



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA**

---

## **Interferon- $\gamma$ disminuye el reclutamiento de neutrófilos inducido por LPS sobre fibroblastos cardíacos**

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

**Renatto Claudio Anfossi Matus**

Director: Dr. Guillermo Antonio Díaz-Araya

Patrocinante: Dr. Guillermo Antonio Díaz-Araya

Santiago, Chile 2016

*A mis viejos*

## **AGRADECIMIENTOS**

Es una mañana fría la de este día, no dormí intentado terminar este escrito. Así que, a quien primero agradezco es a la estufa que me permite resistir el alba gélida.

He disfrutado y aprendido. Conocí el mundo abstracto de lo que está ahí, oculto, invisible, sin embargo, gritando su existencia. Y a veces no.

Agradezco a los eternos, liguanos y santiaguinos, Rorro y Daigo. Agradezco a los buenos compañeros de trabajo, Clodín, Felatio, Rulo, Diegorina, Raoul, Vivi, Pía, Bad Pancho, Nino, Nati, Parrita, Sami, Evelyn y Samir. Agradezco a los compañeros de la bankita, grandes valores JP y Muñoz. Agradezco al profe Willy por la confianza ciega que tuvo para conmigo, que aún no logro comprender. Agradezco al profe Hernán Vergara por su valentía y entrega al rescate de esta profesión, y por transmitir esos deseos. Agradezco a Carlos, señora Silvia, Óscar, los muchachos del bioterio, Bárbara, los bq de la centrífuga y varios más que estoy olvidando en este momento por jamás poner una traba, por la empatía, por las palabras, por la sonrisa eterna que nunca se borre. Mención honrosa a Sci-Hub por nunca negarme el conocimiento. Agradezco a los incondicionales amigos renquinos y quintanos por dejar mucho de ustedes en mí y contribuir al equilibrio. Agradezco a Robin, Romi, Belén, Francis y Maxi por el cariño, risas, música y desvelos. Agradezco a la agüela Gladis por ser un Guayacán, y jamás ser abatida. Agradezco a mis viejos mamá Mónica, papá Sergio por todo, simplemente. La base de lo que soy y seré son ellos, que hablarán, contemplarán, cuestionarán, sentirán a través de mí. Eso es lo que agradezco, lo que ya han dejado en mí. Sé que esto lo han deseado para mí y lo que significa para ustedes.

Agradezco a todos los aludidos porque, aunque usted no lo crea, contribuyeron de la forma que fuere a que este trabajo culminara en buenos términos. Gracias y chao.

# ÍNDICE

**Página**

ÍNDICE GENERAL .....	
..... I	
ÍNDICE DE FIGURAS .....	
..... III	
ABREVIATURAS .....	
..... IV	
RESUMEN .....	
..... VI	
SUMMARY .....	
..... VII	
1. INTRODUCCIÓN .....	
..... 1	
1.1 Corazón .....	
2	
1.1.1 Fibroblastos cardiacos .....	
2	
1.2 Toll-like receptor (TLRs) .....	
3	
1.3 Fases reparativas en el IC .....	
5	
1.4 Quimioquinas .....	
6	
1.4.1 Quimioquinas CXC .....	
7	
1.4.2 Interleuquinas-8 .....	
7	
1.5 Proteínas de adhesión células ICAM-1 y VCAM-1 .....	
8	
1.6 Interferón-beta .....	
9	
1.7 Neutrófilos .....	
11	
2. HIPÓTESIS .....	
..... 13	
3. OBJETIVO GENERAL .....	
..... 13	

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Reactivos.....	15
5.2 Obtención y cultivo de fibroblastos cardiacos .....	15
5.3 Pasaje celular.....	16
5.4 Western blot.....	17
5.5 Ensayo secreción de IL-8.....	18
5.6 Aislación de neutrófilos a partir de bazo y médula ósea de rata adulta.....	18
5.7 Cell sorting.....	20
5.8 Ensayo de adhesión de neutrófilos sobre FC.....	20
5.9 Expresión de resultados y análisis estadístico.....	21
6. RESULTADOS.....	22
6.1 Determinación de los niveles proteicos de IL-8 en FC.....	22
6.2 Determinación y cuantificación de la secreción de IL-8 por FC tras activación de TLR4.....	23
6.3 Efecto del IFN- sobre la secreción de IL-8 en FC.....	25
6.4 Efecto de IFN- sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por LPS en FC.....	26
6.5 Identificación y análisis de la población de neutrófilos aislados a partir de bazo y médula ósea de rata adulta.....	28
6.6 Aislación de neutrófilos a partir de médula ósea de rata adulta.....	36
6.7 Efecto del IFN- sobre la adhesión de neutrófilos sobre monocapa.....	

de FC  
38

7. DISCUSIÓN.....  
42

7.1. Expresión de Interleuquina-8 en FC estimulados con LPS.....  
42

7.2 Determinación y cuantificación de la secreción de IL-8 en FC  
estimulados con LPS vía la activación de TLR4.....  
44

7.3 Efecto de IFN- sobre la secreción de IL-8 en FC.....  
45

7.4 Efecto del IFN- sobre la expresión de ICAM-1/VCAM-1 en FC.....  
46

7.5 Efecto del IFN- sobre la adhesión de neutrófilos sobre los FC.....  
48

8. CONCLUSIONES.....  
51

9. REFERENCIAS.....  
52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Expresión niveles proteicos de IL-8 en fibroblastos cardíacos (FC)	22
.....	.....
Figura 2. Secreción IL-8 en FC	23
.....	.....
Figura 3. Secreción IL-8 vía TLR4 en FC	24
.....	.....
Figura 4. Efecto IFN- sobre secreción de IL-8 en FC	25
.....	.....
Figura 5. Efecto de IFN- sobre la expresión de niveles proteicos de ICAM-1/VCAM-1 en FC	27
.....	.....
Figura 6. Titulación anticuerpo anti RP-1 contra neutrófilos	29-30
.....	.....
Figura 7. Identificación población de neutrófilos de bazo en fracciones post centrifugación protocolo aislación	32-33
.....	.....
Figura 8. Identificación población neutrófilos aislados a partir de médula ósea (MO)	34
.....	.....
Figura 9. Población de neutrófilos aislada de bazo o MO	35
.....	.....
Figura 10. Separación población neutrófilos por cell sorting	37-38
.....	.....

Figura 11. Diagramas representativos de adhesión de neutrófilos sobre FC  
tratados con IFN-  $\gamma$  y/o LPS

40

Figura 12. Adhesión neutrófilos sobre FC tratados con IFN-  $\gamma$  y/o LPS

41

## Abreviaturas

-SMA	Alfa-actina de músculo liso
µL	Microlitro
µM	Micromolar
AP-1	Activator protein 1
CXC	Cisteína-aminoácido-cisteína
CC	Cisteína-cisteína
CX3C	Cisteínas-aminoácido <sub>3</sub> -cisteína
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium fórmula 12
ECV	Enfermedades cardiovasculares
ENA-78	Péptido activador de neutrófilos del endotelio
ELISA	Ensayo inmuno enzimático
ELR+	Ácido glutâmico-leucina-arginina-positivo
FBS	Suero fetal de bovino
FC	Fibroblastos cardíacos
FSC	Forward scatter (tamaño)
(GRO)-alpha	Growth-regulated oncogene
g	Gramos
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
h	Hora
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular
IFN-	Interferón beta
IFN-	Interferón gama
IL-8	Interleuquina 8
IL-6	Interleuquina 6
IRF3	Factor regulador del interferón 3
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolisacárido
mA	Miliamper
MEC	Matriz extracelular
MFC	Miofibroblastos cardíacos
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
MO	Médula ósea
mg	Milígramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar

MMP	Metaloproteasa
mV	Milivolt
N	Normal
NAP-2	Péptido activador de neutrófilos
NF- B	Factor nuclear B
nM	Nanomolar
nmoles	Nanomoles
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PE	Ficoeritrina
PBS	Tampón fosfato salino
PMN	Polimorfonuclear
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida desnaturante
SEM	Error estándar de la media
SSC	Side scatter (complejidad)
TGF-	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptor de tipo toll
TNF-	Factor de necrosis tumoral
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular
WB	Western blot
XC	Aminoácido-cisteína

## **Resumen**

En los últimos años se ha descrito y dado énfasis al rol determinante que tiene el fibroblasto cardíaco (FC) en el proceso inflamatorio, dónde cumple un rol clave a fin de mantener la homeostasis del órgano. En los procesos inflamatorios y en cualquier episodio de daño, los neutrófilos son la primera línea de defensa del organismo, los cuales son atraídos al sitio de daño por la quimioquina, interleuquina 8 (IL-8), quien además, provoca su activación. Posteriormente, el reclutamiento de neutrófilos en los sitios de daño es dependiente de las proteínas de adhesión E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1. Por lo tanto, controlar la expresión de estas proteínas constituye un nuevo enfoque terapéutico en el tratamiento de los procesos inflamatorios. En ese sentido, el interferón beta (IFN- $\beta$ ), ha demostrado moderar la respuesta inflamatoria; pero hasta la fecha no se ha demostrado su utilidad como agente antiinflamatorio en el corazón y específicamente en el FC. Debido a estos antecedentes, el objetivo general fue estudiar el efecto preventivo del IFN- $\beta$  sobre la expresión de IL-8, ICAM-1 y VCAM-1 bajo un contexto inflamatorio, inducido por estímulo con LPS. Consecuente con este hallazgo, se observó que el IFN- $\beta$  disminuye la adhesión de neutrófilos sobre FC inducida por LPS. De esta manera, se demostró que el tratamiento con IFN- $\beta$  puede modular la cascada inflamatoria, y así, transformarse en una potencial y valiosa herramienta terapéutica capaz de controlar la expresión de estas proteínas de vital importancia partícipes del proceso inflamatorio luego de algún evento de injuria cardíaca como lo puede ser una miocarditis, o bien, un infarto al miocardio

## **SUMMARY**

In recent years it is described the determining role that cardiac fibroblast (CF) has in the inflammatory process, where plays a major role to maintain homeostasis. In inflammatory process and any event of damage, neutrophils are the first line of defense, which are attracted to the site of damage through interleukin 8 (IL-8), who initially causes activation. Subsequently, neutrophil recruitment at sites of damage depends on E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 adhesion proteins. Therefore, controlling the expression of these proteins is a new therapeutic approach in the treatment of inflammatory process. In this sense, interferon beta (IFN- $\beta$ ) has shown be a inflammatory moderator; but to date it has not been proved useful as an anti-inflammatory agent in the heart, specifically on CF. On the basis of this background, the overall objective was to study the preventive effect of IFN- $\beta$  on the expression of IL-8, ICAM-1 and VCAM-1 on CF under an inflammatory stimuli with LPS and evaluate neutrophil adhesion to CF. The results showed that IFN- $\beta$  prevents the increased expression on IL-8, ICAM-1 and VCAM-1 induced by LPS. Consistent with this finding, we observed that IL-8, ICAM-1 and VCAM-1 decreases the neutrophil adhesion induced also by LPS on CF. Thus, it was shown that IL-8, ICAM-1 and VCAM-1 can modulate the inflammatory cascade, and thus become a potentially valuable therapeutic tool able to manage these important participants proteins of the inflammatory process after an event of cardiac injury as can be a myocarditis, or myocardial infarction.

## **1. Introducción**

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) se deben a alteraciones funcionales del corazón y/o los vasos sanguíneos, entre ellos cardiopatías coronarias (infarto al miocardio), enfermedades cerebrovasculares, aumento de la tensión arterial (hipertensión), vasculopatías periféricas, cardiopatías reumáticas, congénitas, siendo la insuficiencia cardiaca el estado final de muchas de estas patologías. Dentro de las principales causas las ECV se encuentra el consumo de tabaco, la falta de actividad física y una alimentación poco saludable [1].

Las ECV son la principal causa de defunción en todo el mundo. Cada año mueren más personas por alguna de estas enfermedades que por cualquier otra causa. Se calcula que en el año 2008 murieron 17,3 millones de personas por ECV, lo cual representa el 30% de las defunciones registradas en el mundo. De esas defunciones, aproximadamente 7,3 millones se debieron a infarto al miocardio y 6,2 millones a accidentes cerebrovasculares [1]. Estas patologías afectan en mayor medida a los países de ingresos bajos y medios: más del 80% de las defunciones por esta causa se producen en esos países, y afectan casi por igual a hombres y mujeres.

De aquí al año 2030, casi 23,6 millones de personas morirán por alguna ECV, principalmente por cardiopatías y accidentes cerebrovasculares. Por lo tanto, se prevé que estas enfermedades y entre ellas el infarto al miocardio sigan siendo la principal causa de muerte en los próximos decenios [2]. De esta manera, se enfatiza la importancia en la prevención de accidentes cardiovasculares y, aún más, la importancia y complejidad del órgano en cuestión, el corazón.

## **1.1 Corazón**

El corazón, desde el punto de vista funcional, es un órgano muscular cuya función es bombear sangre hacia todo el cuerpo. Es el centro del sistema circulatorio, que consiste en una red de vasos sanguíneos, tales como arterias, venas y capilares. Estos vasos transportan sangre desde y hacia todas las áreas del cuerpo, y en ella oxígeno y nutrientes. Un sistema eléctrico controla al corazón para contraer las paredes cardíacas. Al contraerse estas paredes, la sangre es bombeada hacia el sistema circulatorio.

Desde el punto de vista celular, los principales constituyentes celulares del corazón incluyen a los cardiomiocitos, fibroblastos cardíacos (FC), células vasculares del músculo liso, y células endoteliales; siendo los fibroblastos y cardiomiocitos los tipos celulares que más abundan en el tejido cardíaco, un 70% y 30%, respectivamente. Estos tipos celulares mantienen la naturaleza eléctrica, química y biomecánica del órgano [3].

### **1.1.1 Fibroblastos Cardíacos**

Los FC son células mesenquimales, caracterizadas por una morfología “spindle-shaped” (forma de huso), plana y núcleo oval con un extensivo retículo endoplásmico, distribuidas de forma abundante en tejidos conectivos de la mayoría de los órganos del cuerpo. Tradicionalmente son vistos como células productoras y remodeladoras de matriz extracelular (MEC), activadas luego de una lesión y participantes de la formación de su respectiva cicatriz. Los FC tienen una diversidad de funciones y exhiben una remarcable plasticidad al someterse a alteraciones fenotípicas dinámicas en respuesta a cambios en su

microambiente. Un ejemplo de esto es su capacidad de diferenciarse a un fenotipo más activo, denominado miofibroblasto cardíaco (MFC), que secreta y remodela de forma más eficiente la MEC y es la célula responsable de llevar a cabo el proceso de cicatrización [4]. Además, los FC expresan una amplia variedad de receptores y a través de ellos tienen la capacidad de responder a citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, liberando también una serie de citoquinas y factores de crecimiento los cuales impactarán directamente en las células que los rodean, manteniendo la homeostasis de células adyacentes y orquestar el “infiltrado inflamatorio”, lo que demuestra su importancia en el desarrollo, diferenciación, remodelado y reparación de tejidos. Así, el rol de los fibroblastos puede ir más allá de su contribución en la formación de cicatriz y remodelado de matriz [5]. Entre estos receptores destacan los Toll like receptors (TLR), a través de los cuales los FC han mostrado participar de la respuesta inflamatoria.

#### **1.2 Toll-like receptor 4**

Los Toll Like Receptor (TLR) y específicamente el TLR4 fueron inicialmente caracterizados por su interacción con ligandos bacterianos y su participación en activación celular asociada con infección y sepsis [6]. Los TLR son proteínas transmembrana, los cuales son los principales receptores de reconocimiento de patrones que transducen señales en respuesta a diversos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Como tal, los TLRs tienen un rol central en la iniciación de la respuesta del sistema inmune innato contra patógenos y su expresión es rápidamente alterada en respuesta a

patógenos, citoquinas y factores de estrés ambiental. Su activación vía PAMPs genera la aparición de respuestas del sistema inmune innato y adaptativo, a través de la expresión de citoquinas, interferones, quimioquinas, moléculas de la superficie celular y receptores de quimioquinas. Los TLR se expresan en varias células del sistema inmune, tales como macrófagos, células dendríticas, células B, neutrófilos, y en células microgliales, así como también, en células que no pertenecen al sistema inmune, tales como, células epiteliales, miocitos, neuronas y fibroblastos.

El TLR4 es uno de los más de diez tipos de receptores del tipo Toll, y originalmente fue descrito solo como reconocedor de PAMPs derivados de bacterias y otros microorganismos. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que TLR4 puede reconocer ligandos no microbianos, como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y otros productos del tejido inflamado.

Se ha demostrado la presencia de TLR4 en fibroblastos de distintos tejidos y cardiomiocitos. Específicamente en fibroblastos cardiacos (Boza et al. 2016). TLR4 inicia su señalización por medio de vías intracelulares que conducen a la activación de factores de transcripción, tales como el factor nuclear kB (NF-kB), y el factor 3 regulador del interferón (IRF3), que conlleva a la transcripción de genes, incluyendo citoquinas proinflamatorias y otras moléculas inmunoregulatoras como el interferón-beta [6-8].

### **1.3 Fases reparativas en el infarto cardiaco**

La respuesta reparativa que secunda al infarto al miocardio resulta en la formación de una cicatriz y se divide en 3 fases superpuestas:

a) *Fase inflamatoria*. Durante la fase inflamatoria ocurre la inducción de quimioquinas, citoquinas, y moléculas de adhesión que se traducen en el reclutamiento de leucocitos hacia el área infartada. Los neutrófilos y los macrófagos “limpian” el área infartada de células muertas restos o fragmentos de la MEC. A medida que los neutrófilos van ejerciendo sus funciones van entrando en apoptosis, posteriormente los macrófagos liberan factores de crecimiento y entre ellos el (TGF-beta), que conduce a la supresión de la inflamación y a la formación de tejido de granulación. A esta altura la síntesis de quimioquinas es suprimida, mientras que los fibroblastos y células endoteliales proliferan.

b) *Fase proliferativa*. Durante esta fase de la cicatrización, los fibroblastos activados, también llamados miofibroblastos, depositan proteínas de la MEC, mientras que las células endoteliales angiogénicas forman una extensa red microvascular.

c) *Fase de maduración*. En esta fase los fibroblastos sufren apoptosis, mientras que la neovasculatura del infarto madura, y se forma una cicatriz a base de colágeno. La respuesta reparativa en el corazón infartado está estrechamente entrelazada con remodelado ventricular adverso, proceso complejo asociado con la dilatación de la cámara, hipertrofia cardíaca, y alteraciones geométricas del ventrículo, lo que resulta en un aumento en la esfericidad y una acentuada disfunción sistólica y diastólica. El remodelado post-infarto implica tanto la zona al corazón infartado como la zona remota o no infartada, y da lugar a un aumento

de la fibrosis intersticial en el área peri-infartada. Sin embargo, un rol aún no descrito en el proceso de reparación tisular mediado por los FC es la participación de las quimioquinas [3, 5].

#### **1.4 Quimioquinas**

Las Quimioquinas [9] constituyen una superfamilia de proteínas de bajo peso molecular, que varían entre los 8-15 kDa y que comparten similitudes estructurales [10]. Están divididas en 4 familias (CC, CXC, XC O CX3C) basado en el número de aminoácidos entre sus residuos de cisteína aminoterminales. Las quimioquinas CXC, están divididas en dos grupos (ELR+ y ELR-) conforme a la presencia del tripéptido Glu-Leu-Arg (ELR motif) en la región aminoterminal.

Las quimioquinas tienen una importante participación en la locomoción y tráfico de leucocitos [11, 12] y su blanco principal son las células hematopoyéticas. Los niveles de quimioquinas inflamatorias aumentan en el tejido dañado, y con el fin de inducir su respuesta quimiotáctica in vivo, deben ser inmovilizados en la superficie celular o de la MEC a través de interacciones con glicosaminoglicanos [13]. En las células endoteliales las interacciones entre las quimioquinas unidas a la superficie de células endoteliales activadas y sus receptores expresados en leucocitos juegan un rol esencial en la extravasación de éstas células en las áreas inflamadas. Además de los efectos en el traslado (locomoción) celular, las quimioquinas son capaces de provocar una variedad de otras respuestas que afectan la activación y degranulación, mitogénesis, y apoptosis de leucocitos. Es más, ciertas quimioquinas parecen ejercer un amplio rango de efectos en otros tipos celulares, más allá del sistema inmune, que

incluyen células endoteliales, células del músculo liso, fibroblastos, neuronas, células epiteliales y cardiomiocitos.

Las vías mediadas por quimioquinas son, en primera instancia, activadas durante la fase inflamatoria de la cicatrización del infarto. La muerte del cardiomiocito da lugar a la activación de una serie de vías pro-inflamatorias que inducen la expresión de quimioquinas en el corazón infartado. Entre ellas la generación localizada de C5a (sistema complemento), formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y activación de vías mediadas por los TLR, inducen la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB) y aumenta la síntesis de quimioquinas producidas por las células endoteliales en el miocardio infartado [14].

#### **1.4.1 Quimioquinas CXC**

Las quimioquinas CXC ELR+, como la IL-8, péptido activador de neutrófilos del epitelio (ENA)-78, growth-regulated oncogene (GRO)-alpha, -beta, -gamma, y el péptido activador de neutrófilos (NAP)-2, inducen tanto la quimiotaxis de neutrófilos y su activación [10, 15].

#### **1.4.2 Interleuquina-8**

La interleuquina-8 (IL-8), es un polipéptido miembro de la familia de quimioquinas CXC de citoquinas y es uno de los mayores mediadores de inflamación, que contribuye a la (quimio) atracción de neutrófilos hacia los sitios de lesiones tisulares durante procesos inflamatorios [16]. La estimulación de los neutrófilos conlleva a cambios en su forma, a la exocitosis de proteínas de

almacenamiento y a la migración [17]. La IL-8 también ha exhibido propiedades quimiotácticas en linfocitos T [18], basófilos y también, promueve el reclutamiento de “stem cells” tisulares hacia el sitio de lesión [19].

Además de su propiedad como quimioattractante, la IL-8 induce a los neutrófilos a liberar enzimas lisosomales y a adherirse a células endoteliales no estimuladas por la estimulación de proteínas de anclaje en su superficie, como lo son las integrinas. Se ha descrito su rol quimioattractante de neutrófilos sobre fibroblastos de tejido dérmico [20] tejido gingival [21], en tejido uroepitelial inducido por *E. coli* [22], y en vías aéreas de pacientes con asma [23], entre otros. La producción de IL-8 ha sido observada *in vitro* en una gran variedad de células, que incluye monocitos, linfocitos T, neutrófilos, células endoteliales vasculares, fibroblastos de tejido dérmico, keratinocitos, hepatocitos, y células humanas de cáncer gástrico. Esta producción ocurre bajo estímulos inflamatorios, tales como LPS, IL-1, y factor de necrosis tumoral (TNF).

### **1.5 Proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1**

Las moléculas de adhesión celular (CAM) son proteínas de superficie involucradas en modular la comunicación intercelular entre una gran variedad de tipos celulares. Se han identificado y caracterizado varias familias de receptores de moléculas de adhesión; entre estos se incluyen las integrinas, cadherinas, selectinas, proteoglicanos asociados a membrana y los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas. La molécula de adhesión celular vascular, VCAM-1 (o CD106), y la molécula de adhesión intercelular, ICAM-1 (o CD54), son dos miembros de la superfamilia de genes de inmunoglobulinas que son

fundamentales en el reclutamiento e infiltración de células inflamatorias a los sitios de injuria o lesión. VCAM-1 une monocitos y linfocitos circulantes que expresan las integrinas  $\alpha_4\beta_1$  y  $\alpha_4\beta_7$  [24-26], mientras ICAM-1 es el contrarreceptor para una variada cantidad de integrinas del tipo  $\beta_2$  (eg, antígeno asociado a la función de linfocitos {CD11a/CD18} y Mac-1 {CD11b/CD18}). La interacción de ICAM-1 con las integrinas de los leucocitos también juega un rol importante en el tráfico de leucocitos y en la iniciación de respuestas inmunes antígenoespecíficas [27-28]. Un aumento en la expresión de CAM es temporalmente asociado con secuestro de leucocitos y su posterior infiltración dentro del tejido del miocardio. En el proceso inflamatorio cardíaco, células residentes (eg, células endoteliales, miocitos, fibroblastos y células del músculo liso) y leucocitos infiltrados liberan citoquinas capaces de activar genes CAM a nivel transcripcional y, como consecuencia, promover la secuestro y transmigración de leucocitos. La importancia en la expresión de ICAM en la adherencia de neutrófilos y la subsecuente lesión cardíaca ha sido demostrada en diversos trabajos [29-31].

### **1.6 Interferón-beta**

Los interferones (IFNs) son citoquinas y cumplen un rol vital en la comunicación entre células, en la protección contra infecciones virales; sin embargo, ahora se conoce que provocan una amplia gama de respuestas biológicas, a menudo de una manera específica del tipo celular [32]. Los interferones de tipo I, el grupo al que pertenece el interferón-beta (IFN- $\beta$ ), comparten una serie de características que los diferencia de los interferones del tipo II (eg, IFN-gamma),

que son los más estudiados [33]. En particular, IFN- $\beta$  puede ser producido por una gran variedad de células entre las que destacan los fibroblastos y cardiomiocitos [34]. En contraste, el IFN-gamma, representante de los interferones de clase II, es una citoquina exclusivamente linfocítica [32]. De manera natural, el IFN- $\beta$  es secretado por los fibroblastos y se une a su receptor, que consiste en dos componentes (IFNAR1 e IFNAR2), y activa la vía de señalización intracelular Janus kinase (JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) para que fosforile a las proteínas STAT1 y STAT2. Estas dimerizan y se asocian con el factor de regulación de interferón 3 (IRF3) y luego se unen a los elementos de respuestas mediados por IFN en el núcleo celular [35-37]. Y esto a su vez, activa genes estimulados por IFN, que conduce a la producción de productos antitumorales, antivirales y antiproliferativos.

Trabajos previos han demostrado que los interferones del tipo I tienen un amplio rango de efectos sobre el sistema inmune, los que pueden ser asociados a cambios en vías inmunomoduladas específicas que podrían estar implicadas en procesos inflamatorios a nivel cardíaco. A través de distintos mecanismos, IFN- $\beta$  afecta la presentación de antígenos. Se ha documentado la modulación de Th1/Th2/th17 a un estado más anti-inflamatorio, aumenta la actividad regulatoria en células T y B, y reduce la habilidad de las células B para presentar antígeno. Por otro lado, también interfiere en la migración de células T inhibiendo la secreción de IL-2 y a consecuencia de esto, la disminución de la secreción de MMP-2 y MMP-9 dependientes de IL-2 por parte de las células T al ser pre-tratadas con IFN-beta, lo

que lo convierte en un agente importante al momento de mediar procesos inflamatorios [38].

Si bien es cierto, la actividad de los IFNs es bien conocida en células del sistema inmune; se conoce poco respecto de la actividad y efectos mediados por los IFNs en células no propias del sistema inmune, como los fibroblastos; a los cuales estos últimos años se les ha atribuido una participación determinante en la respuesta inflamatoria, siendo activos ya sea en la liberación de componentes propios del sistema inmune o como células capaces de condicionar la respuesta inflamatoria propia de las células del sistema inmune [39]. Y menos aún, el efecto del IFN- en el proceso de adhesión de células del sistema inmune sobre FC.

### **1.7 Neutrófilos**

Los neutrófilos son células altamente fagocíticas que constituyen la primera línea de defensa del sistema inmune innato [40]. Son reclutados rápidamente a los sitios de inflamación, donde su rol primordial es eliminar patógenos a través de fagocitosis por medio de la liberación de enzimas y proteínas granulares, y por la producción de una gama de especies reactivas de oxígeno (ROS). También cumplen una acción de "amplificadores" de la respuesta inmune al generar un aumento en el reclutamiento de leucocitos. Tienen una vida media muy corta, se estima que esta en circulación es de 6-8 hrs. La regulación estricta de estas células es vital porque tienen una considerable capacidad histotóxica y están ampliamente implicadas en la lesión tisular [41-42].

En resumen, tal como fue mencionado, los FC fueron, por mucho tiempo, considerados como responsables, únicamente, de la producción de componentes de la MEC; sin embargo, esta presunción ha cambiado con las evidencias recientes en que ha demostrado que los FC también participan en la respuesta inmune. La evidencia muestra que, bajo la estimulación con LPS; TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , y otras citoquinas son fuertemente expresadas por los FC. Además, los FC expresan una serie de quimioquinas, entre las que se encuentra la IL-8, y esta última, debido a su efecto activante y quimioattractante, es capaz de reclutar neutrófilos. La secreción de IL-8 ocurre por la vía del receptor TLR4, resultando en la activación de vías de transducción de señales dependientes de MyD88 [43]. Se han reportado trabajos de esta índole en fibroblastos de tejido dérmico humano [20, 44], fibroblastos de tejido pulmonar humano [45]. Sin embargo, a la fecha no hay evidencia de trabajos en los que se haya demostrado la liberación de IL-8 por FC, y menos aún, que esta proteína es la responsable de reclutar neutrófilos y gatillar la consecuente adhesión de estos a los FC. La vía de reclutamiento de neutrófilos es un camino de vital importancia en el proceso inflamatorio debido, como se mencionó anteriormente, a que este tipo celular es el primero en llegar al sitio de injuria y la respuesta de estos gatilla una exacerbación de la inflamación. Es por eso que creemos que el reclutamiento de neutrófilos y su posterior adhesión a FC, mediada por las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, puede ser un blanco importante para censar la cascada inflamatoria. Este proceso supone favorecer un cambio ya sea en el fenotipo de los fibroblastos o en la actividad de los neutrófilos.

De esta manera, se propone un nuevo blanco terapéutico para en el proceso inflamatorio cardíaco. Con el fin de incursionar en este tópico farmacológico el IFN- $\beta$  es el elegido en este trabajo debido a las propiedades anti-inflamatorias mencionadas anteriormente descritas en la literatura, principalmente, como mediador de la respuesta inmune, proceso de vital importancia en la cascada de inflamación.

Con estos antecedentes se planteó la siguiente hipótesis:

## **2. Hipótesis:**

El Interferón- $\beta$  disminuye la secreción de IL-8 y la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 inducidos por LPS, lo que lleva a un menor reclutamiento de neutrófilos sobre fibroblastos cardíacos.

## **3. Objetivo General:**

Demostrar que el interferón beta disminuye el reclutamiento de neutrófilos sobre los fibroblastos cardíacos, a través de la disminución de la expresión de IL-8, ICAM-1 y VCAM-1.

#### **4. Objetivos específicos**

4.1 Objetivo específico 1: Demostrar que el tratamiento con IFN- $\beta$  previene la secreción de IL-8 en fibroblastos cardíacos estimulados con LPS a través TLR4.

4.2 Objetivo específico 2: Demostrar que el tratamiento con IFN- $\beta$  previene la expresión de las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en FC estimulados con LPS.

4.3 Objetivo específico 3: Aislar y purificar neutrófilos desde bazo, y médula ósea de ratas.

4.4 Objetivo específico 4: Demostrar que el tratamiento con IFN- $\beta$  previene el reclutamiento de neutrófilos sobre FC estimulado con LPS.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Reactivos**

Anti-GAPDH; anti-rabbit fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Medio de cultivo DMEM/F12; suero fetal bovino (FBS); tripsina-EDTA fueron adquiridos de Gibco BRL (Carlsbad, USA). Anti-IL-8 fue adquirido de ABCAM (Cambridge, USA). Anti-ICAM1; anti-VCAM1 fueron adquiridos de SantaCruz Biotechnology (Dallas, USA). Anti-RP-1 fue obtenido de BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Histopaque-1083; histopaque-1119 fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). LPS; TAK-242; Colagenasa tipo II fueron adquiridos de Invivogen (San Diego, USA). Material de plástico estéril para la obtención y cultivos celulares fue adquirido de Falcon (Ballerica, Ca, USA). Xilazina 2% adquirido de Laboratorios Centrovét (Santiago, Chile). Ketamina 100 mg/ml fue adquirida de Richmond Vet Pharma (Bs. As., Argentina). Interferón-beta (IFN- $\beta$ ) fue adquirido de InterferonSource (NJ, USA).

### **5.2 Obtención y cultivo de Fibroblastos Cardíacos**

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley adultas (200-300g) de 8 semanas de edad para obtención de cultivo de FC. Los animales fueron adquiridos desde el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, en cumplimiento de las normas éticas referidas a la utilización de animales, contando, con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Para la aislación de FC, se utilizó el procedimiento

descrito por Claycomb y Palazzo, con algunas modificaciones. Se anestesió una rata adulta con una mezcla de ketamina-xilazina (66 y 1.6 mg/kg respectivamente) vía intraperitoneal. La tapa torácica se removió por toracotomía bilateral y se escindió el corazón, separando a continuación las aurículas de los ventrículos. Estos últimos se disgregaron mecánicamente en pequeños trozos, añadiendo luego 30 mL de una solución de colagenasa tipo II (1mg/mL), y se dispuso para agitación digestiva a 37°C durante una hora y media. El producto de la digestión se centrifugó a 500 rpm por 2 min a temperatura ambiente. El pellet resultante de esta primera centrifugación, rica en cardiomiocitos, se descartó y el sobrenadante, enriquecido en FC, se sometió a una segunda centrifugación a 1000 rpm por 10 min a la misma temperatura. El pellet obtenido se resuspendió en 4 ml de medio DMEM-F12 suplementado con 10% FBS. Finalmente, se sembraron los FC en placas de cultivo de 100 mm y se incubaron en un ambiente al 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de oxígeno a 37°C. Al cabo de 24 h, se cambió el medio de cultivo para remover debris celulares, eritrocitos, células muertas y/o no adheridas. Los FC se incubaron nuevamente bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas hasta un 90% - 100% de confluencia. Luego se expandieron hasta pasaje 1, previo lavado de los cultivos y tratamiento con tripsina-EDTA.

### **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 0,1% 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 35 mm a una concentración de 150.000 cél/cm<sup>3</sup> para la determinación de las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, o en placas de 60 mm a una concentración de 300.000 cél/cm<sup>3</sup> para la determinación de la proteína IL-8, en medio DMEM/F-12 suplementado con FBS 10% (pasaje 1). Las células, una vez adheridas a la placa, fueron lavadas con PBS 1X estéril y mantenidas en medio DMEM/F-12 hasta la realización del experimento.

#### **5.4 Western blot (WB)**

Los extractos proteicos obtenidos luego de la lisis celular de FC fueron cuantificados empleando el método de Bradford y, posteriormente, fueron sometidos a electroforesis en geles de acrilamida/bisacrilamida al 8%-10% (ICAM-1, VCAM-1) o 16%-18% (IL-8) 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 mAmper) durante 90 minutos, en tampón de transferencia. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en TBS-Tween. Finalmente, las membranas de nitrocelulosa se incubaron con anticuerpos primarios anti ICAM1 (1:200), anti VCAM1 (1:200) y anti -GAPDH (1:10.000); las membranas de PVDF se incubaron con los anticuerpos: anti IL-8 (1:100) y anti -GAPDH (1:10.000), ambas, durante toda la noche, a 4°C con agitación suave. Transcurrido

el tiempo fueron lavadas con TBS-Tween e incubadas con anticuerpo secundario anti rabbit (1:5.000). Para la detección de la actividad enzimática, se utilizó un método químico luminiscente de ECL.

## **5.5 Ensayo secreción de IL-8**

Los niveles de secreción de IL-8 se midieron mediante el uso de un Kit comercial de ELISA (ELISA Kit IL-8, MyBioSource, San Diego, CA, USA).

## **5.6 Aislación de neutrófilos a partir de bazo y médula ósea de rata**

### *5.6.1 Aislación PMN a partir de bazo*

La rata se anestesió con una mezcla de ketamina-xilazina (66 y 1.6 mg/kg respectivamente) vía intraperitoneal. La tapa torácica se removió por toracotomía bilateral, se escindió el corazón y enseguida el bazo. Posteriormente, se procedió a la trituración del bazo mediante el uso de un Tamiz de Disociación Celular, tamaño de poro 380  $\mu$ m (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) en solución de PBS 1X estéril a temperatura ambiente suplementado con 1mL citrato de sodio 4% hasta formar una suspensión.

A continuación, se procede a separar PMN de linfocitos, monocitos y eritrocitos a través de la técnica de centrifugación por gradiente de densidad, mediante la utilización de gradiente Ficoll-Histopaque 1083 y 1119 (Sigma-Aldrich, USA). De modo resumido, la suspensión proveniente del bazo o médula ósea es depositada sobre la solución Ficoll-Histopaque 1083/1119 y luego es centrifugada a 400g

durante 30 minutos en una centrífuga de cubeta oscilante (Hettich, Alemania). Al acabar la centrifugación se recolecta la fracción intermedia localizada entre el histopaque 1083 y 1119, que corresponde a las células polimorfonucleares, PMN (neutrófilos, basófilos, eosinófilos).

#### 5.6.2 Aislación PMN a partir de médula ósea

La rata se anestesió con una mezcla de ketamina-xilazina (66 y 1.6 mg/kg respectivamente) vía intraperitoneal. La tapa torácica se removió por toracotomía bilateral y se escindió el corazón. Posteriormente, se procedió a la extracción del fémur y tibia de ambas extremidades y a la remoción de tejidos aledaños a estos. Una vez concluido esto, se procede a la escisión de la epífisis de ambos tipos óseos. Enseguida, se remueve la médula ósea por medio de influjo de medio DMEM/F12 por medio de una jeringa de ancho 25G sobre una placa Petri de 100mm. A continuación, la suspensión de células rica en leucocitos y eritrocitos es trasladada a tubos eppendorf de 1,5 ml y es centrifugada a 300g por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se procede a lisar los eritrocitos presentes en la suspensión con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,83% por 7 minutos. Posteriormente, se lava dos veces con medio MACS y se somete a incubación con anticuerpo anti-RP-1 a la razón de 0,5 $\mu\text{l}$  de anti-RP-1 por  $10^6$  cél en 100 $\mu\text{l}$  de volumen por 30 minutos, evitando la luz. Enseguida, se lava dos veces la suspensión de leucocitos con medio MACS y se procede al análisis mediante Cell Sorting (Beckson-Dickinson FACS flow and sorting cytometer).

## **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-RP-1 específico para neutrófilos. La pureza de los PMN fue de un 98% y viabilidad 95%. 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 Ensayo de adhesión de neutrófilos sobre FC**

Leucocitos obtenidos de médula ósea de rata fueron resuspendidos en medio DMEM/F12 a razón de  $1 \times 10^6$  cél/100 $\mu$ l y se agregaron a placas de 35mm sobre una monocapa confluyente de FC ( $20 \times 10^4$ ) previamente tratados en presencia o ausencia de LPS e IFN- $\gamma$ . Tras un período de incubación de 2 horas a 37°C, las placas con células se lavaron con medio libre de suero y los FC con leucocitos adheridos se despegaron de la placa utilizando tripsina 0,1% en PBS 1X estéril. Luego, la suspensión de FC y leucocitos se lavó con medio MACS a 300g por 5 min a temperatura ambiente y se incubó con anticuerpo anti-RP-1 a la razón de 0,5 $\mu$ l de anti-RP-1 por  $10^6$  cél en 100 $\mu$ l de volumen total por 30 minutos, evitando la luz. Enseguida, se lavó dos veces la suspensión de FC+leucocitos con medio MACS y se procedió al análisis mediante la técnica de citometría de flujo (Beckson-Dickinson FACS flow and sorting cytometer). El porcentaje de adhesión de neutrófilos se calculó de la siguiente manera;  $100 \times (\text{n}^\circ \text{ de células RP-1}^+ \text{ adheridas} / \text{n}^\circ \text{ total de células RP-1}^+ \text{ agregadas})$ .

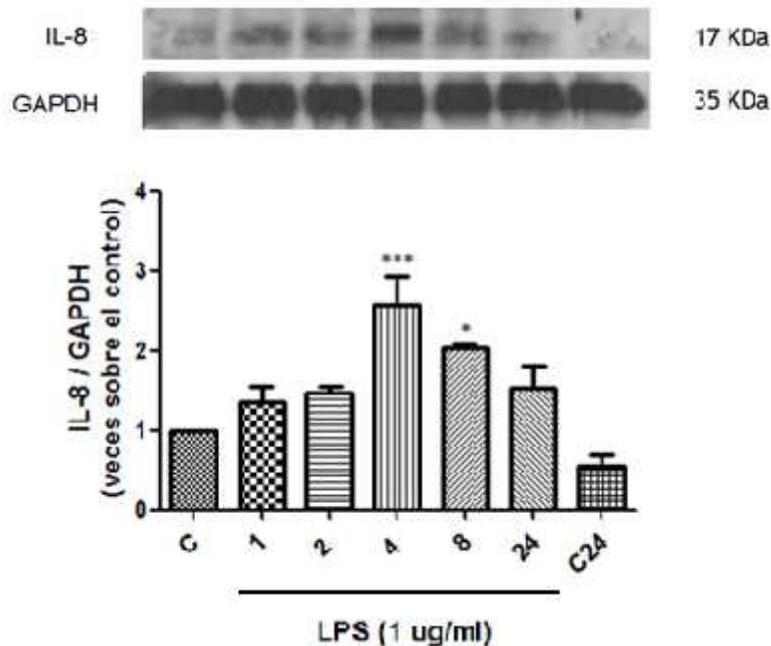
## **5.9 Expresión de resultados y análisis estadístico**

Los resultados mostrados se obtuvieron mediante el promedio  $\pm$  SEM de, al menos, tres experimentos independientes (n 3). Los datos obtenidos fueron analizados por ANOVA y prueba Tuckey, lo que permitió determinar la significancia estadística de los resultados, considerándose significativa la diferencia entre dos grupos cuando su valor de p fue menor a 0.05.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Determinación de los niveles proteicos de IL-8 en el fibroblasto cardiaco.

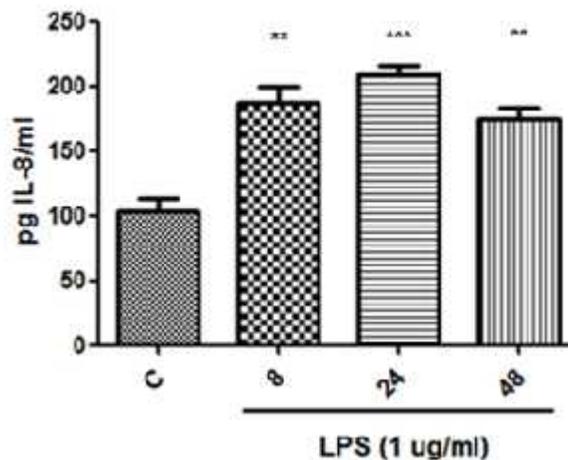
Para dar cuenta de nuestro objetivo 1 estudiamos en primer lugar el contenido intracelular de IL-8. Como se muestra en la figura 1, los FC expresan la IL-8, y tras el estímulo con con LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) se produjo un aumento en los niveles proteicos de IL-8. Este aumento fue estadísticamente significativo a las 4 horas de incubación con LPS. Posterior a este tiempo de estímulo se puede apreciar un decaimiento en los niveles proteicos de IL-8 hasta las 24 horas de incubación con LPS, alcanzando los niveles del control (sin estímulo).



**Fig. 1 Expresión niveles proteicos de IL-8 en fibroblastos cardíacos (FC).** Se estimularon FC con LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) por períodos de 1; 2; 4; 8 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=3). Se muestra una imagen representativa del experimento en el panel superior y la cuantificación de este en el panel inferior.

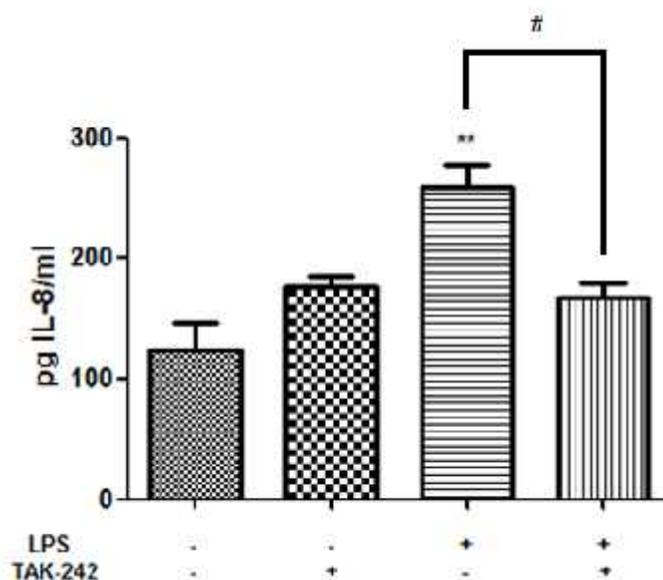
## 6.2 Determinación y cuantificación de la secreción de IL-8 por FC tras la activación de TLR4.

Esta disminución de IL-8 a partir de las 4 horas de estímulo sugiere que se ello se podría deber a su secreción o degradación, y para dilucidar esta interrogante se evaluó la secreción de IL-8 hacia el medio extracelular o medio de cultivo. En la figura 2 se muestra el perfil de liberación de IL-8 en los FC al ser estimulados por 8, 24 o 48 con LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), donde se aprecia un aumento en la secreción de IL-8 hasta las 24 horas de estímulo, obteniendo resultados estadísticamente significativos respecto del control. Posteriormente, se observa un decaimiento en los niveles de IL-8 en el medio extracelular hasta las 48 horas de estímulo con LPS. Este resultado se condice con los niveles de expresión (intracelular) de IL-8 observados en el experimento anterior. Infiriendo, de esta manera, que la IL-8 tiene un período de síntesis y un posterior período de secreción.



**Fig. 2 Secreción IL-8 en fibroblastos cardiacos (FC).** Se estimuló FC con LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a tiempos de 8; 24 o 48 horas. Los niveles de IL-8 secretados se cuantificaron por kit de ELISA. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$  vs control. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. (n=3)

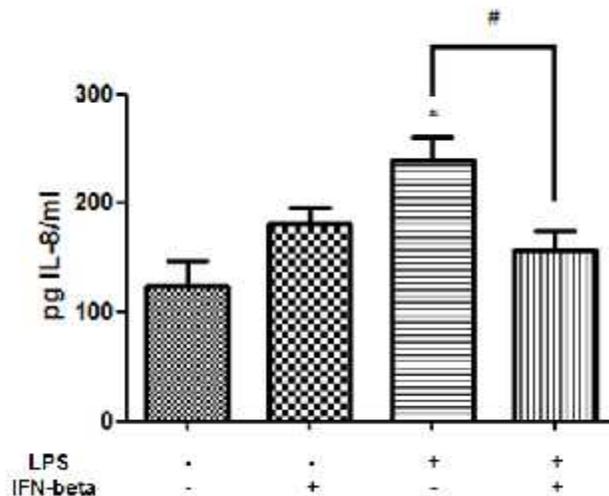
Luego se procedió a determinar si la secreción de IL-8 estimulada por LPS es dependiente de la activación de TLR4. Para tal fin, se pre-estimularon los FC con el inhibidor de TLR4, TAK-242 (4uM) por 30 minutos, y posteriormente se estimuló con LPS (1 µg/ml) por 24 horas y se procedió a cuantificar la secreción de IL-8. La figura 3 muestra que la secreción de IL-8 desde los FC es dependiente de TLR4, puesto que al preestimar con el TAK-242, se aprecia que los niveles secretados de IL-8 por FC estimulado con LPS disminuyen a niveles cercanos al control. Este hecho sugiere que la secreción de esta quimioquina depende de la activación de este receptor.



**Fig. 3 Secreción IL-8 vía TLR4 en fibroblastos cardiacos (FC).** FC fueron preestimulados con el inhibidor de TLR4, TAK-242 (4uM) y estimulados, posteriormente, con LPS (1 µg/ml) por 24 horas. Se determinó la secreción de IL-8 por kit de ELISA. \*\*p<0,01 vs control; #p<0,05. Los resultados se expresan como promedio ± SEM. (n=3)

### 6.3 Efecto del interferón-beta sobre la secreción de IL-8 en el FC

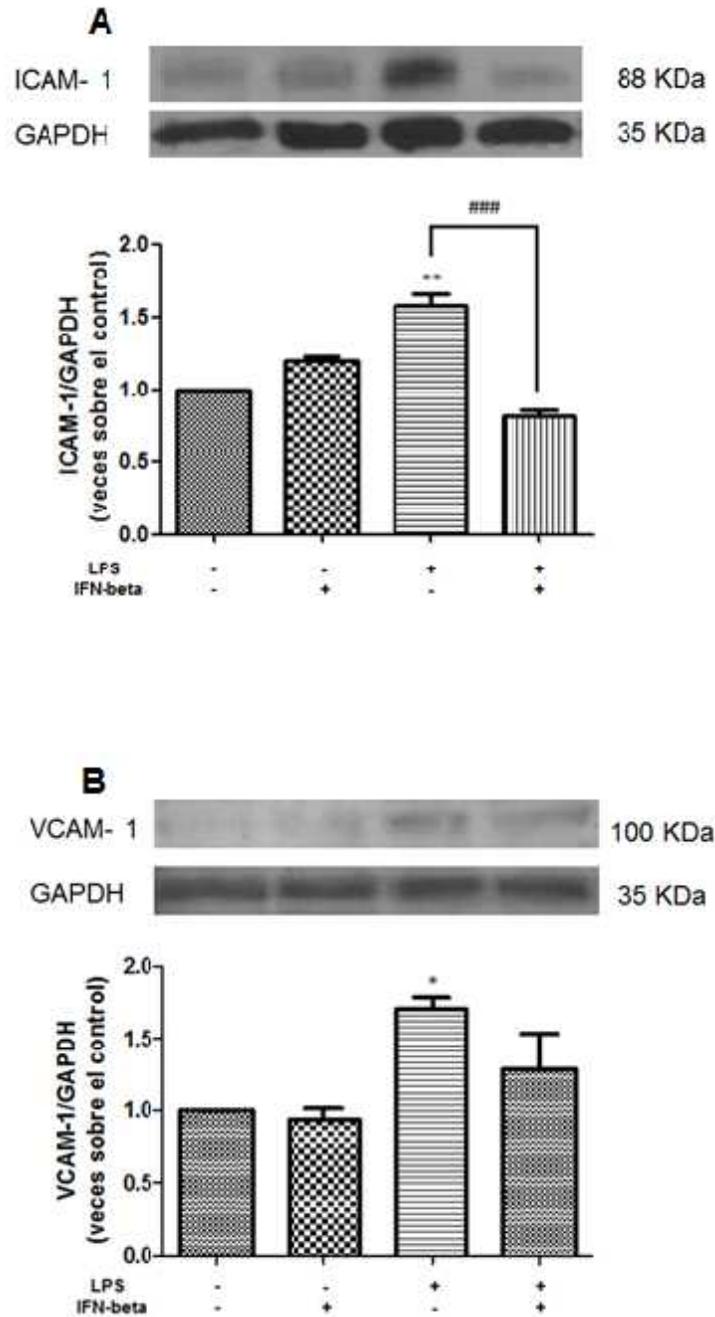
Antecedentes de nuestro laboratorio han mostrado que el IFN- $\beta$  tiene efectos antiinflamatorios en los FC cuando ellos son estimulados con LPS. Con la idea de evaluar si el efecto del IFN- $\beta$  se observa a este nivel, se cuantificaron los niveles de secreción de IL-8. Para ello los FC se pre-estimularon con IFN- $\beta$  (500 U/ml), por una hora y posteriormente, se estimularon con LPS (1  $\mu$ g/ml) por 24 horas. En la figura 4 se puede apreciar que los FC al ser estimulados con LPS (1  $\mu$ g/ml) secretan niveles de IL-8 estadísticamente significativos respecto del control; mientras que IFN- $\beta$  por sí misma no tuvo efecto sobre los niveles de IL-8. Sin embargo, el pre-tratamiento de FC con IFN- $\beta$  y su posterior estímulo con LPS (1  $\mu$ g/ml), se observó una disminución, estadísticamente significativa, en los niveles de IL-8 respecto del control.



**Fig.4 Efecto IFN- $\beta$  sobre secreción de IL-8 en fibroblastos cardiacos (FC).** FC se preestimuló con IFN-beta (500 U/ml) por una hora y posteriormente se estimuló con LPS durante 24 horas. La secreción de IL-8 se cuantificó por kit de ELISA. \* $p < 0,05$  vs control; # $p < 0,05$ . Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. (n=3)

#### **6.4 Efecto de IFN- $\beta$ sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por LPS en FC**

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que en los FC, el LPS induce la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, proteínas importantes en mediar la adhesión intercelular; y se ha determinado que a las 24 hrs se observó la máxima expresión de estas proteínas. Con el objetivo de conocer si el IFN- $\beta$  afecta los niveles de expresión de estas proteínas, se pre-estimularon los FC con IFN-beta (500 U/ml) por una hora y, posteriormente se estimuló con LPS (1  $\mu$ g/ml) por 24 horas. La figura 5A muestra que el LPS (1  $\mu$ g/ml, por 24 horas), aumentó de una manera estadísticamente significativa, los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 con respecto del control. El IFN- $\beta$  por sí solo no tuvo efecto sobre la expresión de ambas proteínas. Sin embargo, el IFN- $\beta$  previene el aumento inducido por LPS sobre la expresión de ICAM-1, disminuyendo significativamente los niveles con respecto al control. En el caso de VCAM-1, el IFN- $\beta$  genera una regresión parcial en los niveles de esta proteína respecto del aumento inducido por LPS. Estos resultados en su conjunto destacan el efecto antiinflamatorio que tiene el IFN- $\beta$ .



**Fig.5 Efecto de IFN- $\beta$  sobre la expresión de niveles proteicos de ICAM-1/VCAM-1 en fibroblastos cardíacos (FC).** Los FC se pre-trataron con IFN-beta (500 U/ml) por 1 hora y posteriormente se estimuló con LPS por 24 horas. Se determinó la expresión de las proteínas ICAM-1 (A) y VCAM-1 (B), mediante la técnica de Western Blot (WB). Como control de carga se utilizó GAPDH. \*\* $p < 0,01$  vs control; \* $p < 0,05$  vs control; ### $p < 0,001$ . Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. (n=3) Se muestra una imagen representativa de cada experimento.

## **6.5 Identificación y análisis de la población de neutrófilos aislados a partir de bazo y médula ósea de rata adulta**

Puesto que IL-8 es un quimioattractante de neutrófilos, y que los FC secretan esta quimioquina y expresan las proteínas ICAM-1 y VCAM-1, se procedió a aislar y purificar monocitos a fin de realizar estudios de adhesión de los neutrófilos sobre los FC.

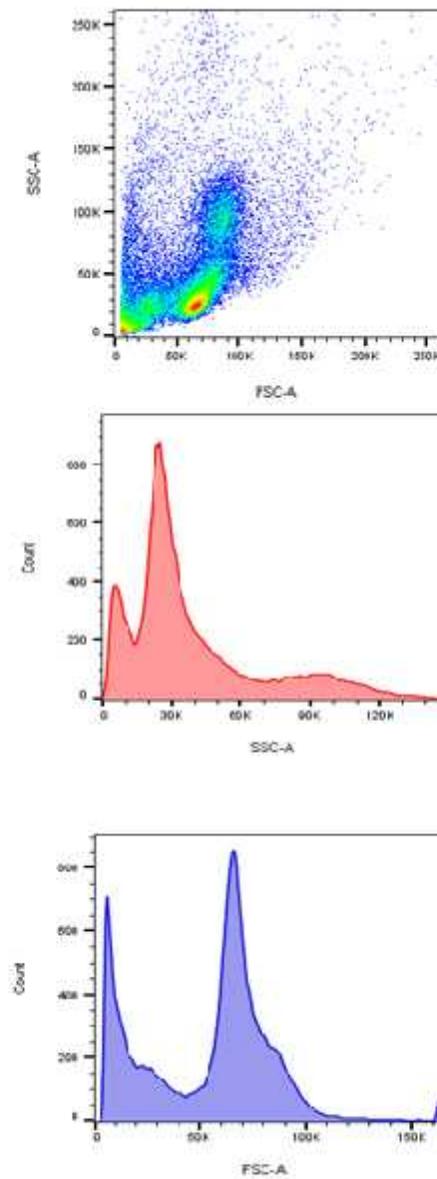
Para ello, se aislaron neutrófilos a partir de bazo y/o médula ósea de rata adulta según se indicó en materiales y métodos. El análisis y separación de las muestras se realizó a través de Citometría de Flujo, Cell Sorting (Beckson-Dickinson FACS flow and sorting cytometer) mediante el uso del anticuerpo anti RP-1(PE) específico para neutrófilos.

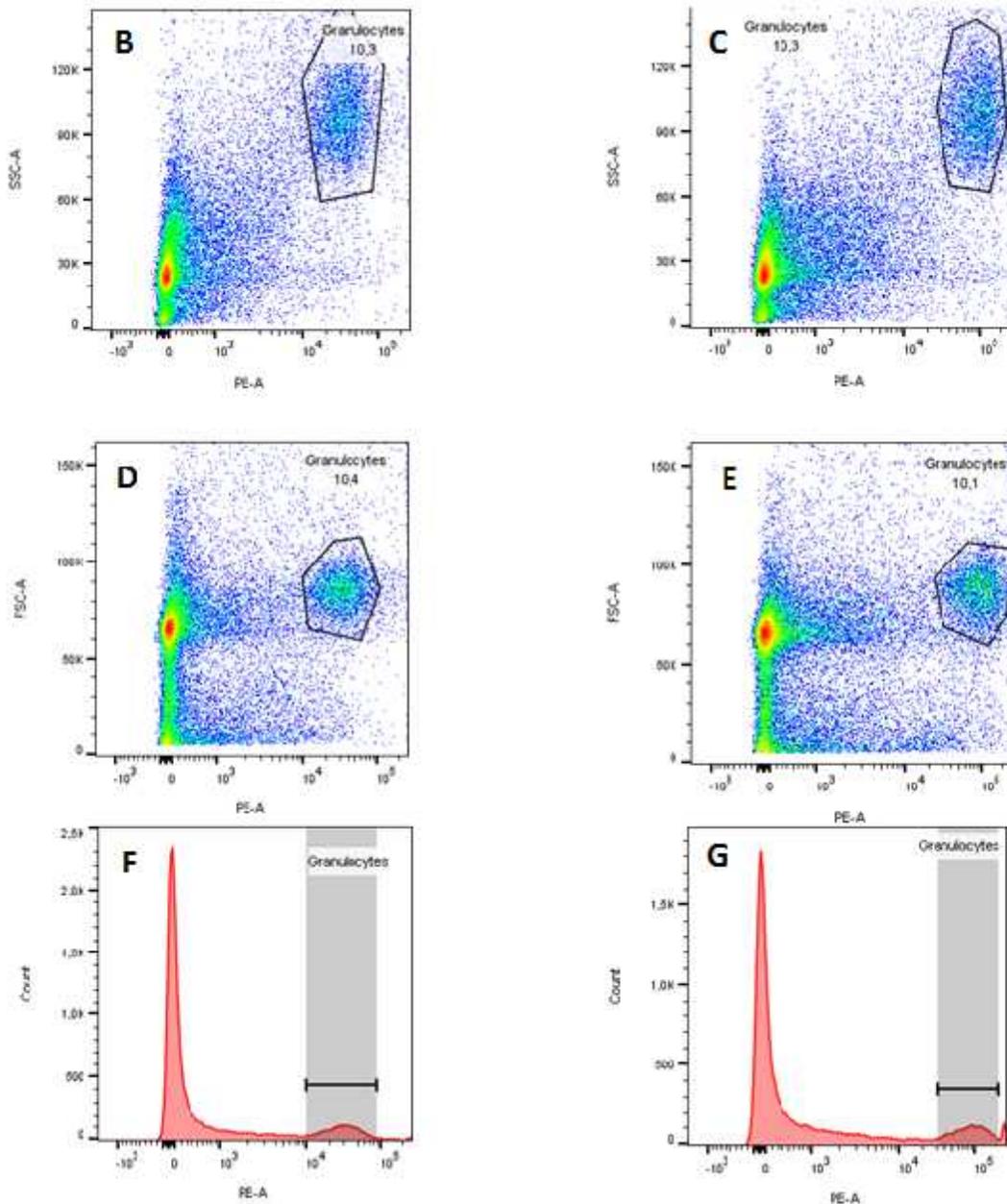
### **6.5.1 Detección y titulación anticuerpo anti RP-1 contra neutrófilos**

En primer lugar se procedió a determinar la concentración óptima de anticuerpo a utilizar que se une a la población celular de interés (células que poseen el antígeno reconocido por el anticuerpo anti-RP-1. El experimento se realizó en células de bazo de rata adulta. En la figura 6, se muestra un análisis comparativo respecto a la concentración de anticuerpo anti RP-1 utilizado para el reconocimiento de la población de neutrófilos del bazo de rata. Se utilizaron dos concentraciones de anticuerpo (B, D y F corresponden a 1ug/ml, mientras que C, E y G corresponde 10ug/ml). De estas imágenes podemos indicar que no hay diferencia significativa en la cantidad de neutrófilos detectados a las distintas concentraciones del anticuerpo (Fig. 6B vs 6C; 6D vs 6E). Esta afirmación se confirma al evaluar los niveles de

fluorescencia emitido por el fluoróforo PE conjugado al anticuerpo antiRP-1, que se muestra en los histogramas correspondientes a la concentración de anticuerpo utilizada en cada caso (Fig. 6F vs 6G). De los resultados expuestos concluimos que la menor concentración de anticuerpo es óptima para realizar experimentos posteriores.

**A**



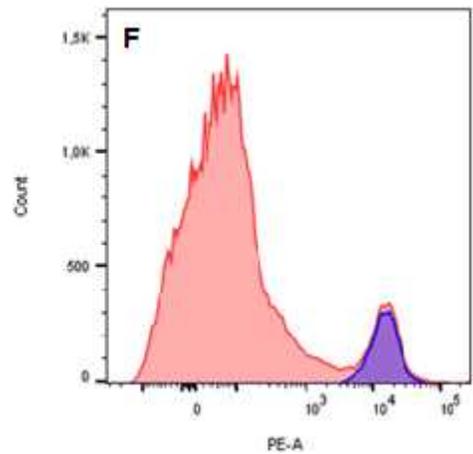
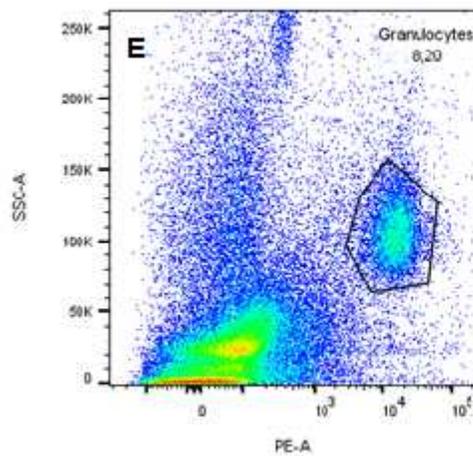
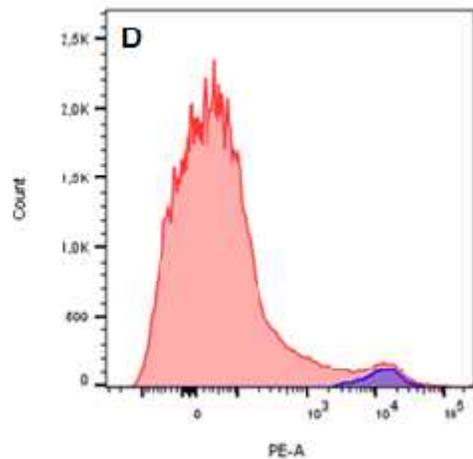
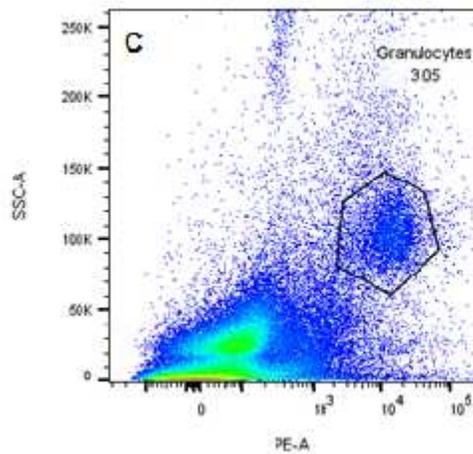
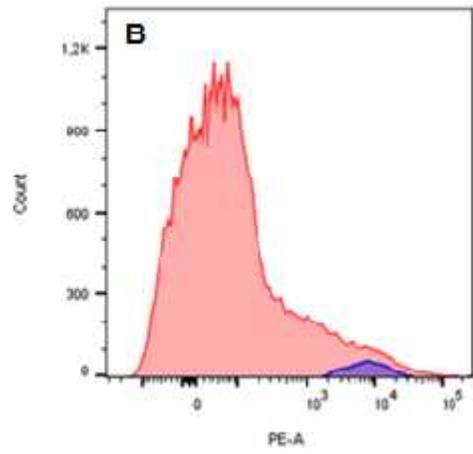
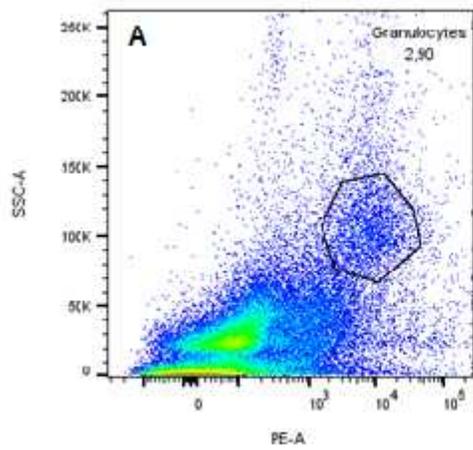


**Fig 6. Titulación anticuerpo anti RP-1 contra neutrófilos.** Se utilizó dos concentraciones de anti RP-1 según lo señalado por el fabricante en células de bazo de rata adulta. 1ug/ml o 10ug/ml por  $10^6$  cel. **A.** Diagrama representativo del total de células a analizar y los respectivos histogramas contra tamaño celular (FSC) y complejidad celular (SSC). Esta muestra se consideró como control. En las siguientes imágenes se realiza una comparación de las poblaciones analizadas a distintas concentraciones del anticuerpo anti RP-1. **B, D y F.** Corresponde a población incubada con anti RP-1 (10ug/ml). **C, E y G.** Corresponde a población incubada con anti RP-1 (1ug/ml). **B-C y D-E.** Par de imágenes representativas de las poblaciones celulares incubadas con anti RP-1; comparativas entre fluorescencia ficoeritrina (PE) correspondiente a anti RP-1 vs complejidad (SSC); y tamaño (FSC), respectivamente. **F y G.** Histogramas correspondientes a conteo celular vs PE. El análisis de las muestras se realizó a través de Cell Sorting (Beckson-Dickinson FACS flow and sorting cytometer).

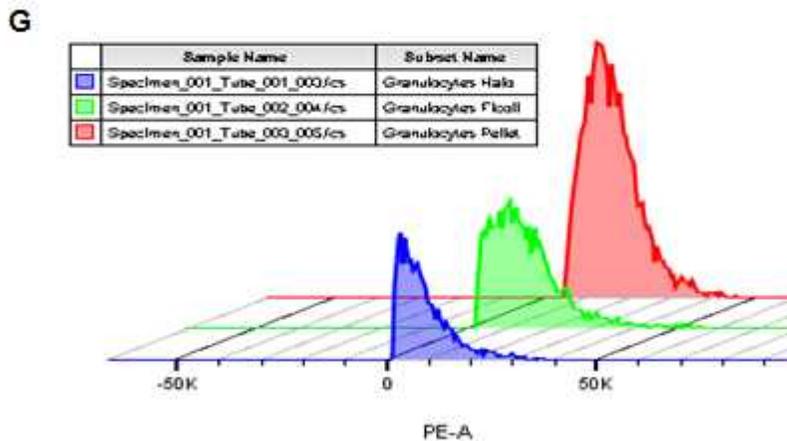
### **6.5.2 Identificación de la población de neutrófilos de bazo en distintas fracciones del gradiente de densidad ficoll-histopaque.**

Una vez titulado el anticuerpo anti-RP-1, se procedió a identificar la población de interés de bazo de rata adulta en las distintas fracciones luego de la centrifugación por gradiente de densidad, con el fin de determinar dónde se encuentra la mayor población de neutrófilos. Las muestras a analizar fueron la fracción entre el histopaque 1.083 y 1.119 (1083-1119), la fracción que comprende al histopaque 1.119 (1119) y el pellet. El análisis de las muestras se realizó a través de Cell Sorting.

Los resultados obtenidos (fig. 7), muestra que el porcentaje de neutrófilos hallado en la fracción 1083-1119 (7A-7B), corresponde a un 2,96% respecto de la población total de células. Un valor similar se obtiene de la fracción que comprende, únicamente, al histopaque 1.119 (7C-7D), que corresponde a un 3,05% de la población total de células. Mientras, este valor, correspondiente a la población de neutrófilos, aumenta considerablemente respecto de las fracciones anteriores en la fracción que comprende al pellet de eritrocitos. Valor que asciende al 8,2% de la población total de células (7E-7F). Los resultados descritos anteriormente, resumidos en la fig. 7G, sugieren que la población de neutrófilos extraídos de bazo de rata adulta y posteriormente aislados por el método de gradiente de densidad ficoll histopaque, se concentra, en su mayoría, en el pellet de eritrocitos obtenido posterior a la centrifugación de la suspensión original y posterior lisis de estos últimos con  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , y no en la fracción entre 1083-1119, donde la literatura sugiere debería hallarse la población de interés.



Sample Name	Subset Name
specimen_BU1_Tube_BU2_BU6.1cd	Granulocytes
specimen_BU1_Tube_BU2_BU6.1cd	Ungated



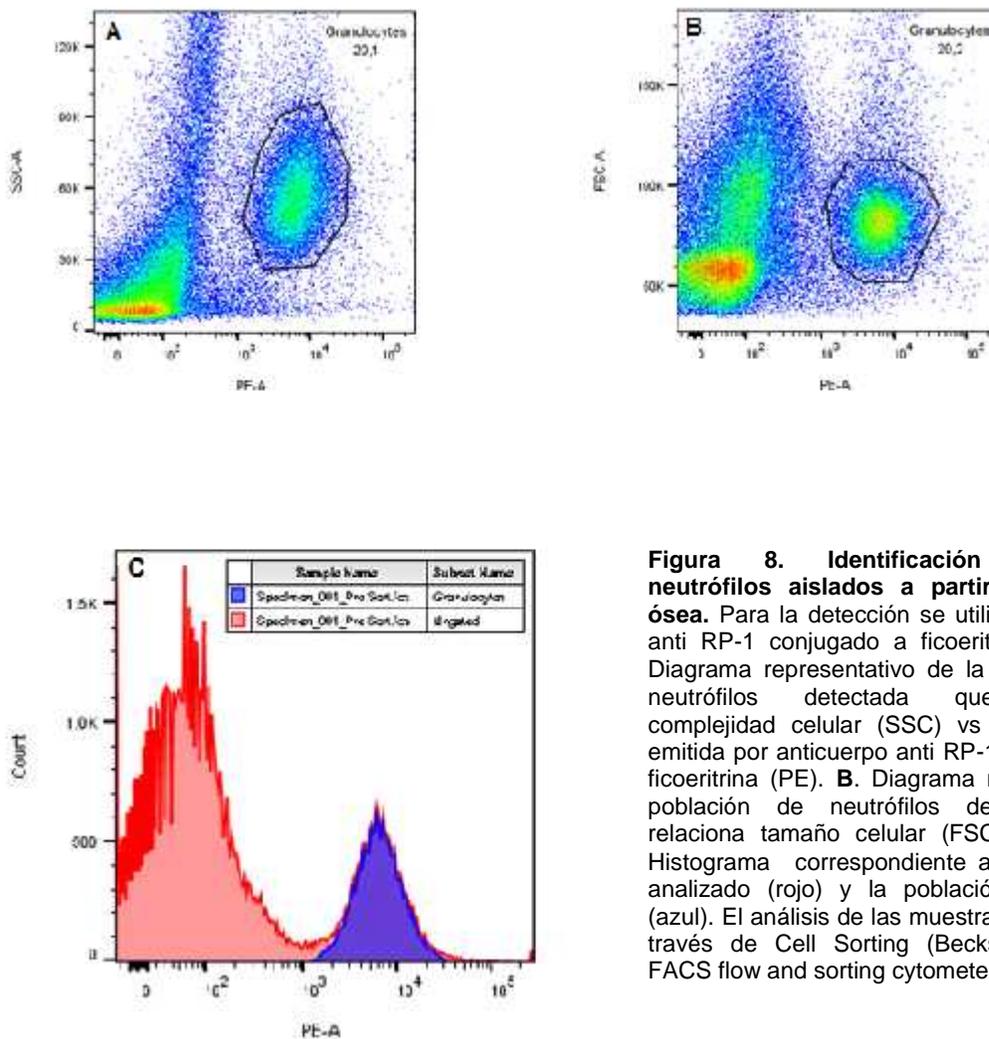
**Figura 7. Identificación población de neutrófilos de bazo en fracciones post centrifugación protocolo aislamiento PMN.** Los neutrófilos fueron aislados de bazo de rata, y para la detección se utilizó el anticuerpo anti RP-1 conjugado a ficoeritrina (PE). Diagrama representativo (SSC vs PE) y su respectivo histograma (vs PE) para fracción 1083-1119. **A** y **B**; fracción 1119. **B** y **C**; pellet. **E** y **F**. Resumen conteo celular de las tres fracciones analizadas. **G**. El análisis de las muestras se realizó a través de Cell Sorting (Beckson-Dickinson FACS flow and sorting cytometer).

### 6.5.3 Identificación población de neutrófilos aislados a partir de médula ósea de rata adulta

Los neutrófilos fueron aislados a partir de médula ósea de rata adulta según el protocolo descrito en materiales y métodos. Los resultados de la figura 8, muestran la relación entre la población de neutrófilos y la población total de células aisladas a partir de médula ósea de rata. Se muestran imágenes representativas relacionando la complejidad o granularidad celular (SSC) y el tamaño celular (FSC) vs la fluorescencia detectada característica de fluoróforo conjugado al anticuerpo anti-RP-1. El análisis SSC vs PE (8A), arroja que el 20,1% de la población total de células corresponde a neutrófilos. Así mismo, el análisis FSC vs PE, arroja que un 20,2% de la población total corresponde a neutrófilos. Esta comparación se realizó con la finalidad de demostrar que bajo el análisis de estos dos parámetros morfológicos existe congruencia en la cantidad de neutrófilos detectados. En la

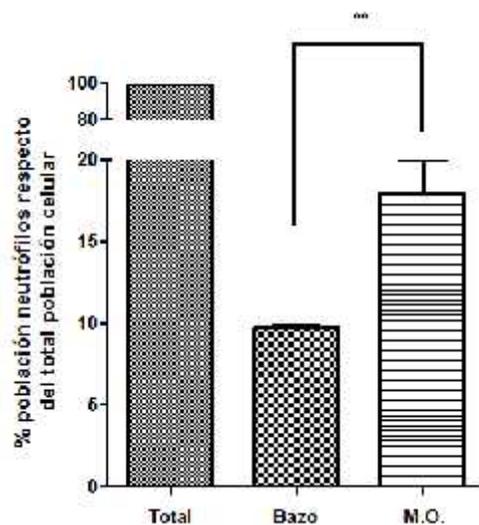
figura 8C, se muestra el histograma que relaciona el conteo total de la población analizada con el conteo de la población de neutrófilos detectada. Estos resultados indican que el método utilizado es confiable para el análisis de neutrófilos extraídos de médula ósea de rata adulta.

### 6.5.4 Análisis comparativo entre la población de neutrófilos de bazo y médula ósea



**Figura 8. Identificación población neutrófilos aislados a partir de médula ósea.** Para la detección se utilizó anticuerpo anti RP-1 conjugado a ficoeritrina (PE). **A.** Diagrama representativo de la población de neutrófilos detectada que relaciona complejidad celular (SSC) vs fluorescencia emitida por anticuerpo anti RP-1 conjugado a ficoeritrina (PE). **B.** Diagrama representativo población de neutrófilos detectada que relaciona tamaño celular (FSC) vs PE. **C.** Histograma correspondiente al total celular analizado (rojo) y la población de interés (azul). El análisis de las muestras se realizó a través de Cell Sorting (Beckson-Dickinson FACS flow and sorting cytometer).

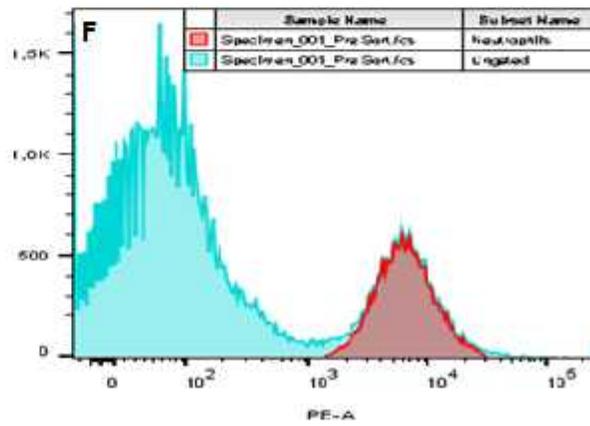
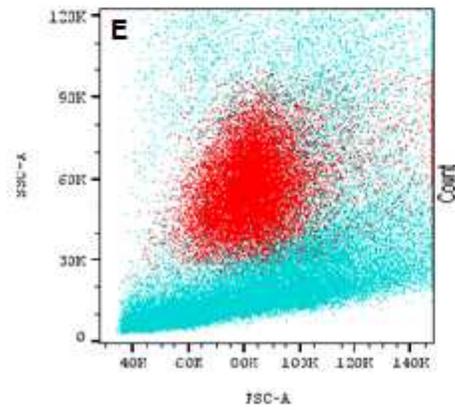
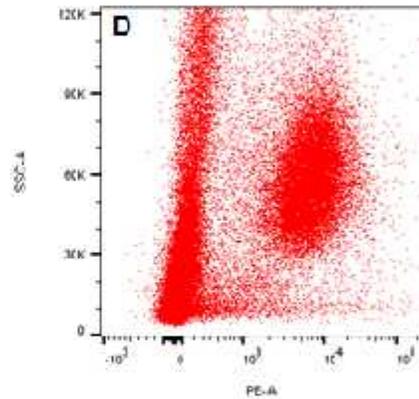
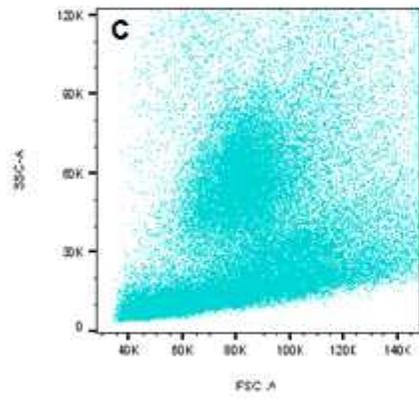
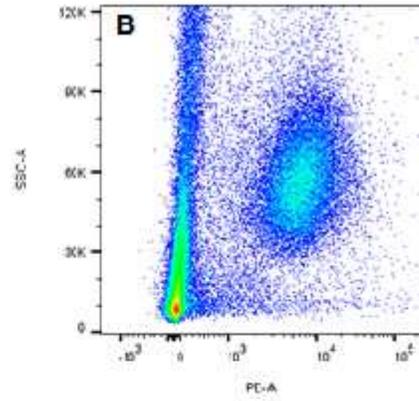
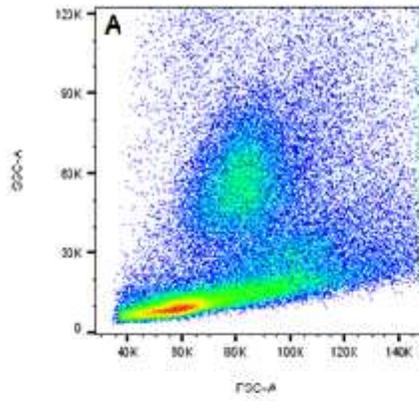
Se comparó la población de neutrófilos obtenida bajo los protocolos de aislación desde bazo y médula ósea de rata adulta descritos en materiales y métodos. Los resultados de esta comparación se muestran en la figura 9. En estos se puede observar un aumento estadísticamente significativo en los niveles de la población de neutrófilos de médula ósea (MO) en relación a los niveles detectados en bazo, respecto de la población total de células analizadas (100%). Esto sugiere que, en términos de rendimiento, el aislamiento de neutrófilos a partir de MO es el mejor camino para la obtención de estos.

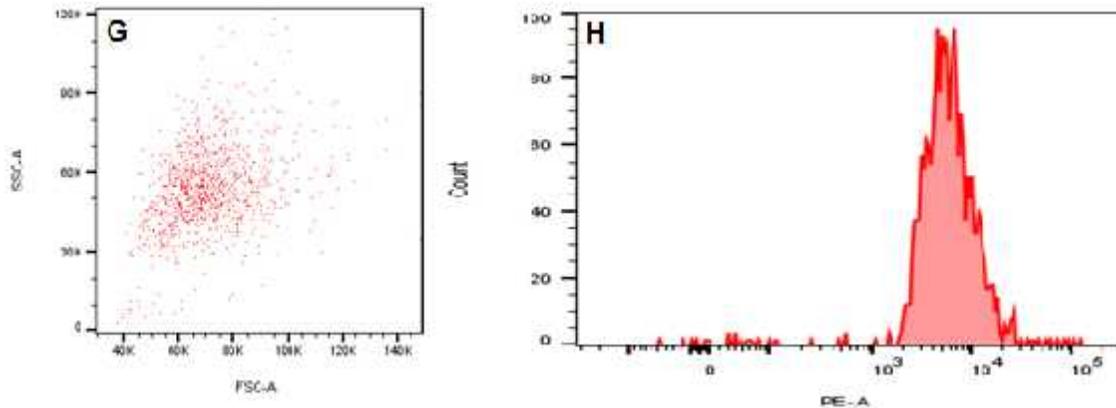


**Fig 9. Población de neutrófilos aislada de bazo o médula ósea (MO).** Los neutrófilos fueron aislados de bazo o MO bajo los protocolos descritos anteriormente. El análisis de las muestras se realizó a través de Cell Sorting (Beckson-Dickinson FACS flow and sorting cytometer). \*\* $p < 0,01$ . Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. (n=3)

## 6.6 Aislación de neutrófilos a partir de médula ósea de rata adulta

Se procedió a la separación de neutrófilos basado en el protocolo de aislamiento a partir de médula ósea de rata y su posterior separación a través del método de Cell Sorting. La figura 10, muestra el resultado del análisis y posterior separación de la población de neutrófilos obtenidos a partir de médula ósea (MO) de rata adulta, marcados con anticuerpo anti-RP-1(PE). Se puede apreciar la población total de células relacionando su complejidad celular (SSC) vs tamaño celular (FSC); fluorescencia ficoeritrina (PE) RP-1, bajo el formato *pseudocolor* y *dot plot* (A-D). En la figura B y C, se puede distinguir la población de neutrófilos detectada por el anticuerpo anti-RP-1, relacionado con la complejidad característica de este tipo celular. En este caso, corresponde al 20% de la población total celular analizado (A y C). Con la intención de aclarar, aún más, la identificación de la población de neutrófilos respecto de la población total celular analizada, esta relación se representa en el diagrama de la figura E, con su respectivo análisis histográfico (F). A continuación, en la figura G y H, se muestra el resultado del análisis de la población celular total luego de haber sido sometida a separación por *Cell Sorting*, es decir, se observa únicamente la población de neutrófilos. El análisis PostSort arrojó que la población de neutrófilos se separó con un 95% de viabilidad y 98% de pureza. Estos resultados permiten concluir que el método utilizado para la obtención y purificación de neutrófilos obtenidos a partir de MO de rata adulta es confiable y reproducible.





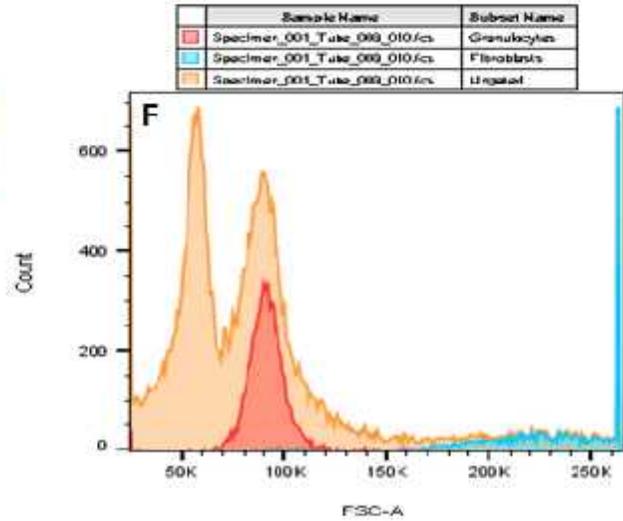
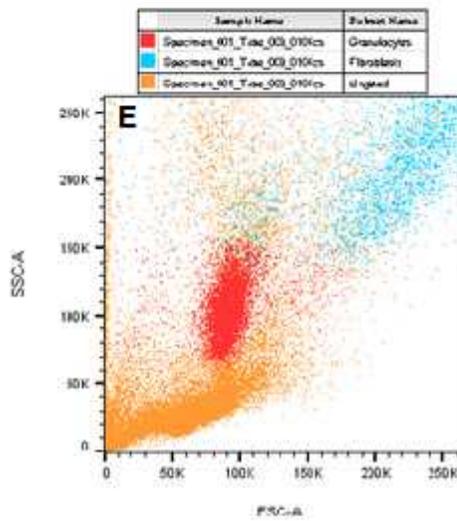
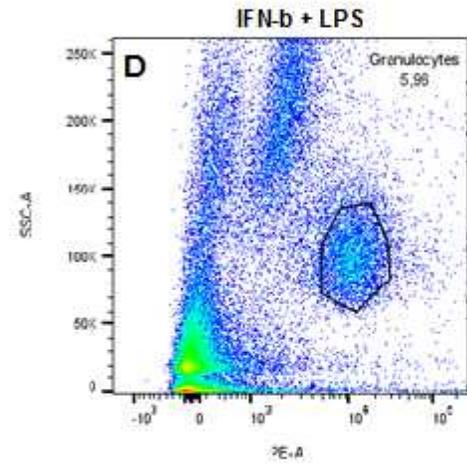
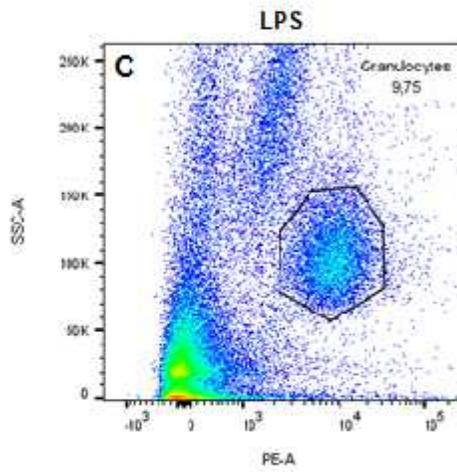
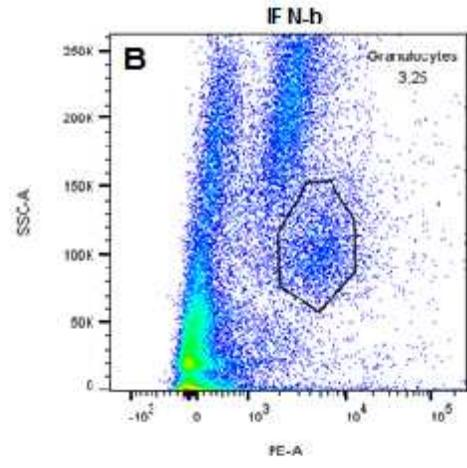
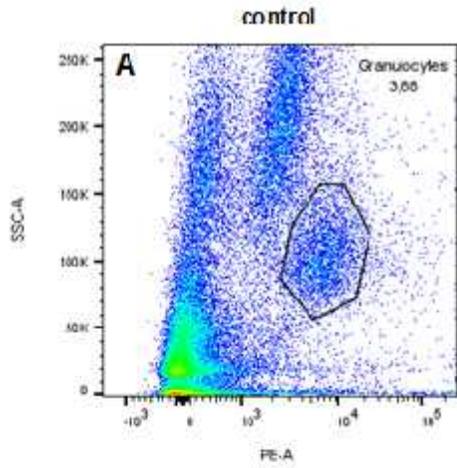
**Fig 10. Separación población neutrófilos por cell sorting.** A-C. Diagrama representativo de población total previa a la separación (PreSort), relacionando tamaño (FSC) vs complejidad celular (SSC) bajo el formato pseudocolor y dot plot, respectivamente. B-D. Diagrama representativo de la población total celular previo a la separación (PreSort), relacionando su complejidad (SSC) vs fluorescencia detectada (PE), a partir del anticuerpo anti RP-1 específico contra neutrófilos, bajo el formato pseudocolor y dot plot, respectivamente. E. Representación gráfica de la población, PreSort, de neutrófilos (rojo) en relación a la población total celular (azul), relacionando tamaño (FSC) y complejidad celular (SSC). F. Histograma que relaciona la cantidad de neutrófilos respecto del resto celular. G-H. Representación gráfica de la población de neutrófilos separada (PostSort) con su respectivo histograma. 98% pureza y 95% viabilidad. Cell Sorting (Beckson-Dickinson FACS flow and sorting cytometer).

## 6.7 Efecto del IFN- sobre la adhesión de neutrófilos sobre monocapa de FC

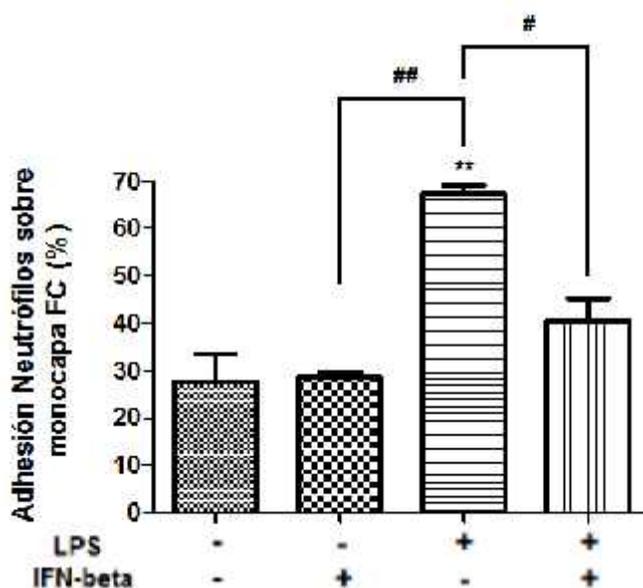
Se utilizaron leucocitos/neutrófilos obtenidos a partir de médula ósea de rata adulta. La detección y niveles de adhesión de neutrófilos fueron determinados mediante el uso del anticuerpo anti-RP-1, y el posterior análisis mediante Citometría de Flujo.

En la figura 13 se exponen los resultados obtenidos luego del ensayo de adhesión de neutrófilos sobre una monocapa de FC a través de análisis por citometría de flujo. En los diagramas representativos (A-D) se muestra el porcentaje de la población de neutrófilos y de FC detectados analizados por citometría de flujo. Para ello los leucocitos fueron adheridos a la monocapa de FC, posteriormente se

removieron las especies celulares no adheridas, y todo el conjunto celular leucocitos más FC fueron lisados y analizados por citometría de flujo. Se aprecia una población de neutrófilos considerablemente superior en el diagrama de la población de FC tratados con LPS (C) por sobre aquellos sin tratamiento (A). Por otro lado, FC tratados únicamente con IFN- $\gamma$  (B) no muestran una variación en los niveles de adhesión de neutrófilos sobre FC respecto del control. Finalmente, el nivel de adhesión de neutrófilos sobre FC tratados con IFN- $\gamma$  y posteriormente con LPS (D), disminuye respecto al nivel de adhesión de neutrófilos sobre FC tratados con LPS. Este hecho fue corroborado en el análisis gráfico que se muestra en la figura 13. En esta imagen, se aprecia un aumento estadísticamente significativo en los niveles de adhesión de neutrófilos sobre FC tratados con LPS respecto de FC no estimulados y FC tratados con IFN- $\gamma$ , en este último caso, el tratamiento únicamente con IFN- $\gamma$  no arrojó cambios apreciables respecto del control. Por otro lado, también se observa una disminución estadísticamente significativa en los niveles de adhesión de neutrófilos sobre FC tratados con IFN- $\gamma$  y posteriormente estimulados con LPS respecto de aquellos tratados únicamente con LPS. Estos resultados sugieren que el estímulo sobre FC con LPS induce la adhesión de neutrófilos y el pretratamiento de FC con IFN- $\gamma$  revertiría el efecto del LPS sobre los niveles de adhesión.



**Fig 11. Diagramas representativos de adhesión neutrófilos sobre FC tratados con IFN-  $\gamma$  y/o LPS.** Leucocitos se agregaron sobre una monocapa confluyente de FC, los cuales habían sido previamente incubados en presencia o ausencia de IFN-beta (500 U/ml) por 1 hora y posteriormente se estimularon con LPS 1  $\mu$ g/ml por 24 horas. El ensayo se realizó de acuerdo a lo descrito en la metodología. Posteriormente, se lavó el cultivo para remover las células no adheridas a los FC. Los FC con leucocitos adheridos fueron tripsinizados para su remoción de la placa y se procedió a incubarlos con el anticuerpo anti RP-1(PE), específico para neutrófilos, por 30 min, según lo descrito anteriormente. **A-D.** Diagrama representativo de la población de neutrófilos adheridos a monocapa de FC bajo distintas condiciones. **E-F.** Diagrama representativo de las poblaciones celular sometidas a análisis. Los niveles de adhesión se determinaron mediante citometría de flujo.



**Fig 12. Adhesión neutrófilos sobre FC pretratados con IFN-  $\gamma$  y/o LPS.** La gráfica muestra niveles de adhesión de neutrófilos sobre monocapa FC tratados como observa en la gráfica. El cálculo de porcentaje de adhesión de neutrófilos fue el siguiente:  $100 \times \{n^\circ \text{ cél RP-1}^+ \text{ adheridas} / n^\circ \text{ total de cél RP-1}^+\}$ . \*\* $p < 0.01$  vs FC no estimulados; ## $p < 0.01$ ; # $p < 0.05$ .

## **7 Discusión**

Los FC son reconocidos como las principales células responsables de mantener la homeostasis de la matriz extracelular (MEC) del corazón. Sin embargo, ante situaciones de daño y estrés, los FC liberan mediadores inflamatorios y factores pro-fibróticos necesarios para el proceso de cicatrización y remodelamiento cardiaco. A pesar de que no son parte del grupo de células inmunes, los FC son capaces de expresar moléculas de adhesión y producir citoquinas y quimioquinas en respuesta a estímulos de daño, lo que sugiere una fuerte participación de éstos en la respuesta inmune. Dentro de esta respuesta inmune e inflamatoria destaca la participación de neutrófilos, considerados la primera línea de defensa del organismo debido a que la infiltración de estos ocurre dentro de las primeras horas luego de una oclusión o daño cardíaca [46]; teniendo como función primordial limpiar el área infartada de células muertas, restos celulares y de matriz; y la liberación de más citoquinas proinflamatorias con la finalidad de prolongar la respuesta inflamatoria [47]. Los hallazgos de esta tesis dan cuenta de una importante vía que promueve la respuesta inflamatoria a nivel cardiaco.

### **7.1 Expresión de Interleuquina-8 en FC estimulados con LPS.**

La familia CXC ELR-positiva de la quimioquinas, inducen la quimiotaxis, o quimioatracción, y la activación de neutrófilos [10, 15], además, de poseer propiedades angiogénicas. La IL-8 es el prototipo de esta familia de quimioquinas, y la expresión y posterior secreción de esta proteína es de vital importancia en los procesos inflamatorios. Además, la IL-8 puede activar la infiltración de neutrófilos induciendo el estallido respiratorio y la liberación de gránulos, e intensificar la

adhesión celular [17]. Se ha encontrado la presencia de esta proteína en fibroblastos de tejido dérmico [48, 49], pulmonar [50], gingival [21], entre otros; sin embargo, no hay reportes de la presencia de IL-8 en los FC, aunque se ha determinado un aumento en los niveles de IL-8 posterior a un infarto cardiaco [51]. Los resultados muestran que existe un nivel basal de expresión de IL-8 en FC, y que el estímulo con LPS es capaz de inducir un aumento temprano en la síntesis de esta proteína. Se ha descrito que el LPS aumenta los niveles de expresión de IL-8 en fibroblastos nasales [52], de ligamento periodontal [53], de pulmón [54], entre otros. También, se han descrito niveles aumentados de secreción de IL-8 en fibroblastos de intestino delgado [55] y fibroblastos nasales [54] aunque a tiempos muy prolongados después del estímulo (24-72 horas).

Por otro lado, y en base a los resultados obtenidos la disminución de la expresión de IL-8 posterior a las 4 horas de estímulo con LPS, es consecuencia de la secreción de esta misma hacia el espacio extracelular. Esto quiere decir, que la síntesis de IL-8 se produce a tiempos tempranos, siguiendo la lógica de la producción de citoquinas, para posteriormente, finalizar en la secreción de la proteína, indicando entonces que el aumento sería transitorio.

Hasta la fecha, no hay trabajos que describan la existencia de esta proteína en FC. Este hecho, convierte a este resultado en la primera evidencia que describe su presencia. En resumen, nuestros resultados sugieren que la IL-8 podría jugar un papel importante en el reclutamiento de neutrófilos en el miocardio infartado.

## **7.2 Determinación y cuantificación de la secreción de IL-8 en FC estimulados con LPS vía la activación de TLR4.**

Los resultados muestran que existe un nivel de secreción IL-8 basal, y conjuntamente un aumento en la secreción de IL-8 a partir de las 8 horas de estímulo con LPS. Estos resultados son coincidentes con la disminución de los niveles de expresión intracelular de esta proteína, obtenidos en este trabajo. La secreción de IL-8 alcanza un nivel máximo luego de 24 horas de estímulo, disminuyendo a tiempos posteriores. Estos resultados son coincidentes con lo descrito en la literatura en lo que se refiere al tiempo de estímulo donde se produce la mayor cantidad de proteína secretada [44, 55].

Nuestros resultados mostraron la secreción de IL-8 es dependiente de TLR4 al ser estimulados FC con LPS. Resultados similares se han obtenido en otros trabajos donde se demuestra la participación de TLR4 en la expresión de IL-8, y también la participación de la vía MAPK en la vía de señalización que conduce a la secreción de esta proteína en fibroblastos de tejido nasal [52], aunque también se ha observado la participación de la proteína MyD88 [44]. Por otro lado, Mukaida *et al.* [56], reportaron que la transcripción del gen IL-8 requiere la activación de una serie de factores transcripcionales, incluyendo NF-kB. Sakuta *et al.* [57], confirma este hecho, tratando fibroblastos gingivales con un inhibidor de NF-kB, resultando en la disminución en la expresión del gen IL-8. Estos precedentes sugieren la participación tanto de NF-kB como de AP-1 a nivel transcripcional para la síntesis y secreción producción de IL-8, por vía de TLR4 MyD88-dependiente.

### **7.3 Efecto de IFN- sobre la secreción de IL-8 en FC.**

Los IFN-I son una familia de citoquinas que desempeñan un rol vital en la respuesta inmune innata a la infección, al desarrollo de tumores y a otros estímulos

inflamatorios. Los IFN-I provocan una amplia variedad de respuestas anti-inflamatorias, pro-inflamatorias, anti-virales y anti-bacterianas, y pueden regular el desarrollo y la activación de la mayoría de las células efectoras de la respuesta inmune innata y adaptativa [32-37]. En la clínica, los IFN-I son usados para tratar las infecciones del virus de la hepatitis B y C, algunas neoplasias hematológicas, y en el caso de IFN- $\gamma$ , la esclerosis múltiple [33]. Durante una respuesta inmune innata, los IFN-I son producidos a través de la estimulación de los PRRs que detectan los ácidos nucleicos virales y bacterianos, además de ligandos endógenos [58]. El promotor del IFN- $\gamma$ , además de sitios de unión para los factores reguladores de interferón (IRF, *Interferon regulatory factor*), tiene sitios para el factor nuclear B (NF- $\kappa$ B) y la proteína activadora 1 (AP-1), por lo que el IFN- $\gamma$  puede ser expresado en diferentes circunstancias.

El IFN- $\gamma$  puede ser producido por varias células del sistema inmune innato, incluyendo macrófagos y células dendríticas, inducido por la activación de varios receptores de tipo Toll (TLRs), incluyendo el TLR4 que están presentes en estas células [59-60], así como en células no inmunes, tales como fibroblastos y células epiteliales [34].

Debido a la descripción de su capacidad anti-inflamatoria, su expresión vía TLR4 en FC y la presencia de sus receptores en este último tipo celular, es que se decidió estudiar su rol como mediador en proceso inflamatorio que involucra la activación y reclutamiento de neutrófilos. Como primera medida, se determinó que los niveles de IL-8 inducidos con LPS fueron reducidos completamente al pre tratar FC con IFN- $\gamma$ , alcanzando valores similares al control. A raíz de esto le adjudicamos el carácter de “preventivo” al efecto producido por el IFN- $\gamma$ . A este respecto, Oliveira

*et al.* [61] describieron que el IFN- $\gamma$  inhibe la transcripción del mRNA de IL-8 inducida por TNF- $\alpha$  en fibroblastos de piel (FS-4). Este efecto se lo atribuye a las proteínas inducidas por IFN (IFN-induced proteins) que actúan inhibiendo la transcripción de genes pro-inflamatorios [62]. Y también, detectó una disminución en la acumulación de IL-8, atribuyéndolo a que el IFN- $\gamma$  bloquea la síntesis de IL-8 a nivel posttranscripcional, traslacional, o posttranslacional. Resultados similares fueron encontrados en células de melanoma [63]. Los resultados obtenidos en FC establecen por primera vez, una relación entre el IFN- $\gamma$ , como agente antiinflamatorio, y la vía que involucra la expresión de la quimioquina IL-8.

#### **7.4 Efecto del IFN-beta sobre la expresión de ICAM-1/VCAM-1 en FC**

La expresión de moléculas de adhesión por células cardíacas es un evento de vital importancia para los procesos inflamatorios. Se han encontrado niveles altos de estas proteínas en diversos procesos inflamatorios cardíacos, tales como isquemia/reperfusión y miocarditis [64]. En este contexto, la expresión elevada de ICAM-1 y VCAM-1 ha sido asociada con la movilización e infiltración de leucocitos al tejido cardíaco. Si bien ICAM-1 y VCAM-1 son constitutivamente expresadas por varios tipos celulares, estas aumentan su expresión gatillado por estímulos proinflamatorios como IL-1, LPS y ésteres de forbol, entre otros [65]. Esto último ha sido ampliamente descrito en células del sistema inmune y células endoteliales [66]. Hosokawa *et al.* [67] describen el aumento en la expresión de estas proteínas en fibroblastos de tejido gingival, mientras que Pang *et al.*, [68], lo describieron en fibroblastos de tejido duodenal. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que la activación de TLR4 en FC es capaz de inducir un aumento en

los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1, obteniendo un máximo a las 24 horas de estímulo con LPS [Humeres, 2016].

Nuestros resultados muestran que el efecto del IFN- $\gamma$  sobre las proteínas ICAM-1 y VCAM-1 sigue la misma dinámica discutida respecto del efecto sobre la IL-8. Estos resultados contribuyen al esclarecimiento del efecto que induce el IFN- $\gamma$  sobre la expresión de estas proteínas. Sin embargo, existen resultados antagónicos, Dhib-Jalbut *et al.*, [69], han descrito que el tratamiento conjunto de TNF- $\alpha$  o IL-1 con IFN- $\gamma$  gatilla el aumento en la expresión de ICAM-1 en células de cordón umbilical. Un resultado similar fue descrito por Shen *et al.*, [70], quienes describen un aumento tanto para ICAM-1 como para VCAM-1 en el mismo tipo celular. Por otro lado, Floris *et al.*, [71], describen la disminución en la expresión tanto de ICAM-1 como VCAM-1 inducida por IFN- $\gamma$  /IL-1 al estimular en conjunto con IFN- $\gamma$ . Estos resultados siguen la tendencia de resultados anteriores de este trabajo que reafirman el efecto antiinflamatorio que ejerce el IFN- $\gamma$  sobre FC al modular la expresión de estas proteínas vitales en el proceso de adhesión de leucocitos. Estos resultados sugieren que el IFN- $\gamma$  podría censar la respuesta inflamatoria del sistema inmune, siendo de mayor importancia en este trabajo, el efecto que pueda producir sobre la adhesión de neutrófilos, células de importancia significativa en la respuesta inflamatoria.

### **7.5 Efecto del IFN- $\gamma$ sobre la adhesión de neutrófilos sobre los FC**

Los neutrófilos, un tipo de leucocitos polimorfonucleares (PMN), son reconocidos como uno de los más importantes participantes durante el proceso inflamatorio y de defensa del organismo [72]. Son los primeros leucocitos en ser

reclutados al sitio de inflamación y son capaces de eliminar a los patógenos por múltiples mecanismos [73-74]. Para que esta migración sea efectiva es necesaria la sobreexpresión de ciertas citoquinas, sobreexpresión propia de un cuadro inflamatorio o de sepsis. Dentro de la innumerable cantidad de citoquinas liberadas, podemos destacar TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN-gamma y quimioquinas, entre otros. Este último grupo es de nuestro particular interés. La función de las quimioquinas es generar la quimiotaxis o quimioatracción de células del sistema inmune tanto innato como adaptativo. Dentro de estas podemos destacar, MCP-1, CCL5 e IL-8, por nombras algunas. Es esta última la que hemos estudiado y caracterizado en este trabajo. La IL-8 es quimioattractante por excelencia de neutrófilos, secretada por células vasculares, células endoteliales, fibroblastos, entre otros.

A nivel cardíaco, dónde está enfocado este trabajo, la respuesta inflamatoria puede tener distinto origen. Ya sea patógeno, como una miocarditis, o bien, endógeno, infarto cardíaco.

La respuesta reparativa que secunda al infarto al miocardio da lugar a la formación de una cicatriz y puede ser dividida en tres fases “superpuestas”: la fase inflamatoria, fase proliferativa y fase de maduración [75-76]. Durante la fase inflamatoria hay una inducción de quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión que dan lugar al reclutamiento de leucocitos hacia el área infartada [77-78]. La región infartada es, en consecuencia, dinámica y hospeda a diferentes tipos celulares que incluyen neutrófilos, monocitos/macrófagos, mastocitos, fibroblastos y células vasculares, que secuencialmente se infiltran en el miocardio dañado a través una serie de eventos orquestados [79].

La infiltración de neutrófilos, que se produce dentro de las primeras horas después de la oclusión coronaria [80], parece ser perjudicial para el proceso de reparación al exacerbar la lesión de los cardiomiocitos y el aumento del tamaño de infarto [75, 81]. De esta manera, las terapias dirigidas a reducir el reclutamiento de neutrófilos post infarto cardiaco pueden ser beneficiosas en reducir el tamaño de infarto y, así, disminuir las complicaciones cardiacas posteriores [75, 82-84].

Con el objetivo de determinar el efecto que ejerce el IFN- en esta vía del proceso inflamatorio, se practicó un ensayo de adhesión de neutrófilos sobre FC estimulados con LPS.

Los resultados mostraron un evidente aumento en el porcentaje de adhesión de neutrófilos sobre FC estimulados con LPS. Corroborando, así, que neutrófilos aislados de médula ósea de rata adulta son capaces de unirse a FC. En la literatura se documenta este hecho [85], también sobre FC. La importancia de la adhesión de estas células sobre FC radica en el efecto que los neutrófilos pueden ejercer sobre los FC en el contexto de un proceso inflamatorio, ya sea, en cuanto a la liberación de proteínas pro-inflamatorias, diferenciación a miofibroblastos o proliferación; y al mismo tiempo, el efecto que se produce en los mismos neutrófilos. Está descrito en la literatura que los neutrófilos, una vez migrados al sitio de injuria, liberan una serie de proteasas, ROS, citoquinas y quimioquinas [17]. Así, contribuir al daño del tejido. Sin embargo, bajo condiciones encontrada in vivo, estos productos tóxicos son casi exclusivamente secretados por neutrófilos adherentes. De este modo, parece ser que la adhesión de neutrófilos sobre FC puede ser importante para la mediación del proceso inflamatorio en el tejido dañado [84]. Existe documentado en fibroblastos de pulmón y corazón la importancia de la adhesión de neutrófilos a estos [85-88].

En lo que respecta al tratamiento con IFN- $\gamma$ , los resultados obtenidos han corroborado la tendencia de acción de esta citoquina sobre agentes proinflamatorios. Hasta la fecha no existen trabajos que describan el efecto del IFN- $\gamma$  sobre la adhesión de neutrófilos. No obstante, existen reportes del efecto preventivo que ejerce el IFN- $\gamma$  sobre la infiltración de neutrófilos inducida por IL-8, en cerebro de rata [89]. En este trabajo, el IFN- $\gamma$  mostró prevenir el efecto inducido por LPS en lo que respecta al nivel de adhesión de neutrófilos sobre FC. Es importante recalcar que la adhesión de neutrófilos sobre células endoteliales (CE) ocurre por mecanismos bien definidos que involucran interacciones entre glicolípidos e integrinas expresadas en la superficie del neutrófilo y de sus moléculas de adhesión complementarias expresadas en la superficie de las CE, que incluyen a la E-selectina y la molécula de adhesión celular intercelular-1 (ICAM-1). Además, como se mencionó anteriormente, el reclutamiento de neutrófilos al sitio de injuria es estimulado a través de la quimiotaxis ejercida por los miembros de la familia ELR+ de las quimioquinas CXC, de las que destaca la CXCL8 o IL-8 [75, 83], que además, ejerce un rol de activador de los neutrófilos, gatillando un aumento en la expresión de los glicolípidos e integrinas en su superficie, aumentando de esta manera, la interacción con sus proteínas de adhesión afines, entre otros efectos [17]. Es por esto, que el efecto producido por el IFN- $\gamma$  en la adhesión de neutrófilos sobre FC estimulados con LPS, es consecuente con el efecto preventivo que, de igual manera, produjo sobre los niveles de IL-8 e ICAM-1 bajo las mismas condiciones. Resultados discutidos anteriormente en este mismo trabajo.

## **Conclusión**

A modo de conclusión, en el presente trabajo, se demostró que el IFN- $\gamma$ , por sí mismo, no genera efecto alguno sobre FC; sin embargo, frente a una condición pro-inflamatoria como lo es el LPS, el IFN- $\gamma$  demostró ejercer un efecto anti-inflamatorio. Se aprecia que el tratamiento de los FC con IFN- $\gamma$ , previo al estímulo con LPS, induce la disminución en los niveles de la proteína IL-8, activadora y attractante de neutrófilos; y también se demostró que el IFN- $\gamma$  previene el aumento en la expresión de las proteínas de adhesión ICAM-0 y VCAM-1. Finalmente, demostramos que el IFN- $\gamma$  disminuyó la adhesión de neutrófilos sobre FC.

Los resultados expuestos en este trabajo muestran una evidente acción como agente antiinflamatorio del IFN- $\gamma$  en la vía que involucra el reclutamiento de neutrófilos sobre fibroblastos cardiacos. Estos resultados pueden significar un nuevo blanco terapéutico para combatir y censar la respuesta inflamatoria en procesos de estrés cardíaco, ya sea, un infarto, una miocarditis o procesos inflamatorios crónicos como los que se presentan en la hipertensión por angiotensina II.

## **REFERENCIAS**

1. Organización Mundial de la Salud (OMS)
2. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, World Health Organization, 2011.
3. Souders C.A., Bowers S.L., Baudino T.A. (2009). Cardiac Fibroblast: the renaissance cell. *Circulation Research* 105:1164–1176.
4. Davis J., Molkenin J.D. (2014). Myofibroblasts: Trust your heart and let fate decide. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 70:9-18.
5. Van Linthout S., Miteva K., Tschöpe C. (2014). Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovascular Research* 102:258–269.
6. Lorne E., Dupont H., Abraham E. (2010). Toll-like receptors 2 and 4: initiators of non-septic inflammation in critical care medicine?. 2010. *Intensive Care Medicine* 36:1826-35.
7. Arumugam T.V., et al. (2009). Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury. *Shock* 32:4-16.
8. Mesquita R.F., et al. (2014). Protein kinase C -calcineurin cosignaling downstream of toll-like receptor 4 downregulates fibrosis and induces wound healing gene expression in cardiac myofibroblasts. *Molecular Cell Biology* 34:574-594.
9. Olson T.S., Ley K. (2002). Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283:R7–28.
10. Clark-Lewis I., et al. (1991). Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH<sub>2</sub>-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. *J. Biol. Chem.* 266:23128–23134.
11. Gerard C., Rollins B.J. (2001). Chemokines and disease. *Nat. Immunol.* 2:108–115.
12. Moser B., Loetscher P. (2001). Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat. Immunol.* 2:123–128.
13. Middleton J., et al. (2002). Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 100:3853–3860.
14. Dobaczewski, M., Frangogiannis N.G. (2011). The cellular specificity of leptin-mediated actions in the infarcted heart. *Cardiovascular Research* 89(1): 9-11.
15. Clark-Lewis I., et al. (1995). Structure-activity relationships of chemokines. *J. Leukoc. Biol.* 57:703–711.
16. Harada A., et al. (1994). Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 56(5): 559-564.
17. Wright H.L., et al. (2010). Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* 49: 1618-31.
18. Gesser B., et al. (1996). IL-8 induces T cell chemotaxis, suppresses IL-4, and up-regulates IL-8 production by CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Leukoc. Biol.* 59(3): 407-411.
19. Pruijt J. F., et al. (2002). Neutrophils are indispensable for hematopoietic stem cell mobilization induced by interleukin-8 in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(9): 6228-6233.

20. Larsen C.G., et al. (1989). Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology* 68:31-36.
21. Takashiba S., et al. (1992). Interleukin-8 is a major neutrophil chemotactic factor derived from cultured human gingival fibroblasts stimulated with interleukin-1 $\beta$  or tumor necrosis factor alpha. *Infection and Immunity* 60:5253-5258.
22. Godaly G., et al. (1997). Role of epithelial interleukin-8 (IL-8) and neutrophil il-8 receptor A in Escherichia coli-induced transuroepithelial neutrophil migration. *Infection and Immunity* 65:3451–3456.
23. Pignatti P., et al. (2004). *American Academy of Allergy, Asthma and Immunology* 115:88-94.
24. Osborn L., et al. (1989). Direct cloning of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*. 59:1203–1211.
25. Elices M.J., et al. (1990). VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA/fibronectin binding site. *Cell*. 60:577–584.
26. Bevilacqua M.P. (1993). Endothelial-leucocyte adhesion molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 11:767–804.
27. Springer T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multiple step paradigm. *Cell*. 76:301–314.
28. Kukiella G.L., et al. (1993). Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in ischemic and reperfused myocardium. *J. Clin. Invest.* 92:1504–1516.
29. Smith C.W., et al. (1991). Adherence of neutrophils to canine myocytes in vitro is dependent on intercellular adhesion molecule-1. *J. Clin. Invest.* 88:1216–1223.
30. Ban K., et al. (1994). Expression of intercellular adhesion molecule-1 on rat cardiac myocytes by monocyte chemoattractant protein-1. *Cardiovasc. Res.* 28:1258–1262.
31. Ikeda U., et al. (1994). Neutrophil adherence to rat cardiac myocyte by proinflammatory cytokines. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 23: 647–652.
32. Noppert S.J., Fitzgerald K.A., Hertzog P.J. (2007). The role of type I interferons in TLR responses. *Immunology and Cell Biology* 85: 446-457.
33. Pestka S., Krause C.D., Walter M.R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews* 202: 8-32.
34. Ivashkiv L.B., Donlin L.T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Immunology* 14: 36-49.
35. Darnell J.E., Kerr I.M., Stark G.R. (1994). JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular proteins. *Science* 264: 1415-1420.
36. Ihle J.N. (1995). The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling. *Adv. Immunol.* 6: 1-35.
37. Chen J., Baig E., Fish E.N. (2004). Diversity and relatedness among the type I interferons. *J. Interferon Cytokine Res.* 24: 687-698.
38. Leppert D., et al. (1996). Interferon beta-1b inhibits gelatinase secretion and in vitro migration of human T cells: a possible mechanism for treatment efficacy in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 40(6): 846-852.

39. Van Linthout S., Miteva K., Tschoöpe C. (2014). Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovascular Research* 102: 258-269.
40. Segal A.W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Europe PMC Funders Group* 23:197–223.
41. Summers C., et al. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology* 31:318–324.
42. Nauseef W.M. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological Reviews* 219:88–102.
43. He W., et al. (2012). LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NF-kappaB and MAPK pathways in human dental pulp stem cells. *International Endodontic Journal* 46:128–136.
44. Wang J., et al. (2011). Toll-like receptors expressed by dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring. *Journal of Cellular Physiology* 226:1265–1273.
45. Smith R.S., et al. (2001). IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the pseudomonas autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kB and activator protein-2. *The American Association of Immunologists* 167:366-374.
46. Braunwald E., Kloner R.A. (1985). Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J. Clin. Invest.* 76:1713–9.
47. Huebener P., et al. (2008). CD44 Is Critically Involved in Infarct Healing by Regulating the Inflammatory and Fibrotic Response. *J. Immunol.* 180:2625–2633.
48. Mielke V., et al. (1990). Detection of neutrophilactivating peptide NAP/IL-8 and NAP/IL-8 mRNA in human recombinant IL-1a- and human recombinant tumor necrosis factor-a-stimulated human dermal fibroblasts. An immunocytochemical and fluorescent in situ hybridization study. *J. Immunol.* 144:153-161.
49. Strieter R.M., et al. (1989). Monokine-induced neutrophil chemotactic factor gene expression in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 264:10621-10626.
50. Kunkel S.L., et al. (1991). Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung. *Exp. Lung Res.* 17(1): 17-23.
51. de Winter R.J., et al. (1997). Interleukin 8 released after acute myocardial infarction is mainly bound to erythrocytes. *Heart* 78(6): 598-602.
52. Cho J.S., et al. (2014). Lipopolysaccharide induces pro-inflammatory cytokines and MMP production via TLR4 in nasal polyp-derived fibroblast and organ culture. *PLoS One* 9(11): e90683.
53. Zhang Y., Li X. (2015). Lipopolysaccharide-regulated production of bone sialoprotein and interleukin-8 in human periodontal ligament fibroblasts: the role of toll-like receptors 2 and 4 and the MAPK pathway. *J. Periodontal Res.* 50(2): 141-151.
54. Zhang J., et al. (2011). Inhibited proliferation of human lung fibroblasts by LPS is through IL-6 and IL-8 release. *Cytokine* 54(3): 289-295.
55. Chakravorty D., Kumar K.S. (1999). Interaction of lipopolysaccharide with human small intestinal lamina propria fibroblasts favors neutrophil migration and peripheral blood mononuclear cell adhesion by the production of proinflammatory mediators and adhesion molecules. *Biochim. Biophys. Acta.* 1453(2): 261-272.
56. Mukaida N., et al. (1994). Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J. Leukocyte Biol.* 56:554-558.

57. Sakuta T., et al. (1998). Dual regulatory effects of interferon-alpha, -beta, and -gamma on interleukin-8 gene expression by human gingival fibroblasts in culture upon stimulation with lipopolysaccharide from *Prevotella intermedia*, interleukin-1alpha, or tumor necrosis factor-alpha. *J. Dent. Res.* 77(8): 1597-1605.
58. Barnes B., Lubyova B., Pitha P.M. (2002). On the role of IRF in host defense. *J. Interferon Cytokine Res.* 22: 59-71.
59. Takeda K., Akira S. (2004). TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 16(1): 3-9.
60. Applequist S.E., et al. (2002). Variable expression of toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int. Immunol.* 14: 1065-1074.
61. Oliveira I.C., et al. (1992). Downregulation of interleukin 8 gene expression in human fibroblasts: unique mechanism of transcriptional inhibition by interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(19): 9049-9053.
62. Sen G.C., Lengyel P. (1992). The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry. *J. Biol. Chem.* 267(8): 5017-5020.
63. Singh R.K., et al. (1996). Interferon-beta prevents the upregulation of interleukin-8 expression in human melanoma cells. *J. Interferon Cytokine Res.* 16(8): 577-584.
64. Kukielka G.L., et al. (1993). Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in ischemic and reperfused myocardium. *J. Clin. Invest.* 92(3):1504-16.
65. Dustin M.L., et al. (1986). Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. immunol.* 137(1):245-54.
66. Makagiansar Y., et al. (2002). Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med. Res. Rev.* 22(2):146-67.
67. Hosokawa Y., et al. (2006). Cytokines differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human gingival fibroblasts. *Clin. Exp. Immunol.* 144(3):494-502.
68. Pang G., et al. (1993). GM-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 alpha and TNF-alpha. *Clin. Exp. immunol.* 96(3):437-43.
69. Jiang H., Williams G.J., Dhib-Jalbut S. (1997). The effect of interferon beta-1b on cytokine-induced adhesion molecule expression. *Neurochem Int.* 30(4-5):449-53.
70. Shen J., et al. (1997). Early E-selectin, VCAM-1, ICAM-1, and late major histocompatibility complex antigen induction on human endothelial cells by flavivirus and comodulation of adhesion molecule expression by immune cytokines. *J. Virol.* 71(12): 9323-9332.
71. Floris S., et al. (2002). Interferon-beta directly influences monocyte infiltration into the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 127(1-2): 69-79.
72. Ley K., et al. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Rev. Immunol.* 7, 678-689.
73. Brinkmann V., et al. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532-1535 (2004).
74. Amulic, B., et al. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 459-489.

75. Frangogiannis N.G. (2008). The immune system and cardiac repair. *Pharmacol. Res.* 58:88–111.
76. Frangogiannis N.G. (2006). The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal* 8:1907–1939.
77. Dewald O., et al. (2005). CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ. Res.* 96:881–889.
78. Bujak M., et al. (2008). Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am. J. Pathol.* 173:57–67.
79. Turner N.A., et al. (2011). Human cardiac fibroblasts express ICAM-1, E-selectin and CXC chemokines in response to proinflammatory cytokine stimulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43: 1450-8.
80. Braunwald E., Kloner R.A. (1985). Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J. Clin. Invest.* 76:1713–9.
81. Kakkar A.K., Lefer D.J. (2004). Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4:154–8.
82. Benson V., McMahon A.C., Lowe H.C. (2007). ICAM-1 in acute myocardial infarction: a potential therapeutic target. *Curr. Mol. Med.* 7:219–27.
83. Frangogiannis N.G., Entman M.L. (2005). Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc. Med.* 15:163–9.
84. Frangogiannis N.G., Smith C.W., Entman M.L. (2002). The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 53:31–47.
85. Couture P., et al. (2009). Adhesion and transcellular migration of neutrophils and B lymphocytes on fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* 315(13): 2192-2206.
86. Morzycki W., Issekutz A.C. (1991). Tumour necrosis factor-alpha but not interleukin-1 induces polymorphonuclear leucocyte migration through fibroblast layers by a fibroblast-dependent mechanism. *Immunology* 74 107–113.
87. Shang X.Z., Issekutz A.C. (1997). Beta 2 (CD18) and beta 1 (CD29) integrin mechanisms in migration of human polymorphonuclear leucocytes and monocytes through lung fibroblast barriers: shared and distinct mechanisms. *Immunology* 92 527–535.
88. Gao J.X., Issekutz A.C. (1996). Mac-1 (CD11b/CD18) is the predominant beta 2 (CD18) integrin mediating human neutrophil migration through synovial and dermal fibroblast barriers, *Immunology* 88 463–470.
89. Veldhuis W.B., et al. (2003). Interferon-beta prevents cytokine-induced neutrophil infiltration and attenuates blood-brain barrier disruption. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23(9): 1060-1069.