



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

---

# **LA RESOLVINA-D1 PREVIENE EL REMODELAMIENTO CARDÍACO E HIPERTENSIÓN INDUCIDOS POR ANGIOTENSINA II Y ATENÚA LA INFLAMACIÓN CARDÍACA**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado académico  
de Doctor en Farmacología por:**

**FRANCISCO JAVIER OLIVARES SILVA**

Directores: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

Dr. Carlos Sánchez-Ferrer

---

Santiago, Chile 2021

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**  
**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

**FRANCISCO JAVIER OLIVARES SILVA**

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen público rendido el día \_\_\_\_\_ de xxxx del 2021.

**Directores de Tesis:**

Dr. Guillermo Díaz Araya \_\_\_\_\_

Dr. Carlos F Sánchez Ferrer \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

Dr. Ramón Rodrigo (presidente) \_\_\_\_\_

Dra. Zully Pedrozo \_\_\_\_\_

Dra. Gina Sánchez \_\_\_\_\_

Dr. Claudio Cabello \_\_\_\_\_

## **FINANCIAMIENTO**

Proyecto FONDECYT N° 1170425 y 1210627 (Guillermo Díaz Araya, investigador principal) y Beca de Doctorado Nacional ANID 2017-21170177 para Francisco Javier Olivares Silva

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:

Presentación a congreso:

**Olivares-Silva F**, De Gregorio N, Sánchez-Ferrer CF, Díaz-Araya G. "Resolvin D1 prevents cardiac hypertrophy and fibrosis in Angiotensin II-infused C57BL/6 mice". XLI CONGRESO ANUAL de la Sociedad de Farmacología de Chile. 4-8 de Noviembre del 2019, Concepción, Chile.

Publicación derivada de la tesis:

**Olivares-Silva F**, De Gregorio N, Espitia-Corredor J, Espinoza C, Vivar R, Silva D, Osorio JM, Lavandero S, Concepción Peiró C, Sánchez-Ferrer CF, Díaz-Araya

G. Resolvin-D1 attenuation of Angiotensin II-induced cardiac inflammation in mice is associated with prevention of cardiac remodeling and hypertension. BBADis, 2021 (en revisión)

Otras publicaciones

**Olivares-Silva F**, Landaeta R, Aránguiz P, Bolívar S, Humeres C, Anfossi R, Vivar R, Boza P, Muñoz C, Pardo-Jiménez V, Peiró C, Sánchez-Ferrer CF, Díaz-Araya G. Heparan sulfate potentiates leukocyte adhesion on cardiac fibroblast by enhancing VCAM-1 and ICAM-1 expression. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2018 Mar; 1864(3):831-842. PMID: 29222072.

Bolívar S, Anfossi R, Humeres C, Vivar R, Boza P, Muñoz C, Pardo-Jimenez V, **Olivares-Silva F**, Díaz-Araya G. IFN- $\beta$  Plays Both Pro- and Anti-inflammatory Roles in the Rat Cardiac Fibroblast Through Differential STAT Protein Activation. Front Pharmacol. 2018 Nov 28; 9: 1368. PMID: 30555324.

Muñoz-Rodríguez C, Fernández S, Osorio JM, **Olivares-Silva F**, Anfossi R, Bolívar S, Humeres C, Boza P, Vivar R, Pardo-Jimenez V, Hemmings KE, Turner NA, Díaz-Araya G. Expression and function of TLR4- induced B1R bradykinin

receptor on cardiac fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018 Jul 15; 351: 46-56.  
PMID: 29775649.

Bolivar S, Espitia-Corredor JA, **Olivares-Silva F**, Valenzuela P, Humeres C, Anfossi R, Castro E, Vivar R, Salas-Hernández A, Pardo-Jiménez V, Díaz-Araya G. In cardiac fibroblasts, interferon-beta attenuates differentiation, collagen synthesis, and TGF- $\beta$ 1-induced collagen gel contraction. *Cytokine*. 2021 Feb; 138: 155359. PMID: 33160814.

**Olivares-Silva F**, Espitia-Corredor J, Letelier A, Vivar R, Parra-Flores P, Olmedo I, Montenegro J, Pardo-Jiménez V, Díaz-Araya G. TGF- $\beta$ 1 decreases CHOP expression and prevents cardiac fibroblast apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Toxicol In Vitro*. 2021 Feb; 70: 105041. PMID: 33127435.

*A mi mamá, amiga, compañera y ángel guardián*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todas las personas que me han alentado para lograr terminar este desafío y seguir haciendo lo que me gusta. De verdad, どうもありがとうございました。

Al Dr. Guillermo Díaz Araya, que como tutor me entregó su guía y experiencia en la ciencia, y como amigo estuvo presente cuando mi vida giró en 180° y necesité mucho apoyo para reconstruirme como persona y seguir caminando.

A todos los integrantes del Laboratorio de Farmacología Molecular, cuya camaradería y apoyo siempre estuvo presente y se transformaron en una segunda familia para mí.

A mis amistades, contadas con los dedos de una mano, pero verdaderas.

Y por supuesto a Ana María Silva Rozas, por su amor, sacrificio y abnegación que hicieron posible mi desarrollo como persona y profesional. Descansa en paz vieja querida, nos vemos pronto.

## **TABLA DE CONTENIDOS**

ABREVIATURAS .....	14
RESUMEN.....	19
SUMMARY.....	21
1. INTRODUCCIÓN .....	23
1.1 Hipertensión arterial.....	23
4.2 Efectos de Ang-II a nivel sistémico y cardíaco .....	24
4.3 Inducción de HTA mediante la infusión de Ang II con bombas osmóticas.....	27
4.4 Nexo entre inflamación y HTA.....	29
4.5 Rol de la Resolvina-D1 en la resolución de la inflamación .....	34
2. HIPÓTESIS.....	40
3. OBJETIVO GENERAL .....	40
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
5. MÉTODOS.....	41
5.1 Animales.....	41
5.2 Modelo de hipertensión arterial inducida por Ang II.....	41
5.3 Ecocardiografía.....	43
5.4 Medición de la presión arterial.....	43



5.5 Recolección de tejido y análisis morfométrico .....	44
5.6 Inmunohistoquímica.....	44
5.7 Inmunofluorescencia.....	45
5.8 Muestreo de plasma para ensayo multiplex .....	46
5.9 Análisis estadístico .....	46
6. RESULTADOS.....	48
6.1 RvD1 suprime la formación de tejido de granulación e infiltración de neutrófilos en el tejido cardíaco .....	48
6.2 RvD1 disminuye los niveles cardíacos de ICAM-1 y VCAM-1 .....	50
6.3 RvD1 reduce la presencia de citoquinas plasmáticas proinflamatorias ...	53
6.4 RvD1 previene parcialmente la hipertrofia cardíaca .....	57
6.5 RvD1 previene el engrosamiento del VI sin afectar la función cardíaca ..	62
6.6 RvD1 previene parcialmente la deposición de colágeno en el corazón...	67
6.7 RvD1 atenúa el desarrollo de HTA .....	72
6.8 Asociación entre inflamación y remodelamiento cardíaco .....	75
7. DISCUSIÓN .....	81
7.1 Acciones cardiovasculares de Ang II .....	81
7.2 Acciones antiinflamatorias de RvD1 .....	83
7.2 RvD1 previene el remodelamiento cardíaco inducido por Ang II .....	86

7.3 Efectos antihipertensivos de RvD1 .....	91
7.4 La atenuación de la inflamación cardíaca se correlaciona con la prevención del remodelamiento cardíaco e hipertensión.....	95
7.5 Limitaciones.....	97
8. CONCLUSIONES .....	100
9. BIBLIOGRAFÍA.....	102

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	24
Figura 2. Respuesta inflamatoria generada por Ang II.....	29
Figura 3. Resolvinas en la inflamación.....	34
Figura 4. RvD1 suprime la formación de tejido de granulación en el tejido cardíaco.....	49
Figura 5. RvD1 suprime la presencia de neutrófilos en el tejido cardíaco.....	49
Figura 6. RvD1 suprime la presencia de ICAM-1 en el tejido cardíaco.....	51
Figura 7. RvD1 suprime la presencia de VCAM-1 en el tejido cardíaco.....	52
Figura 8. RvD1 reduce el nivel de IL-1 $\beta$ en plasma.....	54
Figura 9. RvD1 reduce el nivel de TNF- $\alpha$ en plasma.....	55
Figura 10. RvD1 reduce el nivel de IL-6 en plasma.....	55
Figura 11. RvD1 reduce el nivel de KC en plasma.....	56
Figura 12. RvD1 reduce el nivel de MCP-1 en plasma.....	56
Figura 13. RvD1 reduce el nivel de IL-10 en plasma.....	57
Figura 14. RvD1 previene el aumento patológico de la masa cardíaca.....	59
Figura 15. RvD1 previene la hipertrofia cardíaca.....	60

Figura 16. RvD1 previene la hipertrofia de los cardiomiocitos.....	61
Figura 17. RvD1 previene el engrosamiento de las paredes del ventrículo izquierdo.....	63
Figura 18. RvD1 previene la hipertrofia del septum interventricular.....	64
Figura 19. RvD1 previene la hipertrofia de la pared posterior del ventrículo izquierdo.....	64
Figura 20. RvD1 previene el incremento del diámetro del ventrículo izquierdo en sístole.....	65
Figura 21. RvD1 previene el incremento del diámetro del ventrículo izquierdo en diástole.....	65
Figura 22. RvD1 no varía la fracción de eyección.....	66
Figura 23. RvD1 no varía la fracción de acortamiento.....	66
Figura 24. RvD1 previene la deposición de colágeno intersticial en el tejido cardíaco.....	68
Figura 25. RvD1 previene la fibrosis intersticial en el tejido cardíaco.....	69
Figura 26. RvD1 previene la deposición de colágeno perivascular en el tejido cardíaco.....	70
Figura 27. RvD1 previene la fibrosis perivascular en el tejido cardíaco.....	71
Figura 28. RvD1 atenúa la hipertensión sistólica.....	73

Figura 29. RvD1 atenúa la hipertensión diastólica.....	73
Figura 30. RvD1 atenúa la hipertensión arterial media.....	74
Figura 31. RvD1 atenúa el incremento en la frecuencia cardíaca.....	74
Figura 32. Correlación entre inflamación y remodelamiento cardíaco.....	76
Figura 33. El incremento de ICAM-1 está relacionado con la hipertrofia de los cardiomiocitos.....	77
Figura 34. El incremento de ICAM-1 está relacionado con la fibrosis intersticial.....	78
Figura 35. El incremento de ICAM-1 está relacionado con la fibrosis perivascular.....	78
Figura 36. El incremento de IL-6 está relacionado con la hipertrofia de los cardiomiocitos.....	79
Figura 37. El incremento de IL-6 está relacionado con la fibrosis intersticial.....	79
Figura 38. El incremento de IL-6 está relacionado con la fibrosis perivascular....	80
Figura 39. Resumen gráfico del estudio.....	101

## **ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. RvD1 previene el engrosamiento del ventrículo izquierdo.....	63
Tabla 2. Valores del r de Pearson.....	76
Tabla 3. Valores de p de las correlaciones.....	77

## **ABREVIATURAS**

µg	Microgramo
15-LOX	Lipoxigenasa-15
2K1C	Dos riñones, un clip
5-LOX	Lipoxigenasa-5
AKT	Transformador de la cepa AK
ALX/FPR2	Receptor Alox/Formilpéptido 2
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análisis de la varianza
ANP	Péptido natriurético atrial
AP-1	Proteína activadora 1
APOE	Apolipoproteína E
ARRIVE	Guías para el reporte de experimentos <i>in vivo</i> en investigación animal
AT1	Receptor de angiotensina tipo 1
AT2	Receptor de angiotensina tipo 2
ATC	Área transversal de los cardiomiocitos
BNP	Péptido natriurético cerebral
CM	Cardiomiocito
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CXCR2	Receptor de quimioquinas CXC 2

DAB	Diaminobenzidina
DHA	Ácido docosahexanoico
DOCA	Deoxicorticosterona
DS	Desviación estándar
DVI <sub>d</sub>	Diámetro del ventrículo izquierdo en diástole
DVI <sub>s</sub>	Diámetro del ventrículo izquierdo en sístole
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERK1/2	Kinasa regulada por señales extracelulares 1/2
FA	Fracción de acortamiento
FC	Fibroblasto cardíaco
FE	Fracción de eyección
FIS	Fibrosis intersticial
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FPV	Fibrosis perivascular
GC	Gasto cardíaco
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3
HE	Hematoxilina/Eosina
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1
HTA	Hipertensión arterial



ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IHQ	Inmunohistoquímica
IL-13	Interleuquina 13
IL-1 $\beta$	Interleuquina 1 beta
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
KC	Quimioattractante de keratinocitos
kg	Kilogramo
LFA-1	Antígeno asociado a función de linfocitos
L-NAME	N-nitro-L-arginina-metil-éster
LPM	Latidos por minuto
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
M1	Macrófago M1
M2	Macrófago M2
MCP-1	Proteína quimioattractante de monocitos 1
MEC	Matriz extracelular
MFC	Miofibroblasto cardíaco
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro

mm	Milimetro
mRNA	ARN mensajero
NETosis	Trampas extracelulares de neutrófilos
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NIH	Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos
Nrf2	Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide-2
PA	Presión arterial
PAM	Presión arterial media
PC/LT	Razón del peso del corazón/longitud de la tibia
PD	Presión diastólica
PKC	Proteína quinasa C
PMN	Polimorfonucleares
PNA	Péptido natriurético atrial
PPIVd	Pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole
PS	Presión sistólica
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
RAAS	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
Rho	Miembro de la familia homóloga Ras
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RvD1	Resolvina D1

SIVd	Septum interventricular en diástole
SPM	Mediadores lipídicos pro-resolución
STAT3	Activador de la transcripción y transductor de señales 3
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptores de tipo Toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1
VE	Volumen de eyección
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VI	Ventrículo izquierdo
WGA	Aglutinina de germen de trigo
$\alpha$ -SMA	Alfa actina de músculo liso
$\beta$ -MHC	Cadena pesada de miosina beta

## **RESUMEN**

Introducción: A pesar del arsenal farmacológico disponible para tratar la hipertensión (HTA), los pacientes crónicos pueden desarrollar remodelado cardíaco irreversible y fibrosis. Dentro de los gatillantes de HTA se encuentran las enfermedades metabólicas, el envejecimiento celular y la desregulación hormonal. En este último contexto, la Angiotensina II (Ang II) regula la hemodinamia del sistema circulatorio, manteniendo la volemia y homeostasis del sistema cardiovascular. Sin embargo, la actividad crónica y exacerbada de Ang II tiene como consecuencia inflamación en vasos sanguíneos y corazón, incremento de la precarga, HTA y remodelamiento cardíaco, conduciendo a los pacientes a falla cardíaca irreversible.

La Resolvina-D1 (RvD1) pertenece a la familia de lípidos autacoides con potentes efectos antiinflamatorios y pro-resolutivos en varios modelos patológicos cardiovasculares *in vitro* e *in vivo*, como infarto del miocardio, isquemia/reperfusión y estenosis aórtica, previniendo el reclutamiento de leucocitos, expresión de marcadores de inflamación y fibrosis cardíaca. Sin embargo, hasta la fecha aún no se han realizado estudios evaluando los efectos protectores de RvD1 frente al daño crónico producido por la HTA. De esta manera, nos propusimos evaluar tales efectos en un modelo de HTA por infusión de Ang II.

Métodos: Se infundió Ang II (Ang-II, 1,5 mg/kg/día) en ratones machos C57BL/6 mediante mini bombas osmóticas Alzet® durante 7 o 14 días, junto con la administración de Resolvina-D1 (RvD1, 3 µg/kg/día, i.p) un día después de la cirugía y durante el período de infusión. Se evaluó la presión arterial y parámetros funcionales mediante ecocardiografía. Al final de los esquemas experimentales, se recolectaron los tejidos y se estudiaron parámetros histológicos por inmunohistoquímica y citoquinas plasmáticas utilizando LUMINEX.

Resultados: RvD1 disminuyó a los 7 y 14 días la infiltración cardíaca de neutrófilos y formación de tejido de granulación inducida por Ang II; la expresión de ICAM-1 y VCAM-1; el incremento de niveles plasmáticos de IL-1β, TNF-α, IL-6, KC, MCP-1 mientras que aumentó la IL-10 en ambos tiempos de infusión. Además, RvD1 logró prevenir la hipertrofia del ventrículo izquierdo y de los cardiomiocitos, la fibrosis a nivel intersticial y perivascular, y la hipertensión sistólica y diastólica.

En resumen, este estudio revela nuevos efectos cardioprotectores de RvD1 en la hipertensión y remodelamiento cardíaco inducido por Ang-II, lo que brinda información novedosa sobre una posible aplicación terapéutica.

## **SUMMARY**

Introduction: Despite the pharmacological arsenal available to treat hypertension (HBP), chronic patients may develop irreversible cardiac remodeling and fibrosis. Among the triggers of HBP are metabolic diseases, cellular aging and hormonal dysregulation. In the latter context, Angiotensin II (Ang II) regulates the hemodynamics of the circulatory system, maintaining the volume and homeostasis of the cardiovascular system. However, chronic and exacerbated Ang II activity results in inflammation in blood vessels and heart tissue, increased preload, blood pressure, and cardiac remodeling, leading to irreversible heart failure.

Resolvin-D1 (RvD1) belongs to the family of autacoid lipids with potent anti-inflammatory and pro-resolution effects in diverse *in vitro* and *in vivo* cardiovascular pathological models, such as myocardial infarction, ischemia/reperfusion and aortic stenosis, preventing the recruitment of leukocytes, expression of inflammation markers and cardiac fibrosis. However, to date no studies have yet been conducted evaluating the protective effects of RvD1 against chronic damage caused by HBP. Hence, we set out to evaluate such effects in an Ang II infusion HBP model.

Methods: Ang-II (Ang II, 1.5 mg/kg/day) was infused into male C57BL/6 mice via Alzet® mini osmotic pumps for 7 or 14 days, along with the administration of Resolvin-D1 (RvD1, 3 µg/kg/day, ip) one day after surgery and during the infusion

period. Blood pressure and functional parameters were evaluated by echocardiography. At the end of the experimental periods, tissues were harvested and histological parameters were studied by immunohistochemistry and plasma cytokines using LUMINEX.

Results: RvD1 decreased the cardiac infiltration of neutrophils and granulation tissue formation induced by Ang II at 7 and 14 days; the expression of cardiac ICAM-1 and VCAM-1; the increase in plasmatic levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, KC, MCP-1 while IL-10 was increased at both times of infusion. In addition, RvD1 was able to prevent left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy, interstitial and perivascular fibrosis, and systolic and diastolic hypertension.

In summary, this study reveals new cardioprotective effects of RvD1 on Ang II-induced hypertension and cardiac remodeling, providing novel information on a possible therapeutic application.

## **1. INTRODUCCIÓN**

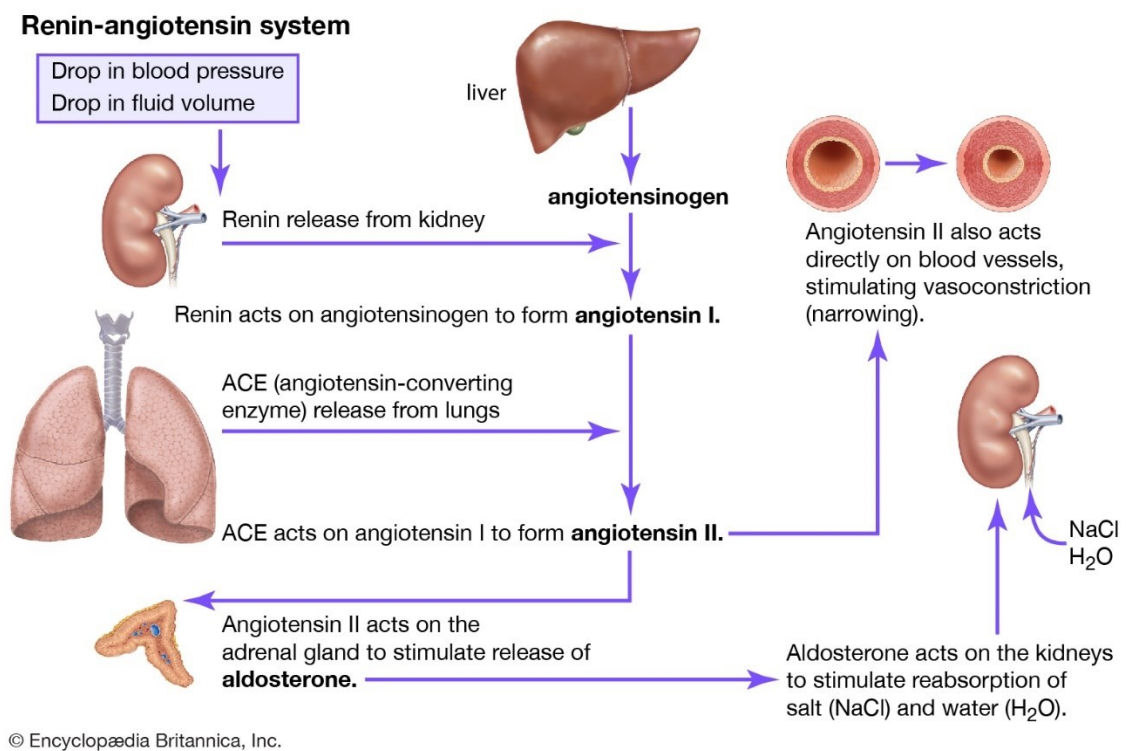
### **1.1 Hipertensión arterial**

La hipertensión arterial (HTA) es una de las enfermedades no transmisibles más prevalentes en el mundo. El 28% de la población podría padecerla sin estar consciente de su existencia al presentar valores de presión arterial (PA) sobre los 130/80 mmHg. Estos antecedentes dan alta prioridad a las investigaciones relacionadas con HTA considerando las complicaciones fisiopatológicas a largo plazo y sobrecarga del sistema de salud (Smolgovsky et al., 2021). La HTA en sí no se manifiesta con síntomas clínicos determinados, y suele ser asintomática hasta que ocurre un evento agudo, como el infarto del miocardio u otros (Nadruz, 2015). En aproximadamente el 90% de los pacientes la causa de HTA es desconocida, condición denominada hipertensión esencial, mientras que se conoce como hipertensión secundaria a la que posee una causa definida. A pesar de ser menos común, el tratamiento de la causa subyacente a menudo implica la cura de este tipo de HTA (Lilly, 2015).

La PA está condicionada por la resistencia vascular periférica (RVP) y el gasto cardíaco (GC), determinado a la vez por la frecuencia cardíaca (FC) y el volumen de eyección (VE), comúnmente afectados por comorbilidades como diabetes y dislipidemia (Lilly, 2015). El volumen de eyección está condicionado a la vez por la contractilidad cardíaca, retorno venoso al corazón (precarga) y la resistencia que debe superar el ventrículo izquierdo (VI) para eyectar la sangre a través de



la aorta (Lilly, 2015). Entre los principales desencadenantes de la HTA se encuentran el envejecimiento celular, las enfermedades metabólicas y la desregulación hormonal (L. Wang et al., 2012). Es en este último contexto donde el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) y su principal molécula efectora, la Angiotensina II (Ang II), tiene un papel fundamental.



**Figura 1. Sistema renina-angiotensina-aldosterona.** Se destaca la vía de síntesis y efectos vasopresores de Ang II. (Adaptado de *Renin-Angiotensin System | Definition & Facts*, Encyclopedia Britannica, 2017)

#### 4.2 Efectos de Ang-II a nivel sistémico y cardíaco

El RAAS es un sistema endocrino complejo que regula la homeostasis cardiovascular y ha sido largamente reconocido como actor principal en el desarrollo y progresión de enfermedades cardiovasculares como la insuficiencia

cardíaca (Unger & Li, 2004). La Ang II es la principal hormona producida por el RAAS, y posee funciones endocrinas, paracrinas y autocrinas que afectan principalmente el volumen de plasma circulante (Montezano et al., 2014). A nivel renal, actúa en la arteriola aferente generando un incremento en la resistencia arteriolar y consecutivamente en la PA, reduciendo el flujo de sangre hacia el glomérulo. Por otro lado, a nivel eferente compensa el efecto en las arteriolas aferentes aumentando la presión intraglomerular, permitiendo la elevación de la fracción de filtración de sangre y mayor recuperación de  $\text{Na}^+$  a nivel tubular. Adicionalmente, la Ang II induce la reabsorción de agua mediante la mayor liberación de vasopresina desde la pituitaria y estimula en la glándula adrenal la secreción de noradrenalina desde la médula y aldosterona desde la zona glomerular, que tiene como consecuencia aumento del tono simpático vascular y mayor reabsorción de  $\text{Na}^+$  desde el asa de Henle (Emdin et al., 2015). Su síntesis se origina en el riñón donde las células yuxtaglomerulares liberan la proteasa  $\text{R}_\zeta$ renina que actúa escindiendo el decapeptido angiotensina I desde la porción N-terminal del péptido inactivo angiotensinógeno, sintetizado principalmente en el hígado. La angiotensina I es una molécula con poca actividad biológica y es convertida al octapéptido Ang II por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), una metaloproteinasa dependiente de zinc ampliamente distribuida en la superficie de células endoteliales y epiteliales, en especial a nivel de capilares pulmonares (Atlas, 2007).

Las acciones de la Ang II son desencadenadas a través de dos tipos de receptores acoplados a proteína G: los receptores de angiotensina tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2) (Singh & Karnik, 2016). El receptor AT1 promueve el crecimiento celular y regula la expresión de sustancias bioactivas como factores de crecimiento, citoquinas y componentes de la matriz extracelular y, por lo tanto, es considerado como el mayor responsable de los efectos deletéreos de Ang II. El receptor AT2 está limitado al miocardio, endotelio vascular, útero, ovarios, cerebro, páncreas y médula adrenal. Actúa contrarrestando los efectos de AT1 inhibiendo el crecimiento de las células musculares lisas vasculares y la hipertrofia de cardiomiocitos (Kim & Iwao, 2000). De esta manera, Ang II a través de sus acciones sistémicas vía AT1 contribuye al aumento de la PA y posteriormente al desarrollo de remodelamiento cardíaco, dependiente de mecanismos inflamatorios e HTA, que es una respuesta adaptativa inicial del corazón para compensar el incremento en la presión del VI por la sobrecarga hemodinámica (Restini et al., 2017). Esta hipertrofia adaptativa tiene como característica el crecimiento del septum hacia el interior del VI, reducción de la cámara del VI, hipertrofia de los cardiomiocitos y aumento del depósito de proteínas de la matriz extracelular (MEC) mediante la deposición progresiva de colágeno (Berk et al., 2007). Pacientes hipertensos pueden progresar a hipertrofia patológica, donde ocurre el aumento de la cámara del VI producto del adelgazamiento de las paredes ventriculares y septum, junto con el reordenamiento de los sarcómeros en los cardiomiocitos (CM) hipertróficos (Opie

et al., 2006). Los mecanismos involucrados en la transición de hipertrofia adaptativa a patológica no están completamente dilucidados; sin embargo, algunos estudios apuntan hacia la excesiva degradación de la MEC que altera la organización celular y desencadena la dilatación ventricular (Heusch et al., 2014).

### **4.3 Inducción de HTA mediante la infusión de Ang II con bombas**

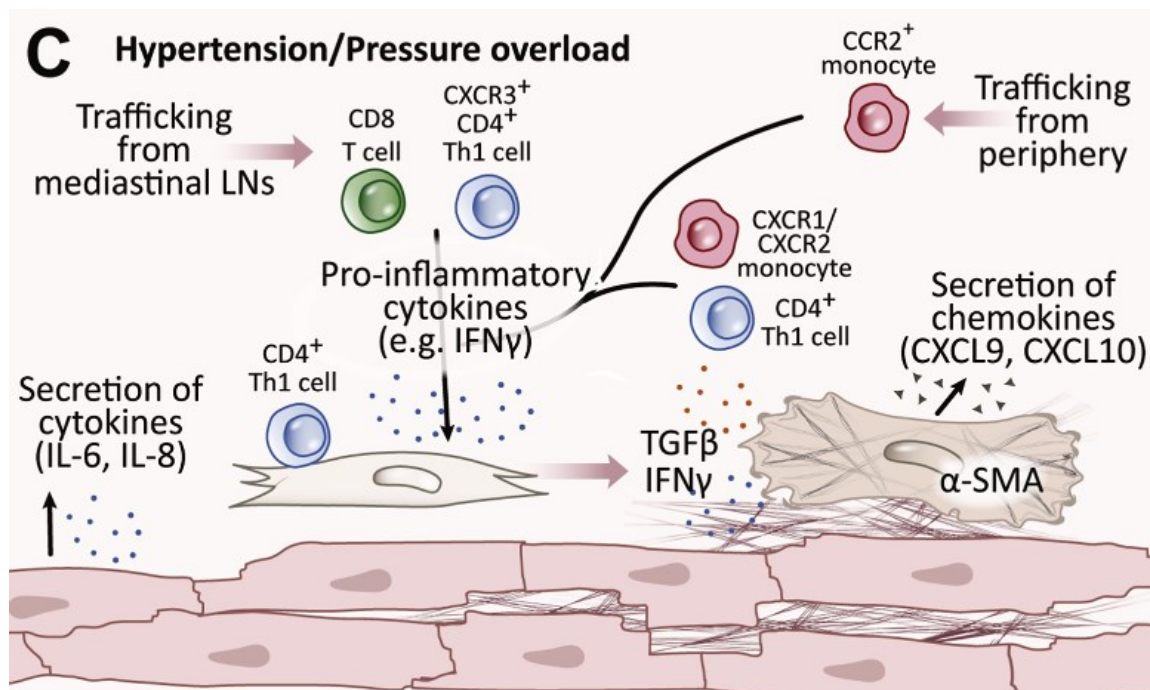
#### **osmóticas**

La HTA inducida por Ang II es un modelo experimental muy utilizado, principalmente en roedores, cuya popularidad ha sido aumentada por el rol prominente de Ang II en la homeostasis cardiovascular y enfermedades asociadas. Adicionalmente, la relativa facilidad para generar HTA en animales normales en un período determinado de tiempo sin manipulaciones adicionales, como extirpación del riñón o administración de sal en el agua, lo hacen un modelo atractivo (Kuroki et al., 2014). En particular, el modelo de infusión subcutánea de Ang II ha sido ampliamente utilizado durante los últimos 20 años gracias al desarrollo de mini-bombas osmóticas implantables que permite la administración de fármacos independiente de bombas externas o cirugías adicionales. Estas mini-bombas funcionan gracias a la diferencia en la presión osmótica entre una capa interior del aparato y el tejido donde está implantada. La alta osmolaridad de la bomba genera ingreso de agua, que comprime el reservorio donde está la sustancia de interés a un flujo constante (Theeuwes & Yum, 1976). La dosis de

Ang II requerida para generar HTA según la literatura fluctúa entre 0,576 y 2 mg/kg/día, con una duración de 14 días (Kuroki et al., 2014). La respuesta hipertensiva se caracteriza por un aumento gradual en la PA que puede derivar en hipertrofia y fibrosis cardiovascular dependiendo de la dosis de Ang II y la ingesta de sal en la dieta.

Recientemente, en un estudio de la acción del eje MCP-1/CXCR2 en HTA se utilizaron mini-bombas osmóticas para la administración de Ang II (1,5 mg/kg/día) a ratones BALB/c durante 14 días, para luego observar parámetros y marcadores específicos de inflamación e hipertrofia. Los investigadores observaron mayor infiltración de neutrófilos, monocitos y macrófagos en el tejido cardíaco desde el día 1 post-implante, el que se sostuvo hasta los 14 días. Concomitantemente, se evaluaron niveles de citoquinas proinflamatorias y vías transduccionales activadas a los 7 y 14 días, encontrando un aumento de mRNA para IL-6, IL-1 $\beta$  y IL-13, junto a mayor fosforilación de AKT, ERK1/2, STAT3 y Calcineurina A. Como parámetro de HTA se determinó un incremento en la PA desde el día 3 hasta el día 7, que se mantuvo elevado hasta el día 14. Al estudiar la función cardíaca, evidenciaron un aumento en la fracción de eyección (FE) y fracción de acortamiento (FA), así como hipertrofia de cardiomiocitos y mayores niveles de mRNA para ANP y BNP. Finalmente, al estudiar parámetros de fibrosis demostraron deposición de colágeno mediante tinción de tricrómico de Masson, incremento de  $\alpha$ -SMA utilizando inmunohistoquímica (IHQ) y mRNA para colágeno I/III y  $\alpha$ -SMA (L. Wang et al., 2018). Estos resultados demostraron que

este modelo de infusión de Ang II fue capaz de producir inflamación temprana post-implante de la bomba, así como también hipertrofia y fibrosis a las dos semanas, observándose características de hipertrofia adaptativa y patológica a la vez.



**Figura 2. Respuesta inflamatoria generada por Ang II.** El incremento crónico de la presión arterial inducida por Ang II genera liberación de citoquinas y quimioquinas desde las células residentes del tejido cardíaco, que ayudan a reclutar monocitos y macrófagos, perpetuando la inflamación crónica. Las células del sistema inmune se adhieren a los fibroblastos cardíacos y contribuyen a la generación de fibrosis (Adaptado de Smolgovsky et al., 2021).

#### 4.4 Nexo entre inflamación y HTA

Las funciones de Ang II van mucho más allá del control de la homeostasis circulatoria. Una gran cantidad de estudios experimentales han demostrado que la Ang II media en varios eventos clave de los procesos inflamatorios (Marchesi

et al., 2008). La inflamación implica la activación del endotelio de los vasos sanguíneos y la expresión de diversas selectinas de células endoteliales que dictan la extravasación de poblaciones específicas de leucocitos al sitio de la lesión (Medzhitov & Horng, 2009). En el contexto de un proceso inflamatorio, la activación local del RAAS mediante la unión de Ang II a su receptor AT1 aumentó la permeabilidad vascular al promover la expresión de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), e indujo la expresión de moléculas de adhesión celular en endotelio que incluyen selectinas L y P, ICAM-1 y VCAM-1 (Alvarez et al., 2004), que serían esenciales para el desarrollo de HTA. Respaldando esta idea, al inhibir la adhesión de monocitos LFA-1<sup>+</sup> al endotelio vascular mediante el bloqueo farmacológico de ICAM-1, disminuyó el desarrollo de hipertensión y remodelamiento cardíaco (Lin et al., 2019).

La Ang II también promueve la disfunción endotelial a través de la activación de la COX-2, que genera prostaglandinas vasoactivas y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Welch, 2008). La HTA se asocia a altos niveles de ROS en diversos tejidos, con impacto directo en la regulación de la presión arterial. En vasos sanguíneos promueven disfunción endotelial y contráctil, en miocardio generan remodelamiento hipertrófico, en riñones disminuyen la filtración glomerular generando daño de órgano, y en el sistema nervioso central incrementan la actividad simpática desde el tracto solitario y médula ventrolateral, generando incremento en la presión arterial, convirtiendo a las ROS en un atractivo blanco terapéutico para tratar la HTA (Lassègue & Griendling, 2004).

Adicionalmente, se ha demostrado que Ang II estimula la proliferación de fibroblastos cardíacos (FC) y pulmonares *in vitro* mediante la activación del receptor AT1 (Sopel et al., 2011). Específicamente, la Ang II aumenta la expresión de colágeno tipo I y  $\alpha$ -SMA de una manera dependiente de la concentración y del tiempo en los FC (Szabó et al., 2004). En otro estudio, Ang II protegió a los FC contra la apoptosis inducida por IL-1 $\beta$  al regular negativamente la expresión de iNOS y la fosforilación de Akt, y el pretratamiento con Ang II redujo la apoptosis de fibroblastos sinoviales en respuesta a la privación de suero y la exposición a NO mediante la activación de NF- $\kappa$ B y el bloqueo de la activación de caspasas vía el receptor AT1 (Suzuki et al., 2003).

Las acciones de Ang II también abarcan el sistema inmune. Ang II favorece el reclutamiento de células inflamatorias en los tejidos estimulando la producción de citoquinas específicas. Por ejemplo, Ang II induce la producción de MCP-1 en monocitos cultivados (Dai et al., 2007). En la aorta de ratas espontáneamente hipertensas, que presentan niveles elevados de Ang II, la infiltración masiva de macrófagos se acompaña de una mayor expresión de MCP-1 y su receptor CCR2. La modulación de MCP-1/CCR2 a través del bloqueo del receptor AT1 reduce la inflamación de los vasos en estas ratas (Dai et al., 2007). En modelos de nefropatía progresiva, la acumulación intersticial de macrófagos se acompaña de un aumento de la expresión renal de MCP-1, y la protección proporcionada por lisinopril limita la inflamación intersticial y reduce la expresión de MCP-1 (Donadelli et al., 2000). La actividad proinflamatoria de Ang II también está



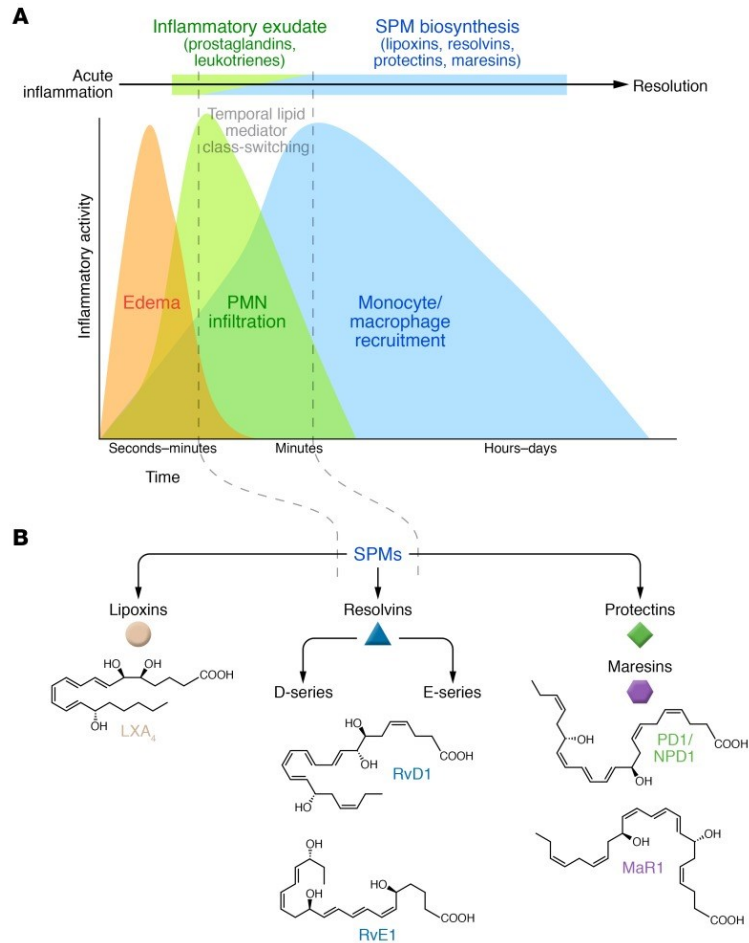
mediada por la activación de células dendríticas, células presentadoras de antígenos responsables de la defensa contra la inflamación y la respuesta inmune. Las células dendríticas expresan receptores de Ang II , cuya activación mejora la migración, maduración y capacidad de presentación de antígenos (Lapteva et al., 2002). El efecto beneficioso sobre la inflamación tisular del bloqueo de la síntesis de Ang II también se basa en su capacidad para interferir en la activación de los receptores tipo Toll (TLR), mediada por Ang II. En células de músculo liso vascular, la Ang II a través de la señalización del receptor AT1 estimula la expresión y activación del TLR-4, que promueve la lesión oxidativa celular, la apoptosis y la inflamación (Ji et al., 2009). Estas observaciones *in vitro* son paralelas a estudios *in vivo* que muestran protección contra la lesión del miocardio por isquemia/reperfusión después del bloqueo de AT1 mediante la supresión de la expresión de TLR-4 y la reducción de la liberación de citoquinas (R. Yang et al., 2011). Complementando esta idea, Matsuda et al. lograron bloquear la HTA, hipertrofia y fibrosis cardíaca dependiente de Ang II utilizando ratones *knockout* para TLR-4, apuntando a este receptor como participante en la génesis del remodelamiento cardíaco (Matsuda et al., 2015).

Los efectos proinflamatorios de Ang II también pueden afectar a las células T. Las células T poseen un RAAS endógeno que modula la proliferación y migración de las células T y la producción de ROS (Hoch et al., 2009). Durante la inflamación, la Ang II actúa a través de su receptor AT1 para reordenar el citoesqueleto en las células T y desencadenar la liberación de citoquinas y

quimioquinas específicas que favorecen el reclutamiento de las células T en los sitios de inflamación (Jurewicz et al., 2007). La infiltración tisular de las células T contribuye a la génesis de HTA, como lo documenta el aumento atenuado de la presión arterial tanto en la infusión de Ang II como en la hipertensión con desoxicorticosterona (DOCA) en ratones Rag1<sup>-/-</sup>, que carecen de células T y B. El trasplante de células T, pero no de células B, restaura la respuesta hipertensiva a Ang II en esta cepa de ratón (Guzik et al., 2007). Entre los subconjuntos de células T, las células T productoras de IL-17 son fundamentales para el mantenimiento de la hipertensión inducida por Ang II (Madhur & Harrison, 2013).

La aparición de HTA también se relaciona al *milieu* de citoquinas inducidas por Ang II, como lo observado por Torre-Amione et al. al demostrar que TNF- $\alpha$  se encuentra aumentado en pacientes hipertensos (Torre-Amione et al., 2000). Relacionado a esta idea, en ratones con infusión de Ang II por 14 días, los que desarrollaron HTA, se demostró una mayor actividad de NF- $\kappa$ B y al mismo tiempo mayor expresión de mRNA para AT1 y el péptido natriurético atrial, efectos revertidos por bloqueo de TNF- $\alpha$  con etanercept (Sriramula & Francis, 2015). Adicionalmente, otros grupos han dejado en evidencia que el desarrollo de HTA y remodelamiento cardíaco depende de otras citoquinas inflamatorias, como MCP-1 (Matsuda et al., 2015) y CXCL1 (L. Wang et al., 2018), pues el bloqueo farmacológico o genético de estas citoquinas produce la ablación de la HTA. Estos antecedentes evidencian la comunicación cruzada existente entre Ang II,

inflamación, desarrollo de HTA y posterior remodelamiento cardíaco (Nakamura & Sadoshima, 2018).



**Figura 3. Resolvinas en la inflamación.** Esquema general de las fases de la inflamación y las familias de mediadores lipídicos involucradas (Adaptado de Serhan & Levy, 2018).

#### 4.5 Rol de la Resolvin-D1 en la resolución de la inflamación

En respuesta a daño tisular o infección, la resolución de la inflamación inicial es crítica para reestablecer la homeostasis. La inflamación aguda consta de dos fases principales: iniciación y resolución. La iniciación se caracteriza por edema

producto de la vasodilatación inducida por mediadores como serotonina, óxido nítrico e histamina; y autacoides lipídicos, como leucotrienos y prostaglandinas (Frangogiannis, 2015). Consecutivamente, los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) migran al área dañada atraídos por quimioattractantes como IL-8 e leucotrieno B4, y atraviesan la vasculatura a través de interacciones con moléculas de adhesión celular, para finalmente llegar a la zona de daño y fagocitar restos celulares (Sansbury & Spite, 2016). La fase resolutive ya se encuentra iniciada en este punto, pues el influjo de PMN es detenido a un nivel apropiado para el estímulo de daño acompañado de su apoptosis. Subsecuentemente, los monocitos infiltran el tejido donde se diferencian a macrófagos, que fagocitan a los PMN apoptóticos y *debris* tisular. Posterior a estos eventos, se gatilla la esferocitosis de los macrófagos (salida del sitio de inflamación hacia los ganglios linfáticos). La limpieza activa de células apoptóticas es un factor crítico de la resolución, pues una falla en esta etapa puede conducir a necrosis celular e inflamación crónica exacerbada, impidiendo la reparación tisular (Serhan & Levy, 2018). Los macrófagos permanecen más tiempo en el tejido que los PMN, por lo que su acumulación y fenotipo predominante define una fase post-resolutoria que otorga protección al daño en el futuro. Interrupciones en este proceso, como reclutamiento prolongado de leucocitos, alteraciones en la esferocitosis o en la diferenciación de macrófagos, puede desencadenar efectos crónicos como fibrosis o pérdida de función

evidenciado, por ejemplo, en aterosclerosis y falla cardíaca (Frangogiannis, 2015).

La inflamación aguda, por naturaleza, es un proceso autolimitado por la retroalimentación negativa de vías transduccionales cuando el estímulo inflamatorio ha sido eliminado. Sin embargo, en los últimos años se ha evidenciado la participación de mediadores lipídicos especializados pro-resolutivos (SPM) sintetizados de manera temporal en el exudado. Estos SPM no sólo terminan la producción de mediadores proinflamatorios, sino que además estimulan directamente la actividad fagocítica de macrófagos, regulan la apoptosis de PMN, promueven la remoción de quimioquinas y estimulan la reparación de tejido (Chiang & Serhan, 2020). En la transición de mediadores proinflamatorios a pro-resolutivos, los primeros inducen la síntesis de enzimas, como lipoxigenasa-15 (LOX-15), que otorgan a leucocitos la capacidad de generar SPM como lipoxinas y resolvinas desde ácidos grasos polinsaturados (PUFAs). Las resolvinas tienen su origen en  $\omega$ -3 PUFAs y se clasifican en distintas familias dependiendo de su precursor: serie D para ácido docosahexanoico (DHA) y serie E para ácido eicosapentanoico (EPA). Otras subfamilias derivadas de DHA incluyen la Protectina D1 y las Maresinas. La Resolvina D1 (RvD1) se sintetiza a partir de DHA, que en presencia de LOX-15 es convertida a un intermediario 17-hidroperóxido, que sufre otra oxigenación vía 5-LOX y finalmente es convertida en las RvD1 o RvD2 tras hidrólisis enzimática (Sansbury & Spite, 2016). Como otros mediadores lipídicos clásicos, las

Resolvinas ejercen sus acciones biológicas a través de receptores acoplados a proteína G. Las acciones de RvD1 son mediadas por señalización vía receptor Alox/Formil péptido 2 (ALX/FPR2), acoplado a proteína Gi o Gq (Bäck et al., 2014), presente en leucocitos, células epiteliales y fibroblastos humanos y murinos, y el receptor GPR32, solamente identificado en humanos. Dado que tanto la RvD1 como la Lipoxina A4 son estructuralmente similares, activan el mismo receptor y promueven la síntesis recíproca entre ellos, evidencia que las vías pro-resolutivas están íntimamente relacionadas (Q. Qu et al., 2015).

La RvD1 ejerce acciones antiinflamatorias tanto *in vitro* como *in vivo*. En células endoteliales humanas aórticas disminuye la expresión de IL-8 y MCP-1, quimioattractantes de neutrófilos y monocitos respectivamente (Merched et al., 2008). Tanto RvD1 como RvD2, de forma dosis-dependiente, disminuyen la proliferación, migración, adhesión de monocitos, generación de ROS y expresión de genes proinflamatorios en células de músculo liso vascular (Miyahara et al., 2013). En fibroblastos de pulmón, RvD1 disminuye la expresión de ICAM-1, VCAM-1, COX-2 y TNF- $\alpha$  gatillados por LPS (B. Wang et al., 2011) y en fibroblastos renales disminuye la proliferación y diferenciación a miofibroblasto vía ERK1/2 y Akt (X. Qu et al., 2012).

En nuestro laboratorio de Farmacología Molecular se ha demostrado que RvD1 no posee efectos citotóxicos ni hiperplásicos en FC de rata neonata. Sin embargo, frente a un estímulo pro-inflamatorio gatillado por LPS, disminuye los

niveles de ICAM-1, VCAM-1, adhesión de células mononucleares de bazo, y secreción de IL-6 y MCP-1 al medio de cultivo (Salas-Hernández et al., 2021).

RvD1 actúa *in vivo* a través de su receptor FPR2/ALX disminuyendo los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1 (Serhan & Levy, 2018) y migración de neutrófilos, junto con acciones pro-resolutivas como el aumento del reclutamiento de monocitos no dependiente de citoquinas inflamatorias, el aumento de la capacidad fagocítica y la diferenciación de macrófagos de M1 a M2 (Capó et al., 2018).

Existen pocos estudios en los que se haya estudiado el efecto de RvD1 en tejido cardíaco, pero se ha demostrado que, en modelos de infarto del miocardio, RvD1 promueve la síntesis del receptor ALX, la esferocitosis de neutrófilos asociada a un aumento de la población de macrófagos M2 y la disminución de la deposición de colágeno (Kain et al., 2015). Además, en un modelo de isquemia/reperfusión (I/R), RvD1 previno la apoptosis de los CM al disminuir la activación de la caspasa 3/8 y NF- $\kappa$ B, junto con la activación de la vía PI3K/Akt (Gilbert et al., 2015). Además, en nuestro laboratorio se demostró recientemente que, en FC expuestos a Ang II, RvD1 disminuye el calcio intracelular, la expresión y transcripción de IL-6, MCP-1, VCAM-1 y TNF- $\alpha$ , la secreción al medio de cultivo de MCP-1 e IL-6, y la adhesión de células mononucleares de bazo.

En resumen, está ampliamente descrito *in vivo* e *in vitro* la acción proinflamatoria de Ang II al inducir el aumento de moléculas de adhesión celular, citoquinas a nivel plasmático y tisular, reclutamiento de leucocitos, hipertrofia y

remodelamiento cardíaco, que pueden conducir a daño de órgano y falla cardíaca. Por esta razón, es de interés estudiar si la RvD1, por sus acciones antiinflamatorias y pro-resolutivas, es capaz de limitar el efecto inflamatorio de la Ang II asociado al desarrollo de HTA e hipertrofia cardíaca, y por tanto proporcionar efectos cardioprotectores novedosos y con potencial terapéutico.



## **2. HIPÓTESIS**

La Resolvina-D1 previene la hipertensión arterial y remodelamiento cardíaco en ratones C57BL/6 infundidos con Angiotensina II.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Demostrar que RvD1 previene la hipertensión arterial, hipertrofia del ventrículo izquierdo y deposición de colágeno en el miocardio inducido por Ang II asociado a la reducción de la respuesta inflamatoria.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

4.1 Demostrar que RvD1 disminuye la inflamación inducida por Ang-II a los 7 y 14 días de infusión

4.2 Evidenciar que RvD1 previene la hipertrofia generada por Ang-II a los 7 y 14 días de infusión

4.3 Demostrar que RvD1 previene la fibrosis inducida por Ang-II a los 7 y 14 días de infusión

4.4 Demostrar que RvD1 previene la HTA generada por Ang-II a los 7 y 14 días de infusión

## **5. MÉTODOS**

### **5.1 Animales**

Se obtuvieron ratones machos C57BL/6 entre 6-8 semanas de edad y 20-24 g de peso desde el Bioterio de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Los animales se identificaron con grapas metálicas numeradas y se mantuvieron en jaulas separadas por grupo experimental (a un máximo de tres animales por jaula) con ciclos de luz/oscuridad de 12 h y acceso *ad libitum* a alimento y agua. Todos los estudios se realizaron de conformidad con el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile (FOUCH 130806), las guías ARRIVE y la Guía NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, actualizada en 2011 ([http:// Grant.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-Use-of-Laboratory-Animals](http://Grant.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-Use-of-Laboratory-Animals))

### **5.2 Modelo de hipertensión arterial inducida por Ang II**

Mini-bombas osmóticas (Alzet, modelo 1007D o 1002) se cargaron con Ang II (A9525, Sigma-Aldrich) diluida en solución salina seguido de cebado durante toda la noche de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se preparó RvD1 (# 10012554, Cayman Chemical) en solución salina y se almacenó a -80 ° C hasta su uso.

En condiciones asépticas, los ratones fueron anestesiados con oxígeno e isoflurano (2-3%) durante todo el procedimiento de implantación de la bomba (10-15 min). Primero, a los ratones se les administró ungüento oftálmico e inyección de analgésico subcutáneo (meloxicam 2 mg/kg), luego se hizo una pequeña incisión a nivel escapular medio y se creó un bolsillo subcutáneo usando una pinza hemostática. Posteriormente, se insertó la bomba osmótica y se cerró la incisión con suturas. Después de la cirugía, los ratones recibieron terapia de fluidos s.c, ungüento antiséptico para heridas y se les permitió despertar y volver a poner en su jaula. Para los ratones con implante simulado o *sham*, el bolsillo subcutáneo se cerró sin implantar una bomba. A los ratones se les infundió angiotensina-II (1,5 mg/kg/ día) durante 7 o 14 días (Atchison et al., 2020), y se les administró diariamente solución salina o RvD1 (3 µg/kg/día i.p) (Kain et al., 2015) comenzando un día después de la cirugía y hasta el sacrificio.

Los animales se asignaron al azar a sus respectivos grupos según el peso corporal, lo que resultó en 8 grupos experimentales: 1) Control (*sham*) de 7 días, 2) Control (*sham*) de 14 días, 3) Infusión de Ang II por 7 días, 4) Infusión de Ang II por 14 días, 5) RvD1 durante 7 días, 6) RvD1 durante 14 días, 7) Infusión de Ang II + RvD1 por 7 días, 8) Infusión de Ang II + RvD1 por 14 días. Se asignaron 6 animales a cada grupo, y se utilizaron un total de 55 animales en el estudio, teniendo en cuenta el modelo y la puesta a punto de la extracción de tejido (2 animales), 3 animales que murieron después de la cirugía y 1 animal que murió debido a peleas con sus compañeros de jaula.

### **5.3 Ecocardiografía**

Una semana antes de la implantación de la bomba, se entrenó a los ratones para que se sometieran al procedimiento (día por medio se manipulaban imitando el examen mientras se esparcía gel en el tórax con un transductor simulado). El día antes de la cirugía, se realizó una ecocardiografía transtorácica 2D (Vivid Q, GE Healthcare), para evaluar los parámetros dimensionales y funcionales cardíacos basales sin anestesia, como se ha descrito anteriormente (Battiprolu et al., 2012). Se midieron el grosor del septum interventricular en diástole (SIVd), el grosor de la pared posterior del VI en diástole (PPVId), el diámetro del VI en sístole y diástole (DVI<sub>s</sub> y DVI<sub>d</sub>), la fracción de eyección (FE) y la fracción de acotamiento (FA). El mismo procedimiento se repitió a los 14 días de administración de Ang-II.

### **5.4 Medición de la presión arterial**

Se utilizó el método del mango de la cola o *tail-cuff* (NIBP LE5001, Aparato de Harvard) como se ha descrito anteriormente (Schiattarella et al., 2019). Una semana antes de la implantación de la bomba y cada dos días cuando no se realizaba el entrenamiento para ecocardiografía, los ratones se aclimataron al soporte de sujeción durante 10 min y luego se les permitió volver a sus jaulas. El día antes de la cirugía, los ratones fueron inmovilizados en el soporte y sus colas se calentaron en una almohadilla térmica durante 20 min antes de comenzar un

ciclo inicial de 30 tomas de presión arterial sistólica (PS), diastólica (PD) y presión arterial media (PAM) junto a mediciones de frecuencia cardíaca (HR). Se registró un promedio de 15-20 mediciones aceptables para cada ratón. Este procedimiento se repitió a los 7 y 14 días de infusión de Ang-II.

### **5.5 Recolección de tejido y análisis morfométrico**

Se administró a los ratones una asociación de de ketamina/xilazina i.p (87,5/12,5 mg/kg, 0,1 ml por 20 g de ratón) y se evaluó el nivel de anestesia mediante el reflejo pedal. La sangre se extrajo por punción retro-orbital en tubos Eppendorf recubiertos con EDTA 0,5 M, después de lo cual se cortó la cavidad torácica junto con el diafragma y se extirpó el corazón, que a continuación se pesó, fotografió y fijó en formalina tamponada neutra al 4%. Posteriormente, la tibia derecha se diseccionó, limpió y midió con una regla para calcular la relación peso del corazón/longitud de la tibia (PC/LT).

### **5.6 Inmunohistoquímica**

Los corazones fueron procesados y preparados siguiendo protocolos previamente validados (Schiattarella et al., 2019). Los tejidos incluidos en parafina se cortaron en secciones de 5  $\mu$ m para análisis histológicos. Para investigar la formación de tejido de infiltración, se utilizó tinción con hematoxilina/eosina (HE). Para determinar el área positiva de colágeno, se

realizó tinción con tricrómico de Masson y Sirius Red seguida de análisis usando el software ImageJ como se ha reportado (Schiattarella et al., 2019). Se emplearon ambas técnicas para reforzar la identificación de colágeno y ayudar en la cuantificación, donde Sirius Red presenta menos dificultades al ser más sencilla la separación de los canales (Arjmand et al., 2020). Para cada muestra, se capturaron 5 campos aleatorios a 40X utilizando un microscopio óptico (Leica DM500, Leica Microsystems), que fueron medidos y promediados para cada ratón, obteniendo el área de fibrosis intersticial (FIS) y perivascular (FPV).

Para estudiar la magnitud de la inflamación, se incubaron cortes de tejido con anticuerpos primarios contra mieloperoxidasa (MPO) (sc-390109, Santa Cruz Biotechnology, 1:50), ICAM-1 (Ab222736, Abcam, 1:200) y VCAM (Ab134047, Abcam, 1:200) durante 1,5 h a temperatura ambiente y luego se detectaron utilizando el sistema de polímeros Novolink (Leica Biosystems). Al igual que con la tinción anterior, se tomaron 5 campos aleatorios a 40X, se midieron y se promediaron por animal. El área positiva de la reacción por DAB se evaluó por densitometría según protocolos publicados (X. Qu et al., 2012). Se utilizó el software Fiji para todos los análisis (Schindelin et al., 2012).

## **5.7 Inmunofluorescencia**

El área transversal de los cardiomiocitos (ATC) se determinó empleando aglutinina de germen de trigo conjugada con FITC (WGA, Biotrend, 1:5000)

(Schiattarella et al., 2019). Para cada muestra, se tomaron 5 campos aleatorios a 40X digital utilizando un generador de imágenes fluorescente ZOE (Biorad), luego se midieron 20-30 CM por captura utilizando el software Fiji.

### **5.8 Muestreo de plasma para ensayo multiplex**

El plasma se separó por centrifugación de la sangre recolectada a 1500 g durante 15 min y 4°C sin usar frenos en la centrífuga, para luego ser almacenado en un congelador (-80°C) hasta su uso. Los niveles plasmáticos de Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), Interleuquina 6 (IL-6), Interleuquina 10 (IL-10), quimioattractante de keratinocitos (KC) y proteína quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1) se determinaron utilizando un kit Multiplex personalizado (MCYTOMAG-70K, Merck Millipore) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### **5.9 Análisis estadístico**

Todos los valores se presentan como media  $\pm$  desviación estándar (DS) de 6 ratones diferentes por condición experimental. Todos los datos se analizaron inicialmente para determinar su normalidad y homocedasticidad mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Brown-Forsythe. Si los datos eran homocedásticos con una distribución normal, se utilizó ANOVA unidireccional seguido de la prueba post-hoc de Tukey. Cuando los datos no eran homocedásticos, pero

seguían una distribución normal, se aplicó ANOVA unidireccional con corrección de Brown-Forsythe, seguido de la prueba post-hoc Dunnett T3. Los respectivos valores de p se muestran en cada gráfico. Se realizaron todas las posibles comparaciones por pares y no se excluyó ningún animal del estudio. No se utilizaron análisis estadísticos para determinar los tamaños de las muestras, y las estimaciones se elaboraron en función de nuestro enfoque experimental y la disponibilidad de recursos. El análisis de correlación de Pearson se realizó tabulando los datos para los animales con infusión de 14 días en una tabla de variables múltiples, donde cada columna representa la variable estudiada y cada fila un animal diferente, para finalmente ejecutar el análisis de correlación de dos colas con un intervalo de confianza del 95%, con los valores de r y p para cada par de variables. Las imágenes representativas mostradas representan los datos promedio obtenidos en todas las muestras. Se consideró significativo un valor de p inferior a 0,05 para todos los análisis correspondientes. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 9.0.2.

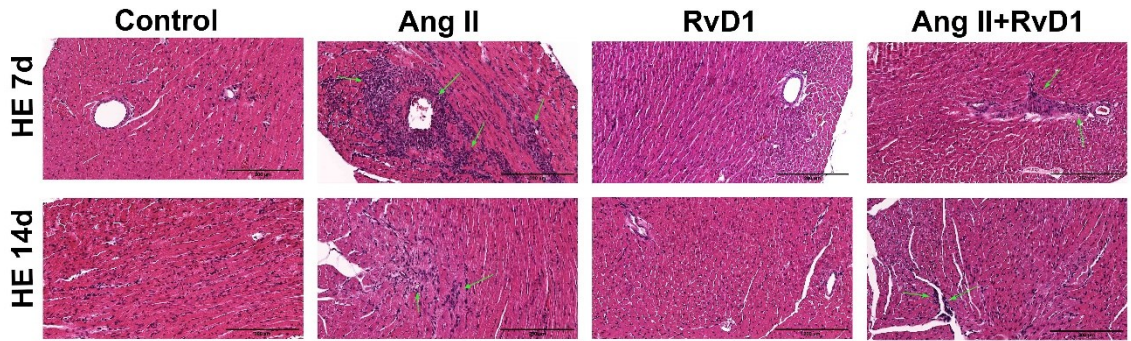


## **6. RESULTADOS**

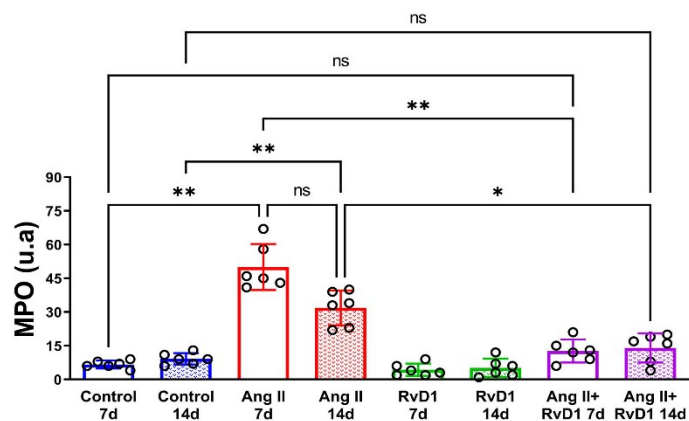
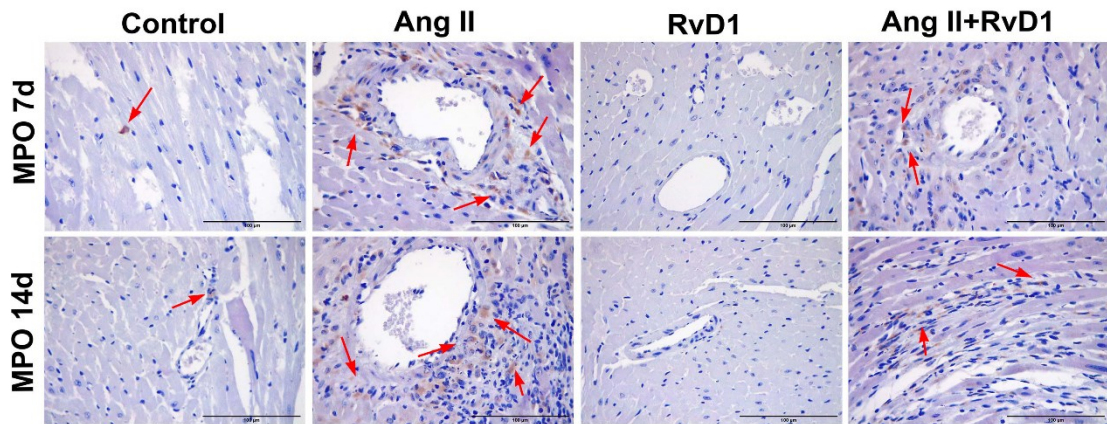
### **6.1 RvD1 suprime la formación de tejido de granulación e infiltración de neutrófilos en el tejido cardíaco**

Durante la inflamación cardíaca aguda se reclutan leucocitos hacia la zona de daño, facilitados por quimioattractantes como IL-8, para fagocitar el tejido lesionado e iniciar la reparación del tejido, como se ha observado en los modelos de infusión de Ang II (Matsuda et al., 2015). De esta manera, se estudió la formación de tejido de granulación mediante tinción de HE y presencia de neutrófilos a través de IHQ contra MPO. En este trabajo, la administración de Ang II resultó en un marcado aumento de la presencia de tejido de granulación (Figura 4) e infiltración de neutrófilos a nivel perivascular (Figura 5) a los 7 (6,5 veces sobre el control) y 14 días (3,5 veces sobre el control). Sin embargo, no estudiamos la composición de ese tejido, donde podría existir la contribución de FC en proliferación que actúan como mediadores en la inflamación cardíaca (Díaz-Araya et al., 2015).

El tratamiento con RvD1 previno de manera total la inflamación inducida por Ang II, que se evidencia en la reducción de la formación de tejido de granulación y la infiltración de neutrófilos a los 7 (3,9 veces bajo Ang II) y 14 días (2,3 veces bajo Ang II), indicando que RvD1 estaría ejerciendo propiedades antiinflamatorias al mitigar el reclutamiento y/o adhesión de neutrófilos en el tejido cardíaco.



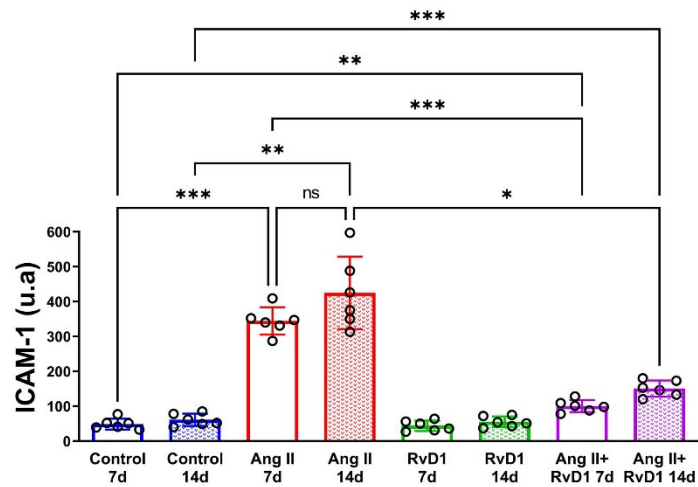
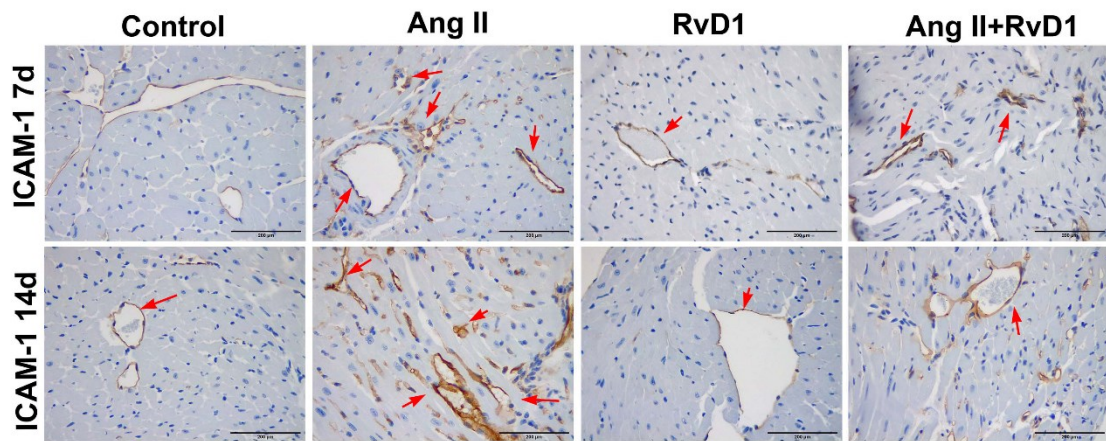
**Figura 4. RvD1 suprime la formación de tejido de granulación en el tejido cardíaco.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La formación de tejido de infiltración (indicada con las flechas) fue evaluada mediante tinción con hematoxilina-eosina (HE). La escala gráfica representa 200 µm.



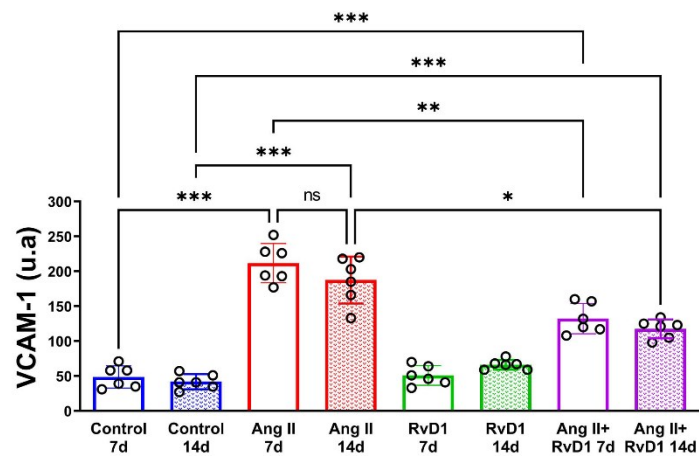
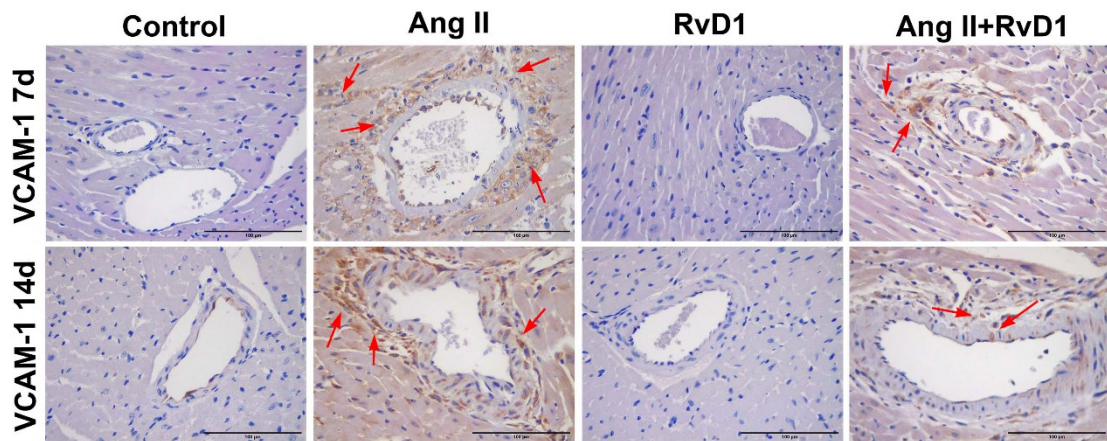
**Figura 5. RvD1 suprime la presencia de neutrófilos en el tejido cardíaco.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La presencia de neutrófilos fue detectada mediante IHQ contra MPO y posterior densitometría. La escala gráfica representa 100 µm. La tinción positiva se indica con flechas. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con corrección de Brown-Forsythe. \*\*p<0,01; \*p<0,05. n=6 para todos los grupos experimentales.

## **6.2 RvD1 disminuye los niveles cardíacos de ICAM-1 y VCAM-1**

ICAM-1 y VCAM-1 tienen un papel esencial en la adhesión y activación de leucocitos en eventos inflamatorios (Olivares-Silva et al., 2018), facilitando la actividad de neutrófilos y posteriormente monocitos. De esta manera, ambas proteínas de adhesión celular fueron evaluadas mediante IHQ para profundizar en lo observado con el tejido de infiltración y neutrófilos. Como se esperaba, la infusión de Ang II provocó una elevación pronunciada de la tinción de ICAM-1 a los 7 y 14 días (7 veces sobre el control en ambos tiempos) (Figura 6) y VCAM-1 a los 7 días (4,4 veces sobre el control) y 14 días (4,5 veces sobre el control) (Figura 7), y principalmente alrededor de los vasos sanguíneos, lo que estaría indicando participación del tejido endotelial. Sin embargo, el tratamiento con RvD1 disminuyó los niveles de ICAM-1 en ambos tiempos de infusión de forma parcial a los 7 (3,4 veces bajo Ang II) y 14 días (2,8 veces bajo Ang II); encontrándose la misma situación para VCAM-1 a los 7 (1,8 veces bajo Ang II) y 14 días (1,6 veces bajo Ang II). Estos resultados indicarían la acción antiinflamatoria de RvD1 a nivel de endotelio.



**Figura 6. RvD1 suprime la presencia de ICAM-1 en el tejido cardíaco.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 μg/kg/día). La presencia de ICAM-1 fue detectada mediante IHQ y posterior densitometría. La escala gráfica representa 100 μm. La tinción positiva se indica con flechas. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con corrección de Brown-Forsythe. \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05. n=6 para todos los grupos experimentales.

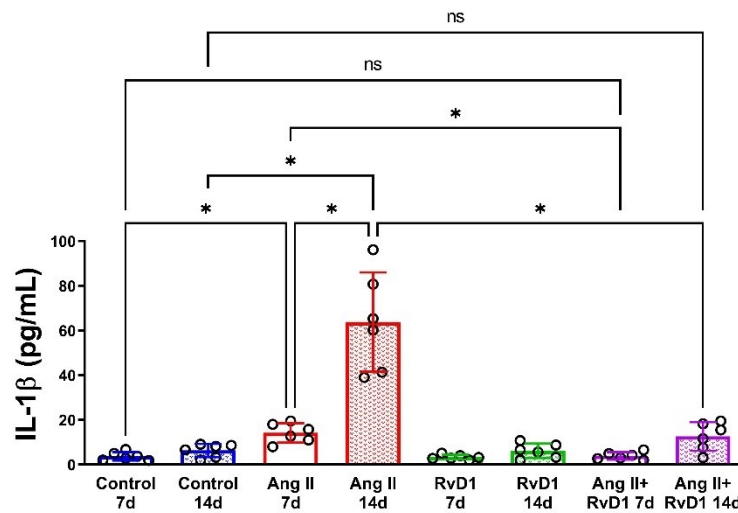


**Figura 7. RvD1 suprime la presencia de VCAM-1 en el tejido cardíaco.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La presencia de VCAM-1 fue detectada mediante IHQ y posterior densitometría. La escala gráfica representa 100 µm. La tinción positiva se indica con flechas. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con corrección de Brown-Forsythe. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ .  $n=6$  para todos los grupos experimentales.

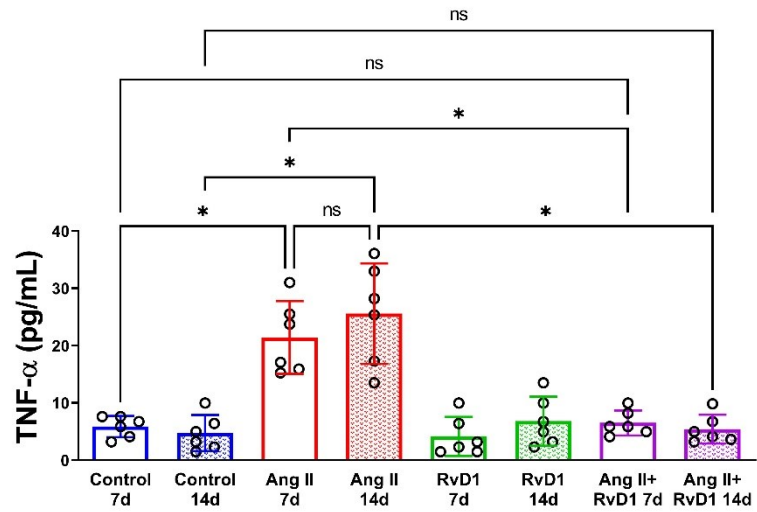
### **6.3 RvD1 reduce la presencia de citoquinas plasmáticas proinflamatorias**

La Ang II altera los niveles sistémicos y locales de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Satou et al., 2018), incrementando la secreción de factores de crecimiento y quimioattractantes. Para tener una mejor comprensión del proceso inflamatorio sistémico, se investigó el nivel de citoquinas plasmáticas a los 7 y 14 días de infusión de Ang II. Ang II aumentó la concentración plasmática de las citoquinas proinflamatorias de IL-1 $\beta$  (3,8 y 10 veces sobre el control a los 7 y 14 días respectivamente) (Figura 8), TNF- $\alpha$  (3,6 y 5,4 veces sobre el control a los 7 y 14 días respectivamente) (Figura 9), IL-6 (7,3 y 5,9 veces sobre el control a los 7 y 14 días respectivamente) (Figura 10), KC (5,7 y 1,7 veces sobre el control a los 7 y 14 días respectivamente) (Figura 11) y MCP-1 (5,2 y 2,4 veces sobre el control a los 7 y 14 días respectivamente) (Figura 12), evidenciada con una mayor magnitud significativa a los 7 días de infusión de Ang II en el caso de IL-6, KC y MCP-1, y a los 14 días de infusión de Ang II para IL-1 $\beta$ , además de niveles similares en ambos tiempos de administración para TNF- $\alpha$ . El tratamiento con RvD1 disminuyó la presencia de IL-1 $\beta$  (3,7 y 5,6 veces bajo Ang II a los 7 y 14 días respectivamente), TNF- $\alpha$  (3,3 y 4,7 veces bajo Ang II a los 7 y 14 días respectivamente), IL-6 (2,5 y 1,7 veces bajo Ang II a los 7 y 14 días respectivamente), KC (2,4 y 1,4 veces bajo Ang II a los 7 y 14 días respectivamente) y MCP-1 (3,2 y 3,4 veces bajo Ang II a los 7 y 14 días respectivamente) Además, en la figura 13, se observa que la Ang II también disminuyó la IL-10 plasmática a los 7 y 14 días de manera no significativa

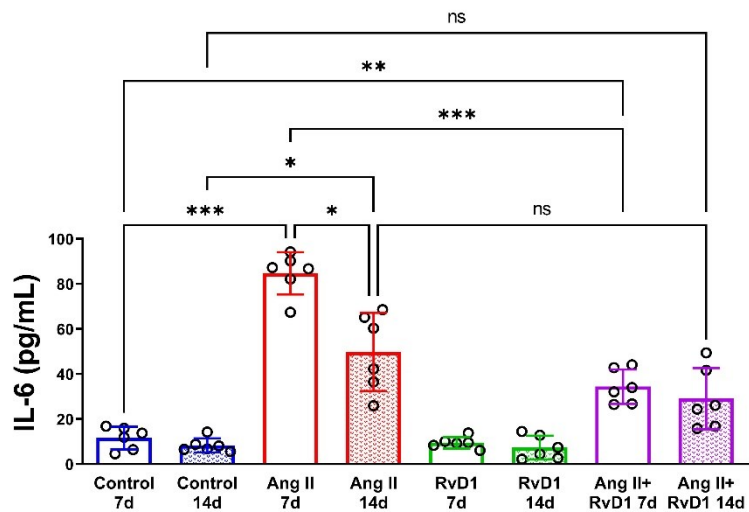
respecto al control; y lo que es más importante, la administración de RvD1 desencadenó un fuerte aumento de IL-10 (3,5 y 4,1 veces sobre el control a los 7 y 14 días respectivamente) con mayor magnitud a las dos semanas de tratamiento en comparación al grupo de Ang II+RvD1 de 7 días (1,5 veces respecto a los 7 días), no visto en el grupo de RvD1 solo e indicando que quizás RvD1 requiere un estímulo inflamatorio para manifestar sus efectos (Figura 13).



**Figura 8. RvD1 reduce el nivel de IL-1β en plasma.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 μg/kg/día). La presencia de IL-1β fue detectada mediante ensayo LUMINEX. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con corrección de Brown-Forsythe. \*p<0,05. n=6 para todos los grupos experimentales.

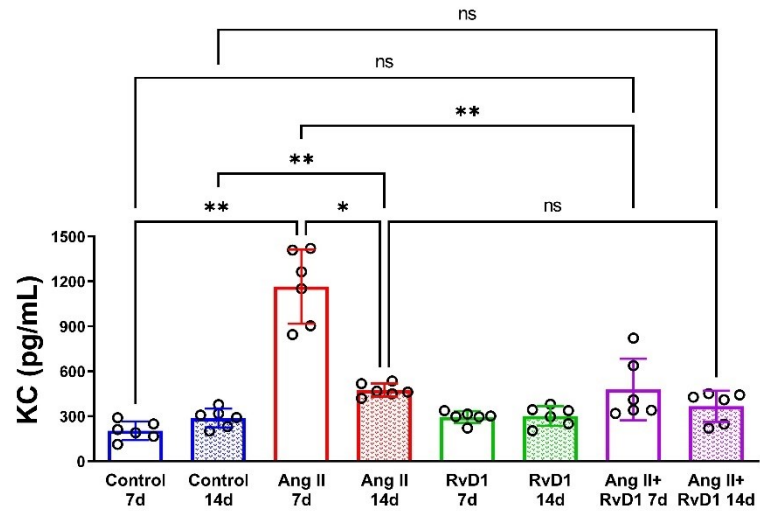


**Figura 9. RvD1 reduce el nivel de TNF- $\alpha$  en plasma.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3  $\mu$ g/kg/día). La presencia de TNF- $\alpha$  fue detectada mediante ensayo LUMINEX. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con corrección de Brown-Forsythe. \* $p$ <0,05.  $n$ =6 para todos los grupos experimentales.

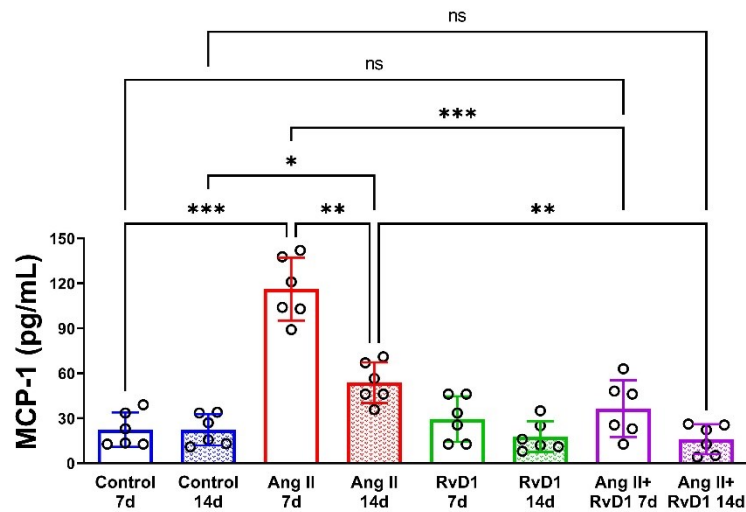


**Figura 10. RvD1 reduce el nivel de IL-6 en plasma.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3  $\mu$ g/kg/día). La presencia de IL-6 fue detectada mediante ensayo LUMINEX. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con corrección de Brown-Forsythe. \*\*\* $p$ <0,001; \*\* $p$ <0,01; \* $p$ <0,05.  $n$ =6 para todos los grupos experimentales.

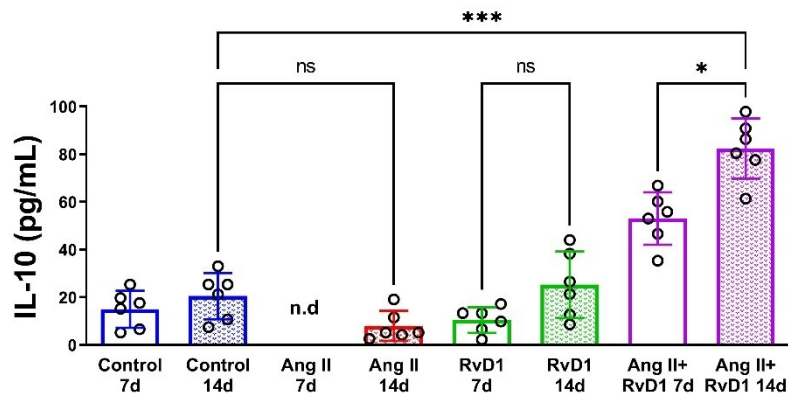




**Figura 11. RvD1 reduce el nivel de KC en plasma.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La presencia de KC fue detectada mediante ensayo LUMINEX. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con corrección de Brown-Forsythe. \*\*\*p<0,01; \*p<0,05. n=6 para todos los grupos experimentales.



**Figura 12. RvD1 reduce el nivel de MCP-1 en plasma.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La presencia de MCP-1 fue detectada mediante ensayo LUMINEX. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con corrección de Brown-Forsythe. \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05. n=6 para todos los grupos experimentales.

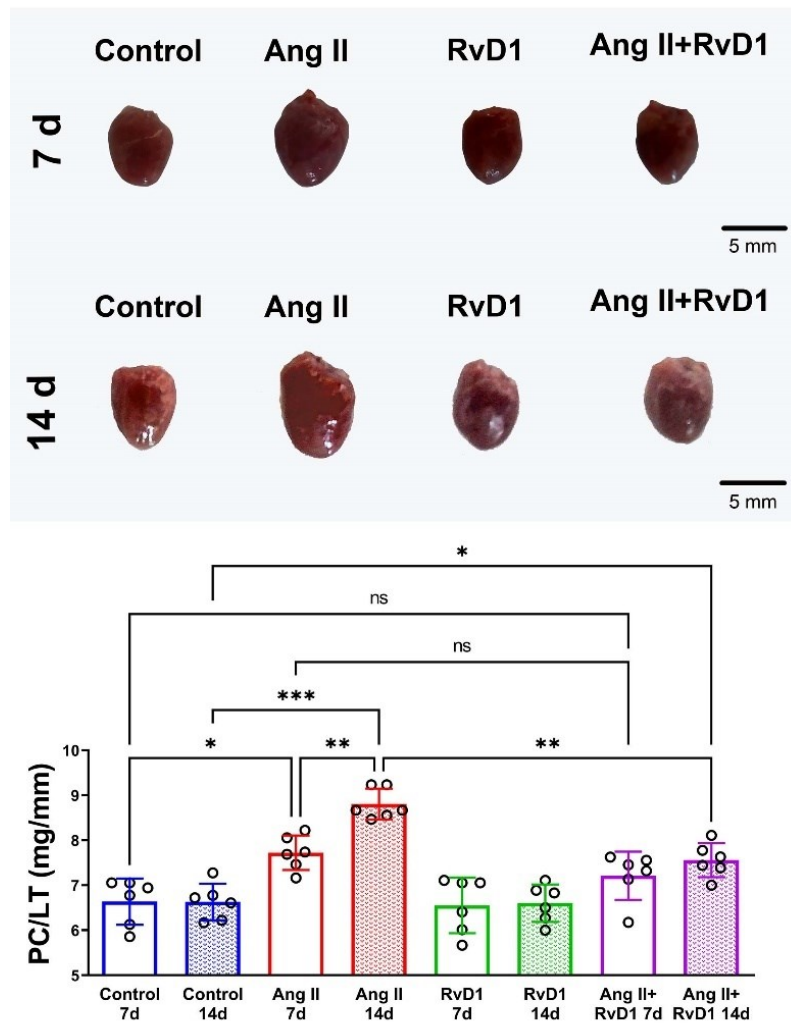


**Figura 13. RvD1 reduce el nivel de IL-10 en plasma.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La presencia de IL-10 fue detectada mediante ensayo LUMINEX. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con corrección de Brown-Forsythe. \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,05$ .  $n = 6$  para todos los grupos experimentales.

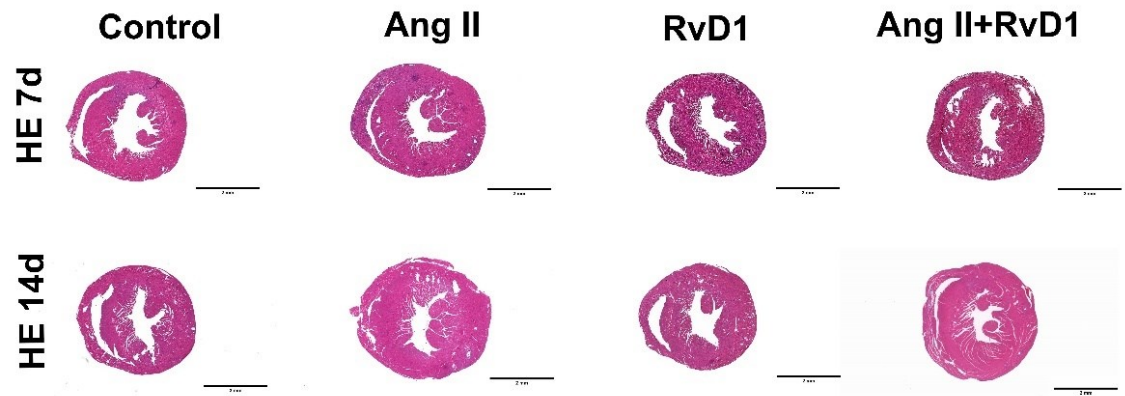
#### 6.4 RvD1 previene parcialmente la hipertrofia cardíaca

La hipertrofia cardíaca se genera por el incremento del tamaño de los cardiomiocitos, debido a las acciones hipertróficas directas de Ang II sobre su receptor AT1 en los cardiomiocitos activando la vía Akt (Ye et al., 2020), junto con la secreción de TGF-β1 por los FC y activación de la ruta JAK/STAT3 (Kurdi & Booz, 2011). En este estudio, el objetivo fue evaluar los efectos protectores de RvD1 en el desarrollo de esta patología. Como se muestra en la Figura 14, la relación PC/LT más alta se encuentra en los grupos con infusión de Ang II (1,2 y 1,4 veces sobre el control a los 7 y 14 días respectivamente), aunque más prominente a los 14 días y parcialmente prevenida en los animales Ang II+RvD1 (1,1 y 1,3 veces bajo Ang II a los 7 y 14 días respectivamente) Al realizar un corte transversal en los corazones, se refuerza lo encontrado en la figura anterior,

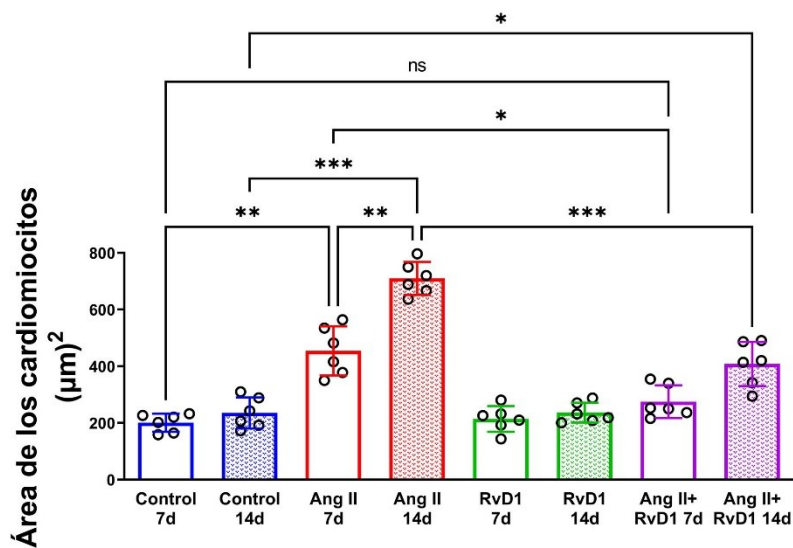
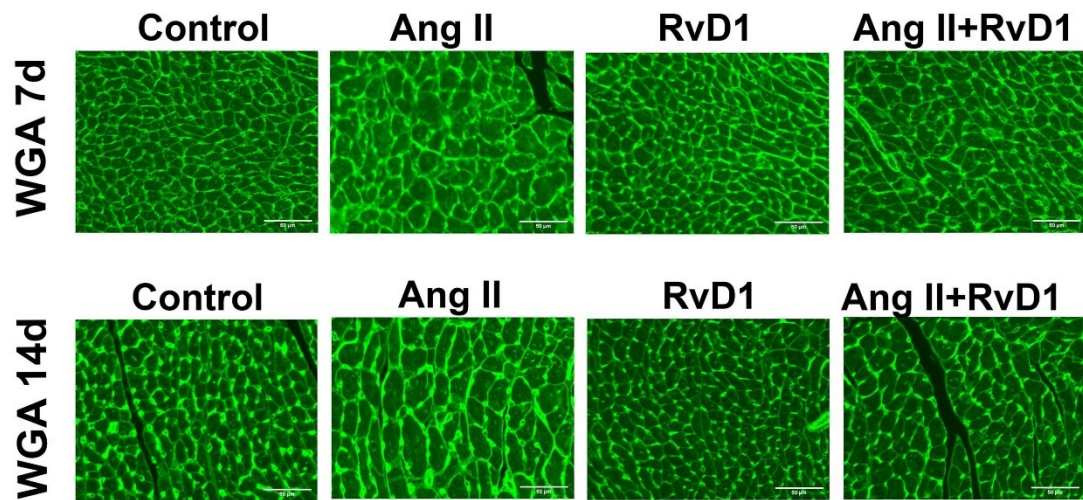
evidenciando paredes ventriculares más hipertróficas y disminución de la cámara del VI, que es prevenida nuevamente por RvD1. Además, los cardiomiocitos marcados con WGA evidenciaron área transversal cruzada (ATC), notablemente aumentada (2,3 y 3,1 veces sobre el control a los 7 y 14 días respectivamente), mientras que los ratones tratados con Ang II+RvD1 exhibieron CM con ATC disminuida de manera parcial (1,7 y 1,8 veces bajo Ang II a los 7 y 14 días respectivamente) (Figura 16). Estos resultados darían cuenta de acciones antihipertróficas que podrían relacionarse a la disminución de la inflamación producida por la RvD1 en el tejido cardíaco.



**Figura 14. RvD1 previene el aumento patológico de la masa cardíaca.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). El aumento de la masa cardíaca fue evaluado según la relación peso del corazón/longitud de la tibia (PC/LT). La escala gráfica representa 2 mm. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con test de Tuckey. \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05. n=6 para todos los grupos experimentales.



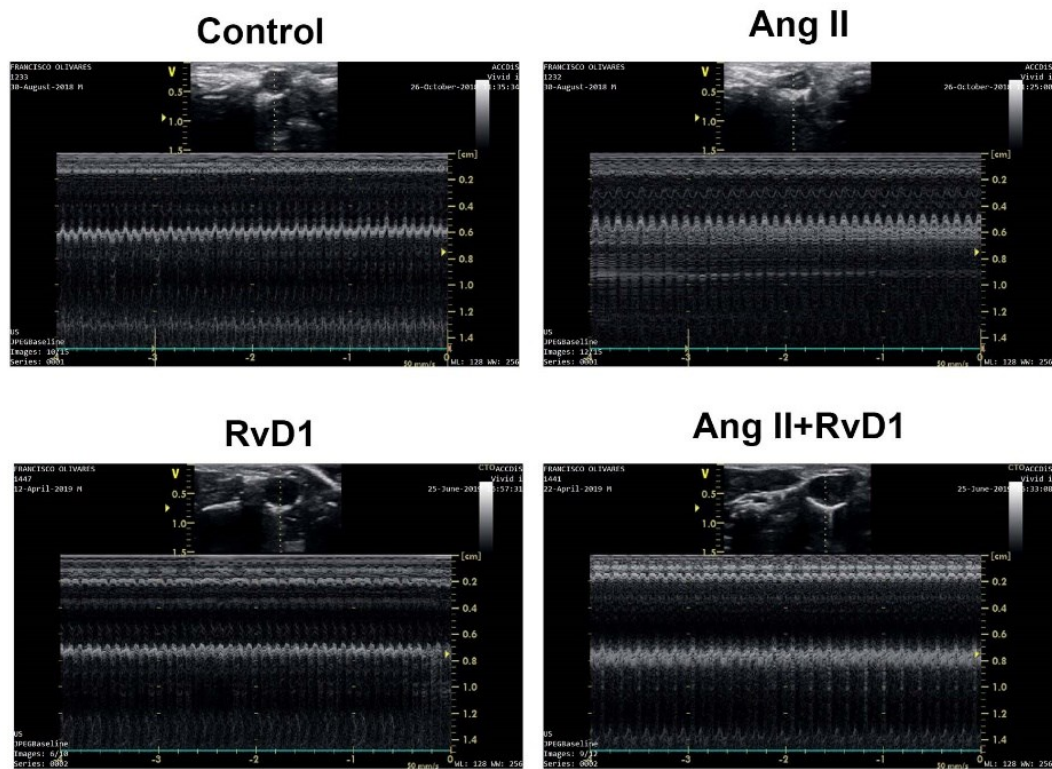
**Figura 15. RvD1 previene la hipertrofia cardíaca.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La integridad tisular y tamaño del corazón fueron evaluados mediante tinción con hematoxilina-eosina (HE). La escala gráfica representa 2 mm.



**Figura 16. RvD1 previene la hipertrofia de los cardiomiocitos.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La hipertrofia de los cardiomiocitos fue evaluada utilizando tinción con aglutinina de trigo (WGA) y posterior cálculo del área celular. La escala gráfica representa 50 µm. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con test de Tuckey. \*\*\*p<0,001; \*\*p<0.01; \*p<0,05. n=6 para todos los grupos experimentales.

## **6.5 RvD1 previene el engrosamiento del VI sin afectar la función cardíaca**

En la hipertensión inducida por Ang II, el engrosamiento de la pared del VI y el remodelamiento cardíaco desencadenan disfunción diastólica que puede progresar a la disminución del llenado del VI e insuficiencia cardíaca (Yoon & Eom, 2019). Debido a la relevancia clínica de esta patología, se realizó un estudio exhaustivo de los parámetros funcionales cardíacos a los 14 días de infusión (Figura 17, Tabla 1). Mientras que los ratones infundidos con Ang II evidenciaron engrosamiento del SIVd (1,9 veces sobre el control) (Figura 18) y PPVId (1,5 veces sobre el control) (Figura 19), que guarda relación con la hipertrofia observada anteriormente, sugiriendo quizás algún grado de disfunción sistólica y diastólica, evidenciada en el DVIs (1,2 veces sobre el control) (Figura 20) y DVId (1,4 veces sobre el control) (Figura 21) más elevadas, indicando alteraciones en la contracción y relajación del miocardio. En relación al grupo con tratamiento de RvD1, no afectó la funcionalidad cardíaca, pero sí originó la disminución en el diámetro del VI, previniendo parcialmente el engrosamiento del septum y pared posterior del VI de forma significativa (1,1 y 1,3 veces bajo Ang II para SVId y PPVId respectivamente). Es de destacar que, aunque RvD1 previno parcialmente la alteración del DVId (1,2 veces bajo Ang II), la FE (Figura 22) y FA (Figura 23) se conservaron sin variación en todos los grupos experimentales, situando a este modelo dentro del rango de hipertrofia adaptativa, aún reversible.

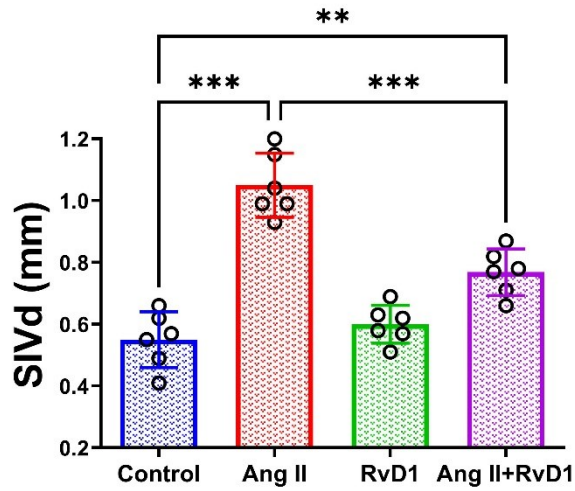


**Figura 17. RvD1 previene el engrosamiento de las paredes del ventrículo izquierdo.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). Se muestra una imagen representativa de la ecocardiografía en modo M realizada a cada grupo experimental.

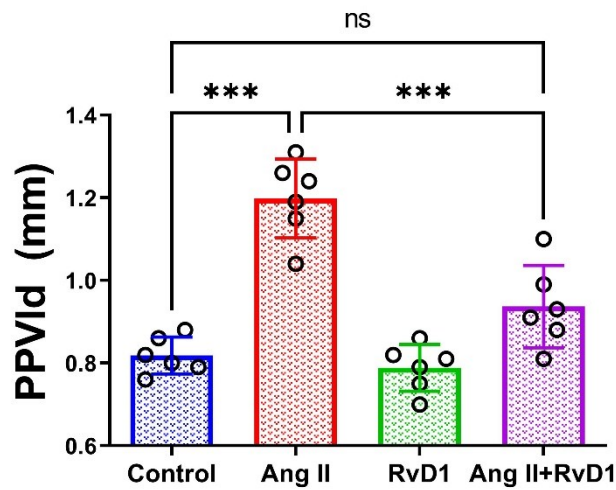
Parámetros	Control	Ang II	RvD1	Ang II+RvD1
SIVd (mm)	0,55 ± 0,09	1,05 ± 0,10 ***	0,60 ± 0,06	0,77 ± 0,075 ###
PPVId (mm)	0,82 ± 0,45	1,2 ± 0,10 ***	0,79 ± 0,06	0,94 ± 0,10 ###
DVIs (mm)	0,93 ± 0,08	1,14 ± 0,10 **	0,88 ± 0,01	1,01 ± 0,09
DVId (mm)	1,96 ± 0,11	2,62 ± 0,11 ***	1,98 ± 0,11	2,26 ± 0,10 ###
FE (%)	76,5 ± 2,66	81 ± 2,37	77,3 ± 3,01	76,50 ± 4,32
FA (%)	52,2 ± 2,48	55,3 ± 3,44	52,7 ± 2,58	53,50 ± 3,51

**Tabla 1. Parámetros funcionales obtenidos mediante ecocardiografía.** SIVd: septum interventricular en diástole, PPVId: pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole, DVIs: diámetro del ventrículo izquierdo en sístole, DVId: diámetro del ventrículo en diástole, FE: fracción de eyección, FA: fracción de acortamiento. Los valores se presentan como la media ± DS, n=6 para todos los grupos experimentales. \*\*p<0,01 vs control; \*\*\*p<0,001 vs control; ###p<0,001 vs Ang-II.

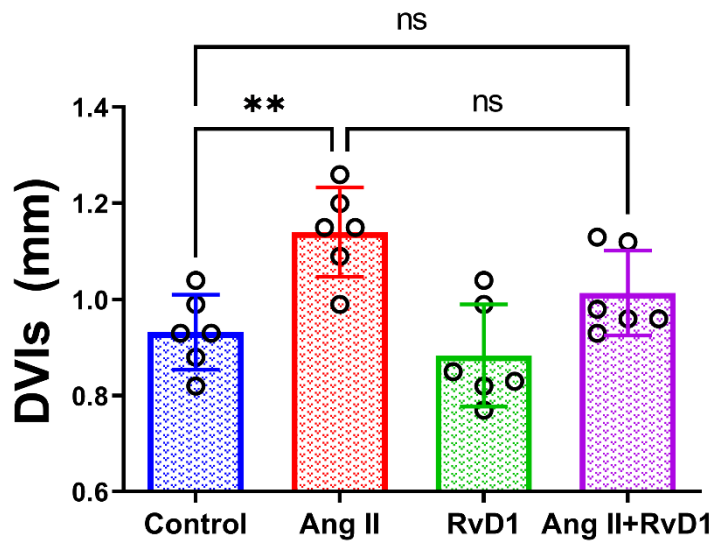




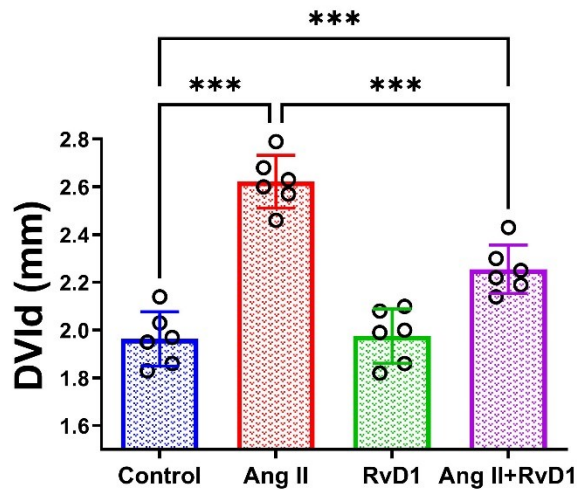
**Figura 18. RvD1 previene la hipertrofia del septum interventricular.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). El diámetro del septum interventricular en diástole (SIVd) fue evaluado mediante examen ecocardiográfico. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con test de Tuckey. \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01. n=6 para todos los grupos experimentales.



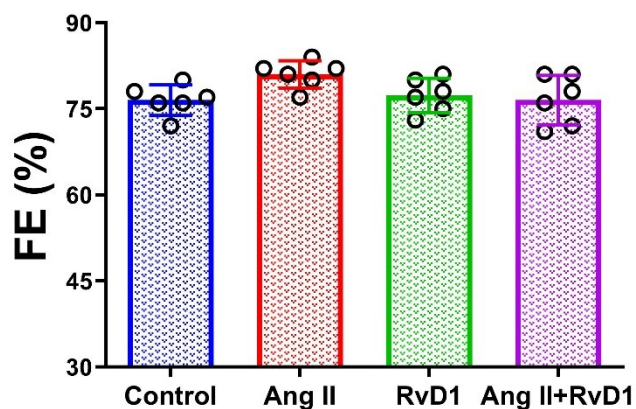
**Figura 19. RvD1 previene la hipertrofia de la pared posterior del ventrículo izquierdo.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). El diámetro de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole (PPVId) fue evaluado mediante examen ecocardiográfico. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con test de Tuckey. \*\*\*p<0,001. n=6 para todos los grupos experimentales.



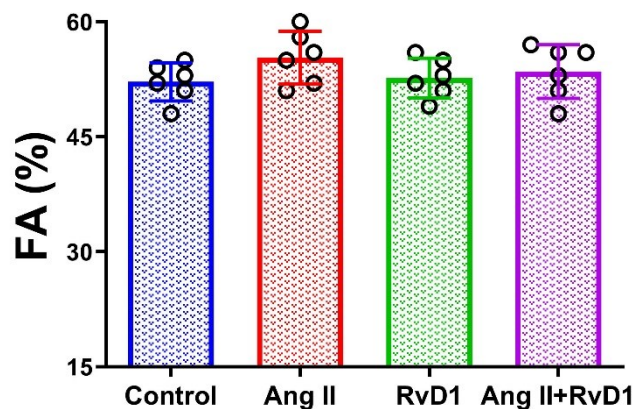
**Figura 20. RvD1 previene el incremento del diámetro del ventrículo izquierdo en sístole.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). El diámetro del ventrículo izquierdo en diástole (DVI) fue evaluado mediante examen ecocardiográfico. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con test de Tuckey. \*\*p<0,01. n=6 para todos los grupos experimentales.



**Figura 21. RvD1 previene el incremento del diámetro del ventrículo izquierdo en diástole.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). El diámetro del ventrículo izquierdo en diástole (DVI) fue evaluado mediante examen ecocardiográfico. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con test de Tuckey. \*\*\*p<0,001. n=6 para todos los grupos experimentales.



**Figura 22. RvD1 no varía la fracción de eyección.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La fracción de eyección (FE) fue evaluada mediante examen ecocardiográfico. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con test de Tuckey. n=6 para todos los grupos experimentales.

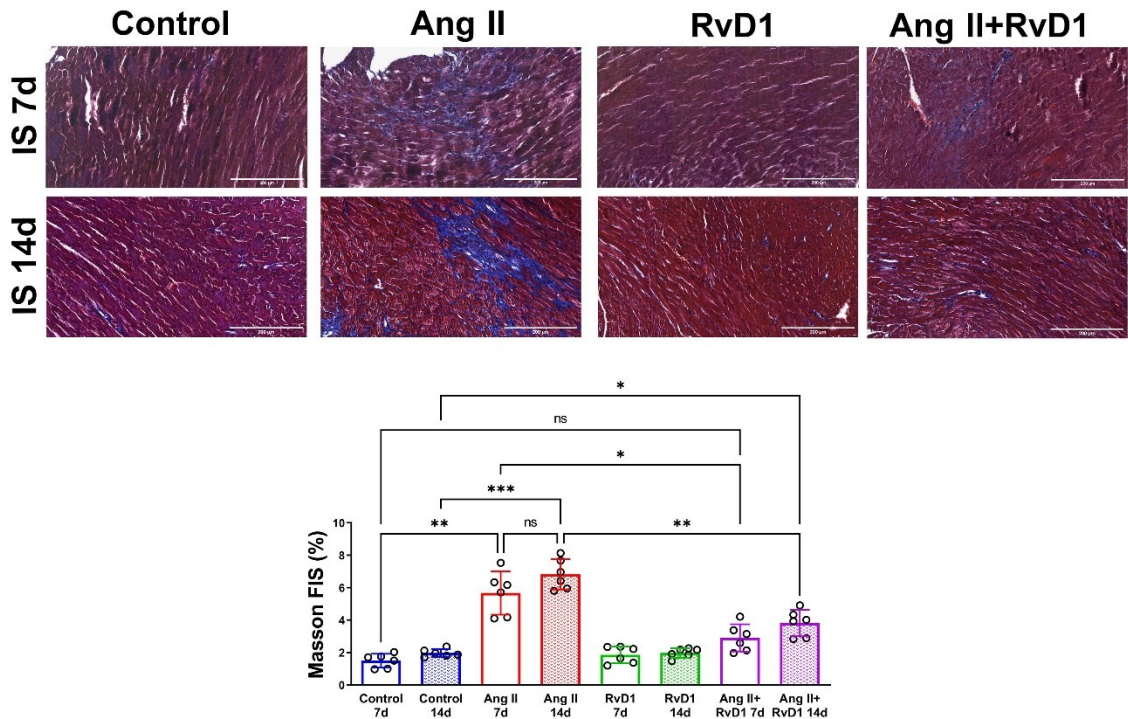


**Figura 23. RvD1 no varía la fracción de acortamiento.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La fracción de eyección (FA) fue evaluada mediante examen ecocardiográfico. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con test de Tuckey. n=6 para todos los grupos experimentales.

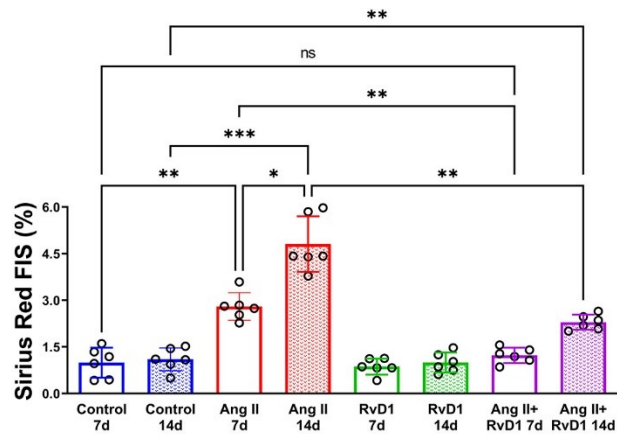
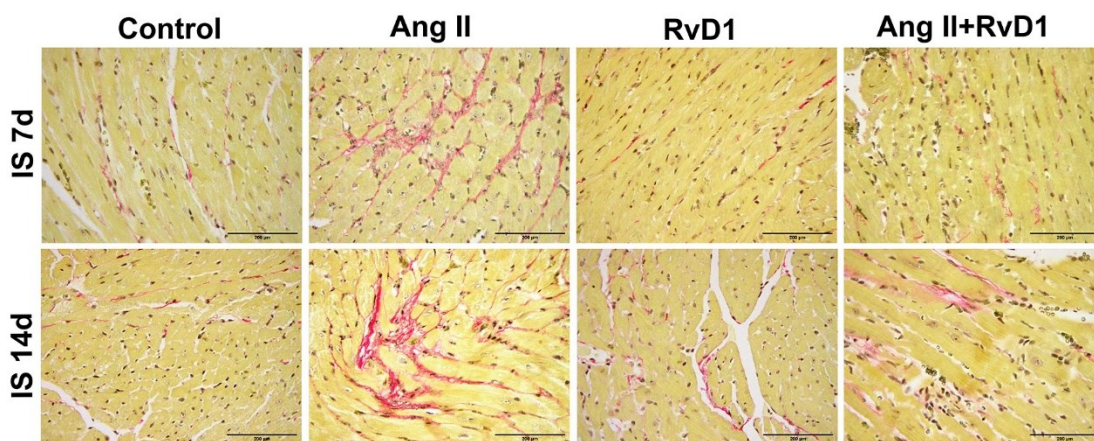
## **6.6 RvD1 previene parcialmente la deposición de colágeno en el corazón**

Los pacientes con PA elevada desarrollan una remodelación estructural del miocardio caracterizada por estrés oxidativo y fibrosis. El equilibrio alterado entre la síntesis y degradación de las moléculas de colágeno I/III termina con un depósito excesivo de fibras de colágeno en el miocardio, adquiriendo distensibilidad y contractilidad deficientes (Smolgovsky et al., 2021). En nuestro modelo, la Ang II aumentó la deposición de colágeno a los 7 y 14 días de infusión, evidenciada en una tinción más profunda con Tricrómico de Masson en la fibrosis intersticial (FIS, 3,8 y 4,5 veces sobre el control a los 7 y 14 días respectivamente, Figura 24) y la fibrosis perivascular (FPV, 3,4 y 4,6 veces sobre el control a los 7 y 14 días respectivamente, Figura 26); observándose incrementos similares con Sirius Red en la FIS (2,8 y 1,7 veces sobre el control a los 7 y 14 días respectivamente, Figura 25) y FPV (3,1 y 2,3 veces sobre el control a los 7 y 14 días respectivamente, Figura 27). Esto se apreció especialmente alrededor de los vasos sanguíneos, que mostraron una diferencia significativa a los 14 días de infusión y refuerza la noción que, en este modelo, los efectos de Ang II estarían más ligados al endotelio vascular. Observando los efectos del tratamiento con RvD1, nuevamente ejerció efectos cardioprotectores al prevenir parcialmente la fibrosis evaluada con Tricrómico de Masson en la FIS (2,3 y 1,9 veces bajo Ang II a los 7 y 14 días respectivamente, Figura 24) y la FPV (1,6 y 2,1 veces bajo Ang II a los 7 y 14 días respectivamente, Figura 26); reiterándose de forma paralela la atenuación con Sirius Red en la FIS (2,3 y 2,1 veces sobre el control

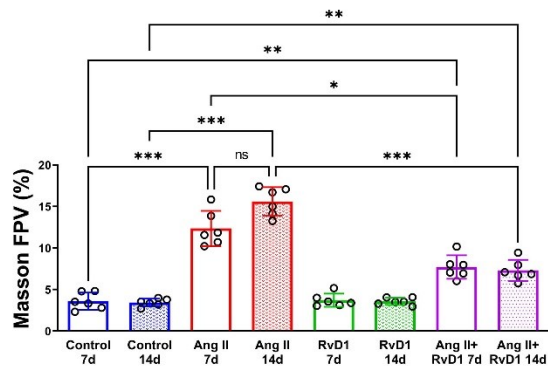
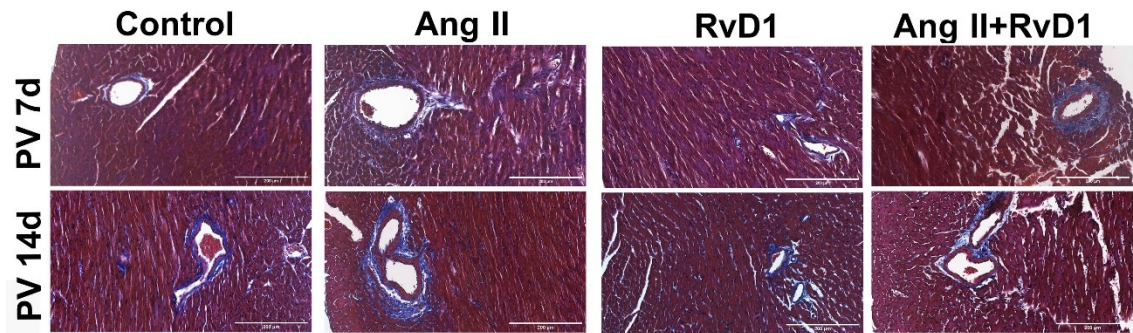
a los 7 y 14 días respectivamente, Figura 25) y FPV (1,4 y 1,7 veces sobre el control a los 7 y 14 días respectivamente, Figura 27).



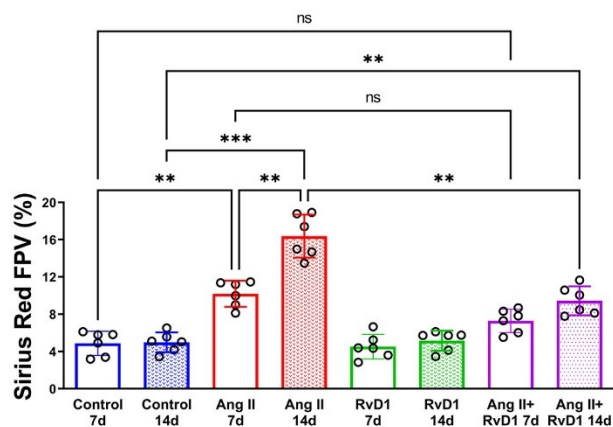
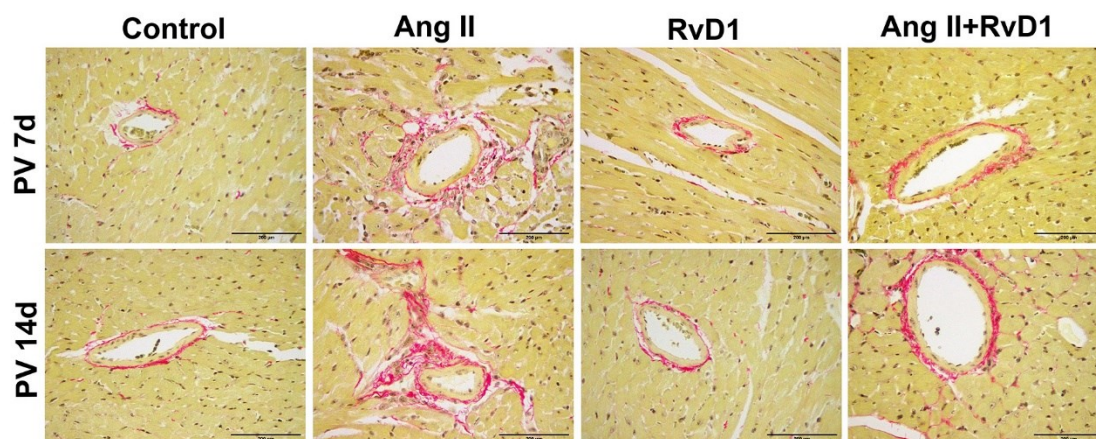
**Figura 24. RvD1 previene la deposición de colágeno intersticial en el tejido cardíaco.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La presencia de fibrosis intersticial (FIS) fue evaluada mediante tinción de Masson. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con corrección de Brown-Forsythe. \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05. n=6 para todos los grupos experimentales



**Figura 25. RvD1 previene la fibrosis intersticial en el tejido cardíaco.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La presencia de fibrosis intersticial (FIS) fue evaluada mediante tinción de Sirius Red. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con corrección de Brown-Forsythe. \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05. n=6 para todos los grupos experimentales.



**Figura 26. RvD1 previene la deposición de colágeno perivascular en el tejido cardíaco.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La presencia de fibrosis perivascular (FPV) fue evaluada mediante tinción de Masson. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con corrección de Brown-Forsythe. \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05. n=6 para todos los grupos experimentales.

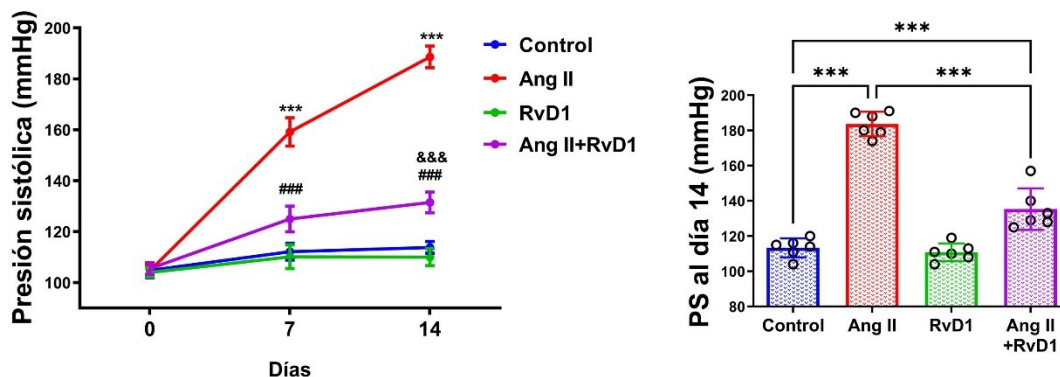


**Figura 27. RvD1 previene la fibrosis perivascular en el tejido cardíaco.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La presencia de fibrosis intersticial (FPV) fue evaluada mediante tinción de Sirius Red. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con corrección de Brown-Forsythe. \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01. n=6 para todos los grupos experimentales.

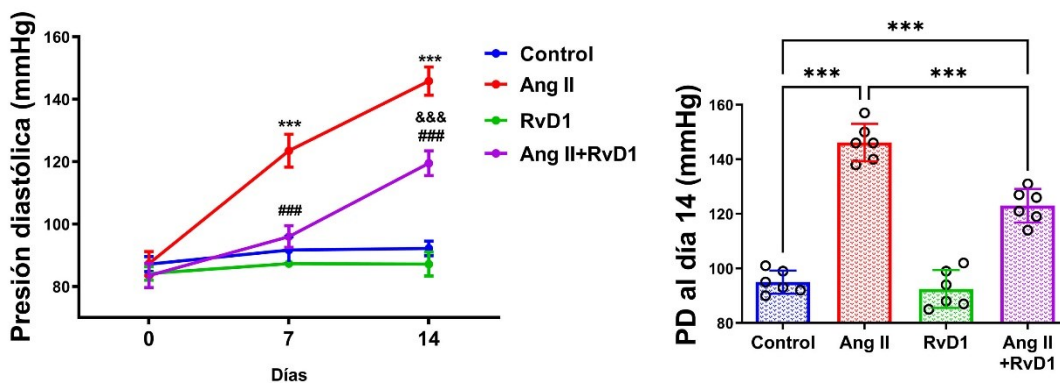


## **6.7 RvD1 atenúa el desarrollo de HTA**

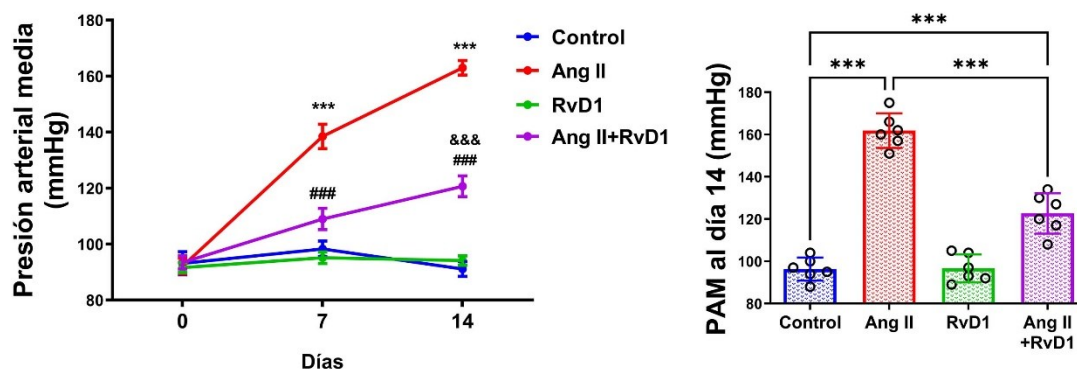
La Ang II eleva la PA a través de diversos mecanismos, como acciones proinflamatorias en el tejido cardíaco y los vasos sanguíneos, junto con efectos profibróticos en las células del músculo liso vascular y los FC (Satou et al., 2018). Como parámetro final de nuestro modelo, evaluamos la variación de la PA a los 7 y 14 días de la infusión de Ang II. Se logró demostrar que, efectivamente, Ang II aumentó la presión sistólica (PS, 1,6 veces sobre el control a los 14 días, Figura 28), la presión diastólica (PD, 1,5 veces sobre el control a los 14 días, Figura 29), la presión media (PAM, 1,7 veces sobre el control a los 14 días, Figura 30) y la HR (1,1 veces sobre el control a los 14 días, Figura 31) en ambos tiempos experimentales. No obstante, RvD1 atenuó el incremento de PS, PD, PAM y HR provocado por Ang II a los 7 y 14 días (PS 1,3 veces bajo Ang II; PD 1,2 veces bajo Ang II; PAM 1,3 veces bajo Ang II; HR 1,1 veces bajo Ang II), sugiriendo algún tipo de efecto a nivel de precarga (relacionado con el retorno venoso) y poscarga (existiendo algún nexo con la resistencia periférica).



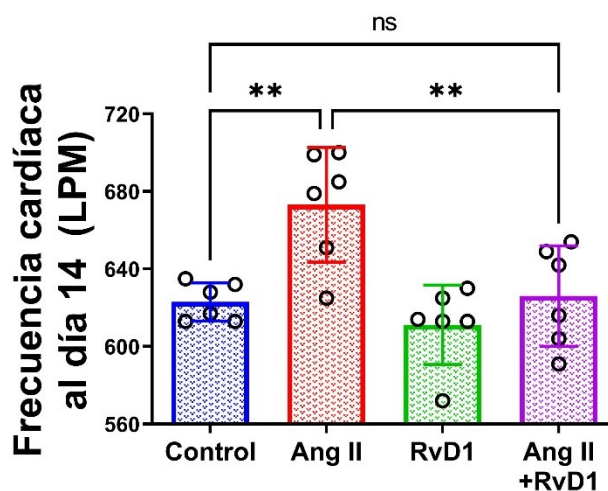
**Figura 28. RvD1 atenúa la hipertensión sistólica.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La presión sistólica (PS) fue evaluada utilizando un tensiómetro de cola. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con test de Tuckey y los valores exactos de p se muestran con sus respectivas comparaciones por pares. \*\*\*p<0,001 frente al control; ###p<0,001 frente a Ang II, &&&p<0,001 frente al control. Para el gráfico de dispersión, \*\*\*p<0,001. n=6 para todos los grupos experimentales.



**Figura 29. RvD1 atenúa la hipertensión diastólica.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La presión diastólica (PD) fue evaluada utilizando un tensiómetro de cola. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con test de Tuckey y los valores exactos de p se muestran con sus respectivas comparaciones por pares. \*\*\*p<0,001 frente al control; ###p<0,001 frente a Ang II, &&&p<0,001 frente al control. Para el gráfico de dispersión, \*\*\*p<0,001. n=6 para todos los grupos experimentales.



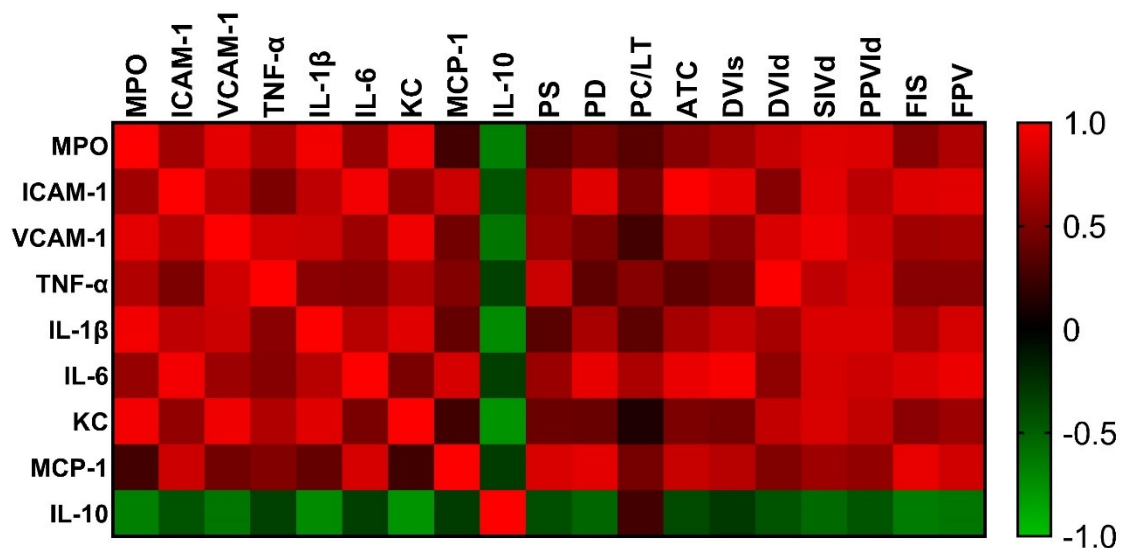
**Figura 30. RvD1 atenúa la hipertensión arterial media.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La presión arterial media (PAM) fue evaluada utilizando un tensiómetro de cola. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con test de Tuckey y los valores exactos de p se muestran con sus respectivas comparaciones por pares. \*\*\*p<0,001 frente al control; ###p<0,001 frente a Ang II, &&&p<0,001 frente al control. Para el gráfico de dispersión, \*\*\*p<0,001. n=6 para todos los grupos experimentales.



**Figura 31. RvD1 atenúa el incremento en la frecuencia cardíaca.** Se infundió Angiotensina II (Ang II, 1,5 mg/kg/día) durante 7 o 14 días, seguido de la administración diaria de RvD1 (3 µg/kg/día). La frecuencia cardíaca fue evaluada utilizando un tensiómetro de cola. Para el análisis estadístico, se utilizó ANOVA unidireccional con test de Tuckey. Para el gráfico de dispersión, \*\*p<0,01. n=6 para todos los grupos experimentales.

## **6.8 Asociación entre inflamación y remodelamiento cardíaco**

Con el fin de estudiar las relaciones de dependencia entre inflamación, hipertrofia y fibrosis, se realizó un análisis multivariado en ratones tratados con RvD1 de 14 días calculando un análisis de correlación de Pearson de dos vías (Tablas 2 y 3). Se eligió ese tiempo experimental debido a que los datos ecocardiográficos sólo se encuentran disponibles para esos grupos, y son necesarios para evaluar parámetros de hipertrofia cardíaca. La matriz de correlación (Figura 32) evidenció diferentes grados de dependencia positiva entre la inflamación y el remodelado cardíaco, en otras palabras, cuando aumenta un parámetro ocurre lo mismo con el otro. Es de destacar que encontramos correlaciones positivas significativas entre ICAM-1 y ATC (Figura 33), ICAM-1 y FIS (Figura 34), ICAM-1 y FPV (Figura 35), IL-6 y ATC (Figura 36), IL-6 y FIS (Figura 37) e ICAM-1 y FPV (Figura 38). Por otro lado, a pesar de que IL-10 evidenció una correlación negativa moderada con la mayoría de los parámetros hipertróficos y fibróticos (cuando IL-10 aumenta, los otros parámetros inflamatorios y relacionados a remodelamiento disminuyen), debido a los altos valores de  $p$  sólo se puede determinar tendencias relativas (Schober et al., 2018). Por lo tanto, los efectos antiremodelamiento de RvD1 podrían estar parcialmente relacionados con los efectos supresores en la inflamación cardíaca y sistémica.



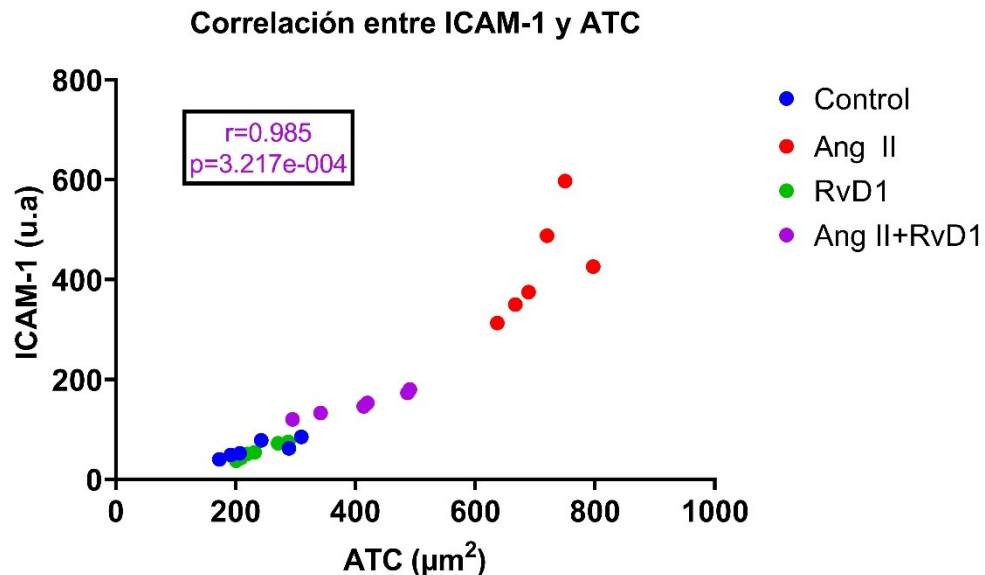
**Figura 32. Correlación entre inflamación y remodelamiento cardíaco.** Utilizando los datos del grupo con infusión de Angiotensina II y RvD1, se realizó el análisis de correlación de Pearson y la matriz correspondiente. MPO: mieloperoxidasa, PS: presión sistólica, DP: presión diastólica, PC/LT: peso del corazón/largo de la tibia, ATC: área transversal de los cardiomiocitos, SIVd: grosor del septum interventricular en diástole, PPVId: grosor de la pared posterior del VI en diástole, DVIs: diámetro del VI en sístole, DVId: diámetro del VI en diástole, FIS: fibrosis intersticial, FPV: fibrosis perivascular.

r de Pearson	MPO	ICAM-1	VCAM-1	TNF-α	IL-1β	IL-6	KC	MCP-1	IL-10
MPO	1.000	0.631	0.898	0.688	0.948	0.588	0.960	0.259	-0.670
ICAM-1	0.631	1.000	0.710	0.488	0.738	0.960	0.575	0.800	-0.438
VCAM-1	0.898	0.710	1.000	0.819	0.795	0.612	0.938	0.446	-0.623
TNF-α	0.688	0.488	0.819	1.000	0.541	0.523	0.692	0.513	-0.337
IL-1β	0.948	0.738	0.795	0.541	1.000	0.716	0.880	0.387	-0.732
IL-6	0.588	0.960	0.612	0.523	0.716	1.000	0.475	0.842	-0.332
KC	0.960	0.575	0.938	0.692	0.880	0.475	1.000	0.247	-0.780
MCP-1	0.259	0.800	0.446	0.513	0.387	0.842	0.247	1.000	-0.308
IL-10	-0.670	-0.438	-0.623	-0.337	-0.732	-0.332	-0.780	-0.308	1.000
PS	0.355	0.563	0.593	0.794	0.346	0.598	0.419	0.850	-0.409
PD	0.456	0.878	0.477	0.367	0.657	0.908	0.405	0.895	-0.539
PC/LT	0.344	0.470	0.262	0.528	0.362	0.665	0.118	0.454	0.262
ATC	0.529	0.985	0.637	0.365	0.650	0.917	0.489	0.780	-0.392
DVIs	0.621	0.898	0.539	0.446	0.766	0.971	0.459	0.717	-0.301
DVId	0.773	0.522	0.847	0.987	0.652	0.561	0.764	0.503	-0.440
SIVd	0.874	0.895	0.943	0.743	0.857	0.832	0.850	0.618	-0.557
PPVId	0.862	0.732	0.802	0.831	0.852	0.803	0.754	0.572	-0.444
FIS	0.537	0.867	0.630	0.536	0.677	0.862	0.545	0.913	-0.651
FPV	0.683	0.882	0.640	0.537	0.834	0.923	0.610	0.805	-0.623

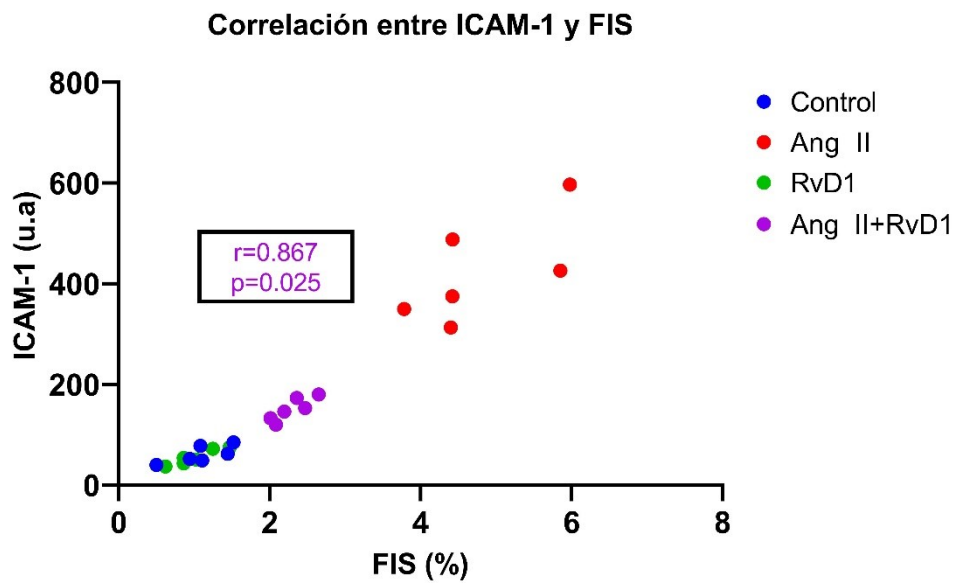
**Tabla 2. Valores del r de Pearson.** Se presentan los valores de r tras el análisis multivariable de correlación utilizando los datos del grupo Ang II+RvD1 a los 14 días. MPO: mieloperoxidasa, PS: presión sistólica, DP: presión diastólica, PC/LT: peso del corazón/largo de la tibia, ATC: área transversal de los cardiomiocitos, SIVd: grosor del septum interventricular en diástole, PPVId: grosor de la pared posterior del VI en diástole, DVIs: diámetro del VI en sístole, DVId: diámetro del VI en diástole, FIS: fibrosis intersticial, FPV: fibrosis perivascular.

Valores de P	MPO	ICAM-1	VCAM-1	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	KC	MCP-1	IL-10
MPO		0.1788	0.0151	0.1310	0.0040	0.2200	0.0023	0.6207	0.1452
ICAM-1	0.1788		0.1139	0.3259	0.0943	0.0024	0.2323	0.0558	0.3854
VCAM-1	0.0151	0.1139		0.0461	0.0585	0.1971	0.0056	0.3748	0.1860
TNF- $\alpha$	0.1310	0.3259	0.0461		0.2677	0.2875	0.1277	0.2979	0.5136
IL-1 $\beta$	0.0040	0.0943	0.0585	0.2677		0.1098	0.0208	0.4480	0.0980
IL-6	0.2200	0.0024	0.1971	0.2875	0.1098		0.3405	0.0355	0.5197
KC	0.0023	0.2323	0.0056	0.1277	0.0208	0.3405		0.6367	0.0675
MCP-1	0.6207	0.0558	0.3748	0.2979	0.4480	0.0355	0.6367		0.5528
IL-10	0.1452	0.3854	0.1860	0.5136	0.0980	0.5197	0.0675	0.5528	
PS	0.4894	0.2450	0.2148	0.0595	0.5019	0.2103	0.4079	0.0321	0.4213
PD	0.3639	0.0213	0.3389	0.4736	0.1559	0.0123	0.4259	0.0160	0.2700
PC/LT	0.5041	0.3472	0.6165	0.2818	0.4802	0.1496	0.8238	0.3657	0.6162
ATC	0.2807	0.0003	0.1741	0.4767	0.1623	0.0099	0.3245	0.0672	0.4425
DVIs	0.1886	0.0149	0.2696	0.3753	0.0760	0.0013	0.3595	0.1087	0.5625
DVIId	0.0712	0.2883	0.0334	0.0002	0.1608	0.2470	0.0768	0.3088	0.3832
SIVd	0.0228	0.0161	0.0048	0.0906	0.0293	0.0401	0.0321	0.1915	0.2508
PPVId	0.0273	0.0982	0.0552	0.0403	0.0314	0.0542	0.0835	0.2354	0.3781
FIS	0.2720	0.0255	0.1799	0.2733	0.1399	0.0271	0.2635	0.0110	0.1614
FPV	0.1344	0.0199	0.1707	0.2719	0.0391	0.0086	0.1985	0.0532	0.1863

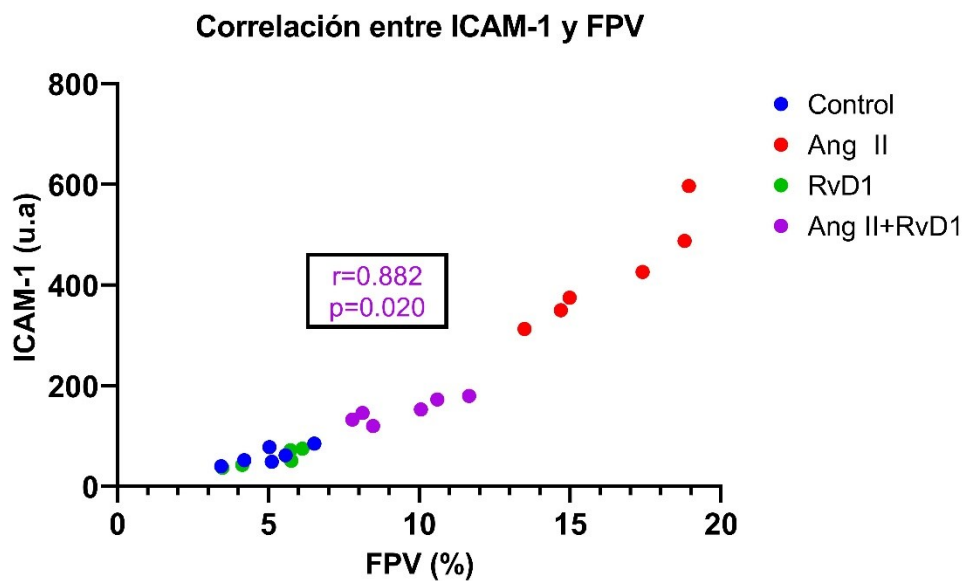
**Tabla 3. Valores de p de las correlaciones.** Se presentan los valores de p tras el análisis multivariable de correlación utilizando los datos del grupo Ang II+RvD1 a los 14 días. MPO: mieloperoxidasa, PS: presión sistólica, DP: presión diastólica, PC/LT: peso del corazón/largo de la tibia, ATC: área transversal de los cardiomiocitos, SIVd: grosor del septum interventricular en diástole, PPVId: grosor de la pared posterior del VI en diástole, DVIs: diámetro del VI en sístole, DVIId: diámetro del VI en diástole, FIS: fibrosis intersticial, FPV: fibrosis perivascular.



**Figura 33. El incremento de ICAM-1 está relacionado con la hipertrofia de los cardiomiocitos.** Análisis de correlación entre ICAM-1 y el área de los cardiomiocitos (ATC) utilizando los datos de infusión a los 14 días. Se muestra el valor de r y p para el grupo de Ang+RvD1.

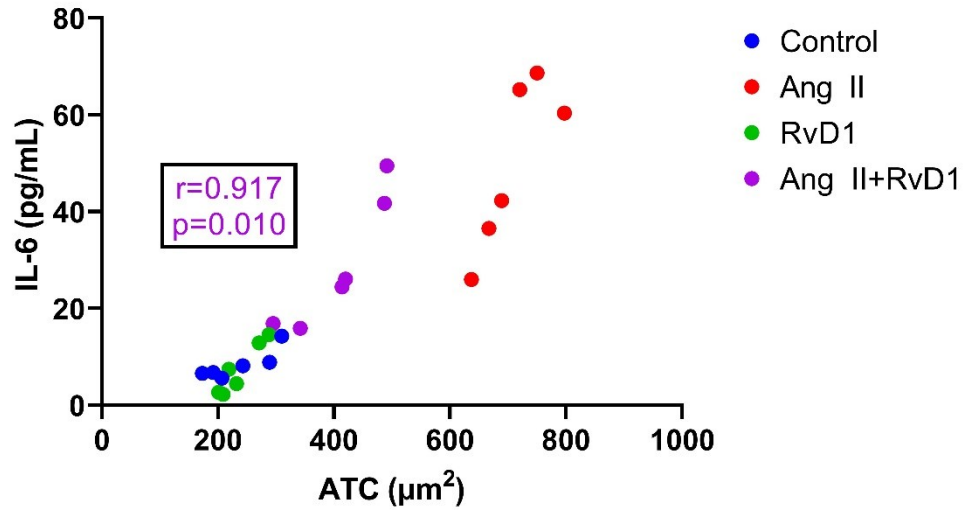


**Figura 34.** El incremento de ICAM-1 está relacionado con la fibrosis intersticial. Análisis de correlación entre ICAM-1 y fibrosis intersticial (FIS) utilizando los datos de infusión a los 14 días. Se muestra el valor de r y p para el grupo de Ang+RvD1.



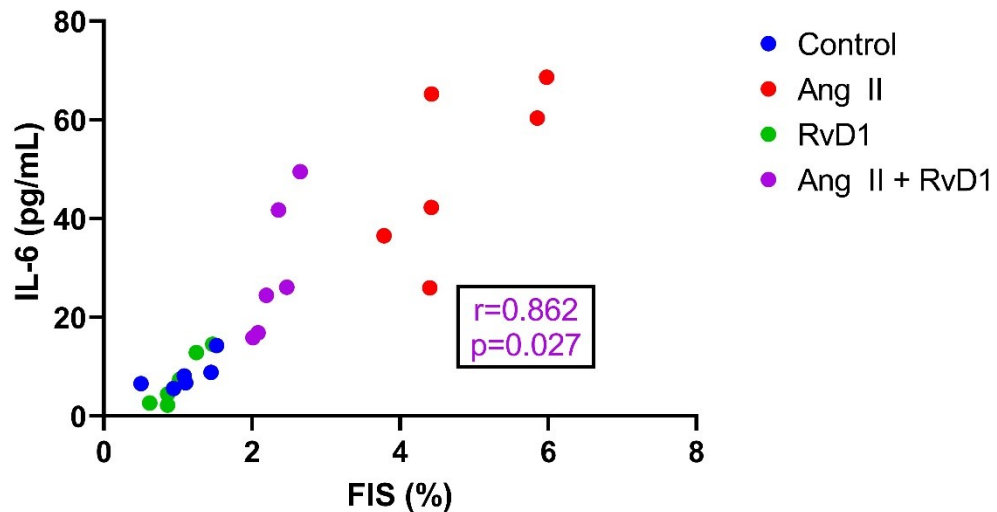
**Figura 35.** El incremento de ICAM-1 está relacionado con la fibrosis perivascular. Análisis de correlación entre ICAM-1 y fibrosis perivascular (FPV) utilizando los datos de infusión a los 14 días. Se muestra el valor de r y p para el grupo de Ang+RvD1.

### Correlación de IL-6 y ATC



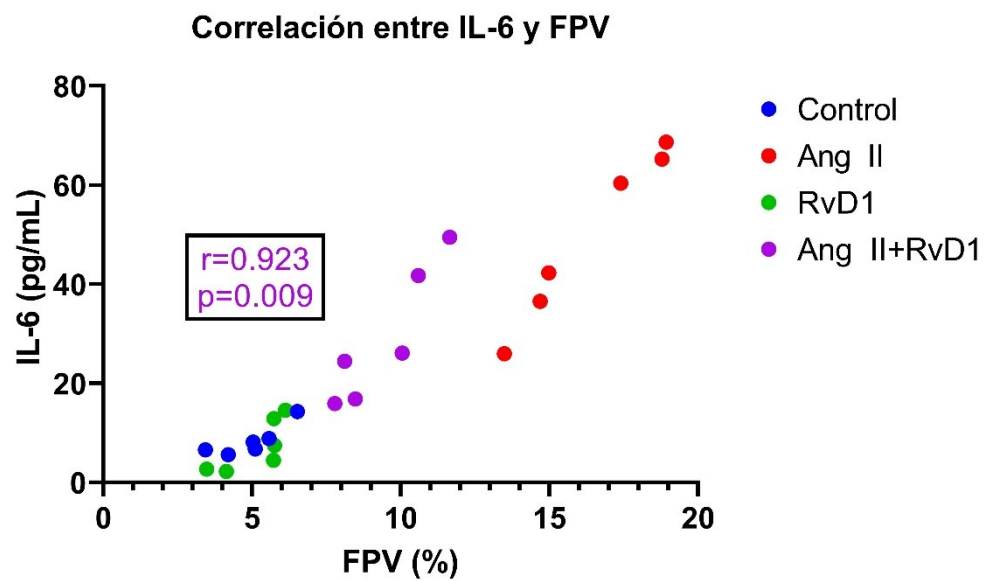
**Figura 36.** El incremento de IL-6 está relacionado con la hipertrofia de los cardiomiocitos. Análisis de correlación entre IL-6 y área de los cardiomiocitos (ATC) utilizando los datos de infusión a los 14 días. Se muestra el valor de r y p para el grupo de Ang+RvD1.

### Correlación entre IL-6 y FIS



**Figura 37.** El incremento de IL-6 está relacionado con la fibrosis intersticial. Análisis de correlación entre IL-6 y FIS (fibrosis intersticial) utilizando los datos de infusión a los 14 días. Se muestra el valor de r y p para el grupo de Ang+RvD1.





**Figura 38. El incremento de IL-6 está relacionado con la fibrosis perivascular.** Análisis de correlación entre ICAM-1 y fibrosis perivascular (FPV) utilizando los datos de infusión a los 14 días. Se muestra el valor de r y p para el grupo de Ang+RvD1.

## **7. DISCUSIÓN**

### **7.1 Acciones cardiovasculares de Ang II**

Como ha sido ampliamente descrito en la literatura, Ang II genera un ambiente inflamatorio que condiciona la homeostasis y lleva al desarrollo de hipertensión y enfermedades cardiovasculares, donde el sistema inmune tiene rol clave en la génesis de estas patologías (Satou et al., 2018). En este estudio, se demostró que Ang II a los 7 y 14 días induce la formación de tejido de granulación (Kong et al., 2014), aunque no se puede separar la contribución de cada factor (Ang II, leucocitos, FC) en la formación de los *clusters* de infiltración observados. Durante la inflamación aguda, Ang II incrementa la permeabilidad vascular y orquesta junto a moléculas de adhesión celular y quimioquinas el reclutamiento y activación de leucocitos en la zona de daño, de una forma tiempo-dependiente (Montezano et al., 2014). Nuestros resultados mostraron que, el nivel máximo de neutrófilos se observó a los 7 días, lo que corresponde a una etapa de inflamación más aguda que crónica, aunque Wang et al., demostraron infiltración de leucocitos desde un día después de la infusión de Ang II y alcanzando el máximo a los 14 días (L. Wang et al., 2018). De esta manera, se podría pensar que en este modelo al día 1 ya existiría reclutamiento y activación de leucocitos en el tejido cardíaco, que deberá ser demostrado en un trabajo posterior.

La secreción de quimioquinas inducida por Ang II, como IL-6, IL-1 $\beta$  y MCP-1 favorece el remodelamiento cardíaco con efectos en el tejido cardíaco y sistema inmune circulante (Feghali & Wright, 1997). Los resultados obtenidos en este

trabajo respaldan la literatura existente, encontrándose niveles incrementados de MCP-1, KC, IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  a los 7 y 14 días de infusión de Ang II, evidenciando un estado inflamatorio sistémico. Sin embargo, Ang II no logró aumentar la presencia de IL-10 por sí sola, efecto que sí hemos observado *in vitro* (Salas-Hernández et al., 2021) y otros grupos *in vivo* (Lima et al., 2016).

La hipertensión crónica genera cambios en la arquitectura del corazón, evidenciados en la hipertrofia de las paredes ventriculares, que puede conducir a daño de órgano y falla cardíaca. Específicamente, la administración crónica de Ang-II se caracteriza por inducir en los CM reprogramación génica hacia un fenotipo fetal, que tiene como consecuencia su hipertrofia e incremento de la masa cardíaca, concordante con lo observado por nosotros en relación PC/LT (Restini et al., 2017). De la misma manera, evidenciamos el aumento de la presión arterial, efecto clásico de la infusión de Ang II (Te Riet et al., 2015), que logramos detectar a las 7 y 14 días. El mecanismo de entrega de Ang II por las bombas osmóticas permite la infusión desde el momento en que se implanta en el ratón, generando hipertensión al día siguiente de la cirugía (L. Wang et al., 2018), por lo que es considerado un modelo eficiente y reproducible de HTA. Profundizando en este tema, existen esquemas de infusión de hasta 4 semanas, donde es posible detectar falla cardíaca y daño en otros órganos como riñón y pulmón (Nakagawa et al., 2020), pero que escapan al espectro acotado en este trabajo.

## **7.2 Acciones antiinflamatorias de RvD1**

Como se mencionó anteriormente, la acción crónica de Ang II puede conducir al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, por mecanismos relacionados a daño vascular, expresión de moléculas de adhesión celular, secreción de citoquinas y reclutamiento de células inmunes (Satou et al., 2018). En este estudio, se demostró que Ang II a los 7 y 14 días induce la formación de tejido de granulación, compuesto por leucocitos infiltrantes, FC en proliferación y colágeno en una fase tardía (Kong et al., 2014). Durante la inflamación aguda, Ang II aumenta la permeabilidad vascular a través de la síntesis endotelial de VEGF que, orquestada con una expresión sostenida de ICAM-1, VCAM-1 y KC, facilita el reclutamiento (migración y adhesión) de neutrófilos en el tejido cardíaco (Montezano et al., 2014). La secreción paracrina de quimioquinas y el daño de las ROS mediado por Ang II contribuyen a mantener el microambiente inflamatorio. Posteriormente, la apoptosis de neutrófilos y la secreción de MCP-1 por FC y CM atraen subpoblaciones de monocitos a la zona lesionada, que posteriormente se diferencian en macrófagos M1 en respuesta a citoquinas inflamatorias, como IL-6 (Fontes et al., 2015). Este proceso suele ser autolimitado; no obstante, la infusión crónica de Ang II provoca daño permanente al miocardio, como lo demuestra el depósito excesivo de colágeno y la expresión incrementada de IL-6, IL-1 $\beta$  y MCP-1, lo que favorece el remodelamiento cardíaco. Nuestros resultados mostraron que, el nivel máximo de neutrófilos y

monocitos se observó a los 7 días, lo que corresponde a una etapa de inflamación más aguda que crónica, aunque Wang et al., demostraron infiltración de leucocitos desde un día después de la infusión de Ang II y alcanzando el máximo a los 14 días (L. Wang et al., 2018). Sin embargo, a los 14 días nuestros resultados lograron evidenciar una disminución estadísticamente significativa de la infiltración de neutrófilos, lo que puede producir mecanismos pro-resolutivos iniciados en el tejido cardíaco, como han descrito otros trabajos (Kain et al., 2015). No obstante, RvD1 atenuó la presencia de neutrófilos a los 7 y 14 días, ejerciendo acciones antiinflamatorias y pro-resolutivas. Además, Kain et al., demostraron en un modelo de infarto del miocardio que RvD1 atenúa la infiltración de neutrófilos al reducir la densidad de neutrófilos del bazo, mientras que Spinosa et al., demostraron que RvD1 disminuye la formación de aneurismas aórticos al inhibir las trampas extracelulares de neutrófilos (NETosis) (Spinosa et al., 2018), otorgando a los neutrófilos infiltrantes la responsabilidad inicial en el desarrollo de patologías cardiovasculares. Aún se desconoce si estos mecanismos están involucrados en la inflamación dependiente de Ang II.

Como se indicó anteriormente, la infusión de Ang II también desencadena la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, que se observa a los 14 días de infusión y contribuye a la infiltración de leucocitos con posterior daño cardiovascular (Lin et al., 2019). Nuestros resultados apoyan esta idea, encontrando una mayor expresión intersticial y particularmente perivascular de ICAM-1 y VCAM-1 a los 7 y 14 días, que fue más significativa a las dos semanas para ICAM-1, lo que

apuntaría a un compromiso endotelial considerable y un efecto dependiente del tiempo de Ang II, ya descrito en la literatura (Kiarash Arash et al., 2001). En particular, RvD1 previno la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en congruencia con hallazgos previos en FC (Salas-Hernández et al., 2021) de rata y CM de ratones (M. Wang et al., 2020) estimulados con LPS, y en modelos de dermatitis psoriasiforme inducida por imiquimod (Xu et al., 2018), respaldando las acciones encontradas en este estudio.

Las acciones proinflamatorias de la Ang II también involucran la expresión y secreción de citoquinas locales y sistémicas (Jia et al., 2012), que se han evidenciado en un aumento de los niveles de ARNm de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , KC y MCP-1 en el corazón (Fontes et al., 2015) y monocitos en cultivo, con consiguiente polarización al fenotipo M1 (Wu et al., 2020). En este estudio, Ang II provocó un aumento significativo de IL-6, KC y MCP-1 plasmáticos a los 7 días más que a los 14 días, lo que indicaría una fase inflamatoria aguda dominada por señales de reclutamiento descritas por Montezano et al. (Montezano et al., 2014), mientras que este efecto lo observamos con IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  a los 14 días, que puede tener explicación según lo descrito por Feghali y Wright, donde el *feedback* positivo inducido por estas citoquinas en su propia expresión sería relevante (Feghali & Wright, 1997). Nuestros resultados apoyan las acciones antiinflamatorias sistémicas de RvD1 al disminuir los niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , KC y MCP-1 a los 7 y 14 días, que ya ha sido demostrado previamente en modelos de artritis (Benabdoun et al., 2019) y lesión pancreática

(Liu et al., 2016). Sin embargo, no se determinó la correlación de los niveles de citoquinas entre el tejido cardíaco y el plasma. Aunque los niveles de IL-10 no se vieron afectados por la Ang II, el tratamiento con RvD1 aumentó marcadamente su concentración plasmática a los 7 e incluso más a los 14 días, que destaca las acciones antiinflamatorias y pro-resolutivas en presencia de estímulos inflamatorios ya demostradas en otros trabajos (Benabdoun et al., 2019; Kain et al., 2015). Sin embargo, al estimular FC de rata con LPS se generó incremento de la secreción de IL-10 en el medio de cultivo, mientras que RvD1 disminuyó la expresión de esta citoquina a niveles del control (Salas-Hernández et al., 2021). Por lo tanto, se debe considerar que la respuesta inflamatoria *in vivo* presenta mayor complejidad al existir diferencia entre los estímulos, involucramiento de más tipos celulares y órganos participantes.

## **7.2 RvD1 previene el remodelamiento cardíaco inducido por Ang II**

Regresando a lo evidenciado en este estudio, la infusión de Ang II a los 7 y 14 días aumentó la masa cardíaca y el área transversal de los cardiomiocitos (ATC) con un mayor incremento de los efectos hipertróficos a las 2 semanas de entrega de Ang II. Además, la evaluación ecocardiográfica mostró engrosamiento del VI paralelo al incremento en el DVI y el DVI<sub>d</sub>, pero la FE Y FA se mantuvieron sin cambios significativos en todos los grupos, contrastando con la disfunción sistólica y diastólica comúnmente observada en modelos de infusión de Ang II

(Bacmeister et al., 2019) . Este engrosamiento se logra apreciar de cierta forma en la imagen comparativa de la ecocardiografía en modo M, y de mejor manera en la cuantificación del SIVd y PPVId, y tiene por objetivo contrarrestar el *stress* ventricular por el incremento de la presión ventricular al final de la sístole producto de una mayor RVP. Además del engrosamiento, la respuesta adaptativa involucra mayor capacidad contráctil para mantener el GC constante, evidenciado en menor DVIs sin generar cambio en el DVId (Oláh et al., 2016). Sin embargo, los resultados de este modelo muestran aumento en el DVIs y DVId. Esto se relaciona directamente con la hipertrofia y remodelamiento cardíaco, y sugiere una probable disminución de la distensibilidad del VI con consecuencias como menor capacidad contráctil, disminución del VE, mayor volumen de sangre al final de la diástole y aumento de la PD (Lilly, 2015).

Por otro lado, nuestros resultados mostraron que la administración diaria de RvD1 previno parcialmente la hipertrofia cardíaca en ambos esquemas de infusión. De esta forma, al existir menor incremento de la PS por el tratamiento con RvD1, se previene la hipertrofia del VI y por consiguiente los cambios en el DVIs y DVId. Estos efectos son similares a los observados en ensayos clínicos de beta-bloqueadores (Farrell et al., 2002) y antagonistas de los canales de calcio (Godfraind, 2017), donde se observa disminución de la PS, PD, MAP, HR e hipertrofia del VI. Cabe destacar, que, aunque se normalizó de forma parcial el diámetro del VI en sístole y diástole, no se observaron cambios en la FE y FA, incluso en el grupo infundido con Ang II. Una probable explicación se basaría en



que, la progresión a hipertrofia maladaptativa en modelos de infusión de Ang II, depende directamente de la dosis administrada, la edad del animal y la dieta (Lerman et al., 2019). En este estudio, la dosis y tiempo de infusión escogidos no serían suficientes para generar falla cardíaca, siendo necesario mayor tiempo de infusión complementado con intervención quirúrgica en otros órganos, como el riñón (Tsukamoto et al., 2013).

En relación al rol de SPM en otros modelos de hipertrofia cardíaca, se demostró que la suplementación alimentaria de DHA a ratas sometidas a ligamiento aórtico normalizó el GC y circulación coronaria sin afectar la masa cardíaca, proponiendo teóricamente una posible regulación del calcio mitocondrial y citoplasmático en los CM (McLennan et al., 2012). Adicionalmente, Kain et al. mostraron que RvD1 exhibe propiedades antihipertróficas en el infarto del miocardio, expresadas como disminución del engrosamiento de la PPVId, relación PC/LT (Kain et al., 2015) y ATC (Halade et al., 2018). Adicionalmente, se han evidenciado efectos similares en la hipertrofia epidérmica en un modelo de inflamación de la piel (Saito et al., 2018). Sin embargo la Maresina-1, otro SPM, indujo hipertrofia de los CM a través de la vía paracrina de IGF-1 *in vitro*, evidenciando que los efectos de las SPM depende del modelo experimental utilizado (Wahyuni et al., 2021).

Junto con la hipertrofia de los CM, Ang-II genera otros cambios en el miocardio, en especial en los FC. Los FC fueron considerados durante años sólo como células que mantenían la homeostasis estructural de tejido cardíaco, pero últimamente son objeto de estudio por su rol como células centinelas del tejido

cardíaco (Díaz-Araya et al., 2015), con participación directa en la orquestación de procesos inflamatorios a nivel paracrino como en *crosstalking* con el sistema inmune (Van Linthout et al., 2014). De esta forma, está descrito ampliamente que Ang-II induce la diferenciación de los CF a un fenotipo secretor denominado miofibroblasto cardíaco (MFC), caracterizado por mayor ensamblaje de proteínas estructurales como  $\alpha$ -SMA, lo que les permite la contracción o retracción del tejido a reparar a través de la síntesis de MEC (Gyöngyösi et al., 2017).

En relación a lo anterior, y para estudiar los efectos de Ang-II y RvD1 en la deposición de colágeno, se utilizó tanto la tinción tricrómica de Masson como la de Sirius Red, que permiten visualizar las fibras de colágeno en bloques de tejido. La figura comparativa muestra que los animales con infusión de Ang-II presentan más zonas fibróticas tanto a nivel perivascular como intersticial, resultado que es respaldado mediante cuantificación densitométrica. El mayor incremento en el porcentaje de fibrosis perivascular comparada a la intersticial podría explicarse por el incremento en parámetros hemodinámicos como la PA, junto a la inflamación crónica a nivel vascular, observable en el mayor *stress* oxidativo local y expresión de moléculas de adhesión celular (Jia et al., 2012), genera en mayor medida daño endotelial en HTA. Durante el curso de la infusión, las fibras de colágeno se depositan en la adventicia de las arterias a nivel sistémico, aumentando su rigidez y disminuyendo su permeabilidad a la vez que se gatillan mecanismos inflamatorios locales. Posteriormente, la

deposición de colágeno ocurre a nivel del tejido cardíaco, en un comienzo sin pérdida de CM y posteriormente con marcada apoptosis y formación de cicatriz (Kong et al., 2014). Este proceso de remodelamiento cardíaco tiene por consecuencia pérdida de la capacidad contráctil y mayor rigidez del miocardio, que se relaciona directamente con el aumento del DVIs y DVId.

Siguiendo con esta idea, los datos presentados demuestran que la inyección diaria de RvD1 logra prevenir la deposición de colágeno a nivel perivascular e intersticial inducida por Ang-II. No existen estudios que relacionen RvD1 y fibrosis cardíaca en HTA, pero sí en un modelo de infarto del miocardio donde Kain et al., (Kain et al., 2015) demostraron en ratones C57BL/6 sometidos a ligamiento de la arteria coronaria, que la administración intraperitoneal de RvD1 logra disminuir la deposición de colágeno al día 5 post-infarto por disminución en el reclutamiento de neutrófilos, mayor diferenciación de macrófagos a su fenotipo M2 y reducción en la expresión de genes relacionados a remodelamiento cardíaco, como *Col1a1*, *Col1a2* y *tnc*. Por otro lado, en un modelo de obstrucción renal, Qu et al. (X. Qu et al., 2012) evidenciaron que las RvD1 y RvE1 ejercen potentes efectos antifibróticos inhibiendo la proliferación de fibroblastos dependiente de PDGF, mientras que más recientemente Yang et al. (Y. Yang et al., 2019) utilizando RvD1 lograron revertir la fibrosis pulmonar inducida por ventilación, mediante inhibición en la fosforilación de Smad2/3. Adicionalmente, Wang et al. (L. Wang et al., 2018) demostraron la participación esencial de CXCL1/KC en la fibrosis inducida por Ang II, donde el bloqueo farmacológico y genético de este

quimioattractante logró disminuir parcialmente el remodelamiento cardíaco, resultados que fueron similares a los obtenidos por Matsuda et al., tras interferir el eje MCP-1 (Matsuda et al., 2015). Recapitulando los resultados obtenidos, RvD1 disminuyó los niveles plasmáticos de KC y MCP-1, impactando de forma negativa en el reclutamiento de leucocitos y en la potencia de la respuesta inflamatoria, que podrían estar relacionados con la prevención de la fibrosis cardíaca observada. Por lo tanto, es necesario investigar más a fondo una relación específica entre ambos eventos en nuestro modelo. Aun así, hasta la fecha no existen estudios que hayan explorado las acciones antihipertróficas y antifibróticas de RvD1 en el remodelado cardíaco inducido por Ang II, lo que atribuye una notable novedad a los resultados obtenidos

### **7.3 Efectos antihipertensivos de RvD1**

En este estudio, se muestra por primera vez que RvD1 atenúa el aumento inducido por Ang II de PS, PD, PAM y HR a los 7 y 14 días después de la infusión con Ang II. En la literatura existen múltiples modelos animales para el desarrollo de hipertensión arterial, como la administración de DOCA/sal en la dieta, L-NAME, Ang II, 2K1C, obesidad inducida, entre otros (Lerman et al., 2019). El modelo de infusión de Ang II es de interés porque involucra la activación del RAAS presente en algunos tipos de HTA y permite apreciar los efectos del incremento de la BP en diversos órganos, que se relaciona con lo visto en HTA

no controlada (Lerman et al., 2019). La respuesta hipertensiva se caracteriza por un aumento gradual en la PA que puede derivar en hipertrofia y fibrosis cardíaca dependiendo de la dosis de Ang II y la ingesta de sal en la dieta (Valero-Muñoz et al., 2017). Los resultados obtenidos indican que Ang-II genera un aumento progresivo de la PA desde los 7 y ya más notorio y diferenciado desde los 14 días demostrando la funcionalidad del modelo; por lo que nuestro resultado es similar a lo discutido por Lerman et al., (Lerman et al., 2019), mientras que la administración de RvD1 logra prevenir moderadamente este cambio. Ang II incrementa la PA a través de diversos mecanismos como vasoconstricción a nivel arteriolar, incremento de la actividad simpática en el tejido cardíaco y mayor reabsorción de sodio y agua en los túbulos renales, tanto de forma directa en el riñón como mediante la secreción de aldosterona y vasopresina (Te Riet et al., 2015). Respecto a la PS y PD, nuestros resultados muestran que Ang-II eleva ambas presiones sin llegar a un *plateau* dentro del tiempo experimental determinado, que es diferente al resultado evidenciado por Wang et al. a las dos semanas de infusión (L. Wang et al., 2018). Por otro lado, RvD1 logra frenar de manera constante a los 7 y 14 días el incremento de la PS y PD; sin embargo, para la PD el efecto protector de la RVD1 se mantiene hasta los 7 días para después perder eficacia. La PS está condicionada principalmente por el retorno venoso y *feedback* negativo en la natriuresis a través del péptido natriurético atrial (PNA), mientras que la PD está determinada por la RVP (Lilly, 2015); por lo que según nuestros resultados el efecto de RvD1 podría estar involucrado en la

regulación sostenida del volumen plasmático, contracción y frecuencia cardíaca, que se logran evidenciar en los valores obtenidos para la HR y con potencial participación de mecanismos de control en el sistema nervioso central; mientras que las acciones a nivel arteriolar, ya sea de forma directa en la vasodilatación o indirecta vía mecanismos antiinflamatorios estarían más presentes en una etapa temprana de la infusión.

Hasta la fecha no existen estudios que relacionen RvD1 y HTA; sin embargo, Gong et al., (Gong et al., 2015) demostraron que la dieta rica en DHA y EPA, logró disminuir la PS en 15 mmHg en ratones C56BL/7 mientras que, en un modelo de aneurisma aórtico abdominal (Wales et al., 2014) y *knockout* de APOE (Bürgin-Maunders et al., 2016), la dieta alta en ácidos grasos poliinsaturados n-3 (n-3 PUFAs) no tuvo efecto estadísticamente significativo en la PA, aunque se logra apreciar cierta tendencia a la disminución. Por otro lado, en adultos prehipertensos la suplementación alimentaria con n-3 PUFAs durante 12 semanas logró reducir la PD en 2 mmHg, atribuyéndose a probables mecanismos antiinflamatorios (Shen et al., 2017). Si bien se logran observar efectos antihipertensivos con la administración de los precursores de RvD1, la mayor parte de la dosis es metabolizada y no logra convertirse en un SPM, por lo que no se puede precisar cuál sería el mecanismo responsable de estas acciones (Chiang & Serhan, 2020). En este trabajo, se demuestra que RvD1 frente a un estímulo inflamatorio crónico logra reducir significativamente la PA y PD, con efectos más marcados en la PS.

Recientemente se ha destacado la estrecha relación entre la inflamación y la regulación de la hipertensión. La hipertensión inducida por Ang II se atenúa en ratones con deficiencia de linfocitos T y B maduros, macrófagos o monocitos positivos para lisozima M7, indicando que la infiltración de leucocitos sería esencial para el desarrollo de HTA. Por otro lado, se han observado resultados similares en ratones con inhibición de MCP-1 (Haudek et al., 2010), TNF- $\alpha$  (Sriramula & Francis, 2015), IL-6 (Senchenkova Elena Y. et al., 2019) e ICAM-1 (Lin et al., 2019), donde el bloqueo de estas citoquinas mediante *knockout* o anticuerpos específicos previene el desarrollo de HTA, hipertrofia de CM y fibrosis cardíaca.

Al respecto, se ha descrito ampliamente la capacidad antiinflamatoria de RvD1 tanto en la disminución de la migración y activación de neutrófilos post-infarto, como en el bloqueo de la síntesis y liberación de TNF-alfa, IL-6 y MCP-1 (Serhan & Levy, 2018). Por lo tanto, el efecto antihipertensivo de RvD1 que muestran nuestros datos puede deberse en parte a la limitación de la infiltración de neutrófilos, la atenuación de la presencia de ICAM-1/VCAM-1 en el tejido cardíaco, la disminución de las citoquinas plasmáticas proinflamatorias y el aumento de la expresión circulante de IL-10. Al respecto, se observó en un modelo *knockout* para IL-10 donde esta citoquina reduce la inflamación cardíaca y HTA modulando la vía RhoA-Rho quinasa (Lima et al., 2016). Sin embargo, no podemos descartar el papel de los vasos y los riñones en la génesis de la PA, pues son reguladores críticos del plasma circulante y del sistema RAAS, o del

bazo, regulador de la respuesta inflamatoria en eventos cardiovasculares donde RvD1 es capaz de frenar la maduración y activación de neutrófilos y monocitos (Halade et al., 2018).

#### **7.4 La atenuación de la inflamación cardíaca se correlaciona con la prevención del remodelamiento cardíaco e hipertensión**

La inflamación cardíaca y remodelamiento cardíaco son los principales mecanismos fisiopatológicos que operan en el corazón sometido a HTA crónica y falla cardíaca (Nicoletti & Michel, 1999). Se ha observado una interacción dinámica entre la inflamación, hipertrofia y remodelamiento que comienza a nivel de endotelio en la íntima de los vasos sanguíneos y adventicia de las arteriolas, otorgándole características proinflamatorias y profibróticas que facilitan la infiltración de leucocitos al miocardio y génesis del remodelamiento cardíaco (Suthahar et al., 2017). De esta manera, CF, CM, macrófagos y células endoteliales actúan en forma concertada para promover la reparación cardíaca a través de la secreción de factores paracrinos, reprogramación de CF, regulación del microambiente hipóxico y polarización de macrófagos (Hara et al., 2017).

Nuestros resultados muestran que, al realizar una correlación entre los factores inflamatorios y los parámetros involucrados en el remodelamiento cardíaco en el grupo infundido con Ang II, se observó una clara asociación positiva entre ellos y con los mismos parámetros inflamatorios, evidenciando quizás un cierto efecto sinérgico que perpetúa la inflamación en estados crónicos (Smolgovsky et al.,



2021). Sin embargo, en el grupo tratado con RvD1 se apreció menor intensidad tanto en parámetros de inflamación, remodelamiento e hipertensión, aunque sin perder la correlación positiva observada en el grupo con Ang II. De esta forma, se podría pensar en que RvD1 es capaz de disminuir la progresión a hipertrofia, fibrosis y HTA a través de mecanismos que involucrarían la atenuación de la inflamación (Dalli & Serhan, 2016).

Entre las asociaciones con mayor potencia estadística se encuentran las que involucran a ICAM-1 e IL-6 con hipertrofia y fibrosis. Recientemente se ha demostrado que ICAM-1 es esencial para el desarrollo de HTA y remodelamiento al limitar la infiltración de neutrófilos y macrófagos al tejido cardíaco (Lin et al., 2019), por lo que la disminución de ICAM-1 por RvD1 podría ser clave para la acción de Ang II en el corazón.

En relación a IL-6, si bien en una etapa de inflamación aguda esta citoquina posee cualidades antiapoptóticas y resolutorias, en una etapa crónica es deletérea para la función cardiovascular (Emdin et al., 2015), por lo que se ha evaluado su utilidad como marcador plasmático de remodelamiento y falla cardíaca, en especial cuando se ha encontrado que pacientes con HTA y activación del RAAS manifiestan elevados niveles de IL-6 (Chamarthi et al., 2011). De esta manera, la reversión del remodelado cardíaco inducido por Ang II podría atribuirse a la disminución de tanto ICAM-1 como IL-6 en los animales tratados con RvD1.

## 7.5 Limitaciones

La principal limitación de este estudio es que, aunque se muestran los efectos antiinflamatorios, antihipertensivos, antihipertróficos y antifibróticos de RvD1, no se investigaron los mecanismos subyacentes que dirigen esas acciones debido a las restricciones impuestas por el estado de pandemia. No obstante, otros grupos han demostrado que RvD1 actúa como molécula antiinflamatoria al suprimir NF- $\kappa$ B, al tiempo que potencia las vías transduccionales PI3K-AKT y MEK-ERK en diferentes modelos patológicos (Gilbert et al., 2015). Los mecanismos exactos que regulan los efectos de RvD1 en la hipertensión e hipertrofia inducida por Ang II quedan por dilucidar mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*, aunque se puede teorizar según lo reportado en la literatura.

La activación de citoquinas y factores de crecimiento inducida por Ang II da como resultado el reclutamiento de leucocitos, el crecimiento celular y la fibrosis. Estos procesos están modulados por la activación de NF- $\kappa$ B, proteína activadora-1 (AP1), factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1), a través de la producción de especies reactivas de ROS (Libby, 2006). La respuesta inflamatoria se asocia con una respuesta reparadora, que implica fibrosis y crecimiento celular. En células endoteliales *in vitro*, la Ang II regula al alza la expresión de VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina a través de vías que involucran ROS (Smolgovsky et al., 2021). Por otro lado, en células de músculo liso vascular la Ang II estimula la producción de VCAM-1, MCP-1, IL-6, IL-8, por mecanismos dependientes de la activación de la vía RhoA/Rho quinasa (Yamakawa et al., 2000) y en fibroblastos

cardíacos, la Ang II induce proliferación de FC mediante la inducción de la vía ERK1/2 y la diferenciación de FC a MFC a través de la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Díaz-Araya et al., 2015). Estos efectos tienen como consecuencia la deposición de colágeno y la formación de ROS que mantienen el estado inflamatorio en el miocardio e inducen estrés oxidativo e hipertrofia de los CM. Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, es posible especular potenciales efectos de RvD1 en su acción antiinflamatoria y pro-resolutoria. De esta manera, se ha observado que por un lado, RvD1 es capaz de bloquear los efectos deletéreos de AP-1 en la progresión de hepatitis a cáncer hepático (Kuang et al., 2016); y en patologías cardiovasculares, la activación del TLR4 en monocitos, involucrado directamente en los efectos deletéreos de la Ang II, a través de la desfosforilación de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) (Gu et al., 2016), asociado a la pérdida de funcionalidad en falla cardíaca (Tariq et al., 2021). Por otro lado, RvD1 en un modelo de injuria pulmonar mecánica logra inducir la expresión del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), disminuyendo la activación de NF- $\kappa$ B y el daño de órgano (Sun et al., 2019). Esto se podría relacionar con los efectos protectores de Nrf2 en la hipertrofia adaptativa, donde el *knockout* de esta proteína ocasiona necrosis de CM y menor supervivencia que los animales control (Qin et al., 2016). Adicionalmente, RvD1 en FC de rata disminuye la señalización de calcio gatillada por Ang II (Salas-Hernández et al., 2021) y además en arteria pulmonar humana, donde revierte la sensibilidad a iones calcio inducida por IL-6 y TNF- $\alpha$  a través del bloqueo en la

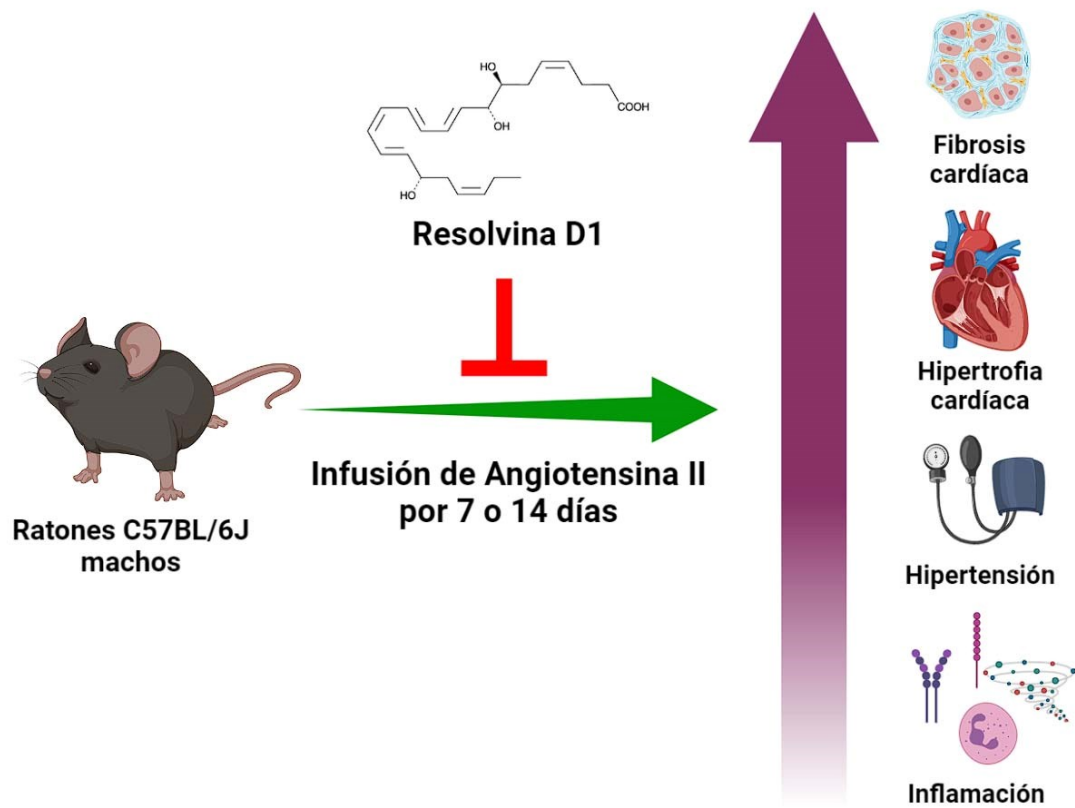
actividad de PKC (Hiram et al., 2014), esencial para el desarrollo de hipertrofia como se ha observado en ensayos enzimáticos *in vitro* (Seung Kim et al., 2001) y en CM de rata estimulados con fenilefrina (Castillo et al., 2005), por lo que los efectos antifibróticos y antihipertroficados observados en este estudio podrían estar asociados a la prevención en la diferenciación de CF a MFC, deposición de colágeno y expresión de TGF- $\beta$ . Adicionalmente, se ha reportado que n-3 PUFAs incrementan la actividad de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa en macrófagos de pacientes con aneurisma aórtico, suprimiendo el stress oxidativo y la señalización de citoquinas inflamatorias (Meital et al., 2019). Considerando que el DHA es el precursor metabólico de la RvD1, se podría pensar en un probable rol como *scavenger* que estaría protegiendo al miocardio del stress oxidativo generado por Ang II. Por otro lado, existen micro-ARNs con efectos antiapoptóticos en CM sometidos a I/R, como el MiR-146b (Di et al., 2017), cuya expresión es intensificada además en macrófagos humanos por RvD1 (Krishnamoorthy et al., 2012), por lo que este micro-ARN podría tener un rol clave en la prevención del remodelamiento cardíaco inducido por Ang II.

Para finalizar, la hipertensión crónica es un poderoso factor de riesgo que puede inducir daño de órgano en el cerebro, la retina, los vasos sanguíneos y los riñones (Piskorz, 2020). Este trabajo se enfocó sólo en el tejido cardíaco, pero no se puede descartar las acciones protectoras de RvD1 en otros órganos, que también pueden contribuir a los efectos antihipertensivos y antiremodelamiento encontrados en esta investigación.

## **8. CONCLUSIONES**

Los principales hallazgos de esta investigación se encuentran resumidos en la Figura 36.

- La infusión de Ang II por 7 y 14 días en tejido cardíaco induce el aumento de la formación de tejido de granulación, infiltración de neutrófilos, ICAM-1 y VCAM-1.
- La infusión de Ang II por 7 y 14 días genera el aumento de la masa cardíaca, engrosamiento de las paredes del ventrículo izquierdo e hipertrofia de los cardiomiocitos.
- La infusión de Ang II por 7 y 14 días provoca la deposición de colágeno a nivel perivascular e intersticial.
- La infusión de Ang II por 7 y 14 días genera el aumento de la presión sistólica, diastólica, media y la frecuencia cardíaca.
- La administración de RvD1 disminuye de forma parcial la inflamación, hipertrofia, fibrosis cardíaca e hipertensión, previniendo el daño de órgano.
- Existe una asociación entre la disminución de ICAM-1 e IL-6 gatillada por RvD1 y la atenuación de la hipertrofia de cardiomiocitos y deposición de colágeno intersticial y perivascular, que podría sugerir los mecanismos por los que actúa RvD1.



**Figura 39. Resumen gráfico.** La infusión de Ang II por 7 o 14 días en ratones C57BL/6 genera inflamación cardíaca, hipertensión, hipertrofia y fibrosis cardíaca. La administración diaria de RvD1 bloquea de forma parcial todas las alteraciones cardiovasculares inducidas por Ang II.

## 9. **BIBLIOGRAFÍA**

- Alvarez, A., Cerdá-Nicolás, M., Naim Abu Nabah, Y., Mata, M., Issekutz, A. C., Panés, J., Lobb, R. R., & Sanz, M.-J. (2004). Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood*, *104*(2), 402–408. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2974>
- Arjmand, A., Tsipouras, M. G., Tzallas, A. T., Forlano, R., Manousou, P., & Giannakeas, N. (2020). Quantification of Liver Fibrosis—A Comparative Study. *Applied Sciences*, *10*(2), 447. <https://doi.org/10.3390/app10020447>
- Atchison, D. K., O'Connor, C. L., Menon, R., Otto, E. A., Ganesh, S. K., Wiggins, R. C., Smrcka, A. V., & Bitzer, M. (2020). Hypertension induces glomerulosclerosis in phospholipase C- $\epsilon$ 1 deficiency. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, *318*(5), F1177–F1187. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00541.2019>
- Atlas, S. A. (2007). The renin-angiotensin aldosterone system: Pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *Journal of Managed Care Pharmacy: JMCP*, *13*(8 Suppl B), 9–20. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2007.13.s8-b.9>
- Bäck, M., Powell, W. S., Dahlén, S.-E., Drazen, J. M., Evans, J. F., Serhan, C. N., Shimizu, T., Yokomizo, T., & Rovati, G. E. (2014). Update on leukotriene, lipoxin and oxoeicosanoid receptors: IUPHAR Review 7. *British Journal of Pharmacology*, *171*(15), 3551–3574. <https://doi.org/10.1111/bph.12665>
- Bacmeister, L., Schwarzl, M., Warnke, S., Stoffers, B., Blankenberg, S., Westermann, D., & Lindner, D. (2019). Inflammation and fibrosis in murine

- models of heart failure. *Basic Research in Cardiology*, 114(3), 19.  
<https://doi.org/10.1007/s00395-019-0722-5>
- Battiprolu, P. K., Hojayev, B., Jiang, N., Wang, Z. V., Luo, X., Iglewski, M., Shelton, J. M., Gerard, R. D., Rothermel, B. A., Gillette, T. G., Lavandro, S., & Hill, J. A. (2012). Metabolic stress-induced activation of FoxO1 triggers diabetic cardiomyopathy in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(3), 1109–1118. <https://doi.org/10.1172/JCI60329>
- Benabdoun, H. A., Kulbay, M., Rondon, E.-P., Vallières, F., Shi, Q., Fernandes, J., Fahmi, H., & Benderdour, M. (2019). In vitro and in vivo assessment of the proresolutive and antiresorptive actions of resolvin D1: Relevance to arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 21(1), 72.  
<https://doi.org/10.1186/s13075-019-1852-8>
- Berk, B. C., Fujiwara, K., & Lehoux, S. (2007). ECM remodeling in hypertensive heart disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(3), 568–575.  
<https://doi.org/10.1172/JCI31044>
- Bürgin-Maunder, C. S., Nataatmadja, M., Vella, R. K., Fenning, A. S., Brooks, P. R., & Russell, F. D. (2016). Investigation of long chain omega-3 PUFAs on arterial blood pressure, vascular reactivity and survival in angiotensin II-infused Apolipoprotein E-knockout mice. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 43(2), 174–181.  
<https://doi.org/10.1111/1440-1681.12520>



- Capó, X., Martorell, M., Busquets-Cortés, C., Tejada, S., Tur, J. A., Pons, A., & Sureda, A. (2018). Resolvins as proresolving inflammatory mediators in cardiovascular disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *153*, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.018>
- Castillo, A., Ruzmetov, N., Harvey, K. A., Stillwell, W., Zaloga, G. P., & Siddiqui, R. A. (2005). Docosahexaenoic acid inhibits protein kinase C translocation/activation and cardiac hypertrophy in rat cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Genetic Medicine: An International Journal of Biomedical Research*, *1*(1), 18–25. <https://doi.org/10.4172/1747-0862.1000006>
- Chamarthi, B., Williams, G. H., Ricchiuti, V., Srikumar, N., Hopkins, P. N., Luther, J. M., Jeunemaitre, X., & Thomas, A. (2011). Inflammation and hypertension: The interplay of interleukin-6, dietary sodium, and the renin-angiotensin system in humans. *American Journal of Hypertension*, *24*(10), 1143–1148. <https://doi.org/10.1038/ajh.2011.113>
- Chiang, N., & Serhan, C. N. (2020). Specialized pro-resolving mediator network: An update on production and actions. *Essays in Biochemistry*, *64*(3), 443–462. <https://doi.org/10.1042/EBC20200018>
- Dai, Q., Xu, M., Yao, M., & Sun, B. (2007). Angiotensin AT1 receptor antagonists exert anti-inflammatory effects in spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*, *152*(7), 1042–1048. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707454>

- Dalli, J., & Serhan, C. (2016). Macrophage Proresolving Mediators-the When and Where. *Microbiology Spectrum*, 4(3).  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0001-2014>
- Di, Y.-F., Li, D.-C., Shen, Y.-Q., Wang, C.-L., Zhang, D.-Y., Shang, A.-Q., & Hu, T. (2017). MiR-146b protects cardiomyocytes injury in myocardial ischemia/reperfusion by targeting Smad4. *American Journal of Translational Research*, 9(2), 656–663.
- 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.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.001>
- Donadelli, R., Abbate, M., Zanchi, C., Corna, D., Tomasoni, S., Benigni, A., Remuzzi, G., & Zoja, C. (2000). Protein traffic activates NF-kB gene signaling and promotes MCP-1-dependent interstitial inflammation. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 36(6), 1226–1241.  
<https://doi.org/10.1053/ajkd.2000.19838>
- Emdin, M., Fatini, C., Mirizzi, G., Poletti, R., Borrelli, C., Prontera, C., Latini, R., Passino, C., Clerico, A., & Vergaro, G. (2015). Biomarkers of activation of renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure: How useful, how feasible? *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 443, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.031>

- Farrell, M. H., Foody, J. M., & Krumholz, H. M. (2002).  $\beta$ -Blockers in Heart Failure: Clinical Applications. *JAMA*, 287(7), 890–897. <https://doi.org/10.1001/jama.287.7.890>
- Feghali, C. A., & Wright, T. M. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 2, d12-26. <https://doi.org/10.2741/a171>
- Fontes, J. A., Rose, N. R., & Čiháková, D. (2015). The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine*, 74(1), 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.12.024>
- Frangogiannis, N. G. (2015). Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Current Opinion in Cardiology*, 30(3), 240–245. <https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000158>
- Gilbert, K., Bernier, J., Bourque-Riel, V., Malick, M., & Rousseau, G. (2015). Resolvin D1 Reduces Infarct Size Through a Phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B Mechanism. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 66(1), 72–79. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000245>
- Godfraind, T. (2017). Discovery and Development of Calcium Channel Blockers. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 286. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00286>
- Gong, Y., Lin, M., Piao, L., Li, X., Yang, F., Zhang, J., Xiao, B., Zhang, Q., Song, W.-L., Yin, H., Zhu, L., Funk, C. D., & Yu, Y. (2015). Aspirin enhances

protective effect of fish oil against thrombosis and injury-induced vascular remodelling. *British Journal of Pharmacology*, 172(23), 5647–5660. <https://doi.org/10.1111/bph.12986>

Gu, Z., Lamont, G. J., Lamont, R. J., Uriarte, S. M., Wang, H., & Scott, D. A. (2016). Resolvin D1, resolvin D2 and maresin 1 activate the GSK3 $\beta$  anti-inflammatory axis in TLR4-engaged human monocytes. *Innate Immunity*, 22(3), 186–195. <https://doi.org/10.1177/1753425916628618>

Guzik, T. J., Hoch, N. E., Brown, K. A., McCann, L. A., Rahman, A., Dikalov, S., Goronzy, J., Weyand, C., & Harrison, D. G. (2007). Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(10), 2449–2460. <https://doi.org/10.1084/jem.20070657>

Gyöngyösi, M., Winkler, J., Ramos, I., Do, Q.-T., Firat, H., McDonald, K., González, A., Thum, T., Díez, J., Jaisser, F., Pizard, A., & Zannad, F. (2017). Myocardial fibrosis: Biomedical research from bench to bedside. *European Journal of Heart Failure*, 19(2), 177–191. <https://doi.org/10.1002/ejhf.696>

Halade, G. V., Kain, V., & Serhan, C. N. (2018). Immune responsive resolvin D1 programs myocardial infarction-induced cardiorenal syndrome in heart failure. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 32(7), 3717–3729. <https://doi.org/10.1096/fj.201701173RR>

- Hara, H., Takeda, N., & Komuro, I. (2017). Pathophysiology and therapeutic potential of cardiac fibrosis. *Inflammation and Regeneration*, 37(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s41232-017-0046-5>
- Haudek, S. B., Cheng, J., Du, J., Wang, Y., Hermosillo-Rodriguez, J., Trial, J., Taffet, G. E., & Entman, M. L. (2010). Monocytic Fibroblast Precursors Mediate Fibrosis in Angiotensin-II-induced Cardiac Hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 49(3), 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.05.005>
- Heusch, G., Libby, P., Gersh, B., Yellon, D., Böhm, M., Lopaschuk, G., & Opie, L. (2014). Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet (London, England)*, 383(9932), 1933–1943. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60107-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60107-0)
- Hiram, R., Rizcallah, E., Sirois, C., Sirois, M., Morin, C., Fortin, S., & Rousseau, E. (2014). Resolvin D1 reverses reactivity and Ca<sup>2+</sup> sensitivity induced by ET-1, TNF- $\alpha$ , and IL-6 in the human pulmonary artery. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 307(11), H1547–H1558. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00452.2014>
- Hoch, N. E., Guzik, T. J., Chen, W., Deans, T., Maalouf, S. A., Gratze, P., Weyand, C., & Harrison, D. G. (2009). Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(2), R208-216. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90521.2008>

- Ji, Y., Liu, J., Wang, Z., & Liu, N. (2009). Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 23(4–6), 265–276. <https://doi.org/10.1159/000218173>
- Jia, L., Li, Y., Xiao, C., & Du, J. (2012). Angiotensin II induces inflammation leading to cardiac remodeling. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 17, 221–231.
- Jurewicz, M., McDermott, D. H., Sechler, J. M., Tinckam, K., Takakura, A., Carpenter, C. B., Milford, E., & Abdi, R. (2007). Human T and natural killer cells possess a functional renin-angiotensin system: Further mechanisms of angiotensin II-induced inflammation. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 18(4), 1093–1102. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006070707>
- Kain, V., Ingle, K. A., Colas, R. A., Dalli, J., Prabhu, S. D., Serhan, C. N., Joshi, M., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.04.003>
- Kiarash Arash, Pagano Patrick J., Tayeh Mahmoud, Rhaleb Nour-Eddine, & Carretero Oscar A. (2001). Upregulated Expression of Rat Heart

Intercellular Adhesion Molecule-1 in Angiotensin II- but Not Phenylephrine- Induced Hypertension. *Hypertension*, 37(1), 58–65. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.37.1.58>

Kim, S., & Iwao, H. (2000). Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological Reviews*, 52(1), 11–34.

Kong, P., Christia, P., & Frangogiannis, N. G. (2014). The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 71(4), 549–574. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1349-6>

Krishnamoorthy, S., Recchiuti, A., Chiang, N., Fredman, G., & Serhan, C. N. (2012). Resolvin D1 Receptor Stereoselectivity and Regulation of Inflammation and Proresolving MicroRNAs. *The American Journal of Pathology*, 180(5), 2018–2027. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.01.028>

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- $\kappa$ B activity. *Oncology Reports*, 35(1), 307–317. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4389>

Kurdi, M., & Booz, G. W. (2011). NEW TAKE ON THE ROLE OF ANGIOTENSIN II IN CARDIAC HYPERTROPHY AND FIBROSIS. *Hypertension*, 57(6), 1034–1038. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.172700>

- Kuroki, M. T., Fink, G. D., & Osborn, J. W. (2014). Comparison of arterial pressure and plasma ANG II responses to three methods of subcutaneous ANG II administration. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 307(5), H670-679. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00922.2013>
- Lapteva, N., Ide, K., Nieda, M., Ando, Y., Hatta-Ohashi, Y., Minami, M., Dymshits, G., Egawa, K., Juji, T., & Tokunaga, K. (2002). Activation and suppression of renin-angiotensin system in human dendritic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(1), 194–200. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)00855-0](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)00855-0)
- Lassègue, B., & Griendling, K. K. (2004). Reactive oxygen species in hypertension; An update. *American Journal of Hypertension*, 17(9), 852–860. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2004.02.004>
- Lerman, L. O., Kurtz, T. W., Touyz, R. M., Ellison, D. H., Chade, A. R., Crowley, S. D., Mattson, D. L., Mullins, J. J., Osborn, J., Eirin, A., Reckelhoff, J. F., Iadecola, C., & Coffman, T. M. (2019). Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 73(6), e87–e120. <https://doi.org/10.1161/HYP.0000000000000090>
- Libby, P. (2006). Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(2), 456S-460S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.456S>



- Lilly, L. S. (2015). *Pathophysiology of Heart Disease: A Collaborative Project of Medical Students and Faculty*. Wolters Kluwer.
- Lima, V. V., Zemse, S. M., Chiao, C.-W., Bomfim, G. F., Tostes, R. C., Clinton Webb, R., & Giachini, F. R. (2016). Interleukin-10 limits increased blood pressure and vascular RhoA/Rho-kinase signaling in angiotensin II-infused mice. *Life Sciences*, *145*, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.12.009>
- Lin, Q.-Y., Lang, P.-P., Zhang, Y.-L., Yang, X.-L., Xia, Y.-L., Bai, J., & Li, H.-H. (2019). Pharmacological blockage of ICAM-1 improves angiotensin II-induced cardiac remodeling by inhibiting adhesion of LFA-1<sup>+</sup> monocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *317*(6), H1301–H1311. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00566.2019>
- Liu, Y., Zhou, D., Long, F.-W., Chen, K.-L., Yang, H.-W., Lv, Z.-Y., Zhou, B., Peng, Z.-H., Sun, X.-F., Li, Y., & Zhou, Z.-G. (2016). Resolvin D1 protects against inflammation in experimental acute pancreatitis and associated lung injury. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *310*(5), G303–G309. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00355.2014>
- Madhur, M. S., & Harrison, D. G. (2013). SENESCENT T CELLS AND HYPERTENSION: NEW IDEAS ABOUT OLD CELLS. *Hypertension*, *62*(1), 13–15. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01410>

- Marchesi, C., Paradis, P., & Schiffrin, E. L. (2008). Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(7), 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.05.003>
- Matsuda, S., Umemoto, S., Yoshimura, K., Itoh, S., Murata, T., Fukai, T., & Matsuzaki, M. (2015). Angiotensin II Activates MCP-1 and Induces Cardiac Hypertrophy and Dysfunction via Toll-like Receptor 4. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 22(8), 833–844. <https://doi.org/10.5551/jat.27292>
- McLennan, P. L., Abeywardena, M. Y., Dallimore, J. A., & Raederstorff, D. (2012). Dietary fish oil preserves cardiac function in the hypertrophied rat heart. *The British Journal of Nutrition*, 108(4), 645–654. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005915>
- Medzhitov, R., & Horng, T. (2009). Transcriptional control of the inflammatory response. *Nature Reviews. Immunology*, 9(10), 692–703. <https://doi.org/10.1038/nri2634>
- Meital, L. T., Windsor, M. T., Perissiou, M., Schulze, K., Magee, R., Kuballa, A., Golledge, J., Bailey, T. G., Askew, C. D., & Russell, F. D. (2019). Omega-3 fatty acids decrease oxidative stress and inflammation in macrophages from patients with small abdominal aortic aneurysm. *Scientific Reports*, 9, 12978. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49362-z>
- Merched, A. J., Ko, K., Gotlinger, K. H., Serhan, C. N., & Chan, L. (2008). Atherosclerosis: Evidence for impairment of resolution of vascular

- inflammation governed by specific lipid mediators. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(10), 3595–3606. <https://doi.org/10.1096/fj.08-112201>
- Miyahara, T., Runge, S., Chatterjee, A., Chen, M., Mottola, G., Fitzgerald, J. M., Serhan, C. N., & Conte, M. S. (2013). D-series resolvins attenuates vascular smooth muscle cell activation and neointimal hyperplasia following vascular injury. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(6), 2220–2232. <https://doi.org/10.1096/fj.12-225615>
- Montezano, A. C., Nguyen Dinh Cat, A., Rios, F. J., & Touyz, R. M. (2014). Angiotensin II and vascular injury. *Current Hypertension Reports*, 16(6), 431. <https://doi.org/10.1007/s11906-014-0431-2>
- Nadruz, W. (2015). Myocardial remodeling in hypertension. *Journal of Human Hypertension*, 29(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/jhh.2014.36>
- Nakagawa, P., Nair, A. R., Agbor, L. N., Gomez, J., Wu, J., Zhang, S. Y., Lu, K.-T., Morgan, D. A., Rahmouni, K., Grobe, J. L., & Sigmund, C. D. (2020). Increased Susceptibility of Mice Lacking Renin-b to Angiotensin II–Induced Organ Damage. *Hypertension*, 76(2), 468–477. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14972>
- Nakamura, M., & Sadoshima, J. (2018). Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nature Reviews. Cardiology*, 15(7), 387–407. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0007-y>

- Nicoletti, A., & Michel, J.-B. (1999). Cardiac fibrosis and inflammation: Interaction with hemodynamic and hormonal factors. *Cardiovascular Research*, 41(3), 532–543. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00305-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00305-8)
- Oláh, A., Németh, B. T., Mátyás, C., Hidi, L., Lux, Á., Ruppert, M., Kellermayer, D., Sayour, A. A., Szabó, L., Török, M., Meltzer, A., Gellér, L., Merkely, B., & Radovits, T. (2016). Physiological and pathological left ventricular hypertrophy of comparable degree is associated with characteristic differences of in vivo hemodynamics. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 310(5), H587-597. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00588.2015>
- Olivares-Silva, F., Landaeta, R., Aránguiz, P., Bolivar, S., Humeres, C., Anfossi, R., Vivar, R., Boza, P., Muñoz, C., Pardo-Jiménez, V., Peiró, C., Sánchez-Ferrer, C. F., & Díaz-Araya, G. (2018). Heparan sulfate potentiates leukocyte adhesion on cardiac fibroblast by enhancing Vcam-1 and Icam-1 expression. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1864(3), 831–842. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.12.002>
- Opie, L. H., Commerford, P. J., Gersh, B. J., & Pfeffer, M. A. (2006). Controversies in ventricular remodelling. *Lancet (London, England)*, 367(9507), 356–367. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68074-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68074-4)
- Piskorz, D. (2020). Hypertensive Mediated Organ Damage and Hypertension Management. How to Assess Beneficial Effects of Antihypertensive

Treatments? *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*, 27(1), 9–17. <https://doi.org/10.1007/s40292-020-00361-6>

Qin, Q., Qu, C., Niu, T., Zang, H., Qi, L., Lyu, L., Wang, X., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P., Janicki, J. S., Wang, X. L., & Cui, T. (2016). Nrf2-Mediated Cardiac Maladaptive Remodeling and Dysfunction in a Setting of Autophagy Insufficiency. *Hypertension*, 67(1), 107–117. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06062>

Qu, Q., Xuan, W., & Fan, G.-H. (2015). Roles of resolvins in the resolution of acute inflammation. *Cell Biology International*, 39(1), 3–22. <https://doi.org/10.1002/cbin.10345>

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. <https://doi.org/10.1002/path.4050>

*Renin-angiotensin system | Definition & Facts*. (s. f.). Encyclopedia Britannica. Recuperado 23 de junio de 2021, de <https://www.britannica.com/science/renin-angiotensin-system>

Restini, C. B. A., Garcia, A. F. E., Natalin, H. M., Natalin, G. M., & Rizzi, E. (2017). Signaling Pathways of Cardiac Remodeling Related to Angiotensin II. *Renin-Angiotensin System - Past, Present and Future*. <https://doi.org/10.5772/66076>

- Saito, P., Melo, C. P. B., Martinez, R. M., Fattori, V., Cezar, T. L. C., Pinto, I. C., Bussmann, A. J. C., Vignoli, J. A., Georgetti, S. R., Baracat, M. M., Verri, W. A. J., & Casagrande, R. (2018). The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01242>
- Salas-Hernández, A., Espinoza, C., Vivar, R., Espitia Corredor, J., Lillo, J., Parra-Flores, P., Sánchez-Ferrer, C., Peiró, C., & Diaz-Araya, G. (2021). Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in rat cardiac fibroblast in vitro. *Molecular Biology Reports*, 48. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06133-8>
- Sansbury, B. E., & Spite, M. (2016). Resolution of Acute Inflammation and the Role of Resolvins in Immunity, Thrombosis, and Vascular Biology. *Circulation Research*, 119(1), 113–130. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.307308>
- Satou, R., Penrose, H., & Navar, L. G. (2018). Inflammation as a Regulator of the Renin-Angiotensin System and Blood Pressure. *Current Hypertension Reports*, 20(12), 100. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0900-0>
- Schiattarella, G. G., Altamirano, F., Tong, D., French, K. M., Villalobos, E., Kim, S. Y., Luo, X., Jiang, N., May, H. I., Wang, Z. V., Hill, T. M., Mammen, P. P. A., Huang, J., Lee, D. I., Hahn, V. S., Sharma, K., Kass, D. A., Lavandero, S., Gillette, T. G., & Hill, J. A. (2019). Nitrosative stress drives

heart failure with preserved ejection fraction. *Nature*, 568(7752), 351–356.  
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1100-z>

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Schober, P., Boer, C., & Schwarte, L. A. (2018). Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesthesia and Analgesia*, 126(5), 1763–1768. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002864>

Senchenkova Elena Y., Russell Janice, Yildirim Alper, Granger D. Neil, & Gavins Felicity N.E. (2019). Novel Role of T Cells and IL-6 (Interleukin-6) in Angiotensin II–Induced Microvascular Dysfunction. *Hypertension*, 73(4), 829–838. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12286>

Serhan, C. N., & Levy, B. D. (2018). Resolvins in inflammation: Emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(7), 2657–2669. <https://doi.org/10.1172/JCI97943>

Seung Kim, H. F., Weeber, E. J., Sweatt, J. D., Stoll, A. L., & Marangell, L. B. (2001). Inhibitory effects of omega-3 fatty acids on protein kinase C activity in vitro. *Molecular Psychiatry*, 6(2), 246–248.  
<https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000837>

- Shen, T., Xing, G., Zhu, J., Zhang, S., Cai, Y., Li, D., Xu, G., Xing, E., Rao, J., & Shi, R. (2017). Effects of 12-week supplementation of marine Omega-3 PUFA-based formulation Omega3Q10 in older adults with prehypertension and/or elevated blood cholesterol. *Lipids in Health and Disease*, *16*(1), 253. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0617-0>
- Singh, K. D., & Karnik, S. S. (2016). Angiotensin Receptors: Structure, Function, Signaling and Clinical Applications. *Journal of Cell Signaling*, *1*(2). <https://doi.org/10.4172/jcs.1000111>
- Smolgovsky, S., Ibeh, U., Tamayo, T. P., & Alcaide, P. (2021). Adding insult to injury—Inflammation at the heart of cardiac fibrosis. *Cellular Signalling*, *77*, 109828. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109828>
- Sopel, M. J., Rosin, N. L., Lee, T. D. G., & Légaré, J.-F. (2011). Myocardial fibrosis in response to Angiotensin II is preceded by the recruitment of mesenchymal progenitor cells. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *91*(4), 565–578. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.190>
- Spinosa, M., Su, G., Salmon, M. D., Lu, G., Cullen, J. M., Fashandi, A. Z., Hawkins, R. B., Montgomery, W., Meher, A. K., Conte, M. S., Sharma, A. K., Ailawadi, G., & Upchurch, G. R. (2018). Resolvin D1 decreases abdominal aortic aneurysm formation by inhibiting NETosis in a mouse model. *Journal of Vascular Surgery*, *68*(6S), 93S-103S. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2018.05.253>



- Sriramula, S., & Francis, J. (2015). Tumor Necrosis Factor - Alpha Is Essential for Angiotensin II-Induced Ventricular Remodeling: Role for Oxidative Stress. *PLoS ONE*, *10*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138372>
- Sun, Z., Wang, F., Yang, Y., Wang, J., Sun, S., Xia, H., & Yao, S. (2019). Resolvin D1 attenuates ventilator-induced lung injury by reducing HMGB1 release in a HO-1-dependent pathway. *International Immunopharmacology*, *75*, 105825. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105825>
- Suthahar, N., Meijers, W. C., Silljé, H. H. W., & de Boer, R. A. (2017). From Inflammation to Fibrosis-Molecular and Cellular Mechanisms of Myocardial Tissue Remodelling and Perspectives on Differential Treatment Opportunities. *Current Heart Failure Reports*, *14*(4), 235–250. <https://doi.org/10.1007/s11897-017-0343-y>
- Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V., & Egido, J. (2003). Inflammation and angiotensin II. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *35*(6), 881–900. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(02\)00271-6](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(02)00271-6)
- Szabó, C., Pacher, P., Zsengellér, Z., Vaslin, A., Komjáti, K., Benkö, R., Chen, M., Mabley, J. G., & Kollai, M. (2004). Angiotensin II-Mediated Endothelial Dysfunction: Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase Activation. *Molecular Medicine*, *10*(1–6), 28–35.

- Tariq, U., Uppulapu, S. K., & Banerjee, S. K. (2021). Role of GSK-3 in Cardiac Health: Focusing on Cardiac Remodeling and Heart Failure. *Current Drug Targets*. <https://doi.org/10.2174/1389450122666210224105430>
- Te Riet, L., van Esch, J. H. M., Roks, A. J. M., van den Meiracker, A. H., & Danser, A. H. J. (2015). Hypertension: Renin-angiotensin-aldosterone system alterations. *Circulation Research*, *116*(6), 960–975. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303587>
- Theeuwes, F., & Yum, S. I. (1976). Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations. *Annals of Biomedical Engineering*, *4*(4), 343–353. <https://doi.org/10.1007/BF02584524>
- Torre-Amione, G., Vooletich, M. T., & Farmer, J. A. (2000). Role of tumour necrosis factor-alpha in the progression of heart failure: Therapeutic implications. *Drugs*, *59*(4), 745–751. <https://doi.org/10.2165/00003495-200059040-00002>
- Tsukamoto, Y., Mano, T., Sakata, Y., Ohtani, T., Takeda, Y., Tamaki, S., Omori, Y., Ikeya, Y., Saito, Y., Ishii, R., Higashimori, M., Kaneko, M., Miwa, T., Yamamoto, K., & Komuro, I. (2013). A novel heart failure mice model of hypertensive heart disease by angiotensin II infusion, nephrectomy, and salt loading. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *305*(11), H1658-1667. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00349.2013>

- Unger, T., & Li, J. (2004). The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System: JRAAS*, 5 Suppl 1, S7-10. <https://doi.org/10.3317/jraas.2004.024>
- Valero-Muñoz, M., Backman, W., & Sam, F. (2017). Murine Models of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: A “Fishing Expedition”. *JACC. Basic to Translational Science*, 2(6), 770–789. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2017.07.013>
- Van Linthout, S., Miteva, K., & Tschöpe, C. (2014). Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovascular Research*, 102(2), 258–269. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu062>
- Wahyuni, T., Kobayashi, A., Tanaka, S., Miyake, Y., Yamamoto, A., Bahtiar, A., Mori, S., Kametani, Y., Tomimatsu, M., Matsumoto, K., Maeda, M., Obana, M., & Fujio, Y. (2021). Maresin-1 induces cardiomyocyte hypertrophy through IGF-1 paracrine pathway. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00568.2020>
- Wales, K. M., Kavazos, K., Nataatmadja, M., Brooks, P. R., Williams, C., & Russell, F. D. (2014). N-3 PUFAs protect against aortic inflammation and oxidative stress in angiotensin II-infused apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice. *PLoS One*, 9(11), e112816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112816>
- Wang, B., Gong, X., Wan, J., Zhang, L., Zhang, Z., Li, H., & Min, S. (2011). Resolvin D1 protects mice from LPS-induced acute lung injury. *Pulmonary*

*Pharmacology & Therapeutics*, 24(4), 434–441.

<https://doi.org/10.1016/j.pupt.2011.04.001>

Wang, L., Szklo, M., Folsom, A. R., Cook, N. R., Gapstur, S. M., & Ouyang, P.

(2012). ENDOGENOUS SEX HORMONES, BLOOD PRESSURE CHANGE, AND RISK OF HYPERTENSION IN POSTMENOPAUSAL WOMEN: THE MULTI-ETHNIC STUDY OF ATHEROSCLEROSIS.

*Atherosclerosis*, 224(1), 228–234.

<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.005>

Wang, L., Zhang, Y.-L., Lin, Q.-Y., Liu, Y., Guan, X.-M., Ma, X.-L., Cao, H.-J., Liu,

Y., Bai, J., Xia, Y.-L., Du, J., & Li, H.-H. (2018). CXCL1-CXCR2 axis mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodelling through regulation of monocyte infiltration. *European Heart Journal*,

39(20), 1818–1831. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy085>

Wang, M., Liu, M., Zhang, J., Liu, J., Ye, J., Xu, Y., Wang, Z., Ye, D., Zhao, M., &

Wan, J. (2020). Resolvin D1 protects against sepsis-induced cardiac injury in mice. *BioFactors (Oxford, England)*, 46(5), 766–776.

<https://doi.org/10.1002/biof.1668>

Welch, W. J. (2008). Angiotensin II-dependent superoxide: Effects on

hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 52(1), 51–56. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.090472>

Wu, L., Chen, K., Xiao, J., Xin, J., Zhang, L., Li, X., Li, L., Si, J., Wang, L., & Ma,

K. (2020). Angiotensin II induces RAW264.7 macrophage polarization to

- the M1-type through the connexin 43/NF- $\kappa$ B pathway. *Molecular Medicine Reports*, 21(5), 2103–2112. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11023>
- Xu, J., Duan, X., Hu, F., Poorun, D., Liu, X., Wang, X., Zhang, S., Gan, L., He, M., Zhu, K., Ming, Z., & Chen, H. (2018). Resolvin D1 attenuates imiquimod-induced mice psoriasiform dermatitis through MAPKs and NF- $\kappa$ B pathways. *Journal of Dermatological Science*, 89(2), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.10.016>
- Yamakawa, T., Tanaka, S., Numaguchi, K., Yamakawa, Y., Motley, E. D., Ichihara, S., & Inagami, T. (2000). Involvement of Rho-Kinase in Angiotensin II–Induced Hypertrophy of Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension*, 35(1), 313–318. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.35.1.313>
- Yang, R., Smolders, I., & Dupont, A. G. (2011). Blood pressure and renal hemodynamic effects of angiotensin fragments. *Hypertension Research*, 34(6), 674–683. <https://doi.org/10.1038/hr.2011.24>
- Yang, Y., Hu, L., Xia, H., Chen, L., Cui, S., Wang, Y., Zhou, T., Xiong, W., Song, L., Li, S., Pan, S., Xu, J., Liu, M., Xiao, H., Qin, L., Shang, Y., & Yao, S. (2019). Resolvin D1 attenuates mechanical stretch-induced pulmonary fibrosis via epithelial-mesenchymal transition. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 316(6), L1013–L1024. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00415.2018>
- Ye, S., Luo, W., Khan, Z. A., Wu, G., Xuan, L., Shan, P., Lin, K., Chen, T., Wang, J., Hu, X., Wang, S., Huang, W., & Liang, G. (2020). Celastrol Attenuates

Angiotensin II–Induced Cardiac Remodeling by Targeting STAT3.  
*Circulation Research*, 126(8), 1007–1023.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315861>

Yoon, S., & Eom, G. H. (2019). Heart failure with preserved ejection fraction: Present status and future directions. *Experimental & Molecular Medicine*, 51(12), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0323-2>