



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

**TGF β ₁ PREVIENE LA MUERTE POR APOPTOSIS INDUCIDA POR ESTRÉS DE
RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EN LOS FIBROBLASTOS CARDIACOS DE RATAS
NEONATAS**

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

ALAN GONZALO LETELIER VARGAS

Patrocinante : Dr. Guillermo Díaz-Araya.

Directores de tesis : Dr. Guillermo Díaz-Araya.

Dr. Sergio Lavandero.

Santiago, Chile 2008

AGRADECIMIENTOS

Quisiera partir agradeciendo al Dr. Guillermo Dfáz, mi profesor, mi amigo, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por haber confiado en mí aunque las cosas no siempre funcionaron de lo mejor. Gracias por ayudarme a perseverar en lo que más me apasiona y me llena, la ciencia.

Este trabajo y todos los años de estudio, no pudieron haberse logrado sin el apoyo fundamental de mi familia, tanto mis padres (Juan y Alejandra) como mi hermana (Brenda), que durante años sacrificaron muchas cosas para poder verme feliz y verme llegar a este momento, es por eso que les agradezco desde el fondo del alma haber convertido un niño en un hombre con años de esfuerzo, dedicación y por sobre todo mucho amor. No puedo olvidarme de mis amigos, de mis verdaderos amigos, “la comunidad de la zopi” (Smiky, Cote, Steph), ya que su apoyo fue fundamental en cada paso que di dentro de la universidad, gracias por no dejarme caer y por estar conmigo en las buenas y en las malas, por entenderme y aguantarme y, por sobre todo, gracias por su amistad. No dejaré de mencionar a una persona muy especial para mí, mi polola Jessica, que pese a haber llegado al final del ciclo, llegó en el momento más importante y más difícil, el final de todo, llenando mi vida de luz.

Junto a lo anterior, quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, “los fibros”, que más que compañeros los siento como amigos, Raúl, Pancha, Miguel, Pablo, Daniel, Pedro, por haber dedicado parte de su valioso tiempo a enseñarme y conducir mis primeros pasos en la ciencia sin pedir nada a cambio. También quiero agradecer a Fidel (maestrizo), Cecilia y Ruth, ya que sin ellos ningún experimento hubiese sido posible y las largas horas de espera hubiesen sido aún más tediosas. No quiero dejar de agradecer a radio futuro porque gracias a ella, en el laboratorio, nunca nos faltó ROCK.

Quiero dar las gracias a todos y cada uno de los que de una forma u otra, contribuyeron con su granito de arena a hacer de mi sueño, una realidad.

Para finalizar, sólo quiero pedir a los que me han apoyado y ayudado en mí camino, que lo sigan haciendo en esta nueva etapa que comienza para mí....Gracias a todos

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL.....	3
ÍNDICE DE FIGURA.....	7
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Generalidades.....	11
1.2 Corazón.....	11
1.3 Fibroblastos cardíacos.....	11
1.4 Estrés de retículo endoplasmático.....	12
1.4.1 Sensores de estrés.....	13
1.4.2 Estrés de retículo endoplasmático en corazón.....	16
1.4.3 Estrés de retículo endoplasmático y proteínas de la MEC.....	17
1.4.4 Estrés de retículo endoplasmático y viabilidad celular.....	17
1.5 Factor de crecimiento transformante beta (TGF β).....	18
1.5.1 TGF β ₁ y ER stress.....	19
2. HIPÓTESIS.....	21
3. OBJETIVO GENERAL.....	21

4.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1.	Reactivos.....	22
5.2.	Modelo animal.....	22
5.3.	Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardiacos de rata neonata.....	22
5.4.	Preparación de solución de tunicamicina.....	23
5.5.	Preparación de extractos celulares totales.....	23
5.6.	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	23
5.7.	Electrotransferencia de proteínas.....	23
5.8.	Inmunowestern blot.....	24
5.9.	Viabilidad celular.....	25
5.9.1.	Viabilidad Celular por citometría de flujo.....	25
5.9.2.	Viabilidad por conteo de células.....	25
5.10.	Cuantificación de la apoptosis celular mediante ioduro de propidio (PI).....	26
5.11.	Determinación de colágeno soluble.....	26
5.12.	Análisis estadístico.....	26

6.	RESULTADOS.....	27
6.1	Efecto de Tn sobre la viabilidad celular.....	27
6.1.1	Efecto de la concentración de Tn.....	27
6.1.2	Efecto del tiempo de exposición a Tn.....	28
6.1.3	Determinación de la apoptosis inducida por Tn.....	28
6.2	Efecto de TGFβ ₁ sobre la pérdida de viabilidad inducida por Tn.....	30
6.2.1	Efecto del tiempo de exposición a Tn y TGFβ ₁	30
6.2.2	Efecto de las concentraciones de Tn y TGFβ ₁ sobre la viabilidad celular de FCNR.....	33
6.3	Efecto de Tn y TGFβ ₁ sobre los niveles de las proteínas marcadoras de estrés de retículo endoplasmático.....	34
6.3.1	Efecto sobre la expresión de BiP.....	34
6.3.2	Efecto sobre la expresión de PDI.....	36
6.3.3	Efecto sobre la expresión de eIF2α fosforilado.....	38
6.3.4.	Efecto sobre la expresión de CHOP.....	40
6.4	Efecto de Tn y TGFβ ₁ sobre la secreción de colágeno.....	42
6.4.1	Efecto de Tn y TGFβ ₁ sobre la secreción de colágeno soluble.....	42
6.4.2	Efecto de Tn y TGFβ ₁ sobre la expresión de CHOP.....	42

7	DISCUSIÓN.....	44
7.1	Efecto de Tn sobre la viabilidad celular.....	44
7.2	Tn induce estrés de retículo endoplasmático en FCNR.....	45
7.3	Efecto de TGF β_1 sobre la viabilidad celular.....	47
7.4	Efecto de TGF β_1 sobre la expresión de proteínas de estrés de retículo endoplasmático.....	47
8.	CONCLUSIONES.....	51
9.	Modelo propuesto del efecto citoprotector de TGF β_1 sobre la apoptosis inducida por Tn.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Vía de señalización de la UPR en células de mamíferos.....	15
Figura 2	Efecto de la concentración de Tn sobre la viabilidad celular.....	27
Figura 3	Efecto de Tn en función del tiempo sobre la viabilidad celular.....	28
Figura 4	Apoptosis de fibroblastos estimulados con Tn.....	29
Figura 5	Efecto de TGFβ ₁ sobre la muerte celular gatillada por Tn por 24 y 48 horas.....	31
Figura 6	Efecto de TGFβ ₁ sobre la pérdida de la viabilidad gatillada por Tn.....	32
Figura 7	Efecto de concentraciones variables de Tn en presencia de concentraciones variables de TGFβ ₁ , por 48 horas sobre la viabilidad celular.....	33
Figura 8	Determinación de los niveles de BiP cuando los FCNR son estimulados con Tn y TGFβ ₁	35
Figura 9	Determinación de los niveles de PDI cuando los FCNR son estimulados con Tn y TGFβ ₁	37
Figura 10	Determinación de los niveles de eIF2α-P cuando los FCNR son estimulados con Tn y TGFβ ₁	39
Figura 11	Determinación de los niveles de CHOP cuando los FCNR son estimulados con Tn y TGFβ ₁	41
Figura 12	Efecto de Tn y TGFβ ₁ sobre la secreción de colágeno soluble y la expresión de CHOP.....	43
Figura 13	Modelo propuesto del efecto citoprotector de TGFβ ₁ sobre la apoptosis inducida por Tn.....	52

ABREVIATURAS

ATF4	: Factor activador de la transcripción 4
ATF6	: Factor activador de la transcripción 6
BiP	: Proteína de unión a inmunoglobulina
BSA	: Albúmina de suero de bovino
CHOP	: Factor de transcripción homólogo a la proteína C/EBP
csp	: cantidad suficiente para
DMSO	: Dimetil sulfóxido
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético
eIF2 α	: Factor eucariótico de iniciación 2
ERO1 α	: Proteína oxidoreductin 1 del retículo endoplasmático
FBS	: Suero fetal de bovino
FCNR	: Fibroblastos cardíacos neonatos de rata
Fig.	: Figura
GADD34	: Proteína inducible por daño al DNA y por detención del crecimiento
Grp94	: Proteína regulada por glucosa 94
h	: Hora
HEPES	: Acido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfónico
HSP	: Proteína de choque térmico
IRE1	: proteína reclutadora de inositol 1
JNK	: Quinasa N-terminal de c-Jun
kDa	: Kilo Dalton
LTBP	: Proteína de unión latente al factor de crecimiento transformante β
MAPK	: Proteína quinasa activada por mitógenos
MEC	: Matriz extracelular
mL	: Mililitro
NaCl	: Cloruro de Sodio
Na ₃ VO ₄	: Ortovanadato de sodio
-P	: Fosforilado
PD	: Proteína disulfuro isomerasa
PERK	: Quinasa del retículo endoplasmático semejante a PKR/quinasa pancreática eIF2 α
PBS	: Tampón fosfato salino
PMSF	: Fenilmetilsulfonilfluoruro
p/v	: Porcentaje peso volumen
RE	: Retículo endoplasmático
rpm	: Revoluciones por minuto
SD	: Desviación estándar
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	: Gel de poliacrilamida denaturante
TRAF2	: Factor 2 asociado al receptor de TNF
TBS	: Tampón tris salino
TGF β ₁	: Factor de crecimiento transformante beta 1
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina
Tn	: Tunicamicina
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminoetano
μ g	: Microgramo
μ l	: Microlitro
vs	: Versus
XBP-1	: Proteína de unión a X-box tipo 1

Resumen

En el corazón, los fibroblastos, las células más abundantes, tienen funciones estructurales, actúan como sensores de los cambios del entorno, reaccionan frente a estímulos externos secretando factores de crecimiento, tienen una alta capacidad proliferativa y de secreción de proteínas de matriz extracelular.

El retículo endoplasmático (RE) es el responsable de la síntesis y correcto plegamiento de las proteínas, pero cuando por diferentes estímulos se ve alterado el correcto proceso de plegamiento se produce lo que se conoce como estrés de retículo endoplasmático. La acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE contribuye al desarrollo de un gran número de enfermedades neurodegenerativas, inmunes, endocrinas y cardiovasculares. En el RE existe toda una maquinaria traduccional que mantiene un correcto flujo de la información para el correcto plegamiento proteico, entre las que destacan los sensores de estrés de RE como PERK, IRE, ATF6, las chaperonas BiP y PDI y la proteína CHOP que funciona como un inductor de apoptosis.

Este es el primer estudio que considera evaluar el efecto del estrés de RE sobre la viabilidad celular y la secreción de proteínas de la MEC en fibroblastos cardiacos de ratas neonatas y para ello utilizamos Tunicamicina (Tn), un antibiótico que induce estrés de RE.

Nuestros resultados mostraron que los fibroblastos cardiacos presentan una alta sensibilidad a la apoptosis inducida por Tn, junto con un cambio en la expresión de las proteínas marcadoras de estrés de RE. Además de lo anterior, nuestros resultados mostraron que el pre-tratamiento con $TGF\beta_1$ (un agente pro-fibrótico de marcada acción sobre fibroblastos cardiacos) fue capaz de prevenir la muerte por apoptosis inducida por Tn en los fibroblastos cardiacos, a través de un mecanismo de adaptación al estrés de RE, modificando los niveles de expresión de las proteínas marcadoras de estrés de RE. Sin embargo, $TGF\beta_1$ no fue capaz de revertir la disminución en la secreción de colágeno inducida por efecto de Tn. En conclusión, $TGF\beta_1$ protege de la apoptosis inducida por Tn, abriendo perspectivas como un mecanismo de prevención de patologías en las que participa el estrés de RE.

Summary

TGF β 1 protects neonat rat cardiac fibroblasts death induced stress endoplasmic reticulum

In the heart, fibroblasts, the cells more abundant, have structural features, act as sensors of the changing environment, react to external stimuli secreting growth factors, have a high proliferative capacity and secretion of extracellular matrix proteins.

The endoplasmic reticulum (ER) is responsible for the synthesis and proper folding of proteins, but when a stimulus alters the proper folding process occurs endoplasmic reticulum stress. The accumulation of bad folded proteins into the ER lumen contributes to the development of a large number of neurodegenerative diseases, immune, endocrine and cardiovascular disorders. In ER there is a whole translational machinery that maintains the proper flow of information to the proper protein folding, including ER stress sensors as PERK, IRE1 α , ATF6, proteins like BiP and PDI and the protein CHOP that works as an inducer of apoptosis.

This is the first study that considers assess the effect of ER stress on the feasibility of cell and secretion of the MEC proteins in neonate rat cardiac fibroblasts and for that we use Tunicamicina (Tn), an antibiotic that induces stress of ER.

Our results showed that cardiac fibroblasts have a high sensitivity to apoptosis induced by Tn, along with a change in the expression of the protein marker of stress ER. In addition, our results showed that pre-treatment with TGF β 1 (an agent with marked pro-fibrotic action on cardiac fibroblasts) was able to prevent death by apoptosis induced by Tn in cardiac fibroblasts, through a mechanism of adaptation to ER stress, by changing levels of expression of the protein marker of stress RE. However, TGF β 1 was not able to reverse the decline in the secretion of collagen induced by effect of Tn. In conclusion, TGF- β 1 protects apoptosis induced Tn, opening prospects as a mechanism for the prevention of diseases in which participates ER stress.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

Tanto en Chile como en el resto del mundo, la mortalidad debido a patologías cardiovasculares corresponde aproximadamente al 30% del total de los decesos⁽¹⁾ y se espera que para el año 2020 este tipo de patologías sean causantes del 73% de las mortalidades y del 60% de la morbilidad⁽²⁾, por lo que se hace muy necesario conocer sus causas tanto a nivel clínico como a nivel molecular.

1.2 Corazón

Por ser el órgano principal del sistema cardiovascular, la mayoría de las patologías que afectan este sistema se concentran en el corazón. Celularmente, está compuesto por cardiomiocitos, que representan el 30% en número y el 70% en peso del total, y por células no musculares como células endoteliales, mastocitos, células inmunes, células del músculo liso vascular y fibroblastos, siendo estos últimos los más abundantes ya que corresponden aproximadamente al 66% en número y al 30% en peso del total celular⁽³⁾.

1.3 Fibroblastos cardiacos

Los fibroblastos, no sólo tienen funciones estructurales y de secreción de proteínas de la matriz extracelular (MEC) como se pensaba antaño, sino que además son capaces de actuar como sensores de los cambios del entorno y reaccionar frente a estímulos externos, tanto mecánicos como químicos, produciendo citoquinas de acción autocrina y paracrina^(4,5), gracias a las cuales pueden migrar, proliferar y diferenciarse a un fenotipo mucho más activo. En condiciones fisiológicamente normales, el fibroblasto tiene como principal función la secreción de proteínas de la MEC, principalmente colágeno y fibronectina para así crear la red que sustenta a los cardiomiocitos, pero en estados patológicos participan de forma muy activa en el proceso de cicatrización^(3,6). Cabe mencionar también, la interacción que existe entre los cardiomiocitos y los fibroblastos ya que los primeros son capaces de liberar factores que inducen la proliferación y liberación de colágeno por parte de los fibroblastos y estos, a su vez, son capaces de liberar angiotensina-II y endotelina que actúan en forma paracrina sobre los cardiomiocitos induciendo la hipertrofia de estos⁽³⁾. Por último, es importante mencionar una característica muy particular de los fibroblastos cardiacos, su capacidad de diferenciarse a

un fenotipo mucho más activo denominado miofibroblasto. Este fenotipo se produce por la acción autocrina o paracrina de mediadores tales como el factor de crecimiento transformante subtipo beta 1 ($TGF\beta_1$), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento análogo a la insulina tipo II (IGF-II) y la interleuquina-4 (IL-4)⁽⁷⁾, que son liberados en condiciones patológicas como un infarto cardiaco o cuando hay una sobrecarga de volumen, y que estimulan la proliferación y diferenciación de los fibroblastos cardiacos⁽⁷⁾.

1.4 Estrés de retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático (ER), es el responsable de la síntesis y correcto plegamiento de las proteínas, por lo que tan sólo el 5% del total de proteínas dentro del citoplasma corresponde a proteínas mal plegadas y no plegadas. Dentro del lumen del RE existen chaperonas residentes que junto con toda una maquinaria mantienen un correcto flujo en el plegamiento proteico, pero cuando por diferentes razones como privación de nutrientes, anoxia e isquemia, infección por virus, deficiencias de calcio, diferenciación celular, inhibición de la bomba de Ca-ATPasa (Tapsigargina), inhibición de la N-glicosilación (Tunicamicina o Tn), etc.⁽⁸⁾, se ve alterado el correcto proceso de plegamiento se produce lo que se conoce como **estrés de retículo endoplasmático** que no es más que un desbalance entre la carga de proteínas no plegadas que entran al RE y la capacidad de la maquinaria celular para manejar esta carga. La respuesta celular a este fenómeno se denomina respuesta a proteínas mal plegadas (del inglés unfolded protein response: **UPR**), cuya función es transmitir la información obtenida a través de los sensores de estrés al núcleo para producir una respuesta que se puede dividir en tres objetivos, disminuir la carga proteica que entra al retículo, aumentar la capacidad del retículo para manejar las proteínas mal plegadas y por último si la homeostasis no puede ser restablecida, activar la maquinaria de muerte^(9,10,11,12,13), aunque los tres fenómenos son activados al mismo tiempo⁽¹³⁾.

1.4.1 Sensores de estrés

Los sensores de estrés de retículo son bastante similares en las células eucariontes y están compuestos por tres proteínas transmembrana del retículo, que poseen su extremo amino terminal en el lumen del retículo, y su extremo carboxilo terminal hacia el citoplasma. Las tres proteínas que han sido identificadas son IRE-1 (inositol requiring protein-1), ATF6 (activating transcription factor-6) y PERK (protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase)^(12, 13, 14,15).

IRE-1 posee dos actividades diferentes en sus dominios luminales y citosólicos. Con su porción luminal censa el ambiente de proteínas plegadas mientras que en su porción citosólica contiene un dominio Ser/Thr quinasa. Cuando aumenta la cantidad de proteínas mal plegadas, IRE1 se activa produciéndose su dimerización, lo que lleva a la fosforilación de los dominios quinasas yuxtapuestos gracias a la actividad de su dominio citosólico cuyo único sustrato conocido es la misma proteína. La activación puede ocurrir por la unión directa de las proteínas mal plegadas a la zona luminal de IRE1 o por la liberación desde esta zona de la chaperona residente del retículo BiP (GRP78) que reprime a IRE1, o por ambos efectos al mismo tiempo. La transfosforilación que ocurre después de la dimerización, activa la función endoribonucleasa de este sensor, para que se produzca el corte del único sustrato que se conoce, el mRNA que codifica para el factor XBP-1. IRE1 corta 2 veces este mRNA, quitando un trozo intermedio, lo que lleva a un cambio en el marco de lectura para que se produzca una proteína más estable de 41 kDa denominada XBP-1s, que es un potente activador de los genes de la UPR y que pertenece a la familia de los factores de transcripción bZIP. Por otro lado, el mRNA que no ha sido cortado, codifica una proteína lábil (XBP-1u), pero que tiene por función reprimir la expresión de los genes involucrados en la UPR^(13, 14, 16,17). XBP-1s heterodimeriza con la proteína NF-Y y se une a lo menos a 2 zonas regulatorias en los promotores de los genes de la UPR, siendo las principales zonas de unión la zona ERSE (ER stress enhancer) y la zona UPRE (unfolded protein response element)^(11, 14). Principalmente XBP-1 produce la transcripción de genes que están involucrados con su autorregulación, con la diferenciación y el metabolismo, con la síntesis de proteínas chaperonas como BiP, GRP94, PDI, etc , y con la expresión de genes del sistema de degradación asociada al retículo (ERAD). Junto con lo anterior, el dominio citosólico activado de IRE1, interactúa con la proteína adaptadora TRAF2 que producirá la señalización de una serie de quinasa

río abajo que llevarán a la activación de NF- κ B y JNK, causando la expresión de genes asociados con respuestas de alarma e incluso de muerte^(13,14,18).

PERK, el segundo sensor de estrés de RE, es muy similar a IRE-1 ya que con su extremo amino terminal también puede censar los cambios en el ambiente proteico y, además, se activa de la misma forma. Una vez que PERK es activada también homodimeriza y se autofosforila produciéndose la activación de su dominio citoplasmático que tiene actividad quinasa y que tiene como sustrato a la subunidad α del factor de iniciación de la traducción (eIF2 α), fosforilándolo en la serina 51. Al producirse la fosforilación de eIF2 α se inhibe al factor intercambiador de nucleótidos de guanina eIF2B ya que este no puede retornar a su forma activa que es capaz de unir GTP y, bajos niveles de eIF2B llevan a un bajo nivel de la traducción por lo que se produce una disminución en la síntesis proteica. Por otro lado, la fosforilación de eIF2 α lleva a un aumento en la traducción del factor de transcripción ATF4, que es capaz de inducir la expresión de genes relacionados con la privación de aminoácidos, con la resistencia al estrés oxidativo y junto con esto induce la expresión de chaperonas de la familia GRP, como BiP (GRP78), al heterodimerizar con XBP-1, y la expresión del factor de transcripción CHOP que a su vez induce la traducción de ERO1 α , GADD34 y de proteínas que llevarán a la muerte celular. GADD34 es la subunidad regulatoria de la fosfatasa PP1 que tiene por función defosforilar a eIF2 α y así terminar la señalización de la vía PERK; en este proceso también interviene una fosfatasa constitutiva (CReP) que asiste a GADD34 en la defosforilación de eIF2 α ^(13, 16, 17, 18,19)

El último sensor de estrés de retículo es la proteína transmembrana ATF6. Este sensor es sintetizado como un precursor inactivo que se encuentra anclado al retículo a través de su segmento transmembrana y, al igual que los otros dos sensores, tiene una porción luminal que censa el estrés por la liberación desde esa zona de la proteína BiP. Una vez que esto último sucede, ATF6 es transportada hacia el aparato de golgi donde sufre la acción de la proteasa S1P (proteasa del sitio 1) y luego de la endoproteasa S2P (proteasa del sitio 2) para producir el fragmento que se unirá al DNA, denominado ATF6f, y que producirá el aumento en la expresión de ciertos genes, entre ellos los que codifican para el mRNA de XBP-1^(13, 14,19).

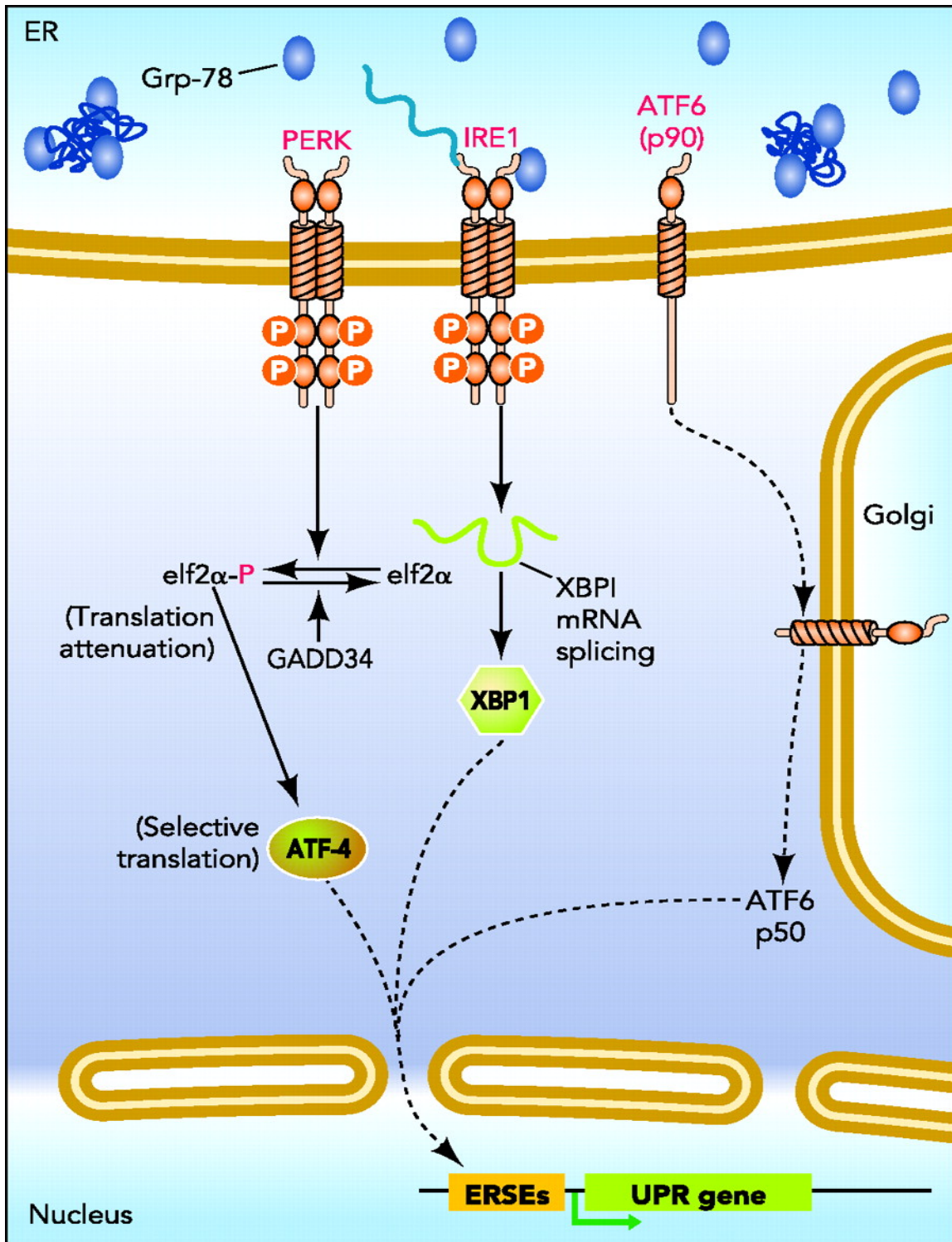


Fig. 1. Vía de señalización de la UPR en células de mamíferos. Tomado de Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology* . 2007; 22:193-201.

1.4.2 Estrés de retículo endoplasmático en corazón

La acumulación de proteínas mal plegadas contribuye en un gran número de enfermedades neurodegenerativas, inmunes y endocrinas, por lo que resulta aparente que también contribuya en las enfermedades cardíacas y vasculares, ya que son los cambios en el ambiente del RE, como la variaciones en los niveles de calcio, glicosilación de proteínas, variaciones en el balance redox, etc, los que producen la falla en el correcto plegamiento proteico⁽²⁰⁾.

El corazón está constantemente bajo estrés metabólico, térmico y mecánico en condiciones fisiológicas y este estrés puede incrementarse debido a un cambio en las condiciones del ambiente o por algún daño patológico. Las células cardíacas y entre ellas los fibroblastos están constantemente desafiados a plegar correcta y eficazmente los polipéptidos nacientes (principalmente colágeno y otras proteínas de la MEC) para poder secretarlos al espacio intersticial.

Los estudios de estrés de RE en corazón se han llevado a cabo sólo en cardiomiocitos, donde se puede mejorar la supervivencia de estos. Incrementos en BiP han sido encontrados en cardiomiocitos H9c2⁽²¹⁾ y en cardiomiocitos neonatos de corazones de ratones hipóxicos e isquémicos⁽²²⁾. La isquemia también es capaz de inducir los tres brazos de la UPR (PERK, IRE1 y ATF6) y sus respectivos blancos río abajo incluyendo la inducción de CHOP y la activación de la caspasa-12. Junto con esto se ha demostrado que la activación de la UPR durante la isquemia en cardiomiocitos está implicada en la aparición de la muerte celular isquémica⁽²³⁾. Por otro lado, Thuerlauf et al., encontraron que los corazones de ratones sometidos a infarto in vivo exhiben un aumento en la expresión BiP en los cardiomiocitos cercanos a la zona infartada, pero no en las células sanas que se encuentran distales al infarto⁽²²⁾. También demostraron que la hipoxia induce BiP en cardiomiocitos ventriculares de ratas neonatas y en cardiomiocitos adultos aislados de corazones de ratones. Estos resultados indican que la hipoxia activa la UPR en cardiomiocitos y que las proteínas inducidas por XBP-1 pueden contribuir a proteger al miocardio durante el estrés hipóxico.

Por último, en los corazones humanos postmortem e *in vitro* e *in vivo* en modelos de hipoxia e isquemia, PDI fue identificado como un factor clave en la vía de supervivencia⁽²⁴⁾. PDI actúa tanto en el estrés hipóxico como en el estrés oxidativo, para

contribuir en el correcto plegamiento proteico en cooperación con ERO-1. Estos datos sugieren un efecto protector de PDI en los corazones humanos infartados mediado por una reducción de la tasa de apoptosis y por una prevención en la remodelación cardiaca, en la que el estrés de RE fue activado para contrarrestar los daños isquémicos en el corazón.

1.4.3 Estrés de retículo endoplasmático y proteínas de la MEC

En el corazón una red de colágeno fibrilar preserva la arquitectura del tejido y la geometría de la cámara. El recambio del colágeno es proporcionado normalmente por fibroblastos situados en los espacios intersticiales y perivasculares. La síntesis de colágeno y su degradación coexisten en el corazón mediante un equilibrio que determina la concentración de colágeno en la matriz extracelular. La síntesis de colágeno implica la participación de las chaperonas del RE HSP47, BiP y PDI^(25, 26,27) entre otras, siendo estas dos últimas, como ya se mencionó, proteínas que aumentan su expresión en respuesta al estrés de RE. Lo anterior indica que el fibroblasto cardiaco tiene una maquinaria suficiente para responder a una elevada sobrecarga sintética de proteínas, por lo tanto, un prolongado o persistente estrés de RE, podría alterar el riguroso control de calidad en la síntesis de proteínas, llevando a una disminución en la síntesis y secreción de colágeno, lo que conllevaría a una alteración de los procesos de cicatrización, o por el contrario, una elevada resistencia al estrés de RE podría llevar a una acumulación adversa de colágeno, debido a una síntesis aumentada o a una degradación inadecuada que conllevaría al desarrollo de fibrosis cardiaca.

1.4.4 Estrés de retículo endoplasmático y viabilidad celular

Los fibroblastos cardiacos tienen una alta capacidad proliferativa, en respuesta a una amplia variedad de estímulos tales como péptidos, hormonas, factores de crecimiento, etc⁽²⁸⁾. Por otro lado, también se han descrito estímulos que inducen muerte por apoptosis y necrosis en fibroblastos cardiacos⁽²⁹⁾. La apoptosis celular se puede clasificar según su vía de ejecución, en dos subtipos, la vía extrínseca y la vía intrínseca, siendo esta última la vía que se ha relacionado directamente con la muerte por estrés de RE. Las tres vías de la UPR contribuyen a inducir apoptosis cuando los cambios generados en la célula son insuficientes para revertir el estrés de RE. El factor de transcripción CHOP, la quinasa JNK y las caspasas han sido involucradas en la activación de la apoptosis en respuesta al

estrés de RE, ya que CHOP disminuye la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2⁽³⁰⁾ y aumenta la expresión de ERO-1 α , lo que genera un ambiente hiperoxidante en el RE produciendo un incremento en la formación de proteínas mal plegadas^(30, 31), junto con producir una disminución en la fosforilación de eIF2 α producida por el aumento en la expresión de GADD34, lo que lleva a la recuperación de la traducción^(13, 17, 30) y por lo tanto a una sobrecarga en la síntesis proteica. Por otro lado, IRE1 α dimerizado y fosforilado recluta a TRAF2 formando un complejo que activa a la quinasa ASK1 lo que lleva a la activación de la vía de JNK que conducirá a la muerte de la célula⁽³²⁾. Además de esto el reclutamiento de TRAF2 por parte de IRE1 α produce la disociación de este de la procaspasa 12 lo que llevaría a la activación de esta última⁽³⁰⁾ junto con la acción ejercida por la caspasa-7, que se transloca desde el citosol a la membrana del RE cuando hay estrés de RE, para interactuar con la caspasa-12 y activarla⁽³³⁾. Junto con lo anterior, se sabe que las calpainas, una familia de cistein proteasas dependientes de calcio, juegan un rol importante en la activación de la caspasa-12 durante el estrés de RE⁽³⁴⁾

1.5 Factor de crecimiento transformante beta (TGF β)

El factor de crecimiento transformante beta 1 o TGF β 1 es un polipéptido perteneciente a la superfamilia de las citoquinas de crecimiento transformante de tipo beta, que lleva a cabo muchas funciones celulares tales como el control del crecimiento, la diferenciación y proliferación celular, y la apoptosis. Existen tres isoformas estructurales de TGF β (TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3) codificadas por tres genes distintos, donde TGF β 1 es el más prevalente en mamíferos. Las tres isoformas de esta citoquina son producidas como péptidos inactivos ya que están unidos a la proteína de unión latente a TGF β o LTBP y son activados por una división proteolítica por ejemplo por plasmina o trombospodin-1. Toda la familia de citoquinas TGF β se une a diferentes isoformas de un receptor heterodimérico formado por el receptor tipo I, un receptor con actividad serina/treonina quinasa, y por el receptor tipo II que posee 5 isoformas, resultando en la fosforilación del receptor que activa Smads^(35, 36). El receptor tipo I fosforila a las proteínas Smad2 y Smad3 gracias a su actividad quinasa, con lo que se produce la activación de estas y pueden unirse a Smad4 para translocarse al núcleo y activar la transcripción de ciertos genes. El complejo Smad3/Smad4 se une directamente al promotor de consenso para Smad que es la secuencia CAGAC, por otro lado Smad2 requiere de una proteína de unión al DNA de la familia Fast (Fast-1) para poder activar la transcripción⁽³⁵⁾. Por otra parte el receptor tipo II produce la activación de un gran número de señales que incluyen p38 MAPK, Erk, JNK y

TAK1⁽³⁶⁾. La respuesta transcripcional a TGF β generalmente requiere de los receptores tipo I y tipo II, junto con las proteínas Smad, pero la especificidad de la respuesta depende de a) las vías de señalización auxiliares inducidas por TGF β y b) el nivel basal de los factores de transcripción que actúan junto a las proteínas Smad⁽³⁵⁾.

TGF β es una pieza central en la respuesta fibrogénica ya que es el mediador esencial de los efectos pro-fibróticos de angiotensina II en el corazón⁽³⁵⁾ debido a que esta hormona produce un aumento en la cantidad de TGF β 1⁽³⁶⁾ en los fibroblastos cardiacos aumentando la síntesis y secreción de colágeno⁽³⁵⁾, razón por la cual es importante dilucidar si TGF β 1 es capaz de producir estrés de RE en los fibroblastos cardiacos y si este fenómeno es capaz de llevar a la muerte de los fibroblastos o adaptarlos para sobrevivir ante una elevada síntesis proteica.

1.5.1 TGF β ₁ y ER stress

Hasta el momento, no hay estudios que relacionen directamente TGF β 1 con el estrés de RE. Se sabe que, IGF-1 (otro factor de crecimiento que induce la síntesis de colágeno en fibroblastos cardiacos⁽³⁷⁾), induce mecanismos de adaptación al estrés de RE evitando la apoptosis⁽³⁸⁾. Estos resultados sugieren que los factores de crecimiento que inducen la expresión de chaperonas de RE, podrían tener un efecto mitigante sobre la apoptosis inducida por el estrés de RE, de hecho, TGF β 1 induce la expresión de HSP47⁽³⁹⁾. Por otro lado, se ha demostrado que en ratones deficientes de CHOP, la expresión del mRNA y las proteínas inducidas por TGF β 1 se encuentran disminuidas en un modelo de fibrosis hepática⁽⁴⁰⁾, sugiriendo que en este modelo el proceso inflamatorio mediado por TGF β 1 es dependiente del estrés de RE. Por último, TGF β 1 ha demostrado tener actividad pro y antiapoptótica^(41, 42, 43). Estos resultados sugieren que las acciones de TGF β 1 dependen del estímulo y tipo de células.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se plantearon una serie de interrogantes a resolver:

- a) ¿Cuál será el efecto de Tn sobre la viabilidad de fibroblasto cardiacos neonatos de rata?
- b) ¿Qué efectos tendrá Tn sobre las proteínas sensoras de estrés de retículo o de las proteínas sensoras de la UPR?
- c) ¿Qué efecto tendrá TGF-beta1 sobre los cambios en la viabilidad celular, proteínas sensoras de estrés de RE y proteínas sensoras de UPR modificados por Tn?
- d) ¿Qué efecto tendrá Tn sobre la secreción de colágeno, y es capaz el $TGF\beta_1$ de prevenir esos cambios?

A fin de responder a esas interrogantes se ha planteado la siguiente hipótesis:

2. HIPÓTESIS

TGF β_1 protege de la muerte celular inducida por tunicamicina a través de un mecanismo de adaptación al estrés de RE.

3. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que tunicamicina induce, en los fibroblastos cardiacos de ratas neonatas, estrés de RE y que el TGF β_1 los protege de la muerte a través de un mecanismo de adaptación al estrés de RE.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Demostrar que tunicamicina induce estrés de RE en los FCNR
2. Demostrar que tunicamicina induce muerte celular de los FCNR
3. Demostrar que TGF β_1 disminuye la pérdida de la viabilidad de los FCNR estimulados con Tunicamicina
4. Demostrar que TGF β_1 gatilla mecanismos de adaptación al estrés de RE

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): azul de tripán. En Gibco BRL (Carlsbad, California EEUU) se adquirieron tripsina-EDTA, estándares de pesos moleculares de proteínas pre-teñidas, suero fetal de bovino (FBS). Los compuestos inorgánicos y orgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en MERCK (Darmstadt, Alemania). El reactivo quimioluminiscente para western blot (Western Lightning) fue adquirido en PerKinElmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA, EEUU). El material de plástico estéril para la obtención y cultivo de fibroblastos cardíacos se obtuvieron en Falcon. TGF- β_1 fue adquirido en Chemicon. Los anticuerpos secundarios anti-IgG ratón y anti-IgG conejo, conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU). Los anticuerpos primarios anti-BiP, anti-PDI, anti-eIF2 α fosforilado se obtuvieron de Cell Signaling Technology (Boston, MA, EEUU), el anticuerpo anti-CHOP fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, EEUU). El anticuerpo anti- β -tubulina, se obtuvo de SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, EEUU). La tunicamicina (Tn) se obtuvo de BIOMOL International Inc. (Plymouth Meeting, PA, EEUU)

5.2 Modelo animal

Ratas Sprague-Dawley neonatas (2 a 3 días de edad), provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, en cumplimiento de todas las normas éticas referidas a la utilización de animales.

5.3 Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos ventriculares de ratas neonatas

Se utilizó el procedimiento descrito por Foncea y cols en 1997 (44). Las ratas se decapitaron e inmediatamente se les removió el corazón bajo condiciones de asepsia, se retiraron las aurículas y los ventrículos se cortaron en pequeños pedazos para facilitar las sucesivas digestiones posteriores con pancreatina y colagenasa II. El producto de las digestiones se sometió a un preplaqueo por 2 h a 37°C en medio de cultivo conteniendo 5% FBS y 10% FCS en frascos para cultivo de plástico. Por adhesión diferencial al plástico se separaron fibroblastos de cardiomiocitos. Luego de las 2 h, se cambió el medio por DMEM-F12 + 10% FBS, los fibroblastos se dejaron proliferar hasta confluencia y los cambios de pasaje se realizaron mediante tripsinización (hasta pasaje 2 como máximo).

Posteriormente las células fueron mantenidas en un medio DMEM-F12 + 2,5% FBS por a lo menos 24 horas antes de ser estimuladas.

5.4 Preparación de solución de tunicamicina

El reactivo tunicamicina fue disuelto en 1 mL de DMSO para generar una solución madre de la cual se hicieron diferentes diluciones para llegar a la concentración deseada de estimulación.

5.5 Preparación de extractos celulares totales

Se prepararon extractos de proteínas totales para evaluar la expresión de las proteínas BiP, PDI, eIF2 α -P, CHOP y β -tubulina. Las células se sembraron en placas de 100 mm a una densidad de 2×10^4 cel/cm². Una vez estimuladas y transcurrido en tiempo del ensayo, las células se lavaron tres veces con PBS 1X frío y luego se lisaron con 100 μ L de tampón de lisis HEPES \pm Triton-X100 buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton-X100, 10% glicerol, 1 mM EDTA, 10 mM difosfato de sodio, 100 mM NaF, 17,5 mM B-glicerofosfato, 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, leupeptina 2 μ g/mL; 10mM aprotinina; 1 mM PMSF y 100 μ M Na₃VO₄). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay). Las proteínas se desnaturaron en tampón SDS-PAGE 4X (glicerol 20 mL, 2-mercaptoetanol 10 mL, SDS 5 g, Tris base 1,51 g, Azul de bromofenol 0,01 g, Agua csp. 100 mL, ajustar a pH 6.8 con HCL), y se almacenaron a -20°C.

5.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida

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

5.7 Electrotransferencia de proteínas

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) a 350 Miliamperes durante 90 min en tampón de transferencia.

5.8 Inmunowestern blot

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

- BiP, PDI, en tampón de incubación BSA (TBS 1X; Tween-20 0,1%, BSA 5% p/v) a una dilución 1:1000, toda la noche a 4°C con agitación suave.
- eIF2 α -P, en tampón de incubación leche (TBS 1X; Tween-20 0,1%, BSA 5% p/v) a una dilución 1:500, toda la noche a 4°C con agitación suave.
- CHOP, eIF2 α , en tampón de incubación leche PBS (PBS 1X; leche descremada 5% p/v) a una dilución 1:2000 toda la noche a 4°C con agitación suave.
- Tubulina (como control de carga), en tampón de incubación con leche descremada a una dilución 1:5000 por dos horas a temperatura ambiente con agitación suave.

Posterior a la incubación, las membranas se lavaron 3 veces por 5 min en TBS 1X / Tween-20 al 0,1%, e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa, a un título de 1:5000 para tubulina; anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa a un título de 1:1000 toda la noche a 4°C para BiP y PDI; 1:2000 para eIF2 α , eIF2 α -P y 1:7000 para CHOP, todos en tampón de incubación con leche descremada. Para la detección de las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en solución de ECL (enhanced chemiluminescence) y se expusieron a la película de fotografía Kodak-Biomax. Las películas se digitalizaron y las imágenes fueron sometidas a densitometría con ayuda de los programas computacionales Photoshop 6.0 y USI. Después de realizar los ensayos de inmunowestern blot, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 60 min en una solución de rojo ponceau (rojo ponceau 2%, TCA 30%, ácido sulfosalicílico 30%) para desprender los anticuerpos, posteriormente se lavaron en TBS 1X / Tween-20 al 0,1% por tres veces. Luego de este tratamiento, las membranas pudieron ser reutilizadas para nuevos ensayos de western blot.

5.9 Viabilidad celular

Se realizó a través de los siguientes métodos:

5.9.1 Viabilidad Celular por citometría de flujo.

- Fibroblastos se sembraron en placas 60 mm a una razón de 2×10^4 cel/cm², cultivadas en medio DMEM-F12 + 10% de FBS, que posteriormente fue reemplazado por DMEM-F12 + 2,5% de FBS. 24 horas después de esto, se aplicó la Tn y/o TGF β_1 , a los tiempos y concentraciones indicados para cada experimento. Luego las células fueron soltadas de las placas utilizando Tripsina-EDTA 1x que fue inhibida utilizando DMEF-12 10% suero, en proporción 1:1. Por otro lado el medio que contenía a las células fue recolectado, centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos y la fracción no soluble recuperada y adisionada a las células soltadas inicialmente. Luego a las células en suspensión se les proporcionó ioduro de propidio (PI) 20 μ g/ μ L. Finalmente se midió la muerte celular por citometría de flujo (FACS CANTO, Becton Dickinson).

5.9.2 Viabilidad por conteo de células.

- Fibroblastos se sembraron en placas 60 mm a una razón de 2×10^4 cel/cm², cultivadas en medio DMEM-F12 + 10% de FBS, que posteriormente fue reemplazado por DMEM-F12 + 2,5% de FBS. 24 horas después de esto, se aplicó la Tn y/o TGF β_1 , a los tiempos y concentraciones indicados para cada experimento. Luego las células fueron soltadas de las placas utilizando Tripsina-EDTA 1x que fue inhibida utilizando DMEF-12 10% suero, en proporción 1:1. Posteriormente se tomó una alícuota de 20 μ l de la suspensión de células y se le adicionaron 20 μ L de solución de azul de tripan, se homogeneizó y de esta nueva suspensión se tomaron 20 μ L que se colocaron en un cámara de Neubauer doble y se contaron las células vivas.

5.10 Cuantificación de la apoptosis celular mediante ioduro de propidio (PI)

Para cuantificar la apoptosis celular se utilizó la técnica de incorporación de ioduro de propidio. Los fibroblastos se sembraron en placas 60 mm a una razón de 2×10^4 cel/cm², cultivadas en medio DMEM-F12 + 10% de FBS, que posteriormente fue reemplazado por DMEM-F12 + 2,5% de FBS. 24 horas después de esto, se aplicó la Tn a los tiempos y concentraciones indicados para cada experimento. Las células fueron soltadas de las placas utilizando Tripsina-EDTA 1x. Por otro lado el medio que contenía a las células fue recolectado, centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos y la fracción no soluble recuperada y adicionada a las células soltadas inicialmente de las placas. El total de células obtenidas fue recolectado en metanol frío, almacenado a -20°C toda la noche, sometido a una segunda centrifugación y la fracción no soluble obtenida fue resuspendida en PBS frío conteniendo RNAsa por 2h. Luego a las células en suspensión se les proporcionó ioduro de propidio (PI) 20µg/µL un minuto antes de la medición. Finalmente se determinó la apoptosis celular por citometría de flujo (FACS CANTO, Becton Dickinson).

5.11. Determinación de colágeno soluble

Para realizar a cuantificación del colágeno soluble se utilizó el Kit "Soluble Collagen Assay" Sircol®, de la manera que se describe en el manual del fabricante.

5.12. Análisis estadístico

Los resultados mostrados corresponden al promedio \pm SD de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA y la prueba Tukey para determinar la significancia estadística de los resultados.

6. RESULTADOS

6.1 Efecto de Tn sobre la viabilidad celular

Para determinar como afecta la concentración y el tiempo de exposición a Tn a la viabilidad celular de los FCNR, estos fueron mantenidos en suero al 2,5% durante 24 horas, como se describe en materiales y métodos, antes de ser estimulados con diferentes concentraciones de Tn por 24 horas y con una concentración de 1 µg/mL por 12, 24 y 48 horas.

6.1.1 Efecto de la concentración de Tn

La viabilidad de los FCNR, se determinó por conteo celular mediante azul de tripán. En la figura 1 se observa la cuantificación de este fenómeno presentándose una disminución significativa en el número de células viables a las concentraciones de 5 y 10 µg/mL de Tn, llegando esta disminución a un 56,3% ($1,97 \times 10^5$ células) y 37,5% ($1,25 \times 10^5$ células), con respecto al control ($p < 0,01$ vs Control, $n=3$)

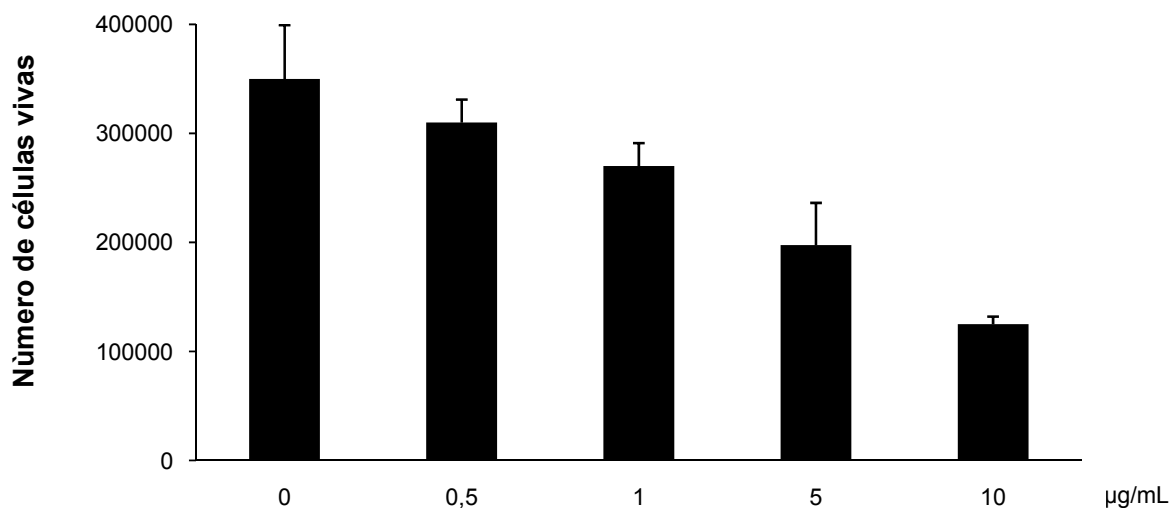


Fig. 2. Efecto de la concentración de Tn sobre la viabilidad celular. Determinación de la viabilidad de FCNR estimulados con Tn (0,5 a 10 µg/mL) por 24h, a través de conteo celular usando azul de tripán. Los resultados muestran la media \pm SD para tres experimentos independientes (** $p < 0,01$ vs Control).

6.1.2 Efecto del tiempo de exposición a Tn

En la figura 2, se observa que a mayor tiempo de exposición a Tn, el número de células vivas se ve disminuido con respecto al control, siendo la disminución notablemente significativa a las 48 horas de estímulo, ya que las células vivas disminuyen a un 51,7% ($1,48 \times 10^5$ células) con respecto al control ($p < 0,001$ vs control 48h).

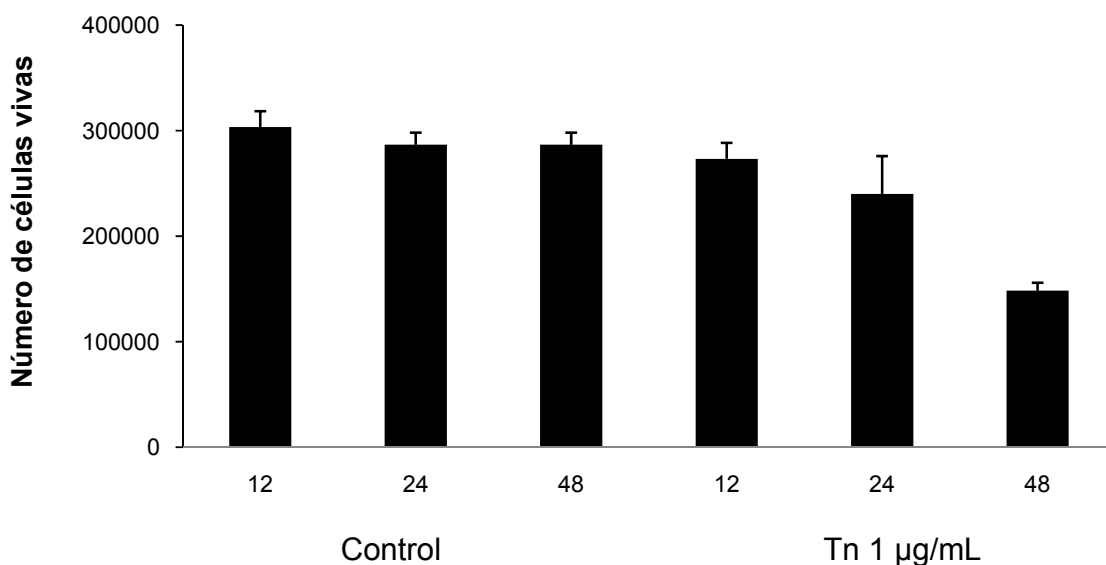
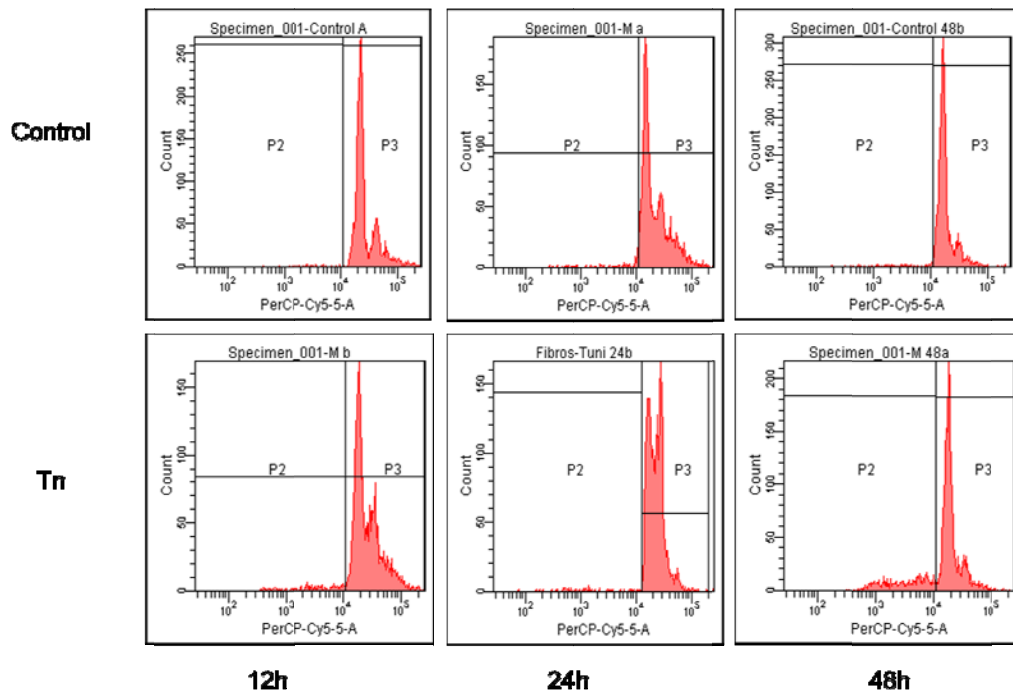


Fig. 3. Efecto de Tn en función del tiempo sobre la viabilidad celular. Determinación de la viabilidad de FCNR, estimulados con Tn 1 µg/mL hasta 48h. La viabilidad se determinó por conteo celular usando azul de tripán. Los resultados muestran la media \pm SD para tres experimentos independientes (** $p < 0,001$ vs control 48h, $n=3$).

6.1.3 Determinación de la apoptosis inducida por Tn

Luego de demostrar que Tn disminuyó la viabilidad del FCNR, se evaluó si el tipo de muerte producida por Tn era apoptosis. Para ello se utilizó la citometría de flujo ocupando como marcador apoptótico la incorporación de yoduro de propidio (PI). En los histogramas de la figura 3A se observa que a las 48 horas el porcentaje de células apoptóticas aumenta, lo que se evidencia por la ganancia de PI en la subpoblación apoptótica. El análisis gráfico (figura 3B) muestra que a sólo a las 48 horas el porcentaje de células apoptóticas ($20,6 \pm 0,98\%$) se hace estadísticamente significativo respecto al control correspondiente ($2,85 \pm 1,34\%$).

A)



B)

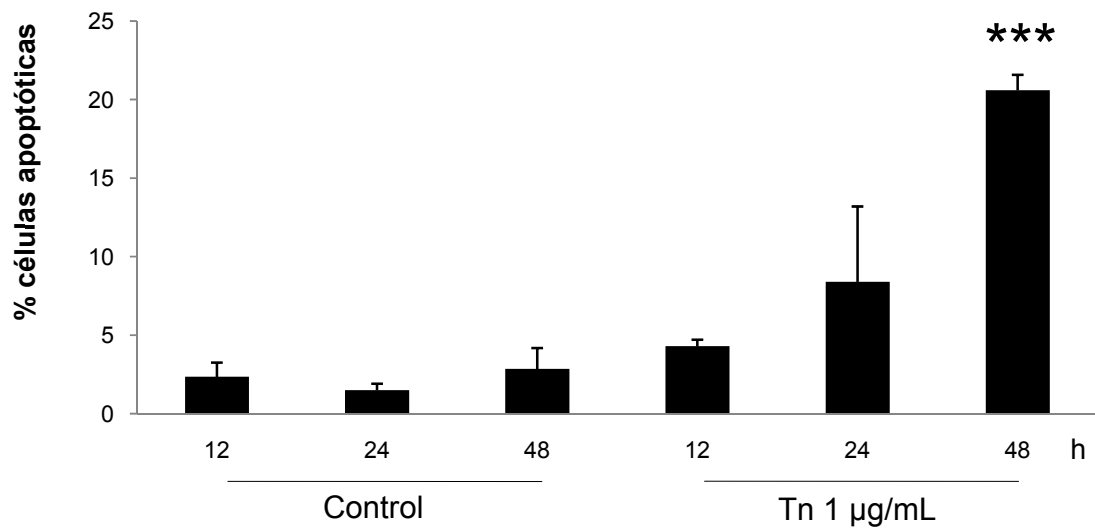


Fig. 4. Apoptosis de fibroblastos estimulados con Tn. La apoptosis de FCNR fue medida por incorporación de PI que se aprecia en el cuadrante P2. FCNR fueron estimulados con Tn 1µg/mL por 12, 24 y 48 horas. (A) histogramas obtenidos por citometría de flujo. (B) Análisis gráfico de los histogramas. Los resultados muestran la media \pm SD para tres experimentos independientes. En la figura 3B *** $p < 0.001$ vs control 48h.

6.2 Efecto de TGF β ₁ sobre la pérdida de viabilidad inducida por Tn

Para determinar como afecta la concentración y el tiempo de exposición a TGF β ₁ a los cambios en la viabilidad inducidos por Tn, los FCNR fueron mantenidos en suero al 2,5% durante 24 horas, como se describe en materiales y métodos, pre-estimulados con diferentes concentraciones de TGF β ₁ (0,5; 1; 5; 10 y 15 ng/mL) y luego estimulados con diferentes concentraciones de Tn (1 y 5 μ g/mL) por 24 y 48 horas.

6.2.1 Efecto del tiempo de exposición a Tn y TGF β ₁

Para la caracterización del efecto del tiempo de exposición sobre la viabilidad, se utilizó el conteo celular. Los FCNR fueron pre-estimulados durante una hora con TGF β ₁ 5ng/mL. Posteriormente fueron estimulados con Tn 1 μ g/mL por 24 y 48 horas. En la figura 4 se observa que TGF β ₁ per se no tiene efectos sobre la viabilidad celular y que Tn reduce el número de células vivas a ambos tiempos de estímulos. Al mismo tiempo se observa que TGF β ₁ previene la disminución de células vivas a las 24 horas, más que a las 48 horas de estímulo. Por otro lado, mediante citometría de flujo y usando como marcador de muerte la incorporación de yoduro de propidio (PI), se observa en los histogramas de la figura 5A, que los fibroblastos cardiacos neonatos que fueron pre-estimulados con TGF β ₁ presentan menos muerte celular a las 24 que a las 48 h, lo que se evidencia por la poca ganancia de PI. El análisis gráfico muestra que sólo las células que fueron pre-estimuladas con TGF β ₁ y estimuladas con Tn por 24 horas, muestran una disminución en el porcentaje de células muertas ($7,9 \pm 1,6\%$) con respecto a las células estimuladas sólo con Tn por 24 horas ($12,8 \pm 1,6\%$).

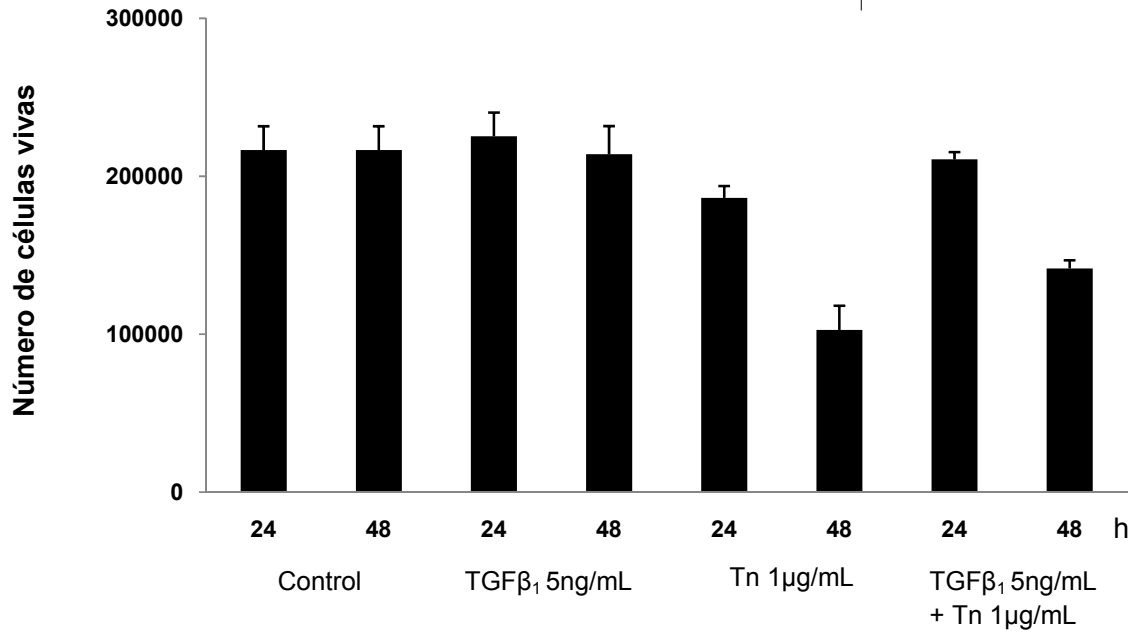
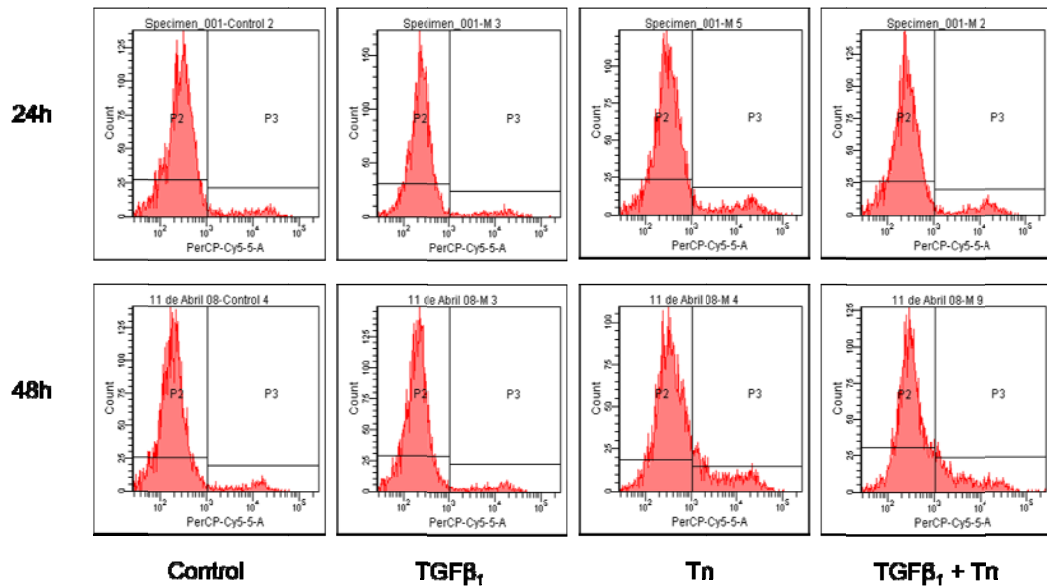


Fig. 5. Efecto de TGFβ₁ sobre la muerte celular gatillada por Tn por 24 y 48 horas. La viabilidad FCNR estimulados con TGFβ₁ 5ng/mL y Tn 1μg/mL, se determinó por conteo celular utilizando azul de tripán. Los resultados muestran la media ± SD para tres experimentos independientes (*p< 0,05 vs Tn 24h, &p<0,05 vs Tn 48h, ***p<0,001 vs control 48h, n=3).

A)



B)

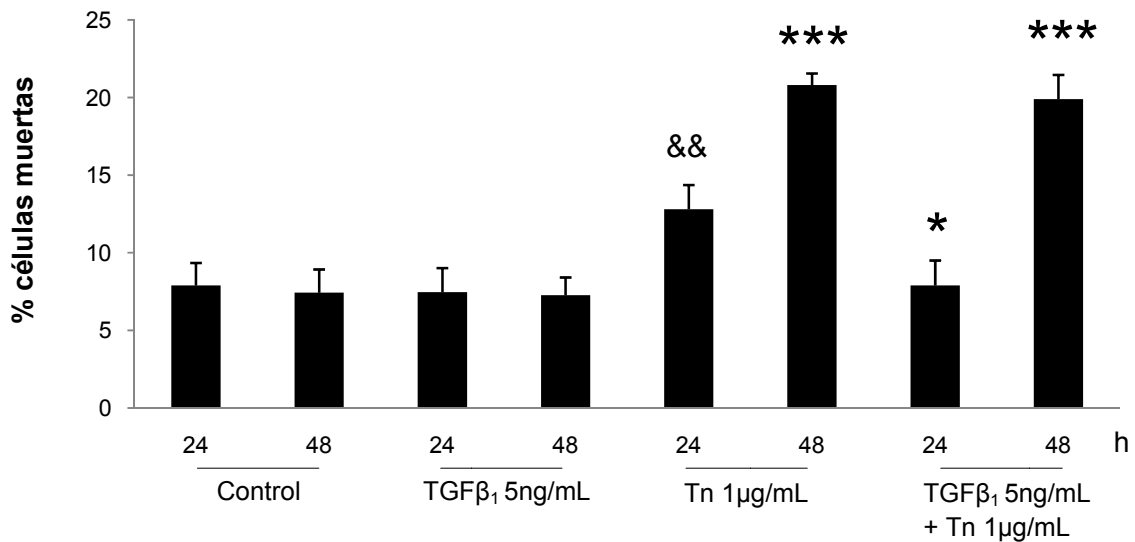


Fig. 6. Efecto de TGFβ₁ sobre la pérdida de la viabilidad gatillada por Tn. La viabilidad de FCNR estimulados con TGFβ₁ 5ng/mL y/o Tn 1μg/mL, fue medida por incorporación de PI que se aprecia en el cuadrante P3. (A) histogramas obtenidos por citometría de flujo a 24 y 48 horas de estímulo. (B) Análisis gráfico y cuantificación de estos histogramas. Los resultados muestran la media ± SD para tres experimentos independientes. En la figura 5B ***p<0,001 vs control 48h, &&p<0,01 vs control 24h y *p<0,05 vs Tn 24h.

6.2.2 Efecto de las concentraciones de Tn y TGFβ₁ sobre la viabilidad celular de FCNR

Para evaluar como afectan las diferentes concentraciones de Tn y/o TGFβ₁ la viabilidad de los FCNR, se utilizó el conteo celular mediante azul de tripán para conocer el número de células vivas después de pre-estimular 1 hora con TGFβ₁ (0,5; 1; 5; 10 y 15 ng/mL) y la posterior estimulación con Tn (1 y 5 μg/mL) durante 48 horas. En la figura 6A se observa que TGFβ₁ por si solo, a las diferentes concentraciones ensayadas, no tuvo efecto sobre la viabilidad celular. Por otro lado, una notable disminución en el número de células vivas fue observada cuando se estimula con Tn. Sin embargo, en las células estimuladas con las mayores concentraciones de TGFβ₁ (10 y 15 ng/mL) se observa una prevención en la pérdida de la viabilidad celular que es estadísticamente significativa respecto de las células estimuladas con Tn.

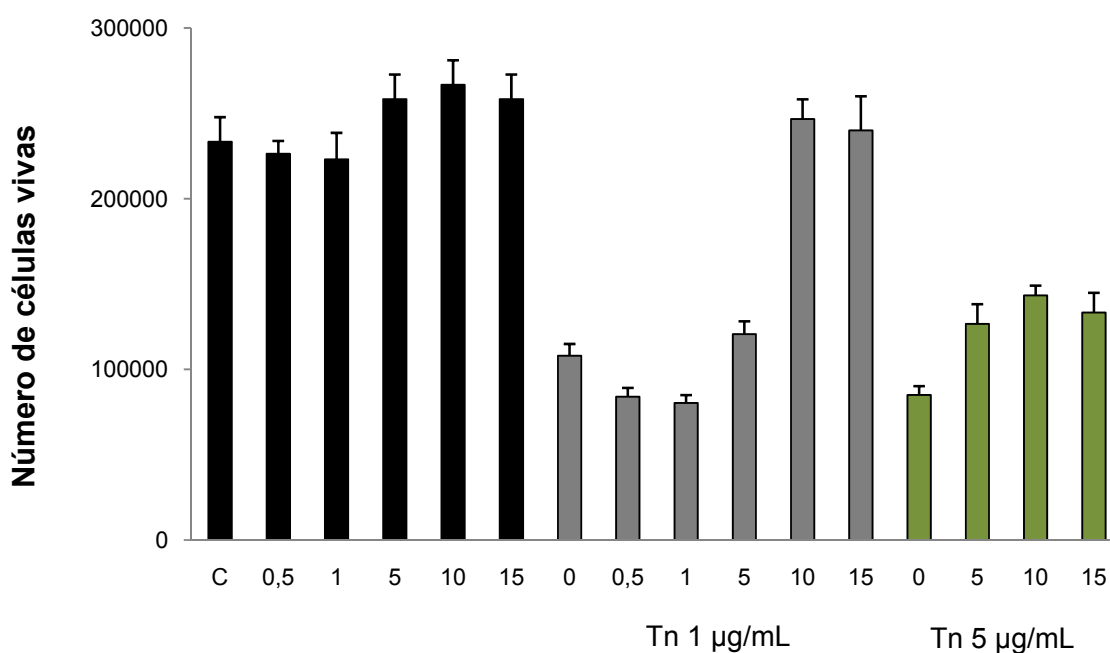


Fig. 7. Efecto de concentraciones variables de Tn en presencia de concentraciones variables de TGFβ₁, por 48 horas sobre la viabilidad celular. Determinación de la viabilidad de FCNR estimulados con TGFβ₁ y Tn, por conteo celular usando azul de tripán. Los resultados muestran la media ± SD para tres experimentos independientes (&p< 0,01 vs Tn 5μg/mL, ***p<0,001 vs Tn 1μg/mL, n=3). C representa el control.

6.3 Efecto de Tn y TGF β ₁ sobre los niveles de las proteínas marcadoras de estrés de retículo endoplasmático

Para evaluar como se modifican los niveles de ciertas proteínas marcadoras de estrés de RE, los FCNR fueron estimulados con Tn (1 μ g/mL) y/o TGF β ₁ (5ng/mL) por periodos de 1, 3, 6, 12 y 24 horas. Cuando se utilizaron ambos estímulos las células fueron pre-estimuladas con TGF β ₁ durante 1 hora. Posteriormente se recolectaron los extractos celulares y se procedió a realizar ensayos de inmuno western blot, como se describe en materiales y métodos.

6.3.1 Efecto sobre la expresión de BiP

Para determinar si Tn produce estrés de RE, se evaluó la expresión de la proteína chaperona BiP. Los FCNR fueron estimulados con Tn 1 μ g/mL, (Figura 7A) y se observó un aumento significativo en la expresión de esta proteína a partir de la hora de estímulo (1, 4 veces respecto al control $p < 0,05$) llegando a su máximo a las 12 horas (2 veces respecto al control $p < 0.001$). Al mismo tiempo se midió el cambio en la expresión de BiP al estimular los FCNR con TGF β ₁ 5ng/mL (Figura 7B). Los resultados muestran que la expresión de esta chaperona cambia significativamente, llegando a ser de 1,3 ($p < 0,05$) y 1,4 ($p < 0,01$) veces respecto al control, a las 12 y 24 horas respectivamente. Cuando los FCNR fueron estimulados con TGF β ₁ 5ng/mL y Tn 1 μ g/mL (Figura 7C), se observa un aumento significativo, en la expresión de la chaperona, de 1.3 veces respecto al control ($p < 0,05$) a la hora de estímulo y que se mantiene hasta las 12 horas de estímulo, para luego regresar al nivel basal.

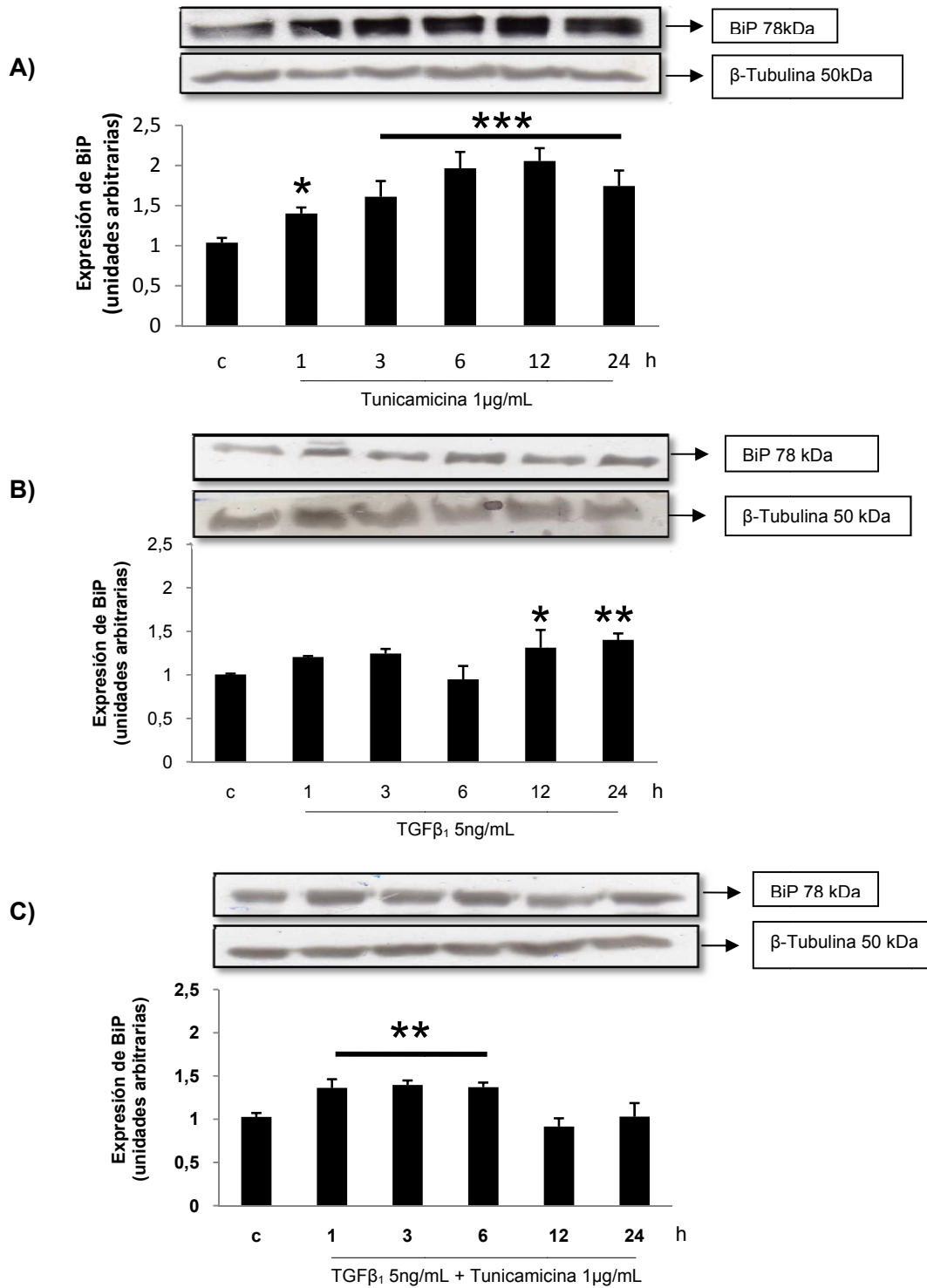


Fig. 8. Determinación de los niveles de BiP cuando los FCNR son estimulados con Tn y TGFβ₁. Inmuno western blot que muestra los cambios en la expresión de BiP. A) Muestra la expresión de BiP cuando los FCNR son estimulados con Tn 1 µg/mL (**p<0,001 y *p<0,05 versus control), B) expresión de BiP cuando las células son estimuladas con TGFβ₁ 5 ng/mL (*p<0,05 y **p<0,01 versus control) y C) expresión de BiP cuando los FCNR son pre-estimulados con TGFβ₁ durante 1h y posteriormente estimulados con Tn 1 µg/mL (**p<0,01 versus control). En la parte inferior de cada uno de los western blots se muestra su respectiva cuantificación. β-tubulina se utilizó como control de carga. Los resultados muestran la media ± SD para tres experimentos independientes.

6.3.2 Efecto sobre la expresión de PDI

Se evaluó el cambio de expresión temporal de la proteína PDI cuando los fibroblastos son estimulados con Tn 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 8A). Los resultados muestran un aumento estadísticamente significativo (1,6 veces) con respecto al control ($p < 0,001$) a partir de la hora de estímulo y que se mantiene hasta las 12 horas para luego disminuir al nivel basal. Cuando los FCNR son estimulados con $\text{TGF}\beta_1$ 5 ng/mL (Figura 8B), la expresión de PDI se ve aumentada desde la primera hora de estímulo (1,8 veces) llegando a tener su máxima expresión a las 12 horas de estímulo (2,5 veces) respecto al control ($p < 0,001$) para luego disminuir, igualando la condición lograda a la hora de estímulo. Cuando los FCNR fueron estimulados con $\text{TGF}\beta_1$ 5 ng/mL y Tn 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 8C), la expresión de la proteína PDI se ve a igualmente aumentada desde la primera hora de estímulo (1,5 veces respecto al control, $p < 0.01$), pero manteniéndose así hasta las 12 horas para luego disminuir al nivel basal a las 24 horas.

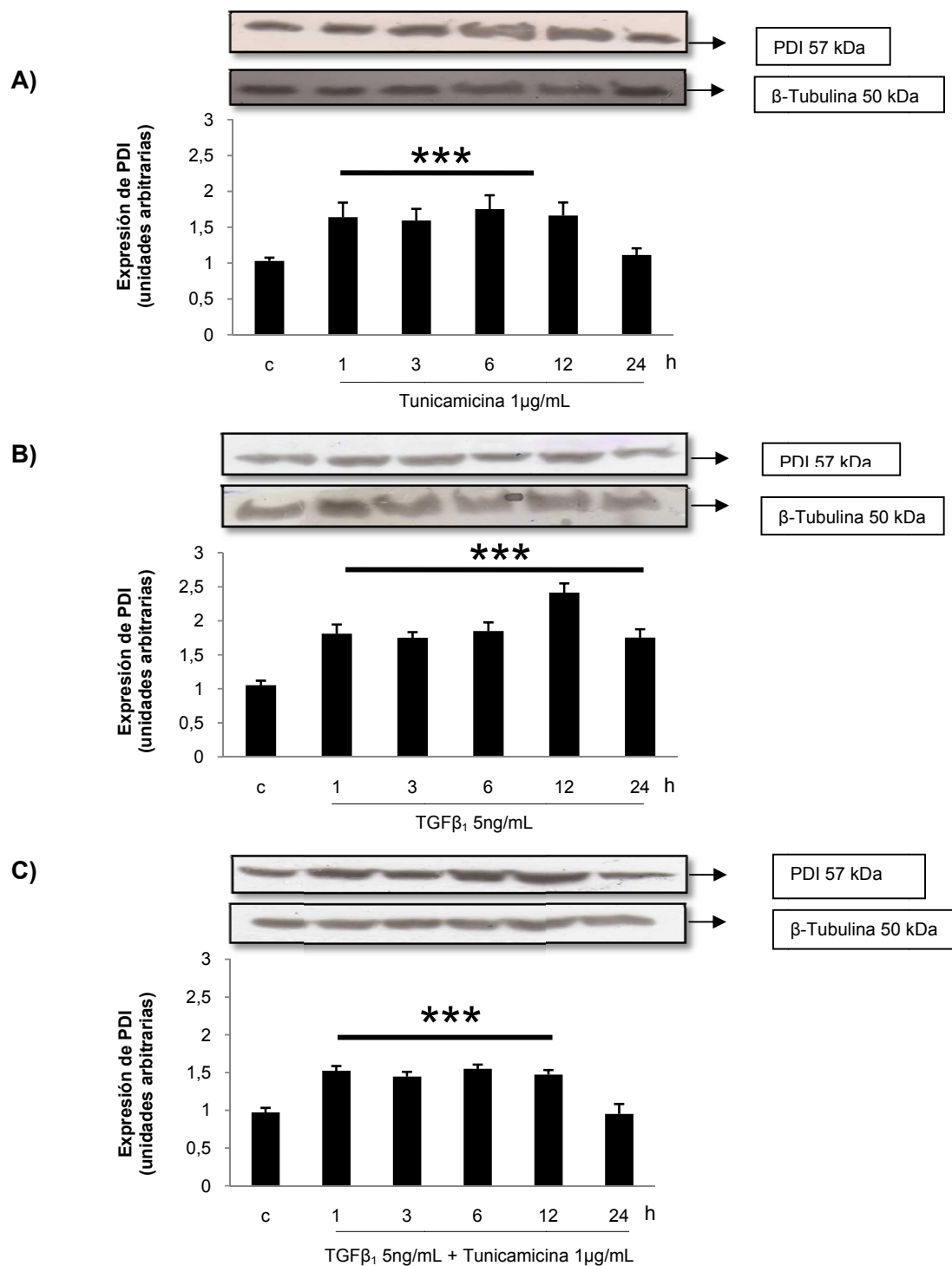


Fig. 9. Determinación de los niveles de PDI cuando los FCNR son estimulados con Tn y TGF β ₁. Inmuno western blot que muestra los cambios en la expresión de PDI. A) Muestra la expresión de PDI cuando los FCNR son estimulados con Tn 1 μ g/mL (**p<0,001 versus control), B) expresión de PDI cuando las células son estimuladas con TGF β ₁ 5ng/mL (**p<0,001 versus control) y C) expresión de PDI cuando los FCNR son pre-estimulados con TGF β ₁ durante 1h y posteriormente estimulados con Tn 1 μ g/mL (**p<0,001 versus control). En la parte inferior de cada uno de los western blots se muestra su respectiva cuantificación. β -tubulina se utilizó como control de carga. Los resultados muestran la media \pm SD para tres experimentos independientes.

6.3.3 Efecto sobre la expresión de eIF2 α fosforilado

Al estimular los FCNR con Tn 1 μ g/mL (Figura 9A), se observó un aumento en la expresión de eIF2 α -P, siendo estadísticamente significativo desde la hora de estímulo y alcanzando un máximo a las 3 horas de estímulo de 2 veces el control ($p < 0,001$). Cuando los FCNR se estimularon con TGF β_1 5ng/mL (Figura 9B) hubo un incremento en la expresión de eIF2 α -P siendo significativo desde la hora de estímulo y logrando la máxima expresión desde las 3 horas de estímulo (1,6 veces con respecto al control, $p < 0,01$). Del mismo modo llega hasta el nivel basal a las 24 horas de estímulo. Al estimular los FCNR con Tn 1 μ g/mL y TGF β_1 5ng/mL (Figura 9C), se observó que eIF2 α -P disminuye su expresión con respecto al control, siendo esta significativa a las 3 horas (0,7 veces, $p < 0,05$) de estímulo y manteniéndose así hasta las 24 horas.

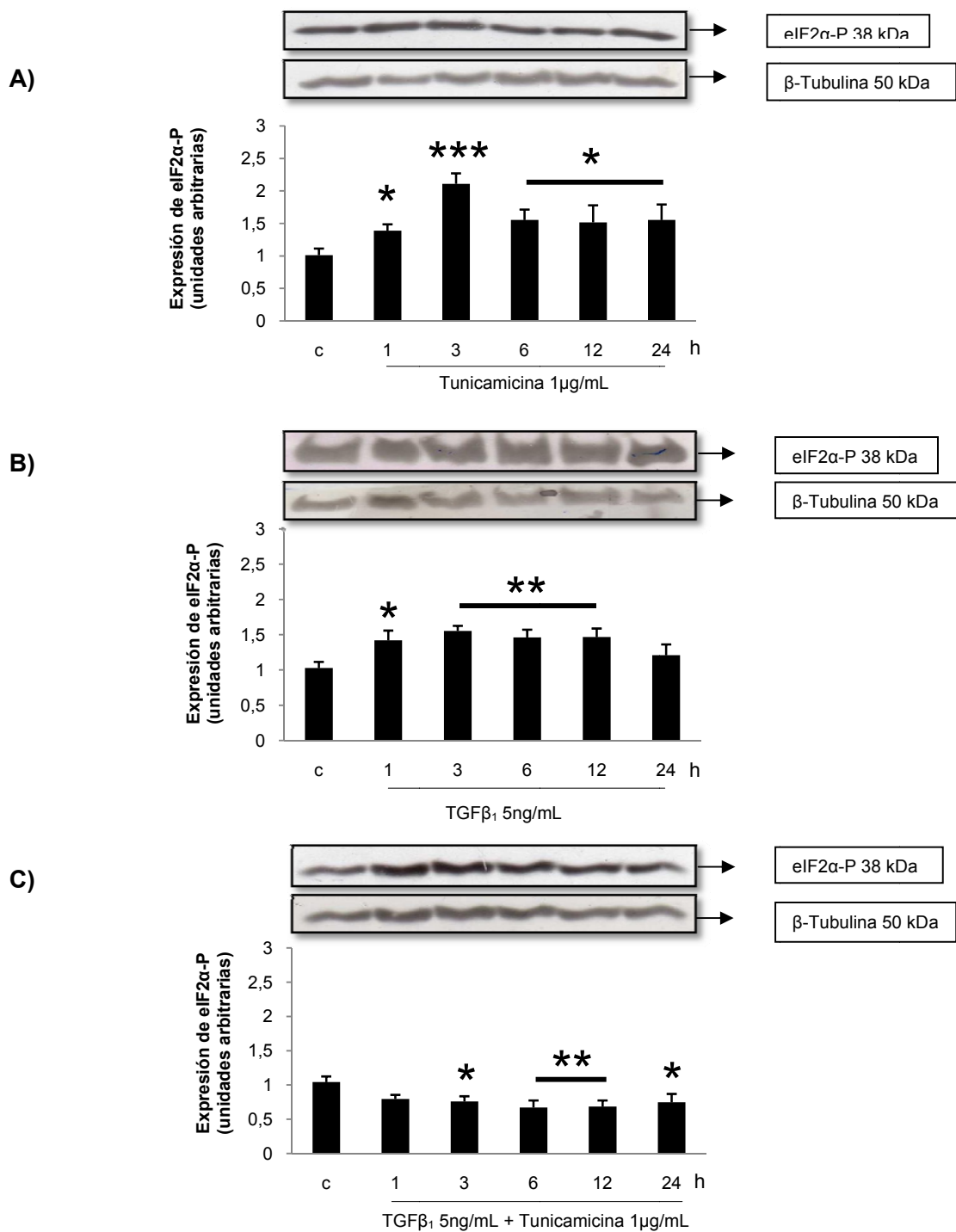


Fig. 10. Determinación de los niveles de eIF2α-P cuando los FCNR son estimulados con Tn y TGFβ₁. Inmuno western blot que muestra los cambios en la expresión de eIF2α-P. A) Muestra la expresión de eIF2α-P cuando los FCNR son estimulados con Tn 1 μg/mL (*p < 0,05 y ***p < 0,001 versus control), B) expresión de eIF2α-P cuando las células son estimuladas con TGFβ₁ 5 ng/mL (*p < 0,05 y **p < 0,01 versus control) y C) expresión de eIF2α-P cuando los FCNR son pre-estimulados con TGFβ₁ durante 1h y posteriormente estimulados con Tn 1 μg/mL (*p < 0,05 y **p < 0,01 versus control). En la parte inferior de cada uno de los western blots se muestra su respectiva cuantificación. β-tubulina se utilizó como control de carga. Los resultados muestran la media ± SD para tres experimentos independientes.

6.3.4 Efecto sobre la expresión de CHOP

En condiciones basales se observa que los FCNR no expresan niveles detectables de la proteína CHOP. Sin embargo, al estimular los FCNR con Tn 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 10A) se observó un aumento en la expresión de la proteína CHOP desde las 6 horas y siendo máxima a las 12 horas de estímulo ($p < 0,001$), para luego comenzar a decaer a las 24 horas. Por el contrario, los FCNR que fueron tratados con $\text{TGF}\beta_1$ (Figura 10B) no presentaron, a ninguno de los tiempos de exposición, expresión de CHOP. Esto se corroboró usando una muestra tratada con Tn 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 12 horas como control positivo. Cuando los FCNR fueron pre-estimulados con $\text{TGF}\beta_1$ 5 ng/mL y luego con Tn 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 10C), se observó un aumento temporal en la expresión de CHOP, que comienza a la hora de estímulo y que mantiene un aumento progresivo en el tiempo llegando a presentarse la máxima expresión a las 24 horas de estímulo ($p < 0,001$).

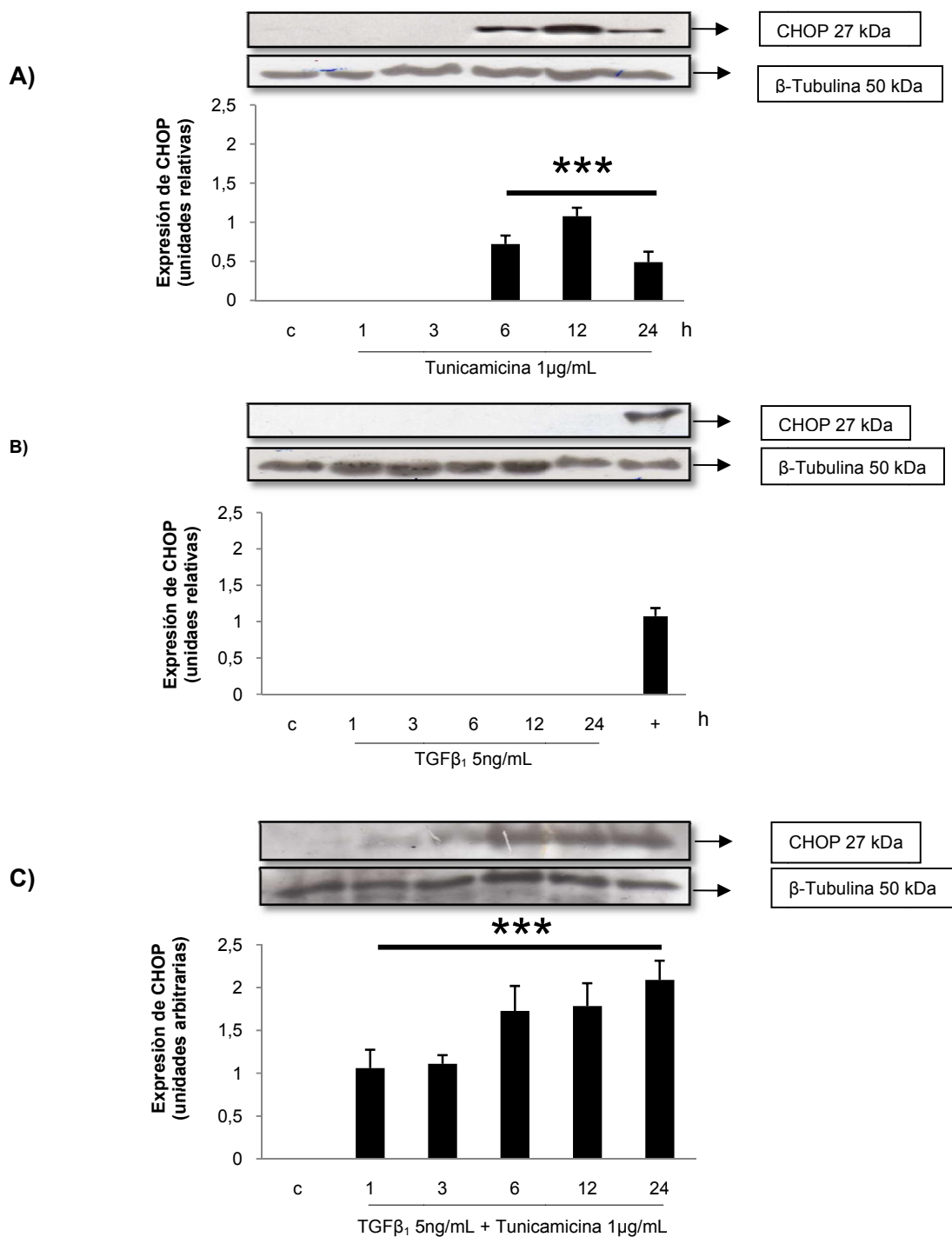


Fig. 11. Determinación de los niveles de CHOP cuando los FCNR son estimulados con Tn y TGF β ₁. Inmuno western blot que muestra los cambios en la expresión de CHOP. A) Muestra la expresión de CHOP cuando los FCNR son estimulados con Tn 1 μ g/mL (***p*<0,001 versus control), B) expresión de CHOP cuando las células son estimuladas con TGF β ₁ 5ng/mL (***p*<0,001 versus control) y C) expresión de CHOP cuando los FCNR son pre-estimulados con TGF β ₁ durante 1h y posteriormente estimulados con Tn 1 μ g/mL (***p*<0,001). En la parte inferior de cada uno de los western blots se muestra su respectiva cuantificación. β -tubulina se utilizó como control de carga. Los resultados muestran la media \pm SD para tres experimentos independientes.

6.4 Efecto de Tn y TGFβ₁ sobre la secreción de colágeno

Para determinar si Tn es capaz de alterar la secreción de colágeno de los FCNR, estos fueron estimulados con Tn 0,1 y 0,5 µg/mL por un periodo de 48 horas. Los FCNR se pre-incubaron con TGFβ₁ 5 ng/mL durante 1 hora, para luego ser estimulados con Tn 0,1 y 0,5 µg/mL por 48 horas. Se recolectaron los medios de cultivo y los extractos celulares y se procedió tal como se describe en materiales y métodos para realizar la determinación de colágeno soluble y los inmuno western blots respectivamente.

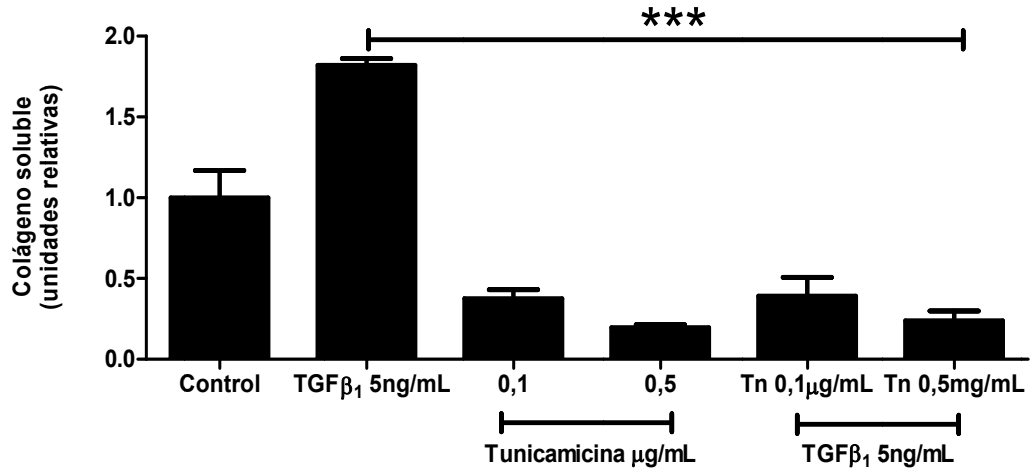
6.4.1 Efecto de Tn y TGFβ₁ sobre la secreción de colágeno soluble

En los FCNR que fueron estimulados con TGFβ₁ se observa un significativo aumento en la secreción de colágeno (1,8 veces respecto el control, p<0,001) mientras que en aquellos estimulados sólo con Tn 0,1 y 0,5 µg/mL se observa una clara disminución en la secreción de colágeno soluble a las 48 h (2,7 y 5,2 veces menos que el control p<0,001). Cuando las células son pre-incubadas con TGFβ₁ y luego tratadas con Tn 0,1 y 0,5 µg/mL, no se observa ninguna diferencia en la secreción de colágeno soluble respecto de las células tratadas solo con Tn (Figura 11A), indicando que Tn reduce significativamente la secreción de colágeno ya sea en condiciones basales o la estimulada por TGFβ₁.

6.4.2 Efecto de Tn y TGFβ₁ sobre la expresión de CHOP.

Para demostrar que a las concentraciones de Tn 0,1 y 0,5µg/mL, había presencia de proteínas marcadoras de estrés de RE, se midió el cambio de expresión en la proteína CHOP (Figura 11B), obteniéndose como resultado que Tn 0,1 y 0,5µg/mL inducen la expresión de esta proteína en los FCNR a las 48 horas. De la misma forma se obtuvo que los FCNR pre-estimuladas con TGFβ₁ también presentan expresión de CHOP, aunque en menor cantidad que Tn sola.

A)



B)

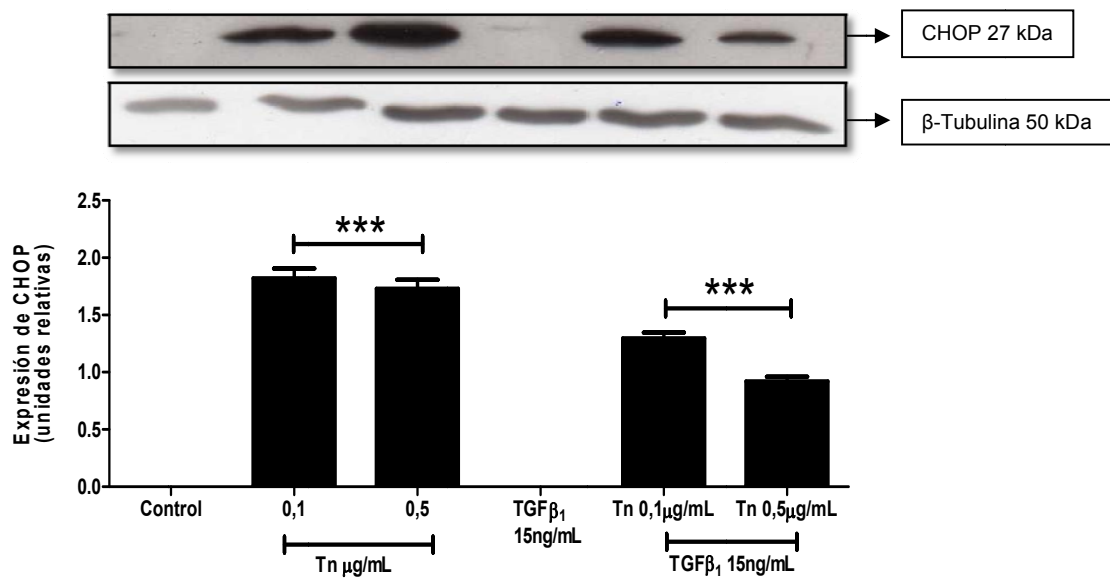


Fig. 12. Efecto de Tn y TGFβ₁ sobre la secreción de colágeno soluble y la expresión de CHOP. FCNR estimulados con Tn 0,1 y 0,5 μg/mL y TGFβ₁ 5ng/L. En la figura 11A se muestra la cuantificación del colágeno soluble en los medios de cultivo (***) $p < 0,001$ versus control). En la figura 11B se observa el inmuno western blot para la proteína CHOP y bajo este, su respectiva cuantificación. Los resultados muestran la media \pm SD para tres experimentos independientes (***) $p < 0,001$).

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo nos indican que: a) los FCNR experimentan pérdida de la viabilidad celular por apoptosis al ser estimulados con Tn, b) la disminución en la viabilidad celular fue revertida por $TGF\beta_1$, c) $TGF\beta_1$ es capaz de adaptar a los FCNR al estrés de RE inducido por Tn, y finalmente d) $TGF\beta_1$ no es capaz de revertir la disminución en la secreción de colágeno inducida por efecto de Tn.

7.1 Efecto de Tn sobre la viabilidad celular

Hasta la fecha no existen trabajos en la literatura que indaguen si el estrés de RE afecta la viabilidad de los fibroblastos cardiacos. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio confirman que Tn tiene efectos negativos sobre la viabilidad celular de FCNR de un modo tiempo y concentración dependiente. Está bien documentado en la literatura que el antibiótico Tn produce estrés de retículo endoplasmático e induce la pérdida en la viabilidad celular^(16, 45, 46, 47). La mínima concentración de Tn para reducir significativamente la viabilidad de fibroblastos cardiacos a las 24h fue 5 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados son similares a los obtenidos por Hetz et al., estimulando células N2A con Tn 2 y 20 $\mu\text{g/mL}$ ⁽⁴⁸⁾ y a los de Lin JH et al, en células HEK 293 estimuladas con Tn 5 $\mu\text{g/mL}$ ⁽¹⁶⁾. Sin embargo, para evaluar el efecto del tiempo de exposición a Tn sobre la viabilidad, decidimos utilizar una concentración de Tn de 1 $\mu\text{g/mL}$, debido a que a mayores concentraciones la elevada pérdida de la viabilidad celular no nos permitió evaluar en una escala temporal más larga el efecto de Tn. Aún así, la viabilidad celular se vio disminuida notablemente por efecto de la Tn a las 48 horas. Resultados similares han sido descritos en otros tipos celulares a concentraciones de Tn similares e incluso menores⁽⁴⁹⁾ o mayores^(16, 48). Lo anterior induce a pensar que los FCNR son sensibles a los efectos deletéreos de Tn debido quizás a la alta carga sintética de proteínas de la MEC. Finalmente, nuestros resultados indican que Tn induce apoptosis de los FCNR. En varios tipos celulares se ha demostrado que Tn induce apoptosis^(18, 50). Si se comparan los resultados de viabilidad celular por conteo celular con los datos de apoptosis, los porcentajes de muerte no coinciden completamente (aunque la tendencia se mantiene) debido, probablemente, a que una vez que se forman los cuerpos apoptóticos, los fragmentos celulares son degradados en el medio de cultivo, lo que impide identificar al total de células apoptóticas por incorporación de yoduro de propidio.

7.2 Tn induce estrés de retículo endoplasmático en FCNR

Nuestros resultados muestran que en FCNR estimulados con Tn, existe activación de las vías sensoras de estrés de RE. En la literatura se ha demostrado Tn activa en forma conjunta todas las vías sensoras de estrés de RE⁽¹⁶⁾, aunque puede existir una diferente temporalidad en la activación de cada uno de las vías sensoras de estrés de RE. Sin embargo, se sabe que la primera vía en activarse en respuesta al estrés de RE es la vía de PERK para disminuir la traducción de proteínas por fosforilación del factor eIF2 α ⁽³⁰⁾, para luego continuar con el aumento en la expresión de las proteínas chaperonas y la expresión de CHOP⁽¹⁶⁾. Lin J. et al.⁽¹⁶⁾, ha demostrado que existe una temporalidad en la duración de los efectos de cada una de las vías sensoras de estrés de RE que se relaciona directamente con la supervivencia celular. La vía de IRE1 α se relacionaba con la supervivencia celular y la mantención de la actividad de la vía de PERK estaba relacionada directamente con la inducción de muerte celular por el aumento de la expresión en el tiempo de CHOP y la consecuente disminución de la fosforilación del factor eIF2 α .

Para determinar la activación directa de la vía del sensor PERK, medimos los niveles de expresión de la proteína fosforilada eIF2 α -P. Tn indujo en FCNR un temprano y estable aumento en la expresión de esta proteína durante todo el tiempo que usamos en nuestros experimentos, resultados muy similares se encontraron en el trabajo de Lin J. et al.⁽¹⁶⁾ usando células HEK 293 y en el trabajo de Kim S.J. et al.⁽⁵²⁾, en células MCF7.

Cuando hay estrés de RE se produce un aumento en la expresión normal de ciertas proteínas^(13, 51), entre ellas BiP, una chaperona residente del retículo y que es importante en la síntesis de colágeno⁽⁵²⁾. En relación a esta, en nuestros ensayos encontramos que Tn produce un aumento temprano y progresivo en la expresión de BiP, lo que es coincidente con los trabajos existentes en la literatura en donde se aprecia un aumento temporal de esta proteína^(16, 31, 53). Aunque no hay datos en la literatura sobre los cambios en la expresión de BiP por Tn en FCNR, la presencia de BiP en condiciones basales en FCNR se explica por su actividad como chaperona necesaria para la síntesis de colágeno junto a la chaperona PDI y a la proteína de choque térmico HSP47⁽⁵⁴⁾. Junto a lo anterior, Tn también indujo en FCNR la expresión de la proteína PDI, chaperona residente del retículo encargada de la formación de los puentes disulfuro de las proteínas⁽²⁶⁾, y en FCNR es esencial en la síntesis de colágeno, ya que forma los puentes disulfuros en la región C y N Terminal de las hebras de colágeno, y a su vez forma parte de la enzima 4-

prolilhidroxilasa (C-P4H), que es la responsable de la hidroxilación de los residuos de prolina presentes en la estructura de procolágeno, siendo PDI la subunidad β de esta proteína^(26,27). Estos resultados son coincidentes con algunos trabajos en donde se observa el aumento en la expresión de PDI en otros tipos de células que presentan estrés de RE^(46, 55), aunque este aumento no siempre lleva a la sobrevida celular y no está claro cuando es que las vías de salvataje se ven sobrepasadas y se llega a la muerte celular. Sin embargo, recientemente se ha demostrado en tejido de corazones humanos infartados, que PDI se expresa en regiones infartadas y no en las regiones remotas, lo que indica su participación en el proceso de cicatrización⁽²⁴⁾. Por otro lado, también se ha demostrado en corazón de ratones que la sobreexpresión de PDI protege a los cardiomiocitos de la muerte celular producida como consecuencia de un daño por infarto. Nuestros resultados, y otros, fortalecen el concepto de un efecto citoprotector de las chaperonas BiP y PDI en corazón y específicamente en fibroblastos cardiacos, Sin embargo, a pesar que se induce la expresión de las chaperonas para reducir el estrés, éstas son sobre pasadas por las vías de muerte conduciendo a la pérdida de la viabilidad celular.

Cuando existe la activación de los sensores de estrés de retículo, las respectivas cascadas de señalización que cada uno de estos sensores activa, llevan a la expresión de una proteína en común denominada CHOP que es un potente factor de transcripción⁽³⁰⁾. PERK es el principal inductor de CHOP, ya que esta vía lleva a la expresión del factor de transcripción ATF4 que se une directamente al promotor de CHOP⁽⁵⁶⁾. Se ha considerado que la presencia de esta proteína es un indicador claro de la existencia de estrés de RE. En muchos estudios se ha evaluado la presencia de la proteína CHOP, ya que esta, además de ser inducida cuando hay estrés de RE^(57, 58), se ha relacionado directamente con la inducción de apoptosis^(59, 60). Nuestros resultados muestran que en estado normal los FCNR no expresan niveles detectables de la proteína CHOP, pero cuando son estimulados con Tn se aprecia una notable expresión de esta proteína a las 12 horas de estímulo, resultados similares se han observado en otros trabajos a tiempos muy similares cuando se estimula con taspigargina o con Tn^(31, 58).

Colectivamente, nuestros resultados, muestran que existe una correlación entre la expresión de las proteínas que tratan de hacer frente al estrés demostrado por una temprana expresión de eIF2 α -P, BiP y PDI; mientras que por otro lado, también

demostramos la tardía expresión de CHOP que antecede a los eventos de muerte inducidos por Tn.

7.3 Efecto de TGF β ₁ sobre la viabilidad celular

TGF β ₁ es una importante citoquina en fibroblastos cardiacos, induciendo la expresión de proteínas de la MEC. Además, posee efectos antiapoptóticos^(42, 43) y efectos proapoptóticos⁽⁴¹⁾ sobre los fibroblastos cardiacos. En nuestros resultados, no observamos una disminución de la viabilidad celular cuando los FCNR fueron estimulados con TGF β ₁. Del mismo modo, tampoco observamos aumento en la proliferación celular lo que nos indica que TGF β ₁ no tiene efecto alguno sobre la viabilidad de los FCNR debido a que TGF β ₁ induce la diferenciación de los FCNR a miofibroblastos cardiacos inhibiendo su proliferación mediante la inhibición en la síntesis de DNA en forma irreversible⁽⁶¹⁾.

7.4 Efecto de TGF β ₁ sobre la expresión de proteínas de estrés de retículo endoplasmático

No existe ningún trabajo en la literatura donde se indague si TGF β ₁ es capaz de producir algún cambio en la expresión de las proteínas propias de estrés de RE. Se sabe que TGF β ₁ induce la síntesis de colágeno en los fibroblastos cardiacos⁽³⁵⁾ y que junto con esto, produce un aumento en la expresión de PDI⁽³⁹⁾. Nuestros resultados muestran que TGF β ₁ produce un claro aumento en la expresión de eIF2 α -P en los FCNR. A su vez, Zhang et al.⁽⁶²⁾ demostraron que la activación de la vía PERK, que lleva a la fosforilación de eIF2 α , es esencial para la proliferación y diferenciación de ciertos tipos celulares como las células β -pancreáticas, puesto que se sabe que esta vía de señalización es requerida para el control fisiológico normal de la síntesis proteica⁽³⁰⁾. Estos resultados sugerirían que TGF β ₁ en FCNR induce la fosforilación de eIF2 α con el fin de lograr la transdiferenciación desde fibroblastos a miofibroblastos.^(63, 64, 65) Otra probable explicación para la inducción en la fosforilación de eIF2 α por TGF β ₁, es que esto lleva a la consecuente disminución en la síntesis proteica para disminuir la sobrecarga en el RE, aunque este resultado se opone a los efectos clásicos de TGF β ₁ que es inducir la síntesis y secreción de proteínas de la MEC, a fin de evitar un excesivo estrés de RE y de esta forma evitar la muerte celular, indicando que ello podría ser un mecanismo de autocontrol.

En la literatura se ha demostrado que la síntesis de colágeno requiere de las chaperonas HSP47, BiP y PDI^(25, 26, 27) y que TGFβ₁ induce la expresión de HSP47⁽³⁹⁾ junto con aumentar la síntesis de colágeno⁽³⁵⁾. Consecuente con lo anterior, nuestros resultados muestran que TGFβ₁ induce la expresión de las proteínas BiP y PDI en los FCNR de manera tiempo dependiente, siendo el aumento en la expresión más temprano para PDI que para BiP, ya que en esta última el aumento se ve a tiempos más tardíos. El controlado aumento en la expresión de estas chaperonas por efecto de TGFβ₁ indica que ambas chaperonas participan de manera específica en la síntesis de colágeno como fue demostrado por Nakata et al⁽⁵⁴⁾. Estos resultados de TGFβ₁ se contraponen a los encontrados por Novosyadlyy et al.⁽³⁸⁾, quien demostró que IGF1 no induce aumento en la expresión de BiP. Sin embargo, en fibroblastos cardiacos ambos estímulos son capaces de inducir la síntesis de colágeno⁽⁶⁶⁾, proteína que requiere de las chaperonas BiP y PDI, por lo anterior, el efecto diferente de estos factores de crecimiento podría deberse tanto al diferente tipo celular como al tipo de estímulo.

Como se mencionó anteriormente, la expresión de CHOP es un indicador claro de la existencia de estrés de RE ya que las tres vías de señalización relacionadas con este, llevan a la expresión de este potente factor de transcripción, en especial la vía de PERK. En nuestros resultados TGFβ₁ induce la expresión de eIF2α-P, lo que indica que la vía de señalización del sensor PERK está activa, sin embargo, TGFβ₁ no induce la expresión detectable de la proteína CHOP en los FCNR, resultado que es consecuente con la falta de efecto de TGFβ₁ sobre la viabilidad celular. De manera similar, Novosyadlyy et al⁽³⁸⁾ demostraron que IGF-1 tampoco induce la expresión de CHOP en las células MCF-7. Por otro lado, estos mismo autores demostraron que IGF-1 indujo la expresión de esta proteína en células NIH/3T3. Lo anterior indica que los factores de crecimiento producen diferente expresión de proteínas dependiendo del tipo celular y al mismo tiempo que la expresión de CHOP no siempre esta asociado a fenómenos de muerte celular, y que ello es dependiente del estímulo y tipo celular.

Recientemente se ha demostrado que IGF-1 protege de la apoptosis inducida por estrés de RE. En este sentido, nuestros promisorios resultados muestran que el pre-tratamiento de los FCNR con TGFβ₁ protege de la pérdida en la viabilidad celular inducida por Tn en forma dosis y tiempo dependiente, lo que se explicaría porque mayores concentraciones de TGFβ₁ producirían un efecto más prolongado en el tiempo, siendo este capaz de revertir la pérdida de la viabilidad. Sin embargo, nuestros resultados también muestran

que a mayores concentraciones de Tn se activa un estrés de RE más severo y prolongado debido a que Tn permanece en el medio produciendo estrés de RE ya que se ha demostrado que este antibiótico conserva sus efectos por un tiempo prolongado⁽¹⁶⁾. El pre tratamiento con TGFβ₁ potencia en forma significativa la disminución en la fosforilación del factor eIF2α durante todo el periodo de estímulo y junto con esto, produce un aumento considerable en la expresión de CHOP en forma tiempo dependiente, a diferencia de TGFβ₁ que por si solo no produce un aumento detectable en la expresión de CHOP. La expresión diferencial de eIF2α-P y CHOP está directamente relacionada ya que el aumento en la expresión de esta última, lleva al consecuente aumento en la expresión de GADD34, proteína que regula la desfosforilación de eIF2α^(13, 60), lo que resulta en una reactivación de la traducción de los mRNA que codifican para las chaperonas como BiP y PDI. Lo anterior sugeriría que TGFβ₁ produce una respuesta adaptativa al estrés de RE puesto que en nuestros resultados estas dos chaperonas aumentan su expresión significativamente cuando los FCNR son pre-estimulados con TGFβ₁. Junto con esto, el aumento en la expresión de CHOP se relaciona directamente con un incremento en la respuesta adaptativa ya que los principales genes regulados por este factor son ERO1α y GADD34 que se relacionan directamente más con la sobrevivencia celular que con la muerte celular por apoptosis⁽³⁸⁾, efecto que a quedado demostrado en los trabajos de Southwood et al.⁽⁶⁷⁾, Yusta et al.⁽⁶⁸⁾ y Novosyadlyy et al.⁽³⁸⁾, en donde el aumento en la expresión de CHOP se relaciona con un efecto antiapoptótico.

En un principio, se mencionó que al presentarse estrés de RE, las células respondían disminuyendo la síntesis de nuevas proteínas para disminuir la sobrecarga sobre el RE. De esta forma, una célula tan secretora como lo es el FCNR debe ver disminuida la síntesis y secreción de sus proteínas, principalmente de colágeno como mecanismo de adaptación. Consecuentemente con esto, nuestros resultados muestran que menores concentraciones de Tn, concentraciones a las cuales no se observa muerte celular, son capaces de inducir estrés de RE, lo que se ve reflejado en un aumento marcado en la expresión de CHOP y, junto con esto, son capaces de disminuir la secreción de colágeno al medio extracelular lo que se relaciona directamente con una disminución en la síntesis de esta proteína de la MEC. Al mismo tiempo nuestros resultados muestran que en los FCNR estimulados con TGFβ₁, este no revierte la disminución en la secreción de colágeno al medio, lo que apoya más el hecho de que al pre-estimar con TGFβ₁ se produce una adaptación al estrés de RE para impedir la muerte celular más que una

normalización de los procesos normales de la célula como la secreción de proteínas de la MEC.

Finalmente, los antecedentes descritos, nos llevan a asegurar que $TGF\beta_1$ tiene un efecto citoprotector en los FCNR frente al estrés de RE, lo que confirma nuestra hipótesis. Junto con esto es necesario dilucidar en trabajos futuros, el o los mecanismos moleculares por los cuales el $TGF\beta_1$ es capaz de adaptar a los FCNR al estrés de RE.

Perspectivas

1. Estudiar si el efecto de TGF beta es específico en FCNR o también se presenta en otros tipos celulares.
2. Estudiar las vías de señalización de $TGF\beta_1$ involucradas en el efecto “anti” estrés de RE.
3. Estudiar si IGF-1 es capaz de demostrar los mismos efectos “anti” estrés de RE en FCNR.
4. Estudiar si las proteínas de estrés pueden ser probables blancos terapéuticos capaces de controlar el proceso de cicatrización post infarto.
5. Estudiar si otros agentes son capaces de modular el estrés de RE para producir los mismos efectos que $TGF\beta_1$.

8. Conclusiones

1. Tn induce pérdida en la viabilidad celular de los FCNR en forma tiempo y dosis dependiente.
2. La muerte celular inducida por Tn es a través de un fenómeno apoptótico.
3. Tn induce estrés de RE en los FCNR y con ello disminuye la secreción de proteínas de matriz.
4. $TGF\beta_1$ previene de la muerte inducida por Tn.
5. $TGF\beta_1$ adapta a los FCNR al estrés de RE.

9. Modelo propuesto del efecto citoprotector de $TGF\beta_1$ sobre la apoptosis inducida por Tn

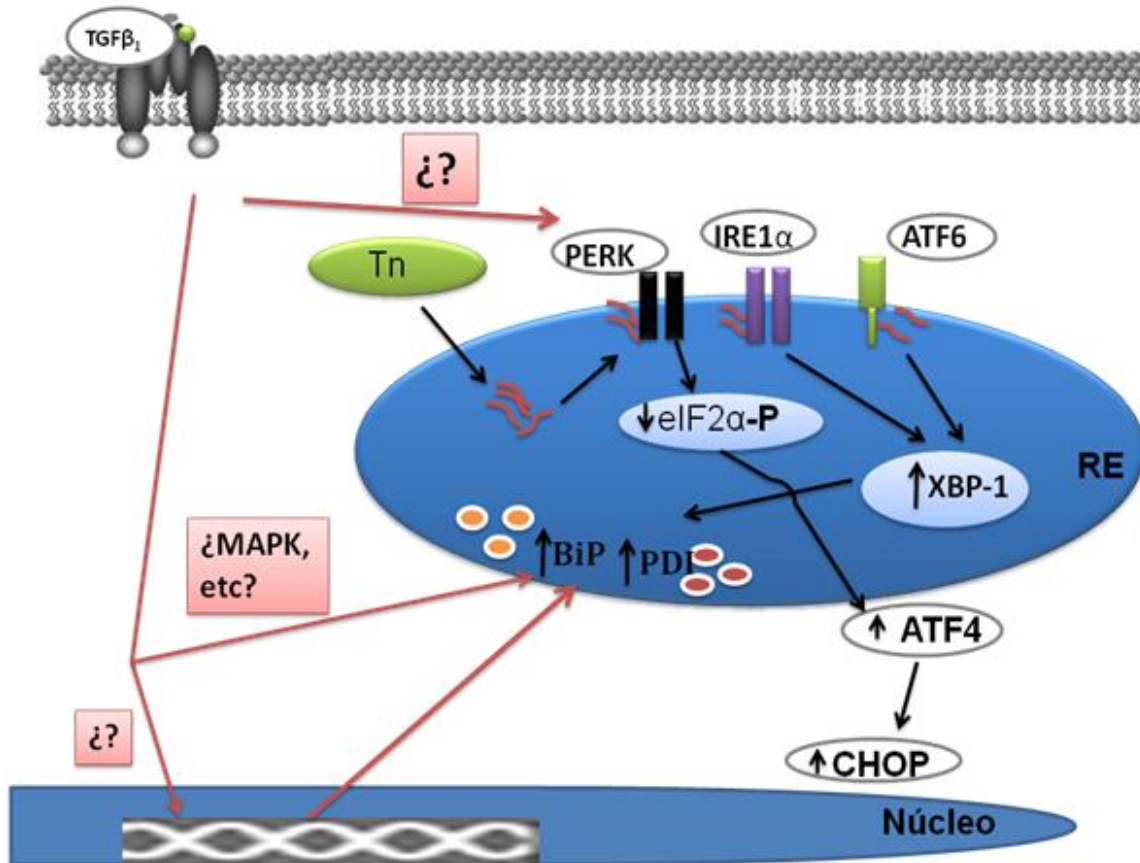


Fig. 13. Modelo propuesto del efecto citoprotector de $TGF\beta_1$ sobre la apoptosis inducida por Tn. $TGF\beta_1$ aumenta la capacidad adaptativa del RE tanto por la represión en la traducción como por la inducción en la expresión de genes que aumenta la capacidad de plegamiento del RE. Durante el estrés de RE, $TGF\beta_1$ produce la activación de la vía PERK/eIF2 α -P/CHOP aunque produce la disminución en eIF2 α -P debido al aumento en la expresión de CHOP que produce el consecuente aumento en la expresión de GADD34, proteína que induce la defosforilación de eIF2 α -P, restaurando la actividad de eIF2. Esto representa el mecanismo que reprograma al RE para pasar de su carga normal de proteínas secretoras a la síntesis de proteínas de estrés de RE, aumentando la capacidad plegadora del RE.

BIBLIOGRAFIA

1. Ministerio de salud, 2004
2. Organización Mundial de la Salud, 55ª Asamblea Mundial de la Salud, A55/16, punto 13.11, 27 de Marzo de 2002
3. Weber KT. Fibrosis in Hypertensive Heart Disease: Focus on Cardiac Fibroblasts. *J Hypertens.* 2004; 22:47-50.
4. Long CS, Brown RD. The cardiac fibroblast, another therapeutic target for mending the broken heart?. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34: 1273-1278.
5. Silze T, Randolph GJ, Kreutz M, Kunz-Schughart LA. The fibroblast: Sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue. *Int. J. Cancer.* 2003; 108, 173-180.
6. Weber KT. Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertens.* 2004; 22:47-50
7. D. W. Powell, R. C. Mifflin, J. D. Valentich, S. E. Crowe, J. I. Saada, and A.B West. Myofibroblasts. I Paracrine cells important in health and disease. *Am. J. Physiol.* 1999; 277: C1-C19.
8. Bernales S, Papa FR, Walter P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.* 2006; 22:487-508.
9. DuRose JB, Tam AB, Niwa M. Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell.* 2006; 17, 3095–3107.
10. Lecca MR, Wagner U, Patrignani A, Berger EG, Hennet T. Genome-wide analysis of the unfolded protein response in fibroblasts from congenital disorders of glycosylation type-I patients. *The FASEB Journal.* 2005; 19(2):240-242.
11. Sriburi R, Jackowski S, Mori K, Brewer JW. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 2004; 167:35-41.
12. Allen JR, Nguyen LX, Sargent KE, Lipson KL, Hackett A, Urano F. High ER stress in b-cells stimulates intracellular degradation of misfolded insulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 324:166–170.
13. Ron D., Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007, 8:519-529

14. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest.* 2005; 115: 2658-2664.
15. Glembotski CC. Endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ. Res.* 2007; 101: 975-984
16. Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, Shokat KM, Lavail MM, Walter P. IRE1 Signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 2007; 318: 944-948.
17. Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 2005; 74:739-789.
18. Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee AH, Bassik MC, Antonsson B, Brandt GS, Iwakoshi NN, Schinzel A, Glimcher LH, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1 α . *Science* 2006; 312:572-576.
19. van Anken E. Endoplasmic reticulum stress and the making of professional secretory cell. *Crit. Rev. Biochem. Mol Biol.* 2005; 40:269-283.
20. Glembotski C. Endoplasmic Reticulum Stress in the Heart. *Circ. Res.* 2007; 101:975-984
21. Brostrom MA, Mourad F, Brostrom CO. Regulated expression of GRP78 during vasopressin-induced hypertrophy of heart-derived myocytes. *J Cell Biochem.* 2001; 83:204 –217.
22. Thuerauf DJ, Marcinko M, Gude N, Rubio M, Sussmanand MA, Glembotski CC. Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes; *Circ. Res.* 2006; 99;275-282.
23. Szegezdi E, Duffy A, O'Mahoney ME, Logue SE, Mylotte LA, O'brien T, Samali A. ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 349: 1406-11.
24. Severino A, Campioni M, Straino S, Salloum FN, Schmidt N, Herbrand U, Frede S, Toietta G, Di Rocco G, Bussani R, Silvestri F, Piro M, Liuzzo G, Biasucci LM, Mellone P, Feroce F, Capogrossi M, Baldi F, Fandrey J, Ehrmann M, Crea F, Abbate A, Baldi A. Identification of protein disulfide isomerase as a cardiomyocyte survival factor in ischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50: 1029-37.
25. Lisse TS, Thiele F, Fuchs H, Hans W, Przemeck GK, Abe K, Rathkolb B, Quintanilla-Martinez L, Hoelzlwimmer G, Helfrich M, Wolf E, Ralston SH, Hrabé de

- Angelis M. ER stress-mediated apoptosis in a new mouse model of osteogenesis imperfecta. *PLoS Genet.* 2008; 4:e7.
26. Koivunen P, Kirsi E, Salo H, Myllyharju J and Ruddock LW. Three binding sites in protein-disulfide isomerase cooperate in collagen prolyl 4-hydroxylase tetramer assembly; *J Biol Chem.* 2005;280: 5227–5235.
27. Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biol.* 2003; 22:15-24.
28. Booz GW, Baker KM. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 1995; 30:537-543.
29. Mayorga M, Bahi N, Ballester M, Comella JX, Sanchis D. Bcl-2 is a key factor for cardiac fibroblast resistance to programmed cell death. *J Biol Chem.* 2004 13; 279:34882-34889.
30. Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda).* 2007; 22:193-201.
31. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 2004; 18:3066-3077.
32. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* 2002; 16:1345-1355.
33. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem.* 2001; 276:33869-33874.
34. Tan Y, Dourdin N, Wu C, De Veyra T, Elce JS, Greer PA. Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2006; 281:16016-16024.
35. Leask A. TGF β , cardiac fibroblast, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res.* 2007; 74:207-212.
36. Mehta JL, Attramadal H. The TGFbeta superfamily in cardiovascular biology. *Cardiovasc Res.* 2007; 74:181-183.
37. Galvez AS, Fiedler JL, Ocaranza MP, Jalil JE, Lavandero S, Díaz-Araya G. Perindopril regulates beta-agonist-induced cardiac apoptosis *J Cardiovasc Pharm.* 2005; 46:255-61.

38. Novosyadlyy R, Kurshan N, Lann D, Vijayakumar A, Yakar S, Leroith D. Insulin-like growth factor-I protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of the adaptive capacity of endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ.* 2008; 15:1304-1317.
39. Nakayama S, Mukae H, Sakamoto N, Kakugawa T, Yoshioka S, Soda H, Oku H, Urata Y, Kondo T, Kubota H, Nagata K, Kohno S. Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF-beta1-stimulated human lung fibroblasts. *Life Sci.* 2008; 82:210-7.
40. Tamaki N, Hatano E, Taura K, Tada M, Kodama Y, Nitta T, Iwaisako K, Seo S, Nakajima A, Ikai I, Uemoto S. CHOP deficiency attenuates cholestasis-induced liver fibrosis by reduction of hepatocyte injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G498–G505.
41. Petrov V, Fagard R, Lijnen P. Transforming growth factor-beta induces angiotensin converting enzyme synthesis in rat cardiac fibroblast during their differentiation to myofibroblast. *J RAAS.* 2000; 1:342-51.
42. Chen HH, Zhao S, Song JG. TGFβ₁ suppresses apoptosis via differential regulation of MAP kinases and ceramide production. *Cell Death and Differentiation.* 2003; 10: 516–527.
43. Chen LL, Yin H, Huang J. Inhibition of TGF-beta1 signaling by eNOS gene transfer improves ventricular remodeling after myocardial infarction through angiogenesis and reduction of apoptosis. *Cardiovasc Pathol.* 2007 Jul-Aug; 16:221-230.
44. Foncea R, Andersson M, Ketterman A, Blakesley V, Sapag-Hagar M, Sugden PH, LeRoith D, Lavandro S.. Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 1997; 31:19115-19124.
45. Lu DP, Christopher DA. Endoplasmic reticulum stress activates the expression of a sub-group of protein disulfide isomerase genes and AtbZIP60 modulates the response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics.* 2008 Jun 24. [Epub ahead of print].
46. Li J, Ni M, Lee B, Barron E, Hinton DR, Lee AS. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death Differ.* 2008 Jun 13. [Epub ahead of print].

47. M. Carlberg, A. Dricu, H. Blegen, G. Kass, S. Orrenius and O. Larsson. Short exposures to tunicamycin induce apoptosis in SV40-transformed but not in normal human fibroblast. *Carcinogenesis*. 1996; 17:2589-2596.
48. C. Hetz, M. Russelakis-Carneiro, K. Maundrell, J. Castilla, C. Soto. Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J*. 2003; 22:5435-5445.
49. Tetsuro Oda, Yasuhiro Kosuge, Motoki Arakawa, Kumiko Ishige, Yoshihisa Ito. Distinct mechanism of cell death is responsible for tunicamycin-induced ER stress in SK-N-SH and SH-SY5Y cells. *Neurosci Res*. 2008; 60:29-39.
50. Ali Masud, Alexander Mohapatra, Saquib A. Lakhani, Anthony Ferrandino, Razqallah Hakem, Richard A. Flavell. Endoplasmic Reticulum Stress-induced Death of Mouse Embryonic Fibroblasts Requires the Intrinsic Pathway of Apoptosis. *J Biol Chem*. 2007; 282: 14132-14139.
51. Martin Schröder M, Randal J. Kaufman. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*. 2005; 569:29-63.
52. Lisse TS, Thiele F, Fuchs H, Hans W, Przemecck GK, Abe K, Rathkolb B, Quintanilla-Martinez L, Hoelzlwimmer G, Helfrich M, Wolf E, Ralston SH, Hrabé de Angelis M. ER stress-mediated apoptosis in a new mouse model of osteogenesis imperfecta. *PLoS Genet*. 2008; 4:e7.
53. Kim SJ, Park KM, Kim N, Yeom YI. Doxorubicin prevents endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 339:463-468.
54. Nakata K. Expression and function of heat shock protein a collagen-specific molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Matrix Biology*. 1998; 16: 379-386
55. Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J, Song B, Yau GD, Kaufman RJ. ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev Cell*. 2007; 13:351-64.
56. Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol*. 2002; 318:1351-1365.
57. Masud A, Mohapatra A, Lakhani SA, Ferrandino A, Hakem R, Flavell RA. Endoplasmic reticulum stress-induced death of mouse embryonic fibroblasts requires the intrinsic pathway of apoptosis. *J Biol Chem*. 2007; 282:14132-14139.

58. Delom F, Fessart D, Chevet E. Regulation of calnexin sub-cellular localization modulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Apoptosis*. 2007; 12:293-305.
59. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*. 2001; 21:1249-1259.
60. Wu J, Kaufman RJ. From acute ER stress to physiological roles of the unfolded protein response. *Cell Death Differ*. 2006; 13:374-384.
61. Petrov VV, van Pelt JF, Vermeesch JR, Van Duppen VJ, Vekemans K, Fagard RH, Lijnen PJ. TGF-beta1-induced cardiac myofibroblasts are nonproliferating functional cells carrying DNA damages. *Exp Cell Res*. 2008; 314:1480-1494.
62. Zhang W, Feng D, Li Y, Iida K, McGrath B, Cavener DR. PERK EIF2AK3 control of pancreatic beta cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis. *Cell Metab*. 2006; 4:491-497.
63. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol*. 1999; 277:C1-9.
64. Walker GA, Masters KS, Shah DN, Anseth KS, Leinwand LA. Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circ Res*. 2004; 95:253-260.
65. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*. 2007; 74:184-195.
66. Diaz-Araya G, Borg TK, Lavandero S, Loftis MJ, Carver W. IGF-1 modulation of rat cardiac fibroblast behavior and gene expression is age-dependent. *Cell Commun Adhes*. 2003; 10:155-165.
67. Southwood CM, Garbern J, Jiang W, Gow A. The unfolded protein response modulates disease severity in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neuron*. 2002; 36:585-596.
68. Yusta B, Baggio LL, Estall JL, Koehler JA, Holland DP, Li H, Pipeleers D, Ling Z, Drucker DJ. GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab*. 2006; 4:391-406.