



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

RESOLVINA-E1 PREVIENE EL AUMENTO DE ICAM-1 INDUCIDO POR ANGIOTENSINA II EN FIBROBLASTOS CARDÍACOS

Memoria para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico

FELIPE IGNACIO RUZ CORTÉS

Director: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya / Dr. Raúl Vivar Sánchez.

Patrocinante: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

2018

FINANCIAMIENTO

Proyecto FONDECYT N° 1170425 (Guillermo Díaz Araya, investigador principal).

El desarrollo de esta memoria de título se realizó en el Laboratorio de Farmacología Molecular, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Esta memoria dio origen a la siguiente presentación a congreso SOFARCHI 2017:

EN EL FIBROBLASTO CARDÍACO LA RESOLVINA-E1 PREVIENE EL AUMENTO DE ICAM-1 INDUCIDO POR ANGIOTENSINA II.

Dedicado a los que están siempre.

AGRADECIMIENTOS

Partir agradeciendo a mi familia, mi madre Alicia, mi padre Luis y hermano Leonardo por el apoyo en distintas y muchas formas que me entregaron.

Agradecer a abuelas, tías, tíos, primos, amigos y perros que me acompañaron en esta etapa de la vida.

Agradecer a mi pareja María José, por su apoyo incondicional y por subirme el ánimo siempre.

Agradecer a la selección de fútbol de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, al profesor Raúl y a las 6 generaciones de jugadores con los cuales compartí entrenamientos y partidos semana a semana. También a los equipos de baby fútbol PAOK ULIAO FC, LOS MAS RANKIAOS y PHARMACIUTICAL CITY con los cuales podía despejar mi mente en los partidos durante la semana.

Agradecer a compañeros y amigos de generación con los cuales se compartieron buenos y malos chistes, desesperación en momentos de estrés y ayuda en momentos mortales.

Agradecer al profesor Díaz por aceptarme en el laboratorio para formar parte de este proceso, por su paciencia y apoyo. A los integrantes tesistas de pre y post grado, de los cuales aprendí mucho, gracias a ellos pude avanzar en los tiempos esperados o con un par de meses de retraso. A los técnicos de laboratorio, personal de aseo y secretaría.

A las ratas adultas Sprague Dawley, perdón y gracias.

ÍNDICE GENERAL

Página

FINANCIAMIENTO	2
AGRADECIMIENTOS.....	4
ÍNDICE GENERAL	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ABREVIATURAS	8
RESUMEN.....	11
SUMMARY	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.....	13
1.2 FIBROBLASTO CARDÍACO.....	13
1.3 ANGIOTENSINA II.....	14
1.4 INFLAMACIÓN.....	15
1.5 ICAM-1 Y VCAM-1.....	15
1.6 ADHESIÓN CELULAR A FIBROBLASTOS CARDÍACOS.....	16
1.7 RESOLVINAS.....	16
1.8 RESOLVINA E1.....	17
1.9 RELACIÓN ENTRE FIBROBLASTO CARDÍACO Y RESOLVINA E1.....	19
2. HIPÓTESIS.....	20
3. OBJETIVO GENERAL	20
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1 Reactivos.....	21
5.2 Animales.....	21
5.3 Aislamiento de fibroblastos cardíacos.....	21
5.4 Western blot (WB).....	22
5.5 Aislamiento de SMC a partir de bazo.....	22

5.6 Ensayo de adhesión in vitro y tinción con cristal violeta.....	23
5.7 Análisis estadístico.....	23
6. RESULTADOS	24
6.1 Activación de las vías transduccionales ERK 1/2, NF-κB y AKT inducidas por ANG II en FC.	24
6.2 Activación de las vías transduccionales ERK 1/2, NF-κB y AKT inducidas por RvE1 en FC.	25
6.3 Modulación de la vía transduccional ERK1/2 activada por RvE1 y ANG II en FC... ..	26
6.4 Evaluación de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidas por RvE1 y ANG II en FC.....	27
6.5 Evaluación de la participación de la vía ERK1/2 en la modulación de los niveles de expresión de ICAM-1 por ANG II en FC.	28
6.6 Evaluación del efecto de RvE1 en la adhesión de SMC sobre FC inducida por ANG II.....	29
7. DISCUSIÓN.....	32
7.1 Activación de las vías transduccionales ERK 1/2, NF-κB y AKT inducidas por ANG II en FC.	32
7.2 Activación de las vías transduccionales ERK 1/2, NF-κB y AKT inducidas por RvE1 en FC.	34
7.3 Modulación de la vía transduccional ERK1/2 que ejerce RvE1 sobre ANG II en FC.	34
7.4 Evaluación de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidas por RvE1 y ANG II en FC.....	36
7.5 Evaluación participación de la vía ERK1/2 en la modulación de la expresión de ICAM-1 por ANG II en FC.....	37
7.6 Efecto de RvE1 en la adhesión de SMC sobre FC inducida por ANG II.	38
7.7 Limitaciones y proyecciones del estudio.....	39
8. CONCLUSIONES	40
9. REFERENCIAS	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Acciones multinivel y de tipo celular específicas de RvE1.....	18
Figura 2. Efecto de ANG II en las vías transduccionales ERK1/2, NF- κ B y AKT.....	24
Figura 3. Efecto de RvE1 en las vías transduccionales ERK1/2, NF- κ B y AKT.....	25
Figura 4. Efecto de RvE1 y ANG II en la activación de la vía ERK1/2.....	26
Figura 5. Efecto de RvE1 y ANG II sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1.....	28
Figura 6. Participación de vía transduccional ERK1/2 en la expresión de ICAM-1 inducido por ANG II.....	29
Figura 7. Fotografías representativas (10X) que demuestra la adhesión de SMC sobre FC.....	30
Figura 8. RvE1 disminuye la adhesión de SMC inducida por ANG II en el FC.....	31

ABREVIATURAS

AC: Adenilato Ciclasa

ALX/FPR2: N-formyl peptide receptor 2

AMPC: AMP ciclico.

ANG II: Angiotensina II

ANOVA: Análisis de la varianza

AT1-R: Receptor de Angiotensina II tipo 1

BLT1: Block lipid transport-1

Ca²⁺: Calcio Intracelular

CAM: Moléculas de Adhesión Celular

ChemR23: Receptor de Chemerina 23

DHA: ácido decosaheptaenoico

DMEM/F12: Dulbecco's modified Eagle's medium, fórmula 12

ECL Quimioluminiscencia potenciada

ECV: Enfermedades Cardiovasculares

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGCG: Epigallocatechin-3-O-gallate

ENS: Encuesta Nacional de Salud

EPA: ácido eicosapentaenoico

ERK1/2: Quinasa regulada extracelularmente1/2

FBS: Suero fetal bovino

FC: Fibroblasto Cardíaco

FCN: Fibroblastos Cardíacos Neonatos

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GPCR: Receptor Acoplado a Proteína G

h: horas

HRP: Peroxidasa de rábano picante

HTA: hipertensión arterial

HUVECs: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1

IgSF: Superfamilia de Inmunoglobulinas

IL-12: Interleuquina 12

IL-1 β : Interleuquina-1 β

IL-6: Interleuquina 6

JNK: c-Jun N-terminal kinases
LFA-1: Antígeno asociado a función de linfocitos 1
LPS: Lipopolisacárido
LTB4: Leucotrieno B₄
Lx: Lipoxinas
Mac-1: Antígeno de macrófagos 1
MAPK: Proteína Kinasa Activada por Mitógeno
MaR: Maresinas
MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1
MEC: Matriz Extracelular
MFC: Miofibroblasto Cardíaco
min: minutos
MMP: Metaloproteinasas de Matriz
NF- κ B: Factor Nuclear kappa B
nM: nano Molar
OMS: Organización Mundial de la Salud
PBS: Tampón fosfato salino
PD: Protectinas
PD98059: inhibidor ERK1/2
PDGF-BB: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas - BB
PI3K/AKT: Fosfoinositol-3-quinasa/proteína quinasa 3
PKC: Proteína Kinasa C
PLC: Fosfolipasa C
PMN: Polimorfonucleares
R.P.M revoluciones por minuto
RANTES: Regulated on activation, normal T expressed and secreted
ROS: Especies Reactivas de Oxígeno
Rv: Resolvinas
RvD1: Resolvina de la serie D
RvE1: Resolvina de la serie E
RvE1: Resolvina E1
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SMC: células mononucleares de bazo
SPM: Mediadores Proresolutivos Especializados

SRAA: Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
TBST: solución salina tamponada con Tris-Tween®
TGF- β 1: Factor de Crecimiento Transformante β 1
VCAM-1: Vascular Cell Adhesion molecule-1
WB: Western blot
 μ L: micro gramo
 μ L: micro Litro
 μ M: micro Molar

RESUMEN

El fibroblasto cardíaco (FC) es la célula encargada de la homeostasis de la matriz extracelular (MEC), cumpliendo un rol estructural en el tejido cardíaco. Además, participan en el proceso inflamatorio aportando con citoquinas y quimioquinas; y también de esta forma participan en la homeostasis.

El FC es capaz de expresar moléculas de adhesión celular como por ejemplo ICAM-1 y VCAM-1 lo que favorece la respuesta inflamatoria y el reclutamiento de leucocitos. Se conoce que Angiotensina II (ANG II) es un fuerte inductor de respuestas inflamatorias, pero se desconoce si en FC aumenta ICAM-1 y VCAM-1.

La Resolvina E1 (RvE1) es un mediador lipídico que participa activamente en la resolución de la inflamación, y se desconoce si la RvE1 modula las respuestas inflamatorias inducidas por ANG II.

El objetivo de este trabajo fue estudiar las vías transduccionales que son activadas por un estímulo proinflamatorio como la ANG II y un estímulo proresolutivo como la RvE1, determinando además su rol como moduladores de la expresión de proteínas de adhesión en el FC. Se demostró que tanto ANG II como RvE1 activan la vía transduccional ERK1/2 y que RvE1 modula la actividad de ésta frente al estímulo de ANG II. Igualmente se evidenció que ANG II aumentó la expresión de ICAM-1 y que el pretratamiento con RvE1 disminuye este efecto de ANG II sobre el FC, lo cual se tradujo en la disminución de la adhesión de monocitos derivados del bazo (SMC) a FC inducida por ANG II.

Los resultados de este trabajo sugieren que ANG II induce la adhesión de SMC a FC a través de ICAM-1, lo cual fue prevenido por RvE1 mediante la modulación de la actividad enzimática de ERK1/2.

SUMMARY

RESOLVINA-E1 PREVENTS THE INCREASE OF ICAM-1 INDUCED BY ANGIOTENSIN II IN CARDIAC FIBROBLASTS

Cardiac fibroblast (FC) is the cell responsible for the homeostasis of the extracellular matrix (ECM), fulfilling a structural role in cardiac tissue. In addition, they participate in the inflammatory process contributing with cytokines and chemokines; and also in this way they participate in homeostasis.

FC is capable of expressing cell adhesion molecules such as ICAM-1 and VCAM-1, which favors the inflammatory response and leukocyte recruitment. It is well known that Angiotensin II (ANG II) is a strong inducer of inflammatory responses, but it is unknown if in FC increases ICAM-1 and VCAM-1.

Resolvin E1 (RvE1) is a lipid mediator that actively participates in the resolution of inflammation, and it is unknown whether RvE1 modulates the inflammatory responses induced by ANG II.

The objective of this work was to study the transduction signalling pathways that are activated by a proinflammatory stimulus such as ANG II and by a proresolutive stimulus such as RvE1, also determining its role as modulators of the expression of cell adhesion protein in the FC. We show that both ANG II and RvE1 activate the transduction pathway ERK1/2 and that RvE1 modulates its activity against the stimulation of ANG II. We also shows that ANG II increased the expression of ICAM-1 and that pretreatment with RvE1 decreased this effect of ANG II on FC, which translated into a decrease in the adhesion of monocytes cells derived from the spleen (SMC) to FC induced by ANG II. The results of this work suggest that ANG II induces the adhesion of SMC to FC through ICAM-1, and RvE1 prevented this effect by modifying the enzymatic activity of ERK1/2.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos. Son la principal causa de defunción en todo el mundo, y afectan en mayor medida a los países de ingresos bajos y medianos: más del 80% de las defunciones por esta causa se producen en esos países [OMS, 2018a].

La mayoría de las ECV pueden prevenirse actuando sobre factores de riesgo comportamentales, como el consumo de tabaco, las dietas no saludables, la obesidad, la inactividad física o el consumo nocivo de alcohol y utilizando estrategias que abarquen a toda la población [OMS, 2018b].

Uno de los factores de riesgo clave de las ECV es la hipertensión arterial (HTA), la que según evidencias actuales afecta a mil millones de personas en el mundo, y es un poderoso factor de riesgo para infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares. Los investigadores calculan que la HTA es la causa por la que mueren anualmente nueve millones de personas [OMS, 2013]. En Chile, es la principal causa de morbimortalidad y el factor de riesgo de mayor carga atribuible para la patología cardiovascular isquémica y accidente cerebrovascular. La Encuesta Nacional de Salud (ENS) 2009-2010 encontró una prevalencia de HTA de 26,9% [Lira, 2015], mientras que la ENS 2016-2017 indica que un 27,6% de la población presenta de sospecha de HTA [Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud, 2017].

1.2 FIBROBLASTO CARDÍACO

El fibroblasto cardíaco (FC) corresponde a un tipo celular de naturaleza mesenquimal que reside dentro del intersticio cardíaco [Deb & Ubil, 2014]. Los FC se identifican por su morfología aplanada en forma de huso y su capacidad para adherirse a las placas de cultivo. Además, los FC carecen de membrana basal, muestran múltiples procesos, tienen un retículo endoplásmico rugoso extenso, aparato de Golgi prominente y abundante material granular citoplasmático [Snider et al., 2009].

El FC es el encargado de mantener la homeostasis de la matriz extracelular (MEC) la cual sirve para soportar todos los tipos de células cardíacas [Deb & Ubil, 2014]. La MEC cardíaca es densa e irregular, compuesta por colágenos intersticiales, proteoglicanos, glicoproteínas. El FC aporta a la MEC con periostina, vimentina, fibronectina y colágenos tipos I, III, V y VI [Ivey & Tallquist, 2016]. También expresa diversas metaloproteinasas de matriz (MMP) que degradan la MEC. En el corazón sano, la síntesis y la descomposición

de la MEC están estrechamente reguladas, pero en los estados patológicos, el aumento de la expresión y la actividad de la MMP puede conducir a una excesiva degradación y renovación de la MEC [Deb & Ubil, 2014].

Los FC no sólo modulan la homeostasis de las proteínas de la MEC, sino que también responden a señales químicas y mecánicas. También expresan una amplia variedad de receptores a través de los cuales modulan la proliferación y/o muerte celular, autofagia, adhesión, migración, expresión de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y diferenciación a miofibroblastos cardíacos (MFC) [Diaz-Araya et al., 2015].

Cuando el FC secreta quimioquinas, citoquinas y expresa proteínas de adhesión, modifica la función de las células cardíacas residentes como los cardiomiocitos, las células del músculo liso vascular, células endoteliales y así como también a las células inmunitarias infiltrantes. Las quimioquinas secretadas por los FC desencadenan la quimiotaxis de leucocitos, la que junto con la expresión de las proteínas de adhesión celular ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) y VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) por el FC, promueven el reclutamiento de leucocitos, esto es, que promueven la migración y posteriormente la adhesión de leucocitos a los mismos FC, destacando el papel de los FC en el inicio y desarrollo de la inflamación cardíaca [Humeres et al., 2016].

1.3 ANGIOTENSINA II

El Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) y su principal producto Angiotensina II (ANG II), están en el foco de la industria farmacológica debido principalmente al tratamiento de la HTA [Herichova, 2016]. La ANG II es una hormona clave en la homeostasis cardiovascular y está involucrada en el desarrollo de múltiples ECV [Jeppessen et al., 2011]. Se ha establecido que la ANG II actúa en forma endocrina para mantener la presión arterial y el balance hidroelectrolítico. Sin embargo, las acciones de ANG II son numerosas, desde un efecto vasoactivo a un péptido capaz de regular funciones celulares altamente específicas como la secreción de citoquinas y la proliferación celular [Pérez-Díaz et al., 2006].

La ANG II regula varias funciones del FC tales como crecimiento, migración e inducción de la síntesis de colágeno. En el FC la activación de AT1-R por ANG II aumenta la expresión del Factor de Crecimiento Transformante β 1 (TGF- β 1), que es crítico para el desarrollo de la fibrosis cardíaca y la fibrosis inducida por ANG II [Kurose & Mangmool, 2016]. Respecto de la ANG II, se ha demostrado que es un péptido con características proinflamatorias, y en este sentido, se ha demostrado que en células endoteliales la ANG II induce la expresión de las proteínas ICAM-1 y VCAM-1 [Liang et al., 2015]; mientras

que en FC induce la expresión y secreción de la proteína quimioattractante de monocitos-1 (MCP-1) [Omura et al., 2004].

1.4 INFLAMACIÓN

Las respuestas inflamatorias agudas son generalmente protectoras para el huésped [Kai et al., 2005]. La inflamación cardíaca se activa para limitar el daño tisular, eliminar desechos y células muertas al iniciar el proceso de curación. La inflamación puede ser aguda como respuesta necesaria a la infección o infarto al miocardio. Sin embargo, la inflamación aguda no controlada o inapropiadamente activada puede conducir a inflamación crónica persistente como en patologías de HTA, aterosclerosis, secuelas de infarto al miocardio [Marchant et al., 2012] o enfermedades autoinmunes [Fairweather et al., 2012], conduciendo finalmente a fibrosis y disfunción del órgano. La progresión de la inflamación aguda a crónica desempeña un papel en muchas enfermedades humanas comunes, es así como en las ECV se ha determinado una gran expresión de mediadores proinflamatorios [Kain et al., 2015]. En este proceso el FC actúa como una célula centinela para la respuesta inmune cardíaca con un papel activo en el control de la persistencia de enfermedades inflamatorias regulando el cambio de inflamación aguda a persistente [Buckley, 2011].

La inflamación desencadenada por ANG II desempeña un importante papel en las ECV [Schiffrin, 2014]. La HTA, especialmente asociada a elevados niveles plasmáticos de ANG II, induce fibrosis y remodelado cardíaco [Ocaranza et al., 2014]. Además, ANG II promueve una serie de respuestas inflamatorias, incluyendo infiltración de leucocitos, diferenciación de monocitos, diferenciación de FC a MFC y expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales [Pastore et al., 1999].

1.5 ICAM-1 Y VCAM-1

Las moléculas de adhesión celular (CAM) son proteínas de superficie implicadas en la modulación de la comunicación entre una amplia variedad de tipos de células [Springer, 1990]. ICAM-1 y VCAM-1 son dos miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF) que tienen implicaciones críticas en el reclutamiento e infiltración de células inflamatorias en el sitio de injuria. VCAM-1 une linfocitos y monocitos en circulación que expresan las integrinas $\alpha 4\beta 4$ y $\alpha 4\beta 7$, mientras que ICAM-1 es el contrareceptor para integrinas $\beta 2$, como LFA-1 y Mac-1 [Bevilacqua et al., 1994]. En la inflamación cardíaca, las células residentes y los leucocitos infiltrados secretan citoquinas capaces de activar la transcripción de las proteínas de adhesión, aumentando así los niveles basales y

perpetuando el reclutamiento y la trans migración [Bevilacqua et al., 1985].

Cuando se produce daño en el tejido cardíaco, los neutrófilos son las primeras células atraídas al sitio de la lesión, seguidas por los monocitos y los linfocitos [Stramer et al., 2007]. Los neutrófilos actúan como la primera línea de defensa e inician una respuesta inflamatoria aguda para fagocitar las células muertas y facilitar la reparación del tejido liberando grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS). También secretan citoquinas proinflamatorias, MMP y catepsinas capaces de degradar la MEC [Ma et al., 2013], y activan otras células del sistema inmunitario mediante la amplificación del reclutamiento de leucocitos [Lefkowitz & Lefkowitz, 2001].

Con respecto a las vías transduccionales implicadas en la expresión de estas proteínas de adhesión, se ha demostrado que TNF- α activa las vías NF- κ B, ERK1/2 y AKT, por las cuales es capaz de aumentar la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1. A este respecto, se ha demostrado que la activación de las vías AKT y ERK1/2, desempeñan un papel importante en la expresión de moléculas de adhesión, y se ha implicado a NF- κ B como un factor de transcripción clave en respuestas inmunes e inflamatorias [Jiang et al., 2013].

1.6 ADHESIÓN CELULAR A FIBROBLASTOS CARDÍACOS

Durante la inflamación tisular, los leucocitos son atraídos por las quimioquinas y cruzan las paredes de los vasos. Una vez infiltrados, se mueven para encontrar la fuente de los quimioattractantes para finalmente limpiar el tejido lesionado, produciendo además remodelación local. El FC puede reclutar leucocitos mediante la liberación de quimioquinas, como MCP-1 y RANTES [Kacimi et al., 1998]. Los leucocitos producen citoquinas que modulan el metabolismo y la diferenciación del FC, provocando la formación de tejido de granulación con la deposición de proteínas de la MEC. La interacción de FC y leucocitos, exacerbaría la respuesta inflamatoria al aumentar la producción local de quimioquinas, aumentando el número de leucocitos y así la respuesta inflamatoria. La incapacidad de los fibroblastos para eliminar las células inmunes reclutadas provocaría la acumulación de estas en el tejido cardíaco provocando inflamación crónica [Diaz-Araya et al., 2015].

1.7 RESOLVINAS

Las Resolvinas son mediadores lipídicos proresolutivos especializados (SPM) endógenos, derivados de la síntesis transcelular entre células endoteliales y leucocitos (esto significa que se requieren dos tipos celulares para su síntesis). Los SPM se identificaron en

exudados inflamatorios y hasta el momento se han identificado cuatro familias distintas: Lipoxinas (Lx), Resolvinas (Rv), Protectinas (PD) y Maresinas (MaR). Hasta la fecha, todos los SPM parecen estar involucrados en la resolución de la inflamación aguda, actuando como potentes agonistas que pueden controlar la duración y magnitud de la inflamación [Serhan, 2009]. De entre las nuevas clases de SPM, las Rv corresponden a pequeñas moléculas estereoespecíficas identificadas por primera vez por análisis basado en sistemas lipídicos de exudados murinos asociados a la resolución espontánea de la inflamación aguda. El ácido eicosapentaenoico (EPA) da origen a la serie E de las resolvinas (RvE1), mientras que el ácido decosahexaenoico (DHA) origina la serie D de las resolvinas (RvD1). Sus receptores son ChemR23 y ALX/FPR2 (ambos asociados a proteína G del tipo G_i/G_o), respectivamente, y se encuentran distribuidos en una gran variedad de tejidos [Serhan et al., 2011].

Existe una gran cantidad de evidencia que indica que las Rv poseen poderosas acciones antiinflamatorias e inmunoregulatoras que incluyen el bloqueo de la producción de mediadores proinflamatorios y la regulación del tráfico de leucocitos [Serhan et al., 2008]. En este sentido, se ha observado *in vivo* que las Rv detienen la infiltración y trans migración de PMN, además de reducir la expresión de citoquinas [Serhan et al., 2011]. Investigaciones recientes, demuestran que las Rv no solo son más potentes que los tratamientos actuales con antiinflamatorios, sino que además, su utilidad se extiende a diversos tejidos y/o patologías incluyendo: vascular, respiratorio, dérmico, renal, ocular, cáncer, fibrosis y cicatrización, pero poco se sabe de su utilidad a nivel cardíaco [Serhan et al., 2015].

1.8 RESOLVINA E1

RvE1 se biosintetiza a partir de EPA. Actúa de forma autocrina y paracrina para luego ser inactivada localmente por metabolismo específico. Este mediador interactúa selectivamente con receptores específicos para inhibir la infiltración adicional de leucocitos, la generación de citoquinas y quimioquinas, inducir la apoptosis de los PMN y su eliminación por los macrófagos, y así de esta forma restaura la homeostasis tisular [Balta et al., 2017].

La RvE1 interactúa con las células por medio de receptor acoplado a proteína G (GPCR). El receptor ChemR23 transduce señales en monocitos y células dendríticas, estimulando la regulación negativa de la expresión de IL-12 [Serhan et al., 2011]. Además, las RvE1 también interactúan con BLT1 (receptor de leucotrienos B₄ LTB₄) expresado en PMN [Arita et al., 2007]. Por lo tanto, RvE1 interactúa selectivamente con los GPCR presentes

en distintas células para regular el proceso inflamatorio y promover la resolución modulando las vías transduccionales de fosforilación intracelular [Arita et al., 2005].

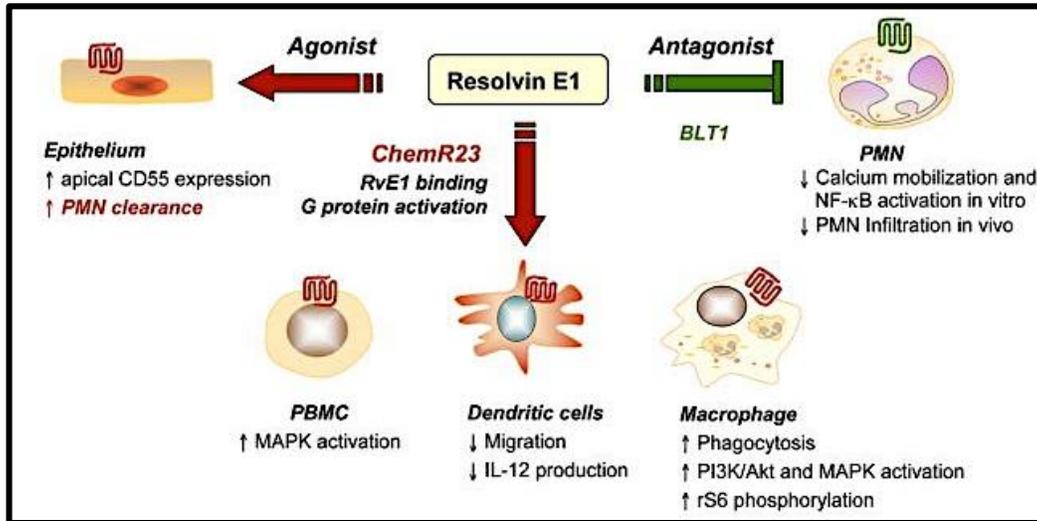


Figura 1. Acciones multinivel y de tipo celular específicas de RvE1. RvE1 activa MAPK en monocitos, provoca fosforilación de rS6 en macrófagos y reduce la producción y migración de IL-12 en células dendríticas. RvE1 también induce la expresión de una molécula antiadhesiva CD55 en la superficie apical del epitelio de la mucosa, promoviendo la eliminación de PMN a través de la superficie de la mucosa. Además, RvE1 interactúa directamente con BLT1 en PMN humanos, inhibiendo la movilización de calcio, la activación de NF-κB in vitro y la infiltración de PMN in vivo. Por lo tanto, RvE1 actúa como un agonista para ChemR23 en células mononucleares y dendríticas, así como un antagonista para señales BLT1 en PMN [Serhan et al., 2011].

1.9 RELACIÓN ENTRE FIBROBLASTO CARDÍACO Y RESOLVINA E1.

Actualmente no hay publicaciones sobre RvE1 sobre FC, pero si las hay en fibroblastos renales [Qu et al., 2012]. Resultados en nuestro laboratorio muestran que en FC tratados con RvE1 y LPS se reducen los niveles de expresión de proteínas de adhesión y de esta manera la adhesión de leucocitos al FC, favoreciendo la resolución de la inflamación [Ramírez, 2017].

Por otro lado, y tomando en cuenta los antecedentes anteriormente expuestos, es conocido que en FC, la ANG II contribuye a la quimiotaxis de leucocitos, ya que desencadena la expresión de MCP-1 [Omura et al., 2004], pero no se sabe si es capaz de inducir la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC. Por lo tanto, estudiar si en FC la ANG II induce la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 y de esta forma modular procesos inflamatorios puede ser relevante en el desarrollo de las ECV. Más aún, el estudiar si la RvE1 puede modular los efectos mediados por ANG II originaría nuevos enfoques terapéuticos en la inflamación cardíaca. Con estos antecedentes se formula la siguiente hipótesis:

2. HIPÓTESIS

La Resolvina E1 disminuye la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducida por ANG II, regulando sus vías transduccionales.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar en los fibroblastos cardíacos si la Resolvina E1 disminuye la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidas por Angiotensina II.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demostrar que Angiotensina II aumenta la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en fibroblastos cardíacos.
- Demostrar que Angiotensina II induce el aumento de ICAM-1 y VCAM-1 a través de la activación de las vías MAPK/ ERK1/2, AKT y NF- κ B.
- Demostrar que la Resolvina E1 disminuye la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducida por Angiotensina II en fibroblastos cardíacos, modulando la activación de las vías MAPK/ ERK1/2, AKT y NF- κ B.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos.

Suero fetal bovino (FBS), tripsina/EDTA, estándar de peso molecular y compuestos orgánicos e inorgánicos fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Germany). Reactivos para quimioluminiscencia (ECL) fueron comprados en PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Material de plástico estéril fue obtenido en Corning Inc. (New York, NY). Anticuerpo primario p-p44/p42 MAPK (T202/Y204) rabbit mAb, p-NF-kappaB p65 (s536) (93H1) rabbit mAb, p-AKT (S473) (D93), GAPDH (14C10) rabbit mAb, anticuerpo secundario Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody, PD98059 fueron comprados a Cell Signaling Technology (CST)(MI, EEUU). Anticuerpo primario anti ICAM-1 fue adquirido en Santa Cruz Biotechnology Inc. (Texas, EEUU). Anticuerpo primario anti VCAM-1 fue comprado en Abcam (Cambridge, MA). Ficoll -Histopaque® 1083 y Angiotensina II humana fue comprado a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Colagenasa tipo II (CAS 9001-12-1) y Trypan Blue Stain (CAS 15250-061) fueron comprados a Life Technologies Corporation (CA, EEUU). RvE1 (CAS 872993-05- 0) fue comprado a Cayman Chemical Company (MI, EEUU).

5.2 Animales.

Ratas Sprague-Dawley adultas de 6-8 semanas de edad fueron obtenidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los animales se mantuvieron en jaulas (con ciclos de luz/oscuridad de 12 h) y libre acceso a alimento y agua. Todos los estudios fueron desarrollados cumpliendo la Guía de la NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, actualizada en el 2011 (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-Use-of-Laboratory-Animals>), y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

5.3 Aislamiento de fibroblastos cardíacos.

FC fueron aislados de ratas macho Sprague-Dawley usando digestión enzimática. Las ratas fueron anestesiadas con una inyección de ketamina/xilazina 2:1 y los corazones extraídos en un ambiente aséptico. Se removieron las aurículas y los ventrículos fueron cortados en trozos pequeños (1-2 mm) para luego ser sometidos a incubación con colagenasa tipo II. El producto de la digestión fue separado mediante centrifugación a 1000 RPM por 10 min. El pellet fue resuspendido en 10 ml de DMEM/F12 suplementado con 10% de FBS y antibióticos (estreptomocina 100 µg/ml, penicilina 100 UI/ml,

anfotericina B 0.25 µg/ml) y cultivados en una atmósfera con 5%CO₂/95%O₂ y 37°C hasta confluencia (10-13 días).

5.4 Western blot (WB).

Se usó el sistema de WesternBlot para evaluar los niveles de expresión de proteínas fosforiladas y moléculas de adhesión. La proteína celular total se extrajo desde placas de 60 mm que se lavaron con PBS frío no estéril (1 mL x 2 veces). Luego se agregó 60 µL buffer de lisis y se raspó cuidadosamente. Se recolectó el contenido líquido de la placa en tubos Eppendorf. Se centrifugó a 4°C, 15.000 RPM por 10 min. Se recolectó 55 µL de muestra. El método de Bradford se usó para determinar la concentración de proteína e igualar en las muestras de los diferentes grupos mediante ajuste. Para esto se tomó 5 µL de muestra para cuantificar por Bradford. El resto de 50 µL de muestra se le agregó 1/3 de buffer de carga desnaturante conteniendo beta-mercaptoetanol (16,6 mL), lo cuales se colocaron en agua a 100°C por 5 minutos para denaturar las proteínas.

La electroforesis mediante la técnica SDS-PAGE se realizó en base a 25 µg de carga total de proteína/carril (cantidades equivalentes de proteínas fueron separadas). Después de la electroforesis, la proteína en el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. El gel se bloqueó con leche sin materia grasa en polvo al 5% (preparada con 0,5% de solución salina tamponada con Tris-Tween® (TBST)) a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadió anticuerpos primarios respectivos, durante la noche a 4°C (P-p44/p42 MAPK 1:2000, P-NF-κB p65 1:1000, P-AKT 1:2000, ICAM-1 1:5000, VCAM-1 1:10.000 y GAPDH 1:3000). Se incubó el anticuerpo secundario (1:3000) por 2 h a temperatura ambiente. Luego se lavó tres veces (5 min) en un agitador orbital a temperatura ambiente con TBST. Se utilizó ECL para la inmunodetección. Los niveles de proteína fueron determinados mediante densitometría utilizando ImageJ (Bethesda, MD) y normalizados con el nivel correspondiente de GAPDH.

5.5 Aislamiento de SMC a partir de bazo.

Para la obtención de SMC (células mononucleares de bazo, principalmente linfocitos y monocitos), desde la cavidad abdominal se disectaron bazos de ratas Sprague Dawley, los cuales fueron recibidos en una placa con 4 mL de PBS 1X estéril para luego ser triturado y filtrado a través de un tamiz de disociación celular (tamaño de poro: 380 µm) hasta la obtención de una suspensión homogénea. Para depletar granulocitos y eritrocitos, se utilizó Ficoll-Histopaque® 1083 en relación 1:1 con lo obtenido en la suspensión celular, para luego ser centrifugado en centrífuga swinging bucket con rotor en

180° a temperatura ambiente por 30 minutos y 400G. La interface rica en SMC se recibió y se lavó dos veces con PBS 1X, pH 7.4. Finalmente, los SMC purificados fueron centrifugados y resuspendidos en PBS + 3% FBS para experimentos posteriores.

5.6 Ensayo de adhesión in vitro y tinción con cristal violeta.

Se sembraron 50 mil células en DMEM-F12 + FBS 10% en placas de 35 mm para estímulo correspondiente. Luego de pasadas las horas de estímulo, se retiró el medio y se lavó una vez con PBS 1X estéril y luego se agregó DMEM-F12. Teniendo este nuevo medio de cultivo, se agregó células leucocitarias en relación 1:5 (FC: SMC) y se dejó actuar durante dos horas. Se retiró el medio y se lavó suavemente, dos veces con PBS 1X estéril. Se agregó 1 ml de cristal violeta (5 mg/ml, MeOH 20%) y se dejó actuar durante 20 minutos. A continuación, se lavó las placas con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente hasta analizarlas mediante microscopía óptica.

5.7 Análisis estadístico.

Todos los datos son presentados como el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Las diferencias entre parámetros fueron evaluados mediante análisis ANOVA de dos vías por cada variable. Se continuó el análisis con el test de Tukey para comparar los efectos de las distintas condiciones en los parámetros. El nivel de significancia establecido fue de $p < 0.05$. Se utilizó el software GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA) para los análisis estadísticos.

6. RESULTADOS

6.1 Activación de las vías transduccionales ERK 1/2, NF- κ B y AKT inducidas por ANG II en FC.

Es bien conocido que ANG II por medio del AT1-R es capaz de modular varias funciones en el FC, por lo que fue de interés conocer las vías transduccionales activadas por ANG II en nuestro modelo. Para ello se realizó un estudio temporal de la fosforilación de las proteínas ERK1/2, NF- κ B y AKT frente un estímulo como ANG II 1 μ M. Como se aprecia, en la Figura 2, ANG II a los 15 min indujo la fosforilación y consecuentemente la activación de la proteína ERK1/2 (figura 2A). Por otro lado, a los mismos tiempos de estudio, los resultados mostraron que ANG II no fue capaz de inducir la activación de las vías AKT (figura 2B) o NF- κ B (figura 2C).

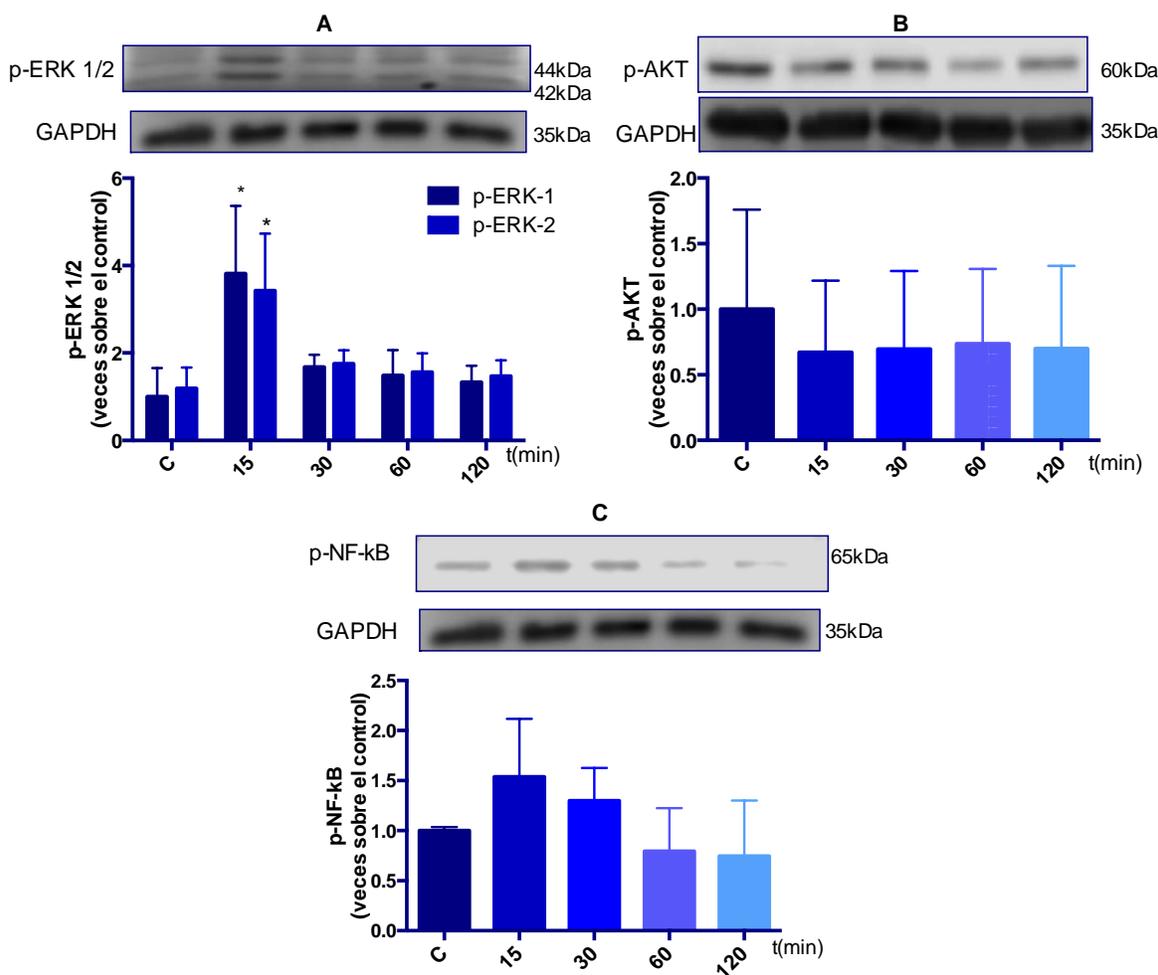


Figura 2. Efecto de ANG II en las vías transduccionales ERK1/2, NF- κ B y AKT. Los FC se trataron con ANG II 1 μ M, y se determinó la activación de las vías ERK1/2 (A), PI3K/AKT (B) y NF- κ B (C), entre 0-120 min mediante WB. En la imagen superior se observa una imagen representativa y en la inferior al análisis gráfico. Como control de carga se utilizó GAPDH. * $p < 0,05$ vs control. Los resultados se expresan como promedio \pm SD. (n=3).

6.2 Activación de las vías transduccionales ERK 1/2, NF-κB y AKT inducidas por RvE1 en FC.

En la literatura existe información controversial, aunque en otros tipos celulares, respecto de las vías transduccionales activada por RvE1. Por lo tanto, y debido a la falta de evidencias que haga referencia a cómo actúa la RvE1 en el FC de rata adulta, se evaluó si RvE1 (100 nM) modula las vías transduccionales ERK1/2, AKT y NF-κB. Como se aprecia en la Figura 3, la RvE1 indujo la fosforilación y consecuentemente la activación de la proteína ERK1/2 (figura 3A) de forma significativa a los 15 min. Por otro lado, a los mismos tiempos de estudio, los resultados mostraron que no ocurrió una activación significativa de las vías AKT (Figura 3B) o NF-κB (Figura 3C).

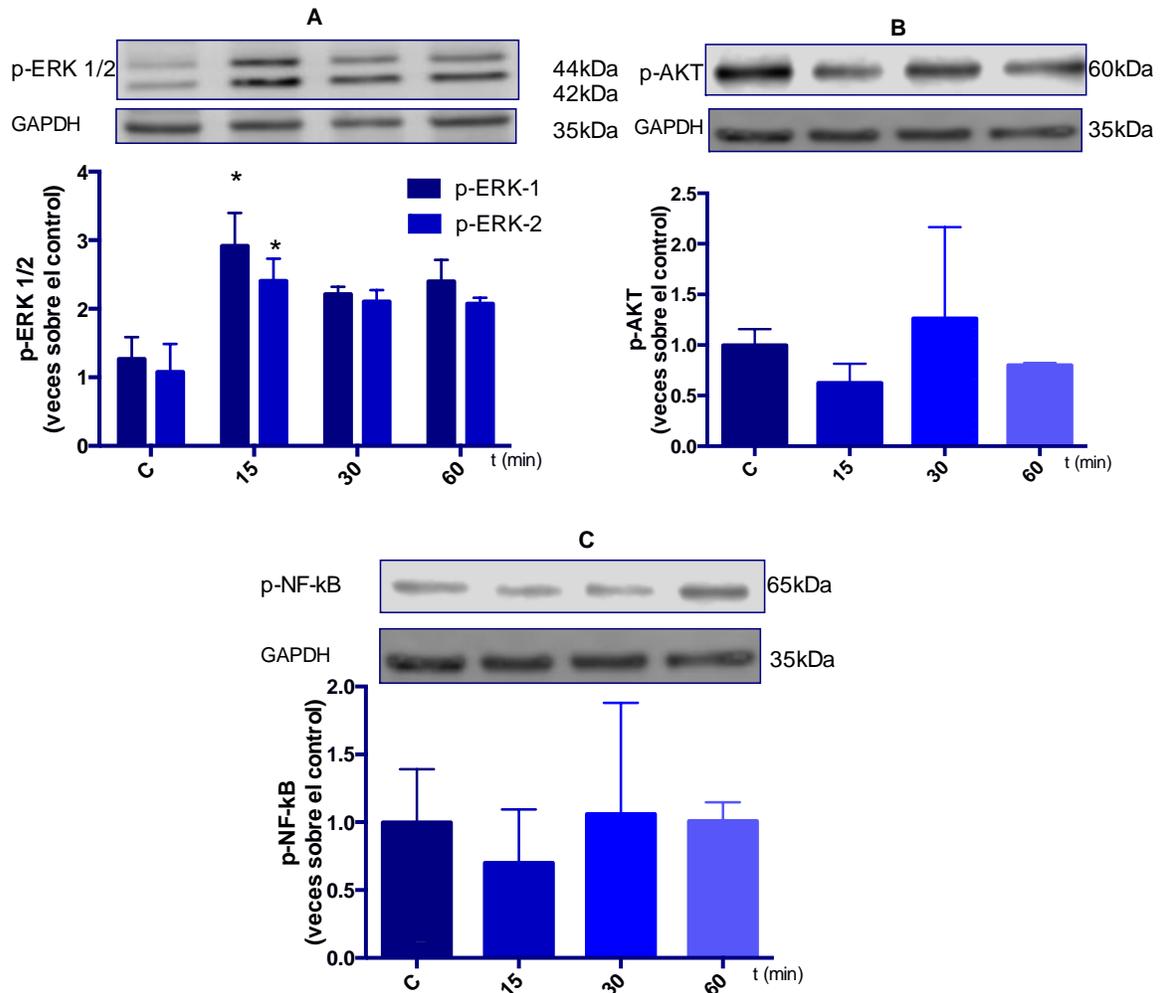


Figura 3. Efecto de RvE1 en las vías transduccionales ERK1/2, NF-κB y AKT. Los FC se trataron con RvE1 100 nM y se determinó la activación de las vías ERK 1/2 (A), PI3K/AKT (B) y NF-κB (C), entre 0-60 min mediante WB. En la imagen superior se observa una imagen representativa y en la inferior al análisis gráfico. Como control de carga se utilizó GAPDH. * $p < 0,05$ vs control. Los resultados se expresan como promedio \pm SD. (n=3).

6.3 Modulación de la vía transduccional ERK1/2 activada por RvE1 y ANG II en FC.

Debido a que en los experimentos anteriores la única vía transduccional que mostró activación en los tiempos propuestos fue la vía ERK1/2, el siguiente experimento buscó encontrar cómo la activación de esta vía transduccional (fosforilación), se ve afectada por ambos estímulos. Nuestros resultados en la Figura 4, muestran en primer lugar que a los 15 min tanto RvE1 como ANG II inducen una marcada fosforilación de las proteínas ERK1/2 con respecto al control. Sin embargo, el pretratamiento de los FC solo con RvE1 durante 15 min y luego con ANG II por otros 15 min mostró que hay una disminución en la fosforilación de ERK1/2, siendo este resultado estadísticamente significativo con respecto a la activación provocada por ANG II a los 15 min.

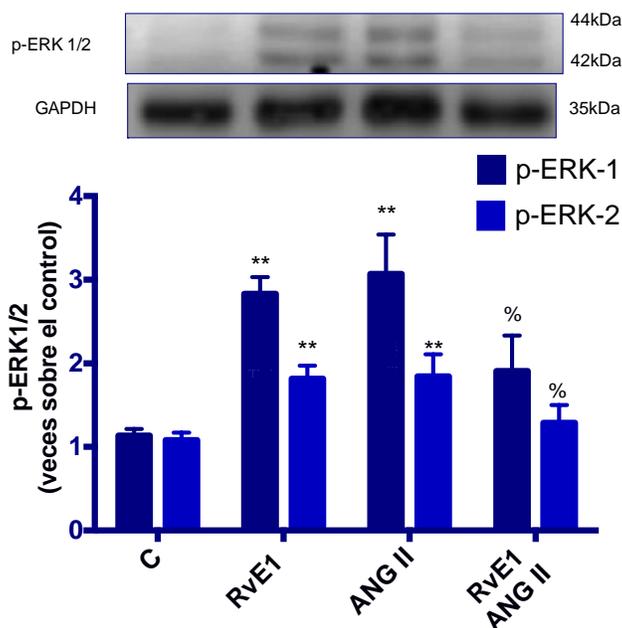


Figura 4. Efecto de RvE1 y ANG II en la activación de la vía ERK1/2. FC se trataron con RvE1 100 nM 15 min y con ANG II 1 μ M 15 min. También los FC se pretrataron con RvE1 100 nM 15 min y luego ANG II 1 μ M 15 min. Se determinó la activación de la vía transduccional ERK1/2 mediante la técnica de WB. En la imagen superior se observa una imagen representativa y en la inferior al análisis gráfico. Como control de carga se utilizó GAPDH. ** $p < 0,01$ vs control y % $p < 0,05$ vs ANG II. Los resultados se expresan como promedio \pm SD. (n=3).

6.4 Evaluación de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidas por RvE1 y ANG II en FC.

Las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 participan en el proceso inflamatorio y son responsables de la interacción entre diversos tipos celulares. Se desconoce si RvE1 es capaz de modular la expresión de proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 inducidas por ANG II, por lo cual se estudiaron sus niveles de expresión.

Los resultados muestran en la Figura 5A que el tratamiento con ANG II durante 24 h indujo un aumento estadísticamente significativo en la expresión de ICAM-1 con respecto al control. Por otro lado, los resultados muestran que RvE1 también por 24 h, no fue capaz de inducir cambios en los niveles de expresión de la proteína ICAM-1; sin embargo, el pretratamiento con RvE1 durante 15 min, previno de una manera estadísticamente significativa el aumento inducido por ANG II por 24 h. Como control positivo se utilizó LPS, el cual es un reconocido estímulo del receptor TLR4 que induce la expresión de ICAM-1.

Los resultados de la Figura 5B, muestran que el tratamiento durante 24 h con ANG II indujo una disminución estadísticamente significativa de la expresión de VCAM-1 con respecto al control. Por otro lado, los resultados muestran que RvE1 también por 24 h, no indujo cambios en los niveles de expresión de la proteína VCAM-1; sin embargo, el pretratamiento con RvE1 durante 15 min, no previno la disminución inducida por ANG II por 24 h. Como control positivo se utilizó LPS, el cual es un reconocido estímulo del receptor TLR4 que induce la expresión de VCAM-1.

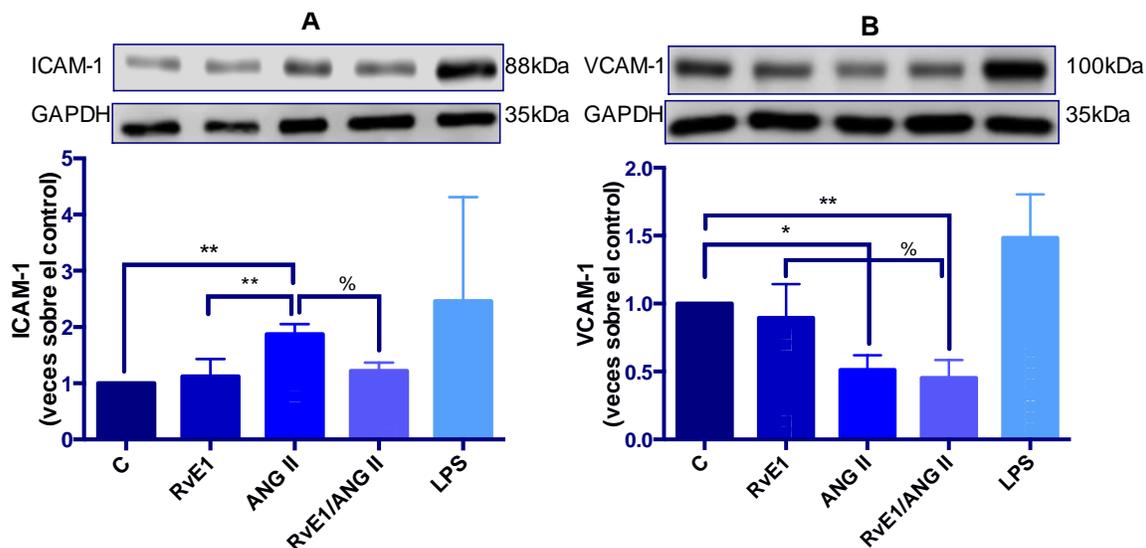


Figura 5. Efecto de RvE1 y ANG II sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1. Los FC se trataron con RvE1 (100 nM por 24 h), ANG II (1 μ M por 24 h), pretratamiento de RvE1 (100 nM por 15 min) y luego ANG II (1 μ M por 24 h). LPS por 24 h fue utilizado como control positivo. Se determinaron los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 por WB. En la imagen superior se observa una imagen representativa y en la inferior al análisis gráfico. Como control de carga se utilizó GAPDH. (A) ** $p < 0,01$ ANG II vs control y ANG II vs RvE1; % $p < 0,05$ RvE1/ANG II vs ANG II. (B) * $p < 0,05$ ANG II y ** $p < 0,01$ RvE1/ANG II vs Control; % $p < 0,05$ RvE1/ANG II vs RvE1. Los resultados se expresan como promedio \pm SD. (n=3).

6.5 Evaluación de la participación de la vía ERK1/2 en la modulación de los niveles de expresión de ICAM-1 por ANG II en FC.

En nuestro estudio de vías de transducción activadas por ANG II solo obtuvimos la activación de la vía ERK1/2. Por lo tanto, estudiamos si esta vía estaba implicada en los niveles de expresión de ICAM-1. Para ello, se utilizó el inhibidor de ERK1/2 (PD98059 10 μ M). Los FC fueron pretratados con el inhibidor por 30 min para luego ser estimulados con ANG II 1 μ M por 24 h. Los resultados muestran en la Figura 6, que ANG II tiende a aumentar los niveles de expresión de ICAM-1, aunque en este experimento no alcanzó una diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado, en el pretratamiento con PD98059 durante 30 min y luego ANG II por 24 h, se observó una tendencia a disminuir los niveles de expresión en comparación con los niveles de expresión logrados por ANG II.

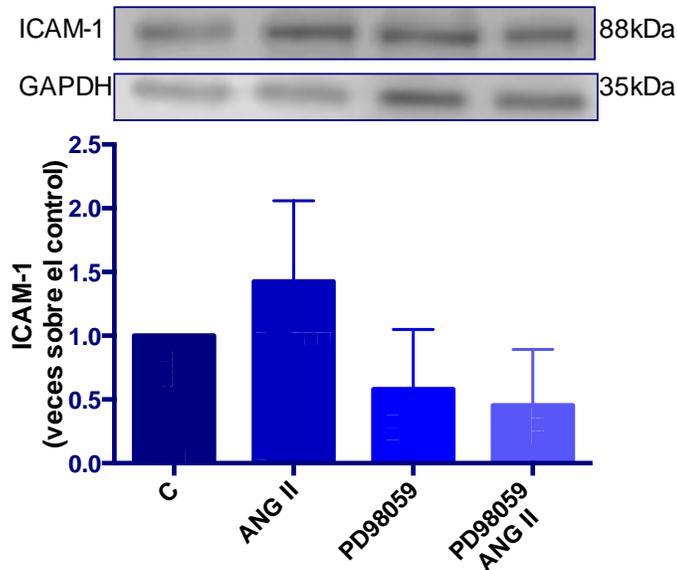


Figura 6. Participación de vía transduccional ERK1/2 en la expresión de ICAM-1 inducido por ANG II. Los FC se trataron con ANG II (1 μ M por 24 h), PD98059 (10 μ M por 24 h) y PD98059 (10 μ M por 30 min/ANG II por 24 h). Se determinó la expresión de ICAM-1 por WB. En la imagen superior se observa una imagen representativa y en la inferior al análisis gráfico. Como control de carga se utilizó GAPDH. Los resultados se expresan como promedio \pm SD. (n=3).

6.6 Evaluación del efecto de RvE1 en la adhesión de SMC sobre FC inducida por ANG II.

Para determinar el efecto de ANG II y RvE1 sobre la adhesión de SMC sobre FC, se realizaron ensayos de adhesión con FC estimulados con ANG II 1 μ M y RvE1 100 nM durante 24 h. Una vez que se cumplieron los tiempos de estímulo, los FC fueron incubados con SMC, según protocolo de adhesión (ver sección métodos), en donde luego se obtuvieron las fotografías de la Figura 7 con un aumento 10x por microscopía. En los resultados de la Figura 8, se aprecia que ANG II es capaz de aumentar la adhesión de SMC significativamente con respecto al control, mientras que los FC estimulados solo con RvE1 no se vio afectada su capacidad de adhesión. Por otro lado, al realizar primero un estímulo con RvE1 15 min y luego con ANG II por 24 h se observa una notable disminución en la adhesión. Al usar PD98059 10 μ M por 24 h (inhibidor ERK1/2) no se observan diferencias con respecto al control pero si con respecto a la adhesión producida por ANG II.

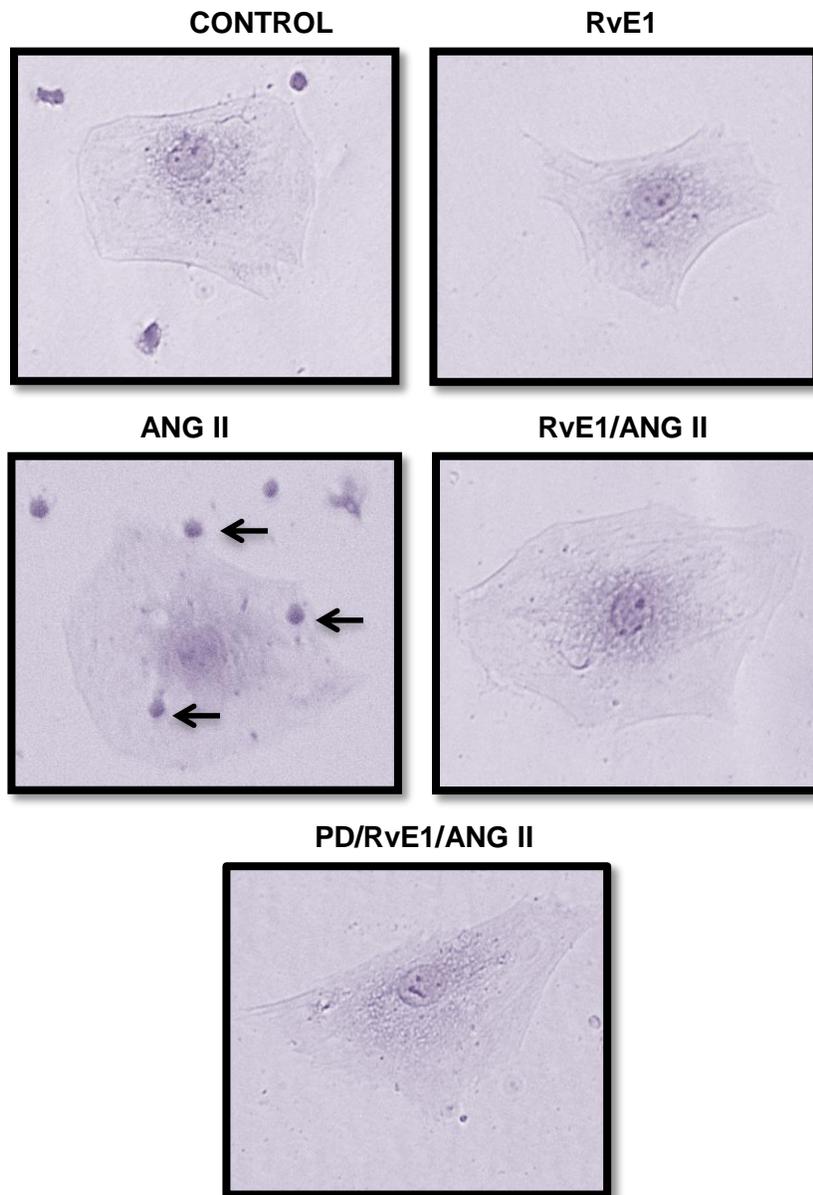


Figura 7. Fotografías representativas (10X) que demuestra la adhesión de SMC sobre FC. Las flechas señalan SMC en distintas condiciones de tratamiento. Se realizó tinción con cristal violeta.

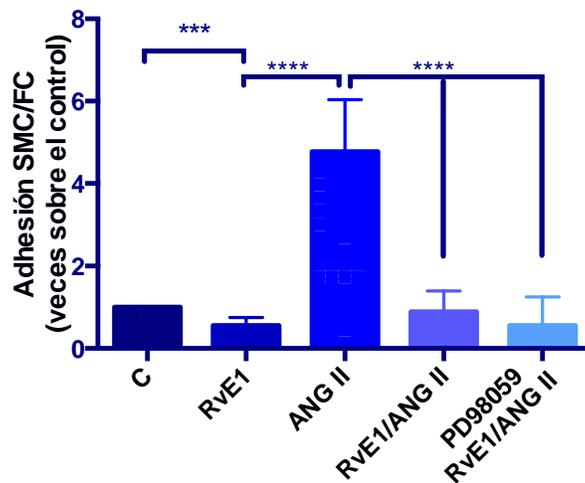


Figura 8. RvE1 disminuye la adhesión de SMC inducida por ANG II en el FC. Se sembraron 50.000 FC/pocillo y estimularon con RvE1 (100 nM por 24 h), ANG II (1µM por 24 h), RvE1 (100 nM por 15 min)/ANG II(1µM por 24 h) y PD98059 (10 µM por 30 min)/ RvE1 (100 nM, por 15 min)/ANG II (1µM por 24 h). Los SMC fueron aislados según protocolo para ser agregados durante 2 h con los FC. ***p<0.001 y ****p<0,0001. Los resultados se expresan como promedio ± SD, de la suma de los SMC adheridos a FC en 10 secciones diferentes de la muestra. (n=3).

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se investigaron las vías transduccionales activadas por ANG II y RvE1; y su relación con el rol proinflamatorio de la ANG II, así como también con el rol antiinflamatorio y pro-resolutivo de RvE1 frente al estímulo ANG II, a través del estudio de los niveles de expresión de proteínas ICAM-1 y VCAM-1 y su importancia en la adhesión celular.

Los principales resultados obtenidos demuestran que ANG II es capaz de aumentar la expresión de ICAM-1 a través de la activación de la vía ERK1/2. RvE1 es capaz de modular la activación de la vía ERK1/2 inducida por ANG II. Además, RvE1 no provoca aumentos en los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1, pero si es capaz de producir una disminución de la expresión de ICAM-1 inducida por ANG II, y por consiguiente una disminución en la adhesión celular.

7.1 Activación de las vías transduccionales ERK 1/2, NF- κ B y AKT inducidas por ANG II en FC.

Entre los procesos bien conocidos y que son mediados por ANG II en el FC es que induce un aumento en la proliferación celular y en la síntesis de colágeno tipo I, los que si se hacen crónicos conducen a fibrosis cardíaca. Sin embargo, son menos conocidos los efectos de ANG II a nivel proinflamatorio.

En primer lugar, en FC de rata adulta estudiamos las vías transduccionales que son activadas por ANG II. Las MAPKs son proteínas quinasas específicas de serina/treonina que responden a estímulos extracelulares y regulan diversas actividades celulares, tales como proliferación y sobrevida. La vía transduccional ERK1/2, se activa preferentemente en respuesta a las hormonas y regula la proliferación celular [Zhang et al., 2012].

Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la fosforilación de la proteína ERK1/2 al ser estimulada con ANG II 1 μ M, la cual va disminuyendo hasta niveles similares al control a los 60 min. Otros estudios han mostrado que la fosforilación de esta proteína ya está presente desde los 5 min con ANG II 100 nM [Olson et al., 2008] o a los 10 min con ANG II 1nM [Okada et al., 2010]. De hecho, en modelos de FC de ratón neonato estimulados con ANG II, la activación de esta vía va en aumento desde 2 h hasta 6 h post estímulo [Gang et al., 2018], mientras que en FC de rata neonata Sprague Dawley el máximo se logra a las 3 h y luego disminuye [Zhang et al., 2012].

La vía de señalización AKT se considera que juega un papel crítico en la mediación de las señales de crecimiento en una amplia gama de tipos de células [He et al., 2008]. En nuestro estudio, la fosforilación de AKT inducida por ANG II, en los tiempos escogidos para realizar las mediciones, no demostró variaciones con respecto al control. En la literatura existen resultados diferentes a los nuestros con respecto a la fosforilación de la vía AKT, los que dependen del estímulo y del tipo celular. En particular en nuestro laboratorio hemos demostrado que la vía AKT se fosforila a partir de los 30 min cuando se estimula con LPS [Bolívar et al., 2017]. Por otro lado, en otro estudio en FC de ratas machos, que fueron tratados con ANG II 1 μ M y se vio un aumento temprano en la fosforilación de AKT a los 2,5 min, volviendo a un nivel basal a los 10 min [Tian et al., 2003]. Otro estudio también en FC de ratas adultas mostró que la activación de AKT por Arginina Vasopresina (AVP) 0,1 μ M se logró a los 5 min post tratamiento [He et al., 2008]. Todo lo anterior, tomado en su conjunto nos permite concluir que la activación de esta vía es dependiente del estímulo y del tiempo de estímulo; por lo tanto, en nuestros resultados no descartamos que la activación podría ser a tiempos más tempranos que los establecidos en este estudio. Finalmente, es bien conocido que el estado de fosforilación de las proteínas de señalización es dependientes del fino equilibrio entre quinasas y fosfatasas, las cuales pueden fosforilar y defosforilar en cuestión de segundos o minutos.

Por otro lado, el factor de transcripción NF- κ B desempeña un papel fundamental en las respuestas inflamatorias ya que induce la expresión de varias citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6. Al evaluar la activación de NF- κ B no se obtuvo activación alguna de la vía de manera significativa. En la literatura existen resultados diferentes a los nuestros con respecto a la fosforilación de la vía NF- κ B, los que dependen del estímulo y del tipo celular. En particular en nuestro laboratorio hemos demostrado que la vía NF- κ B se fosforila a partir de los 5 min cuando es estimulado con LPS y su fosforilación permanece por 30 min [Bolívar et al., 2017]. Nuestros resultados son coincidentes con experimentos en donde no ocurrió un aumento en los niveles de fosforilación de NF- κ B por ANG II 1 nM a los 10 min [Okada et al., 2010]. Por otro lado, la activación de esta vía también se ha observado a tiempos más tardíos, por ejemplo, hay aumentos inducidos por ANG II a las 6 y 24 h en modelo murinos C57BL/J6 [Chen et al., 2015], y del mismo modo, en otra investigación se determinó que ANG II a un tiempo de 48 h provoca la activación de NF- κ B [Thakur et al., 2014]. En resumen, en conjunto nuestros resultados y los de la literatura

podemos concluir que ANG II no induce la activación de la vía NF- κ B a tiempos tempranos.

7.2 Activación de las vías transduccionales ERK 1/2, NF- κ B y AKT inducidas por RvE1 en FC.

Hasta la fecha no hay datos que nos indiquen las vías activadas por RvE1 en el FC de ratas adultas. Los resultados obtenidos en primera instancia nos indican que las vías transduccionales AKT y NF- κ B no son activadas en los tiempos analizados. Mientras que nuestros resultados mostraron que RvE1 induce una temprana fosforilación de las proteínas ERK1/2 a los 15 min. En la literatura encontramos que en fibroblastos de riñón de rata, hay una activación en la vía AKT entre 6 y 15 min, de forma similar en la vía ERK1/2 [Qu et al., 2012]. Por otro lado, en fibroblastos sinoviales, la activación del receptor ChemR-23 por chemerina activa AKT con un máximo a los 5 min [Kaneko et al, 2011]. Lo anterior reafirma que la vía AKT es de activación temprana, y que su activación es tiempo y estímulo dependiente, que en nuestro caso no fue posible apreciar. Por otro lado, se ha observado que la RvE1 no aumenta la activación y translocación de NF- κ B en células RAW264.7 [Flescher et al., 2014]; sin embargo, en células HEK-ChemR23 se observó que al tratar con *toxina pertussis* se inhibió la activación de NF- κ B inducida por RvE1 [Arita et al., 2005].

Conocer como RvE1 participa en el proceso inflamatorio y promueve la resolución es interesante y novedoso. Resolvin E1 activa directamente ChemR23 en células mononucleares y células dendríticas, y en neutrófilos humanos inhibe directamente el receptor de leucotrieno B4, denominado BLT1. De esta forma, modula el comportamiento de diversos tipos de células inmunes. Se ha demostrado que RvE1 disminuye la infiltración de PMN, que aumenta la fagocitosis de los neutrófilos apoptóticos por los macrófagos y que inhibe la respuesta inflamatoria del tejido huésped [Torricelli et al., 2014]. Estos resultados indican que RvE1 desencadena un amplio perfil de estímulos y la vía transduccional que activa para ejercer los efectos proresolutivos es dependiente del tipo celular.

7.3 Modulación de la vía transduccional ERK1/2 que ejerce RvE1 sobre ANG II en FC.

En el presente estudio, solo la vía ERK1/2 mostró ser activada por los estímulos de ANG II y RvE1; sin embargo, desconocemos como estas vías interaccionan entre sí. Por otro lado, la RvE1 tiene un marcado efecto antiinflamatorio [Serhan et al., 2011], mientras que

ANG II tiene efectos proinflamatorios. Por lo tanto, evaluar la conversación cruzada entre las vías activadas por ambos estímulos fue un interesante objetivo. En este sentido, y en el contexto de enfermedades cardíacas, RvE1 ha sido capaz de demostrar actividad protectora frente a determinados estímulos agresores. Se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro*, y los resultados indican que RvE1 aumentó la activación de las vías transduccionales AKT y ERK1/2. *In vitro* se encontró un efecto protector directo en los cardiomiocitos contra la lesión por isquemia-reperusión; mientras que en el estudio *in vivo* disminuyó los límites de tamaño del infarto cuando se administra por vía intravenosa antes de la reperusión [Keyes et al., 2010].

En nuestro caso en particular el pretratamiento con RvE1 15 min fue capaz de disminuir la fosforilación ERK1/2 inducida por ANG II también a los 15 min. Estos resultados son bastantes interesantes y originan un gran variedad de preguntas a las cuales no tenemos respuestas. Debido a que ANG II y RvE1 inducen la fosforilación de ERK1/2, nosotros esperamos un efecto sinérgico entre ambos estímulos, es decir un mayor nivel de fosforilación de la proteína ERK1/2; sin embargo, ocurrió lo contrario y se observó disminución de la activación provocada por ANG II. Uno de los motivos por los cuales se podría explicar esto, es que la RvE1 en primera instancia, llevó a cabo su activación ocupando gran parte de ERK1/2 disponible en la célula y luego ANG II tenía menos cantidad de ERK1/2 para activar. Lo anterior se puede explicar debido a que la literatura describe que los estímulos para las fosforilaciones llegan a activar en primera instancia hasta un 70% del total de la ERK1/2 celular [Wainstein & Seger, 2016], quedando menos disponible para un segundo estímulo. Otro motivo puede deberse a la existencia de moléculas reguladoras de la magnitud de la fosforilación de ERK1/2, como por ejemplo KSR, Ubiquitina Ligasa E3, MP-1. Es por esto, que estímulos distintos podrían ser modulados por estos reguladores para dar diferencias cuali y cuantitativas en la actividad [Ebisuya et al., 2005]. La comprensión de estos fenómenos puede ser motivo para estudios posteriores.

En otros estudios se ha demostrado que RvE1 es capaz de inhibir la fosforilación de las vías ERK1/2 y AKT inducida por Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas - BB (PDGF-BB) después de 8 h [Qu et al., 2012]. Para seguir resaltando un posible rol protector de RvE1, se ha visto que en otros modelos es capaz de modular la activación de vías transduccionales activadas por otros estímulos. Por ejemplo, al usar RvE1 como pretratamiento en un modelo de lesión hepática inducida por Concanavalina A, se demostró que RvE1 fue capaz de inhibir la activación de NF-κB y la degradación de IκBα

e IKK β , además de la inhibición de las MAPKs; JNK, p38 y ERK1/2 [Kuang et al., 2016]. Resultados similares se obtuvieron con NF- κ B en células BV2 pretratadas con RvE1 y luego con LPS, aunque en las vías MAPK: p38 y ERK1/2 no se observaron cambios ni por LPS ni por RvE1 [Rey et al., 2016].

Con estos resultados en forma colectiva podríamos sugerir un posible rol protector de RvE1 debido a algún tipo de interacción en las vías que frenarían la activación y los efectos proinflamatorios que puede llevar a cabo la ANG II en el FC.

7.4 Evaluación de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidas por RvE1 y ANG II en FC.

En los FC las proteínas ICAM-1 y VCAM-1 están expresadas constitutivamente, pero durante un evento inflamatorio cardíaco se ha visto un aumento en los niveles de expresión de CAMs, los que se han asociado a la infiltración y activación de leucocitos al sitio de injuria. Tal incremento se ha reportado al estimular células cardíacas con LPS, IL-1, TGF- β 1, ésteres de forbol, entre otros [Olivares-Silva., 2016]. Resultados previos de nuestro laboratorio han mostrado que la RvE1 por si sola en una manera dependiente de la concentración y del tiempo no modificó significativamente los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 [Ramírez., 2017]; y resultados de esta tesis corroboran esos hallazgos previos, pues nuestros resultados no muestran aumentos en los niveles de las CAMs inducidos por RvE1.

Por otro lado, nuestros resultados demostraron que ANG II fue capaz de provocar un aumento significativo en la expresión de ICAM-1, mientras que los niveles de VCAM-1 tienden a disminuir. Sin embargo, el pretratamiento con RvE1 y luego con ANG II logra una disminución significativa en los niveles de ICAM-1 con respecto a los niveles inducidos por ANG II. Estos resultados son coincidentes con hallazgos previos de nuestro laboratorio, en los cuales demostramos que la RvE1 disminuyó los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FCN estimulados con LPS, aunque de una manera no estadísticamente significativa [Ramírez., 2017]. Por otro lado, la disminución en los niveles de expresión de VCAM-1 inducidos por ANG II no fueron modificados por RvE1, indicando un efecto específico sobre ICAM-1 y no VCAM-1. Lo anterior nos permite sugerir que el pretratamiento con RvE1 podría modular la capacidad de adhesión de los FC hacia otras células, como por ejemplo las células del sistema inmune.

Interesantemente, ANG II disminuyó la expresión de VCAM-1 en FC. Este hallazgo resulta bastante interesante y novedoso. Hasta la fecha no se ha descrito si ANG II modifica los niveles de VCAM-1 en FC. A este respecto, existen datos contradictorios en la literatura

puesto que se ha descrito que ANG II aumenta los niveles de esta proteína en células endoteliales [Zhang et al., 2013]. Del mismo modo, datos de nuestro laboratorio han demostrado que la expresión de VCAM-1 aumenta por Heparán Sulfato [Olivares-Silva., 2016] y LPS [Ramírez., 2017] (ambos agonistas del receptor TLR4), favoreciendo la adhesión de monocitos y/o PMN. Otros datos indican que TNF- α también es capaz de aumentar la expresión de VCAM-1 y favorecer la adhesión de células del sistema inmune [Humeres et al., 2016]. Sin embargo, en la literatura se describe que la ANG (1-7) es capaz de disminuir la expresión de VCAM-1 inducido por ANG II en células HUVEc [Zhang et al., 2013]. Lo anterior indica que la regulación de la expresión de las CAMS es dependiente del estímulo y del tipo celular.

7.5 Evaluación participación de la vía ERK1/2 en la modulación de la expresión de ICAM-1 por ANG II en FC.

La transducción de señales intracelulares requerida para la expresión de ICAM-1 en respuesta a citoquinas puede activar rutas que incluyen a los segundos mensajeros intracelulares AMPc y Ca^{2+} que pueden llevar a la activación de PKC, así como también, a la activación del proteasoma [Kacimi et al 1998]. En la literatura se describe que la expresión de ICAM-1 puede ser regulada por la ruta de las MAPK (ERK, p38, JNK), así como también por la vía NF- κ B [Turner et al., 2011].

Nuestros resultados mostraron que ANG II fue capaz de inducir un aumento en los niveles de expresión de la proteína de adhesión ICAM-1; y por otro lado, se demostró que ANG II activa la vía transduccional ERK1/2. Por lo tanto, se prosiguió a evaluar la participación de esta vía utilizando el inhibidor PD98059. Los resultados indicaron una tendencia a disminuir la expresión de ICAM-1 inducida por ANG II. En la literatura existe una amplitud de datos respecto de la relación entre la vía ERK1/2 y la expresión de ICAM-1. En este sentido, en células de corazón (cardiomiocitos y fibroblastos cardiacos), la IL-1 β activa las vías ERK1/2, p38 y JNK. Sin embargo, el uso de inhibidor de ERK no logró bloquear la expresión de CAM, aunque ese efecto fue logrado con el inhibidor de p38 [Kacimi et al 1998]; y también hay antecedentes de que en FC de rata neonata, la MAPK p38 regula la expresión de ICAM-1 inducida por citoquinas [Turner et al., 2011]. Por otro lado, en una línea celular de cáncer mamario estimuladas con LPS, la inhibición de ERK1/2 por PD98059 disminuyó la expresión de ICAM-1 [Park & Kim., 2015]. Además, otros estudios en células HUVECs, indicaron que el bloqueo de la vía ERK1/2 con dextrometorfano provocó una disminución en los niveles de expresión de ICAM-1 [Jiang et al., 2013], al

estimular con Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) previene la expresión de proteínas de adhesión inducidas por ANG II, por la inhibición de las vías MAPK(ERK1/2 y p38) [Chae et al 2007] y el uso de PD98059 provoca disminución en los niveles de ICAM-1 [Chao et al., 2017].

7.6 Efecto de RvE1 en la adhesión de SMC sobre FC inducida por ANG II.

Se ha demostrado que *in vivo*, las interacciones entre neutrófilos y FC podrían exacerbar la respuesta inflamatoria conduciendo a un proceso inflamatorio crónico. Lo anterior ocurriría por el aumento en la producción local de quimioquinas y la incapacidad del FC de eliminar las células reclutadas [Turner et al., 2011]. Este proceso, de interacción entre células propias y pertenecientes a los diferentes tejidos con las células del sistema inmune en general se ha pasado por alto; sin embargo, en fibroblastos de otros tejidos, como pulmón o hígado, interactúan directamente con los leucocitos a través del antígeno de superficie leucocitaria CD40, que se expresa en fibroblastos, mientras que su ligando CD40L se expresa en células inmunes; sin embargo, este no parece ser el caso para FC, ya que estas células no muestran niveles significativos de CD40 [Díaz-Araya et al., 2015]. En el caso del FC, este proceso se podría llevar a cabo de manera similar por medio de las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, las que son expresadas en respuesta a estímulos proinflamatorios pudiéndose llevar a cabo adhesión de leucocitos que son atraídos al sitio lesionado.

Nuestros resultados mostraron que ANG II, por si sola, aumentó los niveles de expresión de ICAM-1, lo que se tradujo en un aumento significativo en los niveles de adhesión de SMC a los FC, mientras que la RvE1 no indujo cambios en los niveles de expresión de proteína ICAM-1 y VCAM-1, lo que se confirmó con ensayos de adhesión en donde el número de células del sistema inmune, específicamente SMC, que se adhieren al FC no aumentó con respecto al control. Sin embargo, el tratamiento de RvE1 antes de ANG II, disminuyó los niveles de ICAM-1 lo que se tradujo en una consecuente disminución en la adhesión celular de SMC a los FC. Este interesante efecto de RvE1 ya había sido demostrado anteriormente en trabajos de nuestro laboratorio, donde se demostró que RvE1 fue capaz de disminuir la adhesión de SMC a FC inducida por LPS [Ramírez., 2017].

El uso del inhibidor de ERK1/2, (PD98059) no nos permitió concluir nada de forma clara, ya que inhibe totalmente la vía transduccional ERK1/2; tanto la ERK1/2 que es activada por RvE1 así como también, por ANG II, lo cual no permite evaluar de forma clara en este sentido si el efecto proresolutivo de RvE1 se está llevando a cabo por las proteínas

ERK1/2, ya que al no modificar por si sola los niveles de expresión de la proteína ICAM-1, nos es imposible apreciar diferencias con respecto a otro tipo de estímulos como el de ANG II. Por lo tanto, en la adhesión si bien vemos disminuido el número de SMC adheridos al FC, no podemos concluir si este efecto se logró por el uso del inhibidor o por el efecto protector de la RvE1.

Nuestros resultados nos indicarían que RvE1 participa en la disminución de proteínas de adhesión y consecuentemente en la adhesión de SMC inducida por ANG II, de forma similar a los resultados obtenidos cuando el estímulo proinflamatorio es LPS [Ramírez., 2017]. Nuestros resultados son similares a los publicados por otros grupos de investigación en otros modelos experimentales, en los cuales demostraron que la RvE1 disminuye el reclutamiento de PMN, entre ellos modelos de piel [Sawada et al., 2015], periodontitis [Hasturk et al., 2005], peritonitis [Bannenberg et al., 2005; Schif-Zuck et al., 2011], colitis [Arita et al., 2005], [Ishida et al., 2010] y depresión [Deyama et al., 2017]. Lo anterior indica que la RvE1, participa y favorece el proceso proresolutivo en procesos inflamatorios.

7.7 Limitaciones y proyecciones del estudio

Debido a que en esta memoria, no fue posible llevar un estudio más detallado de ciertos aspectos, se sugiere lo siguiente:

1. La principal limitación es que este estudio se realizó con FC en cultivo (*in vitro*), y sería interesante extrapolar estos resultados a un modelo *in vivo*.
2. Estimular FC de rata adulta con ANG II y evaluar otros componentes de la vía MAPK como JNK y p38.
3. Estimular FC de rata adulta con ANG II y evaluar otros tiempos de estimulación, tanto para las vías transduccionales, como para la expresión de proteínas de adhesión.
4. Realizar estudios con otros estímulos proinflamatorios.
5. Estudiar si la RvE1 disminuye la secreción de citoquinas y quimioquinas inducidas por ANG II.
6. Estudiar si RvE1 disminuye la migración de monocitos inducida por ANG II.

8. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró demostrar que:

- RvE1 es capaz de activar la vía transduccional ERK1/2, mientras que no activó las vías AKT y NF-κB.
- ANG II estimuló la vía ERK1/2, y no observamos estimulación de las vías AKT y NF-κB.
- ANG II a través de la activación de la vía ERK1/2, aumentó la expresión de ICAM-1 y la inhibición de la vía ERK1/2 mostró una tendencia no significativa a la disminución de ICAM-1.
- RvE1 disminuyó la expresión de ICAM-1 inducida por ANG II y no afectó la expresión de VCAM-1.
- RvE1 disminuyó en número de SMC adheridos a FC cuando son estimulados con ANG II.

Conclusión general:

Los resultados obtenidos dan cuenta del rol antiinflamatorio de RvE1, siendo una potencial herramienta terapéutica en procesos inflamatorios de enfermedades cardiovasculares desencadenados por ANG II.

9. REFERENCIAS

- Arita, M., Bianchini, F., Aliberti, J., Sher, A., Chiang, N., Hong, S., ... & Serhan, C. N. (2005). Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *Journal of Experimental Medicine*, 201(5), 713-722.
- Arita, M., Ohira, T., Sun, Y. P., Elangovan, S., Chiang, N., & Serhan, C. N. (2007). Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *The Journal of Immunology*, 178(6), 3912-3917.
- Arita, M., Yoshida, M., Hong, S., Tjonahen, E., Glickman, J. N., Petasis, N. A., ... & Serhan, C. N. (2005). Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21), 7671-7676.
- Balta, M. G., Loos, B. G., & Nicu, E. A. (2017). emerging Concepts in the Resolution of Periodontal inflammation: A Role for Resolvin e1. *Frontiers in immunology*, 8, 1682.
- Bannenberg, G. L., Chiang, N., Ariel, A., Arita, M., Tjonahen, E., Gotlinger, K. H., ... & Serhan, C. N. (2005). Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *The Journal of Immunology*, 174(7), 4345-4355.
- Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Wheeler, M. E., Cotran, R. S., & Gimbrone, M. A. (1985). Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *The Journal of clinical investigation*, 76(5), 2003-2011.
- Bevilacqua, MD, Ph. D, M. P., Nelson, Ph. D, R. M., Mannori, MD, Ph. D, G., & Cecconi, MD, O. (1994). Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annual review of medicine*, 45(1), 361-378.
- Bolívar, S., Santana, R., Ayala, P., Landaeta, R., Boza, P., Humeres, C., ... & Anfossi, R. (2017). Lipopolysaccharide activates toll-like receptor 4 and prevents cardiac fibroblast-to-myofibroblast differentiation. *Cardiovascular toxicology*, 17(4), 458-470.
- Buckley, C. D. (2011). Why does chronic inflammation persist: An unexpected role for fibroblasts. *Immunology letters*, 138(1), 12-14.
- Chae, Y. J., Kim, C. H., Ha, T. S., Hescheler, J., Ahn, H. Y., & Sachinidis, A. (2007). Epigallocatechin-3-O-gallate inhibits the angiotensin II-induced adhesion molecule expression in human umbilical vein endothelial cell via inhibition of MAPK pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 20(6), 859-866.
- Chao, Y., Zhu, L., Qu, X., Zhang, J., Zhang, J., Kong, X., ... & Luo, J. (2017). Inhibition of angiotensin II type 1 receptor reduced human endothelial inflammation induced by low shear stress. *Experimental cell research*, 360(2), 94-104.
- Chen, X. Q., Liu, X., Wang, Q. X., Zhang, M. J., Guo, M., Liu, F., ... & Zhou, L. (2015). Pioglitazone inhibits angiotensin II-induced atrial fibroblasts proliferation via NF- κ B/TGF- β 1/TRIF/TRAF6 pathway. *Experimental cell research*, 330(1), 43-55.

Deb, A., & Ubil, E. (2014). Cardiac fibroblast in development and wound healing. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 70, 47-55.

Departamento de Epidemiología, 2017, "Encuesta Nacional de Salud 2016-2017. Primeros Resultados", [en línea] <http://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17_PRIMEROS-RESULTADOS.pdf> [consulta: 22 de julio 2018].

Deyama, S., Shimoda, K., Suzuki, H., Ishikawa, Y., Ishimura, K., Fukuda, H., ... & Shuto, S. (2018). Resolvin E1/E2 ameliorate lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors via ChemR23. *Psychopharmacology*, 235(1), 329-336.

Díaz-Araya, G., Vivar, R., Humeres, C., Boza, P., Bolivar, S., & Muñoz, C. (2015). Cardiac fibroblasts as sentinel cells in cardiac tissue: receptors, signaling pathways and cellular functions. *Pharmacological research*, 101, 30-40.

Ebisuya, M., Kondoh, K., & Nishida, E. (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *Journal of cell science*, 118(14), 2997-3002.

Fairweather, D., Petri, M. A., Coronado, M. J., & Cooperr, L. T. (2012). Autoimmune heart disease: role of sex hormones and autoantibodies in disease pathogenesis. *Expert review of clinical immunology*, 8(3), 269-284.

Flesher, R. P., Herbert, C., & Kumar, R. K. (2014). Resolvin E1 promotes resolution of inflammation in a mouse model of an acute exacerbation of allergic asthma. *Clinical science*, 126(11), 805-818.

Gang, C. H. E. N., Shi-Fen, P. A. N., Xiang-Li, C. U. I., & Li-Hong, L. I. U. (2018). Puerarin attenuates angiotensin II-induced cardiac fibroblast proliferation via the promotion of catalase activity and the inhibition of hydrogen peroxide-dependent Rac-1 activation. *Chinese journal of natural medicines*, 16(1), 41-52.

Hasturk, H., Kantarci, A., Ohira, T., Arita, M., Ebrahimi, N., Chiang, N., ... & Van Dyke, T. E. (2006). RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *The FASEB journal*, 20(2), 401-403.

He, Y. P., Zhao, L. Y., Zheng, Q. S., Liu, S. W., Zhao, X. Y., Lu, X. L., ... & Li, X. (2008). Involvement of ERK and AKT signaling in the growth effect of arginine vasopressin on adult rat cardiac fibroblast and the modulation by simvastatin. *Molecular and cellular biochemistry*, 317(1-2), 33-41.

Herichova, I. (2016). Angiotensin II in the Human Physiology: Novel Ways for Synthetic Compounds Utilization. *Current medicinal chemistry*, 23(42), 4735-4752.

Humeres, C., Vivar, R., Boza, P., Muñoz, C., Bolivar, S., Anfossi, R., ... & Díaz-Araya, G. (2016). Cardiac fibroblast cytokine profiles induced by proinflammatory or profibrotic stimuli promote monocyte recruitment and modulate macrophage M1/M2 balance in vitro. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 101, 69-80.

- Ishida, T., Yoshida, M., Arita, M., Nishitani, Y., Nishiumi, S., Masuda, A., ... & Inokuchi, H. (2009). Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium–induced colitis. *Inflammatory bowel diseases*, 16(1), 87-95.
- Ivey, M. J., & Tallquist, M. D. (2016). *Defining the Cardiac Fibroblast: A New Hope*. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society*,80(11), 2269–2276.
- Jeppesen, P. L., Christensen, G. L., Schneider, M., Nossent, A. Y., Jensen, H. B., Andersen, D. C., ... & Sheikh, S. P. (2011). Angiotensin II type 1 receptor signalling regulates microRNA differentially in cardiac fibroblasts and myocytes. *British journal of pharmacology*, 164(2), 394-404.
- Jiang, S. J., Hsu, S. Y., Deng, C. R., Huang, H. C., Liu, S. L., Shi, G. Y., & Wu, H. L. (2013). Dextromethorphan attenuates LPS- induced adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Microcirculation*, 20(2), 190-201.
- Kacimi, R., Karliner, J. S., Koudssi, F., & Long, C. S. (1998). Expression and regulation of adhesion molecules in cardiac cells by cytokines: response to acute hypoxia. *Circulation Research*, 82(5), 576-586.
- Kai, H., Kuwahara, F., Tokuda, K., & Imaizumi, T. (2005). Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis. *Hypertension research*, 28(6), 483.
- Kain, V., Ingle, K. A., Colas, R. A., Dalli, J., Prabhu, S. D., Serhan, C. N., ... & Halade, G. V. (2015). Resolvin D1 activates the inflammation resolving response at splenic and ventricular site following myocardial infarction leading to improved ventricular function. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 84, 24-35.
- Kaneko, K., Miyabe, Y., Takayasu, A., Fukuda, S., Miyabe, C., Ebisawa, M., ... & Terashima, Y. (2011). Chemerin activates fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, 13(5), R158.
- Keyes, K. T., Ye, Y., Lin, Y., Zhang, C., Perez-Polo, J. R., Gjorstrup, P., & Birnbaum, Y. (2010). Resolvin E1 protects the rat heart against reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 299(1), H153-H164.
- Kuang, H., Hua, X., Zhou, J., & Yang, R. (2016). Resolvin D1 and E1 alleviate the progress of hepatitis toward liver cancer in long-term concanavalin A-induced mice through inhibition of NF-κB activity. *Oncology reports*, 35(1), 307-317.
- Kurose, H., & Mangmool, S. (2016). Myofibroblasts and inflammatory cells as players of cardiac fibrosis. *Archives of pharmacal research*, 39(8), 1100-1113.
- Lefkowitz, D. L., & Lefkowitz, S. S. (2001). Macrophage–neutrophil interaction: a paradigm for chronic inflammation revisited. *Immunology and cell biology*, 79(5), 502-506.

Liang, B., Wang, X., Zhang, N., Yang, H., Bai, R., Liu, M., ... & Yang, Z. (2015). Angiotensin-(1-7) attenuates Angiotensin II-Induced ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 expression via the MAS receptor through suppression of P38 and NF- κ B Pathways in HUVECs. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 35(6), 2472-2482.

Lira, E. M. T. (2015). Impacto de la Hipertensión arterial como factor de riesgo cardiovascular. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(2), 156-163.

Marchant, D. J., Boyd, J. H., Lin, D. C., Granville, D. J., Garmaroudi, F. S., & McManus, B. M. (2012). Inflammation in myocardial diseases. *Circulation research*, 110(1), 126-144.

Ocaranza, M. P., Moya, J., Barrientos, V., Alzamora, R., Hevia, D., Morales, C., ... & Ayala, P. (2014). Angiotensin-(1-9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis. *Journal of hypertension*, 32(4), 771-783.

Okada, M., Yamawaki, H., & Hara, Y. (2010). Angiotensin II Enhances Interleukin-1 β -Induced MMP-9 Secretion in Adult Rat Cardiac Fibroblasts. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(6), 735-739.

Olivares-Silva F. Heparán Sulfato vía TLR-4 induce la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 y aumenta la adhesión de leucocitos a fibroblastos cardíacos. Memoria de pregrado, 2016. Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Olson, E. R., Shamhart, P. E., Naugle, J. E., & Meszaros, J. G. (2008). Angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation is mediated by protein kinase C δ and intracellular calcium in adult rat cardiac fibroblasts. *Hypertension*, 51(3), 704-711.

Omura, T., Yoshiyama, M., Kim, S., Matsumoto, R., Nakamura, Y., Izumi, Y., ... & Takeuchi, K. (2004). Involvement of apoptosis signal-regulating kinase-1 on angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(2), 270-275.

Organización Mundial de la Salud 2013, "Información general sobre la hipertensión en el mundo, Día mundial de la Salud 2013", [en línea] <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/87679/WHO_DCO_WHD_2013.2_spa.pdf;jsessionid=07A4B5E32FE3C8EB12AC5E2395F56D19?sequence=1> [consulta: 22 de julio 2018]

Organización Mundial de la Salud 2018a, "Enfermedades Cardiovasculares". [en línea] <http://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/> [consulta: 22 de julio 2018].

Organización Mundial de la Salud 2018b, "Enfermedades Cardiovasculares". [en línea] <[http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))> [consulta: 22 de julio 2018]

Park, G. S., & Kim, J. H. (2015). LPS up-regulates ICAM-1 expression in breast cancer cells by stimulating a MyD88-BLT2-ERK-linked cascade, which promotes adhesion to monocytes. *Molecules and cells*, 38(9), 821.

- Pastore, L., Tessitore, A., Martinotti, S., Toniato, E., Alesse, E., Bravi, M. C., ... & Santucci, A. (1999). Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation*, *100*(15), 1646-1652.
- Pérez-Díaz, I., Hiriart, M., Olivares-Reyes, J. A., & Robles-Díaz, G. (2006). Receptores para la angiotensina II diferentes a los clásicos receptores membranales AT1 y AT2: Características y su papel en el funcionamiento celular. *Revista de educación bioquímica*, *25*(2), 55-60.
- Qu, X., Zhang, X., Yao, J., Song, J., Nikolic-Paterson, D. J., & Li, J. (2012). Resolvins E1 and D1 inhibit interstitial fibrosis in the obstructed kidney via inhibition of local fibroblast proliferation. *The Journal of pathology*, *228*(4), 506-519.
- Ramírez Ninoska. Resolvina E1 disminuye la adhesión de SMC sobre fibroblastos cardiacos en ratas neonatas. Santiago, Chile 2017. Memoria de pregrado, 2017. Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- Rey, C., Nadjar, A., Baud, B., Vaysse, C., Aubert, A., Pallet, V., ... & Joffre, C. (2016). Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in microglial cells in vitro. *Brain, behavior, and immunity*, *55*, 249-259.
- Sawada, Y., Honda, T., Hanakawa, S., Nakamizo, S., Murata, T., Ueharaguchi-Tanada, Y., ... & Tanizaki, H. (2015). Resolvin E1 inhibits dendritic cell migration in the skin and attenuates contact hypersensitivity responses. *Journal of Experimental Medicine*, jem-20150381.
- Schif-Zuck, S., Gross, N., Assi, S., Rostoker, R., Serhan, C. N., & Ariel, A. (2011). Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b^{low} macrophages: Modulation by resolvins and glucocorticoids. *European journal of immunology*, *41*(2), 366-379.
- Schiffrin, E. L. (2014). Inflammation, immunity and development of essential hypertension. *Journal of hypertension*, *32*(2), 228-229.
- Serhan, C. N. (2009). Systems approach to inflammation resolution: identification of novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *7*, 44-48.
- Serhan, C. N., Chiang, N., & Dalli, J. (2015, May). The resolution code of acute inflammation: novel pro-resolving lipid mediators in resolution. In *Seminars in immunology* (Vol. 27, No. 3, pp. 200-215). Academic Press.
- Serhan, C. N., Chiang, N., & Van Dyke, T. E. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology*, *8*(5), 349.
- Serhan, C. N., Krishnamoorthy, S., Recchiuti, A., & Chiang, N. (2011). Novel anti-inflammatory-pro-resolving mediators and their receptors. *Current topics in medicinal chemistry*, *11*(6), 629-647.

- Snider, P., Standley, K. N., Wang, J., Azhar, M., Doetschman, T., & Conway, S. J. (2009). Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. *Circulation research*, 105(10), 934-947.
- Springer, T. A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346(6283), 425.
- Thakur, S., Li, L., & Gupta, S. (2014). NF- κ B-mediated integrin-linked kinase regulation in angiotensin II-induced pro-fibrotic process in cardiac fibroblasts. *Life sciences*, 107(1-2), 68-75.
- Tian, B., Liu, J., Bitterman, P., & Bache, R. J. (2003). Angiotensin II modulates nitric oxide-induced cardiac fibroblast apoptosis by activation of AKT/PKB. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 285(3), H1105-H1112.
- Toricelli, A. A., Santhanam, A., Agrawal, V., & Wilson, S. E. (2014). Resolvin E1 analog RX-10045 0.1% reduces corneal stromal haze in rabbits when applied topically after PRK. *Molecular vision*, 20, 1710.
- Turner, N. A., Das, A., O'Regan, D. J., Ball, S. G., & Porter, K. E. (2011). Human cardiac fibroblasts express ICAM-1, E-selectin and CXC chemokines in response to proinflammatory cytokine stimulation. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(10), 1450-1458.
- Wainstein, E., & Seger, R. (2016). The dynamic subcellular localization of ERK: mechanisms of translocation and role in various organelles. *Current opinion in cell biology*, 39, 15-20.
- Zhang, F., Ren, J., Chan, K., & Chen, H. (2013). Angiotensin-(1-7) regulates Angiotensin II-induced VCAM-1 expression on vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 430(2), 642-646.
- Zhang, W., Chen, X. F., Huang, Y. J., Chen, Q. Q., Bao, Y. J., & Zhu, W. (2012). 2, 3, 4', 5- Tetrahydroxystilbene- 2- O- β - d- glucoside inhibits angiotensin II- induced cardiac fibroblast proliferation via suppression of the reactive oxygen species- extracellular signal- regulated kinase 1/2 pathway. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39(5), 429-437.