



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA**

---

# **HEPARAN SULFATO, A TRAVÉS DE TLR4, GATILLA TANTO EL AUMENTO DE IL-1 $\beta$ , ICAM Y VCAM, COMO LA DISMINUCIÓN DE $\alpha$ -SMA**

**Memoria para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico**

**RODOLFO IGNACIO LANDAETA MILLAR**

Director: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

Patrocinante: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

Santiago, Chile 2015

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco en primer lugar a mi familia por alentarme a emprender el desafío, no menor, de haber entrado a la carrera de Química y Farmacia en la Universidad de Chile. Obviamente mis padres, Rodolfo y María Angélica, me han apoyado de manera incondicional durante todo mi paso por la universidad, alentándome en todos mis desafíos. Mis hermanas María Victoria y Sylvia también han sido un gran apoyo, en especial al momento de ingresar a la escuela, guiándome y aconsejándome acerca de la carrera gracias a la trayectoria que cada una lleva en el área de la salud, valorando, en gran manera, al profesional químico farmacéutico. Mi hermana Fernanda, a quien en más de alguna ocasión le pedí que me interrogara para estudiar para alguna prueba o examen, siéndome de gran ayuda. Mis cuñados Carlos y Juan quienes han sido como mis hermanos mayores, siempre prestando su oído para dar un consejo o prestar ayuda. Sin cada uno de ellos no hubiera sido posible llegar al final de esta batalla, por lo que agradezco a Dios de tenerlos como familia y de la entrega que cada uno de ellos ha hecho para apoyarme en todo.

Por otro lado, agradezco al Dr. Guillermo Díaz quien ha confiado en mí un trabajo tan elaborado como es la investigación científica. Gracias porque él permitió que me desarrollara en esta área que veía tan lejana y me hizo descubrir que era completamente capaz de trabajar en su laboratorio, ya que con las herramientas entregadas por la escuela pude afrontar cada etapa del proceso experimental, necesarias para el desarrollo de mi memoria. Gracias también por considerarme en la participación de los congresos de la Sociedad Chilena de Farmacología de los años 2013 y 2014 permitiendo exponer mi trabajo realizado en dicha instancia.

Agradezco también a cada uno de los integrantes y compañeros del laboratorio que

juntos conforman un gran equipo de trabajo, partiendo por Raúl y su característica paciencia, amabilidad y disposición para enseñar y ayudar en cualquier problema que uno pudiera tener, así como por el ejemplo de esfuerzo que nos da mediante su trabajo en el laboratorio. Agradezco también a Diego, Roxi, Pía, Samir, Clodito, Queirolo y Felipe con quienes además de compartir temas relacionados al trabajo compartimos muchas experiencias de vida, todas ellas muy enriquecedoras desde el punto de vista humano.

Finalmente agradezco a mis amigos, quienes me aceptan y me quieren con mis mañas y enojos. Gracias a la Ale, Camilo, Carla, Carlos, Naty y Ninoska con quienes compartí momentos de estudio, de estrés y presión; pero también momentos de relaxo y los mejores veranos llenos de aventura, cuando salíamos a acampar por nuestro bello país. Gracias a todos por su lealtad y porque con cada uno de ellos he aprendido mucho de la vida y de cómo estar mejor preparado para un mañana lleno de adversidades y desafíos.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ABREVIATURAS .....	7
RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Fibroblastos y reparación cardíaca.....	12
1.2 Toll-like receptors (TLRs) .....	14
1.3 Heparan Sulfato (HS).....	17
1.4 TLR4: citoquinas pro inflamatorias y proteínas de adhesión .....	19
1.5 Participación de TLR4 en la expresión de $\alpha$ -SMA .....	20
2.HIPÓTESIS.....	22
3.OBJETIVO GENERAL.....	22
4.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
5.MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1 Reactivos .....	22
5.2 Obtención y cultivo de fibroblastos cardíacos.....	23
5.3 Pasaje celular .....	25
5.4 Western Blot .....	25
5.5 Inmunofluorescencia .....	26
5.6 Expresión de resultados y análisis estadístico .....	27
6.RESULTADOS .....	28
6.1 Evaluación del efecto de LPS y HS sobre los niveles proteicos de pro IL-1 $\beta$ en FC.....	28
6.2 Evaluación del efecto de LPS y HS sobre los niveles proteicos de ICAM-1 en FC.....	30
6.3 Evaluación del efecto de LPS y HS sobre los niveles proteicos de VCAM-1 en FC.....	32
6.3.1 Participación de TLR4 en el aumento de los niveles proteicos de VCAM-1 inducida por HS en FCA.....	34
6.3.2 Participación de las vías ERK1/2, PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B en el aumento de los niveles proteicos de VCAM-1 inducida por HS en FCA.....	35
6.4 Evaluación del efecto de LPS y HS sobre los niveles proteicos de $\alpha$ -SMA en FC. ....	38
6.4.1 Participación de TLR4 en la regulación de los niveles de $\alpha$ -SMA inducida por HS en FCA.....	42
6.4.2 Participación de las vías ERK1/2, PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B en la disminución de los niveles proteicos de $\alpha$ -SMA inducida por HS en FCA. ....	44
7.DISCUSIÓN.....	47
7.1 Activación de TLR4 por HS y LPS.....	47
7.2 HS, a través de TLR4, promueve el aumento de pro IL-1 $\beta$ en FC.....	50
7.3 HS promueve el aumento de ICAM-1 y VCAM-1 en FC, vía TLR4. Participación de la vía PI3K/Akt en el aumento de VCAM-1 .....	53
7.4 HS inhibe la expresión de $\alpha$ -SMA en FC, a través de TLR4. Activación de las vías PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B.....	56

8.CONCLUSIONES .....	58
REFERENCIAS .....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funciones de los fibroblastos cardíacos en el remodelado del tejido	13
Figura 2. Vías de señalización de TLR4	16
Figura 3. Heparan Sulfato, estructura molecular	19
Figura 4. Resumen método utilizado para obtención de FC	25
Figura 5. Niveles proteicos de pro IL-1 $\beta$ en FCN	29
Figura 6. Niveles proteicos de pro IL-1 $\beta$ en FCA, inducida por LPS y HS	29
Figura 7. Niveles proteicos de ICAM-1 en FCN	31
Figura 8. Niveles proteicos de ICAM-1 en FCA	31
Figura 9. Niveles proteicos de VCAM-1 en FCN	33
Figura 10. Niveles proteicos de VCAM-1 en FCA	33
Figura 11. Participación de TLR4 en la regulación de los niveles de VCAM-1 en FCA	34
Figura 12. Participación de Erk 1/2 en la regulación de los niveles de VCAM-1 en FCA	36
Figura 13. Participación de PI3K/Akt en la regulación de los niveles de VCAM-1 en FCA	37
Figura 14. Participación de NF- $\kappa$ B en la regulación de los niveles de VCAM-1 en FCA	38
Figura 15. Niveles proteicos de $\alpha$ -SMA en FCN	40
Figura 16. Niveles proteicos de $\alpha$ -SMA en FCA	40
Figura 17. HS inhibe los niveles proteicos de $\alpha$ -SMA en FCA (inmunofluorescencia)	41
Figura 18. Participación de TLR4 en la regulación de los niveles de $\alpha$ -SMA en FCA	43
Figura 19. Participación de TLR4 en la regulación de los niveles de $\alpha$ -SMA en FCA (inmunofluorescencia)	43
Figura 20. Participación de ERK en la regulación de los niveles de $\alpha$ -SMA en FCA	44
Figura 21. Participación de PI3K/Akt en la regulación de los niveles de $\alpha$ -SMA en FCA	45
Figura 22. Participación de NF- $\kappa$ B en la regulación de los niveles de $\alpha$ -SMA en FCA	46

## ABREVIATURAS

$\alpha$ -SMA	Alfa-actina de músculo liso
$\mu$ g	Microgramo
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ M	Micromolar
AP-1	Factor de transcripción heterodimérico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BAY	Inhibidor de la vía de señalización dependiente de NF- $\kappa$ B
BSA	Albúmina de suero de bovino
CA	Cardiomiocitos adultos
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
CARG	Elemento constitutivo del promotor de $\alpha$ -SMA
cel	Célula
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
D.S	Desviación estándar
DAMPS	Patrones moleculares asociados a daño
DMEM F-12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium fórmula 12
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilén glicol-bis ( $\gamma$ -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetracético
ERK	Proteína kinasa activada extracelularmente
FBS	Suero fetal de bovino
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDA	Domínio extra tipo A de la fibronectina
ELISA	Ensayo inmuno enzimático
FC	Fibroblastos cardíacos
FCA	Fibroblastos cardíacos de ratas adultas
FCN	Fibroblastos cardíacos de ratas neonatas
GAG	Glicosaminoglicano
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
g	Gramos
h	Hora
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina N-2-etanosulfónico
HS	Heparan Sulfato
HSBP	Proteína que une heparan sulfato
HSP	Proteínas de estres térmico
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular
IGF-I	Factor de crecimiento análogo a insulina tipo I
I $\kappa$ B	Inibidor de NF- $\kappa$ B
IL-1	Interleuquina 1
IL-6	Interleuquina 6
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IRF	Factor regulatorio de interferón
IRAK	Quinasa activada por el receptor de interleucina
kDa	Kilo Dalton
LDH	Lactato deshidrogenasa

LPS	Lipopolisacárido
LRR	Repeticiones ricas en leucina
mA	Miliamper
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MCA	Miofibroblasto cardiaco de ratas adultas
MEC	Matriz extracelular
mg	Milígramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteasa
MyD88	Gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide
mV	Milivolt
N	Normal
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B
ng	Nanógramo
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
nmoles	Nanomoles
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PDE	Fosfodiesterasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
p-ERK	Proteína quinasa activada extracelularmente fosforilada.
PI3-K	Fosfatidilinositol 3-quinasa.
PIP2	Fosfatidil inositol 2-fosfato
PKB	Proteína quinasa B o Akt
pM	Picomolar
RM	Remodelamiento Cardíaco
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida desnaturante
TAK	Quinasa activada por TGF- $\beta$
TCA	Ácido tricloro acético
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TIR	Domínio común del receptor de interleucina y receptor de tipo toll
TLR	Receptor de tipo toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
UBC13	Enzima ubiquitinante 13
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular. Isoforma 1
v/v	Proporción volumen/volumen

## RESUMEN

Los fibroblastos cardíacos (FC) se encargan de mantener tanto la estructura como la mecánica y la señalización del corazón. A estas células se les conoce como células centinela, pues responden de manera variada y compleja a fin de mantener la homeostasis, jugando un rol clave dentro de este proceso. Dicha respuesta se lleva a cabo mediante una maquinaria conformada por una amplia red de receptores, entre ellos los receptores tipo-toll y, en particular, el TLR4 (del inglés toll like receptor 4). Este receptor presenta patrones de reconocimiento que le permite responder a diversos ligando, los que pueden ser exógenos como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) o endógenos como el heparan sulfato (HS). Ambos estímulos han mostrado mediar respuestas inflamatorias y fibróticas tanto en FC, como en otros tejidos. Sin embargo, en esta memoria se abordará específicamente el rol de HS como estímulo desencadenante de estas respuestas. Como modelo experimental se usaron FC de ratas neonatas y adultas (FCN y FCA).

Estudios previos demuestran que, en FC, LPS modifica los niveles proteicos de la citoquina pro inflamatoria IL-1 $\beta$ , así como de proteínas de adhesión celular y vascular (ICAM-1 y VCAM-1, respectivamente) y de la proteína alfa actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA). Esta última proteína constituye un marcador de diferenciación de fenotipo FC-MFC (miofibroblasto cardíaco), que se expresa en estados patológicos, como ocurre luego de un infarto cardíaco. Para el caso de HS existe evidencia que indica que es un agonista del TLR4, pero no se han medido las variaciones de IL-1 $\beta$ , ICAM-1, VCAM-1 ni de  $\alpha$ -SMA a nivel cardíaco; siendo uno de los objetivos del presente trabajo demostrar si esto ocurre. Para despejar tal interrogante se medirán los niveles de las proteínas mencionadas. También se evaluarán las vías de señalización PI3K/Akt, Erk1/2 y NF- $\kappa$ B de TLR4, comparando efectos inducidos por LPS y HS, a fin de comprobar si el aumento de VCAM-1 y la disminución de  $\alpha$ -SMA en FC, es mediada

por alguna de estas vías de señalización que involucran al receptor.

En conclusión, en FCN y FCA, tanto HS como LPS inducen cambios en los niveles proteicos de IL-1 $\beta$ , ICAM-1, VCAM-1 y  $\alpha$ -SMA, lo que resalta las propiedades proinflamatorias y antifibróticas de ambos estímulos tras la activación de TLR4.

## **SUMMARY**

**Heparan sulphate, through TLR4, triggers IL-1 $\beta$ , ICAM-1 and VCAM-1 increase and  $\alpha$ -SMA decrease.**

**Heart structure, mechanism and signaling** is supported by **cardiac fibroblast (CF)**. These cells are named sentinel cells, because they respond in complex and different manner to maintain homeostasis, playing a key role in this process. This action is due to a mechanism that involves a broad spectrum of receptors, including the toll like receptors especially TLR4 (toll like receptor 4). This receptor has recognition patterns, which allow to answer to several stimulus, like bacterial lipopolysaccharide (LPS) and heparan sulphate (HS), exogenous and endogenous stimulus respectively. Both of them has shown to mediate fibrotics and inflammatory responses, in CF and others tissues. However, in this study we will present the HS responses in adults and neonates animal fibroblasts (ACF and NCF).

According to literature, in CF, LPS changes on IL-1 $\beta$  levels, a proinflammatory cytokine; ICAM-1 y VCAM-1 (intercellular and vascular adhesion molecule) and finally the  $\alpha$ -SMA protein ( $\alpha$ -smooth muscle actin), responsible for cardiac tissue integrity and main fibroblast-myofibroblast differentiation master, expressed in pathological stage, such as heart infarct. In relation with HS, there is evidence that it is a TLR4 agonist, but IL-1 $\beta$ , ICAM-1, VCAM-1 and  $\alpha$ -SMA variations has not been determined. In this work we will perform these experiments. Besides the analysis of these proteins, we will study the PI3K/Akt, ERK1/2 and NF- $\kappa$ B signaling pathways implicated in the VCAM-1 increase and  $\alpha$ -SMA decrease in ACF, via TLR4, as well as the receptor blockade in order to demonstrate if these effects are mediated by this receptor, by comparing the effects of HS and LPS.

In conclusion, as HS as LPS induced changes in IL-1 $\beta$ , ICAM-1, VCAM-1 and  $\alpha$ -SMA protein levels, in NCF and ACF. Therefore the antifibrotics and proinflammatory properties of the two stimulus after the activation of TLR4 are demonstrated.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Fibroblastos y reparación cardíaca**

El sistema cardiovascular, gracias a su principal representante, el corazón; se encarga de mantener la constancia del medio interno (homeostasis) sobre varios otros sistemas del organismo. Este sistema debe responder en forma eficaz y oportuna ante cualquier fluctuación del medio externo, con el fin de retornar el equilibrio del sistema.

Entre las principales funciones del corazón, destacan su contractibilidad y capacidad de bombear sangre, tanto a los pulmones para ser oxigenada, como al resto de los órganos y tejidos del organismo que necesitan nutrirse de ella. De esta manera, la función cardíaca es muy amplia y compleja. Normalmente es regulada por interacciones dinámicas y coordinadas, entre dos tipos celulares principales en este tejido: cardiomiocitos y fibroblastos que, en conjunto, constituyen cerca del 90% de las células del miocardio. Los primeros otorgan contractibilidad y fuerza mecánica al corazón. Los segundos son una fuente de componentes de matriz extra celular (MEC) que regulan su estructura, su mecánica y las señalizaciones químicas y eléctricas entre componentes celulares y no celulares.<sup>1</sup>

Los fibroblastos cardíacos (FC) son células de origen mesenquimal y juegan un rol importante en el remodelado cardíaco. Este proceso ocurre, por lo general, luego de un estímulo dañino sobre el tejido.<sup>2</sup> El objetivo del remodelado es reemplazar las zonas dañadas para reestablecer la función del órgano<sup>3</sup> (ver figura 1). Si esta reparación se prolonga en el tiempo, producto de la presencia persistente de un estímulo dañino, el proceso se torna crónico y patológico. En estas condiciones existe mayor riesgo de disfunción cardíaca, pudiendo afectar tanto su contractibilidad, como la generación de los impulsos nerviosos (arritmias).<sup>4</sup>

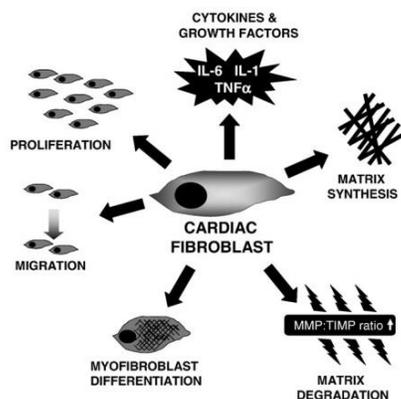


Figura 1: Funciones de los fibroblastos cardíacos en el remodelado del tejido.

Tal tipo de estímulo injurioso se presenta, habitualmente, en ciertas patologías como hipertensión, infarto al miocardio e insuficiencia cardíaca. En estas condiciones, el corazón y en particular los FC, responden a cambios en la homeostasis de la MEC con producción de algunos factores de síntesis y degradación de componentes de tejido conectivo, así como liberación de citoquinas (pro inflamatorias), factores de crecimiento y metaloproteinasas de la matriz (MMP).<sup>5</sup> Por el hecho de ser capaces de mediar tal variedad de cambios, se considera a los FC como “células centinela”, pues son elementos celulares clave en la reparación del tejido dañado.<sup>6</sup> Todos estos cambios desencadenan respuestas inflamatorias locales, las que median la resolución del proceso fibrótico gracias a la ayuda del sistema inmune, sintetizando citoquinas pro inflamatorias (IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1), moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) y la secreción de proteínas por parte de los propios FC. Como resultado los FC se diferencian a miofibroblastos cardíacos (MFC), que se caracterizan por expresar altos niveles de proteína alfa actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA), proteína contráctil marcadora de este fenotipo.<sup>7</sup> Los FC, además, tienen un rol activo en la patogenia de la fibrosis, dada la capacidad que tienen de secretar niveles elevados de proteínas de la MEC y citoquinas fibrogénicas, las cuales otorgan a la MEC la tensión mecánica suficiente para poder contraer y cerrar la herida, formando una cicatriz.<sup>8</sup>

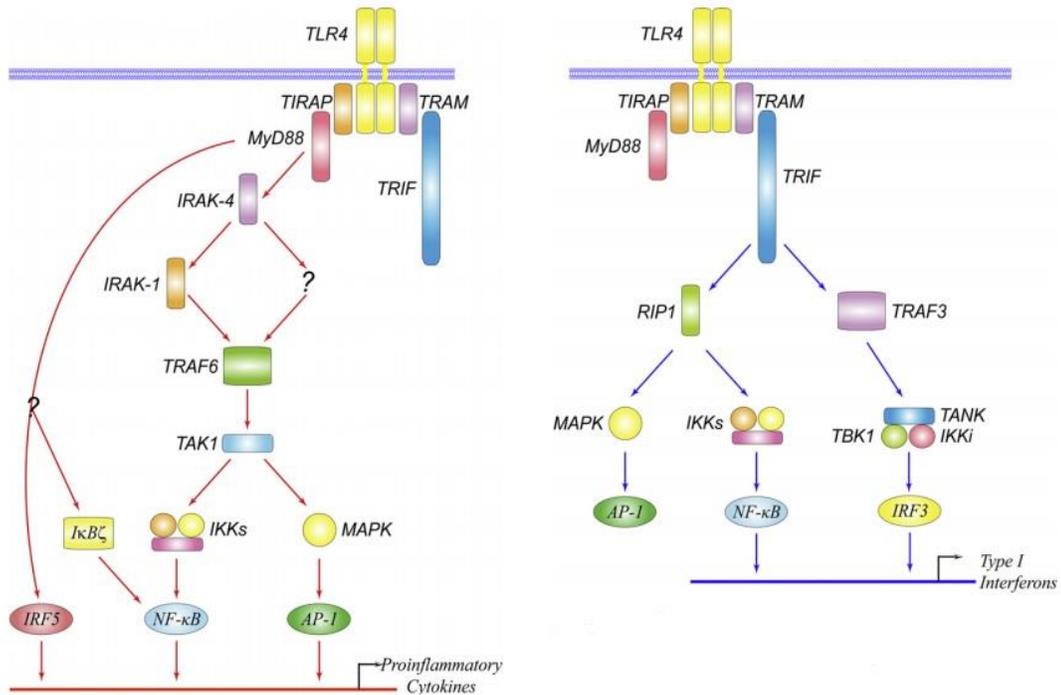
## 1.2 Toll-like receptors (TLRs)

Los Toll-like receptors (TLRs) corresponden a un grupo de receptores expresados por células del sistema inmune innato y son estimulados por ciertas estructuras conocidas y propias de las bacterias, virus y hongos.<sup>9</sup> Estos receptores son capaces de responder a estímulos conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns), de origen exógeno.<sup>10</sup> Entre este tipo de patrones es posible encontrar diversas clases de ligando, como lipopolisacárido bacteriano (LPS), lipopéptidos bacteriales (diacilados y triacilados), flagelinas bacterianas y RNA viral de hebra simple y doble.<sup>11</sup> La interacción de estos ligando con los receptores TLR gatilla la activación de diversas vías de señalización intracelulares las que promueven respuestas inflamatorias tempranas (ver figura 2). Esto induce la expresión de citoquinas y otros mediadores pro-inflamatorios,<sup>12</sup> desencadenando una respuesta inmediata, a fin de reestablecer la homeostasis del medio.<sup>13</sup> Por otro lado, además de los PAMPs, los TLRs también reconocen patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), de origen endógeno. Entre ellos se incluyen algunas proteínas de shock inducidas por calor (Hsp, heat shock protein), Hsp60, Hsp70, proteína surfactante A, cajas grupo 1 de alta movilidad (HMGB1), fibrinógeno y fibronectina, así como polisacáridos como el Heparan Sulfato (HS).<sup>6</sup>

Los TLRs corresponden a una familia de receptores de transmembrana que actualmente está constituida por 10 miembros (TLR1-TLR10). Se caracterizan por presentar una porción citoplasmática muy similar al de la familia del receptor de la interleuquina (IL)-1, por lo que recibe el nombre de receptor de dominio de Toll/IL-1 (TIR). A pesar de esta similitud, las porciones extracelulares de ambos tipos de receptores no están relacionadas estructuralmente. Los receptores de IL-1 poseen un dominio de tipo Inmuno globulina (Ig), mientras que los TLR poseen un una serie de repeticiones ricas en leucina (LRR). Cada TLR tiene la capacidad de

reconocer componentes específicos de los patógenos. Esto demuestra que el sistema inmune de los mamíferos detecta la invasión de patógenos, a través del reconocimiento de los componentes microbianos por TLR.<sup>14 15</sup>

Los TLR luego de ser activados transmiten su señal a través de proteínas adaptadoras, como MyD88 (del inglés, myeloid differentiation primary response 88) para activar IRAKs (del inglés, Interleukin-1 receptor activated kinases), TAK1 (del inglés, Transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1), IKK (I $\kappa$ B kinase) y MAPKs (ver figura 2). Estas quinasas intracelulares llevan a la activación de genes diana e incluyen citoquinas pro inflamatorias, lo que resulta en la inducción de potentes respuestas del sistema inmune innato.<sup>16</sup>



**Figura 2: vías de señalización de TLR4.** A la izquierda vía dependiente de MyD88, a la derecha vía independiente de MyD88

Evidencias recientes indican que la vía de señalización de TLR consiste, a lo menos, en una vía dependiente de MyD88 común para todos los TLRs, y una vía independiente de MyD88 específica para la señalización de TLR3 y TLR4. Se conoce además, que MyD88 activa IRAKs/TRAF6 junto con el factor de transcripción NF-κB, AP-1 e IRF-5. NF-κB corresponde a un factor de transcripción que controla la expresión de genes de citoquinas pro inflamatorias. En la vía independiente de MyD88, la activación de TRIF conduce a la expresión de interferones tipo I mediante el reclutamiento de TRAF3 y RIP1, para activar factores de transcripción como IRF3, junto con NF- κB y AP-1.<sup>17</sup>

La liberación de citoquinas tras el reconocimiento de PAMPS y DAMPS es uno de los efectos más importantes de la activación de TLR4. La mayoría de las células inmunes que son reclutadas al sitio del daño durante la ocurrencia de un infarto cardíaco son capaces de expresar el receptor de TLR4.<sup>15</sup> Sumado a esto, resultados de nuestro laboratorio han confirmado la presencia y activación de este receptor tras el estímulo con LPS en FC y MFC.<sup>18</sup> Esto también se ha observado en modelos de fibrosis pulmonar, donde TLR4 también se ha detectado en células estructurales residentes del tejido como fibroblastos pulmonares y células epiteliales.<sup>19</sup> Con respecto a esto y pese a la extensa literatura que hay acerca de las citoquinas pro inflamatorias y pro fibróticas liberadas por los FC y MFC, tras un infarto cardíaco; no se conoce con exactitud como contribuye el receptor TLR4 a la secreción de estas proteínas, ni cómo es que esta activación regula la transición desde una fase inflamatoria a una fibrótica.

### **1.3 Heparan Sulfato (HS)**

Heparan Sulfato es un glicosaminoglicano (GAG), particularmente, un polisacárido lineal compuesto de subunidades de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina alternadamente. Desde el punto de vista funcional, HS forma parte de la matriz extracelular de muchas células y también se encuentra en la superficie de ellas. Bajo condiciones normales (*in vitro*), HS interactúa con una multitud de moléculas incluyendo factores de crecimiento y proteínas de matriz extracelular.<sup>20</sup>

En ocasiones HS se ha confundido con heparina, debido a que presentan una estructura química común y ambos compuestos forman parte de la familia de los GAGs. Sin embargo, HS presenta una gran secuencia de ácido D-glucurónico (Glc-A) o ácido L-idurónico

(IdoA) y residuos D-glucosaminos (GlcN) los cuales pueden ser N-sulfatados o N-acetilados. Dichos residuos no están presente en la heparina, pudiendo explicar las diferencias en términos de interacción con receptores diferentes, desencadenando así respuestas distintas a nivel celular. Un claro ejemplo es el uso farmacológico de la heparina, que es utilizada ampliamente como anticoagulante (junto a sus derivados heparinas de bajo peso molecular), mientras que el HS no ha descrito tener tales propiedades, lo que podría explicarse por la diferencia en los residuos mencionados.<sup>21</sup>

HS tiene una estructura que, aún con el paso del tiempo, ha permitido que diversas proteínas interactúen con esta molécula (ver figura 3).<sup>22</sup> La mayoría de ellas lo hacen con gran especificidad y se conocen como proteínas que unen HS o HSBP, del inglés Heparan Sulfate-Binding Proteins. Entre ellas es posible encontrar proteínas que participan en el acoplamiento celular, en procesos de migración, invasión y diferenciación, morfogénesis, organogénesis, coagulación sanguínea, metabolismo lipídico, inflamación y respuestas de daño. Estos procesos se llevan a cabo mediante una interacción de las HSBP, a cadenas de carbohidratos presentes en la estructura del HS. Entre las principales HSBP se incluyen citoquinas y quimioquinas; morfogenes y factores de crecimiento involucrados en desarrollo y reparación de tejidos; factores de coagulación sanguínea; proteínas estructurales extracelulares como colágeno, fibronectina y vitronectina; proteínas involucradas en la vía del complemento; receptores de señalización trans membrana y proteínas de adhesión celular.<sup>22</sup>

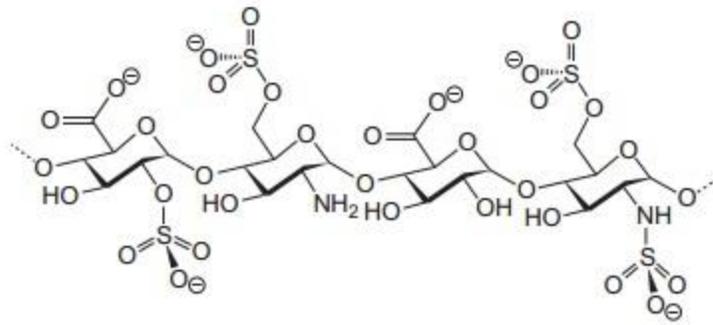


Figura 3: Heparan Sulfato, estructura molecular.

En ciertos procesos inflamatorios, así como en circunstancias que existe tejido dañado en el organismo, el HS presente en matrices extra celulares y membranas celulares de vertebrados se fragmenta a su forma soluble a fin de comenzar los procesos de reparación correspondientes, actuando libre a las diversas HSBP según sea el caso. Por otro lado, en células dendríticas Johnson *et al.* (2002), demostraron que HS activa el receptor TLR4 desencadenando así la maduración de las células dendríticas.<sup>23</sup> Lo anterior confirma que HS es un ligando capaz de activar TLR4.

#### 1.4 TLR4: citoquinas pro inflamatorias y proteínas de adhesión

Es conocido que, a nivel cardíaco, la liberación de la IL-1 $\beta$  corresponde a un acontecimiento desencadenado en el infarto al miocardio y en la aterosclerosis. Lo interesante es que, en ambos casos, la inhibición de la liberación de esta citoquina sería una potencial estrategia farmacológica para disminuir las repercusiones que traen consigo estas patologías.<sup>24</sup> A todo esto se suma el hecho que se ha podido asociar que la expresión transitoria de IL-1 $\beta$  sería más importante para el proceso de cicatrización. No obstante, la expresión crónica de la IL-1 $\beta$  pareciera mediar la fibrosis.<sup>24</sup>

Por otro lado, en células endoteliales, Edfeldt *et al.* 2002 y Vasa *et al.* 2006; describieron que LPS activa el TLR4 e induce la activación de las vías de señalización NF- $\kappa$ B, p38 MAPK y ERK1/2, a través de las cuales se induce la producción de citoquinas inflamatorias y quimioquinas (entre ellas IL-8, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1 y TNF $\alpha$ ),<sup>25</sup> conjuntamente con la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina).<sup>25</sup> En el trabajo a realizar es de particular interés el estudiar si HS, a través de TLR4, induce en los FC la expresión de citoquinas y quimioquinas, así como también de las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1. Estas proteínas, en su conjunto, juegan un rol crucial en los FC, pues activan la maquinaria intracelular responsable del recambio de las proteínas de la MEC, así como también, en los mecanismos de reparación tisular, los cuales son críticos en el desarrollo de la fibrosis cardíaca. En tal proceso, tanto ICAM-1 como VCAM-1 son capaces de reclutar células del sistema inmune, los que serían responsables de los efectos consiguientes.<sup>26</sup>

### **1.5 Participación de TLR4 en la expresión de $\alpha$ -SMA**

Actualmente existen evidencias del rol de TLR sobre fibroblastos en enfermedades como asma bronquial. En este órgano la estimulación del receptor TLR3 por un análogo sintético de RNA doble hebra es capaz de aumentar significativamente la cantidad de TGF- $\beta$ 1 activo y de esta manera inducir la diferenciación a miofibroblasto.<sup>27</sup> Por otro lado, se ha demostrado que la presencia de fibronectina ED-A, otro ligando endógeno de TLR4, es un requisito esencial para la diferenciación a miofibroblastos. El aumento significativo de su deposición precede la expresión de  $\alpha$ -SMA durante la estimulación con TGF- $\beta$ 1. Si se bloquea la fibronectina ED-A mediante un anticuerpo se inhibe la expresión de  $\alpha$ -SMA y de colágeno mediada por TGF- $\beta$ 1.<sup>28</sup> Además, en un modelo de fibroblastos y miofibroblastos pulmonares se ha demostrado que la señalización de TGF- $\beta$ 1 secretado en forma autocrina más ácido

hialurónico, un componente de la matriz extracelular y ligando endógeno de TLR4, es esencial para la mantención del fenotipo. Al ser bloqueado en su síntesis conduce a la pérdida en el fenotipo miofibroblasto.<sup>29</sup> En contraste, también es conocido el efecto antagónico que tiene la activación de NF- $\kappa$ B sobre la expresión de  $\alpha$ -SMA en células del músculo liso vascular.<sup>30</sup> Finalmente, las evidencias sugieren un rol ambiguo de TLR4 sobre el proceso de diferenciación a miofibroblasto o de la mantención de este último.<sup>31</sup>

Como se ha descrito previamente, luego de un proceso fibrótico, los FC expresan la proteína  $\alpha$ -SMA, ya sea por cambios mecánicos o químicos en el ambiente cardíaco, sirviendo como marcador de la diferenciación al fenotipo MFC.<sup>31</sup> De acuerdo a los estudios realizados por Sandbo *et al.*, (2007), la expresión de  $\alpha$ -SMA puede ser inhibida por la endotoxina LPS. Sin embargo, no se menciona si este efecto es mediado vía TLR4.<sup>30</sup> Por otro lado, en fibroblastos de pulmón se ha demostrado que la activación de TLR3 con Poli [I:C] induce la expresión de TGF- $\beta$ 1, y a través de esta citoquina se induce la expresión de  $\alpha$ -SMA.<sup>27</sup> La expresión de  $\alpha$ -SMA es regulada a nivel transcripcional por dos elementos reguladores, las cajas CArG activadas por SRF (del inglés, Serum Response Factor) y por TCE (del inglés, Transforming Growth Factor TGF- $\beta$ -control elements). Según Sandbo *et al.*, (2007), el LPS genera una inhibición dosis dependiente de la expresión de  $\alpha$ -SMA a nivel transcripcional, mediante mecanismos que involucran la inhibición de TCE pero no la de SRF en VSMC.<sup>30</sup>

Por otro lado, antecedentes de nuestro laboratorio señalan que la estimulación con LPS en FC de ratas adultas es capaz de disminuir el nivel proteico de  $\alpha$ -SMA mediante la activación del receptor TLR4 activando diferentes vías de señalización.<sup>32</sup> La recopilación de todos los antecedentes expuestos y el interés por conocer más acerca de los efectos del HS sobre la reparación del tejido cardíaco, nos llevan a plantear la siguiente hipótesis.

## **2. HIPÓTESIS**

“Heparan Sulfato, a través de TLR4, promueve el aumento de IL-1 $\beta$ , ICAM-1 y VCAM-1 y, a su vez, gatilla un descenso en los niveles de  $\alpha$ -SMA en fibroblastos cardíacos de ratas adultas”.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Demostrar que en fibroblastos cardíacos, HS es capaz de modificar los niveles de expresión de IL-1 $\beta$ , ICAM-1, VCAM-1 y  $\alpha$ -SMA.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- i. Demostrar que HS induce la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto, por la disminución de los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA.
- ii. Demostrar que HS induce la expresión de citoquinas pro inflamatorias, en particular de pro IL-1 $\beta$
- iii. Demostrar que HS ejerce efectos anti inflamatorios, reflejados por el aumento de los niveles proteicos de ICAM-1 y VCAM-1.
- iv. Demostrar que las vías transduccionales activadas por HS, que participan en la disminución de  $\alpha$ -SMA, son dependientes de TLR4.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **5.1 Reactivos**

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): Heparan Sulfato (HS), ketamina, xilazina, colagenasa, Tritón X-100, anti-GAPDH, anti- $\alpha$ -SMA,

anti- $\beta$ -tubulina, PD98059, LY294002 y BAY 11-7082. Todos los medios de cultivo, suero fetal bovino (FBS) y tripsina-EDTA se adquirieron a Gibco BRL (Carlsbad, EEUU). El anticuerpo anti TLR4 fue adquirido en Santacruz Biotechnology (Dallas, EEUU). Los compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania). TAK-242 y LPS-RS se adquirieron en Invivogen (San Diego, EEUU). El material de plástico estéril para la obtención y cultivo de FC se obtuvo en Falcon.

## **5.2 Obtención y cultivo de fibroblastos cardíacos**

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley neonatas de 2 a 3 días de edad para obtención de cultivo de fibroblastos cardíacos neonatos (FCN) y ratas Sprague-Dawley de 6 a 8 semanas de edad (200-300 g c/u) para obtener el cultivo de fibroblastos cardíacos adultos (FCA). En ambos casos, los animales se obtuvieron desde el bioterio de la Universidad de Chile, en cumplimiento de todas las normas éticas referidas a la utilización de animales, contando además con la aprobación del comité de ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Para obtención de FCN, se utilizó el procedimiento descrito por Vivar *et al.* (2012), el cual describe la obtención de FCN por medio de la separación de estas células de los cardiomiocitos mediante la adhesión diferencial de estos últimos en las placas de cultivo.<sup>49</sup> Las ratas se decapitaron e inmediatamente se les removió el corazón bajo condiciones de asepsia, luego se retiraron las aurículas, y los ventrículos se cortaron en pequeños fragmentos para aumentar la superficie de contacto con la solución de digestión, formada en base a pancreatina y colagenasa II. El producto de las digestiones se sometió a un pre-plaqueo de 2 h a 37° C en medio de cultivo conteniendo 5 % FBS y 10 % FCS en placas para cultivo de plástico. Por adhesión diferencial a la placa de cultivo se separaron FC de cardiomiocitos. Transcurridas las

2 h, se cambió el medio por DMEM-F12 + 10 % FBS, y los FCN se dejaron proliferar hasta confluencia. Las placas de cultivo con los FCN se dejaron durante 3 días. Luego se removieron las impurezas, restos celulares y células no cardíacas mediante la utilización de Buffer Fosfato Salino (PBS), para luego agregar un nuevo medio DMEM-F12 + 10% FBS.

Para el caso de los FCA, se utilizó el procedimiento descrito por Claycomb y Palazzo, con algunas modificaciones.<sup>33</sup> Se anestesió una rata adulta con una mezcla de ketamina-xilazina (66 y 1.6 mg/kg respectivamente, vía intraperitoneal). La tapa torácica se removió por toracotomía bilateral y se escindió el corazón, separando a continuación las aurículas de los ventrículos. Estos últimos se disgregaron mecánicamente en pequeños trozos, añadiendo luego 25 mL de una solución de colagenasa tipo II (1 mg/mL), y se colocó en agitación para digestión a 37°C durante una hora y media. El producto de la digestión se centrifugó por primera vez a 500 rpm por 2 min a temperatura ambiente. La pella resultante de esta primera centrifugación, rica en cardiomiocitos adultos (CA), se descartó y el sobrenadante, enriquecido en FCA, se sometió a una segunda centrifugación, esta vez a 1000 rpm por 10 min a la misma temperatura. La pella obtenida de la segunda centrifugación se re suspendió con medio DMEM-F12 + 10% FBS. Finalmente se sembraron los FC en placas de cultivo de 100 mm y se mantuvieron con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de oxígeno a 37°C. Al cabo de 24 h, se cambió el medio para remover las células muertas y/o no adheridas. Los FCA se incubaron nuevamente en DMEM-F12 + 10% de FBS, con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de oxígeno a 37°C hasta un 90% - 100% de confluencia. Luego se expandieron hasta pasaje 1, previo lavado de los cultivos y tratamiento con tripsina-EDTA (ver figura 4).

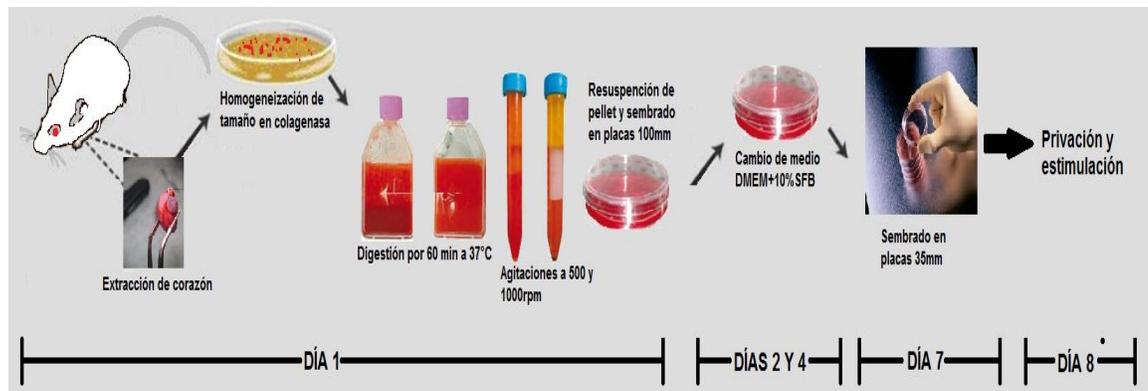


Figura 4: Resumen método utilizado para obtención de fibroblastos cardíacos

### 5.3 Pasaje celular

Para la realización de todos los experimentos, las células se mantuvieron en pasaje 0 (p0), en medio DMEM-F12 suplementado con 10% FBS, hasta alcanzar confluencia del 100%. Posteriormente, los FC se soltaron con tripsina 0,1% en PBS 1X estéril y se contaron por el método de exclusión de azul de tripán y se sembraron en placas plásticas de cultivo celular de 35 mm a una concentración de  $150.000 \text{ células/cm}^3$  en medio DMEM F-12 suplementado con FBS 10% (pasaje 1). Luego de que las células se encontraron adheridas al plástico de las placas, se lavaron con PBS 1X estéril y se mantuvieron en medio DMEM F-12 hasta la realización del experimento.

### 5.4 Western Blot

Los extractos proteicos obtenidos de la lisis celular de los FC se cuantificaron empleando el método de Bradford para ser sometidos, a continuación, a electroforesis en gels de acrilamida/bisacrilamida al 12%-10% para la separación y resolución de las proteínas conforme a su masa. El gel concentrador (stacking) fue de 5%. La electroforesis se realizó a

voltaje constante de 100 Volts en tampón de electroforesis 1X hasta migración completa. Luego, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con poro de 0,2  $\mu\text{m}$  manteniendo constante el amperaje (350 mA) durante 90 minutos, en tampón de transferencia. Posteriormente las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en TBS-Tween.

Finalmente las membranas de nitrocelulosa se incubaron con anticuerpos primarios anti pro IL-1 $\beta$  (1:500) y anti  $\beta$ -tubulina (1:50.000) y anti ICAM-1 (1:200), anti VCAM-1 (1:200), anti GOAT (1:500), anti  $\alpha$ -SMA (1:5.000) y anti  $\beta$ -GAPDH (1:10.000) durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Transcurrido el tiempo se lavaron con TBS-Tween y se incubaron con anticuerpo secundario anti-ratón, anti-conejo o anti-cabra conjugado de la peroxidasa del rábano. Para la detección de la actividad enzimática se utilizó un método quimio luminiscente de ECL.

## **5.5 Inmunofluorescencia**

Se sembraron los FC a una concentración de 100.000 células/cm<sup>3</sup> sobre cubreobjetos de vidrio. Luego del estímulo se lavaron las células con PBS frío y se fijaron a cubreobjetos de vidrio por 10 minutos con paraformaldehído al 4% en PBS. Posteriormente se permeabilizaron con tritón X-100 0,1% por 15 minutos y se bloquearon con BSA 3% por 1 hora. Las preparaciones se incubaron con anticuerpos primarios anti  $\alpha$ -SMA durante toda la noche a 4°C y a continuación con anticuerpos secundarios Alexa flúor 488 y/o 586, según correspondiera por 2 horas. La marcación nuclear se realizó con azul de Hoechst en una dilución de 1:1000 en solución de bloqueo. Finalmente, las células se montaron sobre DAKO en portaobjetos, para retardar el decaimiento de la fluorescencia y se observaron en un microscopio spinning disc. El análisis de las imágenes se efectuó con el programa computacional Image J.

## **5.6 Expresión de resultados y análisis estadístico**

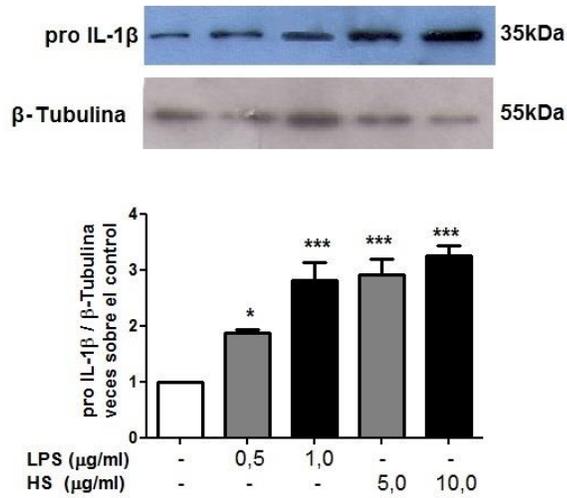
Los resultados mostrados corresponden al promedio  $\pm$  D.S. de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA y la prueba Tuckey para determinar la significancia estadística de los resultados. El nivel de significación establecido fue de  $P < 0,05$ .

## **6. RESULTADOS**

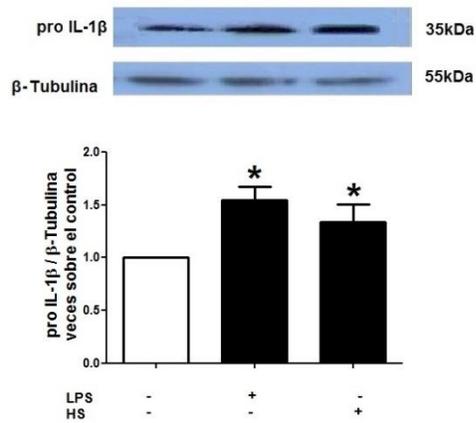
### **6.1 Evaluación del efecto de LPS y HS sobre los niveles proteicos de pro IL-1 $\beta$ en FC.**

En primer lugar, determinamos el efecto de LPS y HS sobre los niveles proteicos de pro IL-1 $\beta$  en FCN (Fig. 5). Las células se estimularon con LPS (0,5-1  $\mu$ g/mL) y HS (5-10  $\mu$ g/mL); y se mantuvieron en medio DMEM-F12 durante 24 horas, para lisarlas posteriormente con tampón de lisis e identificar la proteína por Western blot. En el panel superior se observa una imagen representativa del western blot de pro IL-1 $\beta$ ; mientras que en el panel inferior se muestra el análisis gráfico. Los resultados muestran que a las 8 horas, el estímulo de LPS 0,5  $\mu$ g/mL es capaz de aumentar aproximadamente al doble los niveles proteicos de pro IL-1 $\beta$  respecto al control. En tanto que la mayor concentración de LPS aumentó al triple los niveles proteicos de la citoquina. Por otro lado, HS a ambas concentraciones indujo un aumento significativo (aproximadamente 3 veces), en los niveles proteicos de pro IL-1 $\beta$ .

En segundo lugar, comparamos el efecto de LPS (1  $\mu$ g/mL) y HS (10  $\mu$ g/mL) en FCA (Fig. 6). En el panel superior se observa una imagen representativa del Western blot de la proteína pro IL-1 $\beta$ ; mientras que en el panel inferior se muestra el análisis gráfico. Los resultados muestran que tanto LPS como HS indujeron un aumento significativo en los niveles de pro IL-1 $\beta$  (1,5 veces aproximadamente).



**Fig 5. Niveles proteicos de pro IL-1β en fibroblastos cardiacos neonatos.** Se estimularon FCN (n=4) durante 8 horas con LPS y HS. Los niveles de pro IL-1β se midieron por IWB. Como control de carga se utilizó β-Tubulina. \* p<0,05 vs control, \*\*\* p<0,001 vs control. Los resultados se expresan como promedio ± D.S.

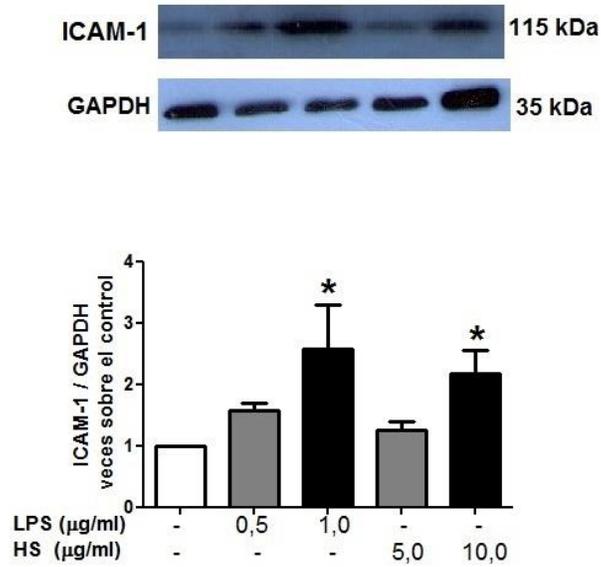


**Fig 6. Niveles proteicos de pro IL-1β en fibroblastos cardiacos adultos, inducida por LPS y HS.** Se estimularon FCA (n=4) durante 8 horas con LPS (1 μg/mL) y HS (10 μg/mL). Los niveles de pro IL-1 se midieron por IWB. Como control de carga se utilizó β-Tubulina. \* p<0,05 vs control. Los resultados se expresan como promedio ± D.S.

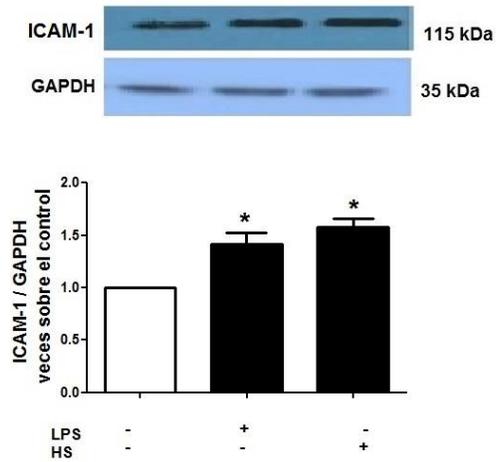
## **6.2 Evaluación del efecto de LPS y HS sobre los niveles proteicos de ICAM-1 en FC.**

Para evaluar los niveles proteicos de ICAM-1 determinamos, en este caso, el efecto que ejercían tanto LPS y HS sobre dicha citoquina en FCN (Fig. 7). Las células se estimularon con LPS (0,5-1 µg/mL) y HS (5-10 µg/mL); y se mantuvieron en medio DMEM-F12 durante 24 horas. Luego se rasparon las placas que contenían las células con tampón de lisis para identificar la proteína mediante método Western blot. En el panel superior se observa una imagen representativa del Western blot de ICAM-1; mientras que en el panel inferior se muestra el análisis gráfico del mismo. Los resultados muestran que a las 24 horas, el estímulo de LPS fue capaz de aumentar desde 1,5 a 2,5 veces los niveles proteicos de ICAM-1 respecto al control. Para el caso de los estímulos con HS, la menor concentración utilizada indujo un leve aumento en los niveles proteicos de ICAM-1, mientras que a la mayor concentración dichos niveles aumentaron aproximadamente al doble.

En un segundo experimento para el estudio de ICAM-1, determinamos el efecto de LPS (1 µg/mL) y HS (10 µg/mL) sobre FCA (Fig. 8). En el panel superior se observa una imagen representativa del Western blot de ICAM-1 para dicho ensayo; mientras que en el inferior se presenta su análisis gráfico. Los resultados muestran que tanto LPS como HS indujeron un aumento significativo en los niveles proteicos de ICAM-1, alcanzando un valor de aproximadamente 0,5 veces por sobre el control.



**Fig 7. Niveles proteicos de ICAM-1 en fibroblastos cardiacos neonatos.** Se estimularon FCN (n=3) durante 24 horas con LPS y HS. Los niveles de ICAM-1 se midieron por IWB. Como control de carga se utilizó GAPDH. \* p<0,05 vs control. Los resultados se expresan como promedio ± D.S.

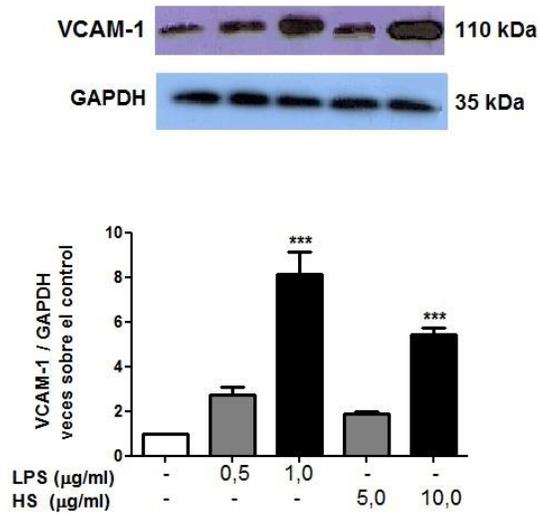


**Fig 8. Niveles proteicos de ICAM-1 en fibroblastos cardiacos adultos.** Se estimularon FCA (n=3) durante 24 horas con LPS (1 μg/mL) y HS (10 μg/mL). Los niveles ICAM-1 se midieron por IWB. Como control de carga se utilizó GAPDH. \* p<0,05 vs control. Los resultados se expresan como promedio ± D.S.

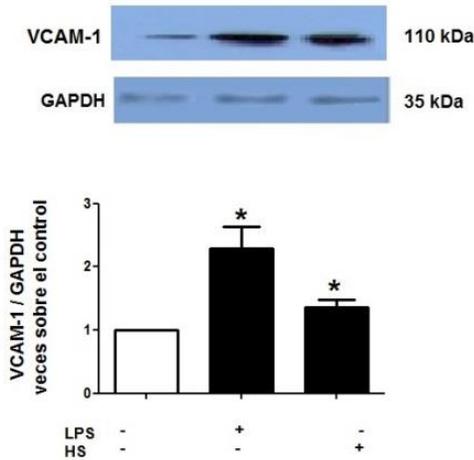
### **6.3 Evaluación del efecto de LPS y HS sobre los niveles proteicos de VCAM-1 en FC.**

Primero se determinó el efecto de LPS y HS sobre los niveles proteicos de VCAM-1 en FCN (Fig. 9). Las células se estimularon con LPS (0,5-1  $\mu\text{g/mL}$ ) y HS (5-10  $\mu\text{g/mL}$ ); y se mantuvieron en medio DMEM-F12 durante 24 horas, para lisarlas posteriormente con tampón de lisis e identificar la proteína por Western blot. En el panel superior se observa una imagen representativa del western blot de VCAM-1, mientras que en el panel inferior se muestra el análisis gráfico. Los resultados muestran que a las 24 horas, el estímulo de LPS 0,5  $\mu\text{g/mL}$  fue capaz de aumentar aproximadamente al triple los niveles proteicos de VCAM-1 respecto al control. Mientras que a la mayor concentración de LPS el aumento fue de aproximadamente nueve veces más que el control. Un efecto similar, pero en menor magnitud, se observó al estimular los FCN con HS, obteniendo que a la menor concentración del estímulo el aumento en la expresión de VCAM-1 fue de aproximadamente dos veces; mientras que a la mayor concentración el aumento fue de 6 veces, en ambos casos respecto del control.

En segundo lugar, determinamos el efecto de LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) y HS (10  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre FCA (Fig. 10), en cuanto a la expresión de VCAM-1. En el panel superior se observa una imagen representativa del western blot de VCAM-1; mientras que en el panel inferior se muestra el análisis gráfico. Los resultados muestran que ambos estímulos, LPS y HS, indujeron un aumento significativo en los niveles proteicos de VCAM-1 a las 24 horas. Sin embargo, mientras que con LPS el aumento fue de entre 2 a 2,5 veces respecto del control, en el caso de las células estimuladas con HS dicho aumento fue sólo de 1,5 veces respecto del control.



**Fig 9. Niveles proteicos de VCAM-1 en fibroblastos cardiacos neonatos.** Se estimularon FCN (n=4) durante 24 horas con LPS y HS. Los niveles de VCAM-1 se midieron por IWB. Como control de carga se utilizó GAPDH. \*\*\* p < 0,001 vs control. Los resultados se expresan como promedio ± D.S.

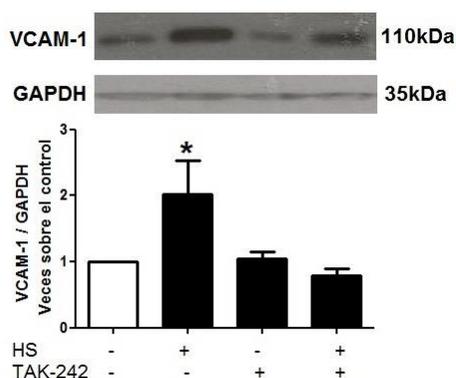


**Fig 10. Niveles proteicos de VCAM-1 en fibroblastos cardiacos adultos.** Se estimularon FCA (n=3) durante 24 horas con LPS (1 µg/mL) y HS (10 µg/mL). Los niveles de VCAM-1 se midieron por IWB. Como control de carga se utilizó GAPDH. \*p<0,05 vs control. Los resultados se expresan como promedio ± D.S

### 6.3.1 Participación de TLR4 en el aumento de los niveles proteicos de VCAM-1 inducida por HS en FCA.

De acuerdo a la literatura los receptores TLR4 tienen como principal ligando al LPS. Debido a la analogía en el efecto inducido al usar HS como estímulo, en lugar de LPS, es que quisimos evaluar si en el aumento de los niveles proteicos de VCAM-1 gatillada por HS participa este receptor. Para determinar dicha participación, las células se pretrataron por 30 min con TAK-242 (4  $\mu$ M), inhibidor del TLR4. Luego se estimularon con HS 10 ( $\mu$ g/mL) y mantuvieron en medio DMEM-F12 durante 24 horas para luego ser lisadas con tampón de lisis.

Los resultados de la figura 11 muestran que a las 24 horas de estimulación con HS 10  $\mu$ g/mL. El estímulo fue capaz de aumentar significativamente los niveles proteicos de VCAM-1 con respecto al control. El pretratamiento de FC con TAK-242 inhibió el efecto de HS, y mantuvo invariables los niveles de VCAM-1 (niveles similares a los del control). Además, TAK-242 por sí mismo tampoco modificó los niveles de VCAM-1.

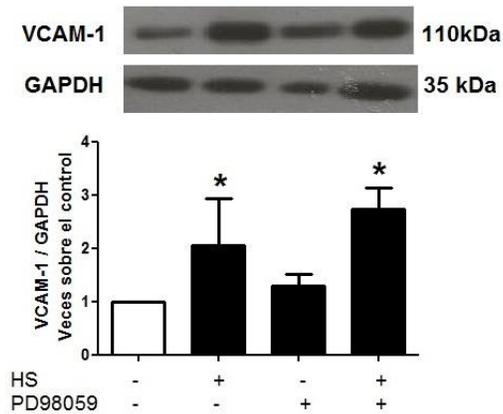


**Figura 11: Participación de TLR4 en la regulación de los niveles proteicos de VCAM-1 en FC adultos.** Los FCA fueron estimulados con HS (10  $\mu$ g/ml) durante 24 horas en presencia o ausencia de TAK-242 (10  $\mu$ g/ml). Se muestra una imagen representativa de la densitometría de VCAM-1 y cuantificación de la relación de VCAM-1/GAPDH normalizado como veces sobre el control. (n=3). \* $p$  0,05 vs control. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  D.S.

### **6.3.2 Participación de las vías ERK1/2, PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B en el aumento de los niveles proteicos de VCAM-1 inducida por HS en FCA.**

Luego de evaluar la participación del receptor TLR4 en los efectos producidos por HS sobre la proteína VCAM-1 respecto a sus niveles proteicos, se evaluó la participación de la vía ERK 1/2 al estimular los FC de ratas adultas con HS (10  $\mu$ g/mL). Para estudiar la participación de esta vía se utilizó el inhibidor químico PD98059; inhibidor de Erk. Con este inhibidor que se pretrataron las células por 30 minutos, antes de estimular con HS. Posteriormente se mantuvieron en medio DMEM-F12 durante 24 horas con/sin HS para finalmente lisarlas con tampón de lisis.

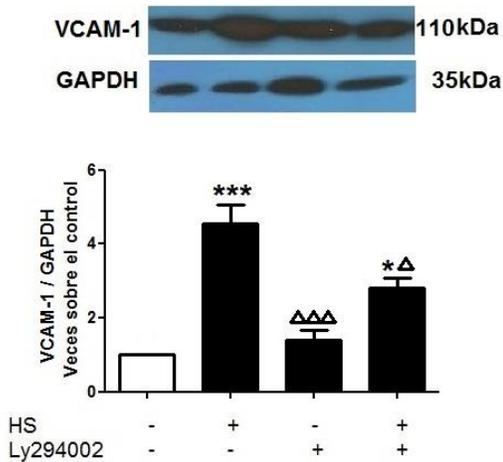
Los resultados de la figura 12 muestran que, mientras HS por sí solo aumenta aproximadamente al doble los niveles proteicos de VCAM-1 respecto del control. El inhibidor de la vía ERK 1/2, PD98059 (10  $\mu$ M) por sí mismo no tiene efecto sobre la cantidad de la proteína en cuestión. Sin embargo, al pretratar con PD98059 y posteriormente estimular con HS (presencia simultánea de ambos estímulos), no se revierte el efecto de LPS, mostrando un aumento significativo en el nivel proteico de VCAM-1. Esto sugiere que la vía Erk 1/2 no está involucrada en el aumento del nivel proteico de VCAM-1 inducido por HS.



**Figura 12: Participación de ERK 1/2 en la regulación de los niveles proteicos de VCAM-1 en FC adultos.** Los FCA se estimularon con HS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 horas en presencia o ausencia de PD98059. Imagen representativa de la densitometría de VCAM-1 y cuantificación de la relación de VCAM-1/GAPDH normalizado como veces sobre el control. (n=3). \*p< 0,05 vs control. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  D.S.

A continuación se evaluó también la participación de la vía PI3K/Akt sobre la variación en los niveles proteicos de VCAM-1 frente al mismo estímulo anterior (HS 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). En este caso se utilizó el inhibidor químico LY294002. Las células se pretrataron con LY294002 durante 30 minutos, previo al estímulo con HS y posteriormente se mantuvieron en medio DMEM-F12 durante 24 horas con/sin HS para finalmente lisarlas con tampón de lisis.

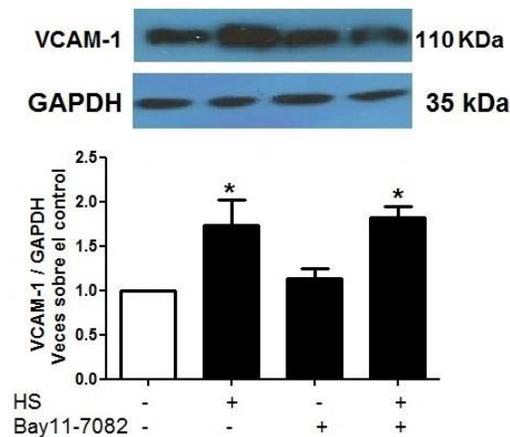
En la figura 13 se muestran los resultados de este ensayo. HS por sí solo aumentó aproximadamente cuatro veces el nivel de expresión de VCAM-1 respecto del control. LY294002 (1  $\mu\text{M}$ ) por sí mismo, no tuvo efecto sobre el nivel de proteínas de VCAM-1. El pretratamiento durante 30 minutos con LY294002, previo a la estimulación con HS, si produjo un aumento significativo del nivel de VCAM-1 respecto del control. Sin embargo, el pretratamiento con LY294002 previno el aumento en el nivel de VCAM-1 inducido por HS. Este resultado, aparentemente controversial, será analizado más adelante en la sección de discusión.



**Figura 13: Participación de PI3K/Akt en la regulación de los niveles proteicos de VCAM-1 en FC adultos.** Los FCA se estimularon con HS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 horas en presencia o ausencia de Ly294002. Imagen representativa de la densitometría de VCAM-1 y cuantificación de la relación de VCAM-1/GAPDH normalizado como veces sobre el control. (n=3). \* $p < 0,05$  vs control; \*\*\* $p < 0,001$  vs control;  $\Delta p < 0,05$  vs [HS (+), Ly294002 (-)];  $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$  vs [HS (+), Ly294002 (-)]. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  D.S.

Finalmente, se estudió la vía NF- $\kappa$ B a fin de observar y posteriormente analizar qué efectos se ejerce sobre ella en cuanto a los niveles de la proteína de adhesión VCAM-1. Tal como en los casos anteriores, se estimularon las células de FCA con HS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); en presencia o ausencia del inhibidor de NF- $\kappa$ B, Bay 11-7082. El pretratamiento fue de 30 minutos, tiempo después del cual se agregó el estímulo HS y se mantuvieron en medio DMEM-F12 durante 24 horas con/sin HS para finalmente lissarlas con tampón de lisis.

En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos. HS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) aumentó los niveles de VCAM-1 en aproximadamente dos veces respecto al control sin estímulo. Al tratar sólo con el inhibidor Bay 11-7082, el nivel proteico de VCAM-1 se mantuvo en valores comparables con los del control. Sin embargo, el pretratamiento con Bay-117082 no previno el aumento de VCAM-1 inducido por HS. Este resultado sugiere que el NF- $\kappa$ B no estaría involucrado en el aumento de los niveles de VCAM-1 inducido por HS.



**Figura 14: Participación de NF- $\kappa$ B en la regulación de los niveles proteicos de VCAM-1 en FC adultos.** Los FCA se estimularon con HS (10  $\mu$ g/mL) durante 24 horas en presencia o ausencia de Bay 11-7082. Imagen representativa de la densitometría de VCAM-1 y cuantificación de la relación de VCAM-1/GAPDH normalizado como veces sobre el control. (n=4). \*p<0,05. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  D.S.

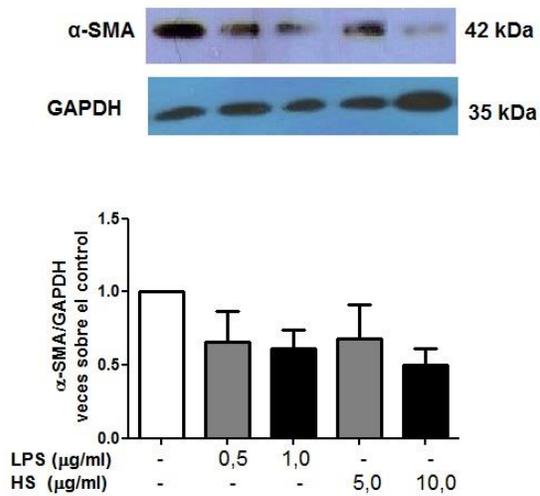
#### 6.4 Evaluación del efecto de LPS y HS sobre los niveles proteicos de $\alpha$ -SMA en FC.

Para evaluar el comportamiento de  $\alpha$ -SMA determinamos el efecto que ejercen tanto LPS y HS sobre sus niveles en FCN (Fig. 15). Las células se estimularon con LPS (0,5-1  $\mu$ g/mL) y HS (5-10  $\mu$ g/mL) y se mantuvieron en medio DMEM-F12 durante 72 horas. Luego las placas se rasparon con tampón de lisis y el nivel de  $\alpha$ -SMA se determinó mediante Western blot. En el panel superior se observa una imagen representativa del Western blot de  $\alpha$ -SMA; mientras que en el panel inferior se muestra el análisis gráfico del mismo. Los resultados muestran que a las 72 horas, el estímulo de LPS fue capaz de disminuir en aproximadamente 0,4 a 0,5 veces los niveles de  $\alpha$ -SMA respecto del control. Para el caso de los estímulos con HS, el descenso en los niveles de  $\alpha$ -SMA varió de entre 0,3 a 0,5 veces respecto del control de acuerdo a cada concentración empleada de HS.

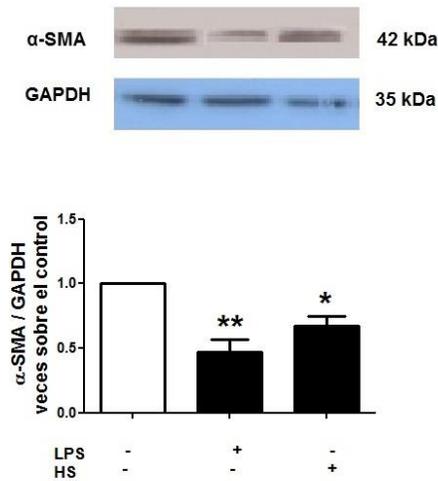
Por otro lado, se evaluó el efecto de LPS 1 ( $\mu$ g/mL) y HS 10 ( $\mu$ g/mL) sobre los niveles

de  $\alpha$ -SMA en FCA (Fig. 16). En el panel superior se observa una imagen representativa del Western blot de  $\alpha$ -SMA para dicho ensayo; mientras que en el inferior se presenta su análisis gráfico. Los resultados muestran que tanto LPS como HS indujeron un descenso significativo en el nivel proteico de la proteína  $\alpha$ -SMA en FC de ratas adultas, siendo tal variación mayor para el caso de LPS que para HS.

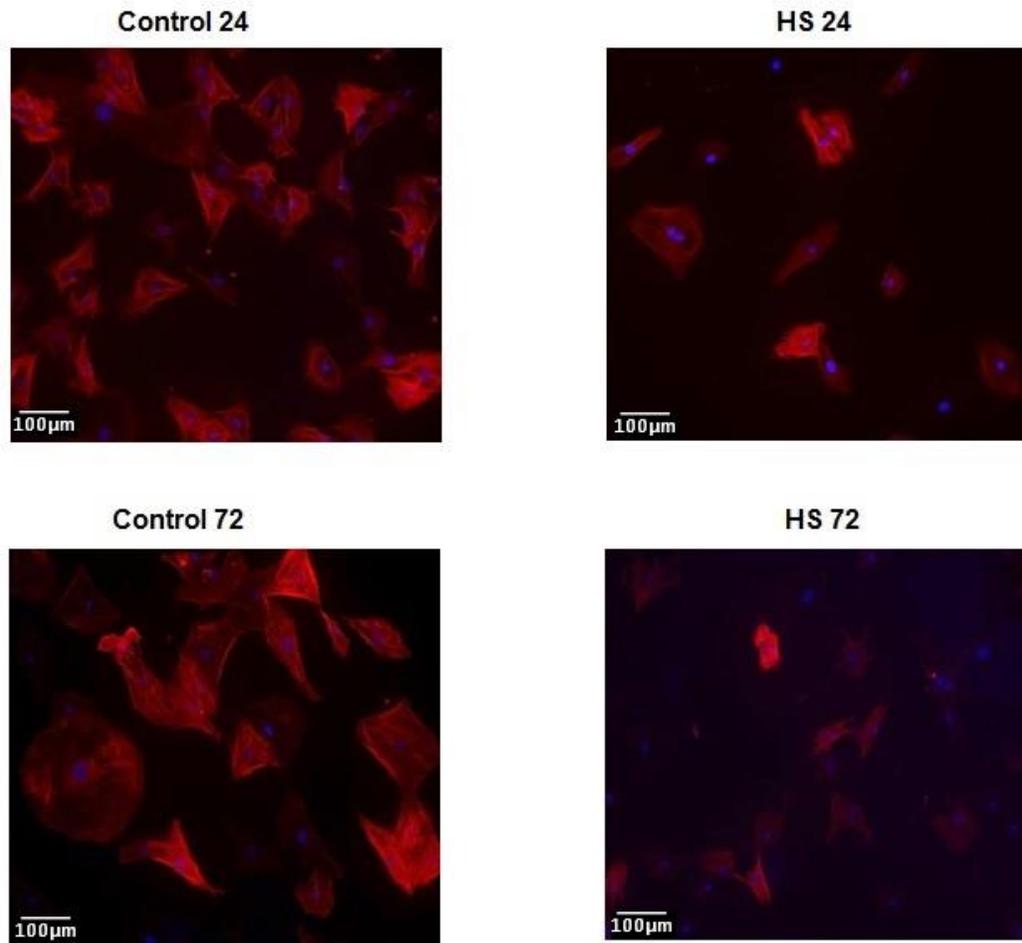
Finalmente se observó mediante inmuno fluorescencia el mismo efecto presentado por IWB. En este caso se observó que HS disminuyó el nivel e inhibió el ensamblaje de  $\alpha$ -SMA en FC (Fig. 17). Este experimento se desarrolló a dos tiempos distintos, 24 y 72 horas. Se observó una disminución en el tamaño y número de células respecto a sus respectivos controles.



**Fig 15. Niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA en fibroblastos cardiacos neonatos.** Se estimularon FCN (n=3) durante 72 horas con LPS y HS. Los niveles de pro-IL-1 $\beta$  se midieron por IWB. Como control de carga se utilizó GAPDH. El análisis estadístico mediante ANOVA y la prueba Tuckey para n=3 no arrojó diferencias significativas.



**Fig 16. Niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA en fibroblastos cardiacos adultos.** Se estimularon FCA (n=4) durante 72 horas con LPS (1 µg/mL) y HS (10 µg/mL). Los niveles de  $\alpha$ -SMA se midieron por IWB. Como control de carga se utilizó GAPDH. \*p<0,05 vs control \*\*p<0,01 vs control. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  D.S.

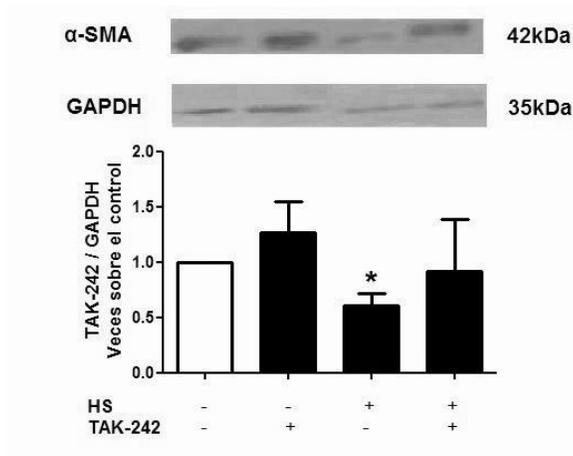


**Fig 17. HS inhibe los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA en fibroblastos cardiacos adultos.** Los FCA se estimularon con HS (10  $\mu$ g/mL) durante 24 y 72 horas. La expresi3n de  $\alpha$ -SMA se observ3 por inmuno fluorescencia. Im3genes obtenidas con microscopio Spinning disc, aumento 10x.

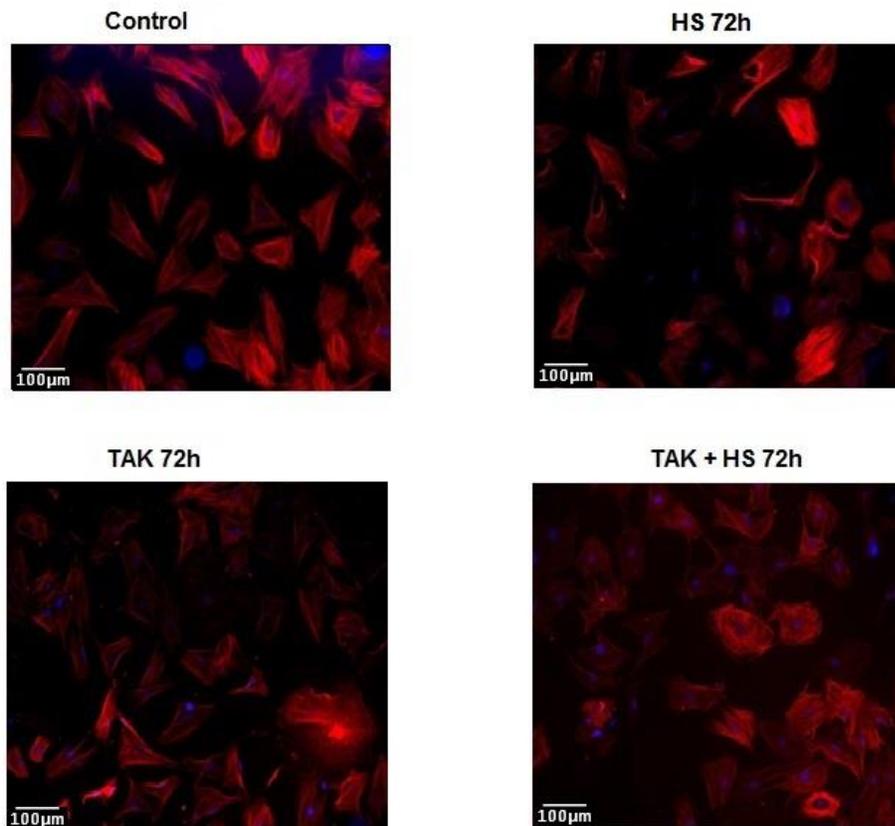
#### **6.4.1 Participación de TLR4 en la disminución de los niveles proteicos de $\alpha$ -SMA inducida por HS en FCA.**

Debido a que HS es capaz de disminuir los niveles de  $\alpha$ -SMA (marcador de diferenciación a miofibroblasto), se sugiere que HS podría estar involucrada en eventos pro fibróticos. A continuación se pretende ahondar en los mecanismos que regulan la expresión de dicha proteína, específicamente por el receptor TLR4. Investigaciones de nuestro laboratorio han relacionado los efectos de LPS sobre este receptor, en cuanto a la expresión de  $\alpha$ -SMA. Sin embargo, en esta ocasión quisimos evaluar los cambios en la expresión de dicha proteína gatillada por HS. Para determinar tal participación, las células se pretrataron por 30 min con TAK-242 (4  $\mu$ M) y luego se estimularon con HS (10  $\mu$ g/mL) y se mantuvieron en medio DMEM-F12 durante 72 horas para luego ser lisadas con tampón de lisis.

Los resultados de la figura 18 muestran que a las 72 horas de estimulación con HS 10  $\mu$ g/mL se produjo una disminución en los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA con respecto al control. Por otro lado, al estimular sólo con TAK-242 no se modificaron los niveles de  $\alpha$ -SMA. En tanto el pretratamiento de FC con TAK-242 inhibió el efecto de HS, manteniendo los niveles de  $\alpha$ -SMA similares a los del control. Estos resultados se correlacionaron de manera cualitativa mediante la técnica de inmunofluorescencia, donde se observó (figura 19) que HS redujo el nivel de  $\alpha$ -SMA así como su ensamblaje. No obstante, en las células tratadas con TAK-242 se observó una inhibición de los efectos inducidos por HS. En esas células se encontraron FC de mayor tamaño y con fibras de estrés más estructuradas respecto de las células controles.



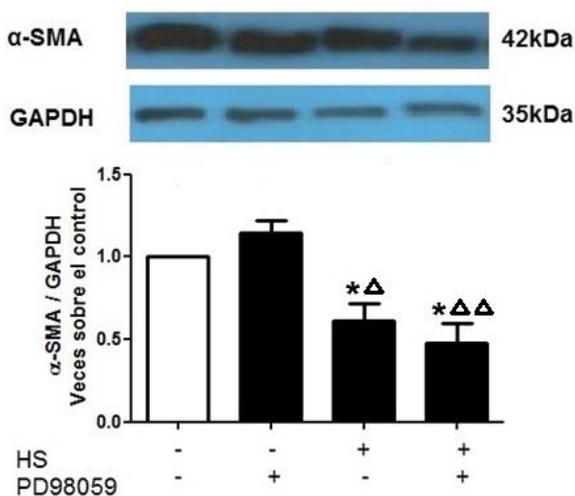
**Figura 18: Participación de TLR4 en la regulación de los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA en FC adultos.** Los FCA se estimularon con HS (10  $\mu$ g/ml) durante 72 horas en presencia o ausencia de TAK-242 (10  $\mu$ g/ml). Se muestra una imagen representativa de la densitometría de  $\alpha$ -SMA y cuantificación de la relación de  $\alpha$ -SMA/GAPDH normalizado como veces sobre el control. \* $p < 0,05$  vs control (n=3). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  D.S.



**Fig 19. Participación de TLR4 en la regulación de los niveles de  $\alpha$ -SMA en fibroblastos cardiacos adultos.** Los FCA se estimularon con HS (10  $\mu$ g/ml) durante 24 y 72 horas en presencia o ausencia de TAK-242 (4  $\mu$ M). La expresión de  $\alpha$ -SMA se observó por inmuno fluorescencia. Imágenes obtenidas con microscopio Spinning disc, aumento 10x.

#### 6.4.2 Participación de las vías ERK1/2, PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B en la disminución de los niveles proteicos de $\alpha$ -SMA inducida por HS en FCA.

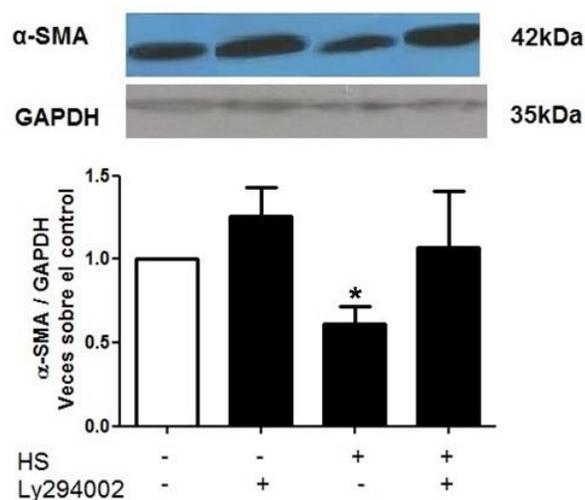
Continuando con el análisis de las vías de señalización del receptor TLR4, en esta ocasión estudiamos cómo podrían contribuir cada una de ellas en la disminución de los niveles de la proteína  $\alpha$ -SMA al estimular con HS. En primer lugar, nos adentramos en la vía ERK 1/2. Los FCA se estimularon con HS (10  $\mu$ g/mL) y se utilizó el inhibidor químico PD98059. Las células se pretrataron con PD98059 por 30 minutos, antes de estimular con HS. Posteriormente se mantuvieron en medio DMEM-F12 durante 72 horas con/sin HS, para finalmente lisarlas con tampón de lisis. Los resultados de la figura 20 muestran que al agregar sólo el inhibidor de la vía ERK 1/2, (PD98059 10  $\mu$ M), no varió el nivel proteico de  $\alpha$ -SMA. Por otro lado, el tratamiento con HS disminuyó los niveles de  $\alpha$ -SMA. Sin embargo, el pretratamiento con PD98059, redujo aún más los niveles de  $\alpha$ -SMA, inducido por HS, respecto al tratado sólo con HS.



**Figura 20: Participación de ERK en la regulación de los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA en FC adultos.** Los FCA se estimularon con HS (10  $\mu$ g/mL) durante 72 horas en presencia o ausencia de PD98059. Imagen representativa de la densitometría de  $\alpha$ -SMA y cuantificación de la relación de  $\alpha$ -SMA/GAPDH normalizado como veces sobre el control. \* $p < 0,05$  vs control;  $\Delta p < 0,05$  vs [HS (-), PD98058 (+)];  $\Delta\Delta p < 0,01$  vs [HS (-), PD98058 (+)]. (n=4). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  D.S.

En tercer lugar, dentro del estudio de las vías involucradas en la regulación de  $\alpha$ -SMA frente a HS, se evaluó la vía PI3K/Akt. Para ello, las células se pretrataron con LY294002 por 30 minutos, previo al estímulo con HS. Luego, las células se mantuvieron en medio DMEM-F12 durante 72 horas con/sin HS para finalmente lisarlas con tampón de lisis.

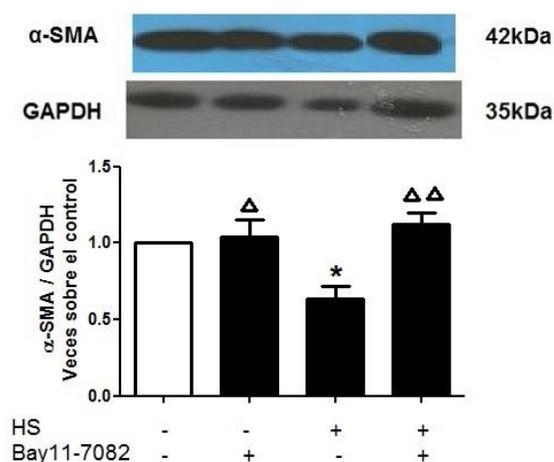
Los resultados de este experimento se muestran en la figura 21. HS indujo una disminución en el nivel proteico de  $\alpha$ -SMA respecto del control. Tanto LY294002 por sí sólo como el pretratamiento con LY294002 seguido por HS mantuvieron niveles similares al control. Estos resultados sugieren que la vía PI3K/Akt estaría involucrada en la regulación de los niveles de  $\alpha$ -SMA controlada por HS.



**Figura 21: Participación de PI3K/Akt en la regulación de los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA en FC adultos.** Los FCA se estimularon con HS (10  $\mu$ g/ml) durante 72 horas en presencia o ausencia de LY294002. Imagen representativa de la densitometría de  $\alpha$ -SMA y cuantificación de la relación de  $\alpha$ -SMA/GAPDH y normalización de veces sobre el control. \* $p < 0,05$  vs control (n=4). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  D.S.

Finalmente, se estudió la vía NF- $\kappa$ B a fin de determinar si este factor transcripcional participa en la regulación de los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA inducido por HS. Tal como en los casos anteriores, los FCA se estimularon con HS (10  $\mu$ g/mL), en presencia o ausencia del inhibidor Bay 11-7082. Las células se pretrataron con Bay 11-7082 por 30 minutos y después se agregó el estímulo HS. Las células se mantuvieron en medio DMEM-F12 durante 72 horas con/sin HS para finalmente lisarlas con tampón de lisis.

En la figura 22 se muestran los resultados obtenidos. Se observó que la estimulación con HS (10  $\mu$ g/mL) por sí sólo, disminuyó significativamente los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA respecto al control sin estímulo. En tanto, al tratar sólo con el inhibidor Bay 11-7082, el nivel proteico se mantuvo en valores comparables con los del control. Sin embargo, la preincubación con Bay 11-7082 y posterior estímulo con HS previno la disminución en los niveles de  $\alpha$ -SMA inducido por HS. Esto sugiere que la vía NF- $\kappa$ B participa en la señalización responsable de regular los niveles de  $\alpha$ -SMA al estimular con HS.



**Figura 22: Participación de NF- $\kappa$ B en la regulación de los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA en FC adultos.** Los FCA se estimularon con HS (10  $\mu$ g/ml) durante 72 horas en presencia o ausencia de BAY 11-7082. Imagen representativa de la densitometría de  $\alpha$ -SMA y cuantificación de la relación de  $\alpha$ -SMA/GAPDH normalizado como veces sobre el control. \* $p$ <0,05 vs control;  $\Delta$  $p$ <0,05 vs [HS (+), Bay11-7082 (-)];  $\Delta\Delta$  $p$ <0,01 vs [HS (+), Bay11-7082 (-)] (n=4). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  D.S.

## 7. DISCUSIÓN

Los principales hallazgos encontrados en este trabajo dicen relación con que HS actúa de manera análoga a LPS, a través de TLR4. Ambos estímulos producen los mismos efectos tanto en FCN como en FCA, respondiendo los primeros con aumentos o disminuciones de mayor magnitud que los últimos. Además, HS, a través de TLR4, induce un aumento en los niveles proteicos de pro IL-1 $\beta$  en FC, promueve el aumento de ICAM-1 y VCAM-1, participando para esto último la vía PI3K/Akt y finalmente, HS reduce los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA en FC vía TLR4 activando las vías PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B.

### 7.1 Activación de TLR4 por HS y LPS.

Como se ha mencionado anteriormente, la familia de receptores de tipo Toll, responde a una variedad de estímulos con características comunes, más que a un ligando único y particular. Por tal motivo, en el actual trabajo se ha tomado como referencia el efecto ejercido por LPS sobre el receptor TLR4 (descrito en trabajos previos de nuestro laboratorio),<sup>18</sup> a fin de testear si HS es capaz de producir efectos similares sobre las proteínas involucradas en la reparación del tejido cardíaco, tras un evento dañino. Existe evidencia que prueba que HS es capaz de activar el receptor TLR4 en células dendríticas.<sup>10,23</sup>

Por otro lado, debe tenerse presente que, mientras LPS es de origen bacteriano, HS es de origen endógeno, originado a partir de la MEC, desde donde se fragmenta y se secreta en su forma soluble. Esto tiene lugar en diversos tejidos del organismo.<sup>22</sup> De esta manera, se clasifica al LPS como un PAMP de los TLRs y, en particular del TLR4, considerándolo como un “patógeno”.<sup>23</sup> Por otro lado, HS cae en la categoría de DAMP del TLR4 y es de interés su estudio ya que se ha reportado su capacidad de activar el TLR4 en modelos distintos al

corazón.<sup>10</sup> En esta diferencia radica el interés de estudiar HS como agonista de TLR4, ya que un componente propio del organismo podría eventualmente usarse como molécula reparadora de daño del tejido cardíaco, por sobre LPS u otra molécula externa al organismo. Además, la presente investigación puede constituir un referente para continuar con el estudio de los efectos que produce este estímulo sobre el receptor, pensando en que sus efectos bien pudiesen emular lo que ocurre frente a un daño cardíaco, por ejemplo en el infarto al miocardio.

Analizando los resultados expuestos, el hecho de haber expuesto FCN y FCA a diferentes concentraciones de LPS o HS, nos permite establecer por un lado que; a las menores dosis de HS y LPS, el cambio en los niveles proteicos de las diferentes proteínas medidas (pro IL-1 $\beta$ , ICAM-1, VCAM-1 y  $\alpha$ -SMA) es de menor magnitud que si se utilizan las concentraciones más altas de estos agonistas del receptor TLR4. Por otro lado, ante ambos estímulos, los FC son capaces de responder de forma similar en cuanto al efecto neto que producen en el aumento de los niveles las proteínas estudiadas. Así, para el caso de pro IL-1 $\beta$ , sus niveles proteicos aumentaron al estimular las células con HS. Este mismo efecto se logró también al ser tratadas con LPS. Este aumento se repite con las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 frente a ambos estímulos. Para el caso de  $\alpha$ -SMA, tanto HS como LPS producen una disminución en los niveles de ambas proteínas. Todas estas variaciones son significativas respecto de sus respectivos controles, acorde a las gráficas ya expuestas en el apartado correspondiente.

A pesar de que tanto HS como LPS producen efectos netos similares en las proteínas señaladas, existe otra diferencia notoria a lo largo de los experimentos mostrados, relacionada con el grado de madurez (desarrollo) de las células cardíacas utilizadas. Así, para el caso de los FCN, estos siempre respondieron con variaciones mayores a las obtenidas con FCA, para cualquiera de los dos estímulos usados. Esta respuesta diferencial, en cuanto a magnitud, pero

igual en cuanto a efecto neto sobre las proteínas medidas, se correlaciona con estudios previos que señalan diferencias no sólo en magnitud sino que también en efecto final. Particularmente, Díaz-Araya G. *et al.*, describieron en 2003 que el factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1, insulin-like growth factor-1) estimula la expresión de colágeno en FC fetales y neonatos, no así en FCA. Frente al mismo estímulo, existe aumento en la adhesión de FC a componentes de la MEC, en modelo fetal y adulto, no observando dicho cambio al usar FCN.<sup>34</sup> Existen además, otros hallazgos como los de Cullen *et al.*, (1997), donde ocurre algo similar al encontrar que los fibroblastos, en este caso obtenidos de la dermis, a menor edad o estado de desarrollo responden con variaciones más altas que las células de edad más avanzada, frente a un mismo estímulo.<sup>35</sup>

En base a los antecedentes se plantea que, dependiendo del grado de madurez de los FC, así como de la exposición a diversos tipos de daño que presenten, estos responden de forma diferente frente a un mismo estímulo o bien de manera similar. Esta diferencia, aparentemente contradictoria, se podría explicar debido a que al menor daño acumulativo que presentan las células (en este caso los FCN) estos muestran un mejor desempeño al activar vías de reparación. Esto incluye el reclutamiento de células del sistema inmune, la secreción de citoquinas pro inflamatorias y la protección al corazón de la fibrosis (disminución de  $\alpha$ -SMA), todo de manera más eficiente que los FCA. Esto sería una ventaja a la utilización del modelo neonato pues, por un lado, presentan una respuesta más marcada y eficiente y, por otro lado, desde el punto de vista práctico la obtención de tales células, es más rápida y fácil en comparación con el modelo adulto. La obtención de FCA requiere más tiempo antes de poder extraer el corazón de las ratas y generalmente el rendimiento del proceso en cuanto a número de células obtenidas fue menor. Sin embargo, los resultados son más reproducibles en modelo adulto considerando que las patologías cardíacas ocurren en su mayoría en edades avanzadas

en el humano.

Finalmente, cabe señalar que la diferencia en intensidad de la respuesta obtenida fue, en la mayoría de los casos, más significativa frente al estímulo LPS que HS. Esta diferencia no es comparable directamente ya que las concentraciones usadas de ambos estímulos difieren en a lo menos 10 veces una respecto de otra. Las dosis usadas se obtuvieron de acuerdo a datos encontrados en la literatura, para el caso de HS.<sup>10</sup> Las dosis usadas de LPS se obtuvieron acorde al protocolo desarrollado en el laboratorio, pues el estímulo se utilizó en estudios previos dentro del grupo de trabajo.<sup>18</sup> De todas maneras, se podría establecer que LPS es más eficaz y más potente que HS ya que los resultados muestran que el primero siempre alcanza variaciones mayores que el segundo (aumento o disminución) y además esto se consigue con una dosis mucho más baja. La importancia de ambos estímulos es que, para el caso de estimular con HS se obtienen respuestas que asemejan un infarto al miocardio, mientras que el uso de LPS imitaría los efectos producidos por una endotoxemia. Cabe destacar que, a la fecha, no existía ningún trabajo que estudiara en forma conjunta ambos estímulos y sus efectos sobre FC, siendo este el primer hallazgo al respecto.

## **7.2 HS, a través de TLR4, promueve el aumento de pro IL-1 $\beta$ en FC**

Según antecedentes de nuestro laboratorio<sup>18</sup> se encontró que los mayores aumentos en la expresión de pro IL-1 $\beta$  se obtuvieron a las 8 h luego de haber puesto el estímulo (LPS en ese caso). Por esta razón, se evaluó el efecto de HS sobre la expresión de pro IL-1 $\beta$ , también luego de 8h de haber estimulado las células. Los resultados fueron muy similares, sin encontrar diferencias significativas en el aumento producido por HS respecto de LPS.

La importancia del estudio de los niveles de expresión de la citoquina pro IL-1 $\beta$ , a través

de TLR4, está relacionada directamente con los procesos inflamatorios que tienen lugar en el corazón luego de un evento injurioso, como es un infarto al miocardio. La inflamación es un proceso fisiopatológico desencadenado por estímulos internos, tales como citoquinas y factores de crecimiento; o externos como algún daño mecánico o elemento de origen bacteriano.<sup>40</sup> Cualquiera sea el tipo de estímulo, el sistema inmune innato, mediante su red de receptores, es capaz de sensor las fracciones conservadas de agente dañinos que activan la maquinaria intracelular responsable de los numerosos eventos bioquímicos que llevarán a la reparación del tejido.<sup>40</sup> Como se ha mencionado antes, para el caso de los TLRs, estos patrones o estímulos se denominan PAMPs cuando son de origen externo o DAMPs cuando provienen del mismo organismo.<sup>17</sup> Por ello que, en base a investigaciones paralelas desarrolladas en el laboratorio, se ha estado estudiado el rol de LPS (un PAMP de TLR4) sobre el nivel de expresión de pro IL-1 $\beta$ , relacionado con la activación del complejo inflamasoma. Este complejo, está compuesto por las proteínas NLRP3, ASC y caspasa-1 y su función es transformar pro IL-1 $\beta$  y pro IL-18 a sus formas activas IL-1 $\beta$  e IL-18.<sup>39</sup> En el corazón, la activación del inflamasoma ocurre gracias a los FC quienes expresan las moléculas necesarias para la activación del complejo.<sup>36</sup> El inflamasoma se activa por estímulos que desencadenan la transcripción de pro IL-1 $\beta$ , pro IL-18 y NLRP3, seguido de otro estímulo capaz de activar a los receptores de NLRP3 a fin de generar el ensamblaje y consecuente activación de este complejo.<sup>37</sup> Se ha demostrado además, que LPS y fibronectina-EDA, vía TLR4, forman parte de la primeras señales necesarias que aumentan los niveles de pro IL-1 $\beta$  como etapa crucial en la activación del inflamasoma.<sup>40</sup> Así es que se ha querido evaluar qué efectos ejerce HS en cuanto a la expresión de esta citoquina en FC, para continuar con la respuesta de inflamación del tejido.

En particular nuestros resultados arrojan que en FCN la expresión de pro IL-1 $\beta$  aumentó 2 veces al usar la menor concentración de LPS (0,5  $\mu$ g/mL) y 3 veces con la dosis mayor (1

µg/mL); ambos valores respecto de control. En el caso de HS, este indujo un aumento de 3 veces respecto del control, en los niveles de expresión de pro IL-1β, a ambas concentraciones testeadas (5 y 10 µg/mL). Por otro lado, para el caso de los FCA se utilizó sólo la mayor concentración de ambos estímulos, ya que en un principio se evaluó en forma paralela a la expresión de pro IL-1β, las proteínas ICAM-1, VCAM-1 y α-SMA, obteniendo para todos los casos que, tanto la mayor dosis de HS, como la mayor de LPS mostraron mejores resultados. Las demás proteínas se discutirán más adelante.

De esta manera, HS estaría ejerciendo un rol análogo a LPS sobre la expresión de pro IL-1β, tanto en FCN como en FCA, a través del receptor TLR4. Además de la presente investigación, existe un estudio reciente que demuestra que HS es capaz de inducir un aumento en los niveles de expresión de esta citoquina, mediante el TLR4.<sup>38</sup> Esto reafirmaría la idea propuesta que, tal como lo hace LPS, HS pueda mediar la respuesta inflamatoria del corazón, mediante los FC. Nuestros resultados recalcarían la importancia que este ligando endógeno del receptor esté involucrado en activación de la maquinaria necesaria para recuperar la homeostasis del tejido cardíaco. También es importante destacar que la sobre activación de mecanismos desencadenados por estímulos internos (como podría ser HS), responsables de la inflamación participan en el inicio y desarrollo de variadas enfermedades que deterioran el funcionamiento cardíaco y por consiguiente, de otros sistemas del cuerpo humano. Tanto la respuesta inflamatoria como los eventos que llevan a la cicatrización del corazón, comparten características comunes con los procesos de reparación de diversos tejidos del organismo, como pulmones, hígado, piel y riñón.<sup>41</sup> En cada uno de ellos se desencadenan secuencialmente los eventos de hemostasis, reclutamiento de células del sistema inmune-inflamatorio, activación de macrófagos, activación de fibroblastos y remodelamiento de cicatriz granulomatosa.<sup>41</sup> Estos procesos se llevan a cabo gracias a la

liberación y síntesis constante de citoquinas y factores de crecimiento pro fibróticos que, de acuerdo a la fisiología del sistema, participan en la respuesta inflamatoria.<sup>39,40</sup> Por lo tanto, HS podría actuar como un elemento mediador de la inflamación siempre que sea de manera medida, es decir, a una dosis específica y por un tiempo determinado, a fin de que el proceso inflamatorio sólo sirva para reparación del tejido y no exponerlo en forma constante ni dosis elevadas que podrían ser dañinas sobre estimulando la respuesta inflamatoria y desencadenando procesos patológicos.

### **7.3 HS promueve el aumento de los niveles proteicos de ICAM-1 y VCAM-1 en FC, vía TLR4. Participación de la vía PI3K/Akt en el aumento de VCAM-1**

Se midieron ambas proteínas a un tiempo de 24 h luego de agregar los estímulos, en base a investigaciones anteriores del laboratorio donde se encontraron los mayores aumentos a dicho tiempo.<sup>41</sup> Luego de medir la expresión de ambas proteínas, tanto con HS como con LPS en FCN, se decidió evaluar en profundidad la expresión de VCAM-1 a través de TLR4. VCAM-1 es relevante en la regulación de la adhesión vascular por sobre la intercelular (reflejada por la variación de ICAM-1). Además, porque se ha demostrado que la expresión de VCAM-1 tiene efectos opuestos a los efectos ejercidos por TGF- $\beta$ 1 encunto a le transición epitelial mesenquimal (otro mecanismo de origen de los miofibroblastos).<sup>42</sup>

El análisis de las vías implicadas en la señalización se desarrolló en FCA, considerando que la mayor parte de las patologías donde estas proteínas están involucradas ocurre a edades avanzadas en el ser humano. Además, existe evidencia científica que demuestra el aumento de ICAM-1 en FCA luego de un evento dañino para el tejido.<sup>43</sup> Para evaluar las vías se utilizó en primer lugar TAK-242, un inhibidor selectivo de la señalización del dominio intracelular del

TLR4 que a su vez inhibe la activación de NF- $\kappa$ B y la activación de NF- $\kappa$ B independiente de ligando, resultando en una sobre expresión de TLR4.<sup>44</sup> Luego de emplear este inhibidor, se observó que la señalización gatillada por HS es completamente inhibida con TAK-242. Este resultado sugiere que la activación de esta respuesta es mediada exclusivamente por TLR4, descartándose que el aumento en la expresión de VCAM-1 sea mediado por otro receptor, tal como se ha descrito al usar LPS como ligando del receptor.<sup>42</sup>

Si bien no existen antecedentes en la literatura donde se evalúen los niveles de estas proteínas en forma paralela para FCN y FCA, se ha dilucidado que, a nivel renal, existe un aumento en la expresión de VCAM-1 inducida por LPS, a través de TLR4.<sup>45</sup> En tal investigación se atribuye el aumento de los niveles proteicos de VCAM-1 a modificaciones en parámetros oxidativos dentro de la señalización de TLR4 y se comprueba que participa activamente la vía p38 y JNK1/2. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la vía PI3K/Akt estaría involucrada en mediar el aumento de los niveles proteicos de VCAM-1. El pretratamiento con el inhibidor LY294002, aumentó los niveles de VCAM-1, respecto del control. Esta variación fue significativamente menor que el aumento producido por HS 10  $\mu$ g/mL por sí sólo. Tal diferencia puede explicarse por múltiples razones. La primera de ellas es que el estudio citado se desarrolló en un modelo de células renales humanas, mientras que nuestro trabajo fue en FC de rata. Por otro lado, los parámetros medidos en dicha investigación, en particular el nivel oxidativo de las células, podrían ser sustancialmente distintos tanto por la diferencia de modelo celular como el modelo animal usado. Además, tal estudio no utilizó inhibidores específicos de cada vía, como PD9805, LY294002 ni BAY11-7082, midiéndose a través de parámetros “indirectos” la participación de ellas. Finalmente, nuestro análisis no incluyó la evaluación de las vías MAPK p38 ni JNK1/2 si estudiadas en dicho trabajo.<sup>48</sup> Debido a esto sería interesante medir el comportamiento de dichas vías en cuanto a los niveles de expresión de VCAM-1 en

futuras investigaciones de nuestro laboratorio y completar el trabajo con ICAM-1.

Existe otro antecedente que muestra la participación de la vía NF- $\kappa$ B, en el aumento de VCAM-1 a través de TLR4 en células endoteliales de venas umbilicales humanas, pero utilizando oxLDL como ligando del receptor.<sup>49</sup> Este estudio presenta las mismas limitaciones y diferencias que el estudio anterior, donde tampoco se midió la vía ICAM-1. Es por eso que ese trabajo tampoco es completamente comparable con nuestros resultados.<sup>46</sup> Finalmente, investigaciones paralelas, han demostrado que VCAM-1 aumenta su expresión en células troncales cardíacas luego de estimular con VEGF-1, no observándose cambios respecto a la expresión de ICAM-1.<sup>47</sup> Este antecedente permite corroborar la expresión de VCAM-1 en células cardíacas luego de un infarto al miocardio. Considerando que VEGF-1 es un factor de crecimiento vascular es que se relaciona directamente con VCAM-1 y no con ICAM-1.<sup>50</sup> Sin embargo, como ligando de TLR4, el LPS ha demostrado mayores efectos en este sentido. Guijarro-Muñoz I. *et al.* (2014), comprobaron que este ligando aumenta efectivamente los niveles de expresión tanto de ICAM-1 como de VCAM-1 vía TLR4.<sup>48</sup> Ellos atribuyeron este efecto a la vía NF- $\kappa$ B. Aún así, lo novedoso de nuestro trabajo es la utilización de HS y cómo este puede activar el TLR4 produciendo efectos similares a los descritos para LPS.

Es importante resaltar que con estos resultados comprobamos el efecto que produce HS en cuanto al aumento de ICAM-1 y VCAM-1. Nuestros resultados mostraron que el efecto de HS es análogo al efecto inducido por LPS en FC, pero de menor magnitud. Esto sugiere que la degradación constante de pequeñas porciones de MEC, que liberan HS, podría mantener activadas las vías de inflamación/adhesión en el corazón, en forma eficiente pero de una manera subclínica sin provocar necesariamente procesos patológicos, agudos. Sin embargo, a largo plazo y en forma crónica podrían ser deletéreos y causante de varias patologías cardíacas.

#### **7.4 HS disminuye los niveles proteicos de $\alpha$ -SMA en FC, a través de TLR4.**

##### **Activación de las vías PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B.**

Resultados recientes de nuestro laboratorio comprobaron la disminución tiempo dependiente de los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA en FCA, vía TLR4 al estimular con LPS.<sup>34</sup> Dado la importancia que tiene el estudio de HS en esta memoria de título, se evaluó el comportamiento de este respecto a los datos mencionados. Sin embargo, no existen antecedentes que relacionen el nivel proteico de  $\alpha$ -SMA inducido por HS en FC. Por ello se evaluó, en primer lugar, que ocurre con los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA al estimular con HS. Se encontró que se produce el mismo efecto que al estimular los FC con LPS. A continuación, se evaluó la participación del receptor TLR4 en la expresión de esta proteína mediante HS, utilizando para ello el inhibidor específico de TLR4, TAK 242. Al ser agregado de forma previa a HS (pre tratamiento), no fue capaz de variar los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA manteniendo niveles similares al control. Este resultado indica que la disminución en los niveles de la proteína es mediada por el receptor TLR4.

En base a nuestros resultados, se sugiere que al igual que LPS, HS sería capaz de inhibir la diferenciación del FC al fenotipo MFC. Esto estaría de acuerdo con investigaciones que demuestran la inhibición transcripcional en la producción de  $\alpha$ -SMA gatillada por endotelina-1 y TGF- $\beta$ ,<sup>31</sup> donde la expresión de  $\alpha$ -SMA estaría regulada por cajas reguladoras de elementos (CArG) activadas por el factor de respuesta a suero(SRF) y por elementos de control de TGF- $\beta$  (TCE). Se debe considerar que TGF- $\beta$ 1 es el principal participante en el proceso de diferenciación de FC a MFC, que tiene lugar luego de procesos de daño sobre el corazón, generando una respuesta pro fibrótica.<sup>52</sup> En este sentido, se cree que LPS podría inhibir la secreción autocrina de TGF- $\beta$ 1, disminuyendo conjuntamente los niveles de  $\alpha$ -SMA, impidiendo la diferenciación a MFC.<sup>52</sup> Pese a ello, en el presente trabajo no se evaluó el efecto

de TGF- $\beta$ 1 en conjunto con HS, quedando como un trabajo a realizar a fin de comprobar si la degradación constante de la MEC y la consiguiente liberación de HS en pequeñas porciones, podría tener este efecto pro fibrótico encontrado para el LPS, mediante TLR4.

En cuanto a las vías de señalización, para evaluar la vía PI3K/Akt se utilizó el inhibidor sintético de PI3K (LY294002). Nuestros resultados se condicen con los datos anteriores<sup>49</sup> y con estudios que indican que Akt media la síntesis de  $\alpha$ -SMA, a través de factores de transcripción de genes de miocardina y SRF en fibroblastos embrionarios de rata.<sup>50</sup> Además He Z. *et al.*, (2009) comprobaron que en fibroblastos de pulmón, la variación en los niveles de expresión de  $\alpha$ -SMA está regulada por PI3K/Akt.<sup>51</sup>

Por otro lado, se utilizó BAY 11-7082, un inhibidor específico en la respuesta de la vía NF- $\kappa$ B. Se observó que al pre tratar los FCA con dicho inhibidor, no se observaron cambios en los niveles de expresión de  $\alpha$ -SMA. Estos resultados sugieren que esta vía participa en la regulación de los niveles de esta proteína. En el mecanismo involucrado en este proceso, BAY 11-7082 inhibe de forma irreversible la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  y la consecuente degradación proteosomal, generando el secuestro de NF- $\kappa$ B a un estado inactivo en el citoplasma, previniendo la señalización río debajo de la cascada transduccional.<sup>52</sup> Nuestro resultado viene a dilucidar el trabajo presentado recientemente por Santana R. (2014), que en nuestro laboratorio analizó con LPS la participación de esta vía en la expresión de  $\alpha$ -SMA.<sup>32</sup> Estos autores obtuvieron un resultado confuso al respecto, pues no se encontró un efecto aditivo de ambos estímulos sobre la expresión de la proteína en estudio.<sup>34,55</sup> En este trabajo, en cambio, el pre tratamiento de HS con el inhibidor logró mantener los niveles de la proteína en valores similares al control. De esta manera, demostramos que esta vía si participa en la modificación de los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA. Nuestro hallazgo al respecto se correlaciona con trabajos presentados en células humanas mieloides y no mieloides, donde a través de TLR4 (MyD88,

Mal/TIRAP e IKK) se comprobó la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de la estimulación con LPS.<sup>52</sup>

Respecto de  $\alpha$ -SMA, nuestros resultados sugieren que la degradación constante de la MEC, con su consecuente liberación de bajas dosis de HS, ejercería un efecto antifibrótico sobre el corazón, impidiendo la diferenciación de FC a MFC y con ello la progresión de enfermedades crónicas que podrían afectar a este órgano.

## **8. CONCLUSIONES**

- 1.) S activa TLR4 de manera análoga a LPS, produciendo los mismo efectos pero en menor intensidad.
- 2.) La respuesta de los FC a HS depende del grado de madurez de estos, presentándose mayores aumentos y disminuciones en FCN que en FCA.
- 3.) HS induce un aumento en los niveles proteicos de pro IL-1 $\beta$  a través de TLR4 en FC.
- 4.) HS aumenta los niveles proteicos de ICAM-1 y VCAM-1 en FC, vía TLR4, dependiente de la vía PI3K/Akt para VCAM-1.
- 5.) HS disminuye los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA a través TLR4, participando en este fenómeno la vía PI3K/Akt y NK- $\kappa$ B.

## REFERENCIAS

---

- <sup>1</sup> Porter K, Turner N. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology & Therapeutics*. 2009; 123:255-278
- <sup>2</sup> Fan D et al. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2012; 5:15
- <sup>3</sup> Cotran R, Kumar V, Collins T. Pathologic Basis of Disease. *Cotran R, Kumar V, Collins T, editors. Vol. 6. W. B. Saunders Company; Philadelphia*. 1999:89-112
- <sup>4</sup> Weber K, Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertens*. 2004; 22(1):47-50
- <sup>5</sup> Tao Z et al. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life Sciences*. 2004; 74:1561-1572
- <sup>6</sup> Smith R et al. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am. J. Pathol*. 1997; 151:317–322
- <sup>7</sup> Brown R et al. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005; 45:657-87
- <sup>8</sup> Phan S. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc*. 2008; 5(3):334-337.
- <sup>9</sup> Uematsu S, Akira S. Toll-like Receptors and Innate Immunity. *Handbook of experimental pharmacology*. 2008; 183:1-21
- <sup>10</sup> Brennan T. et al. Heparan Sulfate, an endogenous TLR4 agonist, promotes acute GVHD after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2012; 120:2899-2908
- <sup>11</sup> Beg A. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol*. 2002; 23(11):509-512
- <sup>12</sup> Peri F, Calabrese V. Toll-like receptor 4 (TLR4) modulation by synthetic and natural compounds: an update. *Journal of medicine chemistry*. 2013; A-K
- <sup>13</sup> Fang H. et al. TLR4 is essential for dendritic cell activation and anti-tumor T-

---

cell response enhancement by DAMPs released from chemically stressed cancer cell. *Celular Celular and Molecular Immunology*. 2014; 11:150-159

<sup>14</sup> Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*. 2004; 16:3-9

<sup>15</sup> Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews Immunology*. 2004; 4:499-510

<sup>16</sup> Kim E, Kim B. Lipopolysaccharide inhibits transforming growth factor-beta1-stimulated Smad6 expression by inducing phosphorylation of the linker region of Smad3 through a TLR4–IRAK1–ERK1/2 pathway. *FEBS Letters* 2011; 585:779–785

<sup>17</sup> Lu Y, Yeh W, Ohashi P. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008; 42:145–151

<sup>27</sup> Sugiura H et al. Activation of Toll-like receptor 3 augments myofibroblast differentiation. *Am J Respir. Cell Mol Biol*. 2009; 40:654-662

<sup>28</sup> Kohan M et al. EDA-containing cellular fibronectin induces fibroblast differentiation through binding to alpha4beta7 integrin receptor and MAPK/Erk 1/2-dependent signaling. *FASEB J* 2010; 24, 4503-4512

<sup>29</sup> Webber, J., Meran, S., Steadman, R. & Phillips, A. Hyaluronan orchestrates transforming growth factor-beta1-dependent maintenance of myofibroblast phenotype. *J Biol Chem*. 2009; 284:9083-9092

<sup>30</sup> Sandbo N et al. Downregulation of smooth muscle alpha-actin expression by bacterial lipopolysaccharide. *Cardiovasc Res*. 2007; 74: 262-269

<sup>31</sup> Turner N, Porter K. Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. *Fibrogenesis tissue repair*. 2013; 6:5

<sup>35</sup> Cullen B et al. The differential regulation and secretion of proteinases from fetal and neonatal fibroblast by growth factors. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 1997; 29(1):241-257

<sup>36</sup> Kawaguchi M et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2011;123(6):594-604.

<sup>37</sup> Takahashi M. Role of the inflammasome in myocardial infarction. *Trends Cardiovasc Med*. 2011;21(2):37-41.

<sup>38</sup> Goodall K, Poon I, Phipps S et al. Soluble heparin sulfate fragments generated by heparanase trigger the release of pro-inflammatory cytokines through TLR4. *Plos one*. 2014;

---

9:e109596. doi:10.1371/journal.pone.0109596

- <sup>39</sup> Villarreal F. Interstitial fibrosis in Heart Failure. Springer, editor: Springer. 2005.
- <sup>40</sup> Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res.* 2008; 58(2):88-111
- <sup>41</sup> Humeres C. Rol diferencial de TLR4 sobre la adhesión y activación de TLR4 M1/M2 en fibroblastos y miofibroblastos cardiacos. Tesis doctoral en curso.
- <sup>42</sup> Dokic D, Dettman R. VCAM-1 inhibits TGFβs TGFβ inhibits TGFβs TGFβoblaymal transformation by modulating Rho activity and stabilizing intercellular adhesion in epicardial mesothelial cells. *Developmental Biology.* 2006; 299:489-504
- <sup>43</sup> Turner N et al. Human cardiac fibroblasts express ICAM-1, E-selectin and CXC chemokines in response to proinflammatory cytokine stimulation. *The international journal of biochemistry and cell biology.* 2011; 43:1450-1458.
- <sup>44</sup> Tian L, Wen Q, Dang X et al. Immune response associated with Toll-like receptor 4 signaling pathway leads to steroid-induced femoral head osteonecrosis. *BMC Musculoskeletal Disorders.* 2014;15:18.
- <sup>45</sup> Lee I et al. Role of TLR4/NADPH oxidase/ROS-activated p38 MAPK in VCAM-1 expression induced by lipopolysaccharide in human renal mesangial cells. *Cell communication and signaling.* 2012; 10:33
- <sup>46</sup> Feng Y et al. TLR4/NF-κB signaling pathway-mediated and oxLDL-induced up-regulation of LOX-1, MCP-1 and VCAM-1 expressions in human umbilical vein endothelial cells. *Genetics and molecular research.* 2014; 13(1):680-695
- <sup>47</sup> Tang J et al. VEGF-A promotes cardiac stem cell engraftment and myocardial repair in the infarcted heart. *International Journal of cardiology.* 2015: 183;221-231
- <sup>48</sup> Gujjarro-Muñoz I et al. Lipopolysaccharide activates toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated NF-κB signaling pathway and proinflammatory response in human pericytes. *The Journal of Biological chemistry.* 2014; 29(2): 2457-2468
- <sup>49</sup> Vivar R. TGF-β1 protege a los fibroblastos cardiacos de la quimioterapia (TLR4)-mediated NF-κB reperfusión simulada, a través de ERK1/2, AKT y SMAD 2/3. Tesis doctoral 2012.
- <sup>50</sup> Abdalla M, Goc A, Segar L y Somanath P. Response factor differentiation via

---

myocardin and serum expression and myofibroblast Akt1 mediates alpha-Smooth muscle actin. muscle actin. *J Biol. Chem.* 2013

<sup>51</sup> He Z, Zhu Y y J Hong. Toll like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced collagen secretion by phosphoinositide3-kinase-akt pathway in fibroblasts during acute lung injury. *Journal of receptors and signal transduction* 2009; 29(2):119-125

<sup>52</sup> Andreakos E et al. Distinct pathways of LPS-induced NF-ke activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. *Blood* 2004; 103(6):2229-2237.