



**Universidad de Chile**  
**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**  
**Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica**

**BK MODULA LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS PRO-INFLAMATORIAS  
INDUCIDAS POR ACTIVACIÓN DEL TLR4 EN FIBROBLASTOS CARDIACOS  
NEONATOS**

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

**SAMUEL ESTEBAN FERNÁNDEZ SANDOVAL**

**Directores:**

Profesor Patrocinante  
Dr. Guillermo Díaz Araya  
Laboratorio de Farmacología  
Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas  
Universidad de Chile

Co directora de Tesis  
QF. Claudia Muñoz Rodríguez  
Laboratorio de Farmacología  
Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas  
Universidad de Chile

## **AGRADECIMIENTOS:**

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres, Elizabeth y Samuel, por absolutamente todo lo que han hecho por mí, por entregarme día a día su amor infinito, valores y principios que han forjado la persona que soy hoy en día. Sin ustedes no sería nada, y mi amor por ustedes no conoce límites, al igual que mi gratitud, la cual es eterna. Los amo mucho.

A mi amado hermano menor Matías, el cual es mi alegría en el día a día, te amo mucho hermano, gracias por todos los buenos momentos, las risas y las conversaciones filosóficas, espero que sepas que siempre estaré a tu lado apoyando tus sueños y fomentando tu crecimiento. No me cabe duda que lograras grandes cosas.

A mis abuelos, tíos y primas, gracias por ser tan únicos, especiales y hermosos, por generar todo el amor y buena onda que fluye entre nosotros, los amo a todos y cada uno de ustedes desde lo más profundo de mi corazón.

Al profesor Guillermo, por todo el apoyo y confianza depositados, por darme la oportunidad de vivir esta experiencia y de guiarme con alegría, compromiso y mucha humanidad durante esta etapa final de mi proceso académico, mis mejores deseos para el futuro, el cual no hay duda que seguirá siendo brillante y lleno de logros y satisfacciones.

A los compañeros del laboratorio, chotunos todos, Samir, Diego, Raúl, Pía, Renatto, Vivy, Parrita, José, Nati, Nino, Pancho, Evelyn, Don José gracias por las alegrías y risas infinitas, por ser el apoyo diario cuando las cosas no resultan como uno las planea, y por ayudar siempre con disposición. Tengo un lugar especial para cada uno de ustedes en mi corazón. Especialmente a Clodito, en quien encontré de forma inesperada una amiga muy valiosa, un apoyo incondicional, muchas gracias por ser la persona que eres conmigo, sin ti nada de esto sería posible, te quiero mucho y todo el éxito en lo que se viene.

A mis amigos más valiosos, Cristóbal y Soledad, sin ustedes yo no soy nada, los amo demasiado, encontré en esta universidad muchos amigos, pero ustedes dos no tienen comparación. Encontré dos tesoros invaluable en ustedes, y día a día me siento agradecido de tenerlos a mi lado, espero siempre estar con ustedes en las buenas y en las malas, y que disfrutemos muchos años más de amistad, alegrías y cariño.

A mis amigos de la universidad, gracias por siempre alegrar los días, por ser las personas que son, por llenar este mundo de buena energía. Sin dudas este proceso nos une de forma especial para toda la vida. Les deseo todo el éxito en el porvenir.

Muchas gracias por todo.

## ÍNDICE GENERAL

<b>Índice general</b>	<b>3</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>5</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>6</b>
<b>Resumen</b>	<b>8</b>
<b>Summary</b>	<b>9</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Generalidades</b>	<b>10</b>
<b>1.2. Tejido cardiaco</b>	<b>10</b>
<b>1.2.1. Fibroblastos cardiacos</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2. Miofibroblastos cardiacos</b>	<b>11</b>
<b>1.3. Participación del sistema inmune en el remodelamiento cardiaco</b>	<b>12</b>
<b>1.4. Receptores involucrados en la respuesta inflamatoria</b>	<b>14</b>
<b>1.4.1. Receptor TLR4 en fibroblastos cardiacos</b>	<b>14</b>
<b>1.4.2. Receptores B1 y B2 de cininas</b>	<b>15</b>
<b>1.5. Expresión y secreción de citoquinas en fibroblastos cardiacos</b>	<b>17</b>
<b>1.5.1. Secreción de IL-1<math>\beta</math> inducida por LPS en fibroblastos cardiacos</b>	<b>17</b>
<b>1.6. Expresión de proteínas de adhesión celular en fibroblastos cardiacos</b>	<b>18</b>
<b>1.6.1. Expresión de moléculas de adhesión celular ICAM-1 y VCAM-1</b>	<b>18</b>
<b>1.7. Relación entre TLR4, receptores de cininas, citoquinas y proteínas de adhesión</b>	<b>19</b>
<b>2. Hipótesis</b>	<b>20</b>
<b>3. Objetivo General</b>	<b>20</b>
<b>4. Materiales y métodos</b>	<b>22</b>
<b>4.1. Reactivos</b>	<b>22</b>
<b>4.2. Modelo animal</b>	<b>22</b>
<b>4.3. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos de ratas neonatas</b>	<b>23</b>

4.4. Pasaje celular	23
4.5. Diferenciación a miofibroblastos cardiacos	23
4.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida	24
4.7. Electrotransferencia de proteínas	24
4.8. Inmunowestern Blot	24
4.9. Expresión de resultados y análisis estadístico	25
5. Resultados	26
5.1. Efecto de LPS sobre los niveles proteicos de ICAM-1 en fibroblastos cardiacos	26
5.2. Efecto de LPS sobre los niveles proteicos de VCAM-1 en fibroblastos cardiacos	28
5.3. Efecto de BK sobre los niveles proteicos de VCAM-1 en fibroblastos cardiacos	30
5.4. Efecto de DAKD sobre los niveles proteicos de VCAM-1 en fibroblastos cardiacos	32
5.5. Efecto de BK sobre la expresión del TLR-4 en fibroblastos cardiacos	34
5.6. Efecto de BK sobre la expresión de $\alpha$ -SMA en fibroblastos cardiacos	36
5.7. Efecto del pretratamiento de LPS sobre los efectos producidos por BK y DAKD sobre los niveles proteicos de VCAM-1	38
5.8. Efecto del pretratamiento de BK sobre los efectos producidos por LPS sobre los niveles proteicos de VCAM-1	40
5.9. Efecto del pretratamiento de BK sobre los efectos producidos a diferentes concentraciones de LPS sobre VCAM-1	42
5.10. Efecto de BK y LPS sobre la expresión de pro-IL-1 $\beta$	44
6. Discusión	46
7. Conclusiones	53
Bibliografía	54

## Índice de figuras

Fig. 1: Comparación entre fibroblasto cardíaco y miofibroblasto cardíaco.

Fig. 2: Receptor TLR4.

Fig. 3: Representación esquemática de las secuencias aminoacídicas de los receptores B1 y B2 humanos.

Fig. 4: LPS estimula la expresión de ICAM-1 en fibroblastos cardíacos neonatos.

Fig. 5: LPS estimula la expresión de VCAM-1 en fibroblastos cardíacos neonatos.

Fig. 6: Expresión de los niveles proteicos de VCAM-1 en fibroblastos cardíacos neonatos frente a BK.

Fig. 7: Expresión de los niveles proteicos de VCAM-1 en fibroblastos cardíacos neonatos frente a DAKD.

Fig. 8: BK estimula la expresión de TLR4 en fibroblastos cardíacos neonatos.

Fig. 9: BK disminuye la expresión de  $\alpha$ -SMA en fibroblastos cardíacos neonatos.

Fig. 10: Expresión de los niveles proteicos de VCAM-1 en fibroblastos cardíacos neonatos pretratados con LPS 1  $\mu$ g/mL por 48 h.

Fig. 11: Expresión de los niveles proteicos de VCAM-1 en fibroblastos cardíacos neonatos pretratados con BK 100  $\mu$ M por 48 h.

Fig. 12: Expresión de los niveles proteicos de VCAM-1 en fibroblastos cardíacos neonatos pretratados con BK 100  $\mu$ M utilizando diferentes concentraciones de LPS.

Fig. 13: Expresión de los niveles proteicos de pro-IL-1 $\beta$  en fibroblastos cardíacos neonatos tratados con LPS y BK.

## Abreviaturas:

$\alpha$ -SMA	: Alfa actina del músculo liso
Ang II	: Angiotensina II
APS	: Persulfato de amonio
BK	: Bradicinina
cm	: Centímetros
cel	: Célula
CO <sub>2</sub>	: Dióxido de carbono
DAKD	: [Lys-des-Arg9]-Bradicinina
DAMPS	: Patrones moleculares asociados a daño
DMEM-F-12	: Medio de mantención modificado Dulbecco
ECL	: Reactivo quimioluminiscente para HRP
FBS	: Suero fetal bovino
FCS	: Suero fetal de cabra
FC	: Fibroblastos cardiacos
FCN	: Fibroblastos cardiacos neonatos
Fig.	: Figura
GAPDH	: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
g	: Gramos
GPCR	: Receptor acoplado a proteína G
ICAM-1	: Molécula de adhesión intercelular - 1
h	: horas
IL-1 $\beta$	: Interleuquina 1 $\beta$
IL-6	: Interleuquina 6
IFN	: Interferón
IWB	: Inmunowesternblot
kDa	: Kilo Dalton
LPS	: Lipopolisacárido
MFC	: Miofibroblastos cardíacos
MFCN	: Miofibroblastos cardiacos neonatos

MEC	: Matriz extracelular
min	: Minutos
mg	: Miligramos
mM	: Milimolar
MMP	: Metaloproteasas
nM	: Nanomolar
NO	: óxido nítrico
PAMPS	: Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	: Tampón fosfato salino
RC	: Remodelamiento cardiaco
rpm	: Revoluciones por minuto
s	: Segundos
SEM	: Error promedio estándar
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SRAA	: Sistema renina angiotensina aldosterona
TBS	: Tampón tris salino
TEMED	: N, N, N', N' –tetrametil-etilendiamina
TGF- $\beta$ 1	: Factor de crecimiento transformante beta - 1
TNF- $\alpha$	: Factor de necrosis tumoral alfa
$\mu$ g	: Microgramo
$\mu$ M	: Micromolar
$\mu$ L	: Microlitro
VCAM-1	: Molécula de adhesión celular vascular - 1
VEGF	: Factor de crecimiento endotelial vascular

## **Resumen:**

Los fibroblastos cardiacos son las principales células encargadas de la reparación y mantenimiento de la matriz extracelular del tejido cardiaco, aunque en los últimos años se ha determinado que pueden secretar y responder a citoquinas y quimioquinas pro inflamatorias. También se ha determinado que poseen el receptor TLR4, el cual es capaz de responder a PAMPS (como LPS), sugiriendo así que el fibroblasto cardiaco tiene un rol clave en el proceso inflamatorio cardiaco gatillado por un daño o patógeno.

Las cininas son péptidos pro inflamatorios asociados principalmente a la vasodilatación y a la formación de edema cuando se unen a sus receptores en el sitio de injuria. Se ha demostrado que el fibroblasto cardiaco posee de forma constitutiva receptor B2 (cuyo ligando es BK), no así receptor B1 (cuyo ligando es DAKD), ya que este último es inducible en este fenotipo celular.

Se ha descrito en células endoteliales que tanto LPS, así como también las cininas, son capaces de aumentar los niveles proteicos de moléculas de adhesión celular (ICAM-1 y VCAM-1), favoreciendo así la adhesión de células del sistema inmune al sitio de daño. Sin embargo, se desconoce si los fibroblastos cardiacos tratados de manera conjunta con cininas y LPS modulan la expresión de estas moléculas de adhesión.

Mediante análisis de inmunowestern blot se demostró que LPS aumentó considerablemente los niveles proteicos de las moléculas de adhesión desde las 8 hasta las 48 h, mientras que no se observó efecto con BK o DAKD, sugiriendo así que el efecto pro inflamatorio de las cininas no favorecería de manera directa la adhesión de células del sistema inmune a los fibroblastos cardiacos. Por otro lado, se determinó que BK aumentó de forma significativa los niveles proteicos de TLR4 a las 72 h y a su vez que disminuyó los niveles basales de  $\alpha$ -SMA en fibroblasto cardiaco. También se determinó que el pre tratamiento por 48 h con BK moduló negativamente la acción de LPS sobre VCAM-1 a las 24 h.

Estos resultados en conjunto indican que el pre tratamiento de fibroblastos cardiacos con BK es capaz de evitar la diferenciación de estos a miofibroblastos, favoreciendo así una respuesta pro inflamatoria y antifibrótica por parte de estos.

## Summary:

Cardiac fibroblasts are the main cells responsible for the repair and maintenance of cardiac matrix. Although in the last years has been determined to be able of secreting and also respond to proinflammatory cytokines and chemokines (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ). Also it has been determined the presence of TLR4, which is able to respond to PAMPs (such as LPS), suggesting that cardiac fibroblast has a key role in cardiac inflammatory process triggered by damage or pathogen.

Kinins are proinflammatory peptides mainly associated to vasodilation and edema formation when are bind to their receptors at the site of injury. It has been shown that cardiac fibroblast express constitutively B2 receptor (whose ligand is BK), not B1 receptor (whose ligand is DAKD), since the latter is inducible in this cell phenotype.

It has been described that LPS and kinins are able to increase protein levels of celular adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1) in endothelial cells, thus enhancing the adhesion of immune cells to the site of injury. However, it is unknown whether cardiac fibroblasts treated together with kinins and LPS modulate the expression of these adhesion molecules.

Through analysis of immuno western blot it was determined that LPS is able to significantly increase the protein levels of adhesion molecules from 8 to 48 hours, not BK and DAKD, thus suggesting that the proinflammatory effect of kinins are not directly linked to the adhesion of immune system cells. Furthermore, it was determined that BK can significantly increase TLR4 protein levels at 72 hours and in turn is capable of decreasing basal levels of  $\alpha$ -SMA in cardiac fibroblast. It was also determined that pretreatment for 48 hours with BK is able to modulate negatively the action of LPS on VCAM-1 at 24 hours.

These results together indicate that pretreatment of cardiac fibroblasts with BK is capable of preventing differentiation of these to myofibroblast, thus supporting a proinflammatory response from these.

## **1. INTRODUCCIÓN:**

### **1.1. Generalidades**

Chile está en transición epidemiológica, lo que implica que las enfermedades no transmisibles (ENT) son la principal causa de muerte en el país, dejando en el pasado el concepto de enfermedad y muerte asociado a problemas de higiene. Encabezando esta lista se encuentran las enfermedades cardiovasculares (ECV), tales como los accidentes cerebrovasculares y las patologías cardíacas y sus componentes, como insuficiencia cardíaca, hipertensión arterial, angina de pecho, etc. Las ECV se correlacionan a nivel mundial con el grado de desarrollo del país, el envejecimiento poblacional y el aumento de factores de riesgo como el sobrepeso y la obesidad, el tabaquismo, el sedentarismo, entre otros, siendo así las ENT (entre ellas las ECV) y sus factores de riesgo, priorizados en los planes de salud preventiva con el fin de disminuir la morbilidad y mortalidad originadas por estos factores de riesgos y sus respectivas enfermedades. <sup>1-3</sup>

Un rasgo común entre las patologías cardíacas es el remodelamiento cardíaco (RC), el cual corresponde a un proceso caracterizado por cambios en la anatomía, geometría, histología, así como también, cambios a nivel molecular como consecuencia al daño causado por las patologías. Este remodelamiento está caracterizado principalmente por una hipertrofia y una fibrosis cardíaca generadas por la activación de diversas vías neurohormonales, como el sistema renina angiotensina aldosterona, el sistema adrenérgico, factores de crecimiento (p.e. TGF- $\beta$ 1), citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , etc.), estrés oxidativo, entre otros, las cuales de forma concertada llevan a un RC que desencadenará en una insuficiencia cardíaca. <sup>4, 5</sup>

### **1.2. Tejido Cardíaco:**

A nivel celular, el tejido cardíaco se encuentra constituido principalmente por cardiomiocitos (células musculares contráctiles) y un conjunto de células no

musculares tales como fibroblastos, células nerviosas, vasculares, entre otras. Dentro de este grupo de células no musculares, las que se encuentran en mayor proporción son los fibroblastos cardiacos (FC). Es importante recalcar que el correcto funcionamiento de los cardiomiocitos se debe a que los FC mantienen la homeostasis de la matriz extracelular (MEC) de este órgano vital para el correcto proceso de contracción/relajación. <sup>6</sup>

### **1.2.1. Fibroblastos Cardiacos:**

Los FC conforman aproximadamente el 70% de las células cardiacas totales pero sólo corresponden a 1/3 del volumen total de éstas, y su función clásica se relaciona directamente con la síntesis y recambio de la MEC, además de ser capaces de secretar y responder a citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento (p.e. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN, VEGF, TGF- $\beta$ 1, Angiotensina II (Ang II), entre otros), induciendo de esta forma su función de homeostasis de la MEC y de reparación del tejido cardiaco. Sin embargo, estos últimos años se han considerado como “células centinelas” del tejido cardiaco debido a su capacidad para sensor cambios en el medio extracelular y gatillar el reclutamiento de componentes del sistema inmune e inducir una respuesta inflamatoria aguda y localizada. En condiciones patológicas especialmente post infarto, los FC se diferencian a miofibroblastos cardiacos (MFC), que corresponde a fibroblastos “activados” presentes en zonas de daño y principales responsables de la reparación tisular post un daño cardiaco. <sup>6, 7</sup>

### **1.2.2. Miofibroblastos Cardiacos (MFC):**

Cuando la integridad de la MEC se altera como consecuencia al daño cardiaco, los FC son expuestos a estrés mecánico, activándose y diferenciándose en un fenotipo intermedio conocido como proto-miofibroblasto, caracterizado por la presencia de fibras de estrés que contienen  $\beta$  y  $\gamma$  actina citoplasmática. La subsecuente exposición al factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1), (producido y secretado principalmente por células infiltrantes del sistema inmune y a su vez por



El inicio de la respuesta inflamatoria post infarto está marcado por la liberación del contenido intracelular de las células que están muriendo por necrosis. En diversos tipos celulares presentes en el tejido cardíaco, existen receptores de superficie p.e. los Toll like receptor (TLR), que sensan ligandos endógenos liberados tras la muerte celular, generando señales de alerta (citoquinas y quimioquinas), que reclutan leucocitos al sitio de daño. La fase del tejido de granulación se origina como consecuencia de la activación de la fase inflamatoria y conduce al reclutamiento de leucocitos, neutrófilos y macrófagos hacia la zona del infarto los cuales se encargan de limpiar el área de células muertas y de debris celular. Por otro lado, los macrófagos activados secretan factores de crecimiento y citoquinas dando lugar a la proliferación de FC, MFC y células endoteliales y éstas últimas dan lugar a la angiogénesis, generando así un tejido altamente irrigado.

Finalmente, durante la fase de maduración los MFC secretan proteínas de la MEC en forma abundante para luego entrar en apoptosis y dejar una cicatriz constituida esencialmente por colágeno. El descontrol y prolongación de cualquiera de estas fases más allá de los límites necesarios para reparar la herida, transforma el tejido cardíaco en un tejido fibrótico disfuncional, conduciendo finalmente a una función cardíaca insuficiente.<sup>9</sup>

**Resultados previos obtenidos en el laboratorio han demostrado la presencia de receptores TLR4, B1 y B2 de cininas (B1R y B2R) y la expresión de la enzima COX-2 en FC y MFC. Estos resultados en conjunto con otros antecedentes de la literatura en los que se demuestra la capacidad secretora de citoquinas tanto de los FC como de los MFC, permiten establecer que ambos tipos celulares son capaces de participar activamente en procesos inflamatorios.**<sup>10</sup>

## 1.4. Receptores involucrados en la respuesta inflamatoria

### 1.4.1. Receptor de tipo Toll 4 (TLR4) en fibroblastos cardiacos:

El receptor TLR4 es un receptor dimérico de transmembrana tipo 1, capaz de reconocer constituyentes de la pared celular de bacterias y/o ácidos nucleicos de patógenos, denominados como PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) y también DAMPs (patrones moleculares asociados a daño) (ver figura 2).<sup>11</sup> El TLR4 ha sido uno de los más estudiados y caracterizados debido a la amplia evidencia que lo involucra como un elemento vital para el inicio de la respuesta inflamatoria. Este receptor puede ser activado por varios ligandos, tales como lipopolisacárido (LPS), y ligandos liberados al medio extracelular en procesos de daño tisular como la proteína de shock térmico HSP70, el fragmento ED-A de fibronectina y el heparan sulfato (HS). La activación de TLR4 promueve de manera directa la respuesta inmune al inducir un aumento en la producción de citoquinas y quimioquinas las que consecuentemente gatillan el reclutamiento (migración y adhesión) de las células inmunes al sitio del daño tisular. Las proteínas que median la adhesión celular son la E-Selectina, moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) y vascular (VCAM-1).<sup>12-14</sup>

Recientemente se ha reportado la importancia del TLR4 *in vivo* en el remodelamiento cardiaco, sobre todo en infarto al miocardio. Se observó que en ratones deficientes de TLR4 (C3H-Tlr4<sup>LPS-d</sup>; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me), éstos desarrollaron un menor grado de hipertrofia cardiaca y hubo una menor secreción de citoquinas pro inflamatorias post infarto.<sup>15</sup>

**Antecedentes del laboratorio indican que TLR4 está presente en FC<sup>16</sup> y sus niveles de expresión aumentan cuando se estimula con TGF- $\beta$ 1. Su activación ya sea por LPS o heparan sulfato (HS), incrementa los niveles de pro-IL-1 $\beta$ , B1R de cininas y las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1; y por otro lado,**

**reduce los niveles de  $\alpha$ -SMA tanto en FC como en MFC, demostrando que participa en la respuesta inflamatoria, y sugiriendo un rol pro inflamatorio.**

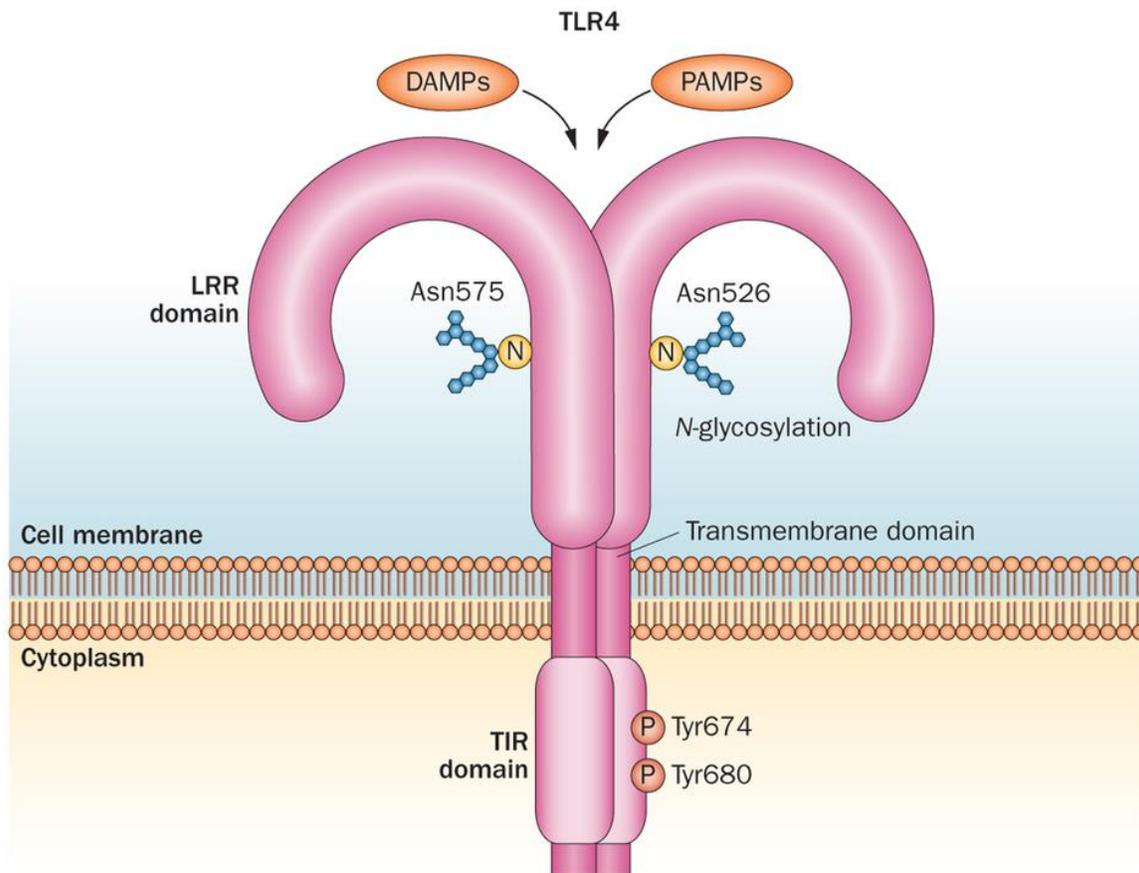
#### **1.4.2. Receptores de cininas**

Los receptores de cininas son una familia de receptores acoplados a proteínas G, dentro de los cuales existen dos tipos, B2R de naturaleza constitutiva y B1R de naturaleza inducible (ver figura 3). Ambos median respuesta inflamatoria (principalmente vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular), y poseen una característica relevante a nivel cardiaco porque forman un sistema análogo y contrario al SRAA, el sistema cinina – calicreína. Los ligandos que se unen a estos receptores son péptidos que se originan a partir de cininógenos por acción de las calicreínas. La bradicinina endógena (BK) y la Lis-bradicinina (Lis-BK) o calidina son agonistas del B2R; mientras que des-Arg-BK (DABK) y des-Arg-Lis-KD (DAKD) actúan como agonistas del B1R.<sup>17, 18</sup> Se ha descrito que posterior a una isquemia miocárdica la expresión de B1R y B2R se encuentra aumentada, y la ausencia de los receptores de cininas es deletérea para el tejido cardiaco, especialmente en situaciones de daño.<sup>19, 20</sup>

Las vías de señalización de B1R y B2R son similares. El  $Ca^{+2}$  es uno de los principales segundos mensajeros (tanto de origen intracelular como el extracelular), el cual lleva a la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS), encargada de la producción de NO en FC y células endoteliales. Por otro lado, la activación de la proteína fosfolipasa A2 (PLA2) dependiente de  $Ca^{+2}$  lleva a la liberación de ácido araquidónico desde los fosfolípidos de membrana, los que se metabolizan por acción de las COX-1 en PGE2 y COX-2 en PGI2 respectivamente, los que son mediadores que contribuyen a la reducción de los niveles de colágeno.<sup>21</sup>

A pesar de las similitudes entre las vías transduccionales de B1R y B2R, los patrones de señalización son diferentes. Por ejemplo, en células vasculares lisas, la activación de B2R lleva a un aumento de la hidrólisis de inositol fosfato (PI) la cual es más dependiente del  $Ca^{+2}$  intracelular que del extracelular, mientras que la estimulación de B1R es más sostenida y depende mucho más del  $Ca^{+2}$

extracelular.<sup>21</sup> Sin embargo, hasta la fecha se desconoce si las cininas son capaces de ejercer otros efectos sobre la respuesta inflamatoria/antifibrótica en FC y MFC.



Nature Reviews | **Rheumatology**

Fig. 2: Receptor TLR4. TLR4 es un receptor dimérico tipo 1 de transmembrana con múltiples dominios LRR extracelulares y un dominio intracelular de señalización TIR. Abreviaciones: DAMPs (patrones moleculares asociados a daño), LRR (repeticiones ricas en lisina), PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos), TIR (Toll/IL-1 receptor), TLR4 (Toll-like receptor 4).<sup>22</sup>

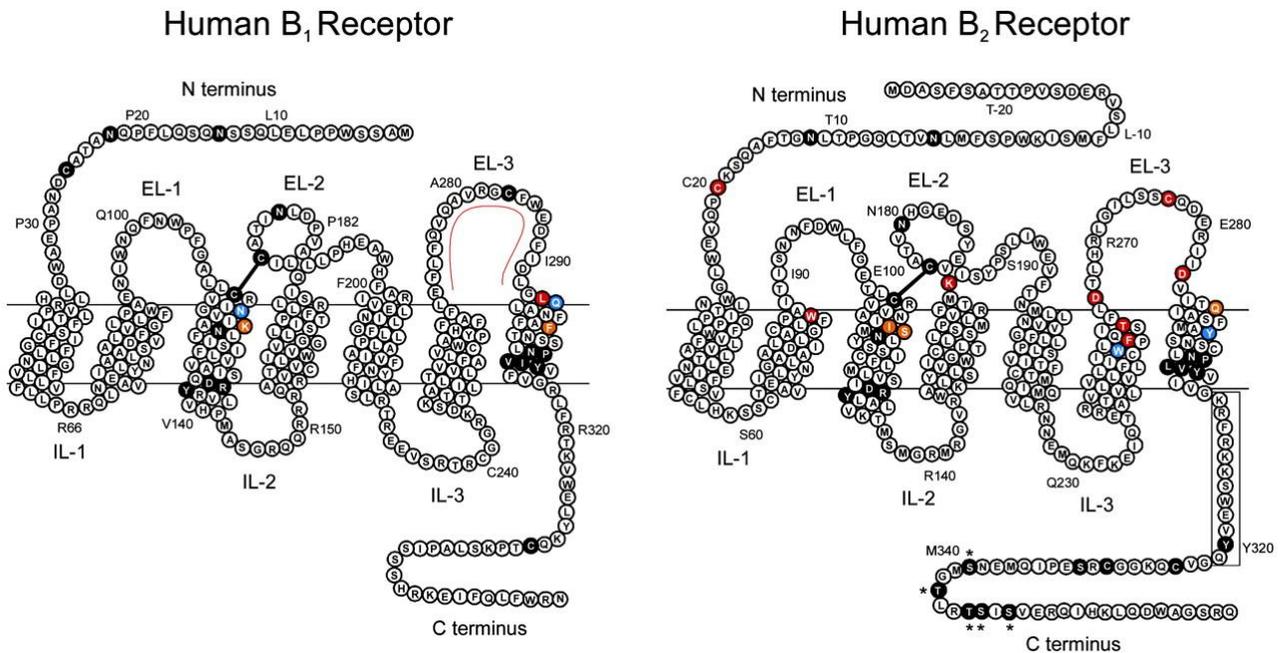


Fig. 3: Representación esquemática de las secuencias aminoacídicas de los receptores B1 y B2 humanos. Los residuos aminoacídicos encerrados en un cuadro en el receptor B2 corresponden a una octava hélice putativa y las estrellas indican los clusters de serinas y treoninas fosforiladas por GRK o PKC, importantes para la desensibilización. <sup>21</sup>

## 1.5. Expresión y secreción de citoquinas en fibroblastos cardiacos

### 1.5.1. Secreción de IL-1 $\beta$ inducida por LPS en fibroblastos cardiacos:

La IL-1 $\beta$  es una potente citoquina pro inflamatoria identificada inicialmente como un pirógeno endógeno. Es sintetizada como un precursor (pro-IL-1 $\beta$ ) por muchos tipos celulares (monocitos, macrófagos, neutrófilos, hepatocitos y macrófagos) y es expresada principalmente por activación de los receptores tipo TLR. La pro-IL-1 $\beta$  debe ser escindida para generar la citoquina activa, y esta incisión es llevada a cabo por la enzima convertidora de IL-1 $\beta$  (ICE) o también llamada caspasa-1, cuya activación se encuentra contenida en la actividad de un complejo intracelular especializado denominado inflammasoma NLRP3. En el laboratorio se demostró que se requiere de ATP para que ocurra la incisión por parte de la caspasa-1 y se genere la liberación de la forma activa de la citoquina *in vitro*. <sup>16</sup>

La interacción de IL-1 $\beta$  con su receptor IL-1RI activa vías de transducción y factores transcripcionales como p38, JNK y principalmente NF- $\kappa$ B, los cuales inducen la expresión génica y la síntesis de COX-2, PLA2 e iNOS, aumentando así los niveles de PGE2, PAF y NO.<sup>23</sup>

Otra importante propiedad pro inflamatoria asociada a IL-1 $\beta$  es su capacidad para aumentar la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 tanto en células mesenquimales, en células endoteliales y en fibroblastos gingivales humanos. Además, induce la expresión y secreción de quimioquinas, la que promueven la infiltración de células del sistema inmune del torrente sanguíneo hacia el espacio extravascular de los tejidos. La magnitud y duración de estos procesos son de vital importancia, puesto que si estos procesos se hacen crónicos conducen a una inflamación crónica que genera efectos deletéreos directos sobre el corazón, como por ejemplo el remodelado del ventrículo izquierdo post infarto.<sup>14, 23-25</sup>

## **1.6. Expresión de proteínas de adhesión celular en fibroblastos cardiaco**

### **1.6.1. Expresión de moléculas de adhesión celular ICAM-1 y VCAM-1:**

Las proteínas de adhesión intercelular, son glicoproteínas de transmembrana que se asocian principalmente con adhesión de leucocitos. Estas proteínas tienen dominios tipo inmunoglobulina G (IgG like) en el extracelular, y una corta cola citoplasmática en el intracelular que se asocian con muchas proteínas de unión al citoesqueleto. La interacción de ICAM-1 con sus contra receptores LFA-1 y Mac-1, y la interacción de VCAM-1 con su contra receptor VLA-4 es crucial para la adhesión de los leucocitos y la posterior migración transendotelial de éstos. El endotelio vascular presenta bajos niveles de ICAM-1 en estado normal, y frente a patologías de inflamación aguda o crónica, se induce su expresión, así como también la expresión de VCAM-1 y E-Selectina. En contraste, VCAM-1 se expresa en la superficie de células endoteliales activadas, fibroblastos de medula ósea, células dendríticas y macrófagos.<sup>26, 27</sup>

**Tanto ICAM-1 como VCAM-1 están ampliamente expresadas en procesos inflamatorios, con la finalidad de favorecer la adhesión de leucocitos y posteriormente facilitar su diapédesis.** Antecedentes del laboratorio han demostrado el aumento en la expresión de moléculas de adhesión celular ICAM-1 y VCAM-1 en FC y MFC de rata adulta al ser estimulados con LPS y HS.

### **1.7. Relación entre TLR4, receptores de cininas, citoquinas y proteínas de adhesión en fibroblastos cardiacos**

Hasta la fecha se desconoce en los FC si las cininas (solas o de manera conjunta con LPS), tienen un efecto sobre la expresión de moléculas de adhesión, así como como también en la secreción de citoquinas. Se sabe que la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 es inducida por citoquinas reguladoras del sistema inmune como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , así como también por hormonas, infecciones virales, infecciones bacterianas y estrés celular. Por otro lado, las cininas juegan un rol importante en los procesos de inflamación aguda al acumularse en el tejido dañado y también al inducir la expresión de moléculas de adhesión celular para favorecer así el tráfico y acceso leucocitario al tejido.<sup>28</sup>

Antecedentes de la literatura señalan que la deficiencia o inhibición de B1R disminuye la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en tejido endotelial cerebral tanto de humanos, como de ratones; y está descrito que el bloqueo de la vía de señalización de las cininas ejerce un efecto anti inflamatorio. Al bloquear B1R y B2R, se reduce la invasión celular y la expresión de citoquinas pro inflamatorias en varios modelos animales de isquemia/reperfusión, trauma y dolor inflamatorio.<sup>29</sup>

**Sin embargo, hasta el momento no existen antecedentes publicados en la literatura que relacionen directamente si la activación de B1R y B2R modulan o regulan los efectos inducidos por la activación de TLR4.** Se sabe que la activación de TLR4 aumenta considerablemente los niveles de TNF- $\alpha$  a las 24 h, y a su vez TNF- $\alpha$  es capaz aumentar los niveles de B1R y B2R; sin embargo, se desconoce si la activación posterior de B1R y/o B2R lleva a una exacerbación de

los efectos pro inflamatorios de la activación de TLR4. Del mismo modo, antecedentes del laboratorio han mostrado que la activación del TLR4 con LPS en FC y MFC aumenta los niveles proteicos de pro-IL-1 $\beta$ , y también se ha demostrado que IL-1 $\beta$  es un fuerte inductor de la expresión de B1R.<sup>30-33</sup>

Resultados aún no publicados del laboratorio, han demostrado que en FC la activación de TLR4 con LPS aumenta la expresión de B1R, mientras que la expresión de B2R no se vio alterada. Además, se demostró el incremento de las enzimas COX-2 e iNOS en respuesta a la estimulación de LPS.

Por lo tanto, con estos antecedentes surgen las siguientes interrogantes:

¿el pretratamiento con BK para activar el B2R modula el efecto de LPS vía TLR4?

¿el pretratamiento con LPS sensibilizará o potenciará en los FC un posterior efecto de las cininas?,

¿Significará esto que el efecto conjunto de LPS/BK o LPS/DAKD ejercerán un efecto pro inflamatorio aún más acentuado?

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, podemos sugerir que existe una relación aún no descrita, entre la activación de TLR4 y B1R o B2R de cininas en FC. Esta relación es relevante de investigar puesto que en un proceso inflamatorio la activación en forma paralela de estas vías pro inflamatorias puede exacerbar la fase inflamatoria. De esta forma, el bloqueo de ambas podría ser una nueva estrategia farmacológica a fin de prevenir una respuesta inflamatoria exacerbada. Sin embargo, a futuro la activación conjunta de TLR4 y B1R o B2R podría considerarse como un blanco farmacológico de interés ya sea por su rol antifibrótico, o por su participación en el fenómeno inflamatorio.

Estos antecedentes en su conjunto nos permiten formular la siguiente hipótesis.

## **2. HIPÓTESIS:**

Bradicinina modula la expresión de moléculas pro-inflamatorias inducidas por la activación de TLR4 en fibroblastos cardiacos neonatos.

## **3. OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar si la activación del B2R modula la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y pro-IL-1 $\beta$  en fibroblastos cardiacos de ratas neonatas inducidas por activación del TLR4.

### **3.1. Objetivo específico 1:**

Determinar si la activación de B2R o de B1R aumenta los niveles de expresión de las moléculas de adhesión en FCN.

### **3.2. Objetivo específico 2:**

Determinar si la activación de B2R o B1R modula la expresión de TLR4 en FCN.

### **3.3. Objetivo específico 3:**

Determinar el efecto conjunto de BK y LPS sobre los niveles de expresión de las moléculas de adhesión y pro-IL-1 $\beta$  en FCN.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS:

### 4.1. Reactivos:

De Abcam PCL (Cambridge, UK): Anti-VCAM1 antibody [EPR5047] (ab134047),  
De Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA): Azul de tripán, Bradykinin acetate salt (BK) [B3259], [Lys-des-Arg9]-Bradykinin (DAKD) [B1542], Anti-Actin  $\alpha$ -Smooth Muscle antibody Mouse monoclonal (A5228).

De Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA): tripsina-EDTA, estándares para masas moleculares de proteínas pre-teñidas, suero fetal de bovino (FBS), D-MEM/F-12.

De Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA): goat anti-rabbit IgG-HRP (sc-2030), goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005), ICAM-1 Antibody (M-19-R) [sc-1511-r], GAPDH Antibody (FL-335) [sc-25778], TLR4 Antibody (25) [sc-293072].

De MERCK (Darmstadt, Alemania): compuestos inorgánicos y orgánicos, sales, ácidos y solventes, Anti-Interleukin-1 $\beta$  Antibody [AB1832P], Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Protein Recombinant human [GF111].

De Winkler: compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes.

De Biological Industries BI (Kibbutz Beit Haemek, Israel): EZ-ECL Kit [20-500-1000].

De Falcon (USA): material de plástico estéril para la obtención y cultivo de fibroblastos cardíacos.

De InvivoGen (San Diego, CA, USA): LPS-EB Ultrapure (TLR4 Agonist - Lipopolysaccharide from E. coli 0111:B4) [tlrl-3pelps].

### 4.2. Modelo animal:

Ratas *Sprague-Dawley* neonatas (2 a 3 días de edad) provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, en cumplimiento de todas las normas éticas referidas a la utilización de animales.

### **4.3. Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos de ratas neonatas:**

Se utilizó el procedimiento descrito por *Foncea y cols.*, con leves modificaciones. Las ratas se decapitaron e inmediatamente se les removió el corazón bajo condiciones de asepsia, se retiraron las aurículas y los ventrículos siendo cortados en pequeños trozos para facilitar las sucesivas digestiones posteriores con pancreatina y colagenasa II.

El producto de las digestiones se sometió a un pre plaqueo por 2 h a 37°C en medio de cultivo conteniendo 5% FBS y 10% FCS en frascos para cultivo celular. Por adhesión diferencial al plástico se separaron los FC de cardiomiocitos. Transcurridas las 2 h, se cambió el medio por DMEM-F12 + 10% FBS, dejando proliferar a los FC hasta confluencia en condiciones convencionales de cultivo (5% de CO<sub>2</sub> y 37°C).

### **4.4. Pasaje celular:**

Para la realización de los experimentos las células se mantuvieron en pasaje 0, en medio DMEM-F12 suplementado con 10% FBS hasta confluencia. Posteriormente los FCN se soltaron con tripsina 1% en PBS 1x estéril y se contaron por el método de exclusión de azul de tripán en cámara de Neubauer, se sembraron los FCN en placas plásticas de cultivo celular de 60 mm a una concentración de 300.000 células/cm<sup>3</sup> en medio DMEM-F12 suplementado con 10% FBS (pasaje 1).

Una vez adheridas las células a las placas de plástico (aproximadamente 4 h), se lavaron con PBS 1x estéril y se mantuvieron en medio DMEM-F12 hasta la realización de cada experimento.

### **4.5. Diferenciación a miofibroblastos cardíacos:**

Se utilizaron FCN en pasaje 1, los cuales se cultivaron por 96 h en medio DMEM-F12 suplementado con TGF-β1 5 ng/mL. En nuestro laboratorio está estandarizado que bajo estas condiciones el 100% de los FC se diferenciaron a MFC. Una vez cumplido el tiempo se retiró el medio suplementado y los MFC se mantuvieron por 24 h con DMEM-F12. Los MFC obtenidos se utilizaron para los ensayos posteriores.

#### **4.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida:**

La separación de los extractos proteicos (obtenidos mediante el lisado celular y cuantificados a través del método de Bradford) de acuerdo a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida según Laemmli, 1970. Para la detección de VCAM-1, ICAM-1, Pro-IL-1 $\beta$ , TLR4 y  $\alpha$ -SMA se cargaron 50  $\mu$ g de extracto proteico. Los geles concentrador (3,78 mL de upper buffer 4x [Tris base 30 g, HCl pH 6.8; 20 mL SDS 10%, 500 mL agua destilada] + 1,98 mL A/BA [145 g Acrilamida + 5 g bis - Acrilamida, 500 mL agua destilada] + 150  $\mu$ L APS 10% + 30  $\mu$ L TEMED + 9,24 mL de agua destilada para dos geles) y separador (5 mL de lower buffer 4x [Tris base 90 g, HCl pH 8.8, 20 mL SDS 10% + 500 mL de agua destilada] + 6 mL A/BA [145 g Acrilamida + 5 g bis - Acrilamida, 500 mL agua destilada] + 150  $\mu$ L APS 10% + 30  $\mu$ L TEMED + 9 mL de agua destilada para 2 geles) fueron al 5% y 10% respectivamente.

La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 Volt en tampón de electroforesis 1x (Tris base 30,25 g, Glicina 144 g, SDS 10 g, agua 1000 mL para tampón de electroforesis) durante aproximadamente 100 minutos.

#### **4.7. Electrotransferencia de proteínas:**

Una vez realizada la electroforesis las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) de 0,2  $\mu$  a 350 mA durante 90 min en tampón de transferencia 1x (700 mL de agua destilada + 200 mL de metanol + 100 mL de buffer de transferencia 10x [Tris base 302,5 g, Glicina 1440 g, 10 L agua destilada]) en hielo.

#### **4.8. Inmunowestern Blot (IWB):**

Una vez transferidas, las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (TBS; Tween-20 0,1% (TBS-T) + leche sin grasa 5% p/v) durante 1 h a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados suaves de 10 minutos con TBS-T al 0,1%. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios en tampón de

incubación (TBS-T 0,1%) a una dilución 1:1000 para Pro-IL-1 $\beta$ , 1:5000 para VCAM-1, 1:200 para ICAM-1, 1:1000 para TLR4 y 10/1000 para  $\alpha$ -SMA toda la noche a 4°C con agitación suave. Posterior a la incubación, las membranas se lavaron 3 veces por 10 min en TBS-T al 0,1% y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario que correspondiera (anti-IgG Rabbit o anti-IgG Mouse) en una dilución 1:5000 en TBS-T al 0,1%.

Posterior a la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron 3 veces por 10 min en TBS-T al 0,1%, luego se incubaron con el sustrato quimioluminiscente EZ-ECL para detectar las proteínas y se expusieron por aproximadamente 10 segundos a la película de fotografía AGFA.

Después de realizada la detección de las proteínas de interés, se sometió a las membranas de nitrocelulosa nuevamente al proceso de bloqueo, para ser incubadas con anticuerpo primario anti-GAPDH, de igual manera que fueron incubados los anteriores anticuerpos primarios, para ser utilizadas como control de carga.

Las películas se digitalizaron y las imágenes obtenidas fueron sometidas a densitometría con ayuda del programa computacional ImageJ.

#### **4.9. Expresión de resultados y análisis estadístico:**

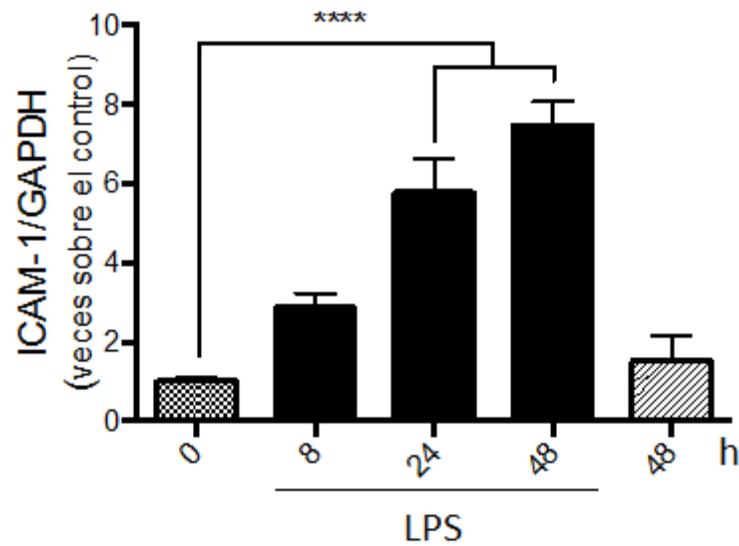
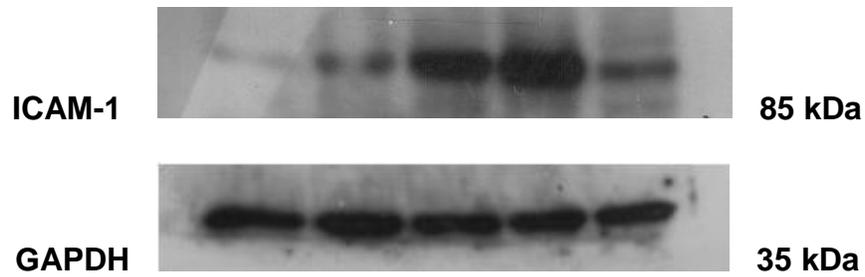
Los resultados se obtendrán mediante el promedio  $\pm$  SEM de, al menos, tres experimentos independientes ( $n \geq 3$ ). Los datos obtenidos serán analizados por ANOVA Test de Tukey o Test de Dunnet, lo que permitirá determinar la significancia estadística de los resultados, considerándose significativa la diferencia entre dos grupos cuando su valor de  $p < 0.05$ .

## **5. RESULTADOS:**

### **5.1. Evaluación del efecto de LPS sobre los niveles proteicos de ICAM-1 en FCN**

Antecedentes de la literatura indican que LPS es capaz de inducir un aumento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en endotelio linfático y en fibroblastos gingivales humanos.<sup>13, 14</sup> Por lo tanto, se estimularon FCN con LPS 1 µg/mL y las células fueron mantenidas en DMEM-F12 durante 8, 24 y 48 h. Para determinar los niveles proteicos de ICAM-1, se hizo el raspado de las placas de cultivo para obtener un lisado celular el cual permitió estudiar los niveles proteicos mediante WB.

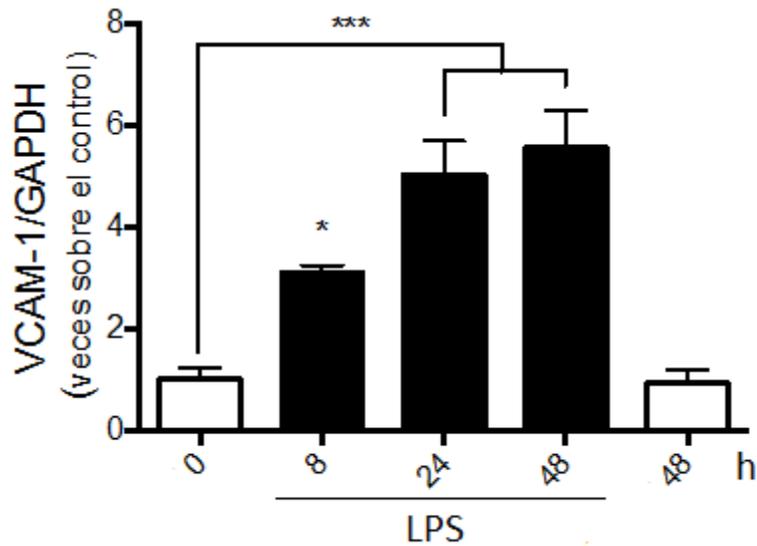
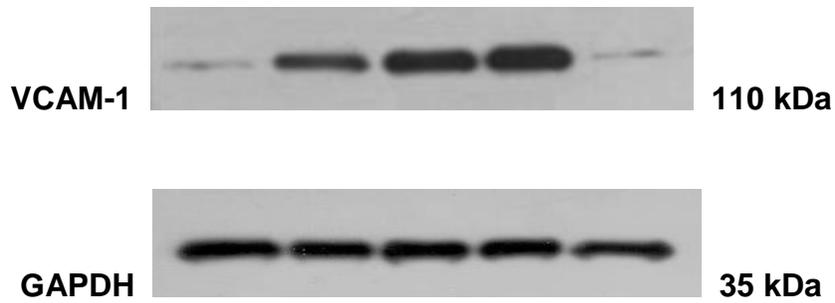
Los resultados de la Figura 4, muestran en la parte superior una imagen representativa del WB de ICAM-1 y su control de carga GAPDH, mientras que en la parte inferior se muestra un análisis gráfico del mismo. Del análisis de los resultados se obtiene que LPS aumentó los niveles proteicos de ICAM-1 en FCN aproximadamente 3 veces a las 8 h, hasta 6 veces a las 24 h y casi 8 veces a las 48 h respecto del control, determinando así que LPS induce un aumento significativo en los niveles proteicos de ICAM-1 en FCN.



**Fig. 4: LPS estimula la expresión de ICAM-1 en fibroblastos cardiacos neonatos.** Se estimularon FCN con LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 8, 24 y 48 h. Los niveles proteicos de ICAM-1 se midieron mediante WB. Se utilizó GAPDH como control de carga. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs Control. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM (n = 5).

## **5.2. Evaluación del efecto de LPS sobre los niveles proteicos de VCAM-1 en FCN**

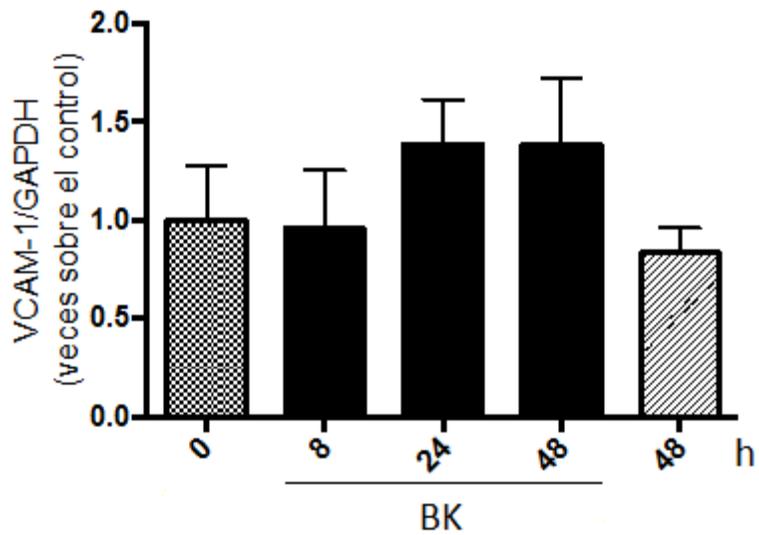
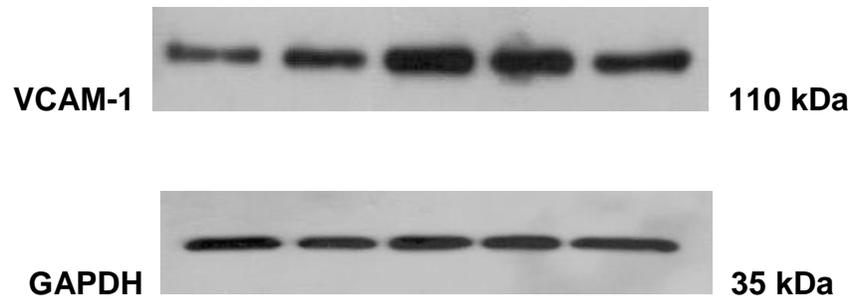
De igual manera se decidió determinar la actividad de LPS sobre los niveles proteicos de VCAM-1 en FCN. Por lo tanto, se estimularon FCN con LPS 1  $\mu\text{g/mL}$  y las células fueron mantenidas en DMEM-F12 durante 8, 24 y 48 h. Para determinar los niveles proteicos de VCAM-1, se hizo el raspado de las placas de cultivo para obtener un lisado celular el cual permitió estudiar los niveles proteicos mediante WB. Los resultados (Figura 5), muestran en la parte superior una imagen representativa del WB de VCAM-1 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 VCAM-1 en FCN aproximadamente 3 veces a las 8 h, hasta 5 a las 24 h y casi 6 veces a las 48 h respecto del control, determinando así que LPS induce un aumento significativo en los niveles proteicos de VCAM-1 en FCN.



**Fig. 5: LPS estimula la expresión de VCAM-1 en fibroblastos cardiacos neonatos.** Se estimularon FCN con LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 8, 24 y 48 h. Los niveles proteicos de VCAM-1 se midieron mediante WB. Se utilizó GAPDH como control de carga. \*  $p < 0,05$  vs Control, \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).

### **5.3. Evaluación del efecto de BK sobre los niveles proteicos de VCAM-1 en FCN**

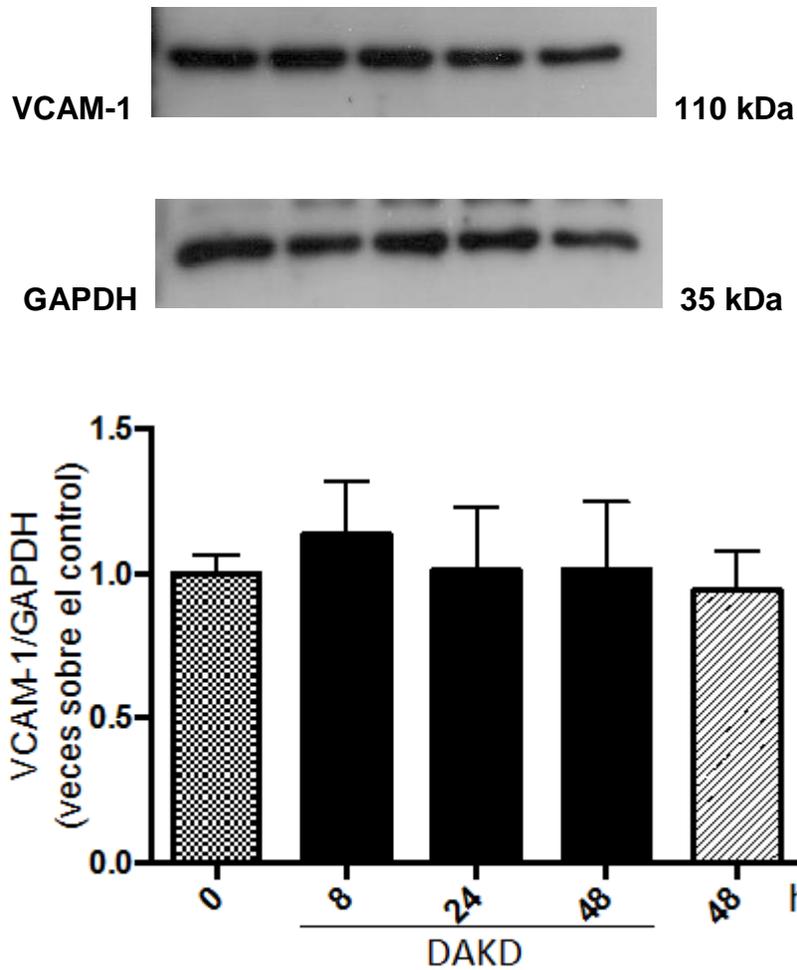
Con el objetivo de comparar la actividad sobre la expresión de VCAM-1 en respuesta a BK (agonista B2R), se utilizaron las condiciones en cuanto a tiempo se refiere utilizadas para los estudios con LPS. Por lo tanto, se estimularon FCN con BK 100 nM y las células fueron mantenidas en DMEM-F12 durante 8, 24 y 48 h. Para determinar los niveles proteicos de VCAM-1, se hizo el raspado de las placas de cultivo para obtener un lisado celular el cual permitió estudiar los niveles proteicos mediante WB. Los resultados de la Figura 6, muestran en la parte superior una imagen representativa del WB de VCAM-1 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 BK no causa cambios estadísticamente significativos en los niveles proteicos de VCAM-1 de FCN.



**Fig. 6: Expresión de los niveles proteicos de VCAM-1 en fibroblastos cardiacos neonatos frente a BK.** Se estimularon FCN con BK 100 nM durante 8, 24 y 48 h. Los niveles proteicos de VCAM-1 se midieron mediante WB. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM (n = 3).

#### **5.4. Evaluación del efecto de DAKD sobre los niveles proteicos de VCAM-1 en FCN**

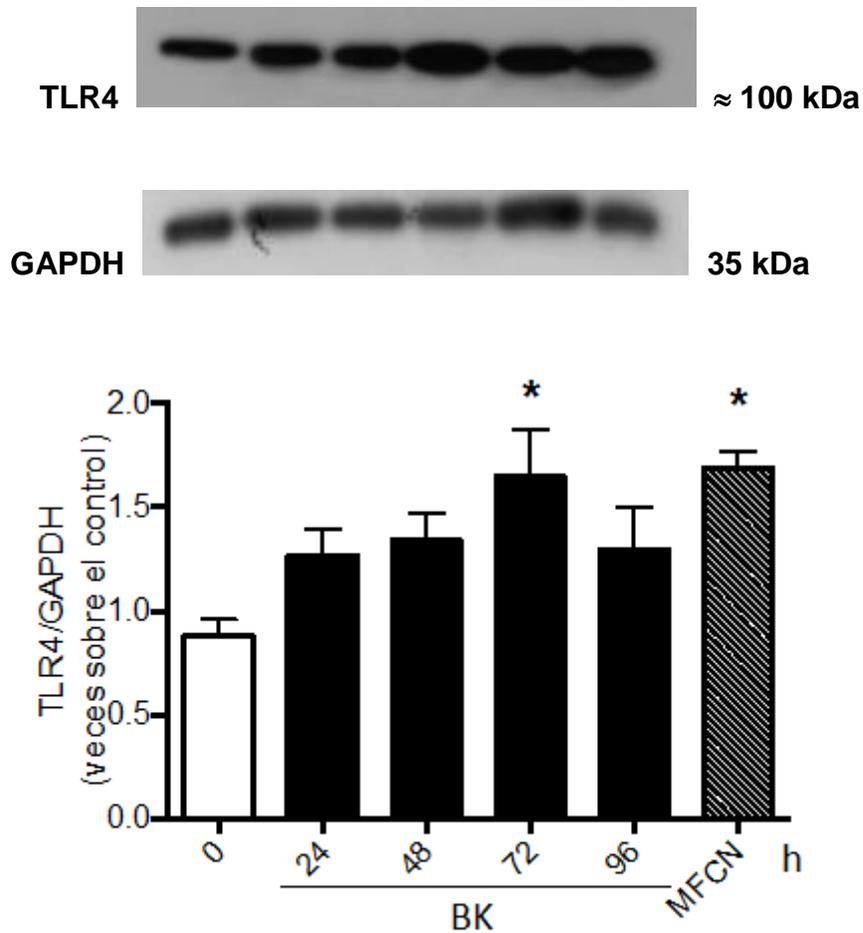
Para determinar los niveles proteicos de VCAM-1 en respuesta a DAKD (B1R), se utilizaron las condiciones anteriores en cuanto a tiempo se refiere. Por lo tanto, se estimularon FCN con DAKD 100 nM y las células fueron mantenidas en DMEM-F12 durante 8, 24 y 48 h. Para determinar los niveles proteicos de VCAM-1, se hizo el raspado de las placas de cultivo para obtener un lisado celular el cual permitió estudiar los niveles proteicos mediante WB. Los resultados de la Figura 7, muestran en la parte superior una imagen representativa del WB de VCAM-1 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 DAKD no fue capaz de aumentar los niveles proteicos de VCAM-1 en FCN a ningún tiempo de estímulo.



**Fig. 7: Expresión de los niveles proteicos de VCAM-1 en fibroblastos cardiacos neonatos frente a DAKD.** Se estimularon FCN con DAKD 100 nM durante 8, 24 y 48 h. Los niveles proteicos de VCAM-1 se midieron mediante WB. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM (n = 3).

### **5.5. Evaluación del efecto de BK sobre la expresión del TLR4 en FCN**

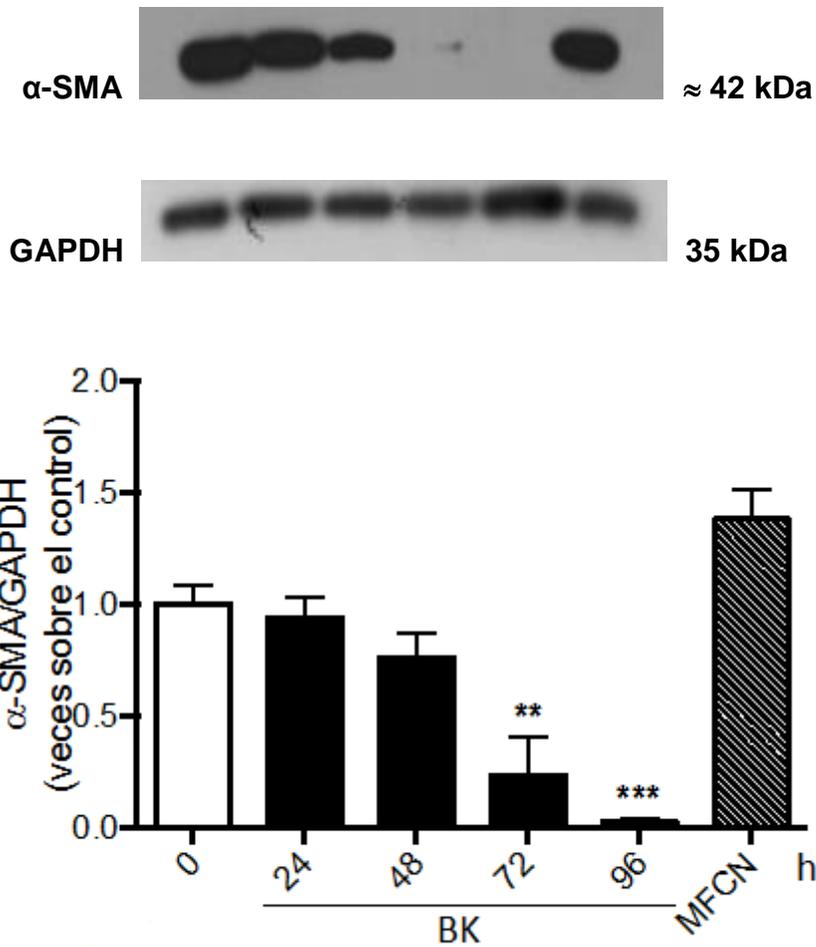
Se ha demostrado la capacidad de BK para aumentar los niveles proteicos de TLR4 en fibroblastos gingivales humanos, por lo que es pertinente determinar si esta capacidad se repite en FCN. Para determinar si BK en FCN modula de alguna forma los niveles proteicos del receptor TLR4, se realizó un perfil temporal de los niveles proteicos del receptor en FCN estimulados con BK 100 nM, siendo los tiempos elegidos 24, 48, 72 y 96 h. Como control positivo de 96 h, se utilizó un cultivo de MFCN, los cuales se obtuvieron al estimular FCN de pasaje 1 durante 96 h con TGF- $\beta$ 1 5 ng/mL. Una vez cumplidas estas condiciones, se hizo el raspado celular para obtener el lisado proteico el cual se utilizó para determinar los niveles proteicos de TLR4 por WB frente a estas condiciones. Los resultados de la Figura 8, muestran en la parte superior una imagen representativa del WB de TLR4 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 BK aumentó los niveles de expresión de TLR4 desde las 24 h de estímulo, alcanzando su máximo a las 72 h, donde el aumento es estadísticamente significativo, alcanzándose niveles proteicos de TLR4 aproximadamente 1,5 veces más altos que la condición control, valor que se asemeja a los niveles proteicos de un MFCN, determinando así que BK aumenta los niveles proteicos de TLR4 en FCN.



**Fig. 8: BK estimula la expresión de TLR4 en fibroblastos cardiacos neonatos.** Se estimularon FCN con BK 100 nM durante 24, 48, 72 y 96 h para analizar los niveles proteicos de TLR4. Como control positivo se utilizó cultivo de MFCN obtenido según protocolo del laboratorio. Los niveles proteicos de TLR4 se midieron mediante WB. Se utilizó GAPDH como control de carga. \*  $p < 0,05$  vs Control 0. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM (n = 5).

### **5.6. Evaluación del efecto de BK sobre la expresión de $\alpha$ -SMA en FCN**

La utilización de MFCN como control positivo del aumento de TLR4 en el experimento anterior se debió a que los MFC expresan mayores niveles de TLR4 que los FC. Por lo tanto, consideramos importante determinar si BK junto con modificar los niveles de TLR4 induce también cambios en la expresión de  $\alpha$ -SMA. Para este objetivo, se realizó un perfil temporal de los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA en FCN estimulados con BK 100 nM, siendo los tiempos elegidos 24, 48, 72 y 96 h. El cultivo de MFCN se obtuvo al estimular FCN de pasaje 1 con TGF- $\beta$ 1 5 ng/mL durante 96 h en DMEM-F12. Una vez cumplidas las condiciones, se hizo el raspado celular para obtener el lisado proteico el cual se utilizó para determinar los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA por WB frente a estas condiciones. Los resultados de la Figura 9, muestran en la parte superior una imagen representativa del WB de  $\alpha$ -SMA 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 en los FCN, BK disminuyó de forma gradual y tiempo dependiente los niveles de  $\alpha$ -SMA hasta la aparente y significativa desaparición de éste a las 72 – 96 h.

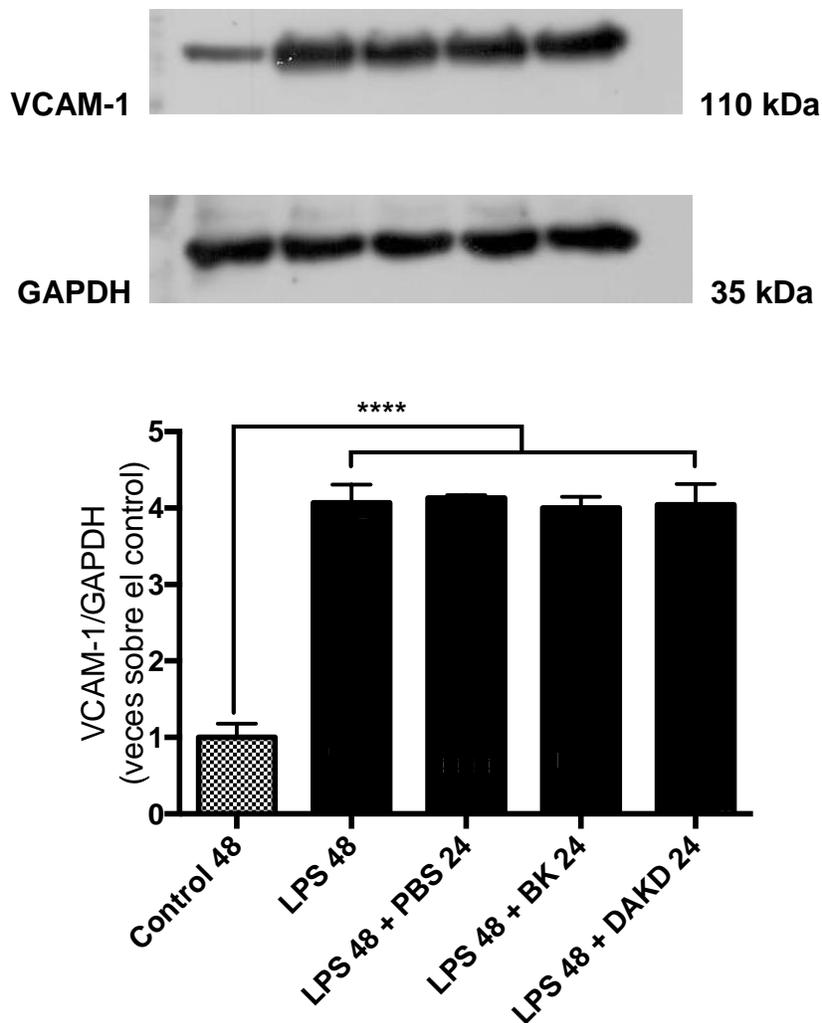


**Fig. 9: BK disminuye la expresión de  $\alpha$ -SMA en fibroblastos cardiacos neonatos.** Se estimularon FCN con BK 100 nM durante 24, 48, 72 y 96 h para analizar los niveles de  $\alpha$ -SMA. Como control positivo se utilizó cultivo de MFCN obtenido según protocolo del laboratorio. Los niveles de  $\alpha$ -SMA se midieron mediante WB. Se utilizó GAPDH como control de carga. \*\* p < 0,01 vs Control 0, \*\*\* p < 0,001 vs Control 0. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM (n = 3).

### **5.7. Evaluación del efecto del pretratamiento de LPS sobre los efectos producidos por BK y DAKD sobre los niveles proteicos de VCAM-1**

Nuestro laboratorio ha demostrado que el tratamiento con LPS incrementa los niveles de expresión de B1R, y no así los niveles de B2R. Por lo tanto, se estudió sí el pretratamiento con LPS (aumento de B1R), sensibiliza a los FC en cuanto a los efectos de las cininas sobre los niveles proteicos de VCAM-1. Para este objetivo, se realizó un pretratamiento de los cultivos de FCN con LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 48 h (se eligió este tiempo debido a que antecedentes previos del laboratorio indican que los niveles del receptor B1R aumentan con el pretratamiento de LPS por 48 h).

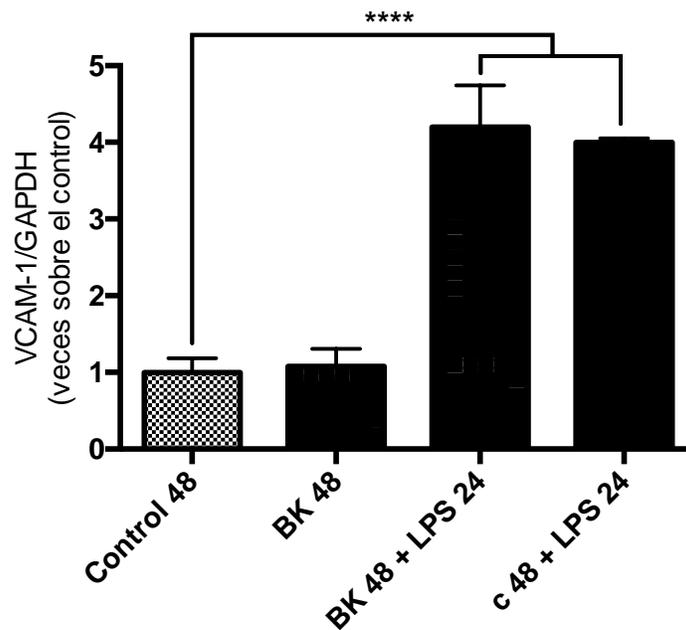
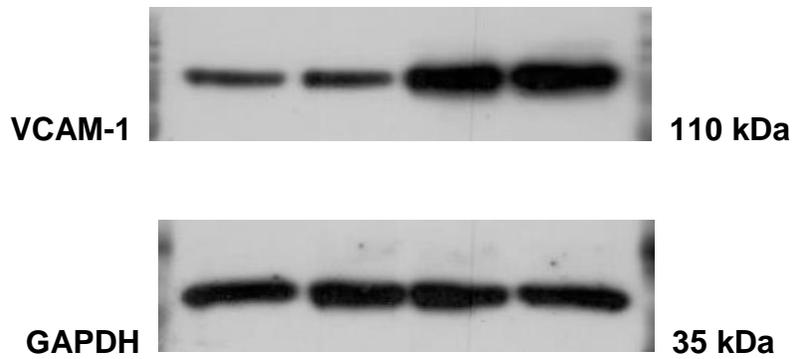
Una vez cumplidas las 48 h con el pretratamiento, se lavaron los cultivos con PBS 1x estéril, y se agregó nuevo medio DMEM-F12, se dejaron las células sólo con medio de cultivo por 1 h y se procedió a estimular con BK 100 nM, DAKD 100 nM y PBS 1x estéril durante 24 h. Una vez cumplidas estas condiciones, se hizo el raspado celular para obtener el lisado proteico el cual se utilizó para determinar los niveles proteicos de VCAM-1 por WB frente a estas condiciones. Los resultados de la Figura 10, muestran en la parte superior una imagen representativa del WB de VCAM-1 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 tanto BK como DAKD no mostraron diferencias significativas respecto a los niveles proteicos de VCAM-1 alcanzados por el pretratamiento de LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 48 h (aumento de 4 veces sobre el control de 48 h).



**Fig. 10: Efecto de BK y DAKD sobre los niveles de expresión de VCAM-1 en fibroblastos cardiacos neonatos pretratados con LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 48 h. Se pre estimularon FCN con LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 48 h, luego se cambió el medio y se estimuló con PBS 1x estéril, DAKD 100 nM y BK 100 nM durante 24 h. Los niveles proteicos de VCAM-1 se midieron mediante WB. Se utilizó GAPDH como control de carga. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs Control 48. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).**

### **5.8. Evaluación del efecto del pretratamiento de BK sobre los efectos producidos por LPS sobre los niveles proteicos de VCAM-1**

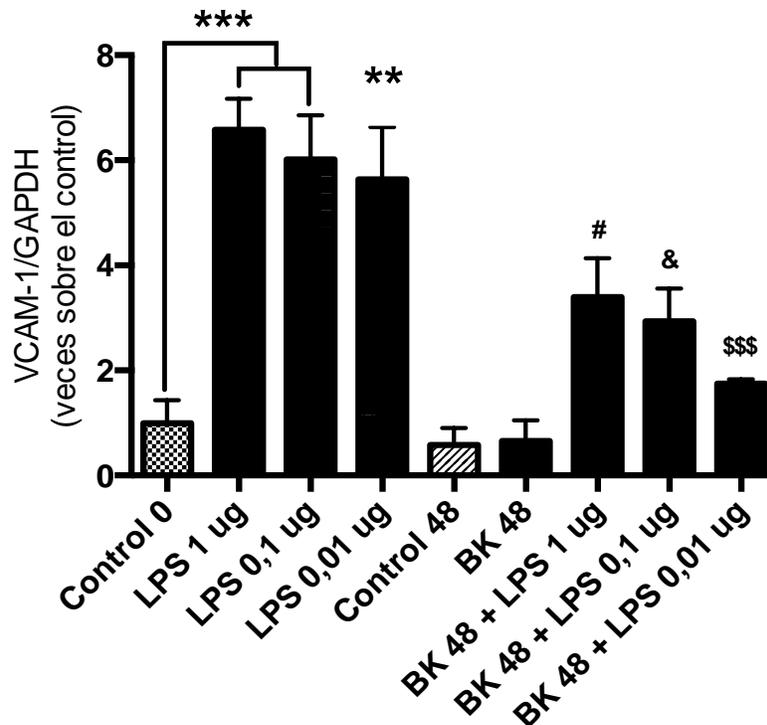
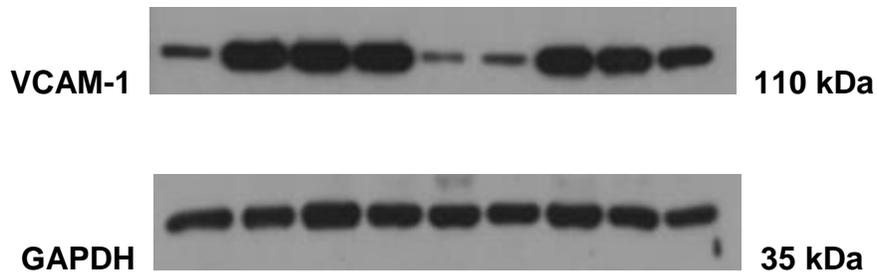
En concordancia con los resultados mostrados en la Figura 8, se estudió si el pretratamiento con BK modula los efectos gatillados por la activación del TLR4. Con este objetivo, los FCN fueron pretratados con BK 100 nM durante 48 h (tiempo al que se observó aumento en los niveles de TLR4), luego se lavaron los cultivos y se dejaron en medio DMEM-F12 durante 1 h, para luego ser estimulados posteriormente durante 24 h con LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Como control del efecto de LPS sobre VCAM-1 se utilizó una placa de FCN por 48 h solo con DMEM-F12 y se estimuló con LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 24 h. Una vez cumplidas estas condiciones, se hizo el raspado celular para obtener el lisado proteico el cual se utilizó para determinar los niveles proteicos de VCAM-1 por WB frente a estas condiciones. Los resultados de la Figura 11, muestran en la parte superior una imagen representativa del WB de VCAM-1 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 ya sea en presencia/ausencia de BK aumentó los niveles de VCAM-1; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre LPS v/s pretratamiento con BK/LPS.



**Fig. 11: Efecto de LPS sobre los niveles de expresión de VCAM-1 en fibroblastos cardiacos neonatos pretratados con BK 100  $\mu$ M por 48 h.** Se pre estimularon FCN con BK 100 nM por 48 h, luego se cambi3 el medio y se estimul3 con LPS 1  $\mu$ g/mL durante 24 h. Los niveles proteicos de VCAM-1 se midieron mediante WB. Se utiliz3 GAPDH como control de carga. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs Control 48. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM (n = 3).

### **5.9. Evaluación del efecto del pretratamiento de BK sobre los efectos producidos a diferentes concentraciones de LPS sobre VCAM-1**

Como no se observaron cambios significativos respecto al efecto de LPS sobre los niveles proteicos de VCAM-1 en una condición de pretratamiento con BK, se decidió trabajar a menores concentraciones de LPS (1, 0,1 y 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ), con la finalidad de estudiar si la falta de efecto se debe a que estamos trabajando con dosis supraóptimas de LPS, y por lo tanto, no es posible observar algún efecto sinérgico o de potenciación. Para este objetivo se estimuló con BK por 48 h. Cumplido este tiempo de estímulo, las placas se lavaron y se dejaron DMEM-F12 durante 1 h, para luego ser estimuladas durante 24 h con las diferentes concentraciones de LPS (1, 0,1 y 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ). Una vez cumplidas estas condiciones, se hizo el raspado celular para obtener el lisado proteico el cual se utilizó para determinar los niveles proteicos de VCAM-1 por WB frente a estas condiciones. Los resultados de la Figura 12, muestran en la parte superior una imagen representativa del WB de VCAM-1 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 a las distintas concentraciones mostró un aumento significativo en los niveles proteicos de VCAM-1, no observándose diferencias entre las distintas concentraciones. Cabe destacar que aún a una concentración 100 veces menor a la utilizada en el laboratorio (1  $\mu\text{g/mL}$ ), se sigue observando un aumento importante de VCAM-1 a las 24 h (aproximadamente 6 veces sobre los niveles del Control 0 a las tres concentraciones). Sin embargo, en FC pretratados con BK se observó una disminución importante en los niveles de expresión de VCAM-1 frente a las diferentes concentraciones de LPS (disminuyendo a la mitad aproximadamente el efecto logrado por LPS 1  $\mu\text{g/mL}$ ). Lo anterior podría indicar que BK (B2R) estaría modulando de forma negativa el efecto que LPS vía TLR4 tiene sobre los niveles proteicos de VCAM-1. Es importante destacar que mantiene el mismo perfil dosis/respuesta que las diferentes concentraciones de LPS en la condición basal.

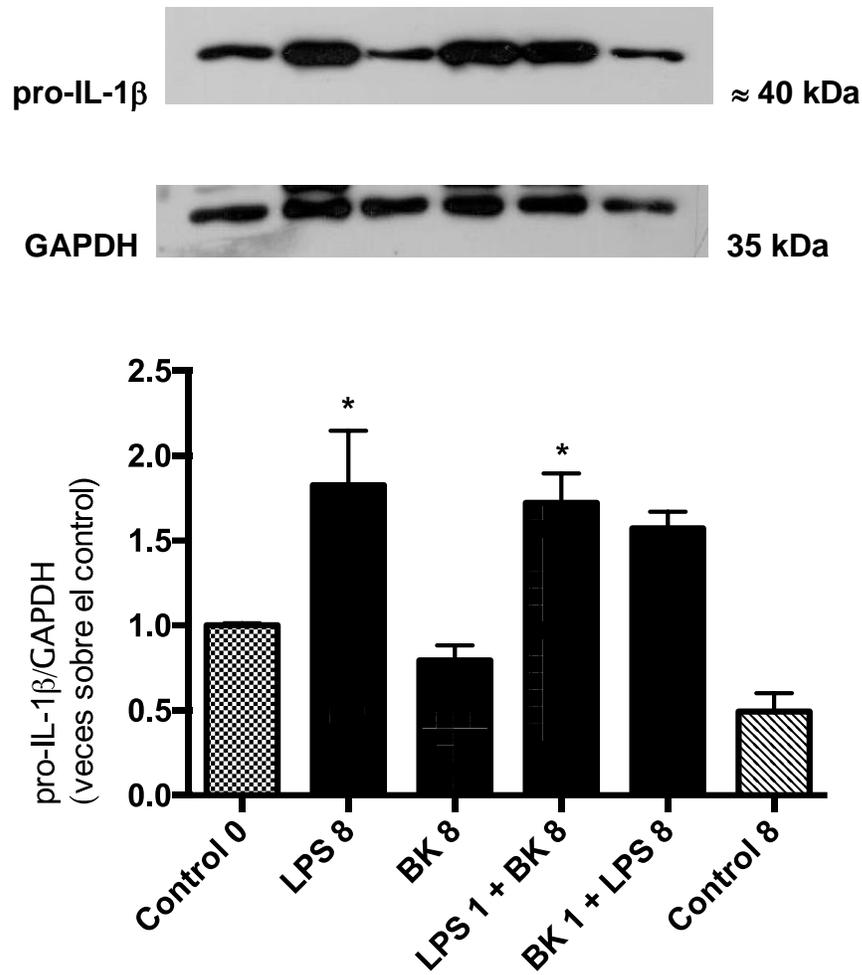


**Fig. 12: Expresión de los niveles proteicos de VCAM-1 en fibroblastos cardiacos neonatos pretratados con BK 100  $\mu$ M utilizando diferentes concentraciones de LPS.**

Se estimularon FCN con diferentes concentraciones de LPS (1, 0,1 y 0,01  $\mu$ g/mL) durante 24 h. De forma análoga se estimularon FCN con BK 100 nM durante 48 h, para luego ser estimulados con diferentes concentraciones de LPS (1, 0,1 y 0,01  $\mu$ g/mL) durante 24 h. Los niveles proteicos de VCAM-1 se midieron mediante WB. Se utilizó GAPDH como control de carga. \*\* $p < 0,01$  vs Control 0, \*\*\*  $p < 0,001$  vs Control 0, # $p < 0,05$  vs LPS 1  $\mu$ g, & $p < 0,05$  vs LPS 0,1  $\mu$ g, \$\$\$ $p < 0,001$  vs LPS 0,01  $\mu$ g. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes (n = 3).

### **5.10. Evaluación del efecto de BK y LPS sobre la expresión de pro-IL-1 $\beta$**

Para comprobar si el pretratamiento con BK modula de forma exclusiva sólo la expresión de VCAM-1, se procedió a estudiar los efectos sobre la expresión de pro-IL-1 $\beta$ . Antecedentes del laboratorio indican que los niveles proteicos del precursor inactivo de IL-1 $\beta$ , la pro-IL-1 $\beta$ , tienen un perfil temporal de aumento y disminución en donde el máximo aumento se observa a las 8 h frente al estímulo con LPS 1  $\mu$ g/mL. Por lo tanto, se utilizó el mismo tiempo de ensayo, para así comparar su efecto con el producido vía TLR4. Con este objetivo se estimularon FCN en DMEM-F12 con LPS 1  $\mu$ g/mL y BK 100 nM durante 8 h. También se probó si el pretratamiento de 1 h, ya sea con BK o LPS, modifica los niveles de esta citoquina con respecto a la expresión propia de cada uno. Una vez cumplidas las condiciones, se hizo el raspado celular para obtener el lisado proteico el cual se utilizó para determinar los niveles proteicos de pro-IL-1 $\beta$  por WB frente a estas condiciones. Los resultados de la Figura 13, muestran en la parte superior una imagen representativa del WB de pro-IL-1 $\beta$  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 observa que LPS por 8 h aumentó casi al doble de los niveles de pro-IL-1 $\beta$  en FCN ya sea en presencia/ausencia de BK (antes o después), no observándose diferencias entre estos tratamientos. Sin embargo, BK por sí misma no mostró efectos sobre los niveles de expresión de esta citoquina, y no moduló los aumentos inducidos por LPS.



**Fig. 13: Expresión de los niveles proteicos de pro-IL-1 $\beta$  en fibroblastos cardiacos neonatos tratados con LPS y BK.** Se estimularon FCN con LPS 1  $\mu$ g/mL y BK 100 nM durante 8 h para analizar los niveles de pro-IL-1 $\beta$ . Se realizaron también pretratamientos de 1 h con el estímulo contrario, luego se cambió el medio y se estimuló 8 h ya sea con LPS o BK. Los niveles de pro-IL-1 $\beta$  se midieron mediante WB. Se utilizó GAPDH como control de carga. \*  $p < 0,05$  vs Control 0. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$ SEM (n=3).

## 6. DISCUSIÓN

### Efecto de LPS y cininas sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FCN.

En FCN LPS aumentó de manera tiempo dependiente los niveles proteicos de ICAM-1 y VCAM-1 (figuras 4 y 5). Estos aumentos en los niveles proteicos de ICAM-1 y VCAM-1 por LPS son consistentes tanto con datos previos del laboratorio en FC adultos, como con un trabajo publicado por *Hosokawa et al.*<sup>14</sup> quienes demostraron que en fibroblastos gingivales humanos, los niveles proteicos de ambas moléculas de adhesión son aumentados por citoquinas pro inflamatorias, como IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . A este respecto, en el laboratorio se ha demostrado que tanto IL-1 $\beta$  como TNF- $\alpha$  aumentan como consecuencia de la activación del TLR4 con LPS. En este mismo sentido, se ha demostrado que los efectos son mediados por la activación de NF- $\kappa$ B, principal factor asociado al aumento de ICAM-1/VCAM-1 en diversos fenotipos celulares<sup>34 35</sup>, dentro de los cuales se encuentran los FC. Dada la temporalidad de nuestros resultados, sugerimos que el aumento de VCAM-1/ICAM-1 son dependientes directamente de la activación de TLR4, y no por un efecto indirecto mediado por la liberación de las citoquinas pro inflamatorias, principalmente TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Sin embargo, es importante discutir que en nuestro modelo experimental de FCN, no se puede descartar la participación de estas citoquinas, aunque esos efectos pueden ser efectos más tardíos.

Por otro lado, el rol de IL-1 $\beta$  como inductor de NF- $\kappa$ B es descartado de este análisis ya que *Boza et al.*<sup>16</sup> demostraron *in vitro* que los FC no secretan esta citoquina, ya que para el ensamblado del inflammasoma NLRP3 y la posterior proteólisis de la forma inactiva pro-IL-1 $\beta$  se requiere de ATP (3 mM), el cual no se agregó en este modelo experimental; por lo que la pro-IL-1 $\beta$  producida tras el estímulo de los FCN con LPS sólo queda en el citosol y posteriormente se degrada.

Respecto al efecto observado de BK sobre los niveles proteicos de VCAM-1 en FCN, nuestros resultados no mostraron efectos. Este efecto es inesperado considerando que BK es un estímulo pro inflamatorio. *Guevara-Lora et al.*<sup>36</sup>

demonstraron que BK y sus derivados producían un aumento en la expresión tanto del mensajero como de la proteína de ICAM-1. En este estudio demostraron que las cininas aumentaban la adhesión de una línea modificada de monocitos sobre una monocapa de una línea celular de endotelio microvascular. Por otro lado, *Tsai et al.*,<sup>37</sup> reportaron que en fibroblastos de mucosa nasal aislados de pacientes con rinosinusitis crónica, BK vía B2R aumenta los niveles de VCAM-1 pero solo a una concentración de 0.05  $\mu$ M; sin embargo, a concentraciones mayores el aumento se hacía menos significativo.

De manera similar, en lo que refiere a la estimulación con DAKD no se observaron cambios en los niveles proteicos de VCAM-1 en FCN (figura 7). Estos resultados son consistentes y esperados con lo que se ha reportado en la literatura respecto del B1R. En este sentido, B1R no se expresa en tejidos sanos, si no que su transcripción y expresión en membrana es inducida en los tejidos frente a estímulos pro inflamatorios, como TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1 y LPS en diversos tipos celulares, como células del musculo liso vascular de conejo, rata, cerdo, fibroblastos de pulmón humano y en FC de rata.<sup>32, 36, 37</sup>

### **BK modula la expresión del receptor TLR4 en FCN.**

Nuestros resultados mostraron que en los FC, BK agonista B2R, aumentó tempranamente los niveles de expresión de TLR4, alcanzando un nivel máximo de 1,5 veces más alto que el control. Estos niveles de expresión son similares a los expresados por los MFC (figura 8). Resultados similares han sido reportados por *Gutiérrez-Venegas et al.*<sup>38</sup> en fibroblastos humanos gingivales, donde el aumento máximo de TLR4 obtenido se asemeja al obtenido en nuestro trabajo. Al mismo tiempo, estos autores demostraron que el incremento de TLR4 inducido por BK fue dosis dependiente y que este aumento de TLR4 se veía bloqueado con el uso de Hoe 140, un antagonista de B2R. En este trabajo también se demostró que BK a través de B2R activa las vías transduccionales PKC y PI3K/Akt las cuales activan el factor transcripcional NF- $\kappa$ B, el que finalmente controla la expresión de TLR4.

## Efecto de BK sobre los niveles de expresión de $\alpha$ -SMA

Los MFCN se caracterizan por presentar altos niveles de  $\alpha$ -SMA (un marcador de su fenotipo). En este sentido, en FCN se evaluó si BK vía B2R modula los niveles de expresión de dicha proteína. Los resultados mostraron que BK vía B2R reduce los niveles de  $\alpha$ -SMA en FCN de rata, Lo anterior significaría que BK estaría favoreciendo el fenotipo pro inflamatorio (FC) por sobre el pro fibrótico (MFC). Estos resultados son bastantes interesantes, pues a la fecha no se ha descrito nada similar en FC de ninguna especie y resaltaría aún más el efecto antifibrótico de BK, pues nuestro laboratorio ha demostrado que BK reduce los niveles de colágeno tanto en FC como en MFC (Catalán et al.).<sup>10</sup>

Sin embargo, este resultado se contrapone a un estudio realizado en células madres derivadas del tejido adiposo cutáneo de humanos, en el que se demostró que BK tiene un efecto inductor de  $\alpha$ -SMA.<sup>39</sup>

Por otro lado, nuestros resultados son coincidentes con los descritos por *Cardenas et al.*,<sup>40</sup> quienes utilizando un modelo de daño renal inducido por albúmina (caracterizado por un aumento en la expresión de TGF- $\beta$ , un aumento en la fosforilación de Smad3 y un consiguiente aumento de  $\alpha$ -SMA), demostraron que la activación de B2R aumenta la expresión de Smad7, disminuye la fosforilación de Smad3, la expresión de  $\alpha$ -SMA y consecuentemente reduce la fibrosis intersticial, denotando con ello una acción renoprotectora. Es interesante indicar que estos efectos fueron revertidos al utilizar Hoe-140, un antagonista específico del B2R. También realizaron un estudio *in vitro* utilizando una línea celular de células epiteliales del tubo proximal humanas, conocidas como HK-2, donde se demostró que altas concentraciones de albúmina aumentan los niveles tanto del mensajero como de la proteína activa de TGF- $\beta$ 1. Sin embargo, al utilizar BK todos los cambios inducidos por albúmina se revirtieron (el aumento de  $\alpha$ -SMA, la disminución del receptor de TGF- $\beta$ 1 tipo 2, el mRNA y la forma activa de TGF- $\beta$ 1), sugiriendo un rol protector de BK contra la fibrosis. En este estudio *in vitro* también se observó la reversión de los efectos de BK al utilizar el antagonista de B2R, Hoe-140. En este tipo celular el mecanismo anti fibrótico de BK es desconocido, pero se sugiere que

puede ser mediado por la activación de la cascada de la proteína G, asociada a TGF- $\beta$ 1 y a la transición epitelio-mesénquima, ya que se ha demostrado que BK atenúa la pérdida de expresión de la E-cadherina y disminuye la expresión de  $\alpha$ -SMA. Estos efectos sugieren que el rol anti fibrótico de BK se debe al efecto modulador sobre TGF- $\beta$ 1.

En otro estudio realizado por, *Zhang et al.*<sup>41</sup> publicaron que la vía de señalización de las Smad activadas por TGF- $\beta$ 1 es regulada negativamente por Smad7, la cual se vio aumentada por activación del B2R tanto *in vivo* como *in vitro*, apoyando la idea de que BK antagoniza la vía de las Smad. Esto explicaría que a pesar de no haber observado una disminución en la fosforilación de Smad3 *in vitro*, BK si antagonizó la expresión de  $\alpha$ -SMA.

Finalmente, *Tu et al.*,<sup>43</sup> utilizando la línea celular de células epiteliales del túbulo proximal de humanos, conocidas como RPTEC, observaron que la activación de B2R con BK reduce la transformación de miofibroblastos, y disminuye la expresión de  $\alpha$ -SMA y la activación de Smad4 inducida por TGF- $\beta$ 1, sugiriendo que B2R puede antagonizar la vía de señalización de las Smad gatillada por TGF- $\beta$ 1. En este grupo celular se observó que TGF- $\beta$ 1 es capaz de aumentar los niveles de  $\alpha$ -SMA, y que la adición de BK era capaz de reducir el número de células  $\alpha$ -SMA positivas inducidas por TGF- $\beta$ 1. También se observó que este efecto de BK era revertido al utilizar Hoe-140. Este rol anti fibrótico de BK no se limita sólo a células renales, ya que *Catalán et al.*,<sup>10</sup> mostraron que los receptores de cininas en los FC, podrían ser un regulador del metabolismo del colágeno mediante la supresión en la diferenciación de fibroblasto hacia miofibroblasto en el tejido cardiaco.<sup>40 43</sup>

**En conclusión, estos resultados en forma colectiva destacan el efecto antifibrótico de BK vía B2R, caracterizados por la disminución de  $\alpha$ -SMA, favoreciendo el fenotipo de FC por sobre un fenotipo de MFC.**

**LPS y BK modulan de manera conjunta los niveles de expresión de las moléculas de adhesión y de pro-IL-1 $\beta$  en FCN.**

Debido a que tanto LPS como BK activan vías proinflamatorias nuestro objetivo fue estudiar si ambos estímulos, ya sea de manera conjunta, o de manera alternada, podrían tener un efecto sinérgico en los niveles de expresión de estas proteínas. Con este objetivo los FC se trataron por 48 h con LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , debido a que: a) antecedentes del laboratorio han indicado a ese tiempo LPS induce la expresión de B1R, y b) a las 48 h de estímulo con LPS se observa un aumento en la expresión del B1R en membrana. Los resultados no mostraron cambios en los niveles proteicos de VCAM-1 ya sea con BK o DAKD en presencia/ausencia de LPS. De lo anterior se concluye que el efecto logrado por LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 48 h es máximo en FCN por lo que un posterior estímulo con las cininas, en esta condición, no permitirá determinar una variación en los niveles proteicos de VCAM-1. Por lo que se propone realizar a futuro un experimento similar pero con menores concentraciones de LPS, para poder determinar de mejor manera si es que existe algún sinergismo con las cininas, o alguna inhibición del efecto propio de LPS.

Por otro lado, en el pretratamiento con BK por 48 h (tiempo en el que se observa el aumento en TLR4), y posterior tratamiento con LPS no se observó ningún efecto sobre los niveles proteicos de VCAM-1. Para descartar que la falta de efecto se debía a que estábamos trabajando con concentraciones supraóptimas de LPS, se utilizaron menores concentraciones de LPS (1, 0.1 y 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Sin embargo, a concentraciones aún 100 veces menores de las utilizadas normalmente en el laboratorio, se pudo observar un aumento importante en los niveles proteicos de VCAM-1 a las 24 h con las 3 concentraciones de LPS. Del mismo modo, en la condición de pre tratamiento con BK durante 48 h, se observa la misma tendencia dosis respuesta a las diferentes concentraciones de LPS, pero el efecto logrado en los niveles proteicos de VCAM-1 se ve disminuido, aproximadamente a la mitad, algo totalmente contrario a lo esperado, ya que sabiendo que BK aumenta los niveles de TLR4, se esperaba una sinergia en el efecto de LPS sobre los niveles proteicos de VCAM-1. Este resultado estaría indicando que BK, a pesar de aumentar los niveles proteicos y la expresión de TLR4 en FCN, no estaría favoreciendo ni potenciando la expresión de VCAM-1. Este resultado podría ser

explicado por el aumento inducido por BK en la concentración de NO en los FCN. En este sentido, *Mantovani et al.*<sup>44</sup> reportaron que el aumento en la producción de óxido nítrico (NO) por las células endoteliales, inhibe la expresión de CAMs inducida por citoquinas a través de la vía NF- $\kappa$ B.

Por otro lado, se sabe que LPS es capaz de aumentar la producción de TNF- $\alpha$ , y que esta citoquina es capaz de inducir un aumento en la expresión de VCAM-1.<sup>45</sup> La inducción de la expresión de VCAM-1 por TNF- $\alpha$  requiere de la activación de NF- $\kappa$ B por un proceso que involucra la fosforilación y degradación de su inhibidor citoplasmático, I $\kappa$ B- $\alpha$ . Se ha demostrado que el NO disminuye la expresión de VCAM-1 al inhibir la activación de NF- $\kappa$ B. En este mismo trabajo *Spiecker et al.*<sup>45</sup> demostraron que el efecto es mediado por NO sobre la estabilidad de I $\kappa$ B- $\alpha$  quien impide la activación de NF- $\kappa$ B. Estos resultados indican que el NO inhibe la activación de NF- $\kappa$ B y la expresión de VCAM-1 al incrementar la expresión y translocación nuclear de I $\kappa$ B- $\alpha$ . Siendo este mecanismo, el más acertado para explicar por qué el pre tratamiento de FCN con BK, a pesar de aumentar los niveles de TLR4, no potencia la expresión de VCAM-1.

Finalmente, se observó un aumento de casi el doble de los niveles de pro-IL-1 $\beta$  en FCN al ser estimulados con LPS por 8 h, lo cual es consecuente con lo publicado por *Boza et al.*,<sup>16</sup> pero con BK no se observaron cambios significativos; y tampoco se observaron diferencias significativas con respecto a pre tratar una h con LPS o BK, y luego tratar 8 h con el estímulo contrario.

Nuevamente los resultados encontrados con BK son inesperados ya que se ha demostrado que BK induce la producción de IL-1 $\beta$  en células endoteliales, una clásica citoquina pro inflamatoria, la cual induce la expresión de una gran variedad de genes, cuyos productos están involucrados en las condiciones de inflamación aguda y crónica.<sup>46</sup>

*Pan et al.*,<sup>47</sup> determinaron que los fibroblastos WI-38 sin tratamiento, producen bajos niveles de IL-1 $\beta$ . La adición de BK (10 nM) resultó en una producción tiempo dependiente de IL-1 $\beta$ . Un notable aumento en la secreción de IL-1 $\beta$  fue detectado

1 h después de la estimulación con BK y continuó por a lo menos 8 h. El perfil temporal de secreción fue similar también a concentraciones de 100 nM. Este antecedente podría indicar que la producción de pro-IL-1 $\beta$  en fibroblastos por BK puede tener otro perfil temporal, el cual no tiene por qué coincidir con el perfil temporal de LPS, por lo tanto, no se puede descartar que BK tenga un efecto inductor de pro-IL-1 $\beta$ , más bien se propone a futuro, realizar una curva temporal con tiempo menores para determinar de mejor forma el tiempo de máxima expresión de la proteína.

## 7. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir:

- LPS aumenta los niveles proteicos de ICAM-1 y VCAM-1 en FCN
- BK no tiene un efecto significativo sobre los niveles proteicos de VCAM-1 en FCN
- DAKD no tiene efecto sobre los niveles proteicos de VCAM-1 en FCN
- BK es capaz de aumentar los niveles proteicos de TLR4 de forma significativa a las 72 h en FCN, igualando a los niveles proteicos de TLR4 presentes en MFCN
- BK posee un efecto anti fibrótico al disminuir los niveles de  $\alpha$ -SMA en MFCN, manteniendo así el fenotipo celular FCN
- El pre tratamiento con LPS no modula de ninguna forma el efecto de BK y DAKD sobre los niveles proteicos de VCAM-1 en FCN
- El pre tratamiento con BK durante 48 h modula de forma negativa el aumento en los niveles proteicos de VCAM-1 producido por LPS a diferentes concentraciones.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Departamento de Estadísticas e Información de Salud (DEIS) y MINSAL, Indicadores Básicos de Salud Chile 2013, 2013.
- [2] Ministerio de Salud (MINSAL), Gobierno de Chile, «Estrategia Nacional de Salud para el Cumplimiento de los Objetivos Sanitarios de la Década 2011-2020», 2011.
- [3] Medina E, Kaempffer A, “Enfermedades cardiovasculares en Chile. Aspectos epidemiológicos”. *Revista Chilena de Cardiología*, 2007, 26(2), 219-226.
- [4] Porter K. and Turner N. “Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling”. *Pharmacol Ther.* 2009. 123, 255-278.
- [5] Van den Borne, S. W. M. *et al.* “Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts”. *Nat Rev Cardiol.* 2010 Jan; 7(1):30-7.
- [6] Turner N. and Porter K. “Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction”. *Fibrogenesis & Tissue Repair.* 2013. 6:5.
- [7] Linthout S, Miteva K, Tscho C. “Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells”. *Cardiovascular Research.* 2014. 102, 258–269.
- [8] Cockerill M, et al., “Mechanosensitivity of the 2nd Kind: TGF- $\beta$  Mechanism of Cell Sensing the Substrate Stiffness”. *PLoS ONE.* 2015. 10(10): e0139959. doi:10.1371/journal.pone.0139959.
- [9] Frangogiannis N. “The immune system and cardiac repair”. *Pharm. Res.* 2008. 58: 88–111.
- [10] Catalán M., et al., “Differential regulation of collagen secretion by kinin receptors in cardiac fibroblast and myofibroblast”. *Toxicol and Appl Pharm.* 2012. 261, 300–308.

- [11] “The Toll-Like Receptor Family of Innate Immune Receptors”. Innate immunity chapter 3, pags 74-75. < <http://www.sinauer.com/media/wysiwyg/samples/nsp-immunity-3-10.pdf> > [Revisado el 06.08.2015]
- [12] Schaub, B., et al., “TLR2 and TLR4 stimulation differentially induce cytokine secretion in human neonatal, adult, and murine mononuclear cells”. J Interferon Cytokine Res. 2004. 24(9):543-52.
- [13] Sawa, Y., et al., “LPS-induced IL-6, IL-8, VCAM-1, and ICAM-1 Expression in Human Lymphatic Endothelium”. J Histochem Cytochem. 2008. 56(2):97–109.
- [14] Hosokawa Y., et al., “Cytokines differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human gingival fibroblasts”. Clin Exp Immunol. 2006. Jun; 144(3): p. 494–502.
- [15] Timmers L., et al., “Toll-Like Receptor 4 Mediates Maladaptive Left Ventricular Remodeling and Impairs Cardiac Function After Myocardial Infarction”. Circ. Res. 2008, 102: 257-264.
- [16] Boza P., et al., “Expression and function of toll-like receptor 4 and inflammasomes in cardiac fibroblasts and myofibroblasts: IL-1 $\beta$  synthesis, secretion, and degradation”. Molecular Immunology 74. 2016. 96–105.
- [17] Marceau F., et al., “The B1 receptors for kinins”. Pharmacol Rev. 1998. 50(3): p. 357-86.
- [18] Xu J., et al., “The kinin B1 receptor contributes to the cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in mice”. Exp Physiol, 2009. 94(3): p. 322-9.
- [19] Campbell DJ., “The kallikrein-kinin system in humans”. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2001. 28(12): p. 1060-5.
- [20] Maestri R., et al., “Cardiac hypertrophy and microvascular deficit in kinin B2 receptor knockout mice”. Hypertension. 2003. 41(5): p. 1151-5.

- [21] Leeb-Lundberg LM., et al., "International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences". *Pharmacol Rev.* 2005. 57(1): p. 27-77.
- [22] Gómez R., et al., "TLR4 signalling in osteoarthritis - finding targets for candidate DMOADs". *Nature Reviews Rheumatology* 11. 2015. p. 159–170.
- [23] Dinarello C., "Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family". *Annu. Rev. Immunol.* 2009. 27:519–50.
- [24] Riad A., et al., "The cardiovascular influence of interleukin-1 $\beta$  on the expression of bradykinin B1 and B2 receptors". *International Immunopharmacology.* 2008. 8, 222–230.
- [25] Turner M., et al., "Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease". *Biochimica et Biophysica Acta* 1843. 2014. 2563–2582.
- [26] Yang L., et al., "ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- $\alpha$ -activated vascular endothelium under flow". *Blood.* 2005 Jul 15; 106(2): 584–592.
- [27] Sainz I., et al., "Interactions between bradykinin (BK) and cell adhesion molecule (CAM) expression in peptidoglycan-polysaccharide (PG-PS)-induced arthritis". *FASEB J.* 2004. May;18(7):887-9.
- [28] Lim WS, et al., "Lauric acid abolishes interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )-induction of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human macrophages". *Asian Pacific Journal of Reproduction.* 2015. Article in press.
- [29] Göbel K., et al., "Blockade of the kinin receptor B1 protects from autoimmune CNS disease by reducing leukocyte trafficking". *Journal of Autoimmunity* 36. 2011. 106 – 114.
- [30] Akira S., "Toll-like Receptor signaling". *JBC.* 2003. 278: 38105–38108.

[31] Karikó K., et al., “Inhibition of Toll-like Receptor and cytokine signaling-A unifying theme in ischemic tolerance”. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2004. 24:1288–1304.

[32] Haddad, EB., et al., “Posttranscriptional regulation of bradykinin B1 and B2 receptor gene expression in human lung fibroblasts by tumor necrosis factor-alpha: modulation by dexamethasone”. *Mol Pharmacol*. 2000. 57(6): p. 1123-31.

[33] Moreau M.E., et al., “Role of nuclear factor- kappaB and protein kinase C signaling in the expression of the kinin B1 receptor in human vascular smooth muscle cells”. *Mol Pharmacol*. 2007. 71(3): p. 949-56.

[34] Kacimi R., et al., “Expression and Regulation of Adhesion Molecules in Cardiac Cells by Cytokines: Response to Acute Hypoxia”. *Circ Res* 82. 1998. p. 576-586.

[35] Rafiee L, et al., “Maprotiline inhibits LPS-induced expression of adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1) in human endothelial cells”. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2016. 11(2):138-144.

[36] Guevara-Lora I., et al., “Influence of Kinin Peptides on Monocyte–Endothelial Cell Adhesion”. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2014. 115. p. 1985–1995.

[37] Tsai Y-J, et al., “Involvement of B2 Receptor in Bradykinin-Induced Proliferation and Proinflammatory Effects in Human Nasal Mucosa-Derived Fibroblasts Isolated from Chronic Rhinosinusitis Patients”. *PLoS ONE*. 2015. 10(5):e0126853. doi:10.1371/journal.pone.0126853.

[38] Gutiérrez-Venegas G., et al., “Bradykinin promotes Toll like receptor-4 expression in human gingival fibroblasts”. *International Immunopharmacology*. 2012. 14. p. 538–545.

[39] Kim Y., et al., "Bradykinin-induced expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin in human mesenchymal stem cells". *Cellular Signalling*. 2008. 20 1882–1889.

[40] Cardenas A., et al., "Upregulation of the kinin B2 receptor pathway modulates the TGF- $\beta$ /Smad signaling cascade to reduce renal fibrosis induced by albumin". *Peptides* 73, November 2015. p. 7 - 19.

[41] Zhang S, et al., "Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation". *Mol Cell Biol* 2007. 27:4488-99.

[42] Tu L, et al., "Delivery of Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated Human Tissue Kallikrein for Therapy of Chronic Renal Failure in Rats". *Human gene therapy*. 2008. 19(4):318-330. doi:10.1089/hum.2007.138

[43] Tschope C, et al., "Regulation of the kinin receptors after induction of myocardial infarction: a mini-review". *Braz J Med Biol Res*. 2000. 33:701-8.

[44] Mantovani A, et al., "Cytokine regulation of endothelial cell function from molecular level to the bedside". *Immunol. Today*. 1997. 18 (5):231 - 40.

[45] Spiecker M., et al., "Inhibition of Endothelial Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression by Nitric". *J. Biol. Chem*. 1997. 272:30969-30974.

[46] Dinarello, C.A. "Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism". *Blood*. 1991. 77:1627–1652.

[47] Pan ZK, et al., "Bradykinin stimulates NF-kappaB activation and interleukin 1beta gene expression in cultured human fibroblasts". *Journal of Clinical Investigation*. 1996. 98(9):2042-2049.