



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

LA ACTIVACIÓN DE TLR4 AUMENTA LA EXPRESIÓN DE E-SELECTINA Y PROMUEVE LA ADHESIÓN DEL MONOCITO SOBRE EL FIBROBLASTO CARDÍACO

Memoria para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico

JOSÉ MIGUEL OSORIO SANDOVAL

Director: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

Patrocinante: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

Santiago, Chile 2016

AGRADECIMIENTOS

*“Baje a la tierra me decidí,
vestido con ropas que yo elegí
vine a llenar, la eterna promesa
me comí el agua, y el vino en la mesa.*

*Traje desastre, traje alegría
traje alambre, baje en subida.*

*Traje desastre, traje alegría
traje alambre, baje en subida.*

*Voy a esconderme, en las malezas
y robarle el sol, cuando amanezca
lo que es real, yo sé son los huesos*

Y todo el resto, es sólo relleno

*Traje desastre, traje alegría
traje alambres, baje en subida*

*Traje recuerdos para olvidar
traje una cuerda para colgar.*

Subo de nuevo, dejo la tierra

Un remordimiento inflama las venas

Y aunque me lleve el tiempo no tengo edad

y aunque me lleve el tiempo no tengo edad.

No tengo edad, no tengo edad

no tengo edad, no tengo edad.

Traje Desastre, Los Tres

A todos los presentes en la titulación, gracias, prefiero no dar nombres, pero todos los que fueron importantes en el proceso se sentirán aludidos con estas palabras.

Saludos a todos!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN.....	12
SUMMARY	13
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Enfermedades cardiovasculares	14
1.2 Tejido cardíaco y fibroblastos cardíacos.....	14
1.3 Proceso inflamatorio	16
1.4 Toll-Like Receptors (TLR´s)	17
1.5 Proteínas de adhesión (E-selectina).....	19
1.6 La activación de TLR4 activa las vías transduccionales ERK1/2, PI3K/Akt y NF-κB que modulan la expresión de E-selectina.....	22
1.7 Monocitos.....	23
2. HIPÓTESIS.....	27
3. OBJETIVO GENERAL	27
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1 Reactivos	28
5.2 Obtención y cultivo de fibroblastos cardíacos.....	28
5.3 Pasaje celular	30
5.4 Western blot.....	30
5.5 Inmunocitoquímica	31
5.6 Aislación y purificación de monocitos	31
5.7 Cell sorting.....	33
5.8 Ensayo de adhesión.....	33
5.9 Ensayo de viabilidad	34
5.10 Expresión de resultados y análisis estadístico	34
6. RESULTADOS.....	35
6.1 Determinación de los niveles proteicos de E-selectina en FC	35
6.2 TLR4 aumenta la expresión de E-selectina en FC	36
6.3 Localización celular de E-selectina en FC	37
6.4 Aislación y Purificación de monocitos a partir de bazo de rata adulta.....	39

6.5	La activación de TLR4 aumenta la adhesión de monocitos sobre una monocapa de FC	41
6.6	La activación de TLR4 a través de las vías ERK 1/2, PI3K/Akt y NF-κB aumenta la adhesión de monocitos sobre una monocapa de FC	43
6.6.1	Participación de la vía ERK1/2 en la adhesión de monocitos sobre una monocapa de FC inducida por LPS	43
6.6.2	Participación de la vía PI3K/Akt en la adhesión de monocitos sobre una monocapa de FC inducida por LPS	44
6.6.3	Determinación de la viabilidad celular de FC en presencia de IMD-0354	46
6.6.4	Participación de la vía NF-κB en la adhesión de monocitos sobre una monocapa de FC inducida por LPS	47
6.7	Participación de la E-selectina en la adhesión de monocitos sobre una monocapa de FC inducida por LPS	49
7.	DISCUSIÓN	51
7.1	La estimulación de TLR4 aumenta la expresión de E-selectina en FC ...	51
7.2	Participación de TLR4, ERK1/2, PI3K/Akt y NF-κB en la adhesión de monocitos sobre FC	53
7.2.1	Adhesión entre monocitos y otros tipos celulares.....	54
7.2.2	La activación de TLR4 modula positivamente la adhesión celular de monocitos sobre una monocapa de FC	55
7.2.3	La activación de ERK1/2 modula positivamente la adhesión celular de monocitos sobre una monocapa de FC	55
7.2.4	La activación de PI3K/Akt modula positivamente la adhesión celular de monocitos sobre una monocapa de FC	57
7.2.5	La activación de NF-κB modula positivamente la adhesión celular de monocitos sobre una monocapa de FC	59
7.3	El aumento de expresión de E-selectina favorece la adhesión de monocitos sobre una monocapa de FC.....	60
8.	CONCLUSIONES.....	63
9.	REFERENCIAS.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funciones de los fibroblastos cardíacos en el remodelado del tejido	15
Figura 2. Etapas del proceso inflamatorio en el tejido cardíaco	17
Figura 3. Comparación entre los dominios extracelulares e intracelulares de los IL-1R y TLR	18
Figura 4. Estructura de los 3 tipos de Selectinas (E, L y P).....	20
Figura 5. Estructura del Sialyl Lewis ^x (SLe ^x)	21
Figura 6. Caracterización de monocitos provenientes del bazo de ratones.....	25
Figura 7. Resumen del método utilizado para la obtención de fibroblastos cardíacos.....	29
Figura 8. Separación de células mononucleares.....	32
Figura 9. Expresión niveles proteicos de E-selectina en fibroblastos cardíacos (FC).....	35
Figura 10. Participación de TLR4 en el aumento de expresión de E-selectina en fibroblastos cardíacos (FC)	37
Figura 11. Participación de TLR4 en la expresión de E-selectina en fibroblastos cardíacos (ICQ)	38
Figura 12. Comparación entre poblaciones celulares obtenidas a partir de bazo de rata adulta.....	39
Figura 13. Comparación entre los parámetros de granularidad (SSC) y tamaño celular (FSC) con el fluoróforo FIT-C en la población celular obtenida a partir de bazo de rata adulta	40
Figura 14. Histogramas correspondientes a conteo celular vs FIT-C	41
Figura 15. Participación de TLR4 en la adhesión entre monocitos y una monocapa de fibroblastos cardíacos (FC).....	42
Figura 16. Participación de ERK 1/2 en la adhesión entre monocitos y una monocapa de fibroblastos cardíacos (FC).....	44

Figura 17. Participación de PI3K/Akt en la adhesión entre monocitos y una monocapa de fibroblastos cardíacos (FC).....	45
Figura 18. Determinación de la viabilidad celular de fibroblastos cardíacos para el uso de IMD-0354	47
Figura 19. Participación de NF-κB en la adhesión entre monocitos y una monocapa de fibroblastos cardíacos (FC).....	48
Figura 20. Participación de E-selectina en la adhesión entre monocitos y una monocapa de fibroblastos cardíacos (FC).....	50

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius.
µg	Microgramo.
µL	Microlitro.
µm	Micrometro.
µM	Micromolar.
2-ME	2-Metoxiestradiol.
ACV	Accidente cerebrovascular.
Akt	Proteína quinasa B.
AP-1	Proteína activadora 1.
BSA	Albúmina de suero bovino.
c/u	Cada uno.
CA	Cardiomiocitos adultos.
CCL/2	Proteína quimioattractante de monocitos 1.
CD34	Cúmulo de diferenciación 34.
CD40	Cúmulo de diferenciación 40.
CD40L	Ligando del cúmulo de diferenciación 40.
CLI-095	Inhibidor de TLR4.
cm ³	Centímetro cúbico.

CO ₂	Dióxido de carbono.
CX ₃ CR ₁	Receptor de la quimioquina CX ₃ C.
DAMP	Patrón moleculares asociados a daño.
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium formula 12.
ECL	Aumentador de quimioluminiscencia.
ECV	Enfermedad cardiovascular.
ED-A	Dominio extra tipo A de la fibronectina.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EGF	Factor de crecimiento epidermal.
ERK1/2	Proteína quinasa activada extracelularmente.
E-sel	E-selectina
ESL-1	Ligando de E-selectina 1.
FBS	Suero fetal bovino.
FC	Fibroblasto cardíaco.
FCA	Fibroblasto cardíaco adulto.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
FSC	Tamaño celular.
g	Gramo.
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa.
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
GlyCAM-1	Molécula de adhesión celular dependiente de glicosilaciones.
h	Hora.
HMGB-1	Proteína del grupo de alta movilidad box 1.
HSC	Células madres hematopoiéticas.
HS	Heparán sulfato.
Hsp	Proteína de estrés térmico.
HUVEC	Células endoteliales de vena de cordón umbilical.
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1.
ICQ	Inmunocitoquímica.

IgG	Inmunoglobulina de tipo G.
IKK	Quinasa IκB.
IL	Interleuquina.
IL-1α	Interleuquina 1α.
IL-1β	Interleuquina 1β.
IL-3	Interleuquina 3.
IL-6	Interleuquina 6.
IL-8	Interleuquina 8.
IL-10	Interleuquina 10.
ILR	Receptor de interleuquina.
IMD-0354	Inhibidor de NF-κB.
IRAK	Quinasa activada por el receptor de interleuquina.
IRF-3	Factor regulatorio de interferón 3.
IRF-5	Factor regulatorio de interferón 5.
kDa	Kilodalton.
Kg	Kilogramo.
LDL	Colesterol de baja densidad.
LPS	Lipopolisacárido.
LRR	Repeticiones ricas en leucinas.
LY-294002	Inhibidor de PI3K.
mA	Miliamper.
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos.
MCP-1	Proteína quimioattractante de monocitos 1.
MEC	Matriz extracelular.
MEK1/2	Quinasa de la proteína quinasa activada por mitógenos.
MFC	Miofibroblasto.
mg	Miligramo.
mL	Mililitro.
mm	Milímetro.

MMP	Metaloproteasa.
MyDD88	Gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide.
NF-κB	Factor nuclear κB.
nm	Nanómetro.
OMS	Organización mundial de la Salud.
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos.
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica.
PBS	Tampón fosfato salino.
PD-98050	Inhibidor de ERK1/2.
PGN	Peptidoglicano.
PFA	Paraformaldehído.
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa.
pKaL	Polifenoles derivados de <i>Artemisa annua</i> L.
PMN	Polimorfonucleares.
PRP	Plasma rico en plaquetas.
PSGL-1	Ligando glicoproteico para P-selectina 1.
rcf	Fuerza centrífuga relativa.
RIP1	Proteína inactivadora de ribosomas.
ROS	Especie reactiva del oxígeno.
rpm	Revoluciones por minuto.
S1P	Esfingosina 1 fosfato.
siRNA	Silenciador de Ácido ribonucleico.
SLe ^x	Sialyl Lewis X
SSC	Granularidad celular.
TAK1	Quinasa activada por TGF-β.
TAK-242	Inhibidor de TLR4.
TBS	Solución salina tris.
TIR	Dominio común del receptor de interleucina y receptor de tipo Toll.
TLR	Receptor de tipo Toll.

TLR1	Receptor de tipo Toll 1.
TLR3	Receptor de tipo Toll 3.
TLR4	Receptor de tipo Toll 4.
TLR10	Receptor de tipo Toll 10.
TMV	Tratamiento con microvesículas.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α .
TRAF3	Factor asociado al receptor de TNF 3.
TRAF6	Factor asociado al receptor de TNF 6.
TRIF	Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR e induce IFN- β .
U0126	Inhibidor de TLR4.
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1.
WB	Western blot.

RESUMEN

Los fibroblastos cardíacos (FC), han sido denominados células centinelas del corazón, pues responden de manera variada y compleja ante cualquier elemento externo o interno a fin de mantener la homeostasis. Esta 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. La activación de este receptor ha mostrado mediar respuestas inflamatorias y fibróticas tanto en FC, como en otras células; en donde la expresión de proteínas de adhesión y reclutamiento de células del sistema inmune componen un eje vital en estos procesos. Por tanto se buscó determinar si la activación de TLR4 en el FC de ratas adultas genera una mayor adhesión de monocitos a través de un aumento en los niveles de E-selectina.

La activación de TLR4 por LPS en FC, indujo un aumento en la expresión de E-selectina, situación que es revertida con el pre tratamiento con TAK-242 (inhibidor de TLR4). Adicionalmente, la activación de TLR4 generó un aumento en la adhesión de monocitos sobre los FC, mientras que la inhibición de TLR4 y las vías transduccionales ERK1/2, PI3K/Akt y NF- κ B previo al estímulo con LPS, revirtió el aumento de adhesión de monocitos. De igual forma, el bloqueo de E-selectina, mediante el uso de un anticuerpo bloqueante, también revirtió el aumento de la adhesión, dando luces de que esta proteína de adhesión es fundamental para el reclutamiento de monocitos y por tanto para mediar la respuesta inflamatoria orquestada por el FC.

SUMMARY

Cardiac fibroblasts (CF) have been considered as sentinel cells, since they respond in a complex and diverse manner to external and internal stimulus, in order to maintain homeostasis of the heart. This is mediated through a wide number of receptors, among them Toll-Like receptors, and particularly TLR4, play a critical role in cardiac inflammation. TLR4 activation has been involved in the regulation of inflammatory and fibrotic response both in CF and other cells; adhesion molecules and recruitment of immune cells are key elements of these processes. Therefore we sought to evaluate whether TLR4 activation in CF obtained from adult rats increased monocyte adhesion through increased levels of E-selectin.

TLR4 activation by LPS in CF, induced increased E-selectin expression, which was abolished when CF were pre-treated with TAK-242 (TLR4 inhibitor). In addition, TLR4 activation increased monocyte adhesion to CF, whereas the inhibition of this receptor and related signaling pathway ERK1/2, PI3K/Akt and NF- κ B, previous LPS exposure reversed monocyte adhesion. Similarly, E-selectin blockade, by the use of blocking antibody, also blocked monocyte adhesion, which emphasizes the importance of this adhesion molecule in monocyte recruitment and inflammatory response orchestrated by CF.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades cardiovasculares.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), son actualmente la principal causa de muerte a nivel mundial, con un crecimiento exponencial en los últimos años debido al estilo de vida que predomina actualmente, con un alto consumo de grasas y una baja actividad física. Es por esto que organizaciones importantes como la OMS, han hecho proyecciones para determinar el impacto futuro que tendrán las ECV en la población mundial. Anualmente mueren 17,3 millones de personas por este tipo de enfermedades, lo cual representa un 30% del total de muertes por año, y se calcula que para el año 2030 las muertes por ECV alcanzarán cifras cercanas a 26 millones de personas, sobre todo por cardiomiopatías y accidentes cerebrovasculares (ACV) [1]. Estos datos nos llevan a profundizar e investigar en los distintos mecanismos fisiopatológicos que conllevan a este tipo de patologías, a fin de encontrar medidas preventivas o futuros tratamientos con el objetivo de disminuir la cantidad de muertes en el mundo por las ECV.

1.2 Tejido cardíaco y fibroblastos cardíacos.

En el tejido cardíaco, la función tisular es regulada por interacciones dinámicas y coordinadas de dos principales tipos celulares como lo son las células musculares (cardiomiocitos) y las no musculares (fibroblastos, endoteliales, macrófagos, mastocitos, etc.), de las cuales las más numerosas e importantes son los fibroblastos cardíacos (FC). Estos dos tipos celulares (cardiomiocitos y FC) constituyen un 90% del tejido cardíaco [2] las que permiten realizar a cabalidad la función destinada a este órgano como lo es la contracción (cardiomiocitos) para poder bombear sangre a todos los rincones de nuestro organismo y la mantención de la matriz extracelular (MEC), en el caso de los FC.

Los FC, son células de origen mesenquimal y son las principales células que

secretan los diferentes componentes de la MEC [3], actuando también como reguladores de las señales mecánicas, químicas y eléctricas entre los componentes celulares y no celulares, representando un 66% en número del tejido cardíaco [2].

La principal función de los FC es mantener la homeostasis de la MEC [3], produciendo y secretando distintas proteínas (colágeno, fibronectina, etc.), por tanto mantiene la integridad del tejido, preservando así la arquitectura cardíaca [4]. Junto a lo anterior los FC, también producen citoquinas, factores de crecimiento, péptidos y enzimas, como metaloproteasas (MMP's), a fin de regular y mantener la homeostasis de la MEC [3] (ver figura 1).

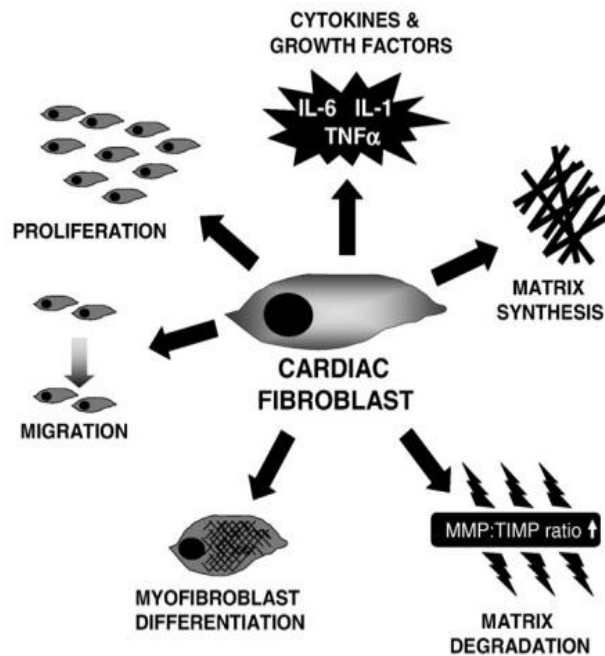


Figura 1. Funciones de los fibroblastos cardíacos en el tejido cardíaco. (De Porter K, Turner N. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. Pharmacology & Therapeutics. 2009; 123: 255-278).

En patologías cardíacas tales como hipertensión, infarto al miocardio o insuficiencia cardíaca, se producen lesiones en el tejido cardíaco, las cuales provocan la activación de los FC, con la finalidad de reparar el daño. Las funciones celulares

asociadas a reparación celular incluyen: migración y proliferación de FC, diferenciación de FC a miofibroblasto (MFC), secreción de proteínas de la MEC, liberación de factores de crecimiento y MMP's, producción de citoquinas (pro-inflamatorias), expresión de proteínas de adhesión y reclutamiento de células hematopoyéticas (monocitos, neutrófilos, entre otras), lo que conlleva a la formación de la cicatriz y finalmente si las lesiones son continuas, fibrosis e hipertrofia cardíaca [3,5-7].

1.3 Proceso Inflamatorio

Se sabe que los cardiomiocitos son células con limitada capacidad regenerativa, es por ello que diversos procesos injuriosos y patológicos tales como la cardiopatía crónica y el aumento de la carga presión/volumen pueden provocar la muerte de este tipo celular de forma esporádica, activando respuestas hipertróficas y pro-fibróticas. Pero además existen otros procesos, que producen una pérdida aguda de un gran número de células cardíacas. Uno de ellos es el infarto agudo al miocardio [7].

El infarto agudo al miocardio, se puede producir por la ruptura de la placa de ateroma, con la generación de un trombo coronario, éste evento, culmina con un proceso isquémico el cual provoca la muerte de los cardiomiocitos en el área afectada [8]. Esta injuria cardíaca junto con activar el proceso de remodelado de la MEC, activa mecanismos del sistema inmune innato iniciando con ello el proceso inflamatorio (ver figura 2). Este proceso de temprana aparición (24 horas), está mediado por las vías de señalización de los receptores de tipo Toll (TLR's), cascada del complemento y especies reactivas de oxígeno, las cuales inducen la activación del factor nuclear (NF- κ B) y la síntesis de quimioquinas y citoquinas en el corazón infartado. Luego de estos eventos comienza el reclutamiento de células del sistema inmune promoviendo la interacción entre leucocitos y células endoteliales, y la llegada de monocitos para fagocitar los cardiomiocitos muertos y la liberación de factores de crecimiento [7].

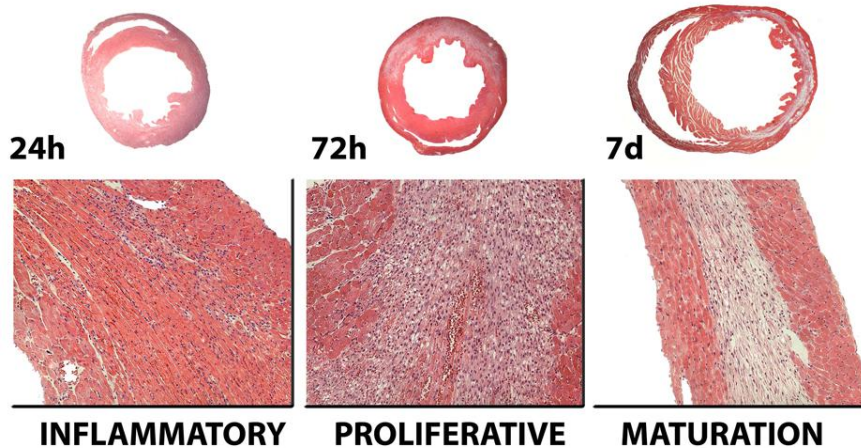


Figura 2. Etapas del proceso inflamatorio en el tejido cardíaco. (De Frangogianinis N. The immune system and cardiac repair. *Pharmacological Research* 58. 2008; 88-111).

Este proceso como se dijo anteriormente está mediado en parte por los receptores de tipo Toll (TLR's) los cuales han sido ampliamente estudiados por el laboratorio de Farmacología Molecular Cardiovascular, especialmente el receptor de tipo Toll 4 (TLR4).

1.4 Toll-Like Receptors (TLR's).

Los Toll-Like Receptors (TLR's) son una familia de receptores compuesta por 10 miembros (TLR1-TLR10) y que fueron descritos por primera vez en *Drosophilla*. Se encuentran expresados en células del sistema inmune innato y pueden ser estimulados por estructuras características de bacterias, virus y hongos conocidos como pathogen-associated molecular patterns (PAMP's) tales como Lipopolisacáridos (LPS) o Peptidoglicanos (PGN). La activación de estos TLR por sus ligandos genera la expresión de citoquinas proinflamatorias, así como también, la maduración de las células presentadoras de antígenos del sistema inmune innato [9]. Pero además de reconocer estructuras exógenas, esta familia de receptores pueden ser activados por componentes endógenos, muchos de ellos asociados a daño conocidos como DAMP's (danger associated molecular patterns), entre ellos Hsp (60 y 70), HMGB-1, complejos cromatina-

IgG, proteína surfactante pulmonar A, fibronectina ED-A y heparán sulfato (HS), siendo el receptor TLR4 como el más común para estos componentes [10].

En los TLR el dominio citoplasmático es muy similar al de los receptores de interleuquinas (ILR) y es por esto que el dominio se denomina Toll/IL-1 (TIR). Por el contrario, el dominio de la región extracelular N terminal, es distinto entre ambas familias ya que el ILR posee un dominio tipo IgG mientras que los TLR se componen de una región rica de leucinas repetidas (LRR's) (ver figura 3) [11].

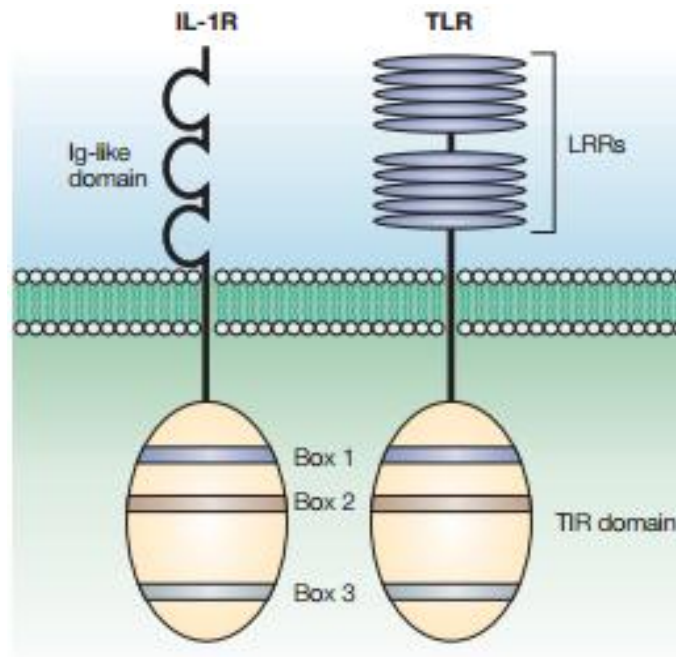


Figura 3. Comparación entre los dominios extracelulares e intracelulares de los IL1R y TLR. (De Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. Nature Reviews Immunology. 2004; 4: 499-510).

Una vez activados los TLR, transmiten la señal a través de proteínas adaptadoras como por ejemplo, el MyDD 88 (del inglés, myeloid differentiation primary response 88) activando a IRAK's (Interleuquin 1 receptor activated kinases), TAK1 (TGF- β_1 -activated kinase 1), IKK (I κ B kinase) y MAPK's (Mitogen activated kinases), todo esto para inducir la expresión de genes blanco entre los que destacan las citoquinas proinflamatorias para

generar la respuesta inmune o las profibróticas para generar la diferenciación de FC a MFC [12].

En la actualidad se conoce que la transmisión de las señales en los receptores TLR se genera, a lo menos, por medio de una vía dependiente de MyD88, la cual es común para todos los receptores TLR y que se basa en la activación de IRAK's/TRAF6 junto a los factores de transcripción NF- κ B, AP-1 e IRF-5, en donde el más importante es NF- κ B ya que controla la expresión de genes para citoquinas pro-inflamatorias [13] y proteínas de adhesión [14]. Pero además, se sabe que existe una vía de señalización independiente a MyD88 y que es común para los receptores TLR3 y TLR4, en donde la activación de TRIF conlleva a la expresión de interferones tipo I mediante el reclutamiento de TRAF3 y RIP1, lo cual activa factores de transcripción iguales a los de la vía dependiente de MyD88 como NF- κ B y AP-1 con una cinética más tardía, o distintos como IRF-3 [13].

Investigaciones desarrolladas en el Laboratorio de Farmacología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, han demostrado que LPS activa el receptor TLR4 en el FC [15,16]. LPS es el principal componente de las endotoxinas producidas por las bacterias gram negativas, y se ha visto que pueden estimular la proliferación de fibroblastos de piel y con ello la producción de colágeno [17], a través de la activación del receptor TLR4. LPS se ha descrito que puede activar el receptor TLR4 y con ello la proliferación de fibroblastos y la producción de proteínas de la MEC como colágeno [18].

1.5 Proteínas de adhesión (E-selectina)

Las selectinas son una familia de receptores glicoproteicos responsables de la adhesión celular de leucocitos en los sitios de inflamación y su emigración a tejidos linfáticos, por ende son promotores del movimiento de leucocitos sobre la pared de vasos

sanguíneos como consecuencia de la exposición a citoquinas proinflamatorias. Se describen tres tipos de selectinas (E, L y P), las cuales son similares estructuralmente con dominios claramente definidos que son: región N-terminal, región lectina dependiente de calcio, dominio tipo factor de crecimiento epidermal (EGF), región de repeticiones reguladores del complemento (única zona que se diferencia entre los tres tipos de selectina), dominio transmembrana y una pequeña región intracelular compuesta por el C-terminal [19] (ver figura 4).

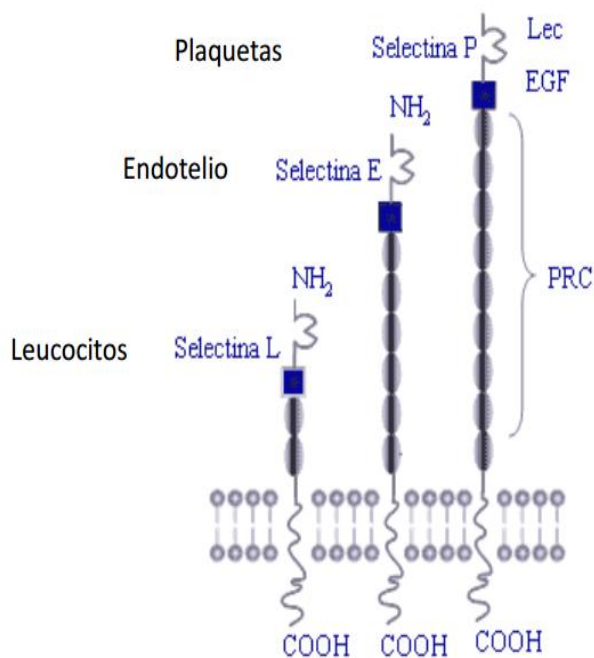


Figura 4. Estructura de los 3 tipos de selectina (E, L y P). Se muestra que sólo la región PRC (Región de repeticiones reguladoras de complementos) es la única distinta entre cada tipo de selectinas.

Hasta la fecha se ha descrito claramente el proceso de adhesión de leucocitos sobre células endoteliales y su posterior migración al espacio extravascular, el cual está mediado por receptores de adhesión. Se ha descrito que la primera interacción es con E-selectina (primera adhesión, la cual es débil, entre el endotelio y leucocitos), y posteriormente la adhesión con receptores tipo integrinas como VCAM-1 e ICAM-1, la cual es más firme, y que posteriormente permite la diapédesis y migración extravascular [14].

Es por esto que el estudio de E-selectina se ha convertido en un tema relevante en los últimos años, en donde ya no sólo se conoce sobre su estructura o función dentro de

procesos inflamatorios, sino que también se conocen sus ligandos, los cuáles han sido descritos por algunos autores [20]. Debido a esto sabemos en la actualidad que existen dos tipos de unión con esta proteína de adhesión, siendo algunas de fuerte afinidad como son las uniones con los contrarreceptores glicanos, tales como PSGL-1, ESL-1, CD34 y GlyCAM-1 [21,22]. Por otro lado, existen interacciones débiles, pero que a pesar de esta característica resultan ser las más importantes del punto de vista fisiológico, ya que son las uniones involucradas en los procesos de adhesión entre células endoteliales y leucocitos, en donde el tetrasacárido, Sialyl Lewis^x (SLe^x) (ver figura 5), es el que más destaca ya que es un epítipo desplegado por los leucocitos [23] y es el que interacciona con los tres tipos de selectinas [24], siendo esta la primera interacción entre ambos tipos celulares tal como se mencionó anteriormente.

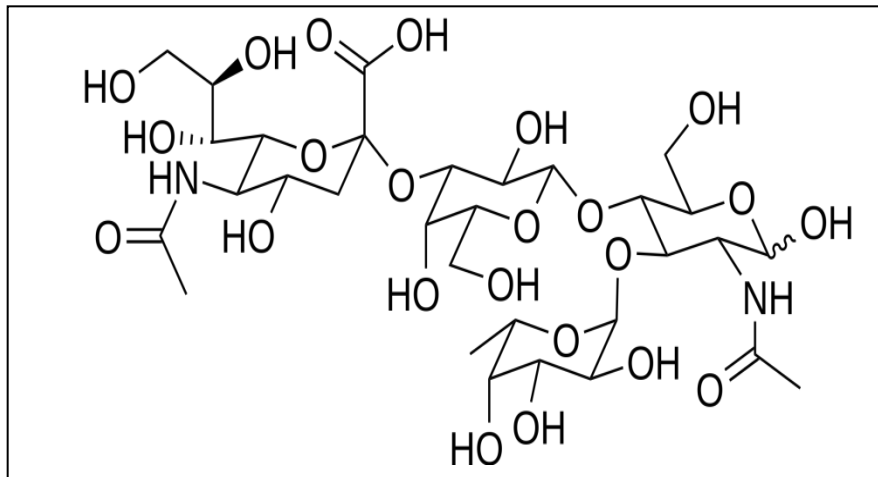


Figura 5. Estructura del Sialyl Lewis^x (SLe^x).

Ahora bien, E-selectina, es transcripcionalmente regulada por el endotelio “activado” [19] y su expresión como explica Turner et al., ocurre en el transcurso de horas y posteriormente disminuye drásticamente luego de 6 horas después de la activación de este. También es importante destacar que estos mismos autores, señalan que la expresión de E-selectina se presenta en el endotelio microvascular y en células

estromales pero no así en cardiomiocitos. Además, estos autores observaron que no existe presencia de E-selectina en el FC que no ha sido “activado”. Finalmente, los autores sugirieron que la expresión de este receptor de adhesión en el endotelio ocurre en procesos inflamatorios [25].

Estudios en el Laboratorio de Farmacología Molecular han demostrado que la activación de TLR4 aumenta la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 [26,27]. Siguiendo la misma línea, podemos pensar que el aumento de estas proteínas, puede ser paralelo a la expresión de E-selectina. En este sentido, Collins et al., describieron que la expresión de estas tres proteínas está condicionada por la activación del factor transcripcional NF- κ B [14], y como se observó anteriormente, éste puede ser activado por TLR4 dando consistencia a los resultados obtenidos en el laboratorio.

1.6 La activación de TLR4 activa las vías transduccionales ERK1/2, PI3K/Akt y NF- κ B que modulan la expresión de E-selectina.

Resultados previos encontrados en el laboratorio, describen que la activación de TLR4 en FC induce la fosforilación y por tanto, la activación de las vías transduccionales ERK1/2, PI3K/Akt y NF- κ B [15]. Es importante destacar que estas vías están involucradas en la expresión de proteínas de adhesión distintas a E-selectina como ICAM-1 y VCAM-1 [26,27].

Debido a lo anterior, otros autores describen que estas vías transduccionales regulan la expresión de E-selectina. En células cancerosas de colon la vía ERK1/2 se activa en conjunto con la síntesis del mRNA de E-selectina, evidenciando su participación en la expresión de la proteína [28]. La vía PI3K/Akt también ha mostrado participación en la expresión de E-selectina, esto se evidenció en fibroblastos orbitales, en los cuales el uso de un inhibidor de Akt (LY294002) revirtió el aumento en la expresión de E-selectina, inducida por el uso de CD40L [29]. Finalmente, otros autores han destacado la

importancia del factor transcripcional NF- κ B en la expresión de E-selectina, quienes demostraron que la inhibición con IMD-0354 disminuye la expresión de la proteína en FC humanos [25]; aunque también ha sido ampliamente descrito en células endoteliales tal y como propusieron Collins et al [14].

1.7 Monocitos

El sistema inmune innato es la principal defensa del organismo frente a microorganismos, siendo esta eficiente y rápida, para evitar un daño mayor en los tejidos. Si bien, este sistema se compone de variados tipos celulares, uno de los que destacan son los monocitos, los cuales representan un 4 y 10% del total de leucocitos en ratones y humanos, respectivamente. Los monocitos, como la gran mayoría de las células hematopoyéticas, se producen principalmente en la médula ósea, a partir de células madres hematopoyéticas (HSC) y desde allí son liberados al torrente sanguíneo en donde cumplen su función de protección [30]. Pero además en los últimos años se han descubierto varios subtipos de monocitos, principalmente en ratones, los cuales cumplen diversas funciones, así es como encontramos los del subtipo Ly-6c^{high} el cual se relaciona con procesos inflamatorios [30-32] y los del subtipo CX₃CR₁ el cual se relaciona con la actividad frente a patógenos [30]. De estos subtipos, el más estudiado es el Ly-6c^{high} del cual se han descubierto algunas características importantes.

Lo primero es que los monocitos de este subtipo, si bien son producidos por la médula ósea, luego de un infarto al miocardio y debido a la acción, principalmente, de señales adrenérgicas, pero también de IL-1 β , IL-3 y GM-CSF, se liberan de su lugar de producción para emigrar al bazo, en donde maduran por 24 horas para luego desplazarse a la zona dañada [30]. Junto a esto, también se ha descubierto que existe también un reservorio importante del subtipo Ly-6c^{high} en el bazo y que son liberados en procesos de injuria cardíaca por acción de la angiotensina II, incluso se ha descrito el proceso de

hematopoyesis extramedular en el propio bazo cuando el reservorio de Ly-6c^{high} se agota, el cual se desencadena en afecciones como infarto al miocardio o aterosclerosis [31].

Lo segundo es que se ha descrito un subtipo de monocitos, denominado Ly-6c^{low} (figura 6A), que si bien se encuentran en el bazo, al igual que el subtipo Ly-6c^{high} (figura 6B), tiene características resolutorias de la inflamación, promoviendo la cicatrización del tejido [32] y de la producción de IL-10 que inhibe la acción de otras citoquinas proinflamatorias, tales como, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6 y IL-8 [7,33]. Esto se confirma, ya que luego de un infarto y a tiempos tempranos, donde el proceso inflamatorio predomina frente al resolutivo, la cantidad de monocitos Ly-6c^{high} que se encuentran en la zona infartada es mucho mayor que el subtipo Ly-6c^{low}, condición que se revierte para el caso del sub tipo pro inflamatorio cuando se realiza una esplenectomía en el animal (figura 6C) [32].

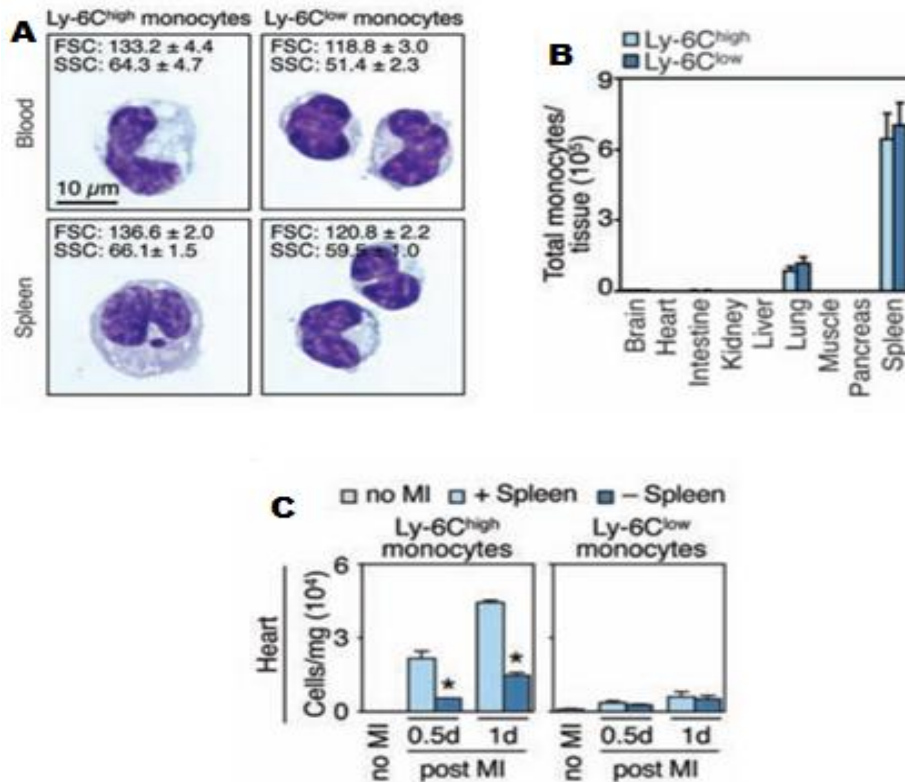


Figura 6. Caracterización de monocitos provenientes del bazo de ratones. **A.** Comparación entre monocitos subtipo Ly-6C^{high} y Ly-6C^{low}. **B.** Distribución de los dos subtipos de monocitos en los distintos tejidos. **C.** Cantidad de monocitos reclutados por subtipo, luego de un infarto con y sin ablación previa del bazo. (De Swirski F et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. Science. 2009; 325: 612-616).

Posterior a su liberación desde el bazo, los monocitos circulantes son reclutados por el tejido dañado, gracias a la liberación de la proteína quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1), pero también a la quimioquina CCL/2 [34]. Por tanto, los monocitos “reclutados” se acercan a la superficie de la zona dañada en donde interactúan con proteínas de adhesión, destacando las selectinas y VCAM-1 [33], para luego seguir dos caminos. El primero es liberar contenido proinflamatorio y el segundo diferenciarse a macrófagos, los cuales también tienen la capacidad de liberar sustancias proinflamatorias, como catepsinas, metaloproteasas, TNF- α y IL-1 β [7,30,33].

La recopilación de todos los antecedentes expuestos, junto a la falta de

conocimiento acerca de la expresión de E-selectina en FC, y al interés por conocer más acerca sobre la interacción entre los fibroblastos cardíacos y los monocitos, mediados por la proteína de adhesión, E-selectina, nos llevan a plantear la siguiente hipótesis.

2. HIPÓTESIS

“La activación de TLR4 aumenta la expresión de E-selectina lo cual favorece la adhesión de monocitos sobre fibroblastos cardíacos”.

3. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la expresión de E-selectina en fibroblasto cardíaco aumenta luego de la activación de TLR4 favoreciendo la adhesión con monocitos.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Demostrar que la activación de TLR4 aumenta la expresión de E-selectina.
- ii. Determinar si TLR4 y las vías de señalización intracelular, ERK 1/2, PI3K/Akt y NF- κ B regulan la adhesión entre fibroblastos cardíacos y monocitos.
- iii. Demostrar que el aumento de la expresión de E-selectina favorece la adhesión celular fibroblasto cardíaco-monocitos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

El Tritón X-100, anti-GAPDH, IMD0354 y PD98059 se adquirieron en Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EEUU). El anti E-selectina fue adquirido en Biovision (Milpitas, CA, EEUU). El TAK-242 y LPS-RB fueron adquiridos en Invivogen (San Diego, CA, EEUU). El anti-Conejo fue adquirido en Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EEUU). El LY294002 fue adquirido en Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, EEUU). El Antibiótico Penicilina-Estreptomicina fue adquirido en Biological Industries (Kibbutz Beit-Haemek, Israel). Los medios de cultivo (DMEM-F12), Suero Fetal Bovino (FBS), Tripsina-EDTA, Colagenasa Tipo-II se adquirieron en Gibco BRL (Carlsbad, CA, EEUU). La solución Hoescht 33342 fue adquirida en Life Technology (Waltham, MA, EEUU). La Ketamina fue adquirida en Laboratorios Richmond (Grand Bourg, BA, Argentina). La Xilazina fue adquirida en Laboratorio Centrovét (Cerrillos, RM, Chile). Los compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos, bases y solventes fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Alemania). El material plástico estéril para la obtención y cultivo de FC se obtuvo de Falcon (Reynosa, Tamaulipas, México).

5.2 Obtención y cultivo de fibroblastos cardíacos

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 6 a 8 semanas de edad (200-300g c/u) para obtener el cultivo de fibroblastos cardíacos adultos (FC). Los animales fueron obtenidos 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 su aislamiento y cultivo se utilizó el procedimiento descrito por Claycomb y Palazzo, con algunas modificaciones. Se anestesió una rata adulta con una mezcla de

ketamina-xilazina (160 y 8 mg/kg respectivamente, vía intraperitoneal). La tapa torácica se removió por toracotomía bilateral y se escindió el corazón, el que fue recibido en solución de Gerard, separando a continuación las aurículas de los ventrículos. Estos últimos se disgregaron mecánicamente en pequeños trozos, añadiendo luego 30 mL de una solución de colagenasa tipo II (1mg/mL), y se colocó en agitación constante 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 minutos a temperatura ambiente. El pellet 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 minutos a la misma temperatura. El pellet obtenido de la segunda centrifugación se resuspendió con medio DMEM-F12 + 10% FBS. Finalmente se sembraron los FC en placas de cultivo de 100 mm y se mantuvieron con 5% de CO₂ 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 FC se incubaron nuevamente en DMEM-F12 + 10 % de FBS, con 5% de CO₂ 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 7).

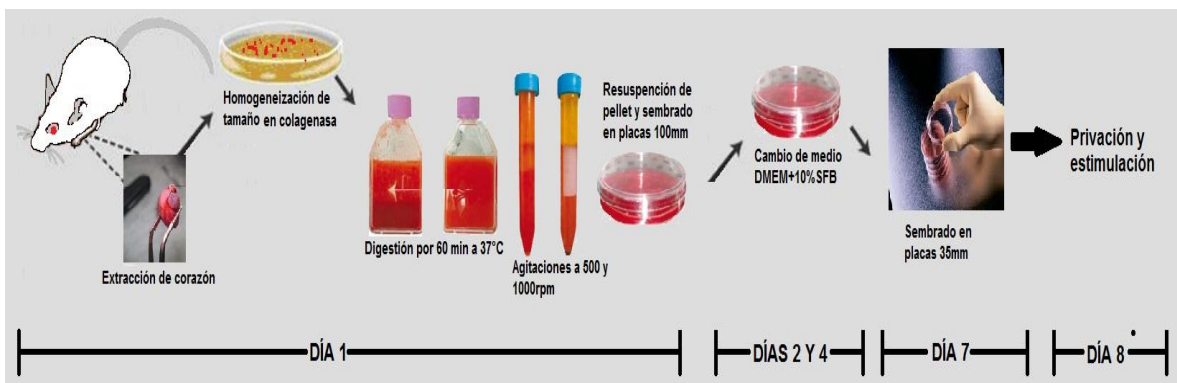


Figura 7. Resumen del método utilizado para la obtención de fibroblastos cardíacos.

5.3 Pasaje celular

Para la realización de todos los experimentos, las células fueron mantenidas en pasaje 0 (p0), en medio DMEM-F12 suplementado con 10% FBS, hasta alcanzar confluencia del 100%. Posteriormente, los FC se soltaron con tripsina 10X en PBS 1X estéril y fueron contados por el método de exclusión de azul de tripán y se sembraron en placas plásticas de cultivo celular de 60 mm a una concentración de 300.000 células/cm³ en medio DMEM F-12 suplementado con FBS 10% (pasaje 1). Luego que las células se encontraron adheridas al plástico de las placas, fueron lavadas con PBS 1X estéril y mantenidas en medio DMEM F-12 hasta la realización del experimento.

5.4 Western blot

Los extractos proteicos obtenidos de la lisis celular de los FCA fueron cuantificados empleando el método de Bradford para ser sometidos, a continuación, a electroforesis en geles de acrilamida/bisacrilamida al 13% 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 µm manteniendo constante el amperaje (350 mA) durante 90 minutos, en tampón de transferencia. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en TBS 1X-Tween 20.

Finalmente las membranas de nitrocelulosa se incubaron con el anticuerpo primarios anti E-selectina (1:1000) y anti GAPDH (1:1000) diluidos en TBS 1X-Tween 20 durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Transcurrido el tiempo fueron lavadas con TBS 1X-Tween 20 e incubadas con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado de la peroxidasa del rábano. Para la detección de la actividad enzimática se utilizó un método quimio luminiscente de ECL.

5.5 Inmunocitoquímica

Se sembraron los FC a una concentración de 100.000 células/cm³ sobre cubreobjetos de vidrio colocados en placas de 35mm. Luego del estímulo se lavaron las células con PBS frío y se fijaron a cubreobjetos de vidrio por 20 minutos con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS. Posteriormente se permeabilizaron con tritón X-100 0,1% por 10 minutos y se bloquearon con BSA 3% por 20 minutos. Las preparaciones se incubaron con anticuerpo primario anti E-selectina durante toda la noche a 4°C y a continuación con anticuerpo secundario anti-conejo Alexa flúor 555 durante toda la noche a 4°C. La marcación nuclear se realizó con azul de Hoechst en una dilución de 1:500 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 Aislación y purificación de monocitos

Se realizó en base al protocolo montado por Claudio Humeres, miembro del laboratorio de Farmacología Molecular el cual fue descrito en tesis doctoral. Este protocolo consiste en la extracción del bazo de una rata adulta Sprague-Dawley, las mismas utilizadas en la obtención de FC. Luego de esto, el bazo fue triturado en campana utilizando medio de cultivo DMEM-F12 hasta obtener un homogenizado. Se colocaron 7 mL de Ficoll-Histopaque 1083 en dos tubos de 15 mL sobre los cuales se agregaron lenta y cuidadosamente 7 mL del homogenizado. Ambos tubos fueron centrifugados a 400 rcf por 30 minutos a temperatura ambiente (aceleración y desaceleración igual a 0).

Posteriormente, mediante pipeteo, se transfirieron 3 a 4 mL del halo blanco (ver Figura 8), en tubos eppendorff de 1,5 mL. A continuación estos tubos se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet

con 100 μ L de solución PBS + 3% de FBS. Reunir todos los volúmenes en un solo tubo eppendorf el cual se llamará tubo M.

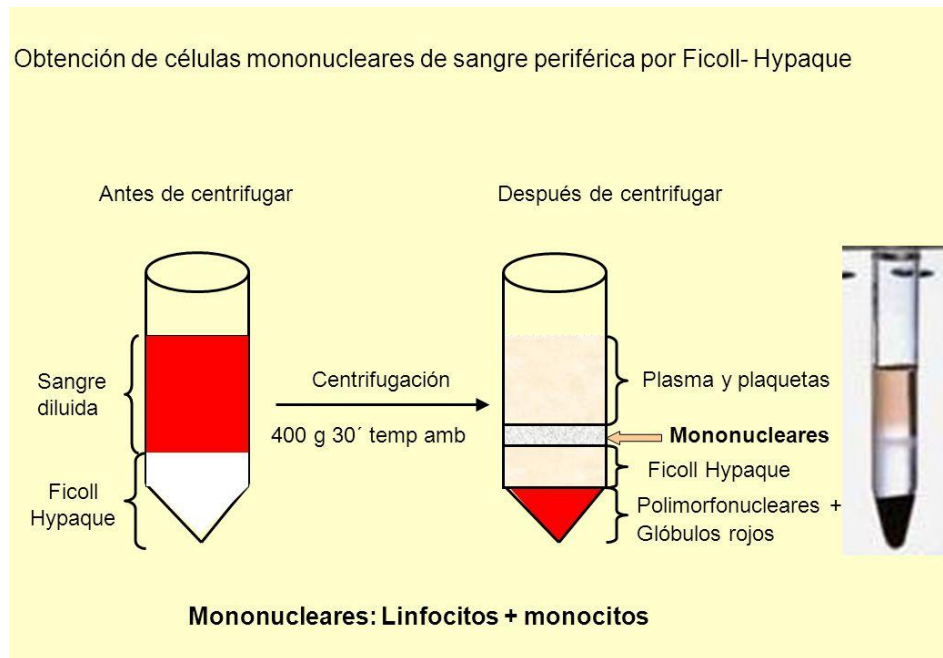


Figura 8. Separación de células mononucleares, utilizando gradiente de densidad (Ficoll-Hystopaque) y posterior centrifugación.

Tomar dos alícuotas de 5 μ L del tubo M y llevarlas a 200 μ L con la solución PBS + 3% de FBS en diferentes tubos eppendorf. Estos serán los tubos control (C) e isotipo (I).

Finalmente se añade anticuerpo primario Anti-SIRP alpha [ED9] en una dilución de (1:100) al tubo M durante 30 minutos a temperatura ambiente en movimiento. Luego se añadieron 10 μ L del anticuerpo secundario Alexa Fluor[®] 555 cabra anti-ratón IgG (H+L) a los tubos I y M durante 30 minutos a temperatura ambiente en movimiento. Todos los tubos se llevaron al proceso de citometría de flujo y posterior Cell Sorting para obtener los monocitos en forma pura.

5.7 Cell sorting

Las poblaciones celulares son identificadas y separadas mediante Cell Sorting (Beckson-Dickinson FACS flow and sorting cytometer) mediante el uso del anticuerpo anti-SIRP alpha [ED9], marcador de monocitos. La pureza de los monocitos fue de un 95% y viabilidad 96%. El análisis de datos se hizo mediante el uso del software FlowJo para lectura de histogramas, según protocolos indicado por el profesional de la unidad que presta servicio de Cell Sorting.

5.8 Ensayos de adhesión

Se seguirán los protocolos montados en el laboratorio. La adhesión celular se analizará con el kit Vybrant Cell Adhesion Assay (Invitrogen, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Monocitos obtenidos de bazo de rata fueron resuspendidos en medio libre de suero conteniendo 5 μ M de Calceína-AM a concentración de 5×10^6 células/ml. Tras una incubación por 30 min. a 37°C, las células se lavaron dos veces con medio libre de suero y se agregaron 60 μ l (100.000 células) sobre una monocapa confluyente de FC (20.000 células), los cuales habían sido previamente incubados en presencia o ausencia de LPS. Las células se incuban por 2 horas a 37°C, y luego se mide la fluorescencia mediante un lector de microplacas con un filtro de fluorescencia (excitación 470 y emisión 517). Después de ello, las células se vuelven a lavar cinco veces con medio libre de suero para finalmente agregar 200 μ l de PBS a cada pocillo y volver a medir la fluorescencia utilizando los mismos parámetros. El porcentaje de adhesión de monocitos se calculó de la siguiente manera; $100 \times (\text{fluorescencia de las células adheridas} / \text{fluorescencia del total de células agregadas})$.

5.9 Ensayo de viabilidad

En placas de 24 pocillos, se sembraron 10.000 células por pocillo, utilizando 200 μ L de medio DMEM-F12. Se realizaron estímulos con IMD-0354 a concentraciones de 0, 1, 5 10 μ M para determinar la viabilidad celular. Transcurrido el tiempo de estímulo (12 horas) se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por uno nuevo y 20 μ L de Alamar Blue®. Las nuevas condiciones se mantuvieron por 2 horas a 37°C en oscuridad y luego se midió la fluorescencia en lector (excitación 550 nm y emisión 590 nm), tomando como control negativo un pocillo que sólo posee el medio de cultivo y el Alamar Blue®. Los cálculos se hicieron restando el valor de cada pocillo por el valor del control negativo y tomando la viabilidad de un 100% en la condición sin estímulo de IMD-0354.

5.10 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 Tukey para determinar la significancia estadística de los resultados. El nivel de significación establecido fue de $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Determinación de los niveles proteicos de E-selectina en FC.

Se determinaron los niveles proteicos de E-selectina en el FC. Para esto, se estimularon las células con LPS (1µg/mL) por tiempos de 3, 6, 12 y 24 horas. Las muestras fueron analizadas por western blot (WB). Los resultados (Figura 9), muestran en la parte superior una imagen representativa del WB de E-selectina y su control de carga GAPDH, mientras que en la parte inferior se muestra un análisis gráfico del mismo. Del análisis de los resultados se obtiene que LPS fue capaz de aumentar los niveles proteicos de E-selectina en FC, en los cuales ya se comienzan a observar un aumento significativo de sus niveles a las 3 horas; sin embargo, alcanza un nivel máximo de aproximadamente 15 veces a las 12 horas, el cual decae a los niveles basales a las después de las 24 horas

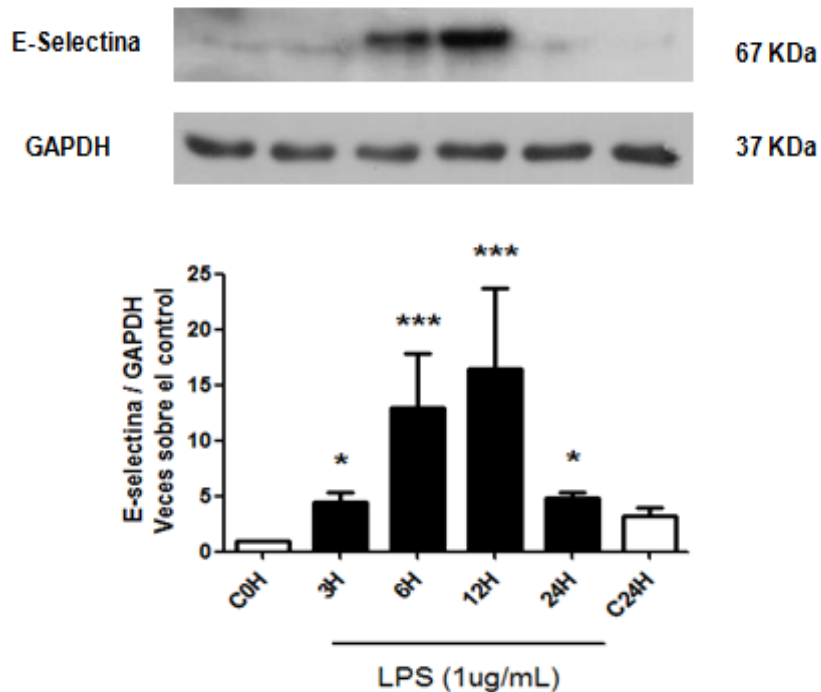


Figura 9. Expresión niveles proteicos de E-selectina en fibroblastos cardíacos (FC). Se estimularon FC con LPS (1 µg/ml) por períodos de 3, 6, 12 y 24 horas. Se utilizó la técnica Western Blot (WB). Como control de carga se utilizó GAPDH. *** $p < 0,001$ vs control; * $p < 0,05$ vs control. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=4), Test de Tukey. Se muestra una imagen representativa del experimento en el panel superior y la cuantificación de este en el panel inferior

6.2 TLR4 aumenta la expresión de E-selectina en FC.

De acuerdo a los antecedentes que manejamos sobre la activación de TLR4, éste se puede activar gracias a la presencia de LPS. Junto con ello, ya demostramos que la activación de TLR4 favorece el aumento de E-selectina. Por tanto este ensayo buscó demostrar, que el aumento de E-selectina era por activación específica del receptor TLR4. Para ello se pretrataron las células por 1 hora con el inhibidor de TLR4, TAK-242 4 μ M, y luego estimuladas durante 12 horas (tiempo de mayor expresión de E-selectina) con LPS 1 μ g/mL. Luego de esto, las muestras fueron analizadas por WB.

Los resultados (Figura 10), muestran en la parte superior una imagen representativa del WB de E-selectina y su control de carga GAPDH, mientras que en la parte inferior se muestra un análisis gráfico del mismo. Del análisis de los resultados se obtiene que LPS fue capaz de aumentar los niveles proteicos de E-selectina en FC; sin embargo, TAK 242 (5 μ M) fue capaz de prevenir el aumento inducido por LPS llegando a los niveles del control; por lo tanto, mostrando que efectivamente, el receptor TLR4 está involucrado en el aumento de expresión de E-selectina.

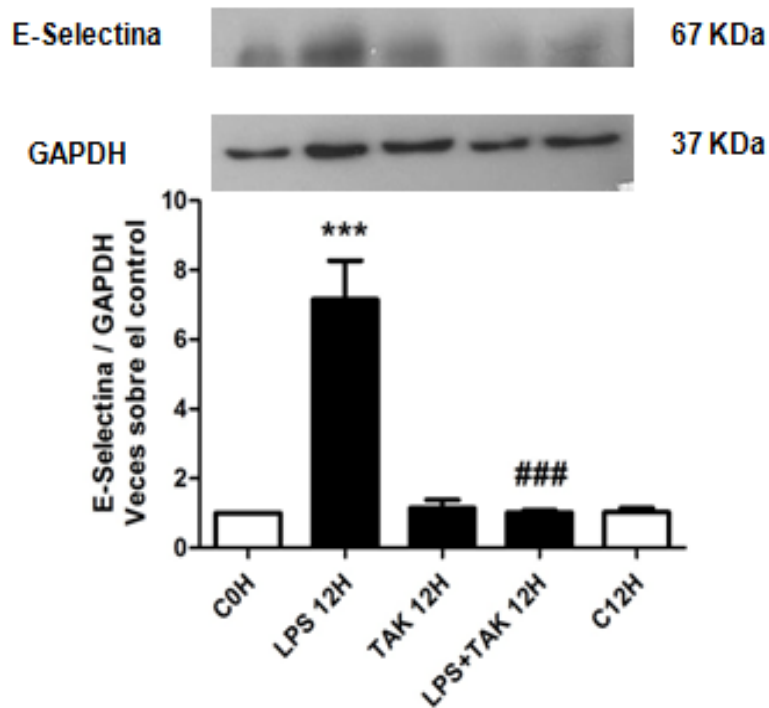


Figura 10. Participación de TLR4 en el aumento de expresión de E-selectina en fibroblastos cardíacos (FC). Se pretrataron FC con el antagonista de TLR4, TAK-242, durante 1 hora y luego fueron estimulados con LPS (1 µg/ml) por 12 horas. Se utilizó la técnica Western Blot (WB). Como control de carga se utilizó GAPDH. *** $p < 0,001$ vs control; ### $p < 0,001$ vs LPS. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=4), Test de Tukey. Se muestra una imagen representativa del experimento en el panel superior y la cuantificación de este en el panel inferior.

6.3 Localización celular de E-selectina en FC.

Una vez determinado que LPS induce la expresión de E-selectina en los FC y que el receptor TLR4 está involucrado en este proceso, estudiamos la localización celular de E-selectina al mayor tiempo de expresión, o sea 12 horas. Para ello realizamos ensayo de inmunocitoquímica (ICQ) a este tiempo, primero para determinar la presencia de E-selectina y luego para efectivamente observar su ubicación.

En la figura 11 observamos los FC en los cuales tenemos distintas condiciones. En la condición control 12 horas observamos que las células con el núcleo teñido en azul por la solución de Hoescht, y alrededor de este, una leve coloración roja, la cual representa a la presencia de E-selectina. Ahora bien, cuando estimulamos los FC con LPS a 12 horas

notamos un aumento considerable en la presencia de E-selectina (aumento de la coloración roja). Por otro lado, cuando el efecto del LPS es antagonizado por TAK-242 se observa una disminución de la presencia de E-selectina. Estos resultados respaldan nuestros resultados anteriores en donde demostramos que el aumento de E-selectina es modulado específicamente por la activación del TLR4. Finalmente ante la presencia solamente del TAK-242, no se observó el aumento en los niveles de expresión respecto del control.

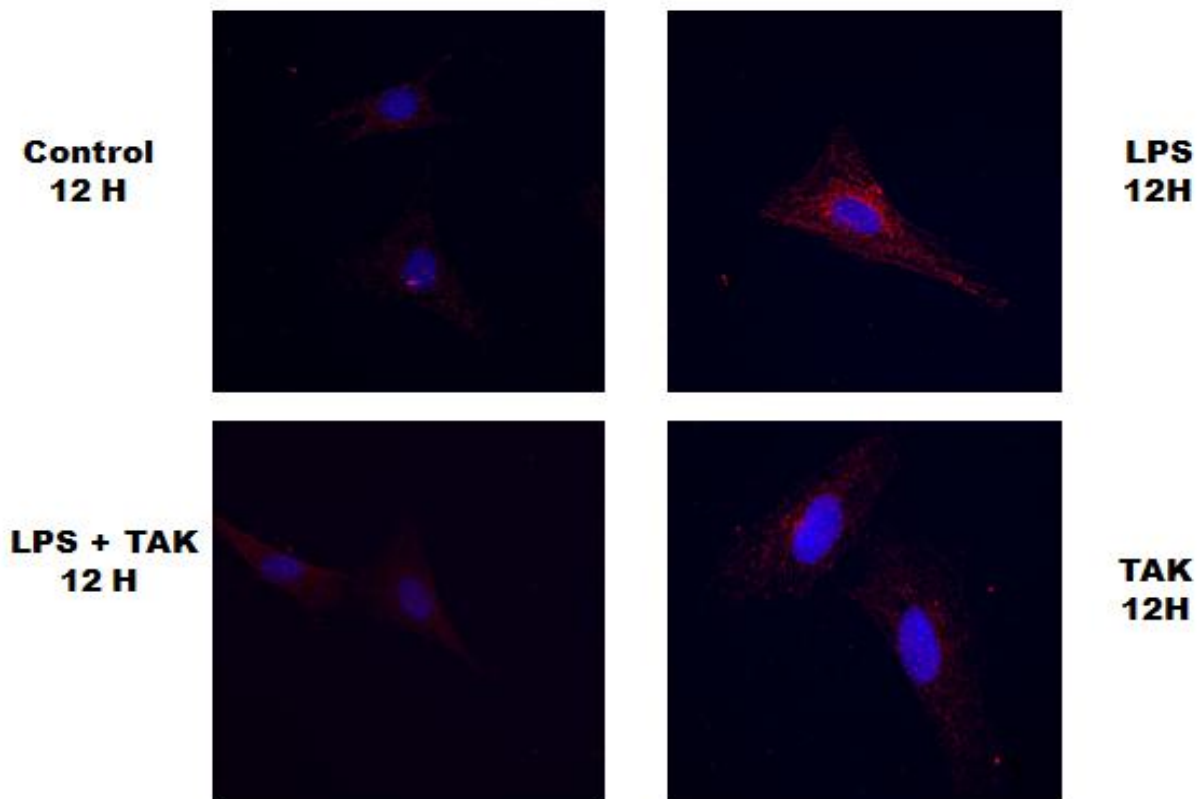


Figura 11. Participación de TLR4 en la expresión de E-selectina en fibroblastos cardiacos (ICQ). Los FCA fueron estimulados con LPS (10 µg/mL) durante 12 horas en presencia o ausencia de TAK-242 (4 µM/mL). La expresión de E-selectina se observó por inmunofluorescencia. Imágenes obtenidas con microscopio LSM 700, aumento 10x.

6.4 Aislación y purificación de monocitos a partir de bazo de rata adulta.

Según el protocolo, se procedió a la aislación y purificación de monocitos a partir de bazo de rata de adulta. En la figura 12 se comparan dos parámetros celulares medidos por la citometría de flujo como lo son la granularidad o complejidad celular (SSC) y el tamaño celular (FSC). A partir de esto, en la figura 12A podemos observar la población total de leucocitos obtenida previo a la separación por gradiente de densidad. Por otro lado, en la figura 12B se puede apreciar la población de células mononucleares, PBMC (linfocitos y monocitos), obtenidos luego de la separación por gradiente de densidad. Así, se observa en la figura 12B la ausencia de la población de polimorfonucleares, PMN (de mayor complejidad, SSC). Esto demuestra que el protocolo de gradiente de densidad fue efectivo para poder separar las poblaciones de PBMC y PMN.

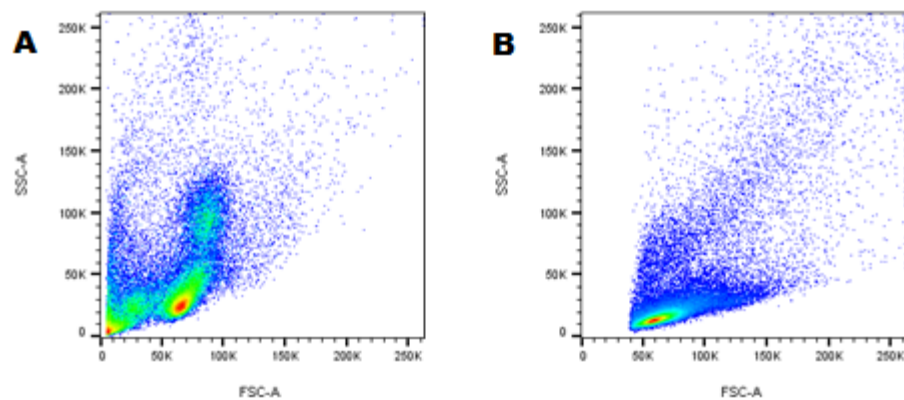


Figura 12. Comparación entre poblaciones celulares obtenidas a partir del bazo de rata adulta. Las ratas fueron anestesiadas con ketamina-xilazina (2:1) y luego se le extrajo de el bazo, el cual fue triturado y homogenizado en solución DMEM-F12. **A.** En este caso el homogenizado, rico en leucocitos, fue analizado directamente en el equipo de citometría de flujo. **B.** El homogenizado fue colocado sobre una capa de Ficoll-Hystopaque 1083 y centrifugado a 400g por 30 minutos. El halo ubicado entre el plasma y el Ficoll es el analizado en este caso.

A continuación, se procedió a la separación de la población de monocitos mediante la técnica de *cell sorting* utilizando como marcador de monocitos el anticuerpo primario Anti-SIRP alpha [ED-9] y el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 555 cabra anti-

ratón IgG (H+L) conjugado al fluoróforo FITC. En la figura 13 se analizan las poblaciones celulares bajo los parámetros de SSC y FSC versus FITC, previo (13A y 13C) y posterior a la separación (13B y 13D). El análisis se realizó bajo los parámetros SSC y FSC para demostrar que no hay una diferencia significativa en la población final de monocitos obtenidos.

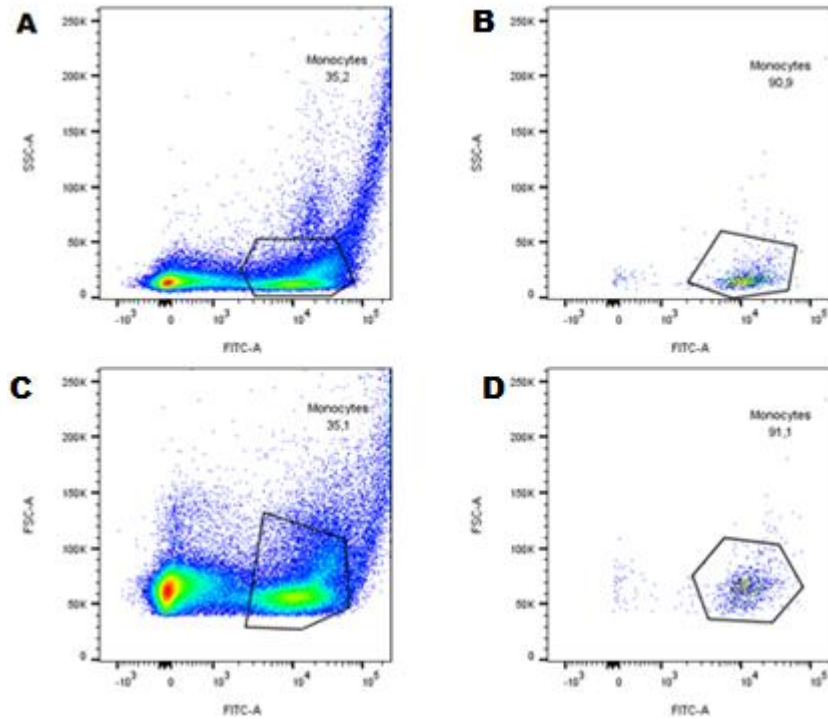


Figura 13. Comparación entre los parámetros de granularidad (SSC) y tamaño celular (FSC) con el fluoróforo FITC en la población celular obtenida a partir del bazo de rata adulta. La población obtenida luego de la separación por gradiente de densidad fue incubada con el anticuerpo primario anti-SIRP alpha [ED-9] (1:100) y posteriormente con el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 555 cabra anti-ratón IgG (H+L) conjugado al fluoróforo FITC. **A-B.** Se comparan los parámetros de granularidad celular (SSC) versus FITC. **C-D.** Se comparan los parámetros de tamaño celular (FSC) versus FITC. El análisis de las muestras se realizó a través de Cell Sorting (Beckson-Dickinson FACS flow and sorting cytometer).

Finalmente al analizar el histograma de la figura 14A, advertimos que existe una población celular negativa para nuestro fluoróforo y por tanto no relacionada al tipo celular que estamos buscando, mientras que en la zona de 10⁴ nos podemos dar cuenta de la población positiva para FITC y que representan a los monocitos que queremos purificar. Por otro lado, en la figura 14B notamos un histograma en donde existe, predominantemente, un conjunto celular positivo para FITC en desmedro de la zona

negativa, lo cual evidencia que el proceso de *sorting* ha sido altamente eficiente, separando sólo las células de nuestro interés.

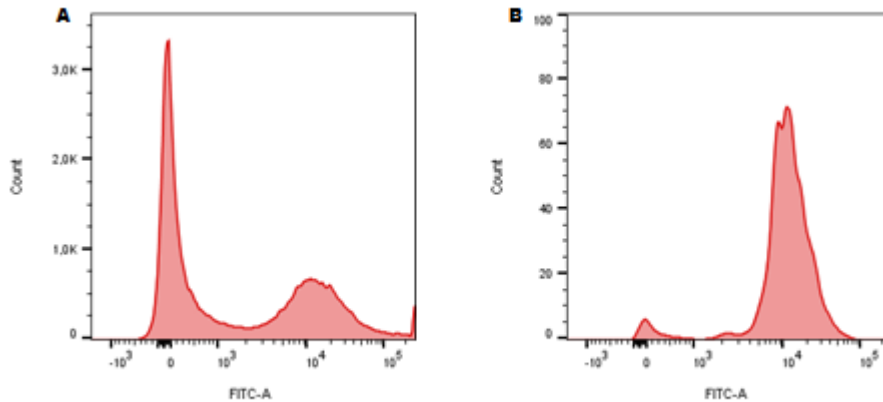


Figura 14. Histogramas correspondientes a conteo celular vs FITC. La población obtenida luego del proceso de centrifugación fue incubada con el anticuerpo primario anti-SIRP alpha [ED-9] (1:100) y posteriormente con el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 555 cabra anti-ratón IgG (H+L) asociado al fluoróforo FITC. **A.** Histograma conteo celular vs FITC previo al proceso de *sorting*, indicando una población altamente negativa para FITC. **B.** Histograma de conteo celular vs FITC posterior al proceso de *sorting*, indicando una población altamente positiva para FITC. El análisis de las muestras se realizó a través de Cell Sorting (Beckson-Dickinson FACS flow and sorting cytometer).

6.5 La activación de TLR4 aumenta la adhesión de monocitos sobre una monocapa de FC.

Para determinar la participación del receptor TLR4 en la adhesión de monocitos sobre fibroblastos cardíacos, se pretrataron los FC con el inhibidor del receptor, el TAK-242 (4 μ M) por 1 hora y luego se estimularon con LPS (1 μ g/mL) durante 12 horas en medio de cultivo DMEM-F12. Posteriormente y una vez completado el tiempo de estímulo se agregaron los monocitos purificados y marcados con calceína AM (5 μ M) en una proporción 1:5 sobre la monocapa de FC. En estas condiciones las células fueron incubadas por 2 horas a 37°C para completar el proceso de adhesión. Una vez transcurrido el tiempo determinado para el ensayo, se procedió a medir la fluorescencia emitida, por los monocitos adheridos a la monocapa, en el lector de microplacas.

Los resultados (figura 15) muestran que los FC en condiciones basales son capaces de adherir aproximadamente un 10% del total de monocitos que fueron agregados sobre la monocapa. Pero cuando estos fueron estimulados con LPS el porcentaje de adhesión casi se triplica, alcanzando valores cercanos al 30%. Por otro lado, cuando el receptor TLR4 fue inhibido por el TAK-242, incluso en presencia de LPS, la adhesión de monocitos a la monocapa de fibroblastos cardíacos se reduce, por debajo de los niveles del control, alcanzado una adhesión de aproximadamente un 8%.

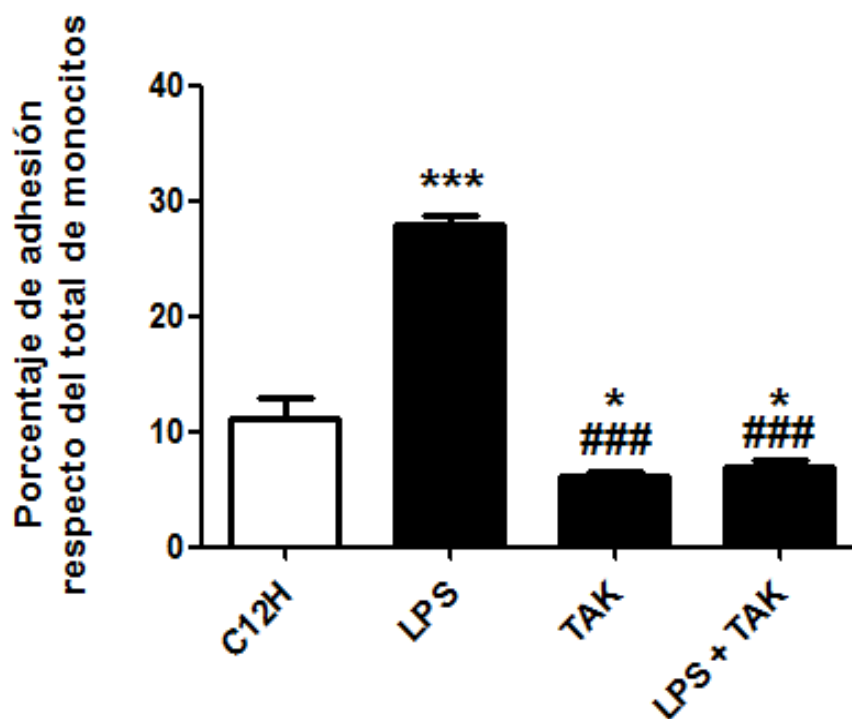


Figura 15. Participación de TLR4 en la adhesión entre monocitos y una monocapa de fibroblastos cardíacos (FC). Se pretrataron FC con el antagonista de TLR4, TAK-242, durante 1 hora y luego fueron estimulados con LPS (1 µg/ml) por 12 horas. Luego se agregaron monocitos marcados con calceína AM 5µM en una proporción 1:5 durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se midió la fluorescencia emitida por los monocitos adheridos en el lector de microplacas. Los resultados se expresan como promedio ± SEM. (n=4), Test de Tukey, *** p<0,001 vs control; ### p<0,001 vs LPS; * p>0,01 vs control.

6.6 La activación TLR4 a través de las vías ERK 1/2, PI3K/Akt y NF-κB aumenta la adhesión de monocitos sobre una monocapa de FC.

Como sabemos, por resultados obtenidos en el laboratorio, luego de la estimulación del TLR4 se activan las vías de señalización ERK1/2, Akt y NF-κB, las cuales se ha demostrado participan de la expresión de E-selectina; es por ello, que analizaremos la importancia y participación de cada una de estas vías en la adhesión entre monocitos y fibroblastos cardíacos.

6.6.1 Participación de la vía ERK1/2 en la adhesión de monocitos sobre una monocapa de FC inducida por LPS.

Para determinar la participación de la vía ERK1/2 en la adhesión entre FC y monocitos, se pretrataron los FC con el inhibidor esta vía, el PD-98050 (10 μM) por 1 hora y luego se estimularon con LPS (1μg/mL) durante 12 horas en medio de cultivo DMEM-F12. Posteriormente y una vez completado el tiempo de estímulo se agregaron los monocitos purificados y marcados con calceína AM (5 μM) en una proporción 1:5 sobre la monocapa de FC. En estas condiciones las células fueron incubadas por 2 horas a 37°C para completar el proceso de adhesión. Una vez transcurrido el tiempo determinado para el ensayo, se procedió a medir la fluorescencia emitida, por los monocitos adheridos a la monocapa, en el lector de microplacas.

Los resultados, mostrados en la figura 16, nos indican que los FC en condiciones basales son capaces de adherir aproximadamente un 10% del total de monocitos que fueron agregados sobre la monocapa. Pero cuando estos fueron estimulados con LPS el porcentaje de adhesión casi se triplica, alcanzando valores cercanos al 30%. Por otro lado cuando la vía ERK1/2 fue inhibida, la adhesión entre monocitos y la monocapa de FC se

reduce incluso, en presencia de LPS, por debajo de los niveles del control, alcanzado una adhesión de aproximadamente un 6%.

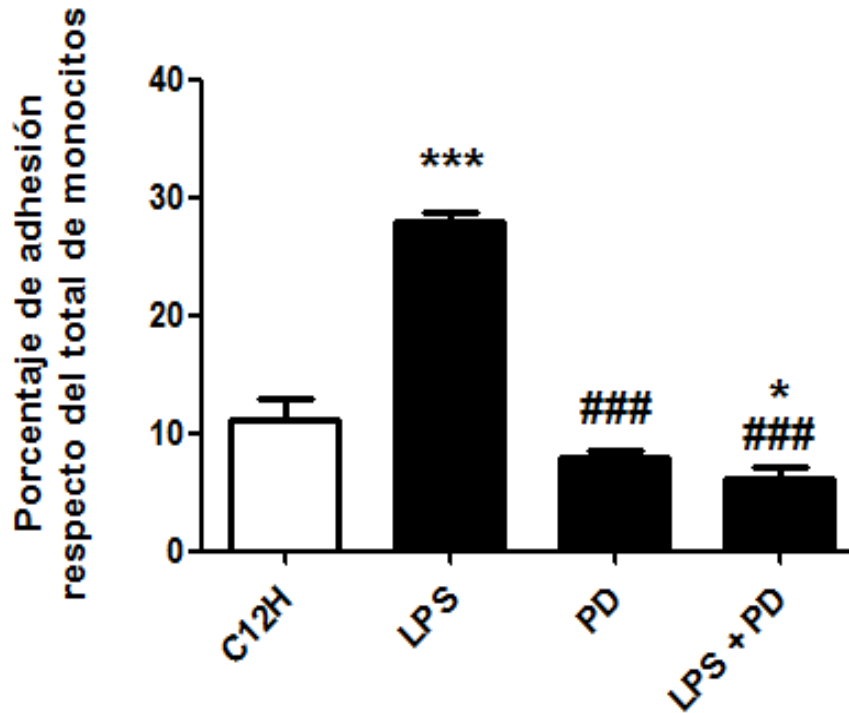


Figura 16. Participación de ERK 1/2 en la adhesión entre monocitos y una monocapa de fibroblastos cardíacos (FC) estimulados con LPS. Se pretrataron FC con el inhibidor de ERK 1/2, PD-98050 10 μ M, durante 1 hora y luego fueron estimulados con LPS (1 μ g/ml) por 12 horas. Luego se agregaron monocitos marcados con calceína AM 5 μ M en una proporción 1:5 durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se midió la fluorescencia emitida por los monocitos adheridos en el lector de microplacas. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=4), Test de Tukey, *** p<0,001 vs control; ### p<0,001 vs LPS; * p>0,01 vs control.

6.6.2 Participación de la vía PI3K/Akt en la adhesión de monocitos sobre una monocapa de FC estimulados con LPS.

Para determinar la participación de la vía PI3K/Akt en la adhesión en FC y monocitos, se pretrataron las primeras con el inhibidor esta vía, el LY-294002 (10 μ M) por 1 hora y luego se estimularon con LPS (1 μ g/mL) durante 12 horas en medio de cultivo DMEM-F12. Posteriormente y una vez completado el tiempo de estímulo se agregaron los monocitos purificados y marcados con calceína AM (5 μ M) en una proporción 1:5 sobre la monocapa de FC. En estas condiciones las células fueron incubadas por 2 horas a 37°C

para completar el proceso de adhesión. Una vez transcurrido el tiempo determinado para el ensayo, se procedió a medir la fluorescencia emitida, por los monocitos adheridos a la monocapa, en el lector de microplacas.

Los resultados, mostrados en la figura 17, nos indican que los FC en condiciones basales son capaces de adherir aproximadamente un 10% del total de monocitos que fueron agregados sobre la monocapa. Pero cuando estos fueron estimulados con LPS el porcentaje de adhesión casi se triplica, alcanzando valores cercanos al 30%. Por otro lado cuando la vía PI3K/Akt fue inhibida, la adhesión entre monocitos y la monocapa de FC se reduce, incluso en presencia de LPS, a los niveles del control, un 10% aproximadamente.

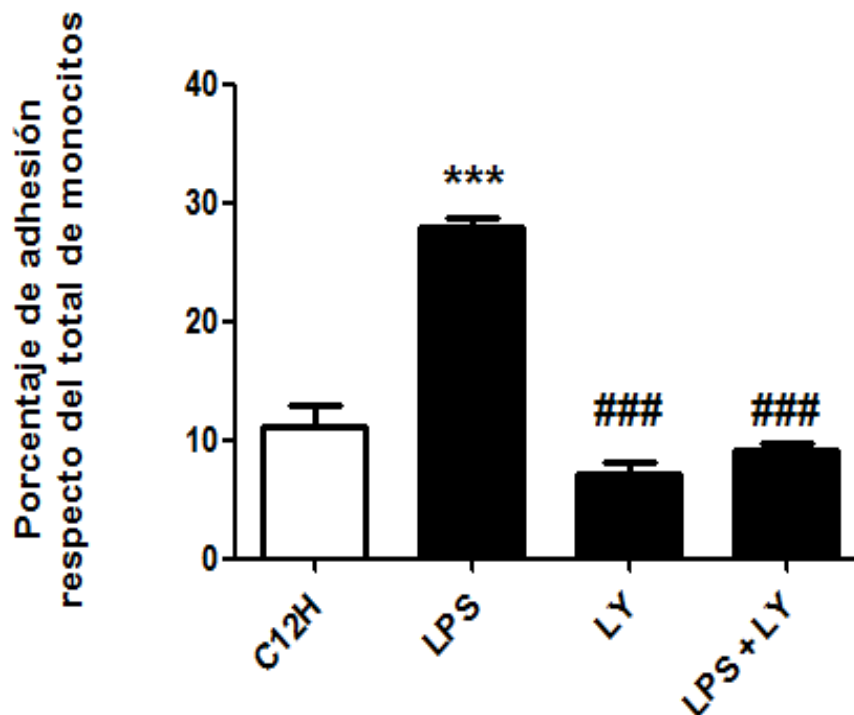


Figura 17. Participación de PI3K/Akt en la adhesión entre monocitos y una monocapa de fibroblastos cardíacos (FC). Se pretrataron FC con el inhibidor de Akt, LY-294002 10 μ M, durante 1 hora y luego fueron estimulados con LPS (1 μ g/ml) por 12 horas. Luego se agregaron monocitos marcados con calceína AM 5 μ M en una proporción 1:5 durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se midió la fluorescencia emitida por los monocitos adheridos en el lector de microplacas. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=4), Test de Tukey, *** p<0,001 vs control; ### p<0,001 vs LPS.

6.6.3 Determinación de la viabilidad celular de FC en presencia de IMD-0354.

Uno de nuestros objetivos era analizar si la vía NF- κ B estaba involucrada en la adhesión entre monocitos y FC, previo a ello se realizó un estudio de la concentración del inhibidor IMD-0354 a la cual no produce la muerte celular de los FC, y es por ello que se realizaron ensayos de viabilidad celular a distintas concentraciones.

Con este fin los FC se trataron con IMD-0354 a concentraciones de 1, 5 y 10 μ M durante 12 horas en medio de cultivo DMEM-F12. Una vez transcurrido el tiempo de ensayo, se procedió a retirar el medio de cultivo, para reemplazarlo por uno nuevo y 20 μ L de Alamar Blue®. En estas nuevas condiciones las células fueron incubadas por 2 horas a 37°C en completa oscuridad, para luego medir la fluorescencia emitida por los FC vivos en el lector de microplacas.

Los resultados expresados en la figura 18, nos indican que los FC mantienen una sobrevida de un 100% en ausencia del tratamiento con IMD-0354. Pero al ser tratados con el inhibidor por 12 horas la sobrevida disminuye conforme aumenta su concentración. Así se observa que una concentración de 1 μ M permite una sobrevida de los FC de aproximadamente un 82%. Al aumentar la concentración esta vez a 5 μ M se observa que la sobrevida de los FC alcanza un 75%. Finalmente al utilizar la concentración de IMD-0354 inicial para nuestro ensayo, es decir, 10 μ M observamos que efectivamente la sobrevida de los FC disminuye considerablemente alcanzando un valor aproximado de un 30%.

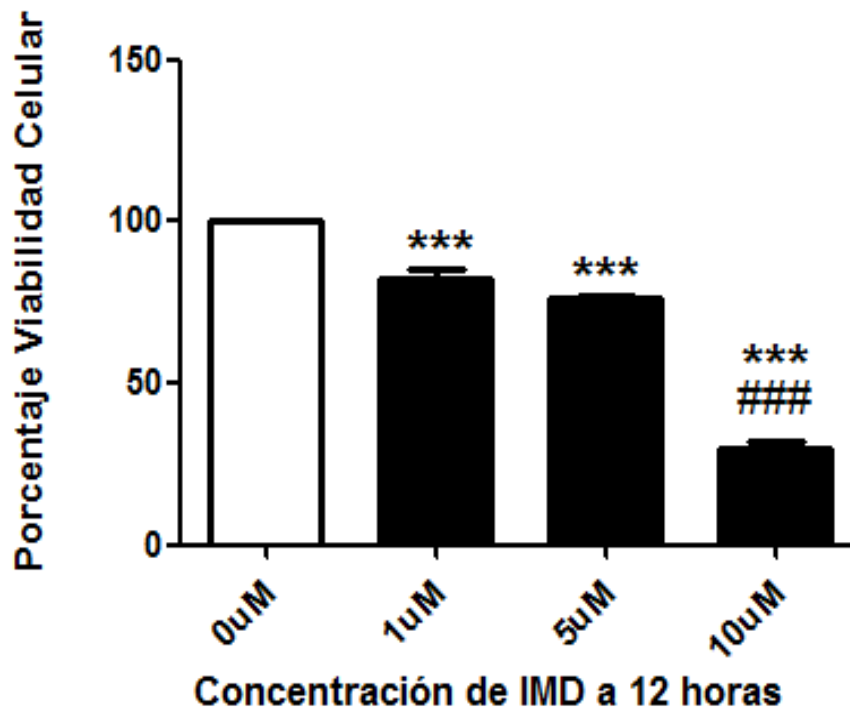


Figura 18. Determinación de la viabilidad celular de fibroblastos en presencia de IMD-0354. Se trataron FC con el inhibidor de NF-κB, IMD-0354, a concentraciones de 1, 5 y 10 μM durante 12 horas. Luego se cambió el medio de cultivo y se agregaron 20 μL de Alamar Blue® durante 2 horas a 37°C en completa oscuridad. Posteriormente se midió la fluorescencia emitida por los fibroblastos cardíacos vivos en el lector de microplacas. Los resultados se expresan como promedio ± SEM. (n=4), Test de Tukey, *** p<0,001 vs control; ### p<0,001 vs 1 μM.

6.6.4 Participación de la vía NF-κB en la adhesión de monocitos sobre una monocapa de FC inducida por LPS.

Para determinar la participación de la vía NF-κB en la adhesión en FC y monocitos, se pretrataron los FC con el inhibidor IMD-0354 (1 μM) por 1 hora y luego se estimularon con LPS (1 μg/mL) durante 12 horas en medio de cultivo DMEM-F12. Posteriormente y una vez completado el tiempo de estímulo se agregaron los monocitos purificados y marcados con calceína AM 5 μM en una proporción 1:5 sobre la monocapa de FC. En estas condiciones las células fueron incubadas por 2 horas a 37°C para completar el proceso de adhesión. Una vez transcurrido el tiempo determinado para el ensayo, se procedió a medir la fluorescencia emitida, por los monocitos adheridos a la monocapa, en el lector de microplacas.

Los resultados, expresados en la figura 19, nos indican que los FC en condiciones basales son capaces de adherir aproximadamente un 10% del total de monocitos que fueron agregados sobre la monocapa. Pero cuando estos fueron estimulados con LPS el porcentaje de adhesión casi se triplica, alcanzando valores cercanos al 30%. Por otro lado cuando la vía NF- κ B fue inhibida, la adhesión entre monocitos y la monocapa de FC se reduce, incluso en presencia de LPS, por debajo de los niveles del control, alcanzado una adhesión de aproximadamente un 4 a 5%.

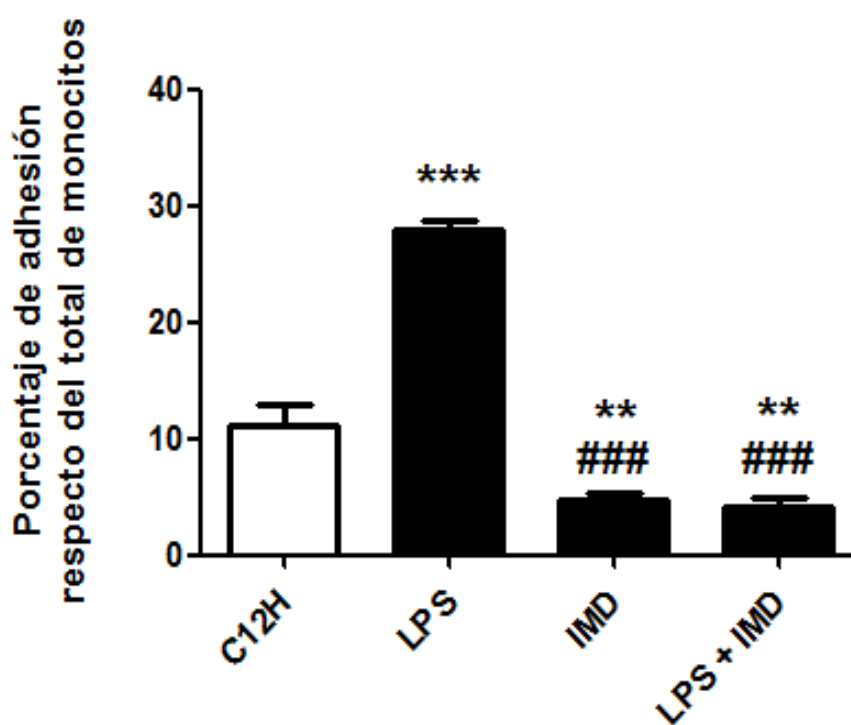


Figura 19. Participación de NF- κ B en la adhesión entre monocitos y una monocapa de fibroblastos cardíacos (FC). Se pretrataron FC con el inhibidor de NF- κ B, IMD-0354 1 μ M, durante 1 hora y luego fueron estimulados con LPS (1 μ g/ml) por 12 horas. Luego se agregaron monocitos marcados con calceína AM 5 μ M en una proporción 1:5 durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se midió la fluorescencia emitida por los monocitos adheridos en el lector de microplacas. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=4), Test de Tukey, *** p<0,001 vs control; ### p<0,001 vs LPS; ** p<0,05 vs control.

6.7 Participación de la E-selectina en la adhesión de monocitos sobre una monocapa de FC inducida por LPS.

El punto más importante de este trabajo consiste en determinar el grado de participación de la proteína de adhesión, E-selectina, en la adhesión entre monocitos y FC, cuya expresión en el FC fue confirmada por nuestros resultados.

Para determinar la participación de E-selectina en la adhesión entre FC y monocitos, los FC se estimularon con LPS (1µg/mL) durante 12 horas en medio de cultivo DMEM-F12. Posteriormente y 1 hora antes de cumplirse el tiempo de estímulo se agregó el anticuerpo Anti E-selectina (10 µg de proteína) para bloquear la proteína expresada en la superficie de los FC. Luego se agregaron los monocitos purificados y marcados con calceína AM (5 µM) en una proporción 1:5 sobre la monocapa de FC. En estas condiciones las células fueron incubadas por 2 horas a 37°C para completar el proceso de adhesión. Una vez transcurrido el tiempo determinado para el ensayo, se procedió a medir la fluorescencia, emitida por los monocitos adheridos a la monocapa de FC, en el lector de microplacas.

Los resultados, expresados en la figura 20, nos indican que los FC en condiciones basales son capaces de adherir aproximadamente un 10% del total de monocitos que fueron agregados sobre la monocapa. Pero cuando estos fueron estimulados con LPS el porcentaje de adhesión casi se triplica, alcanzando valores cercanos al 30%. Por otro cuando E-selectina fue bloqueada, la adhesión entre monocitos y la monocapa de FC, incluso en presencia de LPS, se reduce a los niveles del control, un 10% aproximadamente.

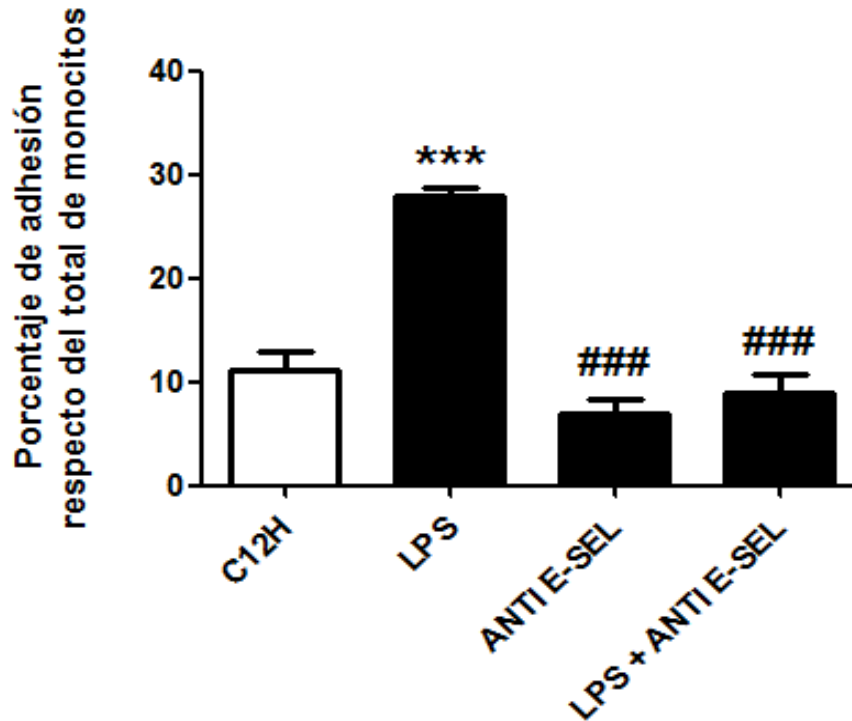


Figura 20. Participación de E-selectina en la adhesión entre monocitos y una monocapa de fibroblastos cardíacos (FC). Se trataron FC con LPS (1 µg/ml) por 12 horas. 1 hora antes del ensayo de adhesión se agregó el anticuerpo Anti E-selectina (10µg de proteína) para bloquear la proteína expresada en la superficie de los FC. Luego se agregaron monocitos marcados con calceína AM (5 µM) en una proporción 1:5 durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se midió la fluorescencia emitida por los monocitos adheridos en el lector de microplacas. Los resultados se expresan como promedio ± SEM. (n=4), Test de Tukey, *** p<0,001 vs control; ### p<0,001 vs LPS.

7. DISCUSIÓN

Los hallazgos más importantes, encontrados en este trabajo, se relacionan con la capacidad del FC de ratas para expresar la proteína de adhesión, E-selectina, siendo fundamental la activación de TLR4 para este proceso. Por otro lado, también encontramos datos valiosos sobre la adhesión de monocitos sobre los FC. En este caso determinamos que la activación del receptor TLR4, y sus vías de señalización ERK 1/2, PI3K/Akt y NF- κ B regulan la adhesión de los monocitos con los FC. Finalmente, demostramos la participación de la E-selectina en la adhesión entre monocitos y FC.

7.1 La estimulación de TLR4 aumenta la expresión de E-selectina en FC.

Como se mencionó anteriormente la expresión de E-selectina está ampliamente descrita en células endoteliales [34-36]. Junto con lo anterior, se ha visto que en muchos casos este aumento es debido al efecto LPS, tal y como muestra Leeuwenberg et al. [34] quienes demostraron que las vesículas derivadas de *E.coli* (un bacteria gran negativa y por tanto productora de LPS) gatillan un aumento en la expresión de E-selectina, además de otras proteínas de adhesión tales como ICAM-1 y VCAM-1.

Por otro lado, varios estudios indican que no sólo LPS promueve el aumento de expresión de E-selectina, sino que además la IL-1 β y TNF- α también provocan el mismo efecto que el LPS. Esto fue demostrado por Makó et al., y Leeuwenberg et al., quienes estimularon células endoteliales con las 3 moléculas anteriormente mencionadas, encontrándose que LPS es el estímulo que menor aumenta la cantidad de E-selectina, siendo TNF- α y IL-1 β los estímulos que favorecen con mayor intensidad la expresión de la proteína. Sin embargo, a pesar de que LPS tiene menos incidencia en el aumento de la expresión de E-selectina, de igual forma favorece la adhesión entre monocitos y células endoteliales [34,37].

En los últimos años el estudio de la E-selectina se ha ido ampliando a otros tipos celulares, debido a su importante rol en procesos inflamatorios. Por ejemplo, en osteoblastos humanos, la activación con LPS a través de TLR4 favorece la expresión de E-selectina a las 24 horas luego del estímulo. También hubo un aumento de ICAM-1 y de las quimioquinas proinflamatorias IL-6 y IL-8, lo que evidencia aún más que la E-selectina está involucrada en procesos inflamatorios [38]. Siguiendo la misma línea, también se ha descrito su presencia en el tejido subgingival humano en presencia de placa bacteriana, incluso una vez erradicada esta, los niveles de E-selectina disminuyen [39].

Además, últimos estudios, nos indican que los resultados obtenidos en nuestro trabajo tienen consistencia ya que en fibroblastos de distintos tejidos también expresan la E-selectina, aunque con distintos estímulos. A este respecto, se ha demostrado que los fibroblastos orbitales de personas que padecen la enfermedad de Graves expresan la E-selectina, luego de la activación del receptor CD40, que al igual que TLR4 permiten la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B [29]. Pero sin duda, el trabajo más importante para nosotros, es el de Turner et al., quienes demostraron que en células endoteliales la IL-1 β y el TNF- α generan un aumento en la expresión de E-selectina a las 6 horas, mientras que en los FC el aumento solo fue significativo con IL-1 β , también al tiempo señalado [25]. Esto último nos da a entender que efectivamente la E-selectina puede expresarse en los FC incluso por distintos estímulos. Respecto de la temporalidad en la expresión de E-selectina nuestros resultados mostraron un máximo aumento a 12 horas, mientras que en otros la máxima expresión se ha observado a las 6 o 24 horas. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la expresión tiene un aumento sostenido a partir de las 3 horas, lo cual indica que la expresión de E-selectina comienza paulatinamente a medida que el proceso inflamatorio se consolida, luego de una injuria

cardíaca. En conclusión, de nuestros resultados y el de otros investigadores podemos concluir que la expresión de E-selectina es célula y estímulo dependiente.

Respecto de la expresión de E-selectina, nuestros resultados muestran que el estímulo con LPS favorece el aumento en la expresión de E-selectina a través de la activación del receptor TLR4. Esto quedó demostrado en la figura 10, en donde el pre-tratamiento con el inhibidor del TLR4, TAK-242, revirtió el efecto del estímulo, LPS. A este respecto, otros autores han demostrado la importancia en la activación del TLR4 para inducir la expresión de E-selectina. En este sentido se demostró en células endoteliales, que HMGB1 (High mobility group box 1, un ligando endógeno de TLR4) induce la expresión de E-selectina y este efecto fue bloqueado con atorvastatina y también con CLI-095, que es un inhibidor del TLR4 [40]. También se demostró que fluvastatina modula negativamente la actividad de TLR4 post isquemia reperusión [41]. En otros estudios se reportó que el bloqueo del TLR4 con LPS de *R. sphaeroides* LPS (un antagonista del TLR4), bloqueó la expresión de E-selectina inducida por LPS[35]. De manera similar, en ratones C3H/HeJ (ratones con TLR4 mutado) se produce una caída en los niveles de E-selectina [42]. Estos resultados en forma colectiva indican que efectivamente nuestros resultados tienen concordancia con los reportados por otros autores, a pesar de que no existen estudios previos de la participación de TLR4 sobre la expresión de E-selectina en FC.

7.2 Participación de TLR4, ERK1/2, PI3K/Akt y NF-κB en la adhesión de monocitos sobre FC.

Los hallazgos encontrados en este trabajo sobre este ítem es que el receptor TLR4 y las vías transduccionales ERK1/2, PI3K/Akt y NF-κB están involucradas en el proceso de adhesión entre FC y monocitos, luego del estímulo con LPS por 12 horas. Lo importante a destacar es que estos resultados son indirectos, y aunque nosotros no

demostramos que estas vías de señalización participan de la expresión de E-selectina, otros autores han demostrado que esas vías de señalización modulan la expresión de E-selectina.

7.2.1 Adhesión entre monocitos y otros tipos celulares.

Los monocitos juegan un rol fundamental en la homeostasis, inmunidad y promoción y resolución de la inflamación en el tejido afectado [43,44]. Para ello, estas células deben transmigrar a este tejido afectado a través del endotelio para poder cumplir las funciones anteriormente descritas. Esto se realiza gracias a citoquinas proinflamatorias tales como, IL-1 β , TNF- α y LPS que “activan” el endotelio, con lo cual se expresan las distintas proteínas de adhesión (E y P selectina, ICAM-1 y VCAM-1) [45]. Incluso la deficiencia de E y P selectina, además de ICAM-1 ha mostrado una reducción significativa en lesiones ateroscleróticas [46].

Junto con lo anterior se ha descrito que E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 son muy importantes en el proceso de adhesión ya que inician la reorganización del citoesqueleto, facilitando la trans migración, gracias a la formación de *clusters* con los contrarreceptores de integrina de los leucocitos [47,48].

El proceso anteriormente descrito ha sido ampliamente estudiado en células endoteliales, pero en la actualidad se ha visto que muchas de las proteínas expresadas en estas células también han sido encontradas en fibroblastos, incluso estudios previos en el laboratorio, han visto que ICAM-1 y VCAM-1 se expresan en FC. A este respecto, ya en este trabajo reportamos la expresión de E-selectina en el mismo tipo celular.

Las tres proteínas mencionadas se expresan tras la activación del TLR4 luego del estímulo con LPS, por tanto analizamos la adhesión de los monocitos sobre FC interviniendo el receptor y sus vías de señalización (ERK1/2, PI3K/Akt y NF- κ B).

7.2.2 La activación de TLR4 modula positivamente la adhesión celular de monocitos sobre una monocapa de FC.

La adhesión entre monocitos y otro tipo celular depende principalmente de tres proteínas de adhesión (E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1). E-selectina, en FC puede ser expresada a través de la activación del receptor TLR4, situación que quedó demostrada en este trabajo. Mientras que ICAM-1 y VCAM 1 también pueden ser expresadas en el FC luego de la activación del TLR4 gracias al estímulo de LPS [27]. En los tres casos anteriores, la participación del TLR4 fue demostrada gracias al uso del inhibidor TAK-242; y el aumento en la expresión de esas proteínas fue significativo a las 12 horas, lo que indica que en los tiempos de nuestro ensayos, estas tres proteínas se encontrarían presentes en la superficie de la monocapa de FC. Los resultados mostraron que la inhibición del TLR4 disminuye considerablemente la adhesión celular entre monocitos y FC, situación que claramente puede ser atribuible a la disminución en la expresión de las proteínas de adhesión.

7.2.3 La activación de ERK1/2 modula positivamente la adhesión celular de monocitos sobre una monocapa de FC.

En nuestros resultados observamos que el uso del inhibidor de ERK1/2 (PD-98059), disminuyó el porcentaje de adhesión entre monocitos y una monocapa de FC inducido por la activación de TLR4. De estos resultados no podemos concluir que la activación de ERK1/2 participa de la expresión de E-selectina, pues nosotros no demostramos que la expresión de esta proteína es dependiente de esta vía de señalización; sin embargo, está ampliamente reportado en la literatura que la expresión de E-selectina es dependiente de esta vía transduccional aunque en otros tipos celulares o con otros estímulos. En este sentido, en células endoteliales de arteria ílica de porcino LPS aumentó la expresión de E-selectina (también de ICAM-1), y este efecto fue revertido

al usar quitosano, esto gracias a la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 [49]. Junto con esto, en fibroblastos el estímulo con CD40L también induce el aumento de E-selectina. Pero además en el mismo trabajo se indica que al usar el inhibidor de ERK1/2 (PD-98095) el aumento de la proteína se revierte al igual que el aumento de VCAM-1 [29].

Por otro lado, es ampliamente conocido que posterior a la adhesión con E-selectina se gatilla una adhesión más estable con la participación de las proteínas ICAM-1 y VCAM-1. En este sentido, creemos importante destacar la participación de la vía ERK1/2 en la adhesión entre monocitos y FC, en la cual no nos cabe duda que participan otras proteínas de adhesión.

En trabajos previos en nuestro laboratorio hemos demostrado que la expresión de ICAM-1, luego de la activación de TLR4 depende de la vía ERK1/2 [27]. Este hallazgo también se ha descrito en células endoteliales de pulmón, en donde la inhibición de ERK1/2 con magnolol (un lignano) disminuyó la expresión de ICAM-1 [50]. De igual forma el uso de U0126 (inhibidor de MEK1/2, proteína de la vía MAPK-ERK1/2), revirtió el aumento de la expresión de ICAM-1, además de la adhesión entre monocitos y células epiteliales alveolares producido por esfingosina 1 fosfato (S1P) [51]. Estos mismos resultados fueron encontrados en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano, en donde el uso de artemisinina (fármaco utilizado en la malaria) inhibe la vía de las MAPK, disminuyendo la proporción de ERK1/2 fosforilado, y por lo tanto, también disminuyó los niveles de ICAM-1 y con esto la adhesión de monocitos sobre estas células [52]. Por otro lado, en FC la expresión de VCAM-1 no fue afectada por la inhibición de la vía ERK1/2 [27], resultado que se contradice con trabajos realizados previamente sobre esta vía. A este respecto, en células musculares lisas vasculares, el uso de lobastina (un agente antioxidante y antibacteriano) revierte el aumento en la expresión de VCAM-1 inducido por TNF- α , gracias a la inhibición en la fosforilación de ciertas MAPK incluido

ERK1/2. Además, el uso del inhibidor PD-98059 (el mismo utilizado por nosotros para inhibir ERK1/2), favoreció la disminución en la expresión de la proteína de adhesión [53]. También se ha observado en fibroblastos NIH/3T3, que el tratamiento con microvesículas (TMV's) induce el aumento de VCAM-1, vía ERK1/2 [54]. Además de lo anterior, también se observó que artemisinina (que inhibe la fosforilación de ERK1/2), también modula negativamente la expresión de VCAM-1 al igual ICAM-1 [52].

Estos resultados en forma colectiva nos indica que en diversos tipos celulares la vía ERK1/2 está involucrada en la expresión de E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 y por ello su inhibición revertiría la expresión de estas proteínas, y como consecuencia de lo anterior sobre los FC se verá disminuida.

7.2.4 La activación de PI3K/Akt modula positivamente la adhesión celular de monocitos sobre una monocapa de FC.

En nuestros resultados observamos que el uso del inhibidor de PI3K/Akt (LY-294002) en el ensayo de adhesión, disminuyó el porcentaje de adhesión entre monocitos y una monocapa de FC inducido por la activación de TLR4.

De estos resultados no podemos concluir que la activación de la vía PI3K/Akt participa de la expresión de E-selectina, pues nosotros no demostramos que la expresión de E-selectina es dependiente de esta vía de señalización; sin embargo, está ampliamente reportado en la literatura que la expresión de E-selectina es dependiente de esta vía transduccional aunque en otros tipos celulares o con otros estímulos. En este sentido, fetuin A (una glicoproteína circulante producida en el hígado y adipocitos) favorece la expresión de E-selectina en HUVEC's proceso que se ve favorecido con la activación de PI3K y la posterior fosforilación de Akt [55]. Este resultado tiene coherencia con otro anteriormente mencionado, en donde se utilizó CD40L para favorecer el aumento

de expresión de E-selectina en fibroblastos orbitales en pacientes con la enfermedad de Graves, proceso que fue revertido al utilizar el inhibidor de PI3K/Akt (LY-294002) indicando que esta vía modula positivamente la expresión de E-Selectina [29]. Finalmente y por el contrario, otros autores reportan que la activación de la vía PI3K/Akt disminuye los niveles de expresión de E-selectina, así como también los de ICAM-1, principalmente por la neutralización de ROS (especies reactivas de oxígeno) producidas por el LDL oxidado en células endoteliales EA.hy926 [56]. Lo anterior sugiere que la vía PI3K/Akt es dependiente del estímulo o del tipo celular.

Por otro lado, y estudiando en profundidad la vía PI3K/Akt se encontró que esta vía transduccional no estaría involucrada en el aumento de expresión de ICAM-1 [27]. Este resultado difiere con otros trabajos encontrados en literatura en donde se ha evidenciado que esta vía sí estaría participando en la expresión de las proteínas de adhesión. Es así como S1P induce la expresión de ICAM-1 en células epiteliales alveolares y también la adhesión entre éstas y monocitos; y el uso del inhibidor de la vía PI3K/Akt, LY-294002, revirtió ambos efectos provocados por la S1P [51]. De igual forma, el uso de Fractalkina/CX3CLI en el osteosarcoma humano favorece el aumento de expresión de ICAM-1 promoviendo así la migración y metástasis en este tejido; en este caso también se utilizó el inhibidor LY-294002, el cual también revirtió el aumento en la expresión de ICAM-1 en este tejido [57]. Ahora bien, en células epiteliales alveolares, el uso de LPS, induce la expresión de ICAM-1, proceso que se ve revertido por LY-294002 al igual que en los dos casos anteriores [58] y contradiciendo en parte los resultados obtenidos en el laboratorio, pero que indicarían que el ensayo de adhesión en nuestro caso tiene sustento científico.

Respecto de la expresión de VCAM-1 los resultados son más contradictorios. Una serie de trabajos indican que la activación vía PI3K/Akt estaría implicada en la reducción

en los niveles de VCAM-1, lo cual queda demostrado al utilizar TNF- α e insulina en células endoteliales de aorta en ratas, en donde se aumenta la expresión de VCAM-1 proceso que es revertido al activar la vía Akt [59]. Mientras que en HUVEC's, se describe el aumento en la expresión de VCAM-1 gracias al estímulo con LPS, proceso que es revertido por el uso de 2-metoxiestradiol (2-ME), con lo cual también disminuye el porcentaje de monocitos adheridos a las células. El efecto antiinflamatorio del 2-ME se vio disminuido cuando se utilizó un inhibidor de PI3K (wortmanina) o un siRNA contra Akt, restaurándose los niveles de VCAM-1 [60]. Por el contrario, en otros estudios se ha demostrado un aumento en la expresión de VCAM-1 en células endoteliales gracias al estímulo con TNF- α , efecto que es revertido por pKAL (polifenoles derivados de una planta coreana, la *Artemisa annua* L.), precisamente evitando la fosforilación de Akt, resultando en resultados opuestos a los anteriormente mencionados [61]. Con todo lo anterior, podemos discutir que no existen datos concluyentes indicando que la vía PI3K/Akt esté involucrada ya sea en el aumento o descenso en la expresión de VCAM-1.

Estos resultados en forma colectiva sugieren que la vía PI3K/Akt al parecer tendría un comportamiento dual dependiendo del estímulo o el tipo celular. Así observamos que en ciertas condiciones favorecería el aumento en la expresión de las diversas proteínas de adhesión mientras que en otras realizaría todo lo contrario. Esto nos lleva a pensar que serán necesarios más estudios de esta vía en FC para asegurar la participación en la adhesión entre monocitos y FC.

7.2.5 La activación de NF- κ B modula positivamente la adhesión celular de monocitos sobre una monocapa de FC.

En los resultados observamos que el uso del inhibidor de NF- κ B (IMD-0354) en el ensayo de adhesión, disminuyó el porcentaje de adhesión entre monocitos y una monocapa de FC inducido por la activación de TLR4.

Lo primero a destacar para discutir este resultado es que la participación de NF- κ B sobre la expresión de las proteínas de adhesión está ampliamente descrita en muchos trabajos. Ya en el año 1999, Collins et al., indican que la activación de este factor transcripcional favorece el aumento de la expresión de E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales. De este mismo modo, Turner et al., muestran que la inhibición de NF- κ B con IMD-0354 genera una disminución en la expresión de E-selectina e ICAM-1 en FC humanos, por lo tanto, nuestro resultado se encuentra dentro de lo esperado.

Por otro lado, existen una serie de trabajos en los cuales se ha profundizado la participación de la vía NF- κ B en la adhesión de monocitos sobre FC. En este sentido, se ha demostrado que el uso de magnolol en células epiteliales de pulmón inhibe la fosforilación de NF- κ B inducida por TNF- α , con la consecuente disminución en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 [50]. También el uso de artemisinina en HUVEC's inhibe la fosforilación de NF- κ B inducida por TNF- α , teniendo como consecuencia la disminución en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 [52]. El uso de quitosano mostró resultados similares a los anteriores, con la salvedad de que esta vez se demostró que la inhibición de la fosforilación de NF- κ B no sólo disminuye la expresión de ICAM-1, sino que también de E-selectina en células endoteliales [49]. De esta forma podemos confirmar que el resultado encontrado es consistente con la literatura, incluso existen aún más trabajos que relacionan la actividad de NF- κ B con la expresión de proteínas de adhesión [35,40,53].

7.3 El aumento de expresión de E-selectina favorece la adhesión de monocitos sobre una monocapa de FC.

Luego de analizar de forma indirecta la participación de E-selectina en la adhesión entre monocitos y FC, nos propusimos observar como afectaba la inhibición de esta proteína por medio de un anticuerpo bloqueante específico. El resultado fue que

efectivamente, el bloqueo de la E-selectina generó una disminución en el porcentaje de adhesión de monocitos sobre FC.

Como ya se ha discutido el proceso de adhesión de monocitos sobre diversos tipos celulares está determinado por la expresión de las tres proteínas de adhesión ya descritas en este trabajo (E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1). De esta forma cuando la expresión de ICAM-1 y E-selectina es inhibida en células endoteliales, la cantidad de monocitos adherida disminuye considerablemente⁶¹. De igual manera cuando las tres proteínas de adhesión son inhibidas por acción de un anticuerpo anti-TNF- α (adalimumab), la adhesión de monocitos a células endoteliales también disminuyó [62].

Por otro lado, existen otros datos que avalan, nuestros resultados. El estímulo de células HUVEC's con plasma rico en plaquetas (PRP) aumenta la expresión de E-selectina y por tanto, la adhesión de monocitos [63]. Por otro lado, la acción de la E-selectina no sólo se limita a procesos inflamatorios, puesto que el reclutamiento de monocitos favorece a las células metastásicas a migrar a células endoteliales de pulmón; proceso que se ve revertido en ratones deficientes en E-selectina (E-sel^{-/-}) [64]. Pero sin duda, uno de los trabajos que más se asemeja al nuestro, es aquel en donde se utiliza indoxil sulfato en células endoteliales de riñón para mejorar la expresión de E-selectina inducida por IL-1 β , lo que además mejora la adhesión de monocitos; éste último proceso, el de adhesión, fue significativamente reducido al utilizar un anticuerpo bloqueante contra E-selectina, resultados muy similares a los que encontramos en esta tesis [65].

Por otro lado, drospirenona (un esteroide anti-androgénico), no fue capaz de inducir la expresión de las proteínas de adhesión, con lo cual no se generó un aumento en la adhesión de monocitos; mientras que el uso de medroxiprogesterona acetato sí aumentó la expresión de las proteínas de adhesión, y consecuentemente aumentó la

adhesión de monocitos sobre células endoteliales, evidenciando aún más que estas proteínas son importantes para este proceso [66].

Finalmente al analizar nuestros resultados en conjunto con los datos encontrados en literatura podemos deducir que la expresión de E-selectina es fundamental para el proceso de adhesión, al igual que las otras proteínas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1). Esto queda aún más demostrado con resultados previos en el laboratorio en donde el silenciamiento de ICAM-1 y VCAM-1 por separado, hizo que el porcentaje de adhesión de monocitos también disminuyera [67], al igual que el uso del anticuerpo bloqueante de E-selectina, lo que cual indicaría que las tres proteínas son igual de necesarias para este proceso y basta que sólo una esté en cantidades deficientes o con estructura defectuosa para que los monocitos no sean capaces de adherirse a los distintos tejidos en donde sea necesario su reclutamiento.

8. CONCLUSIONES

- 1) La activación de TLR4, induce el aumento de la expresión de E-selectina en FC de rata.
- 2) La activación de TLR4 participa en la adhesión de monocitos sobre FC.
- 3) La activación de la vía transduccional ERK1/2 participa en la adhesión de monocitos sobre FC.
- 4) La activación de la vía transduccional PI3K/Akt participa en la adhesión de monocitos sobre FC.
- 5) La activación de la vía transduccional NF- κ B participa en la adhesión de monocitos sobre FC.
- 6) E-selectina es fundamental en la adhesión de monocitos sobre FC.

REFERENCIAS

1. Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013. Organización Mundial de la Salud.
2. Porter K, Turner N. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology & Therapeutics*. 2009; 123: 255-278.
3. Fan D, Takawale A, Lee J, Kassini Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2012; 5:15.
4. Chen W, Frangogiannis N. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1833: 945-953.
5. Tao Z, Cavasin M, Yang F, Liu Y, Yang X. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life Sciences* 74. 2004; 1561-1572.
6. Turner N, Das A, Regan D, Ball S, Porter K. Human cardiac fibroblasts express ICAM-1, E-selectin and CXC chemokines in response to proinflammatory cytokine stimulation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2011; 43: 1450-1458.
7. Frangogiannis N. The immune system and cardiac repair. *Pharmacological Research* 58. 2008; 88-111.
8. Jennings RB, Murry CE, Steenbergen Jr C, Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation* 1990; 82: II2-12.
9. Lu Y, Yeh W, Ohashi P. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008; 42: 145-151.
10. Beg A. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol*. 2002 23(11): 509-512.

11. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews Immunology*. 2004; 4: 499-510.
12. Kim E, Kim B. Lipopolysaccharide inhibits transforming growth factor-beta-1 stimulated Smad6 expression by inducing phosphorylation of the linker region of Smad3 through a TLR4-IRAK-1-ERK1/2 pathway. *FEBS Letters* 2011; 585: 779-785.
13. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*. 2004; 16: 3-9.
14. Collins T, Read M, Neish A, Whitley M, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J*. 1995; 9: 899-909.
15. Ayala P. Participación de fibroblastos y miofibroblastos cardíacos en la respuesta inflamatoria: Rol de los receptores de tipo Toll 4. Tesis (Doctor en Farmacología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2013. 101 h.
16. Anfossi R. Interferón- β disminuye el reclutamiento de neutrófilos inducido por LPS sobre fibroblastos cardíacos. Tesis (Químico Farmacéutico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2016. 68 h.
17. Yang H, Hu C, Li F, Liang L, Liu L. Effect of Lipopolysaccharide on the Biological Characteristics of Human Skin Fibroblasts and Hypertrophic Scar Tissue Formation. *IUBMB LIFE*. 2013.
18. Johnson G, Brunn G, Kodaira Y, Platt J. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J. Immunol* 2002; 168: 5233-5239.

19. Somers W, Tang J, Shaw G, Camphausen R. Insights into the Molecular Basis of Leukocyte Tethering and Rolling Revealed by Structures of P- and E- Selectin Bound to SLeX and PSGL-1. *Cell Press*. 2000; 103: 467-479.
20. Katayama Y. Selective E-selectin ligands. *Blood*. 2013; 122(24): 3858-3860.
21. Kansas G.S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996; 88: 3259-3287.
22. Vestweber D and Blanks J.E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol. Rev.* 1999; 79: 181-213.
23. Sasaki K, Kurata K, Funayama K, Nagata M, Watanabe E, Ohta S, Nanai N, Nishi T. Expression cloning of a novel alpha 1,3- fucosyltransferase that is involved in biosynthesis of the sialyl Lewis x carbohydrate determinants in leukocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269: 14730-14737.
24. Foxall C, Watson S, Dowbenko D, Fennie C, Lasky L, Kiso M, Hasewaga A, Asa D, Brandley B. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the Sialyl Lewis^x oligosaccharide. *The Journal of Cell Biology*. 1992; 117: 895-902.
25. Turner N, Das A, O'Reagan D, Ball S, Porter K. Human cardiac fibroblasts express ICAM-1, E-selectin and CXC chemokines in response to proinflammatory cytokine stimulation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2011; 43: 1450-1458.
26. Landaeta R. Heparán sulfato, a través de TLR4, gatilla tanto el aumento de IL-1 β , ICAM y VCAM, como la disminución de α -SMA. Tesis (Químico Farmacéutico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2015. 61 h.
27. Inostroza E. Vías transduccionales asociadas al receptor tipo Toll-4 (TLR4) en la expresión de las proteínas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 en fibroblastos

- cardíacos. Tesis (Químico Farmacéutico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2015. 50 h.
28. Tremblay P-L, Auger FA, Huot J. Regulation of transendothelial migration of colon cancer cells by E-selectin-mediated activation p38 and ERK MAP kinases. *Oncogene*. 2006; 25: 6563-6573.
 29. Wang H, Zhu L, Cheng J et al. CD40 ligand induces expression of vascular cell adhesion molecule 1 and E-selectin in orbital fibroblasts from patients with Graves' orbitopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2015; 253: 573-582.
 30. Dutta P and Nahrendorf M. Monocytes in myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015; 35(5): 1066-1070.
 31. Frantz S and Nahrendorf M. Cardiac macrophages and their role in ischemic heart disease. *Cardiovascular Research Advanced Access*. 2014; 102(2).
 32. Swirski F et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009; 325: 612-616.
 33. Lee WW et al. PET/MRI of inflammation in myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012; 59(2): 153-163.
 34. Leeuwenberg J et al. E-selectin and intercellular adhesion molecule 1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology*. 1992; 77: 543-549.
 35. Kim JH, Yoon YJ, Lee J, Choi E-J, Yi N, et al. Outer membrane vesicles derived from *E. coli* up-regulate expression of endothelial cell adhesion molecules in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 2013; 8 (3): e59276.
 36. Raschi E et al. β 2-glycoprotein I, lipopolysaccharide and endothelial TLR4: Three players in the two hit theory for anti-phospholipid-mediated thrombosis. *Journal of autoimmunity*. 2014; 55: 42-50.
 37. Makó et al. Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1 β , TNF- α , and LPS. *Cytometry Part A*. 2010; 77A: 962-970.

38. Ma B et al. TLR4 stimulation by LPS enhances angiogenesis in a co-culture system consisting of primary human osteoblasts and out growth endothelial cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015, doi: 10.1002/term.2075.
39. To TT, Gümüs P et al. Subgingival in periodontal health antagonizes at toll-like receptor 4 and inhibits E-selectin expression on endothelial cells. *Infect Immun.* 2016; 84: 120-126.
40. Yang J, Huang C, Yang J et al. Statins attenuate high mobility group box-1 protein induced vascular endothelial activation a key role for TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Mol Cell Biochem.* 2010; 345: 189-195.
41. Yang J, Zhang XD, Yang J et al. The cardioprotective effect of fluvastatin on ischemic injury via down regulation of toll-like receptor 4. *Mol Biol Rep.* 2010; doi: 10.1007/s11033-010-9970z.
42. Xie H, Kong X, Zhou H et al. TLR4 is involved in the pathogenic effects observed in a murine model of antiphospholipid syndrome. *Clin Immunol.* 2015; 160(2): 198-210.
43. Yona S, Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol.* 2010; 17: 53-59.
44. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: development pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14: 392-404.
45. Gerhardt T, Ley K. Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovascular Research.* 2015; 107: 321-330.
46. Collins RG, Velji R et al. P-selectin or intercelular adhesión molecule (ICAM-1) deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med.* 2000; 191: 189-194.

47. Barreiro O, Yanez-Mo M et al. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol.* 2002; 157: 1233-1245.
48. Carman CV, Jun CD, Salas A, Springer TA. Endothelial cells proactively form microvilli-like membrane projections upon intercellular adhesion molecule 1 engagement of leukocyte LFA-1. *J Immunol* 2003; 171: 6135-6144.
49. Li Y, Xu Q et al. Chitosan oligosaccharides downregulate the expression of E-selectin and ICAM-1 induced by LPS in endothelial cells by inhibiting MAP kinase signaling. *International Journal of Molecular Medicine.* 2014; 33: 392-400.
50. Chunlian W, Heyong W et al. Magnolol inhibits tumor necrosis factor- α - induced ICAM-1 expression via suppressing NF- κ B and MAPK signaling pathways in human lung epithelial cells. *Inflammation.* 2014; 37 (6): 1957-1967.
51. Lin C-C, Lee I-T et al. Sphingosine-1-phosphate mediates ICAM-1-dependent monocytes adhesion through p38 MAPK and p42/p44 MAPK-dependent Akt activation. *PLoS ONE.* 2015; 10(3): e0118473.
52. Wang Y, Cao J et al. Artemisinin inhibits monocyte adhesion to HUVEC's through the NF- κ B and MAPK pathways in vitro. *International Journal of Molecular Medicine.* 2016; 37: 1567-1575.
53. Lee K, Yim JH, Lee HK, Pyo S. Inhibition of VCAM-1 expression on mouse vascular smooth muscle cells by lobastin via downregulation of p38, ERK 1/2 and NF- κ B signaling pathways. *Arch Pharm Res.* 2016; 39(1): 83-93.
54. Zhao XP, Wang M et al. Membrane microvesicles as mediators for melanoma-fibroblasts communication: Roles of the VCAM-1/VLA-4 axis and the ERK 1/2 signal pathways. *Cancer Letters.* 2015; 360: 125-133.
55. Naito C, Hashimoto M et al. Facilitatory effects of fetuin-A on atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2016; 246: 344-351.

56. Huang CS, Lin AH et al. Shikonin inhibits oxidized LDL-induced monocyte adhesion by suppressing NF- κ B activation via up-regulation of PI3K/Akt/Nrf2-dependent antioxidation in EA.hy926 endothelial cells. *Biochem Pharmacol.* 2015; 93(3): 352-361.
57. Liu JF, Tsao YT, Hou CH. Fractalkine/CX3CL1 induced intercellular adhesion molecule-1-dependent tumor metastasis through the CX3CR1/PI3K/Akt/NF- κ B pathway in human osteosarcoma. *Oncotarget.* 2016; doi:10.18632/oncotarget.11250.
58. Cho RL, Yang CC et al. Lipopolysaccharide induces ICAM-1 expression via a c-Src/NADPH oxidase/ROS-dependent NF- κ B pathway in human pulmonary alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016; 310(7); 639-657.
59. Pott GB, Tsurudome M et al. ERK2 and Akt are negative regulators of insulin and Tumor Necrosis Factor- α stimulated VCAM-1 expression in rat aorta endothelial cells. *J Inflamm (London).* 2016; 13(6) doi: 10.1186/s12950-016-0115-6.
60. Zhang Y, Li P, Gao Q, Simoncini T, Fu X. 2-Methoxyestradiol prevents monocyte adhesion to vascular endothelial cells via downregulation of VCAM-1 expression. *Gynecol Endocrinol.* 2016; 32(7): 571-576.
61. Ko YS, Lee WS et al. Polyphenols from *Artemisia annua* L inhibit adhesion and EMT of highly metastatic breast cancer cells MDA-MB-231. *Phytother Res.* 2016; 30: 1180-1188.
62. Oberoi R, Schuett J, Schuett H et al. Targeting tumor necrosis factor- α with Adalimumab: Effects on endothelial activation and monocyte adhesion. *PLoS One.* 2016; 11(7): e0160145.
63. Kataoka H, Ariyama Y et al. Inhibitory effect of serotonin antagonist on leukocyte-endothelial interactions in vivo and in vitro. *PLoS ONE.* 2016; 11(1): e0147929.

64. Häuselmann I, Roblek M et al. Monocyte induction of E-selectin-mediated endothelial activation releases VE-cadherin junctions to promote tumor cell extravasation in the metástasis cascade. *Cancer Res.* 2016.
65. Shen WC, Liang CJ et al. Indoxyl sulfate enhances IL-1 β -induced E-selectin expression in endothelial cells in acute kidney injury by the ROS/MAPKs/NF κ B/AP-1 pathway. *Arch Toxicol.* 2015. doi:10.1007/s00204-015-1652-0.
66. Ito F, Mori T et al. Effects of drospirenone on adhesion molecule expression and monocyte adherence in human endothelial cells. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 2016; 201: 113-117.
67. Humeres C. Fibroblastos cardíacos regulan el reclutamiento de monocitos y diferenciación de macrófagos M1/M2 *in vitro*. Tesis (Doctorado en Farmacología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2016. (En curso)