



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

---

# **HEPARÁN SULFATO VÍA TLR4 INDUCE LA EXPRESIÓN DE ICAM-1 Y VCAM-1 Y AUMENTA LA ADHESIÓN DE LEUCOCITOS A FIBROBLASTOS CARDÍACOS**

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

**FRANCISCO JAVIER OLIVARES SILVA**

Director: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

Patrocinante: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

---

Santiago, Chile 2016

## **FINANCIAMIENTO**

Proyecto FONDECYT N° 1130300 (Guillermo Díaz Araya, investigador principal).

El desarrollo de esta memoria de título se realizó en el Laboratorio de Farmacología Molecular, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Esta memoria dio origen a la siguiente presentación a congreso:

**Francisco Olivares-Silva**, Renato Anfossi, José Osorio, Claudia Muñoz, Samir Bolívar, Claudio Humeres, Guillermo Díaz-Araya. Heparán sulfato aumenta la adhesión de leucocitos a fibroblastos cardíacos vía TLR4. XXVIII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Chile, Castro, Noviembre 2016.

*A mi mamá, amiga y compañera*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a mi mamá, mi única familia, que en mis 29 años siempre me ha apoyado en todo a pesar de las dificultades. Juntos hemos superado todas las pruebas que hemos encontrado en la vida, y esta no fue la excepción. Sin ella no hubiera llegado hasta estas instancias, por lo que todos mis logros se los debo a ella. Gracias hasta el final de los tiempos.

Quiero agradecer además al profesor Guillermo Díaz (Dr Willy), por creer en mis capacidades y darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Su calidez humana lo distingue de otros académicos, y gracias a su apoyo logré encauzar este trabajo y mi interés por la ciencia e investigación. Gracias también a mis compañeros de laboratorio, los "fibros" Rulo, Glenato Nolsi Nalus, Samir, Diegorina, Clodito, Sammy, Raúl, Pía, Parrita, Nino Varinia y Ratalia, que me enseñaron desde cero los procedimientos experimentales y alegraron el ambiente de trabajo con sus ocurrencias. Tampoco puedo olvidar a Don José, Evelyn y señora Silvia, que estuvieron presentes en todo momento mientras trabajaba y se preocuparon por mí.

También quiero mencionar a mi hermanita Romi, Nicolette, Cote, Sandy, Bebelén, Bambuxa y Ryu-san, grandes amistades que conocí en la facultad y me acompañaron (y tuvieron paciencia) durante la carrera; con ustedes la universidad se hizo más divertida. A pesar de que con el tiempo fuimos tomando rumbos separados, los recuerdos perduran para siempre.

Finalmente, quiero agradecer a las 77 ratas que se sacrificaron y utilizaron en mis experimentos (prometo hacerme cargo de ese karma en mi próxima vida). Gracias también a mi notebook, que soportó horas y horas de lectura de papers y tipeo. Quiero mencionar también a Robbie, Chris, Tom, Fran, Paul, Adam, Ryota, Hyde, Masafumi,

Shuichi, Wolfgang, Frédéric, Ludwig, Johann, Claude y Franz, por su acompañamiento musical mientras organizaba este trabajo. Mención especial para los japoneses, que con todo el anime, manga y videojuegos que desarrollan evitaron que cayera (aún más) en la locura. Que Kamisama los bendiga.

## **ÍNDICE GENERAL**

ÍNDICE GENERAL .....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ABREVIATURAS .....	9
RESUMEN.....	11
SUMMARY .....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Tejido cardíaco y fibroblastos .....	13
1.2 Toll-like receptors (TLRs) .....	14
1.3 Heparán sulfato.....	16
1.4 Moléculas de adhesión: ICAM-1 y VCAM-1 .....	17
1.5 Leucocitos y su rol en la inflamación y fibrosis .....	19
1.6 Alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA).....	20
2. HIPÓTESIS.....	21
3. OBJETIVO GENERAL .....	21
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1 Reactivos .....	22
5.2 Animales .....	23
5.3 Aislamiento de fibroblastos cardíacos .....	23
5.4 Aislamiento de células mononucleares de bazo y polimorfonucleares de médula ósea .....	24
5.5 Western blot (WB) .....	25
5.6 Transfección con siRNA contra ICAM-1 y VCAM-1 .....	25

5.7 Ensayo de adhesión <i>in vitro</i> .....	26
5.8 Inmunocitoquímica .....	26
5.9 Tinción con cristal violeta .....	27
5.10 Análisis estadístico .....	27
6. RESULTADOS .....	25
6.1 Evaluación del efecto de LPS y HS sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC .....	28
6.1.1 Participación de TLR4 y las vías PI3K/Akt, NF-κB y ERK1/2 en el aumento de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC, inducido por HS.....	29
6.2 Estudios de adhesión de células mononucleares de bazo y polimorfonucleares de médula ósea a FC.....	31
6.3 Evaluación del efecto de LPS y HS en la adhesión de células mononucleares de bazo y polimorfonucleares de médula ósea a FC.....	33
6.3.1 Participación de TLR4 y las vías PI3K/Akt, NF-κB y ERK1/2 en el aumento de la adhesión de células mononucleares de bazo y polimorfonucleares de médula ósea a FC, inducido por HS.....	35
6.3.2 Participación de ICAM-1 y VCAM-1 en el aumento de la adhesión de células mononucleares de bazo y polimorfonucleares de médula ósea a FC, inducido por HS.....	36
6.4 Evaluación del efecto de la adhesión de células mononucleares de bazo y polimorfonucleares de médula ósea a FC, inducida por HS, en la expresión de α-SMA.....	37
7. DISCUSIÓN.....	40
7.1 Aumento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC, inducida por HS .....	40
7.2 Aumento en la adhesión de SMC y PMN a FC, inducida por HS.....	44

7.3 Disminución en la expresión de $\alpha$ -SMA en FC adheridos a células mononucleares de bazo y polimorfonucleares de médula ósea, inducida por HS.....	48
8. CONCLUSIONES .....	53
9. REFERENCIAS .....	54



## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Vías transduccionales asociadas al receptor TLR4 .....	15
Figura 2. Funciones de los proteoglicanos de heparán sulfato .....	17
Figura 3. Superfamilia de las inmunoglobulinas .....	18
Figura 4. LPS y HS inducen la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC .....	28
Figura 5. TLR4 junto con las vías PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B participan en el aumento de la expresión de ICAM-1 en FC, inducido por HS .....	30
Figura 6. TLR4 junto con las vías PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B participan en el aumento de la expresión de VCAM-1 en FC, inducido por HS .....	31
Figura 7. Estudios de adhesión de SMC y PMN a FC.....	33
Figura 8. LPS y HS aumentan la adhesión de células mononucleares de bazo a FC .....	34
Figura 9. LPS y HS aumentan la adhesión de células polimorfonucleares de médula ósea a FC.....	35
Figura 10. TLR4 junto con las vías PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B participan en el aumento de la adhesión de células mononucleares de bazo y polimorfonucleares de médula ósea a FC, inducido por HS.....	36
Figura 11. ICAM-1 y VCAM-1 participan en la adhesión de células mononucleares de bazo y polimorfonucleares de médula ósea a FC, inducido por HS .....	37
Figura 12. HS revierte el aumento de $\alpha$ -SMA gatillado por la adhesión de células mononucleares de bazo y polimorfonucleares de médula ósea a FC .....	39
Figura 13. Heparán sulfato, vía TLR4, induce la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 y aumenta la adhesión de leucocitos a fibroblastos cardíacos.....	51

## **ABREVIATURAS**

$\alpha$ -SMA	Alfa-actina de músculo liso
$\mu$ g	Microgramo
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ m	Micrómetro
ANOVA	Análisis de la varianza
BAFF	Factor activador de células B
BSA	Albúmina de suero bovino
CAM	Molécula de adhesión celular
CCR2	Receptor de quimioquinas C-C tipo 2
DAMP	Patrón molecular asociado a daño
DMEM/F12	Dulbecco's modified Eagle's medium, fórmula 12
DS	Desviación estándar
ECL	Quimioluminiscencia mejorada
ERK1/2	Quinasa regulada extracelularmente 1/2
FBS	Suero fetal bovino
FC	Fibroblasto cardíaco
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GlcA	Ácido glucurónico
GlcNAc	N-acetilglicosamina
h	Horas
HMGB1	Proteínas de alta movilidad del grupo de caja 1
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HS	Heparán Sulfato
HSPG	Proteoglicanos de heparán sulfato
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN $\gamma$	Interferón gamma
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico 1
IgSF	Superfamilia de las inmunoglobulinas
I $\kappa$ B	Inhibidor de NF- $\kappa$ B
IL-1	Interleuquina 1
IL-10	Interleuquina 10
IL-13	Interleuquina 13
IL-1R	Receptor de interleuquina 1
IL-6	Interleuquina 6
IRAK	Quinasa asociada al receptor de interleuquina 1
IRF3	Factor regulador de interferón 3
kDa	Kilodalton
LFA-1	Antígeno asociado a función de linfocitos 1
LPS	Lipopolisacárido
IRR	Repeticiones ricas en leucina
M	Molar

Mac-1	Antígeno de macrófagos 1
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MEC	Matriz extracelular
MFC	Miofibroblasto cardíaco
MI	Infarto al miocardio
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MMP	Metaloproteinasa de matriz
MYD88	Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B
nM	Nanomolar
nm	Nanómetro
oxLDL	LDL oxidado
p/v	peso/volumen
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PI3K/AKT	Fosfoinositol-3-quinasa/proteína quinasa 3
PMN	Polimorfonucleares
RIP1	Proteína de interacción con receptores 1
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPM	Revoluciones por minuto
SC	Scramble (control negativo de transfección)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
siRNA	RNA corto interferente
SMC	Células mononucleares derivadas del bazo
TAB1/2	Proteína de unión a TAB 1/2
TAK1	Quinas activada por TGF- $\beta$ 1
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TIR	Dominio de receptor tipo toll/interleuquina 1
TLR	Receptor de tipo toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF6	Factor asociado al receptor de TNF 6
U.A.F.	Unidades arbitrarias de fluorescencia
UI	Unidades internacionales
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1
VLA-4	Antígeno muy tardío 4
WB	Western blot
WT	Wild type

## **RESUMEN**

Los fibroblastos cardíacos (FC) son considerados células centinelas del tejido cardíaco, por su compleja y variada respuesta en la mantención de la homeostasis o frente a un evento de injuria cardíaca, como infarto al miocardio (MI). La necrosis de cardiomiocitos involucra la liberación diversos patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), entre ellos el heparán sulfato (HS), constituyente de la matriz extracelular (MEC) de FC que ejerce sus efectos a través del receptor Tipo-Toll 4 (TLR4). La cascada inflamatoria gatilla la infiltración y adhesión de leucocitos, que se encargan de limpiar restos celulares y liberar citoquinas que favorecen la diferenciación de FC a miofibroblastos (MFC), iniciando el proceso fibrótico y formación de cicatriz. La activación crónica de MFC por citoquinas y DAMPs en esta etapa puede provocar deposición excesiva de colágeno, conocida como fibrosis cardíaca, con consecuencias como arritmias e insuficiencia cardíaca.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de HS en la expresión de proteínas de adhesión en el FC junto con la adhesión de leucocitos y sus consecuencias en la modulación del fenotipo del FC. Se demostró que en FC *in vitro*, HS aumenta la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, y como consecuencia de ello, aumenta la adhesión de células mononucleares de bazo (SMC) y polimorfonucleares de médula ósea (PMN) a FC. El co-cultivo de FC con SMC generó un aumento en la expresión de alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), que es revertido al pre-tratar los FC con HS. Estos resultados dan cuenta del rol dual del HS durante las etapas de la cicatrización post-MI, permitiendo la adhesión de SMC y diferenciación de los FC a un fenotipo pro-fibrótico, pero manteniendo a la vez características pro-inflamatorias necesarias para llevar a cabo el proceso de cicatrización, y mantener la homeostasis con el fin de mantener el funcionamiento del tejido cardíaco.

## **SUMMARY**

Cardiac fibroblasts (CF) act as sentinel cells of the heart tissue, due to its complex response in the maintenance of homeostasis or in cardiac injury events, such as myocardial infarction (MI). Cardiomyocyte necrosis involves the release of various damage-associated molecular patterns (DAMPs) including heparan sulfate (HS), constituent of the extracellular matrix (ECM), whose effects are exerted through the TLR4 receptor. The inflammatory cascade triggers the infiltration and adhesion of leukocytes, which are responsible of clearing cell debris and releasing cytokines that promote CF differentiation to myofibroblast (CMF), initiating the fibrotic process and scar formation. Chronic activation of CMF at this stage may cause excessive collagen deposition, known as cardiac fibrosis, with consequences such as arrhythmia and heart failure.

The overall objective was to study the effect of HS on the expression of adhesion proteins in CF, along with leukocyte adhesion and its consequences in modulating the phenotype of CF. HS enhanced ICAM-1 and VCAM-1 expression, with increased spleen mononuclear cells (SMC) and bone marrow granulocytes (PMN) adhesion to CF. Co-culture of CF with SMC caused an increment of  $\alpha$ -SMA expression, skewing CF towards a profibrotic phenotype, but pre-treating CF with HS partially reverted this effect. These data shows the dual role of HS during the initial stages of wound healing, allowing the adhesion of SMC and differentiation of CF to a profibrotic phenotype, while maintaining proinflammatory properties to ensure tissue homeostasis and prevent complications such as heart rupture.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Tejido cardiaco y fibroblastos**

Entre las diversas funciones del corazón, destaca la capacidad de bombear sangre tanto a los pulmones para oxigenarla, como a los distintos tejidos para nutrirlos y mantener su homeostasis. Esto es posible gracias a la contractibilidad otorgada por el miocardio, compuesto en un 90% por cardiomiocitos y fibroblastos [Porter y Turner, 2009]. La proporción entre ambos depende de la especie, siendo 1:2 en el miocardio humano. Los cardiomiocitos, si bien menor en número, ocupan mayor volumen y aportan la fuerza mecánica necesaria para la contractibilidad; mientras que los fibroblastos contribuyen con componentes de la matriz extracelular (MEC) y regulan la estructura tisular, mantienen la homeostasis proteica y señalizaciones químicas y eléctricas entre componentes celulares y no-celulares, actuando como centinelas de la función cardiaca [Díaz-Araya y cols., 2015].

Los fibroblastos son células de origen mesenquimal, ampliamente distribuidas por el organismo. Por esta razón, exhiben diversa funcionalidad y plasticidad dependiendo de su localización. Los fibroblastos cardiacos (FC) son capaces de responder a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y a patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), a través de la secreción de una amplia variedad de citoquinas y/o quimioquinas pro-inflamatorias [Frangogiannis, 2006], las que alteran la función de células cardiacas residentes promoviendo, entre otras cosas, la expresión de moléculas de adhesión de FC [Turner y cols., 2011]. También son capaces de modular la respuesta del sistema inmune [Humeres y cols., 2016] y finalmente promover la degradación de la MEC por metaloproteinasas (MMPs) [Tao y cols., 2004].

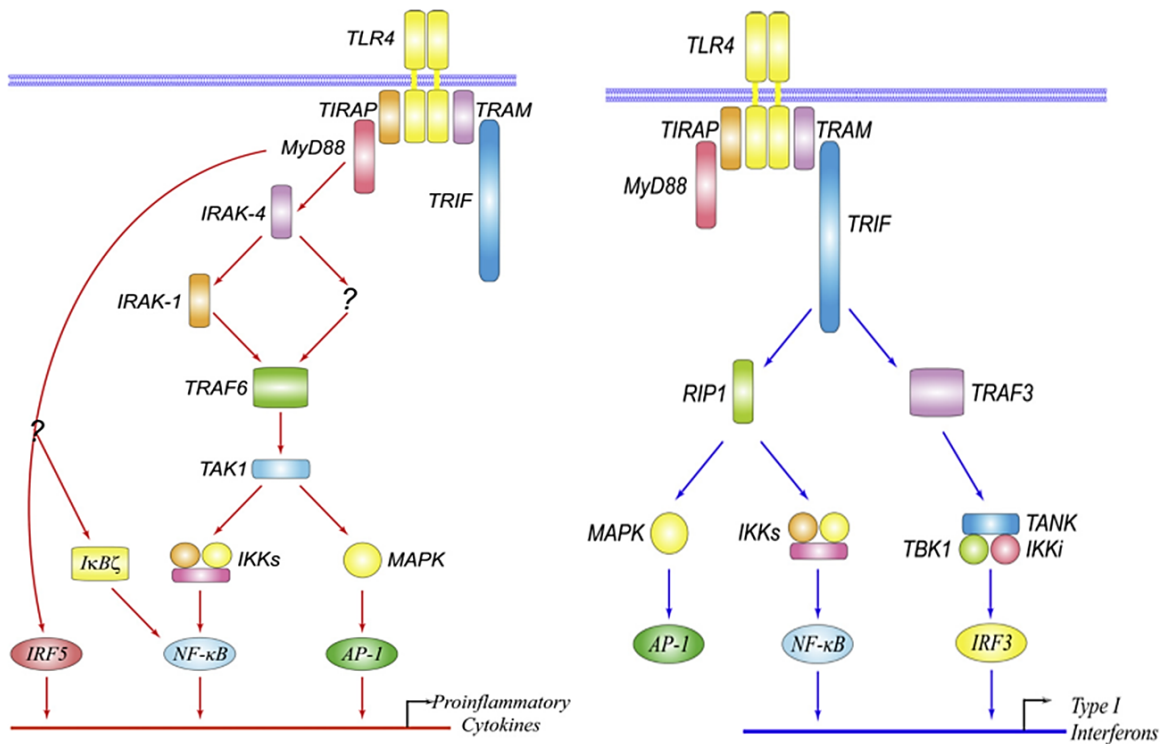
Esta respuesta inflamatoria gatilla la diferenciación del FC pro-inflamatorio (con menor expresión de ICAM-1, VCAM-1,  $\alpha$ -SMA y citoquinas como IL-1 y TNF- $\alpha$ ) a un fenotipo pro-fibrótico conocido como miofibroblasto cardíaco (MFC), caracterizado por la expresión de proteínas contráctiles como  $\alpha$ -SMA, junto con mayor capacidad proliferativa, migratoria y secretora de proteínas de la MEC (como colágeno), así como también de factores pro-fibróticos (como TGF- $\beta$ ) [Turner y Porter, 2013], que contribuyen a la resolución de la inflamación y generación de cicatriz. Cuando estos mecanismos de término fallan se observa sobreproducción de MEC, que altera la funcionalidad del corazón con consecuencias como cardiomiopatías y arritmia [Rohr, 2012]. Como se comentó anteriormente, los FC responden a DAMPs y PAMPs, los cuales son agonistas de los receptores tipo Toll. [Boza y cols., 2016].

## **1.2 Toll-like receptors (TLRs)**

Los TLR son una familia de receptores de transmembrana tipo I (poseen sólo una porción de residuos hidrofóbicos transmembrana, con el residuo amino-terminal en el exterior) sólo expresados en células del sistema inmune innato (como linfocitos y células dendríticas), con funciones de primera línea en la defensa contra patógenos [Uematsu y Akira, 2008]. Actualmente existen 13 parálogos identificados en mamíferos, con 10 miembros presentes en humanos (TLR 11-13 sólo se expresan en ratones). Los TLR 1-6 se expresan en la membrana celular, mientras que los TLR 3,7 y 9 se encuentran principalmente en endosomas y retículo endoplásmico [Kagan, 2008]. Los dominios citoplasmáticos de los TLRs son altamente conservados y compartidos con miembros de la familia de receptores de interleuquina 1 (IL-1R), y se les denomina dominios de tipo Toll/IL-1 (TIR). Sin embargo, ambos receptores no están relacionados estructuralmente: los IL-1R presentan dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina (Ig), mientras que los

TLR poseen repeticiones ricas en leucina (LRR). Estas últimas son las encargadas del reconocimiento de diversos patrones moleculares [Akira y cols., 2006].

Dentro de esta familia, TLR4 es capaz de responder a PAMPs, entre ellos lipopolisacárido bacteriano (LPS), flagelinas bacteriales y RNA de hebra simple y doble. Además, responden a DAMPs como HSP, HMGB1 y heparán sulfato (HS), con distinta especificidad y potencia, teniendo agonistas completos como LPS y agonistas parciales como HS y otros DAMPs [Brennan y cols., 2012]. Estas interacciones gatillan la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y la maduración de células presentadoras de antígenos del sistema inmune innato [Fang y cols., 2014].



**Fig. 1. Vías transduccionales asociadas al receptor TLR4.** Se muestran las vías río-abajo gatilladas con la activación del receptor TLR4, tanto MYD88 dependiente (izquierda) como independiente (derecha).

Luego del reconocimiento de ligandos, la mayoría de los TLRs (excepto TLR3) reclutan la proteína adaptadora MyD88 e inician una cascada dependiente de MyD88, que involucra a intermediarios como IRAKs, TRAF6, TAK1, TAB1 y TAB2, para activar



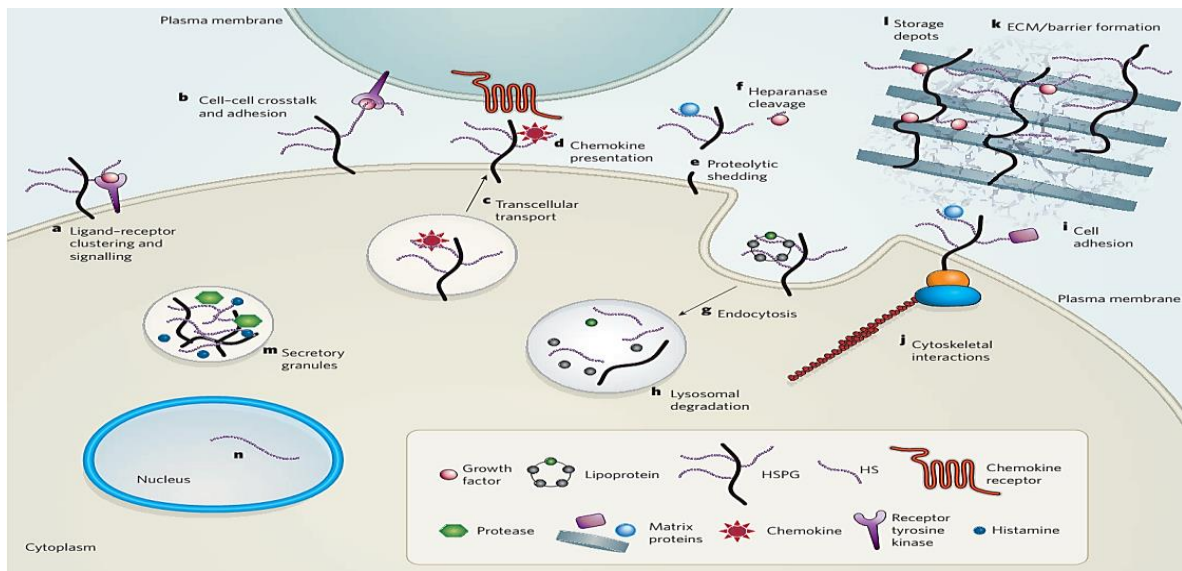
finalmente al factor transduccional NF- $\kappa$ B y MAPKs e iniciar la expresión de citoquinas inflamatorias. TLR3 y TLR4 poseen además una vía transduccional tardía dependiente de TRIF (independiente de MYD88), que media no sólo producción de citoquinas inflamatorias sino además la de IFN1, mediante el reclutamiento de TRAF3 y RIP1, para activar NF- $\kappa$ B e IRF3 (Fig. 1) [An y cols., 2010]. Hasta la fecha, estudios sobre los efectos de la activación del TLR4 en FC son escasos. Se ha demostrado que LPS, un ligando exógeno, activa el TLR4; sin embargo, estudios con ligandos endógenos liberados en un proceso inflamatorio estéril, como heparán sulfato, no han sido realizados

### **1.3 Heparán Sulfato**

Los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) corresponden a proteínas con cadenas de HS unidas covalentemente a su estructura. Están presentes en la superficie celular y MEC de varios tejidos, incluyendo FC. Entre todos los tipos de HSPG, algunos poseen más cadenas de HS en su estructura: los sindecanos 1-4 (parte de la membrana celular), glicicanos 1-6 (anclados a la superficie celular), perlecán, agrina y colágeno XVIII (estos últimos forman parte de la MEC) [Götte y cols., 2003]. Debido a su ubicación, los HSPG están involucrados directamente en procesos inflamatorios. Se ha descrito que participan en adhesión celular, como receptores de quimioquinas, reservorio de citoquinas, en migración de leucocitos, modulación de la actividad angiogénica y señalización celular (Fig. 2) [An y cols., 2010; Parish, 2006].

Las cadenas lineales de HS varían en peso entre 5-70 kDa, y están compuestas alternadamente por ácido glucurónico (GlcA) y N-acetilglicosamina (GlcNAc) que pueden sufrir modificaciones como sulfatación, deacetilación y epimerización (cambio en la quiralidad), resultando en una heterogeneidad estructural y funcional muy amplia [Xu y

Esko, 2014]. Además se ha visto que la actividad degradativa de heparanasas, metaloproteinasas, especies reactivas de oxígeno (ROS) [Raats y cols., 1997] y leucocitos [Fridman y cols., 1987], gatilla la escisión y liberación de HS, que actúa como DAMP y ligando del TLR4 [Johnson y cols., 2002] con consecuencias en el proceso inflamatorio como activación de leucocitos [Akbarshahi y cols., 2011] y secreción de citoquinas [Brennan y cols., 2012; Goodall y cols., 2014].



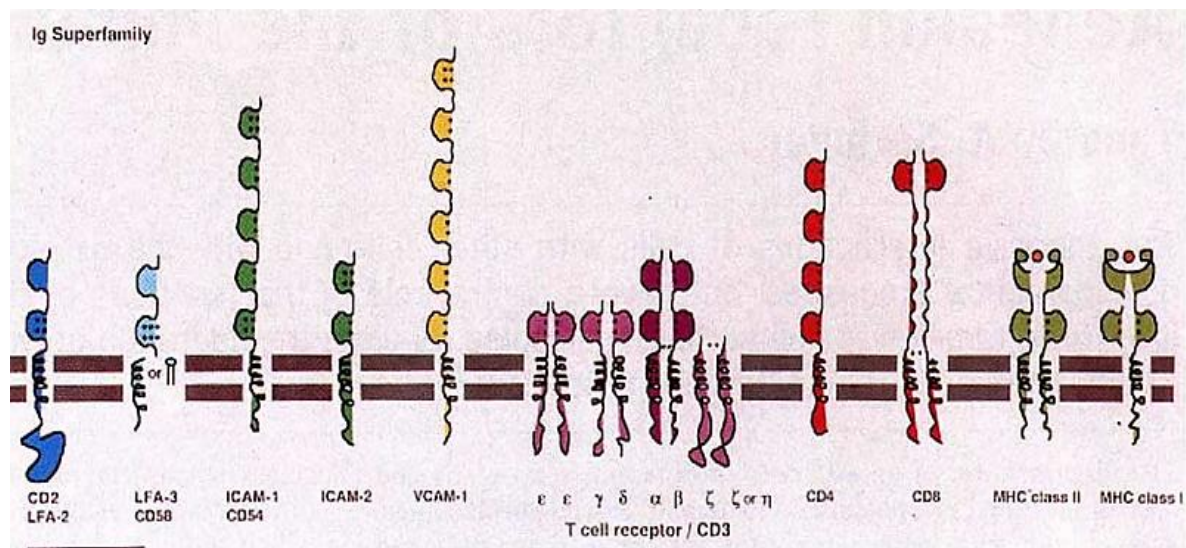
**Fig. 2. Funciones de los proteoglicanos de heparán sulfato.** Se muestran las diversas funciones de los HSPG, destacando su rol en la mantención de la estructura celular y señalización.

#### 1.4 Moléculas de adhesión: ICAM-1 y VCAM-1

Las moléculas de adhesión celular (CAMs) son proteínas de superficie involucradas en modular la comunicación entre una amplia variedad de tipos celulares. Se han identificado y caracterizado diversas familias, como las integrinas, cadherinas, selectinas, proteoglicanos asociados a membranas y la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF). Este último grupo se caracteriza por estar compuesto de 90-100 aminoácidos dispuestos en un arreglo de dos hojas beta estabilizadas por un enlace disulfuro, que le

otorga estabilidad y afinidad por diversos contrarreceptores (receptores ubicados en otros tipos celulares, como leucocitos, que se reconocen mutuamente) [Springer, 1990].

La molécula de adhesión intercelular (ICAM-1 o CD54) y la molécula de adhesión vascular (VCAM-1 o CD106) son dos miembros de la IgSF que tienen implicancia crítica en el reclutamiento e infiltración de células inflamatorias al sitio de injuria. VCAM-1 une linfocitos y monocitos en circulación que expresan las integrinas  $\alpha 4\beta 4$  y  $\alpha 4\beta 7$ , mientras que ICAM-1 es el contrarreceptor para integrinas  $\beta 2$ , como LFA-1 y Mac-1 [Bevilacqua y cols., 1994] (Fig. 3).



**Fig. 3. Superfamilia de las inmuglobulinas.** Se muestran las distintas proteínas de membrana pertenecientes a este grupo, destacando entre ellas ICAM-1 y VCAM-1.

La interacción entre ICAM-1 e integrinas posee un rol importante en el reclutamiento de leucocitos y comienzo de respuestas inmunes gatilladas por antígenos. Un aumento en la expresión de CAMs está temporalmente asociado con el secuestro e infiltración de leucocitos en el tejido del miocardio. En la inflamación cardíaca, las células residentes y leucocitos infiltrados secretan citoquinas capaces de activar la transcripción de CAMs, aumentando los niveles basales y perpetuando el reclutamiento y

transmigración [Bevilacqua y cols., 2003]. Además, se ha demostrado que DAMPs liberados en la zona del daño cardíaco aumentan niveles de CAMs y actúan de manera similar a citoquinas [Chen y Nuñez, 2010].

### **1.5 Leucocitos y su rol en la inflamación y fibrosis**

Al producirse daño en el tejido cardíaco, los neutrófilos son las primeras células atraídas al sitio de injuria, seguidas por monocitos y linfocitos [Stramer y cols., 2007]. Los neutrófilos actúan como la primera línea de defensa e inician una respuesta inflamatoria aguda para fagocitar células muertas y facilitar la reparación tisular, liberando grandes cantidades de ROS. Además secretan citoquinas pro-inflamatorias, MMPs y catepsinas capaces de degradar la MEC [Ma y cols., 2013]; y son capaces de activar otros elementos celulares del sistema inmune, amplificando el reclutamiento de leucocitos [Lefkowitz y Lefkowitz, 2001].

La activación de las vías inflamatorias gatilla la infiltración de subpoblaciones pro-inflamatorias de células mononucleares, mediada por el eje MCP-1/CCR2. Estos monocitos dan origen a macrófagos que limpian la zona de daño y secretan enzimas proteolíticas [Dutta y Nahrendorf, 2015]. En una etapa tardía, subpoblaciones anti-inflamatorias de monocitos son reclutadas selectivamente para ayudar en la resolución de la respuesta inflamatoria post-daño. Esta subpoblación genera macrófagos que facilitan la regeneración promoviendo la proliferación de MFC, deposición de colágeno y angiogénesis, gracias a la secreción de citoquinas pro-fibróticas como TGF- $\beta$  [Dewald y cols., 2005]. Los monocitos infiltrados no sólo provienen de la médula ósea sino también del bazo, que actúa como reservorio de rápido despliegue a los sitios de inflamación [Swirski y cols., 2009].

Por otra parte, la infiltración de linfocitos T coincide con el aumento de la proliferación y actividad pro-fibrótica de los FC. Los Th2 secretan IL-13, que favorece la diferenciación de FC a MFC e inhibición de MMPs [Falloon y cols., 2000]: mientras que los Th1 liberan interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), que modula la diferenciación, activación y migración de macrófagos, favoreciendo la fibrosis [Han y cols., 2012]. Los linfocitos Treg ejercen un rol dual, favoreciendo la fibrosis mediante la secreción de TGF- $\beta$  [Estes y cols., 2007] y con efectos anti-fibróticos gatillados por IL-10 [Krishnamurthy y cols., 2009]. Finalmente, los linfocitos B liberan el factor activador de linfocitos B (BAFF), capaz de ejercer efectos pro-fibróticos mediados por la liberación de IL-6 y TGF- $\beta$  [François y cols., 2013].

### **1.6 Alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA)**

En tejidos en reparación, los FC adquieren un fenotipo contráctil caracterizado por la formación de paquetes de microfilamentos y expresión *de novo* de  $\alpha$ -SMA. Estas células, denominadas MFC, participan en la respuesta reparativa secretando grandes cantidades de proteínas de la matriz extracelular y son responsables en la formación de la cicatriz. Esta respuesta ocurre en respuesta a daño, como infarto al miocardio, en humanos y modelos animales. Por otra parte, la diferenciación excesiva a MFC puede contribuir al desarrollo de fibrosis y promover disfunción sistólica/diastólica. [Gabbiani, 2003]

En FC *in vitro*, se ha visto que la expresión de  $\alpha$ -SMA gatilla un aumento en la contracción de geles de colágeno, como también puede modular vías transduccionales críticas en respuestas celulares. La sobreexpresión de  $\alpha$ -SMA está involucrada en el aumento de señalización por estímulos mecanoreceptivos, en la activación de MAPK y en

la sobrevivencia de células madre [Shinde y cols, 2016]. Finalmente, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la disminución de  $\alpha$ -SMA es provocada por activación del TLR4 [Landaeta, 2014].

Aunque el efecto de HS a nivel de proteínas de adhesión está descrito en diversos tipos celulares, hasta la fecha no existen estudios publicados en FC. Resultados previos de nuestro laboratorio indican que HS, a través de TLR4, gatilla el aumento de IL-1 $\beta$  y disminución de  $\alpha$ -SMA [Landaeta, 2014]. Por lo tanto, es de importancia estudiar el efecto de HS en la adhesión de leucocitos a FC y cómo esta interacción modula el fenotipo de los FC, situándose en un evento de daño cardíaco como infarto al miocardio y en las etapas sucesivas de inflamación y cicatrización tisular. Con estos antecedentes tomados en conjunto se plantea la siguiente hipótesis:

## **2. HIPÓTESIS**

Heparan sulfato, a través de TLR4, aumenta la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y la adhesión de SMC y PMN sobre una monocapa de FC en cultivo, que tiene como consecuencia el aumento de la expresión de  $\alpha$ -SMA.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Demostrar que HS induce la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 y la adhesión de SMC y PMN sobre una monocapa de fibroblastos cardíacos en cultivo, lo que induce cambios en el fenotipo de los FC evidenciado en el aumento de  $\alpha$ -SMA.

#### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

4.1. Demostrar que HS aumenta la expresión de ICAM-1 y VCAM-1

4.2. Demostrar que HS aumenta la adhesión de SMC y PMN sobre una monocapa de FC en cultivo.

4.3. Demostrar que como consecuencia de la interacción entre SMC y PMN con FC estimulados con HS, se gatilla un cambio en el fenotipo de los FC aumentando la expresión de  $\alpha$ -SMA.

#### **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

##### **5.1 Reactivos**

Suero fetal bovino (FBS), tripsina/EDTA, estándar de peso molecular y compuestos orgánicos e inorgánicos fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Germany). Reactivos para quimioluminiscencia (ECL) fueron comprados en PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Material de plástico estéril fue obtenido en Corning Inc. (New York, NY). Anticuerpo primario anti ICAM-1 fue adquirido en R&D Systems (MN, EEUU). Anticuerpo primario anti VCAM-1 fue comprado en Abcam (Cambridge, MA). Anticuerpo primario anti GAPDH y anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP) fueron obtenidos en Santa Cruz Biotechnology (CA, EEUU). Heparan sulfato de riñón bovino, anticuerpo primario anti  $\alpha$ -SMA, IMD-0354 y Ficoll-Histopaque® 1077 y 1119 fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Microplacas FluoroNunc™, anticuerpo secundario Alexa Fluor® 555 y medio de cultivo Opti-MEM® fueron comprados en Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Lipofectamine® 2000 fue obtenido en Invitrogen (Carlsbad, CA). LPS-EB Ultrapure (E. coli O111:B4), TAK-242 y SB-431542

fueron comprados en InvivoGen (San Diego, CA). PD98059 fue obtenido en Gibco BRL (Carlsbad, CA). Ly294002 fue adquirido en Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI). Dako fue adquirido en Agilent Technologies (Glostrup, Dinamarca).

## **5.2 Animales**

Ratas Sprague-Dawley adultas fueron obtenidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los animales se mantuvieron en jaulas (con ciclos de luz/oscuridad de 12 h) y libre acceso a alimento y agua. Todos los estudios fueron desarrollados cumpliendo la Guía de la NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, actualizada en el 2011 (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-Use-of-Laboratory-Animals>), y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad (Código CBE 2012-20).

## **5.3 Aislamiento de fibroblastos cardíacos**

FC fueron aislados de ratas macho Sprague-Dawley (6-8 semanas de edad) usando digestión enzimática, descrita previamente [Boza y cols., 2016]. De forma resumida, las ratas fueron anestesiadas con una inyección de ketamina/xilazina 2:1 y los corazones extraídos en un ambiente aséptico. Se removieron las aurículas y los ventrículos fueron cortados en trozos pequeños (1-2 mm) para luego ser sometidos a incubación con colagenasa tipo II. Lo obtenido en la digestión fue separado mediante centrifugación a 1000 RPM por 10 minutos. El pellet fue resuspendido en 10 ml de DMEM/F12 suplementado con 10% de FBS y antibióticos (estreptomicina 100 µg/ml, penicilina 100 UI/ml, amfotericina B 0.25 µg/ml) y cultivados en una atmósfera con 5%



CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub> y 37°C hasta confluencia (5 días). La pureza de la población de FC fue comprobada con diversos marcadores. La tinción resultó positiva para vimentina, proteína estructural propia de los FC (Santa Cruz Biotechnology, CA), y negativa para actina sarcomérica y desmina (proteínas estructurales de músculo liso y estriado) (Sigma-Aldrich, MO).

#### **5.4 Aislamiento de SMC y PMN**

Para la obtención de SMC (células mononucleares de bazo, principalmente linfocitos y monocitos), se disectaron bazos de rata desde la cavidad abdominal [Humeres y cols., 2016] y filtraron a través de un tamiz de disociación celular (tamaño de poro: 380 µm) hasta la obtención de una suspensión homogénea. Para depletar granulocitos y eritrocitos, la suspensión fue vertida en 7 ml de Ficoll-Histopaque® (1.077 g/ml) y centrifugada a temperatura ambiente por 30 minutos y 400G. La interface rica en SMC fue recibida y lavada dos veces con PBS 1X, pH 7.4. Para lizar los eritrocitos remanentes, se resuspendió en pellet en NH<sub>4</sub>Cl 0.85 M durante 5 minutos para ser nuevamente lavada con PBS. Finalmente, los SMC purificados fueron centrifugados y resuspendidos en PBS + 3% FBS para experimentos posteriores.

Se utilizó una metodología similar para aislar PMN (polimorfonucleares, principalmente neutrófilos) [Anfossi, 2016]. Se extrajeron tibias y fémures de rata, para lavar la cavidad medular con una jeringa 25 G y filtrar el extracto de médula ósea a través de un tamiz. La suspensión se dispuso en 7 ml de Ficoll-Histopaque 1.119 g/ml y 1.077 g/ml (1:1) y centrifugó a temperatura ambiente por 30 min y 300G. La interfase entre ambos Ficoll-Histopaque® fue recibida y lavada dos veces con PBS. Finalmente, el pellet fue resuspendido en PBS + 3% FBS y reservado para su uso.

## 5.5 Western blot (WB)

Cantidades equivalentes de proteína fueron separadas mediante SDS-PAGE (8% para todos los geles). Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y bloqueadas con leche descremada (5% p/v). Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo respectivo (ICAM-1 1:1000, VCAM-1 1:5000,  $\alpha$ -SMA 1:1000, GAPDH 1:1000) durante la noche a 4°C. Se incubó el anticuerpo secundario (1:1000) por 2 h a temperatura ambiente. Se utilizó ECL para la inmunodetección. Los niveles de proteína fueron determinados mediante densitometría utilizando ImageJ (Bethesda, MD) y normalizados con el nivel correspondiente de GAPDH.

## 5.6 Transfección con siRNA contra ICAM-1 y VCAM-1

Se sembraron FC en placas de 96 pocillos hasta confluencia del 70%. Después de 24 h, mezclas de Lipofectamine® 2000 y siRNA específico ajustadas a 100 nM fueron preparadas en Opti-MEM®. Estas mezclas fueron diluidas de 5X a 1X (20 nM) antes de la co-incubación con FC durante 16 h a 37°C. Transcurrido el tiempo, se cambió el medio a DMEM/F12 por otras 24 h. Se utilizó Scramble siRNA (MISSION®, Sigma-Aldrich) como control. Las secuencias utilizadas fueron: ICAM-1: 5'-GCCUCAGCACGUACCUCUAdTdT-3' (sentido); 5'-UAGAGGUACGUGCUGAGGCdTdT-3' (antisentido). VCAM-1: 5'-AAUGCAACUCUCACCUUAAAdTdT-3' (sentido); 5'-UUAAGGUGAGAGUUGCAUUdTdT-3' (antisentido); Scramble siRNA: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3' (sentido); 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT-3' (antisentido).

### **5.7 Ensayo de adhesión *in vitro***

Los ensayos de adhesión celular *in-vitro* fueron realizados utilizando un kit comercial (Vybrant Cell Adhesion kit; Molecular Probes, Eugene, OR) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. SMC o PMN ( $5 \times 10^6$ ) fueron resuspendidos en 1 ml de DMEM/F12 y marcados con calceína AM ( $5 \mu\text{M}$ ) por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Los SMC o PMN marcados ( $5 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $200 \mu\text{l}/\text{pocillo}$ ) fueron agregados a microplacas FluoroNunc™ con una monocapa de  $2 \times 10^4$  FC/pocillo previamente tratadas con HS  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  o LPS  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  por 24 h. El medio de cultivo condicionado fue retirado completamente antes de agregar los leucocitos. La fluorescencia total de las células marcadas fue determinada utilizando un espectrómetro de fluorescencia (excitación 470 nm, emisión 517 nm) equipado con un lector de microplacas. Luego de co-incubar por 2 h a  $37^\circ\text{C}$ , las células no adheridas fueron removidas lavando cuatro veces con DMEM/F12. Finalmente,  $200 \mu\text{l}$  de PBS fue agregado a cada pocillo y la fluorescencia medida concomitantemente. La cantidad de SMC o PMN adheridos a los FC se representa como el promedio de experimentos en triplicado y normalizada respecto del control.

### **5.8 Inmunocitoquímica**

Se sembraron FC sobre cubreobjetos y DMEM/F12 en presencia/ausencia de HS por 24 h. Posteriormente, se co-incubaron con SMC durante 72 h. Transcurrido el tiempo se fijaron con paraformaldehído 4% por 10 minutos, permeabilizaron con Triton X-100 0.1% y bloquearon con BSA 3% por 30 minutos. A continuación, se incubaron con anticuerpo primario contra  $\alpha$ -SMA durante la noche a  $4^\circ\text{C}$  y con anticuerpo secundario Alexa Fluor® 555 durante 2 h a temperatura ambiente. El núcleo fue marcado con

Hoechst (azul). Finalmente, los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos utilizando Dako y las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal.

### **5.9 Tinción con cristal violeta**

Para la obtención de imágenes representativas de los ensayos de adhesión, FC fueron sembrados en DMEM-F12 y presencia/ausencia de LPS 1 µg/ml o HS 10 µg/ml durante 24 h. Luego se co-incubaron con SMC y PMN durante 2 h. Transcurrido el tiempo, se lavaron con PBS 4 veces y agregó 500 µl de cristal violeta (5 mg/ml, MeOH 10%) durante 20 minutos. Finalmente, los FC fueron lavados y secados a temperatura ambiente. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía óptica, evidenciando una tinción violácea para las proteínas y núcleo celular.

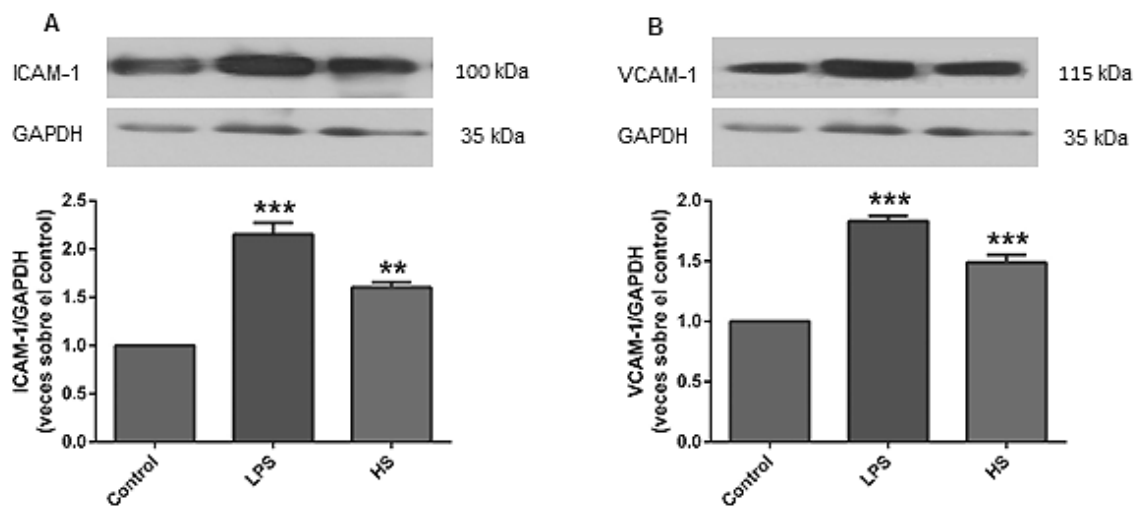
### **5.10 Análisis estadístico**

Todos los datos son presentados como el promedio  $\pm$  DS de al menos tres experimentos independientes. Las diferencias entre parámetros fueron evaluados mediante análisis ANOVA de dos vías por cada variable. Se continuó el análisis con el test de Tukey para comparar los efectos de las distintas condiciones en los parámetros. El nivel de significancia establecido fue de  $p < 0.05$ . Se utilizó el software GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA) para los análisis estadísticos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Evaluación del efecto de LPS y HS sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC

Las proteínas ICAM-1 y VCAM-1 son estudiadas por su rol en la adhesión y activación de leucocitos en un proceso inflamatorio. De esta manera, se estudió la expresión de ambas CAMs ante un estímulo pro-inflamatorio exógeno y endógeno, como LPS y HS respectivamente. Como muestran los resultados (Fig. 4A-B), la incubación con LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  y HS 10  $\mu\text{g/ml}$  (concentración de trabajo establecida en nuestro laboratorio, que gatilla el máximo aumento de las CAMs en 24 h), ambos durante 24 h, aumenta la expresión de ICAM-1 (2.0-2.2 veces para LPS y 1.5-1.6 para HS) y VCAM-1 (1.8 veces para LPS y 1.5 para HS), siendo más marcado el aumento ante el estímulo de LPS.



**Fig. 4. LPS y HS inducen la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC.** Se estimularon FC durante 24 horas con LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) o HS (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Los niveles de (A) ICAM-1 y (B) VCAM-1 se midieron por WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. Los resultados se expresan como promedio ( $\pm$  DS) de al menos 3 experimentos independientes (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs control).

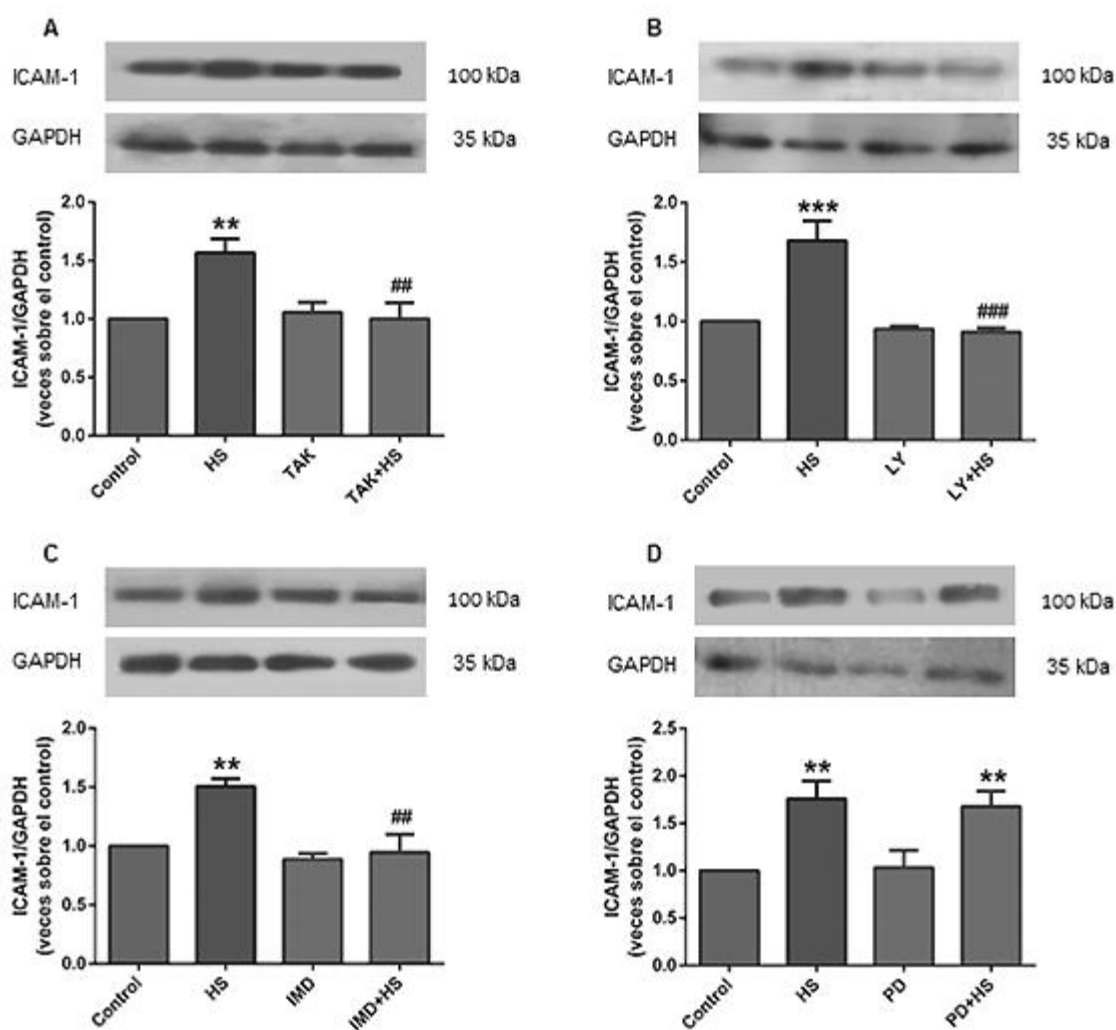
### **6.1.1 Participación de TLR4 y las vías transduccionales PI3K/Akt, NF- $\kappa$ B y ERK1/2 en el aumento de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC, inducido por HS**

De acuerdo a la literatura, tanto LPS como HS actúan a través de TLR4. Para evaluar la participación del TLR4 en el aumento de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducida por HS, los FC se pre-trataron con TAK-242 4  $\mu$ M (inhibidor de TLR4) durante 1 h y luego se estimularon con HS 10  $\mu$ g/ml por 24 h. Los resultados muestran un aumento significativo de ICAM-1 (Fig. 5A) y VCAM-1 (Fig. 6A) gatillado por HS (alrededor de 1.5 veces para ambas), mientras que el pre-tratamiento con TAK-242 inhibió el efecto de HS, manteniendo los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 similares a los del control. Además, TAK-242 por sí solo no modificó los niveles en las proteínas de adhesión.

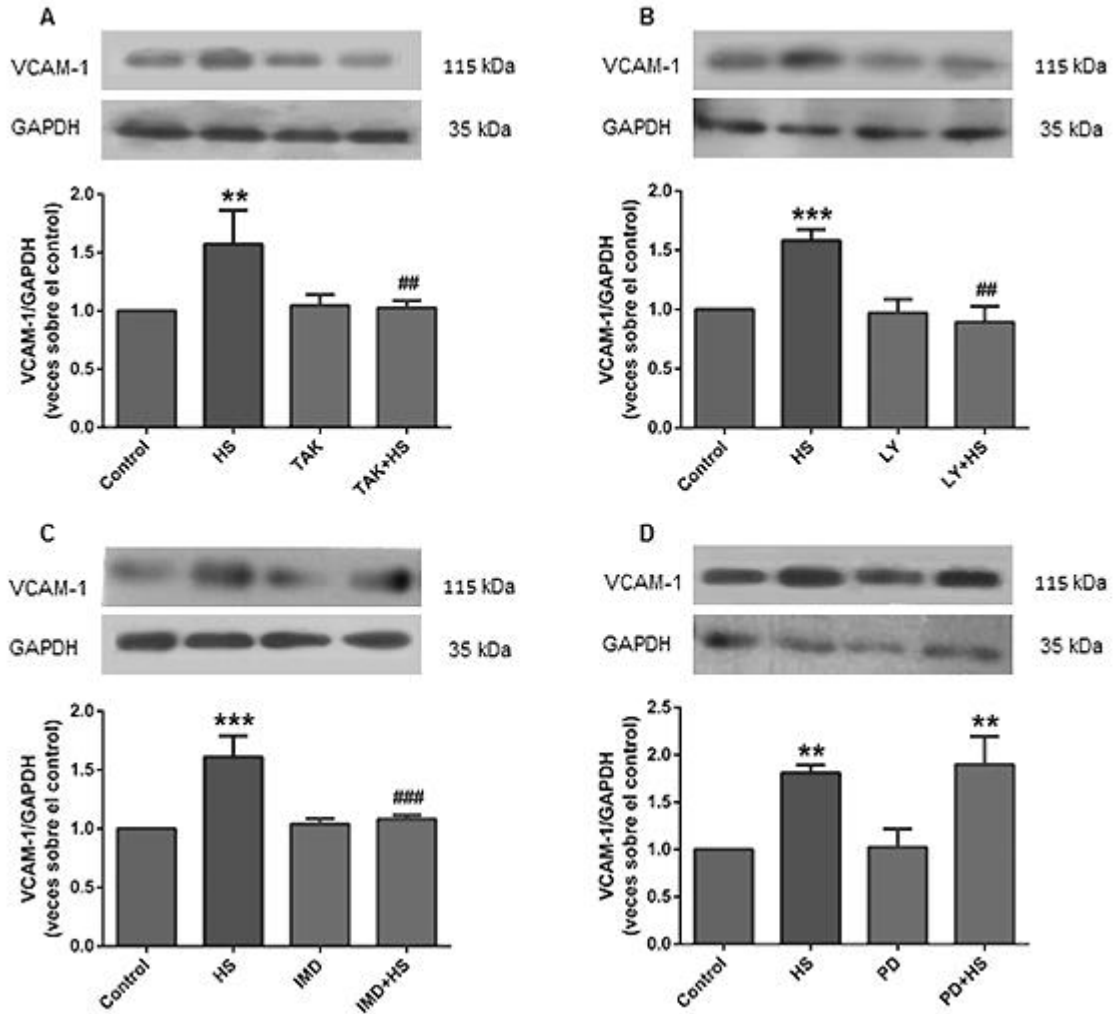
A continuación se evaluó la participación de la vía PI3K/Akt sobre la variación de ICAM-1 y VCAM-1. En este caso, los FC se pre-trataron con LY294002 10  $\mu$ M (inhibidor de PI3K/Akt) durante 1 h y luego se estimularon con HS 10  $\mu$ g/ml por 24 h. Los resultados indican que mientras HS induce el aumento de ambas proteínas de adhesión, el pre-tratamiento con LY294002 disminuye la expresión de ICAM-1 (Fig. 5B) y VCAM-1 (Fig. 6B) inducidas por HS. LY294002 por sí mismo no afectó la expresión de ambas CAMs respecto del control.

Luego se estudió si la vía NF- $\kappa$ B participa de los efectos de HS en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1. Para ello, los FC se pre-trataron con IMD-0354 1  $\mu$ M (inhibidor de NF- $\kappa$ B) durante 1 h, y luego se estimularon con HS 10  $\mu$ g/ml por 24 h. Los resultados muestran que nuevamente HS aumenta los niveles de ambas proteínas de adhesión (Fig. 5C y 6C), mientras que el pre-tratamiento con IMD-0354 anula este incremento inducido por HS. El inhibidor por sí solo no tuvo efecto en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1.

Finalmente, se evaluó la participación de la vía ERK1/2 en los efectos inducidos por HS. Para ello, los FC fueron pre-tratados durante 1 h con PD98059 10  $\mu$ M (inhibidor de ERK1/2), y luego fueron estimulados con HS 10  $\mu$ g/ml por 24 h. De forma similar a los ensayos anteriores, los resultados muestran que HS aumenta la expresión de ICAM-1 (Fig. 5D) y VCAM-1 (Fig. 6D). Sin embargo, en los FC pre-tratados con PD98059 y posteriormente con HS, los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 no son revertidos a nivel del control, permaneciendo aumentados (1.6-1.7 veces). Esto indicaría que la vía ERK1/2 no participa en el aumento de ICAM-1 y VCAM-1 en FC producido por HS.



**Fig. 5.** TLR4 junto con las vías PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B participan en el aumento de la expresión de ICAM-1 en FC, inducido por HS. Se pre-trataron FC con (A) TAK-242 (4  $\mu$ M), (B) LY294002 (10  $\mu$ M), (C) IMD-0354 (1  $\mu$ M) o (D) PD98059 (10  $\mu$ M) durante 1 h, y luego se estimularon con HS (10  $\mu$ g/ml) por 24 h. Los niveles de ICAM-1 se midieron por WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. Los resultados se expresan como promedio ( $\pm$  DS) de al menos 3 experimentos independientes (\*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001 vs control y ## $p$ <0.01; ### $p$ <0.001 vs HS).



**Fig. 6. TLR4 junto con las vías PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B participan en el aumento de la expresión de VCAM-1 en FC, inducido por HS.** Se pre-trataron FC con (A) TAK-242 (4  $\mu$ M), (B) LY294002 (10  $\mu$ M), (C) IMD-0354 (1  $\mu$ M) o (D) PD98059 (10  $\mu$ M) durante 1 h, y luego se estimularon con HS (10  $\mu$ g/ml) por 24 h. Los niveles de VCAM-1 se midieron por WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. Los resultados se expresan como promedio ( $\pm$  DS) de al menos 3 experimentos independientes (\*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001 vs control y ## $p$ <0.01; ### $p$ <0.001 vs HS).

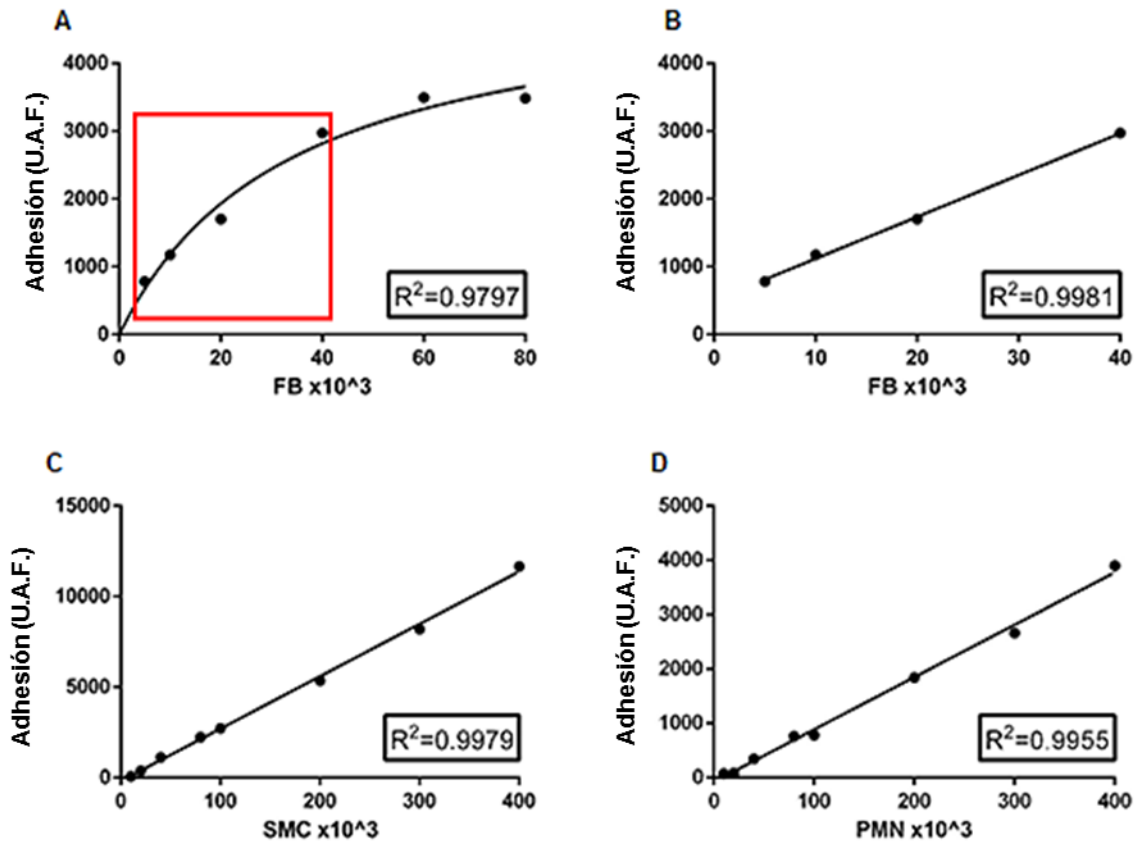
## 6.2 Estudios de adhesión de SMC y PMN a FC

Previo a los ensayos de adhesión se realizaron pruebas para determinar el número óptimo de FC a utilizar, como también el número óptimo de SMC y PMN a agregar sobre la monocapa de FC. Para esto, se sembraron en microplacas FluoroNunc™ cantidades crecientes de FC (desde 5000 a 80000 por pocillo) para luego ser estimuladas durante 24 h con HS 10  $\mu$ g/ml. A continuación, se agregaron 100000 PMN/pocillo marcados con calceína AM y se dejaron adherir durante 2 h, posteriormente se hizo un lavado suave



para retirar las células no adheridas y se midió la fluorescencia emitida, que corresponde a los PMN adheridos a la monocapa de FC. Los resultados (Fig. 7A) muestran una tendencia lineal entre FC sembrados y fluorescencia emitida hasta valores cercanos a 40000 FC, para luego llegar a una meseta donde se estanca el aumento de la fluorescencia. A continuación se tomaron los puntos previos al *plateau* y se realizó una regresión lineal. Se observa que entre 5000 y 40000 FC sembrados existe una relación lineal con buen coeficiente de correlación (Fig. 7B). Por esta razón, se eligió utilizar para los experimentos sucesivos 20000 FC/pocillo, un valor intermedio del rango.

Luego se realizó una curva de calibración para determinar la cantidad más adecuada de leucocitos a utilizar. Para ello, se sembraron 20000 FC/pocillo y se estimularon con HS 10 µg/ml por 24 horas. A continuación, se agregaron cantidades crecientes de SMC o PMN (desde 20000 a 400000) y se dejaron adherir durante 2 h. Luego se realizó un lavado para retirar las células no adheridas y se midió la fluorescencia emitida correspondiente a los leucocitos adheridos sobre la monocapa de FC. Los resultados indican nuevamente una relación lineal entre y fluorescencia, con excelente correlación tanto para SMC (Fig. 7C) y PMN (Fig. 7D). En base a estos datos, se eligió utilizar 100000 SMC/PMN por pocillo, para obtener una relación de 1:5 con los FC.



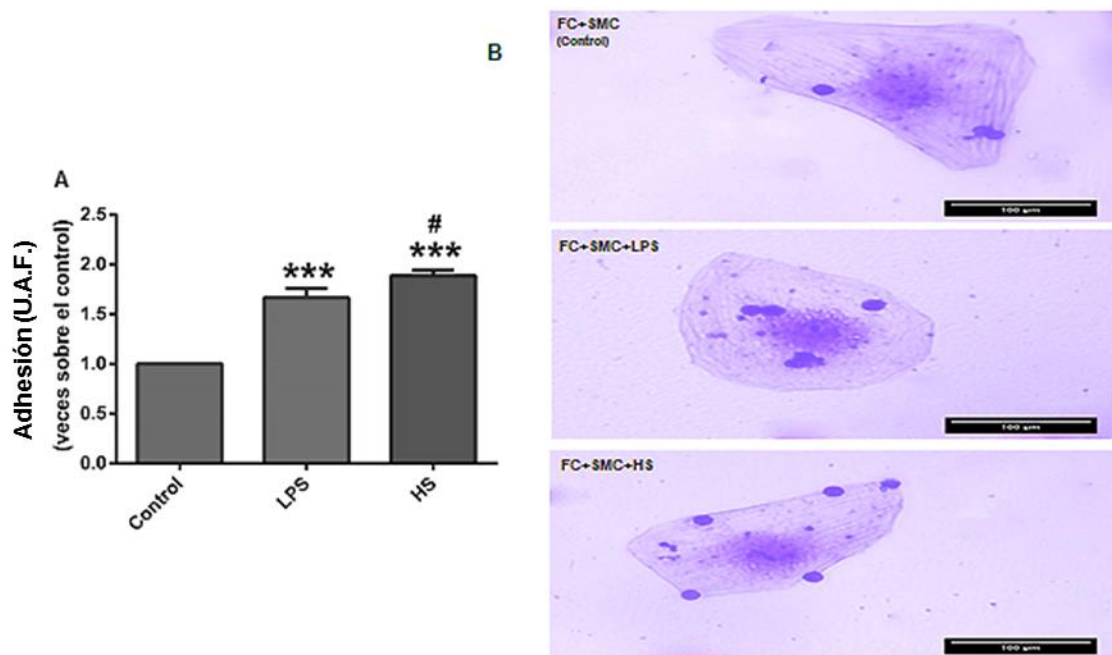
**Fig. 7. Estudios de adhesión de SMC y PMN a FC.** (A) Se sembraron cantidades crecientes de FC y se estimularon con HS (10 µg/ml) durante 24 horas. A continuación se co-incubaron con 100000 PMN y se realizó el ensayo de adhesión por 2 h según protocolo. (B) Se realizó una regresión lineal con los puntos previos al *plateau*, obteniendo buena correlación. Por esto se eligió para los ensayos posteriores un punto intermedio del rango lineal (20000 FC). Se sembraron 20000 FC/pocillo y se estimularon con HS (10 µg/ml) durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se co-incubaron con (C) SMC y (D) PMN por 2 h según la metodología descrita. Para ensayos posteriores se utilizará un valor intermedio del rango lineal (100000 SMC/PMN). Los resultados se expresan en U.A.F. (unidades arbitrarias de fluorescencia). Cada punto representa el promedio del triplicado de tres experimentos independientes.

### 6.3 Evaluación del efecto de LPS y HS en la adhesión de SMC y PMN a FC

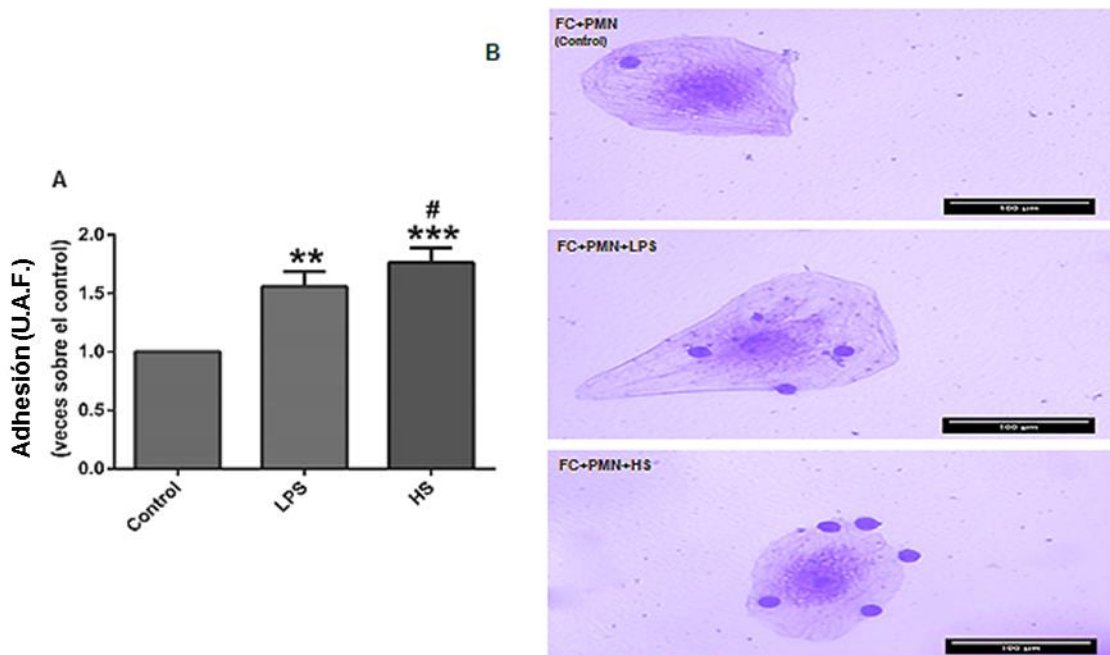
Para determinar el efecto de HS y LPS sobre la adhesión de SMC y PMN a FC, se realizaron ensayos de adhesión con FC estimulados previamente con LPS 1 µg/ml y HS 10 µg/ml durante 24 h. Transcurrido el tiempo, el medio de cultivo condicionado fue retirado completamente y reemplazado por medio fresco. Posteriormente se realizó el ensayo de adhesión según la metodología descrita. Los resultados obtenidos indican que tanto LPS como HS generan un aumento significativo en la adhesión de SMC (Fig. 8A) y PMN (Fig. 9A) sobre la monocapa de FC. Con HS y LPS se observó un aumento

estadísticamente significativo respecto de la condición control (1.8 veces sobre el control para HS; y 1.5-1.6 veces sobre el control para LPS).

Finalmente, este efecto en la adhesión de SMC y PMN se observó claramente en las imágenes obtenidas mediante tinción con cristal violeta (Fig. 8B y 9B). Se observa que los FC sin estimular poseen menor capacidad de adhesión tanto de SMC como de PMN respecto de aquellos estimulados con LPS y HS, siendo éstos datos consecuentes con los resultados obtenidos anteriormente.



**Fig. 8. LPS y HS aumentan la adhesión de células mononucleares de bazo a FC.** (A) Se sembraron 20000 FC/pocillo y estimularon con LPS (1 µg/ml) o HS (10 µg/ml). Transcurrido el tiempo, se retiró completamente el medio condicionado y se co-incubaron con SMC según protocolo. El análisis gráfico indica que tanto LPS como HS aumentan la adhesión de SMC a FC, obteniéndose un incremento significativamente mayor con HS. Los resultados se expresan como promedio ( $\pm$  DS) de al menos 3 experimentos independientes (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs control y # $p < 0.05$  vs LPS) y como U.A.F. (unidades arbitrarias de fluorescencia). (B). Imagen representativa de adhesión de SMC sobre una monocapa de FC en cultivo, obtenida mediante tinción con cristal violeta. Se aprecia que los FC estimulados con LPS y HS poseen mayor capacidad de adhesión de SMC.

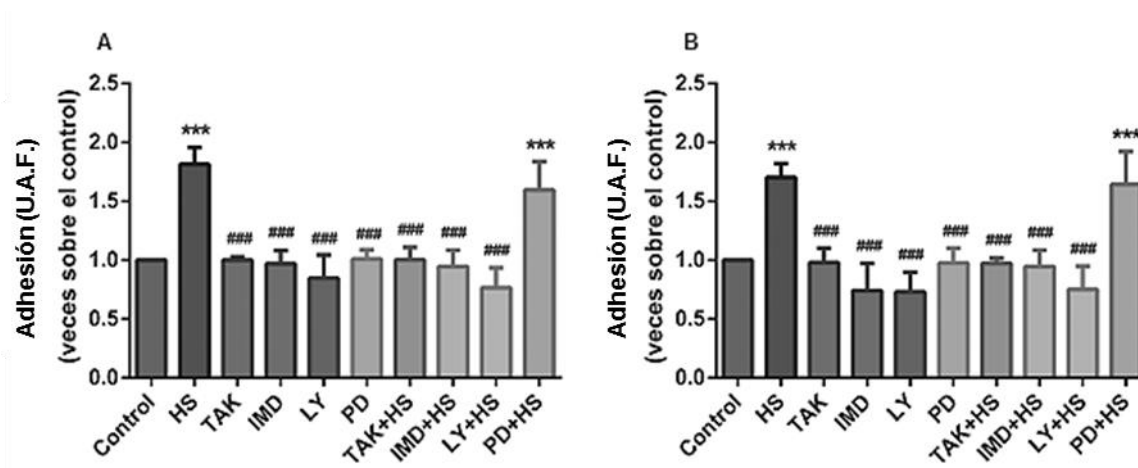


**Fig. 9. LPS y HS aumentan la adhesión de células polimorfonucleares de médula ósea a FC .** (A) Se sembraron 20000 FC/pocillo y estimularon con LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) o HS (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Transcurrido el tiempo, se retiró completamente el medio condicionado y se co-incubaron con PMN según protocolo. El análisis gráfico indica que tanto LPS como HS aumentan la adhesión de PMN a FC, obteniéndose un incremento significativamente mayor con HS. Los resultados se expresan como promedio ( $\pm$  DS) de al menos 3 experimentos independientes (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs control y # $p < 0.05$  vs LPS), y como U.A.F. (unidades arbitrarias de fluorescencia). (B). Imagen representativa de adhesión de PMN sobre una monocapa de FC en cultivo, obtenida mediante tinción con cristal violeta. Se aprecia que los FC estimulados con LPS y HS poseen mayor capacidad de adhesión de PMN.

### 6.3.1 Participación de TLR4 y de las vías transduccionales PI3K/Akt, NF- $\kappa$ B y ERK1/2 en el aumento de la adhesión de SMC y PMN a FC, inducido por HS

Ha quedado en evidencia que tanto HS como LPS activan estas vías transduccionales para aumentar la expresión de las proteínas de adhesión. Por lo tanto, se evaluó su señalización en la adhesión de SMC y PMN, inducida por HS. Para ello, se realizaron ensayos de adhesión utilizando inhibidores de TLR4 (TAK-242 4  $\mu\text{M}$ ) y las vías PI3K/Akt (LY294002 10  $\mu\text{M}$ ), NF- $\kappa$ B (IMD-0354 1  $\mu\text{M}$ ) y ERK1/2 (PD98059 10  $\mu\text{M}$ ). Los FC fueron pre-tratados con los inhibidores durante 1 h, y posteriormente estimulados con HS 10  $\mu\text{g/ml}$  durante 24 h. Transcurrido el tiempo, se realizó el ensayo de adhesión con SMC y PMN según protocolo. Los resultados muestran que nuevamente HS induce un aumento en la adhesión de SMC (1.7-1.8 veces) (Fig. 10A) y PMN (1.5-1.6 veces) (Fig.

10B) sobre el control; mientras que el pre-tratamiento con inhibidores revirtió ese incremento, con tendencia a valores menores al control en el caso de las vías PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B. La inhibición de la vía ERK1/2 no tuvo efecto en la adhesión, conservándose el incremento gatillado por HS (1.6 veces para SMC, 1.5 veces para PMN). Estos resultados muestran la participación de TLR4 y las vías PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B en la adhesión de SMC y PMN. Además, guardan relación con lo observado en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, sugiriendo una posible dependencia de estas proteínas de adhesión. Los siRNA disminuyen la expresión de ambas CAMs entre un 60-70%, comprobándose su efectividad [Humeres y cols., 2016].

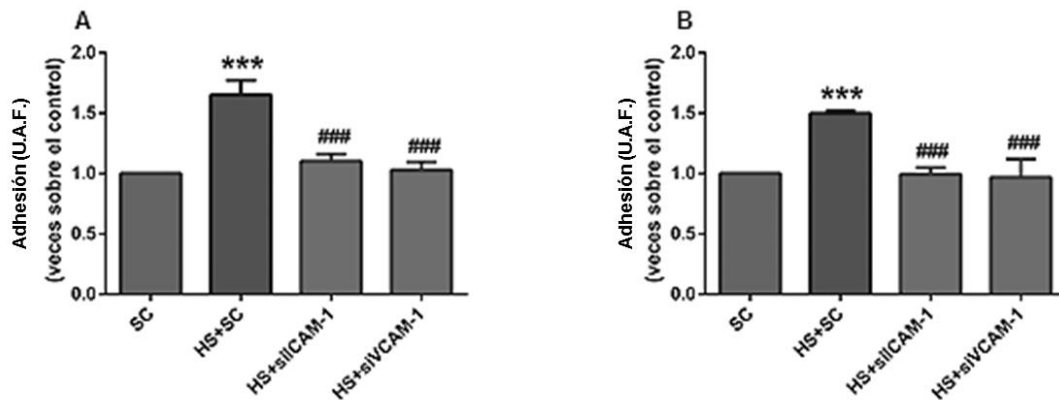


**Fig. 10.** TLR4 junto con las vías PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B participan en el aumento de la adhesión de células mononucleares de bazo y polimorfonucleares de médula ósea a FC, inducido por HS. Se pre-trataron FC con TAK-242 (4  $\mu$ M), LY294002 (10  $\mu$ M), IMD-0354 (1  $\mu$ M) o PD98059 (10  $\mu$ M) durante 1 h, y luego se estimularon con HS (10  $\mu$ g/ml) por 24 h. Transcurrido el tiempo se realizó el ensayo de adhesión con SMC o PMN según metodología. El análisis gráfico indica que la inhibición de TLR4, PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B revierte el incremento en la adhesión de SMC (A) y PMN (B) generado por HS. La vía ERK1/2 no tiene efecto sobre este aumento. Los resultados se expresan como promedio ( $\pm$  DS) de al menos 3 experimentos independientes (\*\*\*) $p$ <0.001 vs control y (###) $p$ <0.001 vs HS, y como U.A.F. (unidades arbitrarias de fluorescencia).

### 6.3.2 Participación de ICAM-1 y VCAM-1 en el aumento de la adhesión de SMC y PMN a FC, inducido por HS

Para corroborar la dependencia de ICAM-1 y VCAM-1 en la adhesión de leucocitos a FC se realizaron experimentos de *knockdown* de estas proteínas mediante el uso de siRNA. Para ello, los FC fueron pre-tratados con siRNA contra ICAM-1 y VCAM-1 de

acuerdo a la metodología descrita, para luego ser estimulados con HS 10  $\mu\text{g/ml}$  durante 24 h. Transcurrido el tiempo, los FC se co-incubaron con SMC o PMN según protocolo de ensayo de adhesión. Los resultados obtenidos muestran que tanto para SMC (Fig. 11A) y PMN (Fig. 11B) el silenciamiento de ICAM-1 o VCAM-1 disminuyó la adhesión a niveles cercanos al control. Estos resultados demuestran que la adhesión de SMC y PMN a FC mediada por HS es dependiente de ICAM-1 y VCAM-1..



**Fig. 11. ICAM-1 y VCAM-1 participan en la adhesión de células mononucleares de bazo y polimorfonucleares de médula ósea a FC, inducido por HS.** Los FC fueron pre-tratados con siRNA contra ICAM-1 y VCAM-1 de acuerdo a la metodología descrita, para luego ser estimulados con HS 10  $\mu\text{g/ml}$  durante 24 h. Transcurrido el tiempo, fueron co-incubados con SMC o PMN según protocolo. Los datos indican que al silenciar tanto ICAM-1 como VCAM-1 la adhesión de SMC (A) y PMN (B) disminuye a niveles cercanos al control. Los resultados se expresan como promedio ( $\pm$  DS) de al menos 3 experimentos independientes (\*\*\* $p < 0.001$  vs SC y ### $p < 0.001$  vs HS+SC), y como U.A.F. (unidades arbitrarias de fluorescencia).

#### **6.4 Evaluación del efecto de la adhesión de SMC y PMN, inducida por HS, sobre la expresión de $\alpha$ -SMA en los FC.**

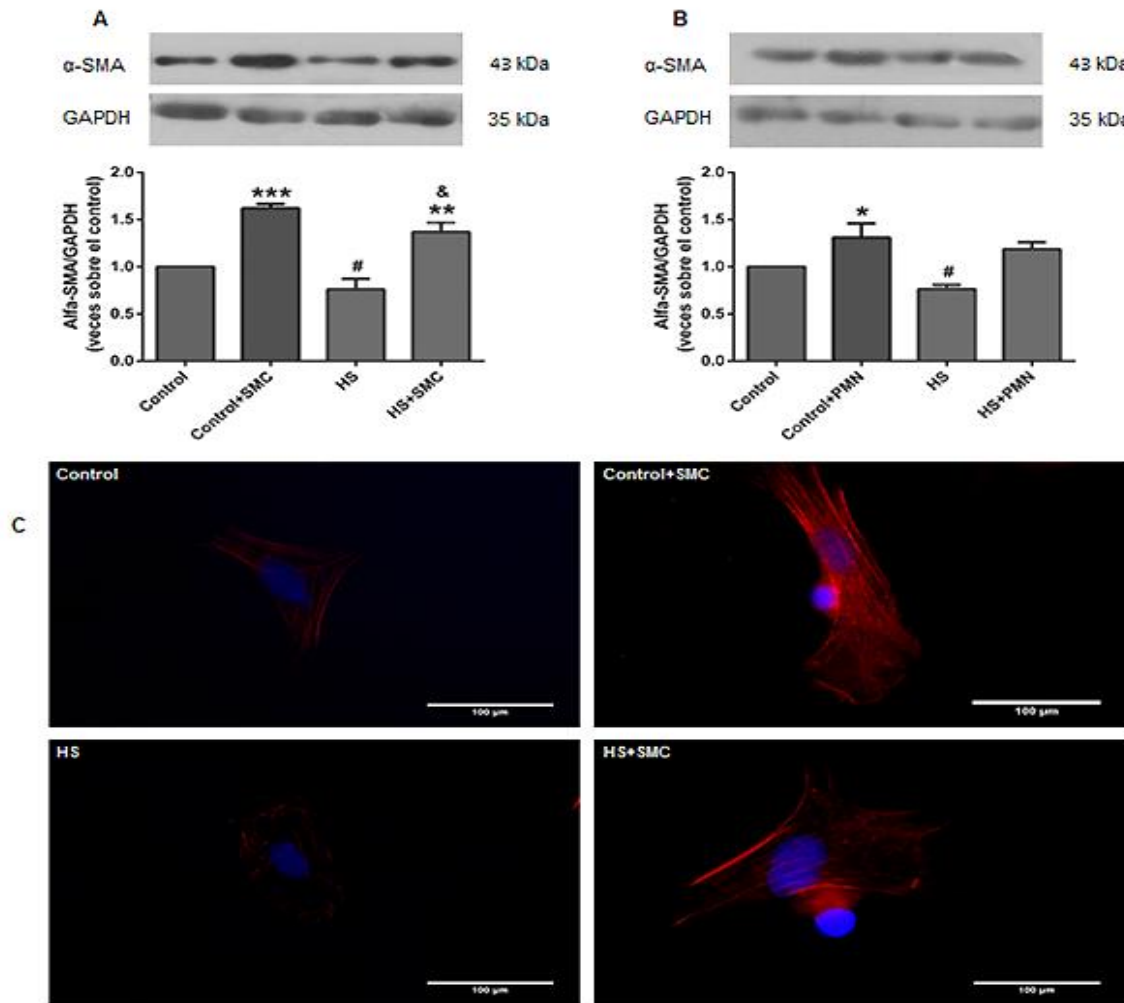
Si bien los datos obtenidos revelan el efecto positivo de HS en la adhesión de SMC y PMN a FC, se desconoce si esta interacción tiene un efecto en los FC, a nivel de fenotipo o expresión de proteínas estructurales. Por esta razón, se estimularon FC con HS 10  $\mu\text{g/ml}$  durante 24 h, y luego se realizó un ensayo de adhesión con SMC y PMN de acuerdo al protocolo, aumentando el tiempo de adhesión de 2 a 72 h. Transcurrido el tiempo, los FC se lavaron con PBS 4 veces para retirar la mayor cantidad de leucocitos adheridos y se examinaron los niveles de  $\alpha$ -SMA en la monocapa de FC mediante WB.

Para la adhesión de SMC (Fig. 12A), se aprecia que primero, la co-incubación de FC con SMC aumenta los niveles de  $\alpha$ -SMA 1.6-1.7 veces respecto del control. Segundo, HS disminuye la expresión de  $\alpha$ -SMA 0.3-0.4 veces respecto de los FC sin estimular. Tercero, la co-incubación de FC estimulados con HS y SMC aumenta la expresión de  $\alpha$ -SMA 1.3 veces respecto del control, observándose una disminución significativa comparada a los FC sin estimular co-incubados con SMC. Esto deja en evidencia que HS si bien aumenta la adhesión de leucocitos a FC, ejerce un efecto inhibitorio en la expresión de  $\alpha$ -SMA al interior de la célula.

En relación a la co-incubación con PMN (Fig. 12B), se observa nuevamente el efecto inhibitorio del HS respecto de los niveles de expresión de  $\alpha$ -SMA en los FC, induciendo una disminución de 0.4 veces respecto del control. Por otro lado, se observa que la co-incubación de los FC con PMN induce un aumento en los niveles de expresión de  $\alpha$ -SMA, aunque este efecto es marcadamente menor en comparación al co-cultivo con SMC. Finalmente, el aumento en la expresión de  $\alpha$ -SMA inducida por la adhesión de PMN sobre los FC se ve revertido cuando se incuban los FC tratados con HS y posteriormente con PMN, a niveles no significativos comparados con el co-cultivo de FC incubados con PMN.

Para profundizar en los resultados obtenidos, se realizaron experimentos por inmunocitoquímica para evaluar si los cambios en los niveles de expresión de  $\alpha$ -SMA se correlacionan con cambios a nivel del ensamblaje de estas proteínas para formar las fibras de estrés. Los resultados obtenidos desde las imágenes muestran que los FC expresan bajos niveles de expresión y ensamblaje de  $\alpha$ -SMA en fibras de estrés. Por otro lado, se observa que HS disminuye los niveles de expresión y ensamblaje de  $\alpha$ -SMA (menor coloración roja y menor cantidad de fibras). Sin embargo, en el co-cultivo de FC con SMC se observa un aumento en la expresión y ensamblaje de  $\alpha$ -SMA en las fibras de

estrés. Finalmente, la expresión y ensamblaje de  $\alpha$ -SMA en FC pre-tratados con HS y posteriormente co-cultivados con SMC fue disminuida respecto de los niveles inducidos solo por el co-cultivo; sin embargo, fue mayor a aquellos inducidos solo con HS (Fig. 12C).



**Fig. 12. HS revierte el aumento de  $\alpha$ -SMA gatillado por la adhesión de células mononucleares de bazo y polimorfonucleares de médula ósea a FC.** Se estimularon FC con HS 10  $\mu$ g/ml durante 24 h, y luego se realizó un ensayo de adhesión con SMC y PMN de acuerdo al protocolo, aumentando el tiempo de adhesión de 2 a 72 h. Transcurrido el tiempo, se examinaron los niveles de  $\alpha$ -SMA mediante WB. Se aprecia que la co-incubación con SMC (A) aumenta los niveles de  $\alpha$ -SMA y que HS disminuye la expresión de  $\alpha$ -SMA comparados con los FC sin estimular. La co-incubación de FC estimulados con HS y SMC aumenta la expresión de  $\alpha$ -SMA a niveles inferiores comparados con los FC sin estimular co-incubados con SMC. En la co-incubación con PMN (B) se observa nuevamente el efecto inhibitorio de HS en FC y en el co-cultivo con PMN, a niveles no significativos. La expresión de  $\alpha$ -SMA es marcadamente mayor en co-cultivos con SMC. Los resultados se expresan como promedio ( $\pm$  DS) de al menos 3 experimentos independientes (\* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001 vs control, # $p$ <0.05 vs control, & $p$ <0.05 vs control + SMC). Mediante inmunocitoquímica (C) se reafirman los resultados obtenidos en (A), con una menor expresión de  $\alpha$ -SMA ante el estímulo con HS, traducido en un menor tamaño comparado con los controles respectivos.



## **7. DISCUSIÓN**

En el presente trabajo se investigaron los efectos de HS en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC, las vías transduccionales involucradas, las consecuencias de este cambio en la adhesión de SMC y PMN a FC; y finalmente, las consecuencias de la interacción física sobre los FC co-cultivados con SMC y PMN. Los resultados obtenidos indican que primero, HS induce un aumento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC; segundo, este aumento se debe a la activación del TLR4 y las vías PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B; tercero, HS induce un incremento en la adhesión de SMC y PMN a FC; cuarto, este incremento en la adhesión depende de la activación del TLR4 y las vías PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B; quinto, la adhesión a FC de SMC más que de PMN, gatilla el incremento en la expresión de  $\alpha$ -SMA, en FC estimulados con HS

### **7.1 Aumento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC, inducida por HS**

En FC, ICAM-1 y VCAM-1 están expresadas constitutivamente, pero durante un evento inflamatorio cardíaco se ha visto un aumento en la expresión de CAMs, que se ha asociado a la infiltración y activación de leucocitos al sitio de injuria. Tal incremento se ha reportado al estimular células cardíacas con LPS, IL-1, TGF- $\beta$ , ésteres de forbol, entre otros [Frangogiannis, 2008]. Es de interés estudiar los efectos de HS, puesto que es un ligando endógeno para TLR4, y representaría de mejor manera lo que ocurre en eventos de inflamación estéril; mientras que LPS es un ligando exógeno para TLR4 y está más relacionado con miocarditis bacteriana [Turner, 2016].

Los resultados obtenidos muestran que LPS y HS aumentan la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en el FC, efectos vistos en células endoteliales estimuladas con LPS [Feng y cols., 2014]. Este incremento en las CAMs se ha reportado además en

cardiomiocitos y FC estimulados con HS escindido de sindecanos [Strand y cols., 2015]. Conjuntamente, se ha demostrado que HS también aumenta la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias en células dendríticas y tejido pancreático [Johnson y cols., 2001; Akbarshahi y cols., 2011], reafirmando el rol de HS como DAMPs.

Cabe destacar que LPS aumenta de forma significativa la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en relación a HS, pero este incremento no es comparable entre ambos estímulos dada la diferencia de concentraciones (HS está 10 veces más concentrado). De todas formas, la diferencia en la magnitud de respuesta ante un agente de origen patógeno muestra claramente la potencia del LPS para la activación del TLR4, como así la especificidad (LPS es agonista completo, HS agonista parcial). El LPS utilizado en el laboratorio es ultrapuro y agonista específico de TLR4, mientras que HS también es un agonista, pero quizás su especificidad es menor. La respuesta inflamatoria a un patógeno es más marcada desde el punto de vista de la inflamación aguda; mientras que frente a señales de daño celular, que son sostenidas en el tiempo y tienen un carácter más crónico será menos intensa, aunque ello dependerá del grado de daño tisular [Akbarshahi y cols., 2011]. En el corazón, se ha demostrado que la degradación crónica de MEC lleva a una generación continua de proteoglicanos de heparán sulfato, que podrían activar receptores del sistema inmune innato como TLR4. Esto conduciría a una respuesta inflamatoria crónica, generando síntesis de proteínas de adhesión, reclutamiento de leucocitos y remodelamiento cardíaco. [Strand y cols., 2015].

Luego de medir el aumento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC inducido por HS, se procedió a estudiar las vías involucradas en el proceso. Es de interés además reforzar la participación de TLR4 en este incremento, pues también se ha visto la participación de TLR2 el aumento de ICAM-1 y VCAM-1 en células cardíacas [Xie y cols., 2016]. Los resultados obtenidos indican que al inhibir el receptor TLR4 utilizando TAK-

242, efectivamente los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 disminuyen a niveles comparables con el control. La dependencia de TLR4 en el aumento de CAMs se ha reportado además en células sinoviales [Wu y cols., 2010], endoteliales [Feng y cols., 2014] y renales [Lee y cols., 2012]. TLR4 está ampliamente expresado en el corazón e inducido durante un infarto al miocardio [Frantz y cols.1999], y ratones TLR4<sup>-/-</sup> para este receptor tienen menor tamaño de injuria y parámetros inflamatorios que los WT, dejando en claro su rol en el sistema inmune innato del corazón [Oyama y cols., 2004].

PI3K y su blanco río-abajo Akt son una familia de proteínas transduccionales involucradas en la activación celular, respuestas inflamatorias y apoptosis. La activación de la vía PI3K/Akt juega un rol crítico en la protección cardíaca durante el precondicionamiento contra daño por I/R [Cao y cols., 2013]. Además, Akt regula parcialmente los efectos protectores de IGF-1 en el corazón [Vivar y cols., 2012]. Para evaluar la participación de estas vías en la expresión de CAMs gatillada por HS, se utilizó el inhibidor LY294002. Los resultados indican que la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 es inhibida a niveles de control, revirtiendo los efectos de HS en el aumento de las CAMs y coincidiendo con estudios en células de epitelio alveolar [Cho y cols., 2016] y corazones de ratón estimulados con LPS [Zhou y cols., 2011].

NF-κB es un factor de transducción dimérico existente de forma inactiva en el citoplasma, unido a IκB. Controla la transcripción de ADN, producción de citoquinas y sobrevivencia celular [Lawrence, 2009]. La exposición de la célula a LPS, ésteres de forbol o citoquinas inflamatorias gatilla la activación de NF-κB y posterior translocación al núcleo. Como parte de la vía transduccional de TLR4, es de interés conocer su participación en la expresión de CAMs en el FC. Para este objetivo, se utilizó su inhibidor, IMD-0354. Los datos obtenidos muestran que la inhibición de NF-κB anula completamente el aumento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 generado por HS. Estos datos concuerdan con los

obtenidos previamente en nuestro laboratorio utilizando LPS como ligando de TLR4, y en estudios realizados en pericitos humanos estimulados con LPS [Guijarro-Muñoz y cols., 2014] y en células endoteliales estimuladas con oxLDL, otro ligando de TLR4 [Feng y cols., 2014]. No obstante, NF- $\kappa$ B forma parte de otras rutas de señalización, como la de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  que son liberados por el FC [Turner y cols., 2011], pudiendo tener alguna incidencia en los resultados obtenidos.

Las (ERK) quinasas MEK1 y MEK2 juegan un rol en la vía de las MAPK, que controlan el crecimiento celular y diferenciación. Son activadas por una amplia variedad de factores de crecimiento, citoquinas y despolarización de membrana, mediante influjo de calcio [Crews y cols., 1992]. Finalmente, se observó la participación de la vía ERK1/2 utilizando su inhibidor PD98059. Los resultados indican que la inhibición de esta vía no tiene efecto sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC, manteniendo el aumento gatillado por HS e incluso aumentando de forma no estadísticamente significativa la expresión de VCAM-1 junto a HS. Estos datos se oponen a los resultados encontrados en células endoteliales [Jiang y cols., 2013] y líneas celulares de cáncer mamario [Park y cols., 2015], todas estimuladas con LPS, donde la inhibición de ERK1/2 disminuye la expresión de ambas CAM. Las diferencias pueden deberse a que en estos modelos se emplean células humanas, mientras que las usadas en este trabajo son de ratas adultas. Estas divergencias entre especies ya han sido revisadas en otras publicaciones [Mestas y Hughes, 2004]. Cabe destacar que el aumento en la expresión de VCAM-1 al inhibir las ERK1/2 se ha reportado previamente en fibroblastos gingivales estimulados con TNF- $\alpha$ , lo que deja en evidencia la importancia en el balance de citoquinas y diversidad de señalización en la expresión de CAMs [Hosokawa y cols., 2006].

## **7.2 Aumento en la adhesión de SMC y PMN a FC, inducida por HS**

En presencia de un infarto al miocardio (MI), la necrosis de cardiomiocitos pone en marcha una cascada inflamatoria que sirve para limpiar la zona dañada de células muertas, como también reparar y cicatrizar el tejido dañado. De esta forma, la reparación cardíaca post-MI está íntimamente relacionada con la respuesta inflamatoria. La cicatrización del infarto puede ser dividida en tres fases: fase inflamatoria, fase proliferativa y fase de maduración. Durante la fase inflamatoria, activación de citoquinas y quimioquinas resulta en el reclutamiento de leucocitos al área infartada [Turner y cols., 2011]. Neutrófilos y macrófagos limpian la zona de restos celulares, y macrófagos activados liberan citoquinas y factores de crecimiento, llevando a la formación de tejido de granulación. En esta etapa, se suprime la expresión de mediadores inflamatorios, mientras que los FC y células endoteliales continúan proliferando. Durante la etapa proliferativa, los MFC activados secretan elementos constituyentes de la MEC, y al mismo tiempo la activación de células endoteliales permite la angiogénesis formándose una extensa red microvascular para suplir de nutrientes y oxígeno a las células presentes en la zona dañada. Finalmente, en la etapa de maduración los MFC entran en apoptosis y se forma una cicatriz de colágeno. En consecuencia, la región infartada es dinámica y múltiples elementos celulares participan en una sucesión de eventos ordenados [Frangogiannis, 2006].

La interacción entre los fibroblastos y leucocitos ha sido estudiada en células de diversos orígenes, como fibroblastos de pulmón [Hogaboam y cols., 1997], renales [Hao y cols., 2003] y gingivales [Murakami y cols., 1997]. Estas interacciones modulan el grado de inflamación en esos tejidos y podrían determinar el nivel de fibrosis que se alcanzará en ese tejido. Está ampliamente documentado que dentro de las primeras horas post-MI, el influjo de leucocitos al tejido cardíaco cumple un rol crucial en el remodelamiento

[Frangogiannis, 2008]. El estudio de las interacciones FC-leucocito, gatilladas por HS, puede arrojar nuevos antecedentes sobre intervenciones para modular la inflamación ante estos eventos.

En primer lugar, se determinó el efecto de la adhesión de SMC y PMN a FC estimulados con HS. Los resultados indican que al estimular FC por 24 h con HS, aumenta la adhesión de SMC; y el estímulo con LPS genera un aumento similar, pero menos significativo que HS. Estos resultados tienen congruencia con los encontrados en fibroblastos intestinales [Chakravorty y Kumar, 1999] y sinoviales [Chi y cols., 2014], que al ser estimulados con LPS son capaces de adherir un mayor número de PBMC. En relación a los PMN, también se aprecia un aumento en la adhesión de éstas células a los FC estimulados con HS y LPS, y nuevamente existe un aumento significativo que favorece a HS. Estudios en fibroblastos derivados de ligamento periodontal [Deguchi y cols., 1990] y pulmonares [Burns y cols., 1996] evidencian una mayor adhesión de neutrófilos al estimular los fibroblastos con LPS, dando cuenta de la importancia del TLR4 en las etapas iniciales del proceso inflamatorio asociado a patógenos. Sin embargo, este trabajo muestra por primera vez el incremento en la adhesión de SMC y PMN a FC estimulados con HS, entregando nueva información sobre el rol del TLR4 en un evento de inflamación estéril en el tejido cardíaco.

De acuerdo a los resultados anteriores, destaca la mayor capacidad de FC estimulados con HS para adherir leucocitos, que estaría dependiendo del aumento de CAMs. El mayor incremento en la adhesión que favorece a HS podría estar relacionado a la capacidad de cadenas solubles de HS para gatillar la síntesis de sindecano-4 [Strand y cols., 2015], constituyente de la membrana celular que interacciona con L-selectina en leucocitos y refuerza la adhesión [Parish, 2006]. Otro punto a destacar es la menor adhesión de PMN comparada con SMC, que podría deberse a la baja viabilidad de los

neutrófilos como a la temperatura del medio [Price y Dale, 1977]. La calceína AM (acetoximetil) es desacetilada al interior de las células, generando el compuesto activo. No obstante, si la célula está muerta o entró en procesos apoptóticos no habrá fluorescencia. Además, si los tiempos de ensayo son muy largos puede haber eliminación de calceína al medio de cultivo, generando una lectura errónea [Wilhelmsen y cols., 2013].

Luego se procedió a evaluar las vías involucradas en la adhesión de SMC y PMN a FC estimulados con HS. De forma análoga a la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, al inhibir TLR4 junto con las vías PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B se aprecia una disminución en la adhesión de leucocitos, a niveles cercanos al control e incluso más bajos para PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B, resultados apoyados por estudios que dan cuenta de la dependencia de estas vías en la adhesión de PMN a endotelio cardíaco [Li y cols., 2009] y PBMC a endotelio pulmonar [Chen y cols., 2014]. La unión de ligandos al TLR4 gatilla la fosforilación y activación de Akt y NF- $\kappa$ B, por lo que la inhibición del receptor o los factores de transcripción río-abajo provocará una disminución en la expresión de CAMs, teniendo impacto en la adhesión de leucocitos. Los niveles más bajos de adhesión respecto del control en la inhibición de PI3K/AKT y NF- $\kappa$ B pueden deberse a otros mecanismos de expresión de CAMs independientes de TLR4 y que involucran a las vías mencionadas, como señalización dependiente de Akt-eNOS, NADPH oxidasa y  $Ca^{+2}$  [Sakamoto y cols., 2009; Yan y cols., 2015].

El tráfico de leucocitos al sitio de injuria cardíaca está regulado por la cascada de adhesión leucocitaria. En condiciones fisiológicas el proceso consta de tres etapas: la captura de leucocitos desde el torrente sanguíneo mediado por selectinas y posterior rodamiento en el endotelio, la unión firme mediada por miembros de la IgSF que interactúan con sus contrareceptores en leucocitos, y finalmente la transmigración a través del endotelio. Sin embargo, frente a una injuria tisular la migración de leucocitos se

ve facilitada y no dependiente de la adhesión al endotelio. La adhesión de leucocitos es dependiente de las interacciones de las integrinas leucocitarias como VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1/7$ ), Mac-1 ( $\alpha M\beta 2$ ) y LFA-1 ( $\alpha L\beta 2$ ) y sus contrareceptores en células endoteliales y FC tales como ICAM-1 y VCAM-1. Mientras que VCAM-1 interactúa con VLA-4, ICAM-1 lo hace con las integrinas  $\beta 2$  [Bevilacqua y cols., 1994].

En base a los resultados obtenidos, que apuntan a la dependencia de ICAM-1 y VCAM-1 en la adhesión de SMC y PMN, se evaluó la participación de ambas CAM utilizando FC pre-tratados con siRNA y posterior estimulación con HS. Previamente en el laboratorio se ha demostrado una efectiva reducción de los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 cuando se utilizan los siRNA. Los resultados indican que al silenciar tanto ICAM-1 como VCAM-1 se genera una disminución a niveles basales de la adhesión de SMC y PMN. Se ha reportado previamente la participación de ICAM-1 y VCAM-1 en la adhesión de monocitos a fibroblastos dérmicos y gingivales [Murakami y cols., 1997; Cabanas y Hogg, 1991], y de ICAM-1 en la adhesión de neutrófilos a FC [Frangogiannis, 2008]. Sin embargo, el rol de VCAM-1 en la adhesión de neutrófilos no está muy explorado salvo en células endoteliales [Lomakina y Waugh, 2009], por lo tanto, este trabajo entrega nuevos datos en relación a esta CAM. La disminución de la adhesión al silenciar ICAM-1 y VCAM-1 no desciende a niveles más bajos porque el siRNA no silencia totalmente las proteínas de adhesión, sino en un 60-70% [Humeres y cols., 2016]. Además, en todos los experimentos realizados se trata de evitar la activación previa de los leucocitos al retirar el medio de cultivo con LPS o HS con el fin de evaluar sólo el efecto de los estímulos en el FC, pero cabe la posibilidad de que condiciones de manipulación, temperatura o concentración de iones en el medio gatille la activación de SMC y PMN, aumentando la adhesión de éstos a FC [Lomakina y Waugh, 2009; Frangogiannis, 2008].



### **7.3 Disminución en la expresión de $\alpha$ -SMA en FC adheridos a SMC y PMN, inducida por HS**

Una injuria cardíaca ocasionada por MI gatilla la degradación de la MEC, llevando al desarrollo de fibrosis intersticial y dilatación del ventrículo izquierdo. Los FC residentes son los responsables del mantenimiento de la homeostasis de la MEC. Luego de una injuria en el tejido cardíaco estas células experimentan diferenciación fenotípica a MFC, caracterizados por mayor expresión de  $\alpha$ -SMA, que le otorga propiedades contráctiles necesarias para llevar a cabo el proceso de contracción tisular y secreción de citoquinas pro-fibróticas [Rosenkranz, 2004]. En este estado, los MFC alteran el balance entre liberación de MMPs y síntesis de colágeno, resultando en la formación de la cicatriz [Frangogiannis, 2006]. Durante las etapas iniciales de la cicatrización post-MI, este proceso es adaptativo, otorgando integridad estructural a tejidos necróticos para prevenir complicaciones mecánicas del MI, como ruptura ventricular. Sin embargo, la activación crónica y sostenida de MFC puede resultar en la desregulación de la MEC, arritmia y falla cardíaca [Opie y cols., 2006].

Distintos tipos de leucocitos están íntimamente relacionados en este proceso. La infiltración de neutrófilos en las primeras horas post-MI ayuda a limpiar restos de tejido necrótico y reclutar más leucocitos, pero a la vez exacerban la lesión de los cardiomiocitos y aumentan el tamaño de infarto [Frangogiannis, 2008]. La posterior llegada de monocitos al sitio de infarto regula la homeostasis de la MEC y función de los MFC dos factores claves en la progresión de la fibrosis [Yamamoto y cols., 2000]. Los linfocitos, últimos en llegar, son esenciales en la diferenciación de FC a MFC y formación de MEC, mediante la liberación de IL-13 y TGF- $\beta$  [Faloon y cols., 2000; François y cols., 2013]. Con estos antecedentes y los resultados obtenidos anteriormente, es de interés averiguar cuál es el

efecto de la adhesión de SMC y PMN en FC, inducida por HS, en la expresión de  $\alpha$ -SMA, un parámetro que indica la diferenciación de FC a MFC.

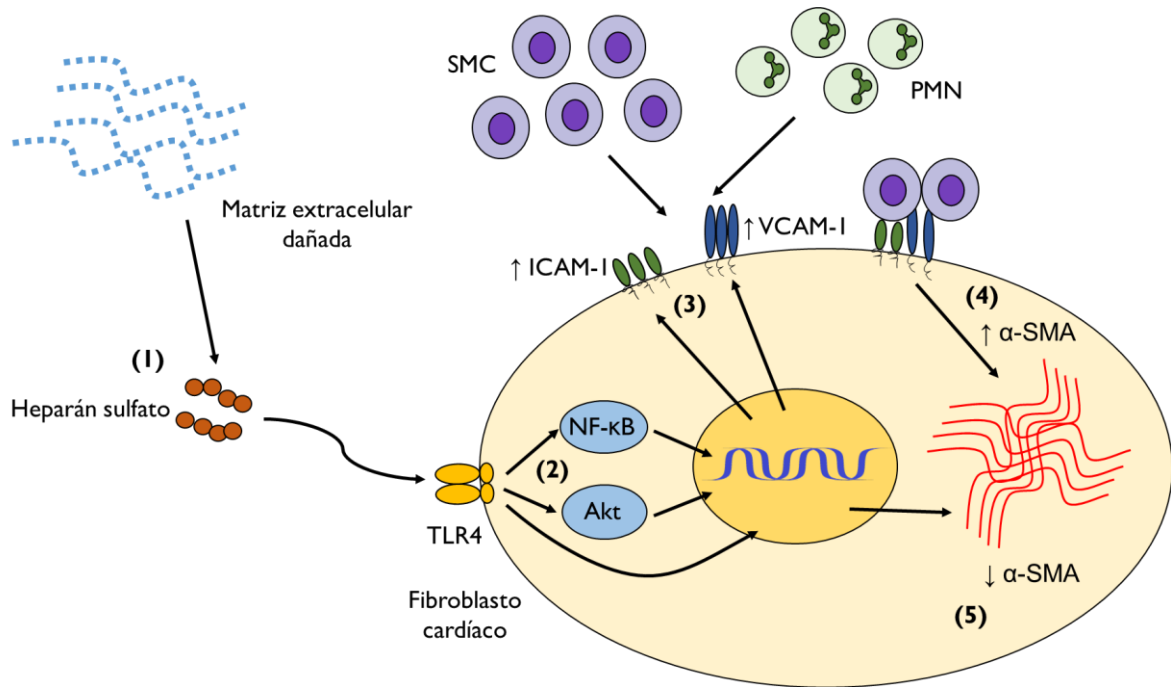
Los datos obtenidos indican que la estimulación de FC con HS induce una menor expresión de  $\alpha$ -SMA. En nuestro laboratorio se demostró que LPS reduce la expresión de  $\alpha$ -SMA, revirtiendo el fenotipo de MFC a FC, que indicaría la capacidad de la activación del TLR4 para revertir un proceso fibrótico [Santana et al, 2013; Landaeta, 2014]. Esta disminución de  $\alpha$ -SMA se ha reportado también en MFC que sobreexpresan sindecano-4, reduciendo la progresión del MI e infiltración de leucocitos [Xie y cols., 2012]. La co-incubación de FC con SMC evidencia un aumento estadísticamente significativo en los niveles de  $\alpha$ -SMA, resultados obtenidos anteriormente en co-cultivo de FC con monocitos [Mewhort y cols., 2016] y fibroblastos dérmicos con linfocitos B [François y cols., 2013]. Sin embargo, otros estudios indican lo contrario, donde monocitos ejercen un efecto anti-fibrótico en tejido pulmonar [Tsutamoto et al, 1998], indicando las diferencias entre tejidos y tipo de leucocito con el que interacciona. Además, nuestro laboratorio demostró que los FC y MFC secretan mayores niveles de TGF- $\beta$ 2 por sobre los niveles de TGF- $\beta$ 1 y tanto en FC como en MFC LPS no afecta los niveles de expresión de TGF- $\beta$ , sugiriendo que el aumento en la expresión de  $\alpha$ -SMA está regulado por la adhesión de SMC al FC y no por la activación del TLR4.

La co-incubación de FC estimulados con HS y SMC produce un aumento de  $\alpha$ -SMA, pero estadísticamente menos significativo que en los FC sin estimular con SMC. Se esperaría que el estímulo de HS, al inducir mayor aumento de ICAM-1 y VCAM-1 y adhesión de SMC, gatillaría un incremento más marcado en la expresión de  $\alpha$ -SMA, pero el efecto de HS por sí solo en el FC no permite que se diferencie a MFC, manteniendo un perfil más pro-inflamatorio. Esta reducción en los niveles de  $\alpha$ -SMA en los MFC podría

indicar que este tipo celular tendría menor capacidad para contraer a zona dañada, pero sería necesario realizar experimentos de contracción de colágeno para demostrarlo.

En relación a los datos obtenidos en el co-cultivo con PMN, se evidencia nuevamente el efecto de HS por sí solo, pero la co-incubación de PMN con FC en presencia/ausencia de HS no muestra un incremento importante en la expresión de  $\alpha$ -SMA, que indicaría la ausencia de participación de los PMN en la diferenciación a MFC. Sin embargo, no se puede decir que los PMN carecen de rol pro-fibrótico. El co-cultivo con neutrófilos en modelos de esclerosis sistémica [Barnes y cols., 2012] y fibrosis hepática [136] evidencia efectos pro-fibróticos directos de neutrófilos mediante la liberación de ROS, MMPs y catepsina [Van Linthout y cols., 2014], que alteran la composición de la MEC, e indirectos mediante la activación de elementos celulares como macrófagos [Lefkowitz y Lefkowitz, 2001]. En este trabajo se evaluó el efecto pro-fibrótico de la adhesión de PMN a FC solamente en base a la expresión de  $\alpha$ -SMA, por lo que no se tomó en cuenta otros efectos.

En resumen, estos resultados muestran por primera vez el rol dual de HS, aumentando la adhesión de SMC y PMN a FC, y a la vez disminuyendo la expresión de  $\alpha$ -SMA. Esta función, aparentemente antagónica, tiene sentido durante el inicio de la inflamación post-MI, donde es importante que leucocitos lleguen a la zona de injuria y se adhieran a los FC para limpiar los restos celulares y liberar factores que degraden la MEC y diferencien los FC a un fenotipo pro-fibrótico, pero donde también se requiere mantener un balance que otorgue estabilidad a la lesión y evite la ruptura cardíaca, protección otorgada por un fenotipo pro-inflamatorio (Fig. 13).



**Fig. 13. Heparán sulfato, vía TLR4, induce la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 y aumenta la adhesión de leucocitos a fibroblastos cardíacos.** Un evento de infarto al miocardio genera la liberación de cadenas solubles de HS desde la matriz extracelular (1), que actúan como ligandos del receptor TLR4, y mediante la activación de AKT y NK- $\kappa$ B (2) inducen la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, con el aumento concomitante de la adhesión de SMC y PMN al FC (3). El incremento en la adhesión de SMC gatilla un cambio en el FC favoreciendo un fenotipo pro-fibrótico, evidenciado en el aumento de la expresión de  $\alpha$ -SMA (4). Por otro lado, HS ejerce de forma directa un efecto inhibitorio en la expresión de  $\alpha$ -SMA, favoreciendo un fenotipo pro-fibrótico (5).

Si bien se realizó un trabajo completo, tratando de abarcar todo el proceso desde expresión de CAMs hasta los efectos de la adhesión en FC, se experimentaron muchas limitaciones y quedaron tareas pendientes, como:

- El cultivo de FC en placas plásticas induce su diferenciación espontánea a un fenotipo conocido como protomiofibroblasto, por lo que los resultados pueden que correspondan totalmente a FC.
- Aparte de la expresión de proteínas de adhesión, se podría evaluar los niveles de mRNA en cada una de ellas utilizando RT-PCR.
- El aislamiento de SMC mediante Ficoll tiene un buen porcentaje de pureza y viabilidad; sin embargo, en el caso de PMN existe baja pureza y rendimiento, existiendo contaminación con linfocitos y macrófagos. Se obtienen mejores resultados con separación mediante FACS, que podría otorgar mejores datos que los obtenidos en este trabajo.
- Quedó pendiente medir otros parámetros pro-fibróticos, como niveles de MMPs en el medio de co-cultivo de SMC y PMN, que completarían los resultados y darían lugar a conclusiones más sólidas.
- En la literatura no existen estudios de co-cultivo de FC con los distintos subtipos de linfocitos. Sería interesante profundizar este trabajo en ese aspecto.

## **8. CONCLUSIONES**

- Heparán Sulfato induce el aumento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, a menores niveles que LPS.
- El aumento de ICAM-1 y VCAM-1 por Heparán Sulfato es dependiente de TLR4 y las vías PI3K/Akt y NK- $\kappa$ B.
- Heparán Sulfato aumenta la adhesión de SMC y PMN a FC, a niveles estadísticamente mayores que LPS
- El aumento en la adhesión de SMC y PMN a FC, inducido por Heparán Sulfato, es dependiente de TLR4, las vías PI3K/Akt, NK- $\kappa$ B y de ICAM-1 y VCAM-1.
- La adhesión de SMC a FC, inducida por HS, gatilla un aumento en la expresión de  $\alpha$ -SMA; mientras que el estímulo de HS por sí solo disminuye los niveles de  $\alpha$ -SMA.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Akbarshahi H, Axelsson JB, Said K, Malmström A, Fischer H, Andersson R. TLR4 dependent heparan sulphate-induced pancreatic inflammatory response is IRF3-mediated. *Journal of translational medicine*. 2011 Dec 21;9(1):1.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):783-801.

An H, Qian C, Cao X. Regulation of Toll-like receptor signaling in the innate immunity. *Science China Life Sciences*. 2010 Jan 1;53(1):34-43.

Anfossi R. Interferón- $\beta$  disminuye el reclutamiento de neutrófilos inducido por LPS sobre fibroblastos cardíacos. Memoria de pregrado, 2016.

Barnes TC, Anderson ME, Edwards SW, Moots RJ. Neutrophil-derived reactive oxygen species in SSc. *Rheumatology*. 2012 Jul 1;51(7):1166-9.

Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone Jr MA. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *Journal of Clinical Investigation*. 1985 Nov;76(5):2003.

Bevilacqua, MD, Ph. D MP, Nelson, Ph. D RM, Mannori, MD, Ph. D G, Cecconi, MD O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annual review of medicine*. 1994 Feb;45(1):361-78.

Boza P, Ayala P, Vivar R, Humeres C, Cáceres FT, Muñoz C, García L, Hermoso MA, Díaz-Araya G. Expression and function of toll-like receptor 4 and inflammasomes in cardiac fibroblasts and myofibroblasts: IL-1 $\beta$  synthesis, secretion, and degradation. *Molecular immunology*. 2016 Jun 30;74:96-105.

Brennan TV, Lin L, Huang X, Cardona DM, Li Z, Dredge K, Chao NJ, Yang Y. Heparan sulfate, an endogenous TLR4 agonist, promotes acute GVHD after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2012 Oct 4;120(14):2899-908.

Burns AR, Simon SI, Kukielka GL, Rowen JL, Lu H, Mendoza LH, Brown ES, Entman ML, Smith CW. Chemotactic factors stimulate CD18-dependent canine neutrophil adherence and motility on lung fibroblasts. *The Journal of Immunology*. 1996 May 1;156(9):3389-401.

Cabanas C, Hogg N. Lymphocyte-fibroblast adhesion A useful model for analysis of the interaction of the leucocyte integrin LFA-1 with ICAM-1. *FEBS letters*. 1991 Nov 4;292(1):284-8.

Cao Z, Ren D, Ha T, Liu L, Wang X, Kalbfleisch J, Gao X, Kao R, Williams D, Li C. CpG-ODN, the TLR9 agonist, attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury: involving activation of PI3K/Akt signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2013 Jan 31;1832(1):96-104.

Chakravorty D, Kumar KN. 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1999 Feb 24;1453(2):261-72.

Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*. 2010 Dec 1;10(12):826-37.

Chen Y, Wang H, Luo G, Dai X. SIRT4 inhibits cigarette smoke extracts-induced mononuclear cell adhesion to human pulmonary microvascular endothelial cells via regulating NF- $\kappa$ B activity. *Toxicology letters*. 2014 May 2;226(3):320-7.

Chi PL, Chuang YC, Chen YW, Lin CC, Hsiao LD, Yang CM. The CO donor CORM-2 inhibits LPS-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression and leukocyte adhesion in human rheumatoid synovial fibroblasts. *British journal of pharmacology*. 2014 Jun 1;171(12):2993-3009.

Cho RL, Yang CC, Lee IT, Lin CC, Chi PL, Hsiao LD, Yang CM. Lipopolysaccharide induces ICAM-1 expression via a c-Src/NADPH oxidase/ROS-dependent NF- $\kappa$ B pathway in human pulmonary alveolar epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2016 Apr 1;310(7):L639-5.

Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*. 1992 Oct 16;258(5081):478-80.

Deguchi S, Hori T, Creamer H, Gabler W. Neutrophil-mediated damage to human periodontal ligament-derived fibroblasts: Role of lipopolysaccharide. *Journal of periodontal research*. 1990 Sep 1;25(5):293-9.

Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, Frangogiannis NG. CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circulation research*. 2005 Apr 29;96(8):881-9.

Díaz-Araya G, Vivar R, Humeres C, Boza P, Bolivar S, Muñoz C. Cardiac fibroblasts as sentinel cells in cardiac tissue: receptors, signaling pathways and cellular functions. *Pharmacological research*. 2015 Nov 30;101:30-40.

Dutta P, Nahrendorf M. Monocytes in myocardial infarction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015 May 1;35(5):1066-70.

Estes JD, Wietgreffe S, Schacker T, Southern P, Beilman G, Reilly C, Milush JM, Lifson JD, Sodora DL, Carlis JV, Haase AT. Simian immunodeficiency virus-induced lymphatic tissue fibrosis is mediated by transforming growth factor  $\beta$ 1-positive regulatory T cells and begins in early infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2007 Feb 15;195(4):551-61.

Fallon PG, Richardson EJ, McKenzie GJ, McKenzie AN. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *The Journal of Immunology*. 2000 Mar 1;164(5):2585-91.

Fang H, Ang B, Xu X, Huang X, Wu Y, Sun Y, Wang W, Li N, Cao X, Wan T. TLR4 is essential for dendritic cell activation and anti-tumor T-cell response enhancement by DAMPs released from chemically stressed cancer cells. *Cellular & molecular immunology*. 2014 Mar 1;11(2):150-9.

Feng Y, Cai ZR, Tang Y, Hu G, Lu J, He D, Wang S. TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway-mediated and oxLDL-induced up-regulation of LOX-1, MCP-1, and VCAM-1 expressions in human umbilical vein endothelial cells. *Genet Mol Res*. 2014 Jan 1;13(1):680-95.

François A, Chatelus E, Wachsmann D, Sibilia J, Bahram S, Alsaleh G, Gottenberg JE. B lymphocytes and B-cell activating factor promote collagen and profibrotic markers expression by dermal fibroblasts in systemic sclerosis. *Arthritis research & therapy*. 2013 Oct 28;15(5):1.

Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacological research*. 2008 Aug 31;58(2):88-111.

Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxidants & redox signaling*. 2006 Nov 1;8(11-12):1907-39.

Frantz S, Kobzik L, Kim YD, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT, Kelly RA. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *The Journal of clinical investigation*. 1999 Aug 1;104(3):271-80.

Fridman R, Lider O, Naparstek Y, Fuks Z, Vlodaysky I, Cohen IR. Soluble antigen induces T lymphocytes to secrete an endoglycosidase that degrades the heparan sulfate moiety of subendothelial extracellular matrix. *Journal of cellular physiology*. 1987 Jan 1;130(1):85-92.



- Gabbiani, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of pathology*. 2003;Jul 200(4):500-503.
- Goodall KJ, Poon IK, Phipps S, Hulett MD. Soluble heparan sulfate fragments generated by heparanase trigger the release of pro-inflammatory cytokines through TLR-4. *PloS one*. 2014 Oct 8;9(10):e109596.
- Götte M. Syndecans in inflammation. *The FASEB Journal*. 2003 Apr 1;17(6):575-91.
- Guijarro-Muñoz I, Compte M, Álvarez-Cienfuegos A, Álvarez-Vallina L, Sanz L. Lipopolysaccharide activates Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway and proinflammatory response in human pericytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2014 Jan 24;289(4):2457-68.
- Han YL, Li YL, Jia LX, Cheng JZ, Qi YF, Zhang HJ, Du J. Reciprocal interaction between macrophages and T cells stimulates IFN- $\gamma$  and MCP-1 production in Ang II-induced cardiac inflammation and fibrosis. *PloS one*. 2012 May 2;7(5):e35506.
- Hao L, Okada H, Kanno Y, Inoue T, Kobayashi T, Watanabe Y, Strutz F, Müller GA, Suzuki H. Direct contact between human peripheral blood mononuclear cells and renal fibroblasts facilitates the expression of monocyte chemoattractant protein-1. *American journal of nephrology*. 2003 Jul 31;23(4):208-13.
- Hogaboam CM, Smith RE, Kunkel SL. Dynamic interactions between lung fibroblasts and leukocytes: implications for fibrotic lung disease. *Proceedings of the Association of American Physicians*. 1997 Dec;110(4):313-20.
- Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T. Cytokines differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human gingival fibroblasts. *Clinical & Experimental Immunology*. 2006 Jun 1;144(3):494-502.
- Humeres C., Vivar R., Boza P., Muñoz C., Bolívar S., Anfossi R., Osorio J., Olivares-Silva F. Cardiac fibroblast cytokine profiles induced by proinflammatory or profibrotic stimuli promote monocyte recruitment and modulate macrophage M1/M2 balance in vitro. *Journal of molecular and cellular cardiology*. Forthcoming, 2016.
- Jiang SJ, Hsu SY, Deng CR, Huang HC, Liu SL, Shi GY, Wu HL. Dextromethorphan attenuates LPS-induced adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Microcirculation*. 2013 Feb 1;20(2):190-201.
- Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *The Journal of Immunology*. 2002 May 15;168(10):5233-9.
- Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- $\beta$ . *Nature immunology*. 2008 Apr 1;9(4):361-8.
- Krishnamurthy P, Rajasingh J, Lambers E, Qin G, Losordo DW, Kishore R. IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR. *Circulation research*. 2009 Jan 30;104(2):e9-18.
- Landaeta R. Heparan Sulfato, a través de TLR4, gatilla tanto el aumento de IL-1 $\beta$ , ICAM y VCAM, como la disminución de  $\alpha$ -SMA. *Memoria de Pregrado*, 2014.
- Lawrence T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009 Dec 1;1(6):a001651.
- Lee IT, Shih RH, Lin CC, Chen JT, Yang CM. Role of TLR4/NADPH oxidase/ROS-activated p38 MAPK in VCAM-1 expression induced by lipopolysaccharide in human renal mesangial cells. *Cell Communication and Signaling*. 2012 Nov 15;10(1):1.

Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. Macrophage–neutrophil interaction: a paradigm for chronic inflammation revisited. *Immunology and cell biology*. 2001 Oct 1;79(5):502-6.

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*. 2007 Sep 1;7(9):678-89.

Li J, Wu F, Zhang H, Fu F, Ji L, Dong L, Li Q, Liu W, Zhang Y, Lv A, Wang H. Insulin inhibits leukocyte–endothelium adherence via an Akt-NO-dependent mechanism in myocardial ischemia/reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009 Oct 31;47(4):512-9.

Lomakina EB, Waugh RE. Adhesion between human neutrophils and immobilized endothelial ligand vascular cell adhesion molecule 1: divalent ion effects. *Biophysical journal*. 2009 Jan 7;96(1):276-84.

Lunde IG, Herum KM, Carlson CC, Christensen G. Syndecans in heart fibrosis. *Cell and Tissue Research*. 2016 Sep 1;365(3):539-52.

Ma Y, Yabluchanskiy A, Lindsey ML. Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction. *Fibrogenesis & tissue repair*. 2013 Jun 3;6(1):1.

Matsunaga N, Tsuchimori N, Matsumoto T, Ii M. TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Molecular pharmacology*. 2011 Jan 1;79(1):34-41.

Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *The Journal of Immunology*. 2004 Mar 1;172(5):2731-8.

Mewhort HE, Lipon BD, Svystonyuk DA, Teng G, Guzzardi DG, Silva C, Yong VW, Fedak PW. Monocytes increase human cardiac myofibroblast-mediated extracellular matrix remodeling through TGF- $\beta$ 1. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2016 Mar 15;310(6):H716-24.

Murakami S, Shimabukuro Y, Saho T, Hino E, Kasai D, Hashikawa T, Hirano H, Okada H. Immunoregulatory roles of adhesive interactions between lymphocytes and gingival fibroblasts. *Journal of periodontal research*. 1997 Jan 1;32(1):110-4.

Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *The Lancet*. 2006 Feb 3;367(9507):356-67.

Oyama JI, Blais C, Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, Bourcier T. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation*. 2004 Feb 17;109(6):784-9.

Parish CR, Freeman C, Hulett MD. Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2001 Mar 21;1471(3):M99-108.

Parish CR. The role of heparan sulphate in inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2006 Sep 1;6(9):633-43.

Park GS, Kim JH. LPS Up-Regulates ICAM-1 Expression in Breast Cancer Cells by Stimulating a MyD88-BLT2-ERK-Linked Cascade, Which Promotes Adhesion to Monocytes. *Molecules and cells*. 2015 Sep 30;38(9):821.

Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology & therapeutics*. 2009 Aug 31;123(2):255-78.

Price TH, Dale DC. Neutrophil preservation: the effect of short-term storage on in vivo kinetics. *Journal of Clinical Investigation*. 1977 Mar;59(3):475.

Raats CJ, Bakker MA, Van den Born J, Berden JH. Hydroxyl radicals depolymerize glomerular heparan sulfate in vitro and in experimental nephrotic syndrome. *Journal of Biological Chemistry*. 1997 Oct 17;272(42):26734-41.

- Rohr S. Arrhythmogenic implications of fibroblast-myocyte interactions. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2012 Apr 1;5(2):442-52.
- Rosenkranz S. TGF- $\beta$ 1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovascular research*. 2004 Aug 15;63(3):423-32.
- Sakamoto N, Ishibashi T, Sugimoto K, Sawamura T, Sakamoto T, Inoue N, Saitoh SI, Kamioka M, Uekita H, Ohkawara H, Suzuki K. Role of LOX-1 in monocyte adhesion-triggered redox, Akt/eNOS and Ca<sup>2+</sup> signaling pathways in endothelial cells. *Journal of cellular physiology*. 2009 Sep 1;220(3):706-15.
- Shinde A., Humeres C., Frangogiannis N. The role of  $\alpha$ -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2016.
- Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990 Aug 2;346(6283):425-34.
- Stramer BM, Mori R, Martin P. The inflammation–fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007 May 1;127(5):1009-17.
- Strand ME, Aronsen JM, Braathen B, Sjaastad I, Kvaløy H, Tønnessen T, Christensen G, Lunde IG. Shedding of syndecan-4 promotes immune cell recruitment and mitigates cardiac dysfunction after lipopolysaccharide challenge in mice. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015 Nov 30;88:133-44.
- Svegliati-Baroni G, Saccomanno S, Goor H, Jansen P, Benedetti A, Moshage H. Involvement of reactive oxygen species and nitric oxide radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells. *Liver*. 2001 Feb 1
- Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009 Jul 31;325(5940):612-6.
- Tao ZY, Cavaasin MA, Yang F, Liu YH, Yang XP. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life sciences*. 2004 Feb 6;74(12):1561-72.
- Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A, Maeda K, Ohnishi M, Fukai D, Mabuchi N, Sawaki M, Kinoshita M. Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998 Feb 1;31(2):391-8.
- Turner NA, Das A, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE. Human cardiac fibroblasts express ICAM-1, E-selectin and CXC chemokines in response to proinflammatory cytokine stimulation. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2011 Oct 31;43(10):1450-8.
- Turner NA, Porter KE. Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. *Fibrogenesis & tissue repair*. 2013 Mar 1;6(1):1.
- Turner NA. Inflammatory and fibrotic responses of cardiac fibroblasts to myocardial damage associated molecular patterns (DAMPs). *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2016 May 31;94:189-200.
- Uematsu S, Akira S. Toll-like Receptors and Innate Immunity. *Handbook of experimental pharmacology*. 2008; 183:1-21
- Van Linthout S, Miteva K, Tschöpe C. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovascular research*. 2014 May 1;102(2):258-69.

- Vivar R, Humeres C, Varela M, Ayala P, Guzmán N, Olmedo I, Catalán M, Boza P, Muñoz C, Araya GD. Cardiac fibroblast death by ischemia/reperfusion is partially inhibited by IGF-1 through both PI3K/Akt and MEK–ERK pathways. *Experimental and molecular pathology*. 2012 Aug 31;93(1):1-7.
- Wilhelmsen K, Farrar K, Hellman J. Quantitative in vitro assay to measure neutrophil adhesion to activated primary human microvascular endothelial cells under static conditions. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2013 Aug 23(78):e50677-.
- Wu CY, Chi PL, Hsieh HL, Luo SF, Yang CM. TLR4-dependent induction of vascular adhesion molecule-1 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: Roles of cytosolic phospholipase A2 $\alpha$ /cyclooxygenase-2. *Journal of cellular physiology*. 2010 May 1;223(2):480-91.
- Xie J, Wang J, Li R, Dai Q, Yong Y, Zong B, Xu Y, Li E, Ferro A, Xu B. Syndecan-4 over-expression preserves cardiac function in a rat model of myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012 Aug 31;53(2):250-8.
- Xie Y, Li Y, Cai X, Wang X, Li J. Interleukin-37 suppresses ICAM-1 expression in parallel with NF- $\kappa$ B down-regulation following TLR2 activation of human coronary artery endothelial cells. *International immunopharmacology*. 2016 Sep 30;38:26-30.
- Xu D, Esko JD. Demystifying heparan sulfate-protein interactions. *Annual review of biochemistry*. 2014 Jun 2;83:129-57.
- Yamamoto T, Eckes B, Mauch C, Hartmann K, Krieg T. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 $\alpha$  loop. *The Journal of Immunology*. 2000 Jun 15;164(12):6174-9.
- Yan S, Zhang X, Zheng H, Hu D, Zhang Y, Guan Q, Liu L, Ding Q, Li Y. Clematichinenoside inhibits VCAM-1 and ICAM-1 expression in TNF- $\alpha$ -treated endothelial cells via NADPH oxidase-dependent I $\kappa$ B kinase/NF- $\kappa$ B pathway. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015 Jan 31;78:190-201.
- Zhou H, Qian J, Li C, Li J, Zhang X, Ding Z, Gao X, Han Z, Cheng Y, Liu L. Attenuation of cardiac dysfunction by HSPA12B in endotoxin-induced sepsis in mice through a PI3K-dependent mechanism. *Cardiovascular research*. 2011 Jan 1;89(1):109-18.