



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Vías transduccionales asociadas al receptor  
tipo Toll-4 (TLR4) en la expresión de las  
proteínas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 en  
fibroblastos cardiacos.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO**

**ELIAS FELIPE CONSTANTE INOSTROZA BRIONES**

**Directora y Patrocinante**  
**Dra. Lorena García Nannig**  
Departamento de Bioquímica  
y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas  
y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Co-director**  
**Claudio Humeres**  
Departamento de Química  
Farmacológica y Toxicológica  
Facultad de Ciencias Químicas  
y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

Santiago de Chile, abril, 2015

## **Financiamiento**

- Proyecto FONDECYT N° 1130300 (Lorena García, coinvestigadora)
- Proyecto FONDAP ACCDiS (Advanced Center for Chronic Diseases) N° 15130011 (Lorena García, investigadora asociada)

El desarrollo de esta memoria de título se realizó en el Departamento Bioquímica y Biología Molecular y Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Esta memoria dio origen a la siguiente presentación a congreso:

**Inostroza E**, Humeres C, Ayala P, Ariel D, Díaz-Araya G, García L. La activación de TLR-4 por LPS induce un aumento en la expresión de VCAM-1/ICAM-1, vía NF- $\kappa$ B, en fibroblastos cardíacos adultos, XXXV Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Chile, Valdivia, Noviembre 2013.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer profundamente a mi hermosa esposa (bebe) por su apoyo incondicional durante la realización de esta memoria. Ella supo, más que nadie, cuánto me frustraban los experimentos que no resultaban y siempre me animó a seguir adelante y a confiar cuando veía todo confuso. Agradezco sinceramente a Dios haberla conocido porque me ha significado un pilar fundamental en mi vida, su apoyo y amor son impagables y ella es ahora mi nuevo motivo para seguir adelante.

De igual manera quiero agradecer a mi familia; papà, mamá, hermano y hermanas. Siempre estuvieron presentes para apoyarme en mis decisiones y apenas necesite de su ayuda no dudaron en dármele. Quiero destacar a mis padres por todo su esfuerzo y sacrificio para darme educación, porque aunque la vida no les fue fácil, se propusieron darme lo que las condiciones económicas le privaron (una carrera profesional). Soy consciente de cuanta pena les causó el tener que salir tan lejos del hogar para convertirme en profesional, pero priorizaron mi felicidad por sobre los recursos. Si esta tesis debe ser dedicada a alguien, esos son mis padres y espero darles más y mayores satisfacciones, porque su esfuerzo merece ser coronado con muchos más éxitos.

También quiero agradecer al profesor Guillermo Díaz por ofrecerme esta tesis, en un momento en que mi vocación me indicaba que la investigación era lo mío, pero me sentía inseguro de mí mismo. Le agradezco por abrirme las puertas de su laboratorio, por su apoyo y orientación cada vez que la necesité, pero sobre todo por su calidad humana, pues desde un principio me demostró que el bienestar de su grupo de trabajo era una de sus prioridades, reflejándose en los muchos asados en su casa.

En esta misma línea quiero agradecer a mi directora de tesis, la profesora Lorena, pues considero que sin su ayuda no habría sido posible concluir esta memoria en tan breve tiempo. Siempre estuvo dispuesta a aclarar mis dudas y se preocupó literalmente de cada detalle de mi escrito. La verdad es que su disposición al respecto fue de oro, sinceramente gracias profe.

Por ultimo quiero agradecer a mis compañeros “fibros” Diego (co-tutor), Raül, Pedro, Pía, Clodito, Verde, Samir, Queirolo, Roxy y Rodo por su grata compañía en el lab y por los muchos momentos graciosos. Siempre destacué a los demás que mis compañeros del lab eran geniales, los que necesitaba para mi carácter un poco tímido. No puedo dejar de mencionar la paciencia de oro de Raül, para responder toda clase de dudas (cuando digo toda es literalmente toda xd), y a Diego, la persona más adecuada para ser mi co-tutor; su confianza desde un principio y su carisma hicieron que fuera realmente una persona a quien no dudaba en pedir consejos. Gracias a él pude aceptar con cierta tranquilidad que el científico se forma con más fracasos que éxitos. Creo sin exagerar que mi experiencia en el lab habría sido muy distinta si él.

Por todo lo anterior nuevamente quiero decir, gracias a todos.

## Índice general

Índice general.....	1
Índice de figuras.....	3
Abreviaturas.....	4
Resumen.....	6
Summary.....	7
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
1.1 Enfermedades cardiovasculares. Epidemiología.....	9
1.2 Reparación cardiaca.....	9
1.3 Inflamación cardiaca.....	10
1.4 Respuesta inflamatoria estéril en el infarto al miocardio.....	11
1.5 Fibroblastos cardiacos, células clave en la respuesta inflamatoria Cardiaca estéril.....	12
1.6 Receptores y mediadores de la respuesta inflamatoria.....	13
1.7 Receptores de tipo Toll (TLR).....	13
1.8 Receptor de tipo Toll 4 (TLR4).....	14
1.9 Vía dependiente de MyD88.....	15
1.10 Vía Independiente de MyD88.....	15
1.11 Receptores tipo Toll en patologías cardiovasculares.....	15
1.12 TLR-4 en fibroblastos cardiacos.....	18
1.13 Mediadores humorales de la inflamación: el papel de las proteínas de Adhesión.....	18
1.14 NF-kB y expresión de mediadores de la respuesta inflamatoria en fibroblastos cardiacos.....	19
1.15 Rol de NF-kB en la expresión de moléculas de adhesión gatillada por TLR4.....	20
<b>2 HIPÓTESIS.....</b>	<b>21</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>4 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
4.1 Reactivos.....	22

4.2	Obtención de FC de rata adulta por el método de Langerdorff.....	22
4.3	Cultivo celular.....	24
4.4	Preparación de extractos celulares totales.....	24
4.5	Electroforesis.....	24
4.6	Electrotransferencia.....	25
4.7	Western blot.....	25
4.8	Inmuncitofluorescencia.....	26
4.9	Diseño experimental.....	26
4.9.1	Objetivo 1.....	26
4.9.2	Objetivo 2.....	26
4.9.3	Objetivo 3.....	27
4.10	Expresión de resultados y análisis estadístico.....	27
5	<b>RESULTADOS</b> .....	28
5.1	LPS no produce muerte celular en el fibroblasto cardiaco.....	28
5.2	LPS induce un aumento en los niveles de ICAM-1 a través de TLR4.....	29
5.3	LPS activa la vía NF- $\kappa$ B a través de TLR-4.....	29
5.4	Participación de TLR-4 y NF- $\kappa$ B en el aumento en los niveles de ICAM-1.....	30
5.5	Activación de ERK 1/2, JNK, p38 y Akt por LPS.....	32
5.6	LPS induce un aumento en los niveles de ICAM-1, vía ERK1/2 y JNK.....	32
5.7	LPS induce un aumento en los niveles de VCAM-1 a través de TLR4.....	32
5.8	LPS induce un aumento en los niveles de VCAM-1, vía JNK.....	34
6	<b>DISCUSIÓN</b> .....	36
7	<b>CONCLUSIONES</b> .....	43
8	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	44

## Índice de figuras.

<b>Figura 1</b>	Vía de señalización de TLR4 dependiente de MyD88.....	16
<b>Figura 2</b>	Modelo hipotético de activación de la vía PI3K/Akt mediada por TLR4.....	16
<b>Figura 3</b>	Vía de señalización de TLR4 independiente de MyD88.....	17
<b>Figura 4</b>	Esquema del Procedimiento general de obtención de fibroblastos cardiacos de ratas adultas.....	23
<b>Figura 5</b>	Viabilidad de fibroblastos cardiacos estimulados con LPS.....	28
<b>Figura 6</b>	LPS induce un aumento en los niveles de ICAM-1.....	29
<b>Figura 7</b>	LPS activa a NF- $\kappa$ B.....	30
<b>Figura 8</b>	Participación de TLR-4 y NF- $\kappa$ B en el aumento de los niveles de ICAM-1 inducida por LPS.....	31
<b>Figura 9</b>	LPS activa a JNK, ERK1/2, p38 y AKT.....	33
<b>Figura 10</b>	Señalización involucrada en el aumento de los niveles de ICAM-1 inducida por LPS.....	34
<b>Figura 11</b>	LPS induce un aumento en los niveles de VCAM-1.....	35
<b>Figura 12</b>	Señalización involucrada en el aumento de los niveles de VCAM-1 inducida por LPS.....	35

## ABREVIATURAS

$\alpha$ -SMA	Alfa actina de músculo liso
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ang II	Angiotensina II
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina de suero de bovino
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
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 quinasa activada extracelularmente
FBS	Suero fetal de bovino
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDA	Dominio extra tipo A de la fibronectina
ELISA	Ensayo inmuno enzimático
FC	Fibroblastos cardiacos
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
HSP	Proteínas de estrés térmico
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfónico
IGF-I	Factor de crecimiento análogo a insulina tipo I
I $\kappa$ B	Inhibidor de NF- $\kappa$ B
IL-1	Interleuquina 1
IRF	Factor regulatorio de interferón
IRAK	Quinasa activada por el receptor de interleucina
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolisacárido
LRR	Repeticiones ricas en leucina
mA	miliamper

MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteasa
MyD88	gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide
N	Normal
NaCl	Cloruro de Sodio
NF-κB	Factor nuclear κB
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Tampón fosfato salino
p-ERK	Proteína quinasa activada extracelularmente fosforilada.
PI3-K	Fosfatidilinositol 3 quinasa.
PIP2	fosfatidil inositol 2 fosfato
PIP3	fosfatidil inositol 3 fosfato
PKB	Proteína quinasa B o AKT
R-IL1-β	Receptor de Interleuquina 1 beta
RM	Remodelamiento Cardíaco
R-TNF-α	Receptor del Factor de necrosis tumoral alfa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida desnaturante
TAK	quinasa activada por TGF-β
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TIR	Dominio común del receptor de interleucina y receptor de tipo toll
TLR	Receptor de tipo toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
UBC13	enzima ubiquitinante 13
v/v	Proporción volumen/volumen

## RESUMEN

Una consecuencia común de las enfermedades cardiovasculares es la remodelación cardíaca, que se caracteriza por cambios en el tamaño, forma y función del corazón. El infarto agudo al miocardio es la causa más común que desencadena un proceso de remodelado. El daño causado por el proceso isquémico conduce a la activación de receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño (PRR), y de mediadores celulares y humorales de la respuesta inflamatoria en el tejido. En relación a esto, se ha reportado que el receptor tipo toll-4 (TLR-4), un tipo de PRR, tiene un papel clave en la función cardíaca luego de un infarto, mientras que el aumento en la expresión de las moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y vascular 1 (VCAM-1), en el tejido cardíaco se ha asociado a una mayor adhesión e infiltración leucocitaria y a un mal pronóstico de la función cardíaca.

En fibroblastos cardíacos (FC) se ha demostrado que TLR-4 reconoce patrones moleculares asociados a daño y que su activación conduce a la secreción de citoquinas proinflamatorias, sin embargo los efectos sobre la expresión de moléculas de adhesión no han sido determinados.

En esta memoria se estudió el rol del TLR-4 en la expresión ICAM-1 y VCAM-1 en FC de rata adulta e indagó las vías de señalización involucradas en dicha expresión. El tratamiento con lipopolisacárido (LPS) 1 µg/mL aumentó los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 de manera tiempo dependiente, observándose en cada caso un aumento significativo a las 24 hrs. Por otra parte, LPS aumentó de forma temprana la fosforilación de NF-κB, ERK1/2, y JNK, mientras que p-38 y Akt sólo mostraron una tendencia a aumentar a partir de los 5 min. La utilización de los inhibidores TAK-242, PD98059 y SP600125, revirtieron el aumento en los niveles de ambas proteínas, mientras que los inhibidores BAY117085, LY294002 y SB202190 no lo revirtieron.

En resumen, nuestros resultados demostraron que la activación del TLR-4 en FC, gatilla un aumento en los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 a través de las vías de señalización ERK1/2 y JNK.

## **Signal transduction pathways associated with Toll-like receptor-4 (TLR4) in the expression of adhesion proteins VCAM-1 and ICAM-1 in cardiac fibroblasts.**

### **SUMMARY**

The cardiac remodeling is a common consequence of the ECV, and is characterized by changes in the size, shape and function. Moreover the acute myocardial infarction is the most common cause of remodeling. The damage caused by the ischemic process leading to activation of pattern recognition receptors (PRR), and humoral and cellular mediators of the inflammatory response in the tissue. In regards to this Toll like receptor-4 (TLR-4) has been described has a key mediator of cardiac function after myocardial infarction, while the increase in intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in cardiac tissue has been linked to increased adhesion and leukocyte infiltration and poor prognosis of cardiac function.

In cardiac fibroblast TLR4 is capable to recognize danger associated molecular patterns and release pro-inflammatory cytokines, however their role in ICAM-1/VCAM-1 expression remain unknown.

In this study we have determined the ability of TLR-4 to increased ICAM-1/VCAM-1 protein level in adult rat cardiac fibroblast and investigated the potential mechanisms underlying this induction.

Treatment with LPS 1 µg/ml resulted in a time-dependent increased of ICAM-1 / VCAM-1 protein level. Furthermore, NF-κB, ERK1/2 and JNK were rapidly phosphorylated by LPS, while p-38 and Akt showed a tendency to increase from 5 min.

We also found that inhibition of ERK1/2 and JNK pathways prevented LPS-induced ICAM-1 and VCAM-1 protein level, whereas NF-κB, p-38 and Akt inhibition did not.

In summary, these findings demonstrate that the increased ICAM-1/VCAM-1 protein level by TLR-4 activation is regulated via the ERK1/2 and JNK pathways, in cultured cardiac fibroblasts.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Enfermedades cardiovasculares. Epidemiología.

Un estimado de 16,7 millones o 29,2 % del total de las muertes totales en el mundo son atribuibles a algún tipo de enfermedad cardiovascular (ECV). De este total, 7,2 millones mueren a causa de enfermedad isquémica cardiaca (Gaziano y cols., 2006). En Chile, tiene particular relevancia el grupo ECV, debido a que la mortalidad es liderada por la enfermedad isquémica cardiaca con un 9,2% para ambos sexos y más de la mitad de la población adulta chilena tiene un riesgo cardiovascular alto o muy alto (55%), con altas tasas de hipertensión, sobrepeso, obesidad, dislipidemia y tabaquismo (Castro y cols., 2004). Actualmente, la terapia estándar para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca está orientada a disminuir la carga de trabajo del corazón con  $\beta$ -bloqueadores, diuréticos e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. Sin embargo, si alguno de estos medicamentos tiene beneficios para el remodelamiento del tejido, el foco no está puesto en la optimización del proceso de remodelamiento cardiaco y/o fibrosis del tejido, lo que ha sido descrito en la literatura como una alternativa o complemento para potenciar las terapias actuales (Gaziano y cols., 2006, Leask 2010).

### 1.2 Reparación cardiaca

Una consecuencia común de las ECV es el remodelamiento cardiaco, proceso caracterizado por cambios anatómicos, geométricos, histológicos y moleculares, que se observan en respuesta a una sobrecarga de trabajo o daño miocárdico (Frangogiannis 2012).

La reparación cardiaca puede ser dividida en 3 etapas consecutivas y sobrepuestas, y que a grandes rasgos corresponden a:

**a) Fase inflamatoria.** Incluye el reclutamiento de células del sistema inmune a la zona dañada, activación del inflamasoma y liberación de quimioquinas y citoquinas;

**b) Fase proliferativa.** En esta etapa se suprime la expresión de mediadores pro-inflamatorios y las células endoteliales proliferan para formar una extensa red

microvascular, los fibroblastos cardiacos (FC) también proliferan y luego se diferencian a miofibroblastos cardiacos (mFC). Los mFC son los principales encargados de producir proteínas de matriz extracelular (MEC), tales como distintos tipos de colágeno y laminina, entre otros.

**c) Fase de maduración de la cicatriz.** Durante la fase de maduración, los miofibroblastos han alcanzado su completa diferenciación y se encargan de la secreción de proteínas de MEC para posteriormente entrar en apoptosis y dejar una cicatriz formada esencialmente por colágeno (Frangogiannis 2008, Frangogiannis 2012). Sin embargo, en el caso de reparaciones de tipo anómalas los mFC son incapaces de entrar en apoptosis por razones hasta ahora desconocidas, perpetuando la deposición de proteínas de la MEC incluso más allá del territorio originalmente dañado, transformando el tejido en uno fibrótico incapaz de cumplir su función de manera óptima y a largo plazo conducirá a una insuficiencia cardiaca (Hinz y cols., 2007, Turner y cols., 2013).

### **1.3 Inflamación cardiaca**

La inflamación cardiaca, también llamada miocarditis fue un vocablo acuñado por Joseph Sobernheim en 1837 (Pankuweit y cols., 2002). Las principales causas de la inflamación cardiaca son: **a)** agentes patógenos externos (virus y bacterias, entre otros), conocida como inflamación cardiaca no estéril; y **b)** infarto al miocardio, hipertensión arterial, agentes químicos y factores asociados a la respuesta inmune, entre otros, conocida como inflamación cardiaca estéril. Aunque cada uno de esos estados patológicos tiene sus características propias en etiología, patogénesis y evolución de la enfermedad, ambas comparten mecanismos inflamatorios (Marchant y cols., 2012). La respuesta inflamatoria puede ser aguda o crónica. La respuesta aguda se presenta en condiciones infecciosas severas o en el infarto al miocardio, y la respuesta crónica se presenta en condiciones patológicas tales como hipertensión arterial, aterosclerosis y etapas muy posteriores al infarto al miocardio, y se caracteriza por eventos inflamatorios subclínicos (Cooper 2009). Desde el punto de vista clínico, las aproximaciones terapéuticas cuyo blanco es la cascada de la respuesta

inflamatoria han mostrado respuestas promisorias en el manejo del remodelamiento patológico (Kempf y cols., 2012). Sin embargo, la alta tasa de mortalidad por esta causa sigue siendo un gran problema de salud pública.

#### **1.4. Respuesta inflamatoria estéril en el infarto al miocardio**

El infarto al miocardio es la principal causa de inflamación cardiaca estéril, y como se describió en el punto anterior, la etapa inflamatoria es la primera respuesta frente a un daño tisular y va a marcar el curso del proceso de remodelamiento. Esta etapa también se describe como un “arma de doble filo”, ya que es necesaria para el inicio y correcto desarrollo de la reparación del tejido pero una respuesta inflamatoria exacerbada y sostenida es también conducente al rápido deterioro de la función y de la estructura del órgano (Frangogiannis 2008, Kong y cols., 2014, Hori y cols., 2008), por lo tanto, conocer los aspectos más esenciales que marcan esta etapa es crucial para desarrollar nuevos tratamientos.

En el infarto al miocardio se produce una lesión en el tejido cardiaco, en donde el principal mecanismo de muerte celular es la necrosis, ya que la apoptosis contribuye a la muerte celular, pero principalmente en el proceso de reperfusión. Las células que mueren por necrosis liberan su contenido al medio, incluyendo una serie de moléculas denominadas en conjunto, patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Así, el comienzo de la respuesta inflamatoria post-infarto está marcado por la activación de receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs) de superficie capaces de sensor DAMPs, y la posterior activación de vías de señalización que inducen la liberación de mediadores inflamatorios, como citoquinas y quimioquinas, y la expresión de proteínas de adhesión celular que favorecen el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos hacia el lugar del daño, los que se encargan de limpiar el área de células muertas y restos celulares (Paulus 2000, Chen y cols., 2010).

La liberación de citoquinas y factores de crecimiento conducen a la formación de tejido de granulación altamente vascularizado (Kono y cols., 2008, Kawaguchi y cols., 2011), dando paso a la fase proliferativa.

### **1.5. Fibroblastos cardiacos, células clave en la respuesta inflamatoria cardiaca estéril.**

La función cardiaca en los mamíferos es regulada por la interacción y coordinación dinámica de cardiomiocitos y FC, que en su conjunto constituyen el 90% de las células del miocardio. Los FC representan el 60-70% del total de las células del corazón humano y son la principal fuente de producción y secreción de proteínas de la MEC, las que incluyen colágeno tipo I, III y VI, proteoglicanos, laminina y fibronectina, entre otros componentes, cuya finalidad es regular la estructura del corazón. Además, son células capaces de sensor y transmitir señales químicas, mecánicas y eléctricas entre los componentes celulares y no celulares (Snider y cols., 2009, Camelliti y cols., 2005). Por lo tanto, en condiciones fisiológicas, los fibroblastos cardiacos secretan proteínas que forman parte de la MEC con el fin de mantener la comunicación de los cardiomiocitos entre las capas del tejido miocárdico y por ende preservar la función cardiaca normal.

Además de las funciones clásicas comentadas anteriormente, los FC cumplen otras importantes funciones como sensores intermedios y amplificadores de señales de las células del sistema inmune, ya que producen mediadores autocrinos y paracrinos, tales como citoquinas, factores de crecimiento, prostaglandinas y óxido nítrico (Cooper 2009). Por estas razones, a los FC se los han re-bautizado como “células centinelas”, y se ha propuesto que juegan un papel relevante en la respuesta miocárdica frente a señales químicas y mecánicas (Kawaguchi y cols., 2011). Frente a un infarto al miocardio, hay infiltración de células del sistema inmune en el sitio de la lesión (Vilahur y cols., 2011), y los fibroblastos son activados rápidamente por citoquinas, tales como IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  y factores de crecimiento (TGF- $\beta$ 1) secretados por las células inmunes. La activación de fibroblastos permite procesos claves en el remodelado cardiaco, como la migración hacia la zona dañada, en donde liberan MMPs, produciendo degradación de la MEC dañada y una vez instalados, se adhieren a la MEC para proliferar y finalmente diferenciarse a mFC, un fenotipo especializado en

reparación de tejidos (Brown y cols., 2005, Souders y cols., 2009, Kong y cols., 2014).

### **1.6. Receptores y mediadores de la respuesta inflamatoria.**

Como se explicó más arriba, la respuesta inflamatoria post-infarto comienza con la activación de los PRRs. Se han descrito al menos cuatro familias principales de PRRs, estas familias cooperativamente reconocen DAMPS:

- 1) Receptores tipo Toll (TLRs)
- 2) Receptores tipo RIG-I (RLRs)
- 3) Receptores de lectinas tipo-C (CLRs)
- 4) Dominios ricos en leucinas que unen nucleótidos (NLRs) (Chem 2010).

### **1.7. Receptores de tipo Toll (TLR)**

El descubrimiento de los receptores de tipo Toll comenzó con la identificación de Toll, un receptor expresado en *Drosophila* que es crucial para el desarrollo de la polaridad dorsoventral durante la embriogénesis (Akira 2003).

Posteriormente, algunos estudios revelaron el papel del Toll en la respuesta inmune de insectos contra infecciones por hongos. En mamíferos, de igual manera, se describió un receptor con gran homología a Toll con capacidad de reconocer variados patrones moleculares dentro de sus distintos subtipos (Akira y cols., 2004).

En la actualidad se conocen 13 tipos de TLR los que clásicamente representaban una familia de receptores que reconoce patrones moleculares relacionados con patógenos (PAMP). Evidencias sugieren que variados patrones pueden estimular a TLR4, estas moléculas pueden incluir lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas, proteína de fusión del virus respiratorio sincicial y otras (Rallabhandi y cols., 2012). Sin embargo, actualmente también se conocen ligandos endógenos para TLR4, entre ellos se encuentran la proteína de shock térmico HSP70 (Chen y cols., 2009), el fragmento EDA de fibronectina (Okamura y cols., 2001) y el glucosaminoglicano hialuronato, todos estas liberadas al medio extracelular durante el daño tisular, ya sea por liberación del contenido intracelular

o por degradación de la MEC (Arslan y cols., 2011, Li y cols., 2011), y por esta razón, se las ha denominado alarminas o DAMP (del inglés "dangers associated molecular patterns") que también activan vías de señalización pro inflamatorias.

### **1.8. Receptor de tipo Toll 4 (TLR4)**

Los TLR4 son glicoproteínas integrales de membrana y sobre la base de su considerable homología en la región citoplasmática (dominio TIR, del inglés Toll-interleukin-1 receptor), son parte de una gran súper familia que incluye los receptores de interleuquina 1 (IL-1R) (Akira 2003). En contraste, la región extracelular en los TLR e IL-1R difieren marcadamente: la región extracelular de los TLR contiene repeticiones ricas en leucinas (LRR) mientras que en los IL-1R contiene 3 regiones análogas a inmunoglobulinas. Luego, del reconocimiento del ligando, TLR4 induce oligomerización y reclutamiento de adaptadores río abajo a través de la interacción con sus dominios TIR. Los dominios TIR contienen 3 regiones altamente conservadas las cuales median las interacciones proteína-proteína entre los TLR y las proteínas adaptadoras. El dominio TIR del receptor es crucial para la transducción de la señal, ya que una única mutación en el dominio TIR puede abolir la respuesta a LPS (Lu y cols., 2008). Actualmente, se conocen 5 proteínas adaptadoras que contienen dominios TIR: MyD88 (del inglés "myeloid differentiation primary response gene 88"), TIRAP (del inglés "TIR domain-containing adaptor protein"), también conocida como MAL (del inglés "MyD88-adaptor-like"), TRIF (del inglés "TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ "), TRAM (del inglés "TRIF-related adaptor molecule"), y SARM (del inglés "sterile and HEAT-Armadillo motifs containing protein"). Diferentes TLRs usan variadas combinaciones de adaptadores que determinan la señalización intracelular. Es interesante hacer notar que TLR4 es el único TLR conocido que utiliza todas las proteínas adaptadoras (Lu y cols., 2008, Park y cols., 2009).

La estimulación de TLR4 facilita la activación de dos vías:

a) La vía dependiente de MyD88, que involucra una fase temprana de activación de NF- $\kappa$ B, la cual conduce a la producción de citoquinas inflamatorias.

b) La vía independiente de MyD88 que activa IRF3 (del inglés "interferon regulatory factor 3") y que conduce a la producción del interferón tipo I (IFN-I) y la expresión de genes inducibles por IFN y también involucra una fase tardía de activación de NF- $\kappa$ B (O'Neill y cols., 2007).

### **1.9. Vía dependiente de MyD88**

Además del dominio TIR, MyD88 contiene un dominio de muerte (DD) que puede reclutar otras moléculas que posean el mismo dominio mediante interacciones homotípicas. Luego de la dimerización del receptor, MyD88 recluta y activa mediante fosforilación y ubiquitinación una serie de proteínas de señalización que concluyen en la activación de NF $\kappa$ B y las MAPK. La subsecuente translocación de NF $\kappa$ B hacia el núcleo controla la expresión de citoquinas proinflamatorias tales como IL- 1, TNF- $\alpha$ . (**Figura 1**) (Lu y cols., 2008).

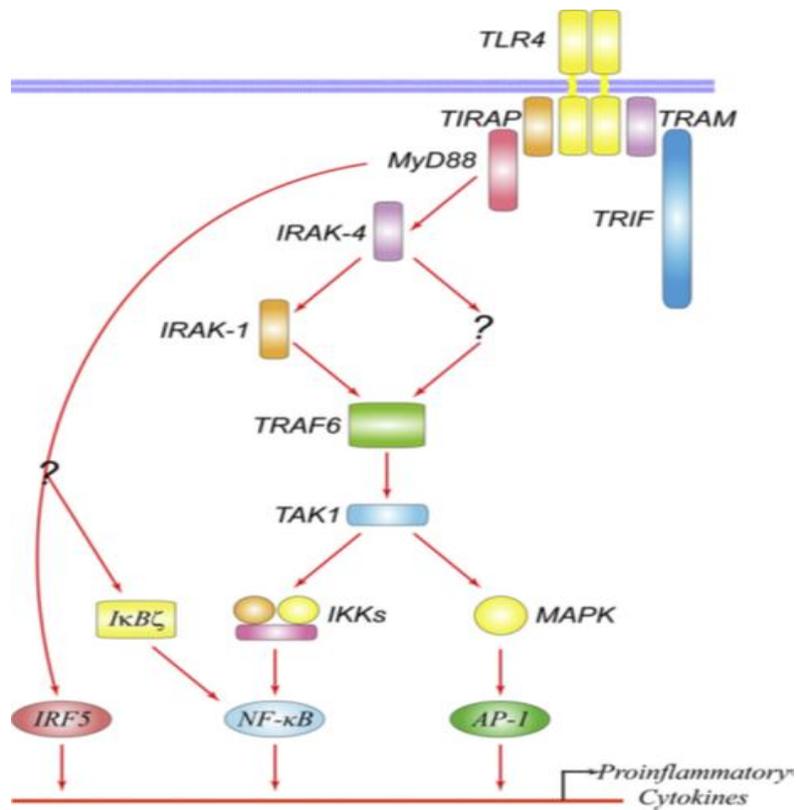
Por otro lado, también se ha descrito que TLR4 a través de MyD88 forma un dímero con la subunidad p85 de PI3K lo que desencadena una señalización que lleva a la activación de la proteína Akt (**Figura 2**) (Laird y cols., 2009).

### **1.10. Vía Independiente de MyD88**

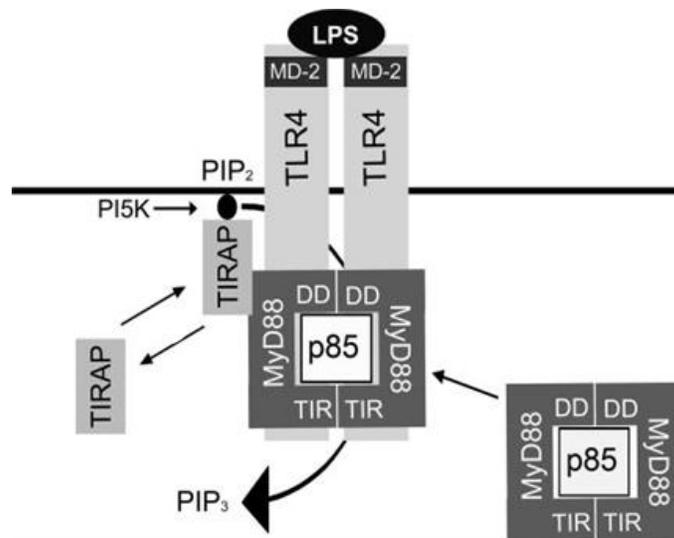
TRIF es otra proteína adaptadora importante que contiene un dominio TIR y que media la vía independiente de MyD88, estudios en macrófagos deficientes de TRIF demostraron que TRIF juega un papel importante en la activación del factor transcripcional IRF3 y la activación en la fase tardía de NF- $\kappa$ B y MAPK. (**Figura3**) (Lu y cols., 2008, Verstrepen y cols., 2008).

### **1.11. Receptores tipo Toll en patologías cardiovasculares**

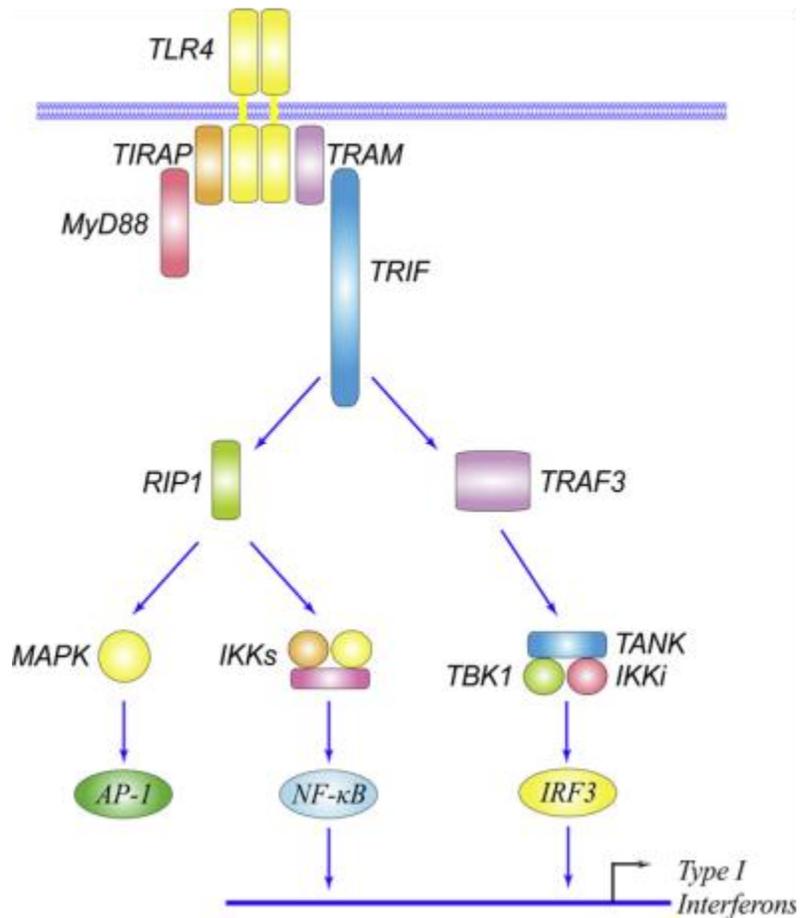
En los últimos años ha crecido el interés de estudiar el rol que cumplen los receptores tipo Toll en enfermedades no infecciosas, debido principalmente al descubrimiento de ligandos endógenos y las condiciones en las cuales estos son liberados. En este contexto, la investigación de estos receptores en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares cobra una mayor importancia.



**Figura 1.** Vía de señalización de TLR4 dependiente de MyD88 (Lu y cols., 2008).



**Figura 2.** Modelo hipotético de activación de la vía PI3K/Akt mediada por TLR4. (Laird y cols., 2009).



**Figura 3.** Vía de señalización de TLR4 independiente de MyD88. (Lu y cols., 2008, Verstrepen y cols., 2008).

Ya en el año 2002 se publicó uno de los primeros trabajos con evidencias del rol que podría jugar TLR4 en procesos inflamatorios post cirugía cardiaca en humanos, donde se observa un significativo aumento en los niveles de HSP70, ligando endógeno de TLR4, consecuente con los aumentos de citoquinas como IL-6 y TNF- $\alpha$  (Dybdahl y cols., 2002). Luego en 2004 y 2008 se reportó más contundentemente el rol que cumple el receptor TLR4 en el desarrollo del remodelamiento cardiaco post infarto *in vivo*. Se demostró que animales deficientes en la señalización vía TLR4 desarrollan menor hipertrofia cardiaca, una mejora en la función cardiaca y una menor secreción de citoquinas pro-inflamatorias post-infarto, demostrando el papel de este receptor en el proceso de

remodelamiento cardiaco. Interesantemente, en los animales deficientes en la señalización, junto a estas mejoras funcionales se pudo observar que la deposición de colágeno aumentó significativamente en las zonas infartadas en correlación a una significativa disminución en la actividad de MMP-2 y MMP-9, desconociéndose el rol de este receptor en el desarrollo de fibrosis y en las principales células involucradas en este proceso como fibroblastos y miofibroblastos, pero sugiriendo un rol clave de este receptor en la deposición de colágeno y actividad de MMPs (Timmers y cols., 2008, Shishido y cols., 2003).

### **1.12. TLR-4 en fibroblastos cardiacos.**

En la literatura se ha descrito la presencia del TLR4 en FC y su activación asociada a DAMPs en la fibrosis cardiaca (Sandanger 2013). Además nuestro laboratorio ha demostrado que la activación de este receptor en el FC, aumenta la expresión de citoquinas proinflamatorias, lo que parece indicar que el TLR-4 tendría un rol protagónico en la etapa inflamatoria de la reparación cardiaca.

### **1.13. Mediadores humorales de la inflamación: el papel de las proteínas de adhesión**

Después de la activación del sistema inmune innato, varios mediadores inflamatorios son liberados y células inflamatorias son atraídas a la zona de la lesión.

Las moléculas de adhesión celular (CAMs) son proteínas de superficie que modulan la comunicación entre diferentes tipos celulares. Entre las CAMs están la familia de las integrinas, cadherinas, selectinas, proteoglicanos asociados a membrana e inmunoglobulinas. En la familia de las inmunoglobulinas están las proteínas conocidas como molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y molécula de adhesión intercelular (ICAM-1). Evidencias indican que la expresión de las CAMs en el tejido cardiaco aumenta en la inflamación originada por I/R y miocarditis (Kukiella y cols., 1993, Seko y cols., 1996). Las moléculas de adhesión de la familia selectina (E-, L- y P selectinas) median la captura inicial de los leucocitos, y ratones KO para estas proteínas muestran menor grado de infiltración

de células inflamatorias en I/R (Kakkar y cols., 2004). Por otro lado, ICAM-1 contribuye al proceso inflamatorio facilitando la adhesión y extravasación de leucocitos al sitio de la inflamación (Kakkar y cols., 2004). En la inflamación cardiaca las células residentes y los leucocitos infiltrados liberan IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , las que activan la transcripción de genes que codifican para CAMs', a través de la activación de los factores transcripcionales NF- $\kappa$ B y AP-1. Kacimi y cols., (1998) demostraron que las citoquinas y LPS inducen la expresión de CAMs en FC y miocitos cardiacos. En FC humanos las citoquinas inflamatorias liberadas durante el infarto del miocardio inducen la expresión de E-selectina e ICAM-1 (Porter y cols., 2009). Finalmente, la sobre-expresión de LOX-1 en FC induce la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, denotando con ello que los FC toman un fenotipo parecido al de una célula endotelial, lo que sugiere que tendrían alguna función en el reclutamiento de neutrófilos en el infarto cardiaco (Chen y cols., 2005). Sin embargo, no se ha caracterizado si la activación del TLR4 induce la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y selectinas en FC.

Las evidencias sugieren que las vías mediadas por los TLR4, y tras su activación las proteínas de adhesión desempeñan un papel importante en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria del infarto cardiaco, principalmente mediante la activación del factor transcripcional NF- $\kappa$ B. Sin embargo, información concerniente a estos tópicos es desconocida en FC.

#### **1.14. NF- $\kappa$ B y expresión de mediadores de la respuesta inflamatoria en FC.**

NF- $\kappa$ B es un factor transcripcional que pertenece a la categoría de los factores de transcripción primarios de "acción rápida" (factores de transcripción que están presentes en las células en un estado inactivo y no requieren nueva síntesis proteica para ser activados) y está implicado en respuestas celulares a estímulos tales como ROS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LPS, etc. NF- $\kappa$ B desempeña un papel clave en la regulación de la respuesta inmune frente a una infección, y una deficiencia en la regulación de este factor se ha relacionado con enfermedades inflamatorias y autoinmunes. En inmunidad NF- $\kappa$ B es un factor importante de transcripción que regula los genes responsables, tanto de la respuesta inmune

innata como adaptativa, por lo que no es sorprendente encontrar a NF- $\kappa$ B crónicamente activo en muchas enfermedades inflamatorias [36]. La señalización de TLR converge en la activación de NF- $\kappa$ B. En FC NF- $\kappa$ B regula una gran cantidad de efectos, entre ellos apoptosis (Sangeetha y cols., 2011), proliferación (Hattori y cols., 2007), actividad de las MMPs (Cortez y cols., 2007, Xie y cols., 2004) y la expresión de moléculas de adhesión (Kacimi y cols., 1998)

#### **1.15. Rol de NF- $\kappa$ B en la expresión de moléculas de adhesión gatillada por TLR4.**

Respecto de la activación de TLR4 se conoce que su activación conduce a la expresión de proteínas de adhesión a través de NF- $\kappa$ B, (Menghini y cols., 2014). Sin embargo, se desconoce si en el FC la activación de TLR4 tiene algún papel en la expresión de proteínas de adhesión.

En base a estos antecedentes surgen las siguientes interrogantes:

- ¿Están presentes todas las vías de señalización río abajo de la activación de TLR4 en el FC?, es decir ¿se activan tanto NF- $\kappa$ B como las MAPK y AKT?
- ¿La activación de TLR-4 en el FC induce un aumento en los niveles proteicos de ICAM-1 y VCAM-1?
- Si la respuesta a la interrogante anterior es afirmativa ¿Qué vías de señalización estarían involucradas?

## **2. HIPÓTESIS**

*“La activación de TLR4 por LPS induce un aumento en los niveles proteicos de ICAM-1/VCAM-1 vía NF- $\kappa$ B, en fibroblastos cardiacos de rata adulta”.*

## **3. OBJETIVOS**

Todos los objetivos se realizaron en FC de rata adulta.

- 1.- Determinar si el aumento en los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 está asociado a la activación de TLR4.
- 2.- Evaluar si la vía transduccional asociada a NF- $\kappa$ B participa en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Reactivos

Se obtuvieron de:

Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): Ketamina, xilazina, colagenasa, los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo y ratón conjugados con peroxidasa de rábano, Tritón X-100, anti-GAPDH, anti- $\beta$ -tubulina.

Gibco BRL (Carlsbad EEUU): Todos los medios de cultivo, suero fetal bovino (FBS) y tripsina-EDTA.

Cell Signalling Technology (Beverly, MA): Los anticuerpos anti-p-p65NF- $\kappa$ B, anti-p-Akt (s473), anti-p-p44/p42 MAPK, anti-p-p38.

Abcam (Cambridge, UK) : los anticuerpos anti-vimentina.

PerKinElmer Life Sciences, Inc (Boston, EEUU): El reactivo Western Lightning .

Merck (Darmstadt, Alemania): Los compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes.

Invivogen (San Diego, EEUU): TAK-242 y LPS-EB Ultrapuro específico para TLR-4.

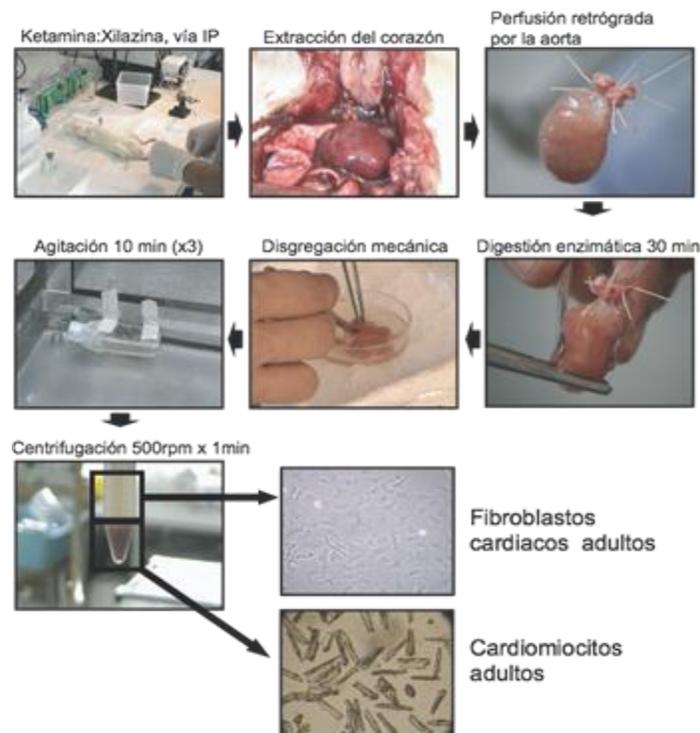
### 4.2. Obtención de FC de rata adulta por el método de Langerdorff.

El procedimiento se realizó según lo descrito por Claycomb y cols., (1984), con algunas modificaciones, se inició anestesiando una rata macho adulta (Sprague-Dawley, 200 – 300 g) con mezcla ketamina-xilazina (66 y 1.6 mg/kg respectivamente, vía intraperitoneal). La tapa torácica se removió por toracotomía bilateral y se escindió el corazón, perfundiéndose retrógradamente por la aorta a un flujo 4 mL/min en etapas sucesivas de la siguiente manera:

- Primero por perfusión por 1 min con tampón Gerard: NaCl (128 mM), KCl (4 mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,19 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,01 mM), MgSO<sub>4</sub> (1,39 mM), HEPES (10 mM), glucosa (5,5 mM) y piruvato de sodio (2 mM); pH 7,4 y suplementado con 2 mM CaCl<sub>2</sub>.
- Luego el corazón aislado se perfundió por 2 min con tampón Gerard suplementado con EGTA 2 mM.

- Finalmente se recirculó por 30 min tampón de digestión (colagenasa tipo II 0,1 % p/v en tampón Gerard).

Al cabo de este tiempo, el corazón se disgregó mecánicamente y a continuación se agitó a 37°C en un frasco con medio de digestión. Las células cardiacas presentes se retiraron cada 15 min, reponiéndose simultáneamente el tampón de digestión. Lo anterior se repitió, al menos, 3 veces y la suspensión celular se centrifugó cada vez a 500 rpm por 1 min. Tanto la pella enriquecida en cardiomiocito como el sobrenadante enriquecido en FC se trataron independientemente. Los FC del sobrenadante antes mencionado se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Luego se resuspendieron con medio DMEM-F12/ 5% FBS/ 10% FCS y se sembraron en placas de cultivo de 100 mm. Al cabo de 1 h, el medio se renovó para remover las células muertas y/o no adheridas. Los FC se incubaron en DMEM-F12/ 5% FBS/10% FCS con 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire a 37°C hasta un 90% - 100% de confluencia (Figura 4). Luego se expandieron hasta pasaje 1, previo lavado de los cultivos y tratamiento con tripsina-EDTA.



**Figura 4.** Esquema del procedimiento general de obtención de fibroblastos cardiacos de ratas adultas.

### **4.3. Cultivo 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%. A continuación, los fibroblastos se soltaron con tripsina 0,1% en PBS y fueron contados por el método de exclusión de azul de Tripán y posteriormente se sembraron en placas plásticas de cultivo celular de 60 y 35 mm a una densidad de 20.000 células/cm<sup>2</sup> en medio DMEM F-12 suplementado con FBS 10% (pasaje 1). Luego de que las células se encontraran adheridas al plástico, fueron lavadas con PBS y mantenidas en medio DMEM F-12 hasta la realización del experimento.

### **4.4. Preparación de extractos celulares totales**

Para la determinación de los niveles proteicos de ICAM-1, VCAM-1, p-ERK1/2, p-JNK, p-p38, p-Akt, GAPDH y  $\beta$ -Tubulina por WB, se prepararon extractos proteicos totales desde cada una de las placas de cultivo previamente estimuladas. La realización de este procedimiento se inició lavando tres veces las células en placas de cultivo con PBS 1X frío y luego se lisaron con 50  $\mu$ L de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,2; EDTA 5 mM; NaCl 150 mM; Tritón X-100 1% v/v; SDS 0,1% v/v; deoxicolato 1% v/v; leupeptina 2  $\mu$ g/mL; aprotinina 10 mM; PMSF 1 mM y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100  $\mu$ M). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (BioRad protein assay). Las proteínas se denaturaron en tampón SDS-PAGE 4X a 40 °C por 5 min (glicerol 20 mL, 2-mercaptoetanol 10 mL, SDS 5 g, Tris base 1,51 g, Azul de bromofenol 0,01 g, agua csp. 100 mL, a pH 6,8 con HCl), y se mantuvieron a -20°C, hasta su utilización.

### **4.5. Electroforesis**

Los extractos proteicos obtenidos de la lisis de las células, se sometieron a electroforesis en geles al 12%-10% de acrilamida/bisacrilamida para la separación y resolución de las proteínas de acuerdo a peso molecular. Los geles se cargaron

con 30 µg de extracto proteico. El gel concentrador (stacking) se preparó al 5% de acrilamida/bisacrilamida. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 100 V en tampón de electroforesis.

#### **4.6. Electrotransferencia**

Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con un poro de 0,2 µm a un amperaje constante de 350 mV por 90 minutos en tampón de transferencia.

#### **4.7. Immunowestern blot**

A continuación, las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con leche descremada al 5% en TBS-Tween. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con anticuerpos primarios anti p-NF-κB, anti p-ERK ½, anti p-Akt, anti p-p38, (dilución 1:1000), anti β-tubulina y anti β-GAPDH (dilución 1:50000), por dos horas a temperatura ambiente y anti ICAM-1, anti VCAM-1 (dilución 1:200) toda la noche a 4°C con agitación suave. Luego se lavaron con TBS-Tween e incubaron con el anticuerpo secundario anti conejo o anti ratón conjugado a la peroxidasa del rábano, según corresponda. Para la detección de la actividad enzimática proporcional a la cantidad de proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en solución de ECL y se expusieron a la película de fotografía Kodak-Biomax o AGFA. Las películas se digitalizaron y las imágenes se cuantificaron por densitometría con ayuda del programa computacional Image J. Después de realizar los ensayos de Western blot, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 45 min en una solución de rojo Ponceau (rojo Ponceau 2%, TCA 30%, ácido sulfosalicílico 30%) para desprender los anticuerpos, posteriormente se lavaron en TBS 1X / Tween-20 al 0,1% por tres veces. Luego de este tratamiento, las membranas fueron reutilizadas para nuevos ensayos de Western blot.

#### **4.8. Inmunocitofluorescencia**

Los FC se sembraron a una densidad de  $0,1 \times 10^6$  células/pocillo, sobre cubreobjetos de vidrio. Luego del estímulo, las células se lavaron con PBS frío y se fijaron a cubreobjetos de vidrio por 10 minutos con paraformaldehído al 4% en PBS, luego se permeabilizaron con tritón X-100 0,1% 15 min y se bloquearon con BSA 3% por 1 hora. Las preparaciones se incubaron con anticuerpos primarios anti TLR-4, anti  $\alpha$ -SMA, anti NF- $\kappa$ B o anti-vimentina, durante toda la noche a 4°C y posteriormente con anticuerpos secundarios Alexa fluor 488 y/o 586, según correspondiera. 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 Karl-Zeiss confocal. El análisis de las imágenes se realizó con el software Image J.

#### **4.9. Diseño experimental**

##### **4.9.1 Objetivo 1**

Para la determinación del ensayo de viabilidad con LPS, los FC en pasaje 1 se cultivaron en ausencia de suero con medio DMEM-F12 y se mantuvieron en presencia de LPS 1  $\mu$ g/mL por 24 y 48 hrs. A continuación, la viabilidad celular fue determinada por conteo celular por exclusión de azul de Tripán.

##### **4.9.2 Objetivo 2**

Para determinar el aumento en los niveles proteicos de ICAM-1 y VCAM-1, las células en pasaje 1 se cultivaron en ausencia de suero y se estimularon con LPS 1  $\mu$ g/mL por 4, 8, 24 y 48 horas (estudio tiempo respuesta). Posteriormente se lisaron con tampón de lisis y los extractos proteicos fueron sometidos a WB, las bandas proteicas se detectaron con los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes.

### **4.9.3 Objetivo 3**

Para determinar la participación de la vía NF- $\kappa$ B en el aumento en los niveles proteicos de ICAM-1 y VCAM-1 gatillada por TLR-4, primero se evaluó la activación de NF- $\kappa$ B por WB e inmunofluorescencia en donde los FC en pasaje 1 mantenidos en cultivo celular privados de suero se estimularon con LPS 1 $\mu$ g/mL durante 5, 15, 30 y 60 min y posteriormente se lisaron con tampón de lisis. Los extractos proteicos fueron sometidos a WB. Para la realización de inmunofluorescencia, las células se privaron de suero y se mantuvieron en DMEM-F12 en presencia de LPS 1 $\mu$ g/mL durante 5, 15, 30 y 60 min, para luego ser fijadas en cubreobjetos.

A continuación los FC pasaje 1 privados de suero, se estimularon con LPS 1  $\mu$ g/mL durante 24 horas en presencia de los inhibidores de TLR-4 (TAK242) 4 $\mu$ M, y NF- $\kappa$ B (BAY117085) 0.2  $\mu$ M, posteriormente las células se lisaron con tampón de lisis y los extractos proteicos fueron sometidos a WB. Las bandas proteicas se detectaron con los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes.

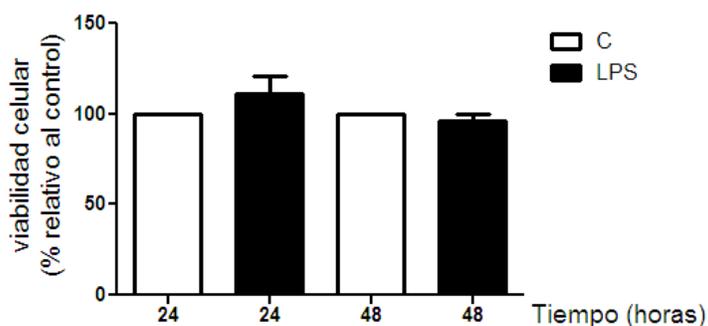
### **4.10. Expresión de resultados y análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  D.S. (n=3 preparaciones celulares independientes). Las comparaciones entre los distintos grupos experimentales se realizó utilizando t-Student de dos colas o análisis de ANOVA y postest estadístico de Bonferroni o Dunnet según correspondiera. El nivel de significancia establecido fue de un  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. LPS no produce muerte celular en el fibroblasto cardiaco

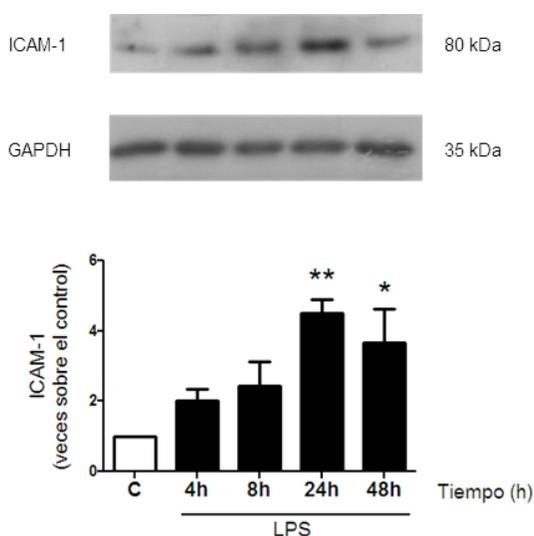
En la literatura hay una gran cantidad de trabajos que reportan el uso de LPS en distintos tipos celulares, incluyendo el FC (Wong y cols., 2004, Voss y cols., 2014, Tomita y cols., 2015), lo que indica una seguridad en su uso a nivel celular. Sin embargo, para demostrar el **objetivo 1** de esta memoria, los FC se estimularon con LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 24 y 48 horas, ya que esta concentración y tiempo serán los utilizados en los distintos experimentos a lo largo de este trabajo y se determinó la viabilidad del FC por conteo celular por exclusión con azul de Tripán. Los resultados mostraron que LPS no produjo muerte celular a ningún tiempo, como se muestra en la **Figura 5**. Además, se realizó un experimento con LPS concentración dependiente, desde 0,1 hasta 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  usando el mismo ensayo de viabilidad celular y se observó que LPS no produce muerte celular, incluso a la concentración mayor de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (datos no mostrados).



**Figura 5. Viabilidad de fibroblastos cardiacos estimulados con LPS.** Fibroblastos cardíacos estimulados con LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a los tiempos indicados. La viabilidad celular fue determinada por conteo celular por exclusión de azul de Tripán.

## 5.2. LPS induce un aumento en los niveles de ICAM-1 a través de TLR4.

Dado que no existe evidencia que indique el rol de TLR4 en la expresión de proteínas de adhesión en el FC, nuestro objetivo fue determinar si este receptor era capaz de inducir un aumento en los niveles de ICAM-1. Para este fin, se estimularon FC con LPS, durante 48 hrs y se observó un aumento significativo en los niveles proteicos de ICAM-1, de una manera tiempo dependiente, a partir de las 24 hrs, como lo muestra la **Figura 6**.

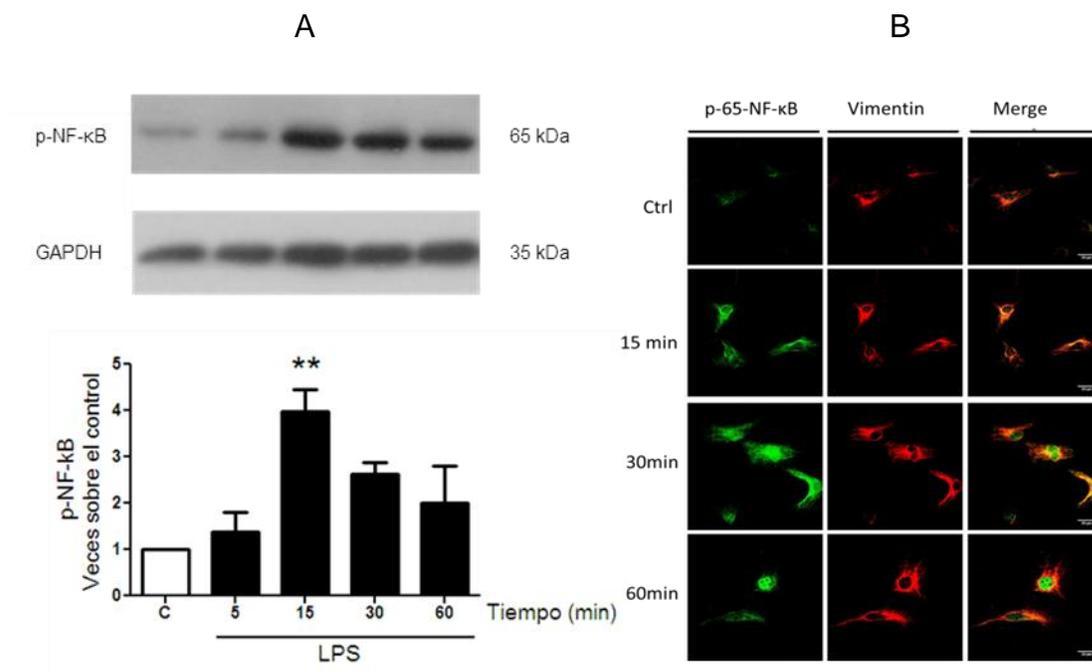


**Figura 6. LPS induce un aumento en los niveles de ICAM-1:** Fibroblastos cardiacos de ratas adultas fueron estimulados con LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) por los tiempos indicados y se determinó la expresión de ICAM-1, mediante WB. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados muestran la media  $\pm$  SEM.  $n=3$ . \*  $p<0.05$  y \*\*  $p<0.01$  v/s control.

## 5.3. LPS activa la vía NF- $\kappa$ B a través de TLR-4.

En los últimos años se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios acerca del papel de NF- $\kappa$ B en procesos inflamatorios (Kurpios-Piec y cols., 2015, Hebeda y cols., 2011, Binion y cols., 2009). Del mismo modo está bastante reportado que LPS a través de TLR-4 activa la vía NF- $\kappa$ B (Menghini y cols., 2014). Para confirmar este efecto en nuestro modelo celular, en conjunto con Pedro Ayala, se trataron FC con LPS 1 $\mu\text{g/mL}$  y se observaron cambios en el estado de

fosforilación y translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B, la cual es fosforilada a partir de los 5 min teniendo un máximo a los 15 min (**Figura 7** panel A). La translocación nuclear de NF- $\kappa$ B (**Figura 7** panel B) ocurre más tardíamente teniendo un pick a los 60 min.



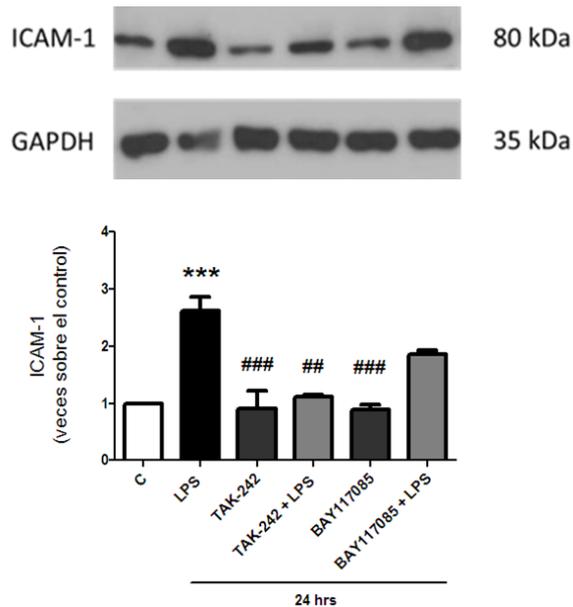
**Figura 7. LPS activa a NF- $\kappa$ B.** (A) Fibroblastos cardiacos de ratas adultas fueron estimulados con LPS 1  $\mu$ g/mL por 5, 15, 30 y 60 minutos y se determinó el nivel de fosforilación de la proteína NF- $\kappa$ B. (B) **Translocación nuclear de NF- $\kappa$ B.** Los fibroblastos fueron estimulados con LPS 1  $\mu$ g/mL por 15, 30, 60 min para ser sometidos a inmunofluorescencia para NF- $\kappa$ B (verde) y vimentina (rojo). Imagen pertenece a experimento de Pedro Ayala. Las fotografías fueron obtenidas por microscopia confocal con un aumento de 40x (B). \*\*  $p < 0,05$  vs Control.

#### 5.4. Participación de TLR-4 y NF- $\kappa$ B en el aumento en los niveles de ICAM-1.

Si bien es cierto hay reportes que indican que ciertos LPS activa a más de un tipo de TLR (Means y cols., 2000), en esta memoria se utilizó LPS-EB, que según indicaciones del fabricante es específico para TLR-4. No obstante, para descartar que LPS induce un aumento en los niveles de ICAM-1 de manera independiente de TLR-4, los FC se trataron con LPS, en presencia de TAK-242

(un inhibidor intracelular de TLR4), observándose una reversión del efecto de LPS, comparable al nivel del control (**Figura 8**).

Luego de determinar que TLR-4 activa la vía NF- $\kappa$ B, hipotetizamos que la inducción en ICAM-1 y VCAM-1 gatillada por LPS, ocurre a través de esta vía. Para este fin, se escogió el tiempo 24 hrs porque en este tiempo se observó el aumento máximo en los niveles de ICAM-1, y se estimularon FC en presencia del inhibidor de la vía NF- $\kappa$ B (BAY117085). Nuestros resultados revelaron que NF- $\kappa$ B no participa en la inducción de los niveles de ICAM-1 gatillados por TLR-4 (**Figura 8**), lo cual fue inesperado debido a lo reportado en la literatura (Menghini y cols., 2014).



**Figura 8. Participación de TLR-4 y NF- $\kappa$ B en el aumento de los niveles de ICAM-1 inducido por LPS.** Fibroblastos cardiacos de ratas adultas fueron estimulados con LPS 1  $\mu$ g/mL durante 24 horas en presencia de TAK242 (4 $\mu$ M), BAY117085 (0.2  $\mu$ M) y se determinaron los niveles de ICAM-1, mediante Western Blot. Se utilizó GAPDH como control de carga. Todos los inhibidores fueron agregados una hora antes del estímulo con LPS. Los resultados muestran la media  $\pm$  SEM. \*\*\* < 0.001 v/s control. ## p < 0.01, y ### < 0.001 v/s LPS.

### **5.5. Activación de ERK 1/2, JNK, p38 y Akt por LPS.**

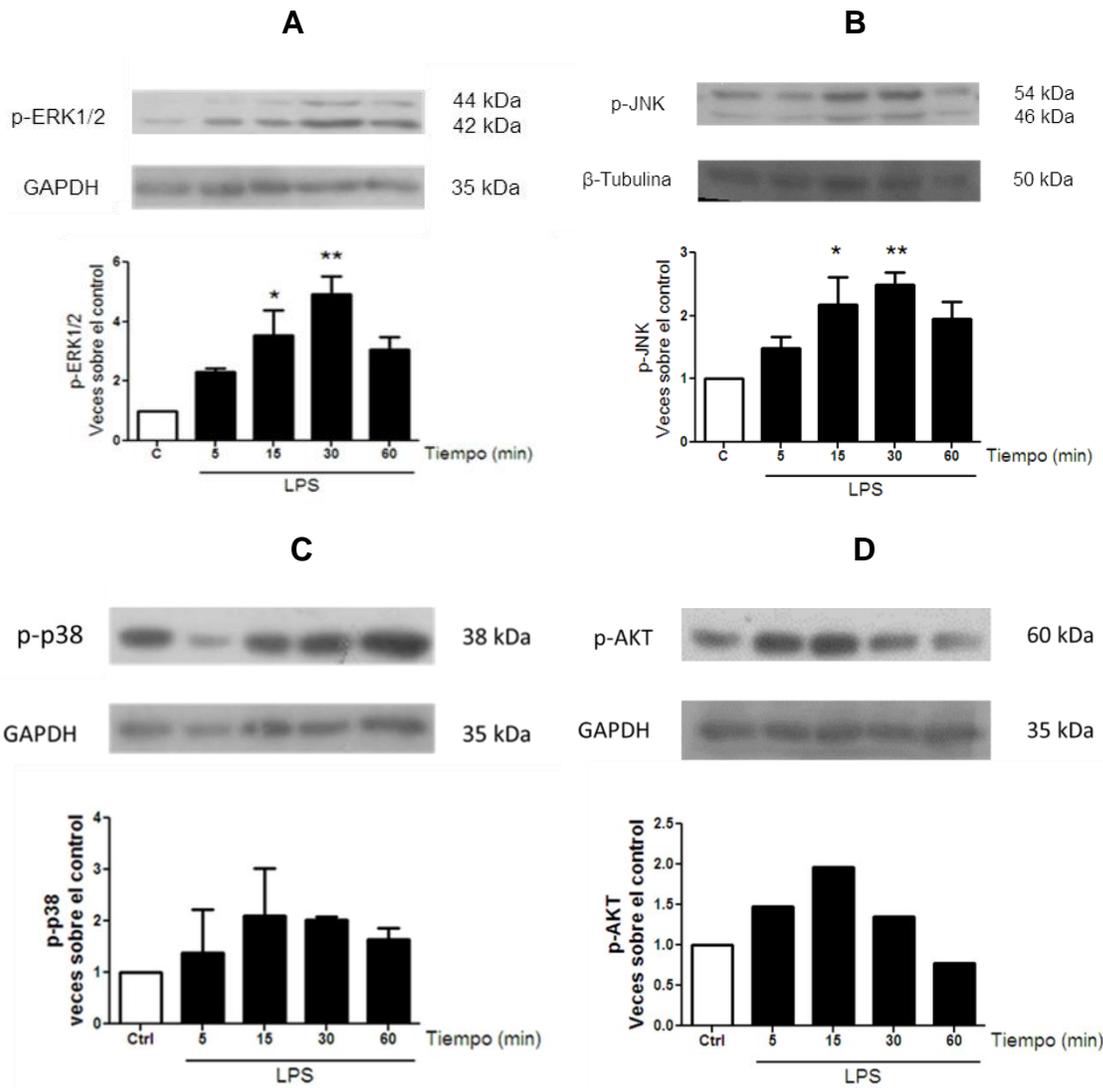
Luego de comprobar que NF- $\kappa$ B no participa en la inducción de ICAM-1, se procedió a evaluar tanto la MAPK, como Akt en busca de dilucidar cuál de estas vías era(n) la(s) responsable(s) del aumento de los niveles de ICAM-1. En la **Figura 9** (A-D) se puede observar que LPS 1 $\mu$ g/mL es capaz de inducir en forma diferencial cambios en el estado de fosforilación de las proteínas ERK1/2, donde la fosforilación ocurre a partir de los 15 min teniendo un pick a los 30 min (panel A); JNK, de igual forma, es fosforilada a partir de los 15 min con un máximo a los 30 min (panel B); p38 muestra una tendencia a aumentar a partir de los 5 min (panel C) y Akt, al igual que p38, muestra una tendencia a aumentar tempranamente (panel D).

### **5.6. TLR-4 induce un aumento en los niveles de ICAM-1, via ERK1/2 y JNK.**

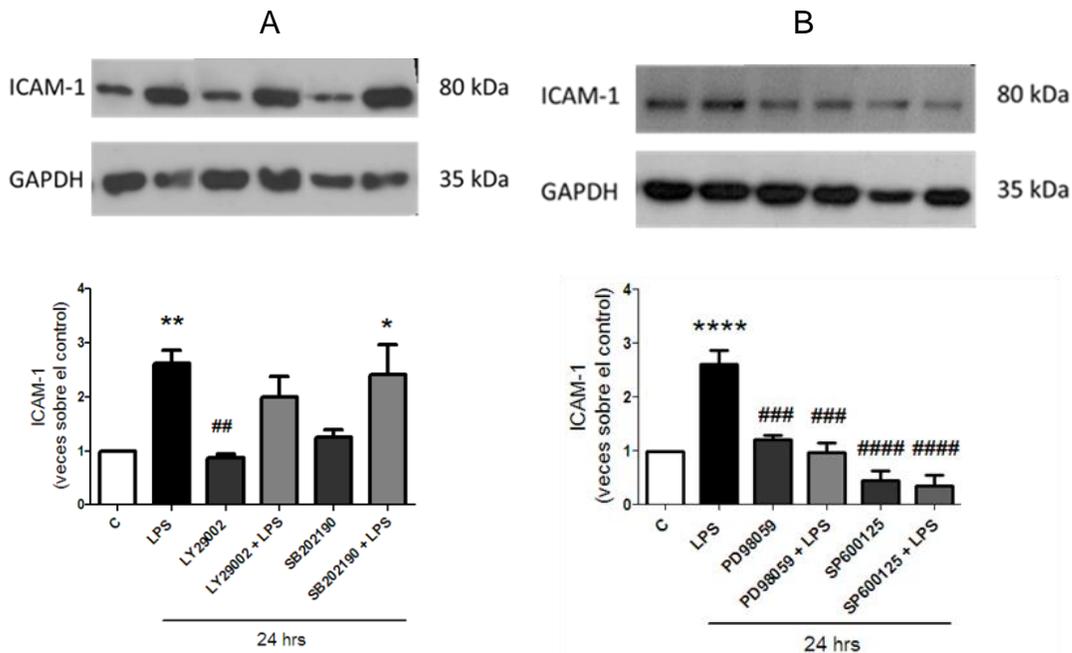
Posteriormente se estimularon FC con LPS durante 24 horas, en presencia de los inhibidores de Akt (LY294002), p38 (SB202190), ERK1/2 (PD98059) y JNK (SP600125) agregados una hora previo al tratamiento con LPS. Tanto ERK1/2, como JNK participan en el aumento en los niveles de ICAM-1, como se puede observar en la **Figura 10** (panel B), ya que la inhibición de estas vías contrarrestó el aumento en ICAM-1, incluso, en el caso de JNK, por debajo de los niveles del control, mientras que ni el inhibidor de Akt ni el de p38 fueron capaces de revertir este efecto. (**Figura 10** panel A).

### **5.7. LPS induce un aumento en los niveles de VCAM-1 a través de TLR4.**

De igual manera que con ICAM-1, se procedió a determinar el rol de TLR4 en los niveles proteicos de VCAM-1 en fibroblastos. Para esto, se estimularon FC con LPS, durante 48 hrs y se observó que LPS aumentó significativamente los niveles proteicos de VCAM-1 a partir de las 4 horas, con un pic a las 24 horas (**Figura 11**). Para confirmar que el aumento en los niveles de VCAM-1 ocurre por activación de TLR4, los FC se trataron con LPS en presencia de TAK-242, revertiéndose el efecto de LPS, a los niveles del control (**Figura 12**, panel A).



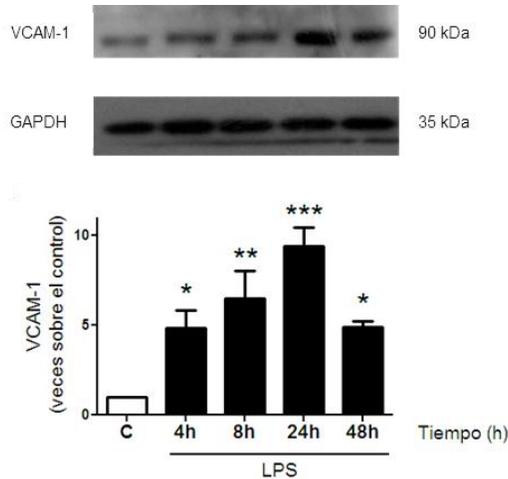
**Figura 9. LPS activa a JNK, ERK1/2, p38 y AKT.** (A) Fibroblastos cardiacos de ratas adultas fueron estimulados con LPS 1 $\mu$ g/mL por 5, 15, 30 y 60 minutos y se determinó el nivel de fosforilación de JNK (A), ERK1/2 (B), p38 (C) y AKT (D). Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados muestran la media  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  v/s control.



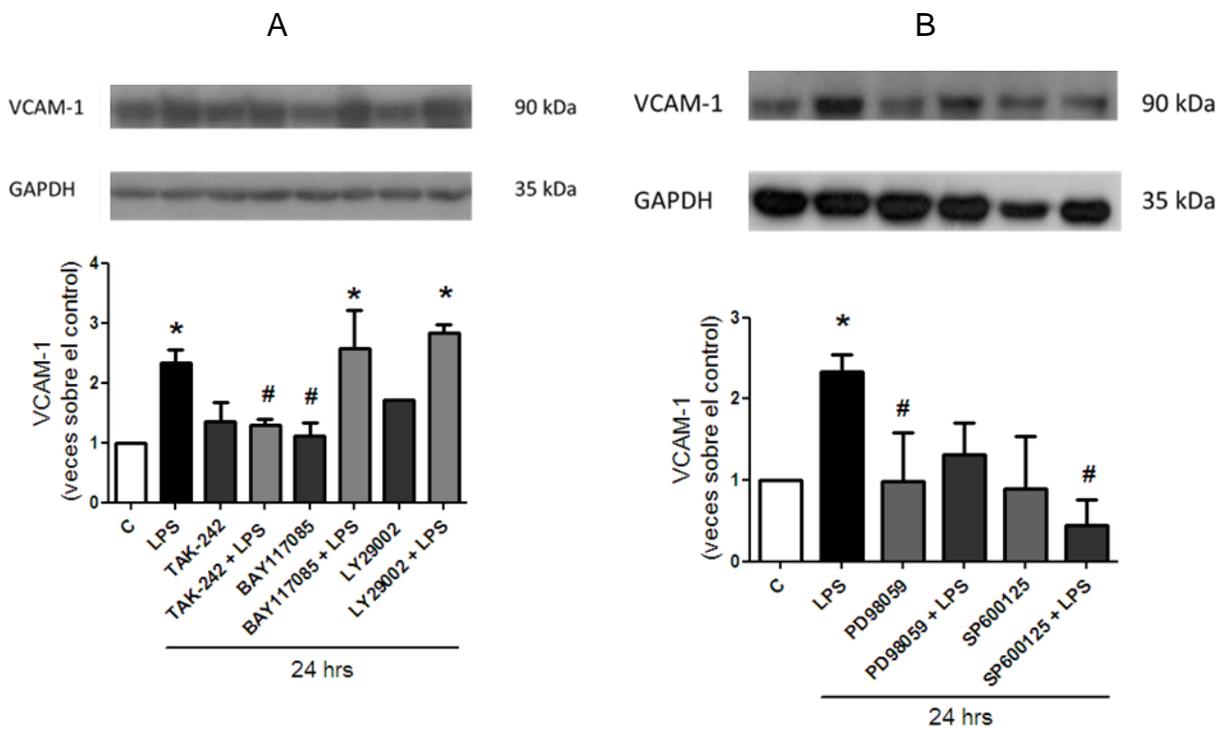
**Figura 10. Señalización involucrada en el aumento de los niveles de ICAM-1 inducida por LPS.** Fibroblastos cardiacos de ratas adultas fueron estimulados con LPS 1 μg/mL durante 24 horas en presencia de, LY294002 (1 μM), SB202190 (10 μM), PD98059 (20 μM), SP600125 (5 μM), y se determinaron los niveles de ICAM-1, mediante Western Blot. Se utilizó GAPDH como control de carga. Todos los inhibidores fueron agregados una hora antes del estímulo con LPS. Los resultados muestran la media ± SEM. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, y \*\*\*\* p < 0.0001 v/s control. ## p < 0.01, ### p < 0.001 y ##### p < 0.0001 v/s LPS.

### 5.8. LPS induce un aumento en los niveles de VCAM-1, vía JNK.

A continuación se determinó la señalización que gatillaba este aumento. Con este fin, los FC se trataron durante una hora con los inhibidores de las vías NF-κB (BAY117085), Akt (LY294002), p38 (SB202190), ERK1/2 (PD98059) y JNK (SP600125) y a continuación se estimularon 24 horas con LPS, por ser éste el tiempo donde se vió el máximo aumento en los niveles de VCAM-1. Los resultados mostraron que sólo JNK participa en el aumento en los niveles de VCAM-1, (Figura 12, panel B), revirtiendo el aumento aún por debajo de los niveles del control, mientras que ni el inhibidor de Akt ni el de ERK1/2, fueron capaces de revertir este efecto. (Figura 12, panel A y B).



**Figura 11. LPS induce un aumento en los niveles de VCAM-1:** Fibroblastos cardiacos de ratas adultas fueron estimulados con LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) por los tiempos indicados y se determinó la expresión de VCAM-1, mediante Western Blot. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados muestran la media  $\pm$  SEM.  $n=3$ . \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  y \*\*\*  $< 0.001$ v/s control.



**Figura 12. Señalización involucrada en el aumento de los niveles de VCAM-1 inducida por LPS.** Fibroblastos cardiacos de ratas adultas fueron estimulados con LPS 1  $\mu\text{g/mL}$  durante 24 horas en presencia de TAK242 (4 $\mu\text{M}$ ), BAY117085 (0.2  $\mu\text{M}$ ), LY294002 (1 $\mu\text{M}$ ), PD98059 (20 $\mu\text{M}$ ), SP600125 (5 $\mu\text{M}$ ) y se determinaron los niveles de VCAM-1, mediante Western Blot. Se utilizó GAPDH como control de carga. Todos los inhibidores fueron agregados una hora antes del estímulo con LPS. Los resultados muestran la media  $\pm$  SEM. \*  $p<0.05$  v/s control. #  $p<0.05$  v/s LPS.

## 6. DISCUSIÓN

Los FC son reconocidos como el principal tipo celular responsable del mantenimiento homeostático de la MEC en el corazón normal. Sin embargo, en condiciones patológicas se comportan como mediadores inflamatorios y fibróticos en el remodelamiento del miocardio (Brown y cols., 2005). Aunque no pertenece a las células inmunes, como macrófagos y linfocitos, la capacidad de los fibroblastos para producir citocinas, quimiocinas, y otros mediadores proinflamatorios localmente en los tejidos, indica firmemente que los fibroblastos participan activamente en la inflamación.

El ensayo de viabilidad demostró que LPS, ya sea de manera tiempo-dependiente o concentración-dependiente, no produce muerte celular en el FC, Este hallazgo está de acuerdo a lo demostrado en la literatura (Wong y cols., 2004, Voss y cols., 2014, Tomita y cols., 2015).

Si bien LPS aparece como un estímulo asociado a la inflamación no estéril, la importancia en esta memoria se centró en el receptor TLR-4, el cual es activado indistintamente por DAMPs o PAMPs. Por otro lado, se ha descrito que LPS a una concentración de 1 µg/mL es específico para TLR-4. Lo anterior, sumado a que el LPS es ultrapuro, permite asegurar que la activación específica de TLR4 en el modelo celular utilizado en este trabajo.

En el presente estudio se estimularon FC de ratas adultas con LPS para estudiar el rol de TLR-4 en la inducción de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1. Los resultados revelaron que LPS fue capaz de inducir un aumento en los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 durante 48 horas. Este hallazgo coincide con lo descrito por Kacimi y cols. (1998), donde se describió en FC de rata que LPS aumentó la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 por 6 a 12 horas. Si bien en este trabajo no se exploraron tiempos mayores, en base a nuestros resultados, podemos esperar que los niveles aumentaran aún más a tiempos más largos. Cuando se utilizó un inhibidor específico del TLR-4 (TAK-242), observamos que se revertía la inducción de los niveles de ICAM-1/VCAM-1. Esto confirmó la

especificidad de nuestro estímulo y está de acuerdo a lo observado por Rajamani y cols., 2014.

Por otro lado, en la literatura existe bastante evidencia indicando que citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  son capaces de aumentar la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en fibroblastos de diversos orígenes. (Song y cols., 2011, Spoelstra y cols., 2000) Particularmente, en FC dos trabajos independientes, demostraron que IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  aumentan la expresión de ICAM-1 a partir de las 6 horas (Neil y cols., 2011, Kacimi y cols., 1998). Además, resultados de nuestro laboratorio indican que FC estimulados con LPS aumentan la expresión y síntesis, tanto de TNF- $\alpha$ , como de IL-1 $\beta$  y para el caso de TNF- $\alpha$ , aumentan igualmente su secreción (la secreción de IL-1 $\beta$  requiere el fraccionamiento de la forma pro-IL-1 $\beta$  previo a su secreción, realizado por el inflammasoma. El ensamblado del inflammasoma necesita ATP como sustrato y en condiciones in vitro no está presente, por lo que en este trabajo no se detectaron niveles de IL-1 $\beta$  secretados al medio). En base a todos estos antecedentes sugerimos que la activación de TLR-4 por LPS, induce la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 a tiempos tempranos, juntamente con la síntesis y secreción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , quienes de manera autocrina promueven un aumento más pronunciado en la expresión de dichas proteínas a los tiempos más tardíos.

Independiente, de si el aumento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 es gatillado únicamente por LPS, o es mantenido por otro estímulo, el aumento en los niveles de CAMs en la superficie de los fibroblastos gatillarían la movilización e infiltración de leucocitos al tejido cardiaco, dando como resultado la exacerbación de la respuesta inflamatoria en el tejido. En este sentido, Couture y cols., (2009) demostraron que los leucocitos se adhieren a los FC, particularmente los neutrófilos y linfocitos B. Además, observaron que los FC eran capaces de fagocitar a los leucocitos, lo que equivale a la migración transcelular de los leucocitos a través de los fibroblastos. Este paso fue dependiente principalmente de las interacciones moléculas de adhesión-receptor; ICAM-1 / integrina  $\beta$ 2 y VCAM-1 / integrina  $\alpha$ 4. Además, algunas evidencias indican que la unión de

neutrófilos a FC a través de ICAM-1 podría tener efectos moduladores directos sobre la función del FC. Hao y cols., por ejemplo, demostraron que el contacto célula-célula entre leucocitos y fibroblastos renales estimula la secreción de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) por los fibroblastos, un efecto que puede ser inhibido por un anticuerpo neutralizante contra ICAM-1 (Hao y cols., 2003). De acuerdo a nuestros resultados, la activación de TLR-4 contribuiría a una mayor adhesión leucocitaria al tejido cardíaco, efecto que podría ser revertido por un inhibidor del TLR-4. Esta hipótesis estaría en concordancia a un estudio realizado en células endoteliales de la microvasculatura retiniana humanas (HMVRECs), donde TAK-242 atenuó los niveles de ICAM-1/VCAM-1 y disminuyó la adhesión de monocitos (Rajamani y cols., 2014)

Con el objetivo de dilucidar nuevos blancos farmacológicos en el proceso inflamatorio del tejido cardíaco, se estudiaron las vías transduccionales que conducían al aumento de las CAMs. En la literatura, hasta ahora, no había evidencia que indicara las vías transduccionales involucradas en el aumento de las CAMs por TLR-4 en FC, siendo nuestro trabajo el primero en demostrar que, tanto JNK como ERK-1/2, participan en el aumento en los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 gatillado por TLR-4 en FC de ratas. No obstante, este resultado estaría de acuerdo con otros estudios realizados en modelos celulares intersticiales de válvula aortica y endoteliales (Song y cols., 2014, Shan y cols., 2012), indicando que las vías ERK1/2 y JNK, parecen ser esenciales en la expresión de ICAM-1/VCAM-1.

Si bien es cierto, en esta memoria nos hemos enfocado sólo en las proteínas de adhesión, la activación de las MAPK por TLR-4, conduce a una gran diversidad de efectos pro-inflamatorios, y a los tiempos aquí evaluados se han llevado a cabo la mayoría de éstos eventos, por lo que no es posible descartar que la expresión de ICAM-1/VCAM-1 sea el resultado de algún otro intermediario intracelular e incluso un receptor activado posterior a la activación de TLR-4. En este sentido, el estudio de receptores, tales como el R-TNF- $\alpha$  y el R-IL-1 $\beta$ , confirma aún más el papel de estas MAPK en la expresión de proteínas de

adhesión. Así, tanto ERK1/2 como JNK se han destacado como vías esenciales para la expresión de TNF- $\alpha$ , así demostrado por dos autores que observaron en macrófagos hepáticos murinos, que LPS indujo la activación de ERK1/2 y la subsecuente transcripción de Egr-1 contribuyendo a la expresión (Shi y cols., 2002) y secreción de TNF- $\alpha$  (Kishore y cols., 2002) a partir de 1 y 4 horas respectivamente. Además Scaldaferri y cols., (2009) demostraron que ERK1/2 participaba en la expresión de ICAM-1 gatillada por TNF- $\alpha$ , por lo que ERK1/2 sería importante tanto en la expresión-secreción como en la señalización de TNF- $\alpha$ . Por otro lado, Yao y cols., (1997) demostraron que LPS activaba la vía JNK conduciendo a la fosforilación de c-jun y la consiguiente interacción de c-jun con la región enhancer CRE/AP-1 en el promotor de TNF- $\alpha$ , en monocitos humanos.

Mohammed y cols., (2014) demostraron que la fosforilación de ERK1 gatillada por el TLR-4 era necesaria para la formación del complejo inflammasoma, observándose secreción de IL-1 $\beta$ , a partir de los 60 min, en monocitos humanos, mientras que Su y cols., (2014), encontraron un rol similar tanto para ERK1/2 como JNK, en células dendríticas derivadas de médula ósea.

Antecedentes de nuestro laboratorio, indican que la activación del TLR-4 en el FC indujo la expresión tanto de TNF- $\alpha$ , como de IL-1 $\beta$ , a partir de las 3 horas y la consiguiente secreción de TNF- $\alpha$  a las 24 horas. En estos ensayos no fueron explorados tiempos más tempranos, por lo que en base a los trabajos de Kishore y cols., (2002) y Mohammed y cols., (2014), la expresión y secreción de estas citoquinas en el FC podrían gatillarse incluso, más tempranamente.

Esto parece indicarnos que tanto la fosforilación de ERK1/2 como de JNK gatillada por TLR-4, participan activamente en la expresión y secreción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y la consiguiente activación de su receptor de manera autocrina conllevaría una expresión de ICAM-1/VCAM-1 a tiempos más tardíos.

Con respecto a la vía p38 activada por el TLR-4, las evidencias son contradictorias, indicando por un lado que contribuye a la estabilidad del mRNA de TNF- $\alpha$  (Mahtani y cols., 2001) y por otro, un efecto anti-inflamatorio que cursa con expresión de IL-10 (Drechsler y cols., 2006). No obstante, algunos trabajos

reportan un rol protagónico de p38 en la expresión de ICAM-1/VCAM-1 gatillada por TNF- $\alpha$  (Scaldaferri y cols., 2009) e IL-1 $\beta$  (Kacimi y cols., 1998). Nuestros resultados revelaron que p38 no es esencial para el aumento en los niveles de ICAM-1/VCAM-1 y esto al parecer estaría dado porque p38 es más bien requerida para la expresión de ICAM-1/VCAM-1 gatillada por IL-1 $\beta$ , y a pesar de estar demostrado que el FC secreta IL-1 $\beta$ , la razón por la que no observamos este efecto es debido a que los FC de ratas en condiciones experimentales no son capaces de secretar IL-1 $\beta$  (por lo explicado más arriba), por ende bajo estas condiciones, no habría activación del receptor.

Contrario a lo encontrado en la literatura (Menghini y cols., 2014), nuestros resultados indicaron que la activación de TLR-4 por LPS inducía un aumento en los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 independiente de la activación de NF- $\kappa$ B. Este hallazgo fue inesperado, ya que NF- $\kappa$ B está ampliamente reportado como un vía pro-inflamatoria (Kurpios-Piec y cols., 2015, Hebeda y cols., 2011, Binion y cols., 2009). Esta discrepancia podría deberse a los distintos tipos celulares estudiados (células endoteliales coronarias vs FC) o ser relativa a la especie (humana vs rata). Sin embargo, a pesar de que NF- $\kappa$ B parece no ser esencial en la señalización del TLR-4 para la inducción de las proteínas de adhesión, si lo es para R-TNF- $\alpha$  (Hosokawa y cols., 2006) y R-IL-1 (Turner y cols., 2011), por lo que su inhibición debería contribuir a disminuir los niveles de ICAM-1/VCAM-1. La explicación de porqué no observamos este efecto podría deberse; por un lado a que R-TNF- $\alpha$  gatillaría la expresión de ICAM-1/VCAM-1 a través de dos o más vías independientes, de manera que frente a la inhibición de NF- $\kappa$ B, las otras vías se encargarían de mantener la expresión de las CAMs, y por otro, a la incapacidad del FC secretar IL-1 $\beta$ , ya que nuestros medios de cultivo no tenían ATP.

Debido a que en esta memoria, no fue posible llevar a cabo un estudio exhaustivo para establecer cada una de las proposiciones aquí planteadas, sugerimos lo siguiente:

1. Estimular FC de ratas con LPS y realizar una cinética, tanto de expresión como de secreción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (agregando ATP al medio de cultivo) a

partir de tiempos tempranos, para definir con mayor precisión los tiempos a los cuales habrían efectos directos del TLR-4 y los tiempos a los que comenzarían a aparecer, más bien, los efectos de las citoquinas, mediante RT-PCR y ELISA. Para determinar que estos eventos ocurren vía ERK1/2 y JNK, se repite el experimento anterior en presencia de los inhibidores; PD98059 y SP600125

2. A los tiempos obtenidos en el punto 1, estimular FC con LPS y determinar cuáles serían los niveles de ICAM-1/VCAM-1 inducidos por TLR-4 y cuales los niveles a los que posiblemente contribuirían las citoquinas, mediante Western blot.
3. Para establecer que la expresión de ICAM-1/VCAM-1 gatillada por TNF- $\alpha$  ocurre a través de la activación de ERK1/2, p38 y NF- $\kappa$ B, los FC se estimulan con TNF- $\alpha$  en presencia de BAY117085 y se miden los niveles del mRNA y proteico de ICAM-1/VCAM-1 mediante RT-PCR y Western blot. Para establecer que la expresión de ICAM-1/VCAM-1 gatillada por IL-1 $\beta$  ocurre a través de la activación de p38 y NF- $\kappa$ B, los FC se estimulan con IL-1 $\beta$  en presencia de BAY117085 y se miden los niveles del mRNA y proteico de ICAM-1/VCAM-1 mediante RT-PCR y Western blot.
4. Para establecer si TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , participan en la expresión de ICAM-1/VCAM-1 gatillada por TLR-4, los FC se estimulan con LPS en presencia de los inhibidores del receptor de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (etanercept y anakinra, respectivamente) y se evalúa la expresión de ICAM-1/VCAM-1, mediante RT-PCR y Western blot. Para establecer que la expresión de ICAM-1/VCAM-1 ocurre por activación del TLR-4, vía ERK1/2 y JNK. Se repite el experimento anterior en presencia del inhibidor de cada vía.

En resumen, en base a todo lo discutido, podemos postular que en una condición patológica de daño al tejido cardiaco tal como el infarto agudo al miocardio, la activación del TLR-4 en el FC, aumenta de forma temprana la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 a través de ERK1/2 y JNK, permitiendo el reclutamiento e infiltración inicial de leucocitos al sitio del daño. La activación de

estas vías, paralelamente aumentarían la expresión y secreción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , las que de forma autocrina gatillarían (tal vez de forma sinérgica al TLR-4) un aumento de dichas CAMs en la superficie del FC, dando soporte a una respuesta inflamatoria sostenida. Paralelo a la secreción de las citoquinas, la interacción inicial fibroblasto-leucocitos aumentaría la producción local de quimioquinas aumentando así la afluencia de leucocitos lo que daría lugar a una respuesta inflamatoria exacerbada y sostenida en el tiempo, permitiendo coordinar la reparación cardiaca en sus distintas etapas.

Lo anterior presenta al TLR-4 como un blanco farmacológico promisorio, cuya inhibición permitiría atenuar la respuesta inflamatoria en las enfermedades cardiacas que cursan con daño y reparación patológica del tejido, permitiendo así una disminución de la fibrosis y la pérdida funcional del órgano.

## **7. CONCLUSIONES**

LPS a concentraciones entre 0,1-50 µg/ml no afecta la viabilidad del FC a las 24 y 48 hrs.

La activación de TLR-4 induce la fosforilación de las proteínas NF-κB, ERK1/2, JNK, p38 y Akt en el FC.

En el FC la activación del TLR-4 induce un aumento en los niveles de ICAM-1 y VCAM-1.

La inducción de ICAM-1/VCAM-1 por TLR-4 ocurre a través de la activación de las vías ERK1/2 y JNK en el FC.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499-511.

Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem*. 2003;278(40):38105-8.

Arslan F, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(5):292-300.

Binion DG, Heidemann J, Li MS, Nelson VM, Otterson MF, Rafiee P. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in human intestinal microvascular endothelial cells is regulated by PI 3-kinase/Akt/MAPK/NF-kappaB: inhibitory role of curcumin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;297(2):G259-68.

Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:657.

Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2005;65(1):40-51.

Castro P, Vukasovic JL, Garcés E, Sepúlveda L, Ferrada M, Alvarado S. Cardiac failure in Chilean hospitals: results of the National Registry of Heart Failure, ICARO. *Rev Med Chil* 2004;132:655-62.

Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):826-37.

Chen K, Chen J, Liu Y, Xie J, Li D, Sawamura T, Hermonat PL, Mehta JL. Adhesion molecule expression in fibroblasts: alteration in fibroblast biology after transfection with LOX-1 plasmids. *Hypertension*. 2005;46(3):622-7.

Chen T, Guo J, Han C, Yang M, Cao X. Heat shock protein 70, released from heat-stressed tumor cells, initiates antitumor immunity by inducing tumor cell chemokine production and activating dendritic cells via TLR4 pathway. *J Immunol*. 2009;182(3):1449-59.

Claycomb WC, Lanson N Jr. Isolation and culture of the terminally differentiated adult mammalian ventricular cardiac muscle cell. *In Vitro*. 1984;20(8):647-51.

Cooper LT Jr. Myocarditis. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1526-38.

Cortez DM, Feldman MD, Mummidi S, Valente AJ, Steffensen B, Vincenti M, Barnes JL, Chandrasekar B. IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP-beta, NF-kappaB, and AP-1 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(6):H3356-65.

Couture P, Paradis-Massie J, Oualha N, Thibault G. Adhesion and transcellular migration of neutrophils and B lymphocytes on fibroblasts. *Exp Cell Res*. 2009;315(13):2192-206.

Drechsler Y, Dolganiuc A, Norkina O, Romics L, Li W, Kodys, et al. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of acute alcohol on IL-10 induction involving p38 MAPK activation in monocytes. *J Immunol.* 2006;177:2592-2600.

Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, Sellevold OF, Espevik T, Sundan A. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation.* 2002;105(6):685-90.

Fink A, Reuven EM, Arnusch CJ, Shmuel-Galia L, Antonovsky N, Shai Y. Assembly of the TLR2/6 Transmembrane Domains Is Essential for Activation and Is a Target for Prevention of Sepsis. *J Immunol.* 2013;190(12):6410-22.

Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res.* 2012;110(1):159-73

Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res.* 2008;58(2):88-111.

Füri I, Sipos F, Germann TM, Kalmár A, Tulassay Z, Molnár B, Múzes G. Epithelial toll-like receptor 9 signaling in colorectal inflammation and cancer: Clinico-pathogenic aspects. *World J Gastroenterol.* 2013;19(26):4119-26.

Gaziano T, Reddy KS, Paccaud F, Horton S, Chaturvedi V. *Cardiovascular Disease. Disease Control Priorities in Developing Countries.* 2nd edition. Washington (DC): World Bank; 2006. Chapter 33.

Hao L, Okada H, Kanno Y, Inoue T, Kobayashi T, Watanabe Y, Strutz F, Muller G A, Suzuki H. Direct contact between human peripheral blood mononuclear cells and renal fibroblasts facilitates the expression of monocyte chemoattractant protein-1. *Am J Nephrol.* 2003;23(4):208-13

Hattori Y, Hattori S, Akimoto K, Nishikimi T, Suzuki K, Matsuoka H, Kasai K. Globular adiponectin activates nuclear factor-kappaB and activating protein-1 and enhances angiotensin II-induced proliferation in cardiac fibroblasts. *Diabetes.* 2007;56(3):804-8

Hebeda CB, Pinedo FJ, Vinolo MA, Curi R, Farsky SH. Hydroquinone stimulates inflammatory functions in microvascular endothelial cells via NF- $\kappa$ B nuclear activation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011;109(5):372-80.

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.* 2007;170(6):1807-16.

Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T. Cytokines differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol.* 2006;144(3):494-502.

Hori M, Nishida K. Toll-like receptor signaling: defensive or offensive for the heart?. *Circ Res*. 2008;102(2):137-9.

Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(9):1379-86

Kacimi R, Karliner JS, Koudssi F, Long CS. Expression and regulation of adhesion molecules in cardiac cells by cytokines: response to acute hypoxia. *Circ Res*. 1998;82(5):576-86.

Kakkar AK, Lefer DJ. Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4(2):154-8.

Kariko K, Ni HP, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem*. 2004;279(13):12542-50.

Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Izawa A, Takahashi Y, Masumoto J, Koyama J, Hongo M, Noda T, Nakayama J, Sagara J, Taniguchi S, Ikeda U. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2011;123(6):594-604.

Kempf T, Zarbock A, Vestweber D, Wollert KC. Anti-inflammatory mechanisms and therapeutic opportunities in myocardial infarct healing. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(4):361-9.

Kishore R, Hill JR, McMullen MR, Frenkel J, Nagy LE. ERK1/2 and Egr-1 contribute to increased TNF-alpha production in rat Kupffer cells after chronic ethanol feeding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;282:G6-G15.

Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(4):549-74.

Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(4):279-89.

Kukiella GL, Hawkins HK, Micheal LL, Manning AM, Youker K, Lane CL, Entman ML, Smith CW, Anderson DC. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in ischemic and reperfused myocardium. *J Clin Invest*. 1993;92:1504-1516.

Kurpios-Piec D, Grosicka-Maciąg E, Woźniak K, Kowalewski C, Kiernożek E, Szumiło M, Rahden-Staroń I. Thiram activates NF-kappaB and enhances ICAM-1 expression in human microvascular endothelial HMEC-1 cells. *Pestic Biochem Physiol*. 2015;118:82-9  
Laird MH, Rhee SH, Perkins DJ, Medvedev AE, Piao W, Fenton MJ, Vogel SN. TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. *J Leukoc Biol*. 2009;85(6):966-77.

Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res* 2010;106:1675-80.

Li Y, Si R, Feng Y, Chen HH, Zou L, Wang E, Zhang M, Warren HS, Sosnovik DE, Chao W. Myocardial ischemia activates an injurious innate immune signaling via cardiac heat shock protein 60 and Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2011;286(36):31308-19.

Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42(2):145-51.

Mahtani KR, Brook M, Dean JL, Sully G, Saklatvala J, Clark AR. Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. *Mol Cell Biol*. 2001;21:6461–6469.

Marchant DJ, Boyd JH, Lin DC, Granville DJ, Garmaroudi FS, McManus BM. Inflammation in myocardial diseases. *Circ Res*. 2012;110(1):126-44.

Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ. The biology of Toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000;11(3):219-32.

Menghini R, Campia U, Tesauro M, Marino A, Rovella V, Rodia G, Schinzari F, Tolusso B, di Daniele N, Federici M, Zoli A, Ferraccioli G, Cardillo C. Toll-like receptor 4 mediates endothelial cell activation through NF- $\kappa$ B but is not associated with endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2014;9(6):e99053.

Ghonime MG, Shamaa OR, Das S, Eldomany RA, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Gavrillin MA, Wewers MD. Inflammasome Priming by Lipopolysaccharide Is Dependent upon ERK Signaling and Proteasome Function. *J Immunol* 2014;192:3881-3888.

Turner NA, Das A, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE. Human cardiac fibroblasts express ICAM-1, E-selectin and CXC chemokines in response to proinflammatory cytokine stimulation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(10):1450-8.

Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF 3rd. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2001;276(13):10229-33.

O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(5):353-64.

Pankuweit S, Portig I, Maisch B. Pathophysiology of cardiac inflammation: molecular mechanisms. *Herz*. 2002;27(7):669-76.

Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009;458(7242):1191-5.

Paulus WJ. Cytokines and heart failure. *Heart Fail Monit*. 2000;1(2):50-6.

Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther*. 2009;123(2):255-78.

Rallabhandi P, Phillips RL, Boukhvalova MS, Pletneva LM, Shirey KA, Giannini TL, Weiss JP, Chow JC, Hawkins LD, Vogel SN, Blanco JC. Respiratory syncytial virus fusion protein-induced toll-like receptor 4 (TLR4) signaling is inhibited by the TLR4 antagonists *Rhodobacter sphaeroides* lipopolysaccharide and eritoran (E5564) and requires direct interaction with MD-2. *MBio*. 2012;3(4):e00218-12.

Rajamani U, Jialal I. Hyperglycemia induces Toll-like receptor-2 and -4 expression and activity in human microvascular retinal endothelial cells: implications for diabetic retinopathy. *J Diabetes Res*. 2014;2014:790902.

Sandanger Ø, Ranheim T, Vinge LE, Bliksøen M, Alfsnes K, Finsen AV, Dahl CP, Askevold ET, Florholmen G, Christensen G, Fitzgerald KA, Lien E, Valen G, Espevik T, Aukrust P, Yndestad A. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2013;99(1):164-74.

Sangeetha M, Pillai MS, Philip L, Lakatta EG, Shivakumar K. NF- $\kappa$ B inhibition compromises cardiac fibroblast viability under hypoxia. *Experimental Cell Research* 2011;317:899–909

Scaldeferri F, Sans M, Vetrano S, Correale C, Arena V, Pagano N, Rando G, Romeo F, Potenza AE, Repici A, Malesci A, Danese S. The role of MAPK in governing lymphocyte adhesion to and migration across the microvasculature in inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol*. 2009;39(1):290-300

Seko Y, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *J Pathol*. 1996;180:450-454.

Shan Y, Lin N, Yang X, Tan J, Zhao R, Dong S, Wang S. Sulphoraphane inhibited the expressions of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 through MyD88-dependent toll-like receptor-4 pathway in cultured endothelial cells. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012;22(3):215-22.

Shi L, Kishore R, McMullen MR, Frenkel J, Nagy LE. Chronic ethanol increases lipopolysaccharide stimulated Egr-1 expression in RAW 264.7 macrophages: contribution to enhanced tumor necrosis factor alpha production. *J Biol Chem*. 2002;277:14777-14785.

Shishido T, Nozaki N, Yamaguchi S, Shibata Y, Nitobe J, Miyamoto T, Takahashi H, Arimoto T, Maeda K, Yamakawa M, Takeuchi O, Akira S, Takeishi Y, Kubota I. Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation*. 2003;108(23):2905-10.

Snider P, Standley KN, Wang J, Azhar M, Doetschman T, Conway SJ. Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. *Circ Res*. 2009;105(10):934-47.

Song H, Zhao H, Qu Y, Sun Q, Zhang F, Du Z, Liang W, Qi Y, Yang P. Carbon monoxide releasing molecule-3 inhibits concurrent tumor necrosis factor- $\alpha$ - and interleukin-1 $\beta$ -induced expression of adhesion molecules on human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2011;46(1):48-57

Song R, Ao L, Zhao KS, Zheng D, Venardos N, Fullerton DA, Meng X. Soluble biglycan induces the production of ICAM-1 and MCP-1 in human aortic valve interstitial cells through TLR2/4 and the ERK1/2 pathway. *Inflamm Res.* 2014;63(9):703-10.

Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res.* 2009;105(12):1164-76

Spoelstra FM, Postma DS, Hovenga H, Noordhoek JA, Kauffman HF. Budesonide and formoterol inhibit ICAM-1 and VCAM-1 expression of human lung fibroblasts. *Eur Respir J.* 2000;15(1):68-74.

Lee SJ, Noh KT, Kang TH, Han HD, Shin SJ, Soh BY, Park JH, Shin YK, Kim HW, Yun CH, Park WS, Jung ID, Park YM. The Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis protein MAP1305 modulates dendritic cell-mediated T cell proliferation through Toll-like receptor-4. *BMB Rep.* 2014;47(2):115-120.

Timmers L, Sluijter JP, van Keulen JK, Hoefler IE, Nederhoff MG, Goumans MJ, Doevendans PA, van Echteld CJ, Joles JA, Quax PH, Piek JJ, Pasterkamp G, de Kleijn DP. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res.* 2008;102(2):257-64.

Tomita K, Takashina M, Mizuno N, Sakata K, Hattori K, Imura J, Ohashi W, Hattori Y. Cardiac fibroblasts: contributory role in septic cardiac dysfunction. *J Surg Res.* 2015;193(2):874-87.

Turner NA, Porter KE. Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2013;6(1):5.

Verstrepen L, Bekaert T, Chau TL, Tavernier J, Chariot A, Beyaert R. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(19):2964-78.

Vilahur G, Juan-Babot O, Peña E, Oñate B, Casaní L, Badimon L. Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50(3):522-33.

Voss U, Ekblad E. Lipopolysaccharide-induced loss of cultured rat myenteric neurons - role of AMP-activated protein kinase. *PLoS One.* 2014;9(12):e114044.

Wong F, Hull C, Zhande R, Law J, Karsan A. Lipopolysaccharide initiates a TRAF6-mediated endothelial survival signal. *Blood.* 2004;103(12):4520-6.

Xie Z, Singh M, Singh K. Differential regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression and activity in adult rat cardiac fibroblasts in response to interleukin-1beta. *J Biol Chem.* 2004;279(38):39513-9

Yao J, Mackman N, Edgington TS, Fan ST. Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor-alpha promoter in human monocytic cells: regulation by Egr-1, c-jun and NF-kappaB transcription factors. *J Biol Chem.* 1997;272:17795-17801.