**: 4938-51.

Mori, T., Kawara, S., Shinozaki, M., Hayashi, N., Kakinuma, T., Igarashi, A., Takigawa, M., Nakanishi, T., Takehara, K., (1999). Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol.* **181**: 153-9.

Muehlich, S., Schneider, N., Hinkmann, F., Garlich, C. D., Goppelt-Struebe, M., (2004). Induction of connective tissue growth factor (CTGF) in human endothelial cells by lysophosphatidic acid, sphingosine-1-phosphate, and platelets. *Atherosclerosis.* **175**: 261-8.

Muehlich, S., Cicha, I., Garlich, C. D., Krueger, B., Posern, G., Goppelt-Struebe, M., (2007). Actin-dependent regulation of connective tissue growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol.* **292**: C1732-8.

Okudaira, S., Yukiura, H., Aoki, J., (2010). Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie.* **92**: 698-706.

Olson, E. N., Nordheim, A., (2010). Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11**: 353-65.

Osses, N., Brandan, E., (2002). ECM is required for skeletal muscle differentiation independently of muscle regulatory factor expression. *Am J Physiol Cell Physiol.* **282**: C383-94.

Ott, C., Iwanciw, D., Graness, A., Giehl, K., Goppelt-Struebe, M., (2003). Modulation of the expression of connective tissue growth factor by alterations of the cytoskeleton. *J Biol Chem.* **278**: 44305-11.

Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E., (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature.* **309**: 30-3.

Pradere, J. P., Klein, J., Gres, S., Guigne, C., Neau, E., Valet, P., Calise, D., Chun, J., Bascands, J. L., Saulnier-Blache, J. S., Schanstra, J. P., (2007). LPA1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* **18**: 3110-8.

Purslow, P. P., Trotter, J. A., (1994). The morphology and mechanical properties of endomysium in series-fibred muscles: variations with muscle length. *J Muscle Res Cell Motil.* **15**: 299-308.

Quach, N. L., Biressi, S., Reichardt, L. F., Keller, C., Rando, T. A., (2009). Focal adhesion kinase signaling regulates the expression of caveolin 3 and beta1 integrin, genes essential for normal myoblast fusion. *Mol Biol Cell.* **20**: 3422-35.

Rao, C. N., Margulies, I. M., Liotta, L. A., (1985). Binding domain for laminin on type IV collagen. *Biochem Biophys Res Commun.* **128**: 45-52.

Sakai, N., Chun, J., Duffield, J. S., Wada, T., Luster, A. D., Tager, A. M., (2013). LPA1-induced cytoskeleton reorganization drives fibrosis through CTGF-dependent fibroblast proliferation. *FASEB J.* **27**: 1830-46.

Samarakoon, R., Goppelt-Struebe, M., Higgins, P. J., (2010). Linking cell structure to gene regulation: signaling events and expression controls on the model genes PAI-1 and CTGF. *Cell Signal.* **22**: 1413-9.

Sanes, J. R., (1982). Laminin, fibronectin, and collagen in synaptic and extrasynaptic portions of muscle fiber basement membrane. *J Cell Biol.* **93**: 442-51.

Schaller, M. D., (2010). Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci.* **123**: 1007-13.

Schultz, E., Gibson, M. C., Champion, T., (1978). Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *J Exp Zool.* **206**: 451-6.

Slack-Davis, J. K., Martin, K. H., Tilghman, R. W., Iwanicki, M., Ung, E. J., Autry, C., Luzzio, M. J., Cooper, B., Kath, J. C., Roberts, W. G., Parsons, J. T., (2007). Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor. *J Biol Chem.* **282**: 14845-52.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C., (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* **150**: 76-85.

Svensson, L., Heinegard, D., Oldberg, A., (1995). Decorin-binding sites for collagen type I are mainly located in leucine-rich repeats 4-5. *J Biol Chem.* **270**: 20712-6.

Tager, A. M., LaCamera, P., Shea, B. S., Campanella, G. S., Selman, M., Zhao, Z., Polosukhin, V., Wain, J., Karimi-Shah, B. A., Kim, N. D., Hart, W. K., Pardo, A., Blackwell, T. S., Xu, Y., Chun, J., Luster, A. D., (2008). The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med.* **14**: 45-54.

Tomakidi, P., Schulz, S., Proksch, S., Weber, W., Steinberg, T., (2014). Focal adhesion kinase (FAK) perspectives in mechanobiology: implications for cell behaviour. *Cell Tissue Res.* **357**: 515-26.

Vial, C., Zuniga, L. M., Cabello-Verrugio, C., Canon, P., Fadic, R., Brandan, E., (2008). Skeletal muscle cells express the profibrotic cytokine connective tissue growth factor (CTGF/CCN2), which induces their dedifferentiation. *J Cell Physiol.* **215**: 410-21.

Vial, C., Gutierrez, J., Santander, C., Cabrera, D., Brandan, E., (2011). Decorin interacts with connective tissue growth factor (CTGF)/CCN2 by LRR12 inhibiting its biological activity. *J Biol Chem.* **286**: 24242-52.

von der Mark, H., Durr, J., Sonnenberg, A., von der Mark, K., Deutzmann, R., Goodman, S. L., (1991). Skeletal myoblasts utilize a novel beta 1-series integrin and not alpha 6 beta 1 for binding to the E8 and T8 fragments of laminin. *J Biol Chem.* **266**: 23593-601.

- Wang, F., Li, Y., Shen, Y., Wang, A., Wang, S., Xie, T., (2013). The Functions and Applications of RGD in Tumor Therapy and Tissue Engineering. *Int J Mol Sci.* **14**: 13447-62.
- Wang, Q., Usinger, W., Nichols, B., Gray, J., Xu, L., Seeley, T. W., Brenner, M., Guo, G., Zhang, W., Oliver, N., Lin, A., Yeowell, D., (2011). Cooperative interaction of CTGF and TGF-beta in animal models of fibrotic disease. *Fibrogenesis Tissue Repair.* **4**: 4.
- Watt, F. M., Huck, W. T., (2013). Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **14**: 467-73.
- Webb, D. J., Donais, K., Whitmore, L. A., Thomas, S. M., Turner, C. E., Parsons, J. T., Horwitz, A. F., (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol.* **6**: 154-61.
- Wickstrom, S. A., Radovanac, K., Fassler, R., (2011). Genetic analyses of integrin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **3**:
- Wu, C., Keivens, V. M., O'Toole, T. E., McDonald, J. A., Ginsberg, M. H., (1995). Integrin activation and cytoskeletal interaction are essential for the assembly of a fibronectin matrix. *Cell.* **83**: 715-24.
- Wynn, T. A., (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* **214**: 199-210.
- Wynn, T. A., Ramalingam, T. R., (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* **18**: 1028-40.
- Yaffe, D., Saxel, O., (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* **270**: 725-7.
- Zammit, P. S., (2008). All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? *J Cell Sci.* **121**: 2975-82.
- Zuehlke, J., Ebenau, A., Krueger, B., Goppelt-Struebe, M., (2012). Vectorial secretion of CTGF as a cell-type specific response to LPA and TGF-beta in human tubular epithelial cells. *Cell Commun Signal.* **10**: 25.