



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

RESOLVINA D1 DISMINUYE LA ADHESIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE BAZO SOBRE FIBROBLASTOS CARDIACOS EN RATAS NEONATAS

Memoria para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico

NATALIA CAMILA MUÑOZ SILVA

Director: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

Patrocinante: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

Santiago, Chile 2017

FINANCIAMIENTO

Proyecto FONDECYT N° 1130300 y 1170425 (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:

Natalia Muñoz Silva, Raúl Vivar, Guillermo Díaz-Araya. Resolvina D1 disminuye la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 inducida por LPS en fibroblastos cardíacos de rata neonata. XXXIX Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Puerto Varas, Chile, 2017.

A mi madre, en los cielos.

AGRADECIMIENTOS

Dentro de este tramo de vida, de esta etapa, me siento muy agradecida de las oportunidades que se me han presentado, del camino recorrido, de la gente que me he encontrado en él y de lo agradable que es saber que estarán ahí para conmigo. He disfrutado y aprendido en mi pasar por este lugar. Logré conocer un mundo minúsculo y abstracto, que de una u otra manera representaba lo que uno vive acá, en este ahora. Comprendí la naturaleza fractal del universo, aprendido de la vida, desde la misma vida, y por eso estoy agradecida.

Agradecida de mi equipo de trabajo, de los amigos hechos en esta etapa y a los amigos de siempre, ustedes son mi familia. Agradecida y orgullosa de lo construido. De mi profe, don Guillermo, quien más que un profesor, ha sido un gran guía y apoyo. Muchas gracias por creer en mí y abrirme las puertas a este camino. De mi laboratorio querido, los antiguos, los de siempre y los que vendrán. Con ustedes he aprendido del día a día, tanto en lo profesional como en lo personal, muchas gracias por todo lo entregado. A mi abuelo querido, por la paciencia y el amor con que me mostrabas tu mundo infinito de libros, letras y conocimiento. A mis hermanos, por sus gritos, locuras y apañes, los quiero montones. Finalmente, a mis viejos, siempre presentes en mí, muchas gracias. Los caminos tomados y las bases de quien soy ahora son ustedes, me veo en sus ojos, y los agradezco. Gracias a mi padre, por entregarme herramientas de lucha y trabajo, y un inmenso gracias a mi madre, por todo lo entregado. Faltarían palabras, idiomas, ¡lenguaje! para expresar mi gratitud hacia ti. Te beso de aquí al cielo querida.

Me siento con el deber de agradecerles a cada uno de ustedes, los aludidos. Son trozos de mí y los llevo a fuego. Muchas gracias, simplemente, por estar.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Generalidades.....	13
1.2 Tejido cardíaco y fibroblasto cardíaco.....	13
1.3 Toll like receptor.....	15
1.4 Inflamación.....	16
1.4.1 Inflamación aguda.....	17
1.4.2 Moléculas de adhesión: ICAM-1 y VCAM-1.....	19
1.4.3 Leucocitos y su rol en la inflamación.....	19
1.5 Resolvina D1.....	20
2. HIPÓTESIS.....	25
3. OBJETIVO GENERAL.....	25
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1 Reactivos.....	26
5.2 Animales.....	26
5.3 Aislamiento de fibroblastos cardíacos.....	27
5.4 Pasaje celular.....	27
5.5 Isquemia/reperfusión simulada.....	28
5.6 Determinación de viabilidad celular por conteo celular con azul de tripán.....	28
5.7 Determinación de viabilidad celular por ensayo con Alamar Blue.....	28
5.8 Western blot.....	29
5.9 Aislamiento de SMC.....	29
5.10 Ensayo de adhesión in vitro y tinción con cristal violeta.....	30
5.11 Análisis estadístico.....	30
6. RESULTADOS.....	31
6.1 Estudios de viabilidad y proliferación celular.....	31
6.1.1 Efecto de RvD1 sobre la viabilidad de FC.....	32
6.1.1.1 Ensayo concentración-dependiente.....	32

6.1.1.2	Ensayo tiempo-dependiente	34
6.1.2	Efecto de la RvD1 sobre la proliferación de los FC.	36
6.2	Efecto citoprotector de RvD1 en muerte de FC neonatos inducida por isquemia/reperfusión simulada.	38
6.3	Efecto de RvD1 sobre cambios en VCAM-1 e ICAM-1.....	40
6.3.1	Efecto de RvD1 concentración-dependiente en la expresión de VCAM-1 e ICAM-1.....	40
6.3.2	Efecto tiempo-dependiente de RvD1 sobre la expresión de VCAM-1 e ICAM-1.....	42
6.3.3	Efecto de la RvD1 sobre los niveles de expresión de VCAM-1 e ICAM-1 inducidos por LPS.....	44
6.4	Efecto de RvD1 sobre la adhesión de leucocitos a FCN	46
7.	DISCUSIÓN.....	48
7.1	Efecto de RvD1 sobre la viabilidad y proliferación de FCN.	49
7.2	Efecto citoprotector de RvD1 en muerte de FCN neonatos inducida por isquemia/reperfusión simulada.	51
7.3	Efecto de la RvD1 sobre los niveles de expresión de VCAM-1 e ICAM-1 inducidos por LPS	52
7.4	Efecto de RvD1 sobre la adhesión de leucocitos a FCN	55
8.	CONCLUSIÓN.....	58
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mediadores lipídicos en la respuesta inflamatoria aguda y sus resultados.....	19
Figura 2. Función de los ácidos grasos poliinsaturados esenciales en la producción de familias de mediadores lipídicos bioactivos.....	23
Figura 3. Las resolvinas de la serie E (RvE1 y RvE2) son agonistas para ChemR23 / ERV y antagonistas para el receptor de leucotrieno B4, BLT-1. La serie Lipoxina A4 (LXA4) y resolvinas de la serie D, RvD1, RvD3 y RvD5 son agonistas para GPR32 / DRV1 y ALX / FPR2.....	24
Figura 4. Curva de calibración de número de fibroblastos cardiacos.....	33
Figura 5. Efecto de RvD1 sobre la viabilidad de FC.....	34
Figura 6. Efecto de RvD1 sobre la viabilidad de FC.....	35
Figura 7. Efecto de RvD1 sobre la viabilidad de FC.....	36
Figura 8. Efecto de RvD1 sobre la viabilidad de FC.....	37
Figura 9. Efecto de RvD1 sobre la proliferación de FC.....	38
Figura 10. Efecto de RvD1 sobre la proliferación de FC.....	39
Figura 11. Efecto de RvD1 sobre la viabilidad en I/Rs.....	40
Figura 12. Efecto de RvD1 sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC..	42
Figura 13. Efecto de RvD1 sobre los niveles de expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en FC..	44
Figura 14. Efecto de RvD1 sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 FC inducidos por LPS.....	46
Figura 15. Efecto de RvD1 sobre el reclutamiento de SMC sobre FC.....	48

ABREVIATURAS

α -SMA	Alfa-actina del músculo liso
μ g	Microgramo
μ l	Microlitro
AA	Ácido araquidónico
AKT	Proteína kinasa 3
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Trifosfato de adenosina
AT-RvD1	Resolvina gatillada por aspirina
CAM	Molécula de adhesión celular
cm ²	Centímetros cuadrados
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CXCL1	Quimioquina C-X-C ligando 1
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DHA	Ácido docosahexanoico
DMEM/F12	Dulbecco's modified Eagle's medium, fórmula 12
DS	Desviación estándar
ECL	Quimioluminiscencia mejorada
ECV	Enfermedades cardiovasculares
ERK1/2	Quinasa regulada extracelularmente 1/2
FBS	Suero fetal bovino
FC	Fibroblastos cardíacos
FCN	Fibroblastos cardíacos neonato
FPR2	Receptor péptido N-formil 2
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
h	Horas
I/Rs	Isquemia/Reperfusión simulada
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1
IgSF	Super familia de inmunoglobulinas
IL-12	Interleuquina 12
IL-1 β	Interleuquina 1 beta
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
LBT4	Leucotrieno T4
LFA-1	Antígeno asociado a función de linfocitos 1
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
Mac-1	Antígeno de macrófagos 1
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimioattractante de monocitos 1
MEC	Matriz Extracelular

MIP-2	Próteína alfa 2 inflamatoria de macrófagos
ml	Mililitro
mm	Milímetros
MMP	Metaloproteinasa de matriz
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NF- κ B	Factor nuclear κ B
nm	Nanómetro
nm	Nanómetro
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Tampón fosfato salino
PDL	Ligamento periodontal
pERK1/2	Fosfoquinasa regulada extracelularmente 1/2
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaglandina I2
PI3K	Fosfoinositol-3-quinasa
PMN	Polimorfonucleares
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RvD1	Resolvina D1
RvD2	Resolvina D2
RvD3	Resolvina D3
RvD5	Resolvina D5
SMC	Células mononucleares derivadas de bazo
SPM	Mediadores especializados pro-resolución
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRL	Receptor tipo toll
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WB	Western blot

RESUMEN

Los fibroblastos cardíacos (FC) son células capaces de mantener la homeostasis de la matriz extracelular (MEC), regulando la estructura tisular, así como también participan de la señalización química y eléctrica del tejido cardíaco. Además, los FC están en estrecha relación con el proceso inflamatorio, manteniendo un rol clave en la homeostasis del tejido posterior a una injuria o daño tisular.

En el proceso inflamatorio, producido por daño celular o por invasión microbiana, las células del sistema inmune son atraídas desde la circulación sanguínea al sitio de injuria, siendo los neutrófilos la primera línea de defensa del organismo. La llegada de neutrófilos al sitio de daño genera gradientes quimiotáxicos que atraen células del sistema inmune, gatillando el reclutamiento leucocitario, el cual es dependiente de las proteínas de adhesión molecular VCAM-1 e ICAM-1, generando una respuesta inflamatoria sostenida. En ese contexto, evidencias sugieren que un nuevo tipo de mediador lipídico, la Resolvina D1 (RvD1), ha demostrado moderar la respuesta inflamatoria, promoviendo el cese de la infiltración leucocitaria, además de mejorar la fagocitosis en macrófagos para así permitir la remoción de células y tejido apoptótico en la zona de injuria, finalizando así el proceso de inflamación. Hasta la fecha, la RvD1 no ha sido utilizada en modelos cardíacos, y por lo mismo, se desconoce su utilidad como agente antiinflamatorio en el corazón, específicamente en el FC.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar los efectos de RvD1 en la viabilidad y proliferación celular de FC neonatos (FCN), para así estudiar el efecto de RvD1 sobre FCN bajo un contexto inflamatorio, inducido por estímulo con LPS, midiendo los niveles de expresión de proteínas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1, y consecuentemente, la adhesión de leucocitos a FCN. Además, se estudió si la RvD1 es capaz de mostrar un efecto

citoprotector frente al daño provocado por un estímulo de isquemia/reperfusión simulada (I/Rs).

Los resultados mostraron que en FCN la presencia de RvD1 no afecta la proliferación ni viabilidad de éstos; sin embargo, no previnieron la muerte celular inducida por I/Rs. Se demostró además que el pre-tratamiento de FCN con RvD1 y posteriormente tratados por LPS, disminuyó la expresión de VCAM-1 e ICAM-1, y como consecuencia de ello, previno la adhesión de SMC a FCN.

De esta forma, la RvD1 se transforma en una potencial y valiosa herramienta terapéutica capaz de disminuir la respuesta inflamatoria luego de algún evento de injuria cardíaca como lo puede ser una miocarditis, o bien, un infarto al miocardio.

SUMMARY

Cardiac fibroblasts (FC) are cells capable of maintaining the homeostasis of the extracellular matrix (ECM), regulating tissue structure, as well as participating in the chemical and electrical signaling of cardiac tissue. In addition, FCs are closely related to the inflammatory process, maintaining a key role in tissue homeostasis following injury or tissue damage.

In the inflammatory process, presented by cellular damage or by microbial invasion, the cells of the immune system are attracted from the blood circulation to the site of the lesion, with neutrophils being the first line of defense of the organism. The arrival of neutrophils to the site of damage to genomes chemotactic gradients that attract cells of the immune system, triggering the leukocyte recruitment, which is dependent on molecular adhesion proteins VCAM-1 and ICAM-1, generating a sustained inflammatory response. In this context, evidence suggesting a new type of lipid mediator, Resolvin D1 (RvD1), has shown that the inflammatory response, the growth of leukocyte infiltration, in addition to improving phagocytosis in macrophages to allow a separation of cells and tissue apoptotic in the area of injury, thus ending the process of inflammation. To date, RvD1 has not been used in cardiac models, and therefore, is unknown as the anti-inflammatory agent in the heart, specifically in the FC.

The objective of this work was to characterize the effects of RvD1 on the viability and cellular proliferation of neonatal FC (FCN), in order to study the effect of RvD1 on FCN under an inflammatory context, induced by stimulation with LPS, measuring the levels of expression of adhesion proteins VCAM-1 and ICAM-1, and consequently, the adhesion of leukocytes to FCN. In addition, we studied whether RvD1 is able to show a cytoprotective effect against damage caused by a simulated ischemia / reperfusion stimulus (I / Rs).

The results show that in FCN the presence of RvD1 does not affect the proliferation or viability thereof; however, they did not prevent cell death induced by I/Rs. It was also demonstrated the previous treatment of FCN with RvD1 and subsequently treated by LPS, decreased the expression of VCAM-1 and ICAM-1, and as a consequence, prevented the adhesion of SMC to FCN.

In this way, RvD1 becomes a potential and valuable therapeutic tool capable of decreasing the inflammatory response after some event of cardiac injury such as myocarditis or myocardial infarction.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) se deben a trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos. Las cardiopatías coronarias (ataques cardíacos), las enfermedades cerebrovasculares (apoplejías), el aumento de la presión arterial (hipertensión arterial) e insuficiencia cardíaca caen dentro de esta clasificación. Las principales causas que inciden en las ECV son el consumo de tabaco, la falta de actividad física y una alimentación poco saludable ^[1]. Las ECV son la principal causa de muerte en el mundo. Éstas constituyen la mayoría de las muertes por enfermedades no transmisibles, lo que corresponde a 17,7 millones de personas cada año a nivel global. Se estima que para el año 2020, un tercio de todas las muertes registradas en el mundo serán por esta causa. Además, se estima que más de tres cuartas partes de las muertes por ECV a nivel mundial, se generan en países de ingresos bajos y medios. En Chile, 25.744 personas mueren por esta causa, lo que corresponde a un 28,1 % de las muertes anuales en el país ^[2,3].

La globalización, la urbanización y la transición demográfica al que nuestro país está sometido, junto con un aumento en la expectativa de vida y el envejecimiento poblacional crean la necesidad de realizar estudios en la materia, lo que provee de vastas oportunidades a los profesionales de la salud para que trabajen en materia de prevención de éstas, además de buscar nuevas estrategias terapéuticas para estas patologías, las que corresponden a la primera causa de muerte hoy y en las proyecciones a futuro.

1.2 Tejido cardíaco y fibroblasto cardíaco

El corazón, como centro del sistema circulatorio, cumple la función de bombear sangre hacia todo el cuerpo tanto a los pulmones para oxigenarlos, como a los distintos tejidos y órganos para nutrirlos y poder mantener su homeostasis ^[4]. Posee una red de vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares) que transportan sangre, por ende, oxígeno

y nutrientes, desde y hacia el resto del cuerpo. Éste posee paredes cardíacas, controladas por un sistema eléctrico que genera contracción y relajo de las mismas, y así, logra bombear sangre hacia el sistema circulatorio. Este órgano contráctil está compuesto principalmente de cardiomiocitos, fibroblastos, células endoteliales y células del músculo liso vascular, entre otros.

La función cardíaca es muy amplia y compleja. Así, en un corazón de mamífero normal, la función cardíaca está regulada por interacciones coordinadas y dinámicas de dos de los mayores tipos celulares presente en éste, cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos (FC). Juntos, suman cerca del 90% de las células del miocardio. Los primeros otorgan contractibilidad y fuerza mecánica al corazón, mientras que los segundos son conocidos tradicionalmente por poseer un rol estructural en los tejidos, siendo una fuente de componentes de matriz extra celular (MEC) que regulan la estructura, la mecánica y las señalizaciones químicas y eléctricas entre componentes cardíacos celulares y no celulares, a través de la acción autocrina y paracrina, así como por interacción célula-célula ^[5].

Los fibroblastos son una población heterogénea de células de origen mesenquimal distribuida en todos los tejidos. Morfológicamente se caracterizan por ser planas y tener múltiples extensiones en su membrana, similar a una forma de huso, además de poseer un núcleo oval con un extensivo retículo endoplásmico ^[6]. En el caso de los FC, éstos no solo responden a un rol estructural, sino también son capaces de responder a señales químicas y mecánicas, expresando variados receptores a través de los cuales modulan la proliferación, muerte celular, autofagia, adhesión, migración, degradación de MEC, expresión de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, modificando su propio comportamiento y el de las células adyacentes a éstos ^[7].

Los FC también son capaces de participar en la respuesta inflamatoria en la reparación cardíaca, ya que son capaces de responder a patrones moleculares asociados

a patógenos (PAMPs), ya sea de origen viral, parásito o bacterial; y a patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), liberados por células muertas después de daño al tejido cardíaco, por ejemplo, en infarto cardíaco. Esto se logra a través de la secreción de una amplia variedad de citoquinas y/o quimioquinas pro-inflamatorias, iniciando un proceso inflamatorio necesario para la reparación del tejido y recuperación de la homeostasis. Ambos, PAMPs y DAMPs activan en el FC el receptor Toll like receptor 4 (TLR4), receptor asociado a células del sistema inmune, desencadenando un fuerte proceso inflamatorio necesario para la cicatrización de la herida ^[8,9].

Esta respuesta inflamatoria gatilla la diferenciación del FC a un fenotipo conocido como miofibroblasto cardíaco (MFC), caracterizado por la expresión de proteínas contráctiles como α -SMA, junto con mayor capacidad secretora de proteínas de la MEC, así como también una capacidad secretora de variadas moléculas bioactivas, incluyendo citoquinas, péptidos vasoactivos y factores de crecimiento, lo que contribuye a la reparación del tejido y consecuente resolución de la inflamación, así como también, factores pro-fibróticos que contribuyen a la resolución de la inflamación y generación de cicatriz ^[10].

1.3 Toll like receptor

El sistema inmune innato es un mecanismo de defensa altamente evolucionado y conservado contra patógenos. Las respuestas del sistema inmune innato son iniciadas por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales reconocen componentes microbiales. Diferentes PRR reaccionan con ligandos y conducen a distintas respuestas antipatogénicas ^[11]. Dentro de estos receptores, los receptores tipo toll (toll like receptors, TLR) juegan un rol crucial en la respuesta inmune, y, por ende, en la defensa del organismo ante agentes invasores o a daño molecular. Éstos son receptores de transmembrana conservados evolutivamente, los cuales fueron caracterizados inicialmente por su interacción con ligandos bacterianos y en su participación en la activación celular asociada

a infección y sepsis, y jugando un papel importante en la iniciación de la respuesta del sistema inmune innato, a través del reconocimiento de los llamados “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs), lo que permite la defensa del huésped contra patógenos invasores. Actualmente, se sabe que además de responder a PAMPs, los TLR también pueden detectar “patrones moleculares asociados a daño”, llamados DAMPs, generando una respuesta inmune que media el mecanismo de reparación del tejido lesionado [12,13] Actualmente existen 13 diferentes tipos de receptores TLR identificados en mamíferos, con 10 miembros presentes en humanos. 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 [14].

Se ha demostrado la presencia de TLR4 en fibroblastos de distintos tejidos, incluyendo a fibroblastos cardíacos [15]. Su activación vía PAMPs y DAMPs genera la aparición de respuestas del sistema inmune innato y adaptativo. Dentro de estos estímulos deletéreos, se sabe que el lipopolisacárido bacteriano (LPS), componente esencial de la pared celular de bacterias Gram negativas, es un reconocido agonista del receptor TLR4, desencadenando una fuerte respuesta inflamatoria. La interacción de este ligando con TLR4 activa diferentes señalizaciones celulares, tales como NF- κ B, ERK_{1/2}, Akt y otras señales que promueven la respuesta proinflamatoria, incluyendo la expresión de citoquinas, quimioquinas, moléculas de superficie celular y otros mediadores proinflamatorios [16,17].

1.4 Inflamación

La inflamación excesiva es apreciada ampliamente como un componente unificador de diferentes enfermedades crónicas, incluyendo dentro de éstas las enfermedades vasculares, síndrome metabólico, enfermedades neurológicas, asma, entre otras. Cuando existe una respuesta inflamatoria aguda, ésta se le considera una respuesta protectora, ya que permite reparar tejido dañado o eliminar organismos invasores. Ésta respuesta es

idealmente autolimitada, finalizando en la resolución completa de la inflamación, lo que permite el retorno a la homeostasis ^[18]. La resolución de la inflamación involucra el término del reclutamiento de neutrófilos, la contraregulación de mediadores proinflamatorios, la estimulación del clearance mediado por macrófagos, y el remodelamiento del tejido. Cuando la inflamación no es controlada, o es activada inapropiadamente, puede conducir a una inflamación crónica persistente, promoviendo fibrosis y disfunción de los órganos ^[19].

1.4.1 Inflamación aguda

Una respuesta inflamatoria aguda, por definición, se divide en fase de iniciación y en la fase de resolución. En la primera fase, podemos observar la aparición de los signos cardinales de la inflamación, tales como calor, hinchazón y dolor local ^[20]. Comienza la participación de quimioquinas como la Interleuquina 8 (IL-8), citoquinas como TNF- α , y la proteína quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1), las que entregan la señal para el reclutamiento de neutrófilos y monocitos en el sitio de daño ^[21]. También, moléculas de adhesión celular (CAMs), tales como ICAM-1 (molécula de adhesión intracelular) y VCAM-1 (molécula de adhesión vascular), participan en este proceso, las cuales permiten la adhesión de células del sistema inmune al endotelio ^[22]. Estos mensajeros químicos forman un gradiente el cual regula el tráfico de leucocitos vía quimiotaxis y diapédesis desde el flujo sanguíneo al tejido dañado ^[19]. Los neutrófilos son los primeros en responder al daño y se acumulan en el sitio de la inflamación. En segundo lugar, llegan los monocitos, los cuales pueden diferenciarse a macrófagos capaces de eliminar microbios, desechos celulares, y neutrófilos polimorfonucleares (PMN) mediante fagocitosis, lo que inicia la resolución de la inflamación ^[21]. La continua presencia de leucocitos activados dentro de los tejidos se asocia con daños colaterales a éste, amplificación y persistencia de la inflamación, por lo que es necesario discontinuar el reclutamiento de neutrófilos en orden de resolver la inflamación ^[23].

Luego de entrar en los tejidos, el tráfico de neutrófilos, monocitos y plaquetas presentes en el sitio de inflamación produce mediadores lipídicos especializados pro-resolución (SPM) de la inflamación, quienes inician la secuencia de terminación del proceso. Así, el reclutamiento de neutrófilos cesa y se activa la muerte programada por apoptosis, en donde el neutrófilo apoptótico se somete a fagocitosis por los macrófagos, lo que lleva a la remoción de neutrófilos y la liberación de citoquinas antiinflamatorias y reparadoras, dándole término a la resolución con la salida de macrófagos a través de los vasos linfáticos, proceso conocido como esferocitosis [24].

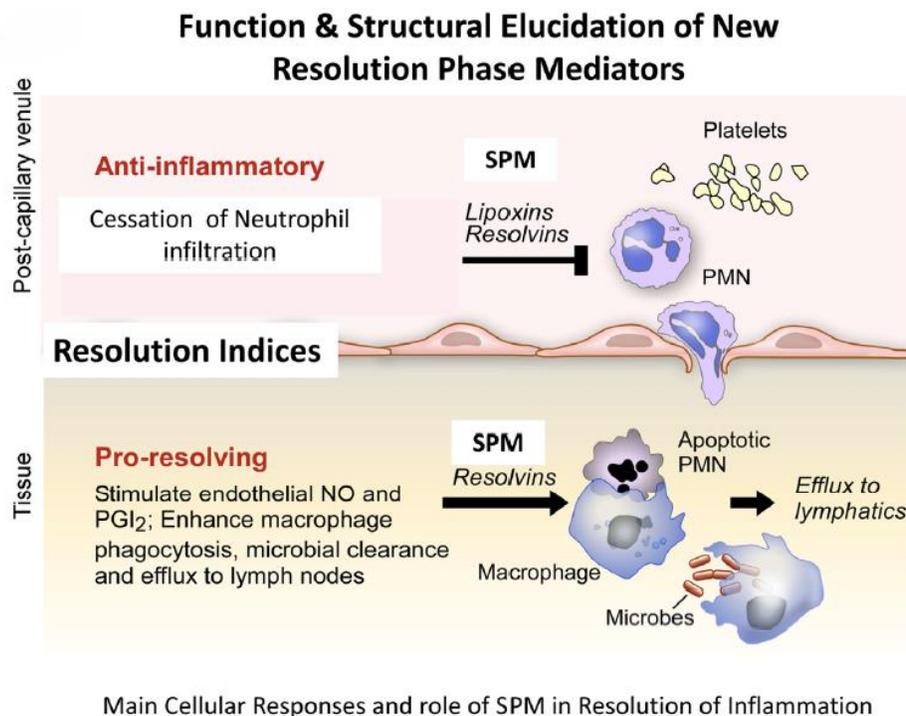


Figura 1. Mediadores lipídicos en la respuesta inflamatoria aguda y sus resultados. Se describen algunos roles de SPM (lipoxinas, resolvinas y maresinas) en el tráfico de leucocitos, el cambio de actividad de los mediadores lipídicos, la esferocitosis y la señalización inmunológica adaptativa a través de los linfocitos. La resolución fallida puede conducir a aumentar la producción de prostaglandinas, leucotrienos e inflamación crónica, que puede conducir a fibrosis. Los SPM regulan los mediadores químicos proinflamatorios, reducen la inflamación y estimulan la re-epitelización, la curación de heridas y la regeneración tisular. *Serhan, Chiang y Dalli, 2015* [18].

1.4.2 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). [25]

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 $\alpha 4\beta 7$ [26,27], mientras que ICAM-1 es el contrareceptor para integrinas $\beta 2$, como LFA-1 y Mac-1 [28].

La interacción entre ICAM-1 e integrinas de los leucocitos es de importancia en el inicio de la respuesta inmune gatillada por antígenos, las cuales están involucradas en el tráfico de leucocitario. Un aumento en la expresión de CAMs está temporalmente asociado con el secuestro e infiltración de leucocitos en el tejido del miocardio [29,30].

En el proceso de inflamación cardíaca, las células residentes, tales como células endoteliales, fibroblastos, células del músculo liso y los leucocitos infiltrados, secretan citoquinas, las cuales tienen la capacidad de activar la transcripción de CAMs, promoviendo el reclutamiento y trans migración leucocitaria [31,32]. Además, se ha demostrado que DAMPs liberados en la zona del daño cardíaco aumentan niveles de CAMs y actúan de manera similar a citoquinas [33].

1.4.3 Leucocitos y su rol en la inflamación

Cuando se produce daño en el tejido cardíaco, ya sea por ruptura del tejido, trauma o invasión microbiana, el hospedero crea la necesidad de neutralizar al invasor, limpiar el sitio, remodelar y regenerar el tejido dañado. De esta manera, son los neutrófilos las

primeras células atraídas al sitio de injuria, seguidas por monocitos y linfocitos ^[34]. Los neutrófilos, células altamente fagocíticas, son la primera línea de defensa del sistema inmune innato, los cuales son reclutados rápidamente a los sitios de inflamación, iniciando la respuesta inflamatoria aguda ^[35]. Su rol primordial es eliminar patógenos a través de fagocitosis y facilitar la reparación tisular, liberando grandes cantidades de ROS, enzimas y proteínas granulares ^[36]. Estos secretan citoquinas pro-inflamatorias, MMPs y catepsinas, las cuales son capaces de degradar la MEC ^[37]. También, cumplen el rol de “amplificadores” de la respuesta inmune, generando un aumento en el reclutamiento leucocitario. Poseen una vida media de 6-8 horas, siendo muy regulados debido a su gran capacidad histotóxica, implicada en lesión tisular ^[38].

La activación de las vías inflamatorias gatilla la infiltración de subpoblaciones pro-inflamatorias de células mononucleares. Estos monocitos dan origen a macrófagos que limpian la zona de daño y secretan enzimas proteolíticas ^[39]. Los monocitos infiltrados provienen de la médula ósea y, además, del bazo, el que actúa como reservorio para un rápido despliegue a los sitios de inflamación ^[40].

En la etapa de resolución de la inflamación, subpoblaciones anti-inflamatorias de monocitos son reclutadas selectivamente para ayudar en la resolución de la respuesta inflamatoria post-daño. Esta subpoblación se diferencia a macrófagos, los que facilitan la regeneración tisular y finalización de la inflamación, promoviendo la proliferación de miofibroblastos cardíacos, deposición de colágeno y angiogénesis ^[41].

1.5 Resolvina D1

Los mediadores especializados pro-resolución (SPM), tales como las resolvinas, protectinas, lipoxinas y maresinas, son ácidos grasos biosintetizados que logran finalizar la

inflamación, protegiendo órganos y estimulando la regeneración tisular, para así poder alcanzar la homeostasis celular.

En el inicio de la inflamación aguda, prostaglandinas, ecosanoides y leucotrienos, los cuales están formados desde el ácido araquidónico (AA, omega 6), poseen un rol proinflamatorio, aumentando la permeabilidad de leucocitos, quimiotaxis y citoquinas en el tejido dañado. Se ha descubierto que estos mediadores sufren un cambio desde la fase de iniciación a la fase de resolución, promoviendo la formación de mediadores lipídicos especializados pro-resolución como los ya mencionados, los cuales reducen la producción de mediadores proinflamatorios, estimulan la captación de neutrófilos apoptóticos y disminuyen la infiltración de polimorfonucleares.

Estos SPM reducen los signos cardinales de la inflamación (calor, rubor, dolor y pérdida de la función), disminuyendo leucotrienos (LBT4), prostaglandinas (PGI2), reducción de citoquinas tales como $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, factores genéticos como NF- κ B, factores de crecimiento (VEGF), ROS extracelular y edemas. Aumentan la producción de óxido nítrico (NO), la fagocitosis bacteriana, promoviendo la esferocitosis en macrófagos, la producción de IL-10 (interleuquina antiinflamatoria) y el clearance bacterial [19,24].

Las acciones de las resolvinas se extienden en innumerables patologías, incluyendo la vascular, respiratoria, dérmica, renal, ocular, cáncer, fibrosis, y sanación de heridas, influyendo en la magnitud y duración de la inflamación, infección y lesión tisular [18]

La identificación de estos mediadores endógenos muestra que el precursor de estos SPM son el ácido graso esencial omega 3 (en protectinas, maresinas y resolvinas) y omega 6 (lipoxinas). Las resolvinas de la serie D provienen del ácido docosahexanoico (DHA), son activadas por receptores acoplados a proteína G ALX/FPR2 y GPR32/DRV. Esta familia de

resolvinas posee distintas estereoquímicas, encontrándose tipos tales como RvD1, RvD2, RvD3 y RvD5. A través de la activación de receptores específicos, los SPM generan su acción biológica en leucocitos, las cuales mejoran la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos, bajan la producción de citoquinas proinflamatorias y mejoran el eflujo de macrófagos desde el tejido dañado. [24].

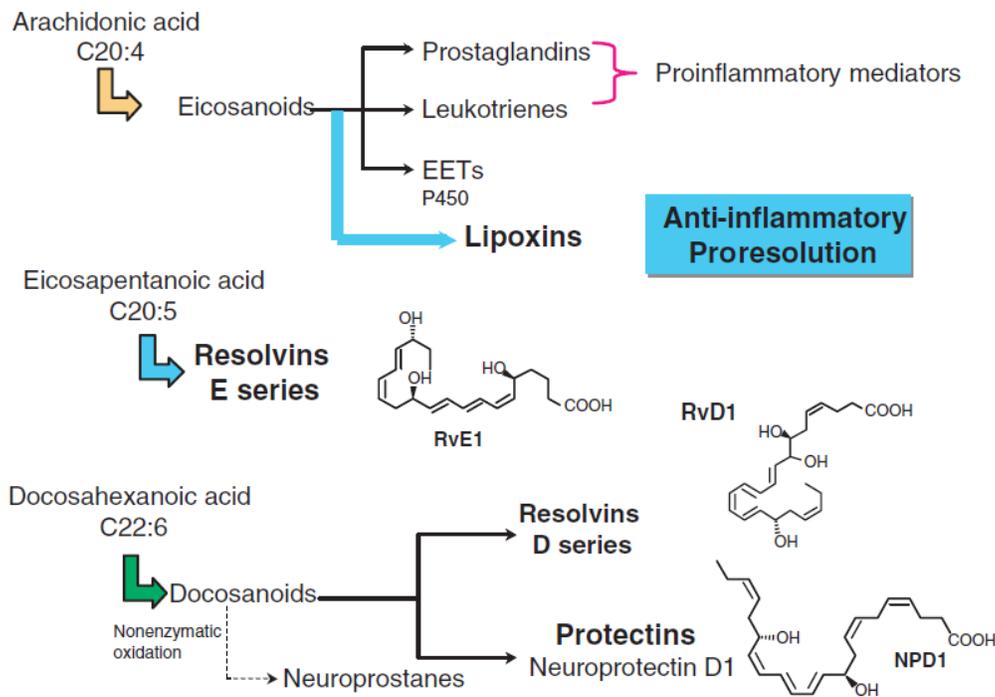


Figura 2. Función de los ácidos grasos poliinsaturados esenciales en la producción de familias de mediadores lipídicos bioactivos. Ácido araquidónico es el precursor de eicosanoides, los cuales tienen diferentes funciones como mediadores proinflamatorios. Una serie de prostaglandinas y leucotrienes tienen una acción específica en la progresión de la inflamación. A través de la interacción célula-célula, ejemplificada por leucocitos plaquetarios en la vasculatura y / o la interacción de células polimorfonucleares de la mucosa, se generan lipoxinas, que sirven como 'señales de parada' promoviendo la resolución, las cuales sirven como mediadores antiinflamatorios endógenos, autolimitando el curso de la inflamación. Los ácidos grasos esenciales omega-3 ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico (C20: 5 y C22: 6) son convertidos a nuevas familias de mediadores de lípidos que son fundamentales para promover la resolución. Resolvins de la serie E como RvE1 se generan desde el ácido eicosapentaenoico, y las resolvinas de la serie D, como RvD1, así como las protectinas, como la neuroprotectina D1 (NPD1), se generan de DHA. *Serhan, & Savill, 2005* [24]

RvD1 se une y activa el receptor GPR23 en humanos y el receptor ALX/FPR2 en humanos y ratones. Los ratones transgénicos que sobreexpresan el receptor ALX/FRP2 requieren menos RvD1 para detener la inflamación, y en ratones deficientes de receptores,

RvD1 aparentemente no presenta acciones leucocitarias [18]. Resultados recientes indican que DHA y derivados del DHA tales como RvD1, pueden estimular un cambio en el fenotipo de macrófagos, pasando de un fenotipo proinflamatorio a uno tipo M2 proresolutivo [42].

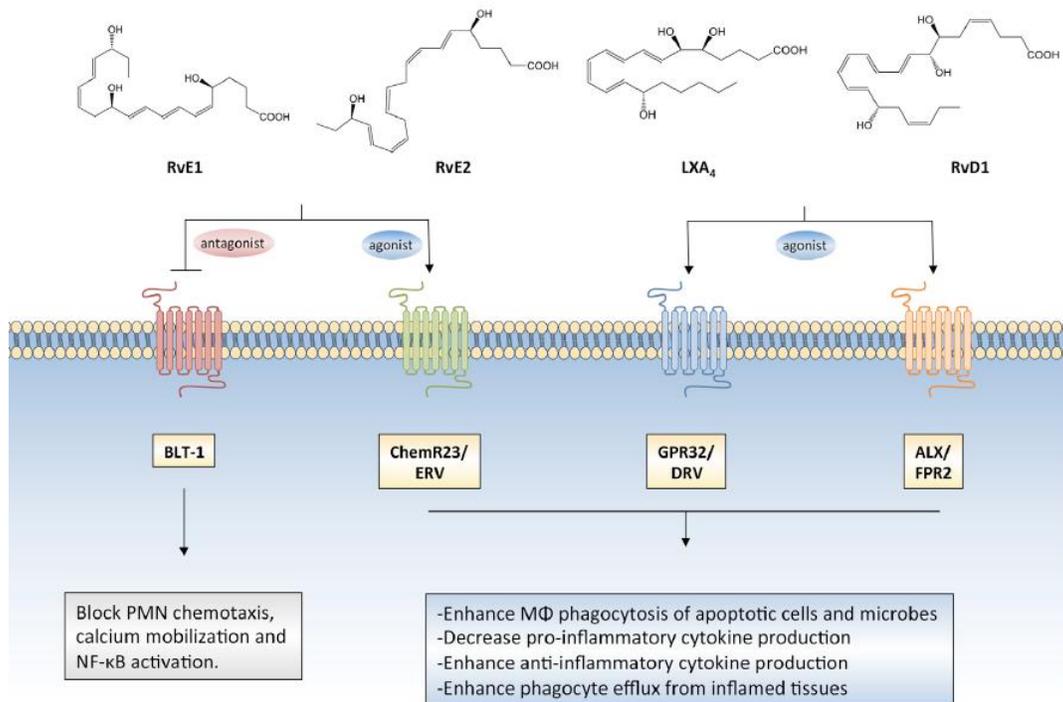


Figura 3. Las resolvinas de la serie E (RvE1 y RvE2) son agonistas para ChemR23 / ERV y antagonistas para el receptor de leucotrieno B4, BLT-1. La serie Lipoxina A4 (LXA4) y resolvinas de la serie D, RvD3 y RvD5 son agonistas para GPR32 / DRV1 y ALX / FPR2. Actuando a través de estos receptores específicos, los SPM obtienen su acción biológica en leucocitos, que incluyen la atenuación del tráfico de PMN, la activación y la transcripción inflamatoria de genes, así como la estimulación de la fagocitosis de macrófagos tanto de células apoptóticas como de bacterias. *Spite, Clària & Serhan, 2014.* [19]

Existe evidencia de que la RvD1 está involucrada en múltiples procesos proresolutivos, tales como promover la resolución de inflamación aguda producida por un infarto al miocardio [43]. En modelos de daño hepático producido por isquemia/reperfusión, RvD1 actúa inhibiendo las cascadas inflamatorias, atenuando los niveles de IL-6, TNF-α y de mieloperoxidasas. Además, reduce la apoptosis e incrementa la fosforilación de AKT [44]. Otra evidencia sugiere que en fibroblastos de ligamentos periodontales (PDL) humanos, la

RvD1 ayuda a mejorar el cierre de la herida, en donde células tratadas con RvD1 disminuyeron los niveles de PGE2, citoquina proinflamatoria, además de mejorar significativamente la proliferación de fibroblastos PDL, células críticas en la regeneración de tejido suave y duro alrededor del diente, teniendo así un efecto protector con los ligamentos periodontales ^[45]. En fibroblastos pulmonares tratados con LPS, la expresión de la proteína COX-2, PGE2 y PGD2 aumentaron a las 48 horas de tratamiento, pero al ser tratados con RvD1 exógena, se genera inhibición los peaks de COX-2 inducidos por LPS, además de disminuir la producción de PGE2 ^[46].

Ya que la inflamación es un componente unificador en muchas enfermedades metabólicas, los mecanismos involucrados en la resolución de ésta son considerable interés. Como hemos mencionado anteriormente, en FC no se ha establecido si RvD1 tiene algún efecto antiinflamatorio, por lo que surgen las siguientes preguntas:

- a) ¿Cómo afecta RvD1 a las células del tejido cardíaco, en especial a los FCN?
- b) ¿RvD1 puede disminuir los efectos producidos por agentes proinflamatorios en tejido cardíaco?
- c) ¿RvD1 es capaz de prevenir la adhesión de SMC a FCN bajo un contexto inflamatorio?

La solución a estas preguntas nos permitirá comprender los efectos de RvD1 en FCN, pudiendo generar nuevas estrategias en la terapia antiinflamatoria cardíaca, eligiendo RvD1 como tópico de estudio debido a las propiedades resolutorias de la inflamación que presenta en los distintos modelos celulares descritos en la literatura.

Es en base a los antecedentes presentados es que se genera la siguiente hipótesis

2. HIPÓTESIS

En fibroblasto cardiaco de rata neonata la resolvina-D1 disminuye la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por LPS, lo que consecuentemente reduce la adhesión de células mononucleares de bazo (SMC) sobre los fibroblastos cardíacos neonatos (FCN).

3. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que, en FCN, la RvD1 disminuye la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 y consecuentemente la adhesión de SMC inducidas por LPS.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1.1: Demostrar que RvD1, de una manera tiempo y concentración dependiente, no afecta la viabilidad y proliferación de los FCN.

4.1.2: Demostrar que RvD1 tiene un efecto citoprotector de la muerte inducida por isquemia/reperfusión simulada en FCN.

4.1.3: Demostrar que en fibroblastos cardíacos estimulados con LPS, la RvD1 tienen un efecto antiinflamatorio, disminuyendo la expresión de moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 en los FCN.

4.1.4: Demostrar que la RvD1 disminuye la adhesión de PMN en FCN inducidos por LPS.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Suero fetal bovino (FBS), tripsina/EDTA, medio de cultivo DMEM/F12 y compuestos orgánicos e inorgánicos fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Germany). Estándar de peso molecular fueron adquiridos en MaestroGen (Hsinchu City, Taiwán). Reactivos para quimioluminiscencia mejorada (ECL) fueron comprados en PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Material de plástico estéril fue obtenido en Corning Inc. (New York, NY). Anticuerpos primario anti ICAM-1 y anticuerpo secundario donkey Anti-goat IgG-HRP fueron adquirido en Santa Cruz Biotechnology Inc. (Texas, EEUU). Anticuerpo primario anti VCAM-1 fue comprado en Abcam (Cambridge, MA). Anticuerpo primario anti GAPDH y anticuerpo secundario Anti-rabbit IgG fueron obtenidos en Cell Signaling Technology Inc. (MA, EEUU). Ficoll-Histopaque® 1077 y Bradford Reagent fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). LPS-EB Ultrapure (E. coli O111:B4), fue comprado en InvivoGen (San Diego, CA). Reactivo RvD1 (CAS 872993-05-0) fue comprado a Cayman Chemical Company (MI, EEUU). Colagenasa tipo II (CAS 9001-12-1) y Trypan Blue Stain (CAS 15250-061) fueron comprados a Life Technologies Corporation (CA, EEUU). Alamar Blue (CAS DAL1025) fue comprado a Thermo Fischer Scientific (MA, EEUU). Cristal violeta se preparó en concentración 5 mg/mL MeOH 20%, el cual se realizó según protocolo de laboratorio.

5.2 Animales

Ratas fueron obtenidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. 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.

5.3 Aislamiento de fibroblastos cardíacos

Fibroblastos Cardíacos fueron aislados de los ventrículos de corazón de ratas neonatas Sprague Dawley (1-3 días de vida). Se decapitaron las ratas e inmediatamente se les removió el corazón en condiciones de asepsia, se les retiraron las aurículas, dejando los ventrículos los cuales fueron cortados en pequeños trozos para aumentar la superficie de contacto con la solución de digestión de colagenasa y pancreatina. Posteriormente se realizó un plaqueo del producto de la digestión por 2 horas a 37°C en medio de cultivo conteniendo suero fetal bovino (FBS) 5% y suero fetal de ternero 10%. Por adhesión diferencial al plástico, los FC se adhieren a diferencia de los cardiomiocitos, permitiendo su aislamiento. Al término de las 2 horas, se realiza un cambio de medio por DMEM-F12 con FBS 10%, y se deja proliferar a los FC a confluencia. Los cambios de pasaje se realizaron mediante tripsinización, lo que permite la purificación de los FC neonatos con respecto a células endoteliales.

5.4 Pasaje celular

Para la realización de todos los experimentos, las células fueron mantenidas en pasaje 1 (máximo hasta pasaje 2) en medio DMEM/F12 suplementado con FBS 10%, hasta esperar confluencia, para luego ser soltadas con tripsina/EDTA 0,05% en PBS 1X estéril, las cuales fueron contadas por el método de exclusión de Azul de tripán. Las células ya contadas se sembraron en placas plásticas de cultivo celular de 35 mm a una concentración de 150.000 cél/cm² para los ensayos de conteo celular y el ensayo de isquemia/reperfusión, 80.000 cél/cm² en placas plásticas de cultivo de 35 mm para los ensayos de adhesión y finalmente, 350.000 cél/cm² para la determinación de proteínas de adhesión ICAM-1 y

VCAM-1 en medio DMEM/F12 suplementado con FBS 10%. Se esperan 4 horas para que las células se adhieran a la placa, para luego lavarlas y privarlas con medio de cultivo DMEM/F12 por 24 horas.

5.5 Isquemia/reperfusión simulada

La isquemia simulada se lleva a cabo utilizando un medio isotónico preparado con iones comunes del medio extracelular (HEPES 25 mM, NaCl 115 mM, KCl 12 mM, MgCl₂•6H₂O 1,2 mM, CaCl₂•2H₂O 2 mM, ácido láctico 20 mM) carente de glucosa, exceso de potasio y a pH ligeramente ácido (pH = 6,2) junto con ambiente de nitrógeno en una cámara sellada a 37 °C, durante 8 horas. La reperfusión simulada se lleva a cabo cambiando el medio isquémico por DMEM-F12, en presencia/ausencia de RvD1 y dejando en incubadora a 37 °C a un ambiente de aire/CO₂ 95%/5% durante 24 horas. Las células control serán incubadas en DMEM-F12, medio de cultivo empleado, por el tiempo que dure la isquemia y la reperfusión (según sea el caso).

5.6 Determinación de viabilidad celular por conteo celular con azul de tripán

Para estos ensayos se utilizaron FC en placas de 35 mm a una densidad de 1,5x10⁵. Al término de la reperfusión, las células fueron tratadas con tripsina/EDTA 0,05% para soltarlas del plástico y luego se aplicó FBS 100% para inactivar a la tripsina. Utilizando el método de exclusión de Azul de tripán, se tomó una alícuota de 20 µl del medio de las células y se mezcló con 20 µl de azul de tripán, para así, a través de un microscopio óptico, discriminar y realizar el conteo de células vivas en cámara de Neubauer.

5.7 Determinación de viabilidad celular por ensayo con Alamar Blue

Para estos ensayos se utilizaron FC en placas Corning de 24 pocillos, sembrados a una densidad de 5x10⁴. Al término del estímulo, se realizó un cambio de medio por DMEM-

F12 a cada pocillo, y luego de 30 minutos se agregó alamar blue al 10%. Después de 4 horas, se midió en Fluorímetro la fluorescencia a 585 nm (λ excitación) y 570 nm (λ emisión).

5.8 Western blot

Cantidades equivalentes de proteína fueron separadas mediante SDS-PAGE. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y bloqueadas con leche descremada (10% p/v). Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo respectivo (ICAM-1 1:5000, VCAM-1 1:5000, 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.

5.9 Aislamiento de SMC

Para la obtención de SMC (células mononucleares de bazo, principalmente linfocitos y monocitos), se disectaron bazos de rata sprague dawley desde la cavidad abdominal, los cuales fueron recibidos en una placa con 4 mL de PBS 1X estéril y 1 mL de citrato de sodio, para luego ser triturado y filtrados a través de un tamiz de disociación celular (tamaño de poro: 380 μ m) hasta la obtención de una suspensión homogénea. Para depletar granulocitos y eritrocitos, se utiliza Ficoll-Histopaque® 1083, el cual se utiliza en relación 1:1 con lo obtenido en la suspensión celular, para luego ser centrifugada en centrífuga swinging bucket con rotor en 180° a temperatura ambiente por 30 minutos y 400G. Se producirá una interface rica en SMC, la cual fue recibida y lavada dos veces con PBS 1X, pH 7.4. Para lisar los eritrocitos remanentes, se resuspendió en pellet en NH_4Cl 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.

5.10 Ensayo de adhesión *in vitro* y tinción con cristal violeta

Sembrar de 50 a 80 mil células en DMEM-F12 + FBS 10% en placas de 35 mm para estímulo correspondiente. Luego de pasadas las horas de estímulo, se retira el medio y se lava una vez con PBS 1X estéril, para luego agregar DMEM-F12. Teniendo este nuevo medio de cultivo, agregar células leucocitarias en relación 1 : 5 (FC : SMC) y dejar actuar durante dos horas. Retirar el medio y lavar suavemente, dos veces con PBS 1X estéril. Agregar 1 ml de cristal violeta (5 mg/ml, MeOH 20%) y se deja actuar durante 20 minutos. A continuación, lavar las placas con agua destilada y dejar secar a temperatura ambiente hasta analizarlas mediante microscopía óptica.

5.11 Análisis estadístico

Todos los datos son presentados como el promedio \pm DS de al menos tres experimentos independientes. Las diferencias entre parámetros fueron evaluadas 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 Estudios de viabilidad y proliferación celular

Debido a que no existen trabajos previos de RvD1 sobre FC neonatos, se estudió el efecto de RvD1 sobre la viabilidad y proliferación de FCN para medir si existen efectos citotóxicos o mitogénicos de este estímulo. Para estos ensayos, utilizamos dos metodologías, mediante fluorimetría usando el reactivo AlamarBlue® y mediante conteo por exclusión del azul de tripán, con la finalidad de tener absoluta certeza de los resultados.

Previo al ensayo por AlamarBlue®, fue necesaria la realización de una curva de calibración para decidir la cantidad de células a sembrar en placa otorga una óptima lectura de éstas. Así, para determinar los efectos de RvD1 en la viabilidad y proliferación celular de FC neonatos, se incubaron cantidades crecientes de FC (desde 10.000 a 50.000 células por pocillo), para luego agregar el reactivo AlamarBlue® y medir fluorescencia emitida a 585 nm (λ excitación) y 570 nm (λ emisión) (como se indica en materiales y métodos).

Los resultados obtenidos en la figura 4, muestran una tendencia lineal entre el número de FC sembrados y fluorescencia emitida (índice de correlación de 0,9737). La mejor relación se obtuvo entre 30.000 y 50.000 FC neonatos sembrados. Por esta razón, se eligió utilizar para los experimentos posteriores 50.000 FC/pocillo.

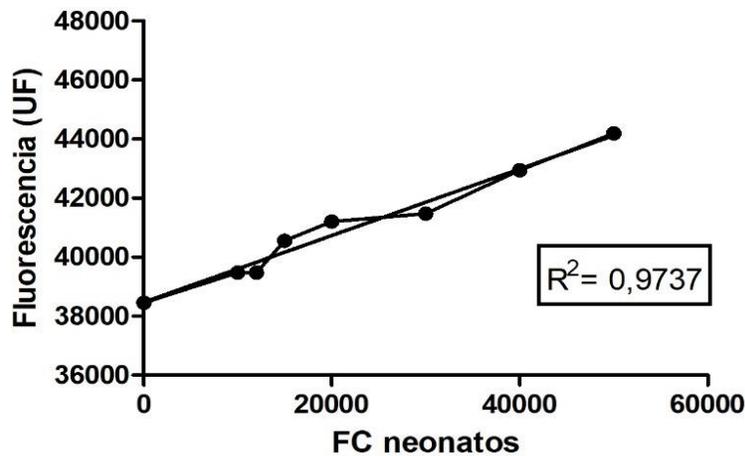


Figura 4. Curva de calibración de número de fibroblastos cardiacos. Se sembraron cantidades crecientes de FC neonatos, tomando 8 puntos que van desde 0 a 50.000 FC neonatos por pocillo. Se agregó AlamarBlue y se midió la fluorescencia. Se observa una buena correlación lineal entre 30.000 y 50.000 FC neonatos sembrados. Para los ensayos posteriores se eligió la cantidad máxima medida de 50.000 FC neonatos. Cada punto representa el promedio del triplicado de tres experimentos independientes.

6.1.1 Efecto de RvD1 sobre la viabilidad de FC.

6.1.1.1 Ensayo concentración-dependiente

Para saber si RvD1 tiene un efecto citotóxico sobre los FC neonatos, se evaluó en primer lugar si la RvD1, en un rango de concentración 0-500 nM, afecta la viabilidad celular. Se evaluó el efecto de RvD1 sobre la viabilidad de FC neonatos medidos a las 24 y 48 horas de estímulo. La viabilidad celular se determinó por fluorimetría utilizando el reactivo AlamarBlue®, midiendo la fluorescencia emitida por FC neonatos luego de ser estimulados con RvD1 (figura 5); así como también, por conteo celular por exclusión del azul de tripán, midiendo la cantidad de células vivas luego del estímulo con RvD1 (figura 6).

Como se puede observar en la figura 5, la viabilidad celular de FC neonatos no se ve afectada por RvD1 en ensayos concentración-dependiente, en la cual se observa que la fluorescencia emitida por FC neonatos a distintas concentraciones de RvD1 es similar a los valores del control (sin estímulo).

Para efectos comparativos, se realizó el mismo ensayo mediante el método de conteo por exclusión de azul de tripán, midiendo la cantidad de células vivas luego del estímulo con RvD1. En la figura 6, podemos apreciar que, la viabilidad de FC neonatos, medida mediante el método por conteo por exclusión del azul de tripán, no fue afectada por RvD1 de forma concentración-dependiente. En su conjunto, estos datos indican que la RvD1 no presenta un efecto citotóxico sobre los FC en un amplio rango de concentración.

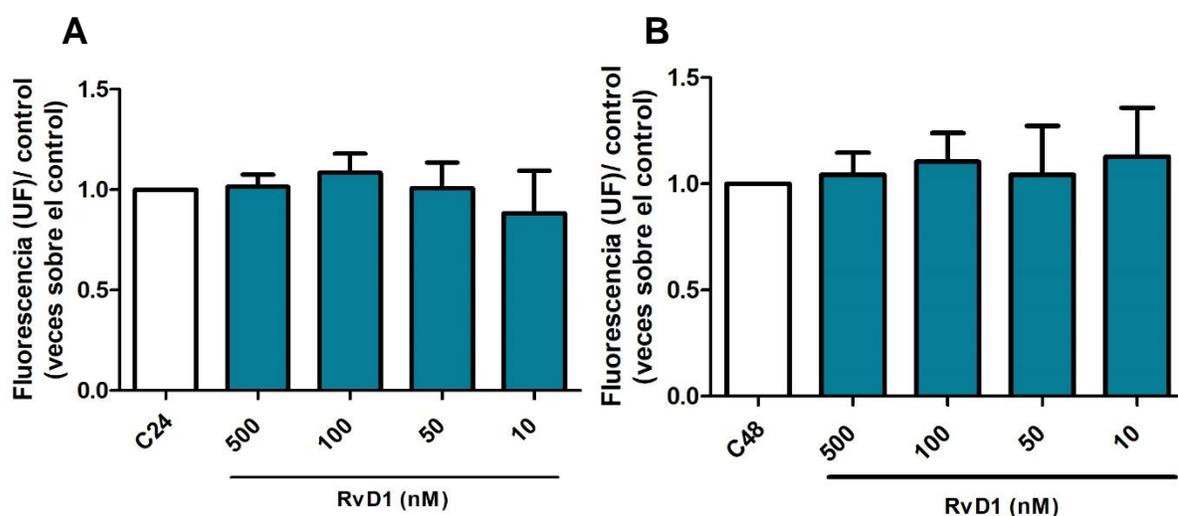


Figura 5. Efecto de RvD1 sobre la viabilidad de FC. FC fueron tratados con RvD1 a diferentes concentraciones (0-500nM) a un tiempo de 24 horas (figura 5A) y un tiempo de 48 horas (figura 5B). Posteriormente, se cuantificó el efecto de RvD1 sobre la viabilidad de FC por fluorescencia mediante el método de AlamarBlue®. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=3).

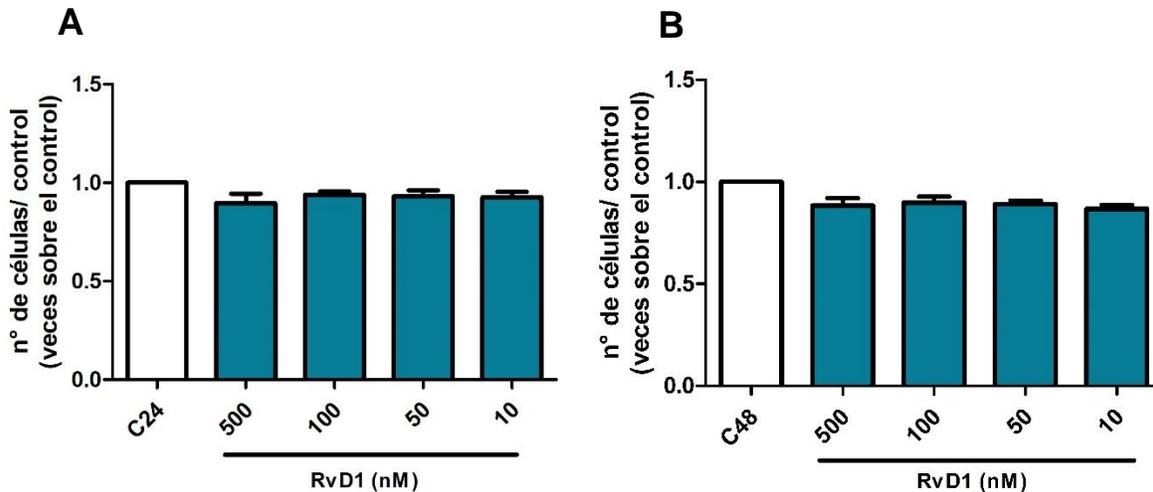


Figura 6. Efecto de RvD1 sobre la viabilidad de FC. FC fueron tratados con RvD1 a diferentes concentraciones (0-500nM) a un tiempo de 24 horas (figura 6A) y un tiempo de 48 horas (figura 6B). Posteriormente, se cuantificó el efecto de RvD1 sobre la viabilidad de FC por conteo por exclusión del azul de tripán. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=3).

Los resultados obtenidos anteriormente indican que RvD1 no afecta la viabilidad celular de manera concentración-dependiente. En base a nuestros resultados y datos de la literatura, hemos decidido utilizar como concentración de trabajo para los próximos experimentos RvD1 100 nM.

6.1.1.2 Ensayo tiempo-dependiente

Con el objetivo de evaluar si la RvD1 afecta la viabilidad en una manera dependiente del tiempo de estímulo, se evaluó el efecto de RvD1 hasta las 48 horas. La finalidad de este ensayo fue verificar que los efectos de las RvD1 no son tardíos. Para este efecto, se realizó un ensayo tiempo-dependiente con RvD1 100 nM, a tiempos de 0-48 horas, en donde se determinó viabilidad celular por fluorimetría utilizando el reactivo AlamarBlue®, midiendo fluorescencia emitida por FC luego de ser estimulados con RvD1 100 nM a los diferentes tiempos (figura 7), y por conteo celular por exclusión de azul de tripán, midiendo la cantidad de células vivas luego de cumplidos los tiempos con el estímulo con RvD1 100 nM (figura 8).

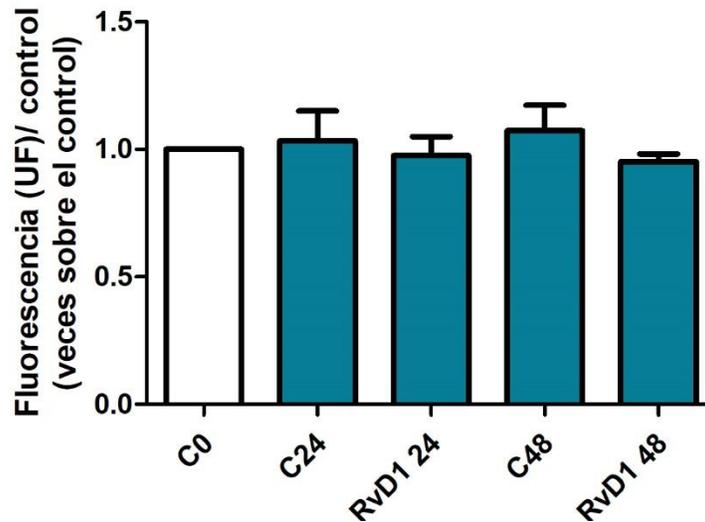


Figura 7. Efecto de RvD1 sobre la viabilidad de FC. FC fueron tratados con RvD1 (100nM) en medio DMEM/F12 durante 0-48 horas. Se determinó viabilidad mediante fluorimetría por AlamarBlue®. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=3)

Como se puede observar en la figura 7, los resultados obtenidos por la fluorescencia emitida de las muestras tratadas con RvD1 100 nM, a los tiempos de 24-48 horas, son cercanos a los valores obtenidos en sus respectivos controles (condición sin tratamiento). También, se midió viabilidad tiempo-dependiente con RvD1 mediante conteo celular (figura 8). Este resultado nos muestra que a tiempos de 24-48 horas, los FC neonatos tratados con RvD1 100 nM muestran un número similar al control a cada tiempo de análisis. En su conjunto, con estos resultados podemos inferir que RvD1 a concentraciones 100 nM no afecta la viabilidad celular de FC neonatos en un rango temporal de hasta 48 hrs.

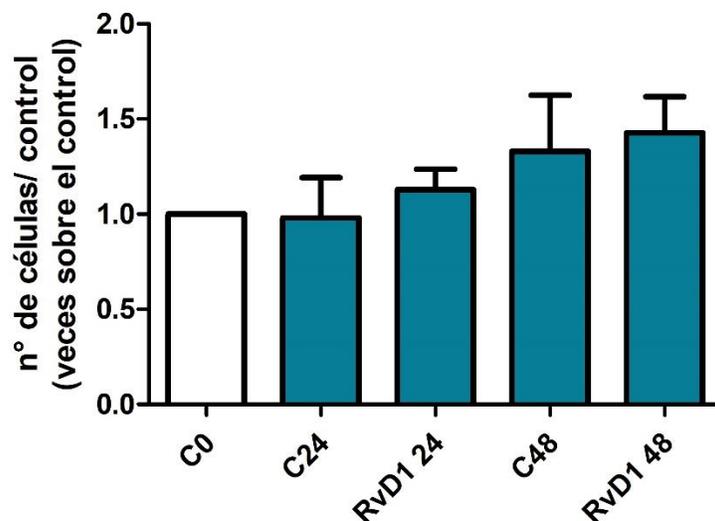


Figura 8. Efecto de RvD1 sobre la viabilidad de FC. FC fueron tratados con RvD1 (100nM) en medio DMEM/F12 durante 0-48 horas. Se determinó viabilidad mediante conteo celular. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=3)

6.1.2 Efecto de la RvD1 sobre la proliferación de los FC.

Posteriormente, estudiamos si la RvD1 era capaz de afectar la proliferación de los FC, con la finalidad de descartar efectos mitogénicos de las resolvinas. Datos de nuestro laboratorio han mostrado que DMEM-F12 enriquecido con FBS 10% aumenta la proliferación de FC. La proliferación de FC neonatos, se evaluó por fluorimetría (utilizando el reactivo AlamarBlue®), midiendo la fluorescencia emitida por FC neonatos luego de ser estimulados con RvD1 (figura 9); y por conteo celular por exclusión del azul de tripán, midiendo la cantidad de células vivas luego del estímulo con RvD1 (figura 10).

Los resultados de la figura 9, muestran la proliferación de FC inducida por SBS 10%, en presencia/ausencia de RvD1. La fluorescencia obtenida para los FC cultivados en un medio de cultivo DMEM-F12 enriquecido con FBS 10% tuvo un aumento estadísticamente significativo con respecto a control 0 (* $p < 0,05$ vs C0) y control 24 horas (## $p < 0,01$ vs C24), evidenciando un aumento en la proliferación de los FC neonatos. Para el tratamiento de FC neonatos con RvD1 100 nM durante 24 horas, podemos ver que el estímulo por si solo no

inhibe y no induce la proliferación de FC neonatos, llegando a fluorescencias cercanas a los valores del control. Por otro lado, en presencia de FBS 10% la RvD1 100 nM no muestra efectos respecto de la condición FBS 10%, indicando que la RvD1 no afecta la proliferación inducida por FBS. Además, se realizó este ensayo mediante conteo celular por el método de exclusión del azul de tripán. Como podemos apreciar, en la figura 10 se muestra el efecto proliferativo inducido por FBS 10%, siendo estadísticamente significativo a las 24 (* $p < 0,05$ vs C0) y 48 horas (** $p < 0,01$ vs C0). Sin embargo, como en el caso anterior, se observa que RVD1 100 nM en presencia de FBS 10%, no afecta la proliferación inducida por FBS. Lo anterior corrobora que la RvD1 no induce y no inhibe la proliferación de FC inducida por la presencia de FBS 10%.

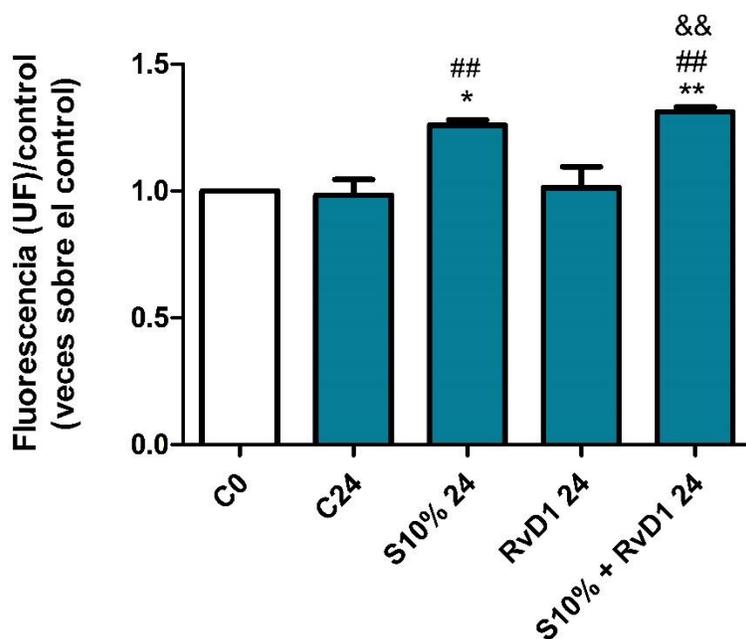


Figura 9. Efecto de RvD1 sobre la proliferación de FC. FC fueron tratados con RvD1 (100nM) en medio DMEM/F12 enriquecido con FBS 10% durante 24h. Se determinó la proliferación mediante el método de AlamarBlue®. * $p < 0,05$ vs control, ** $p < 0,01$ vs control, ## $p < 0,01$ vs control 24h, && $p < 0,01$ vs RvD1 24h 100 nM. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=3). C0= control 0 horas; C24= control 24 horas; S10% 24= FBS 10% 24 horas. S10% +RvD1 24= FBS 10% 24 horas en presencia de RvD1 100 nM.

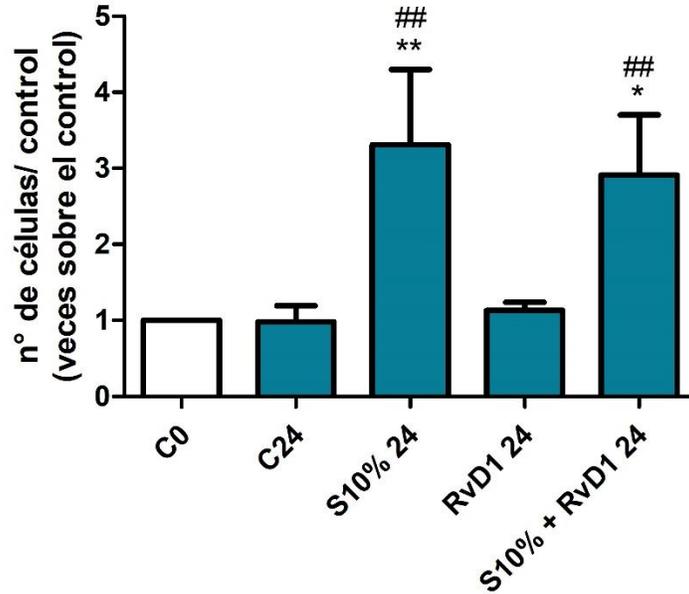


Figura 10. Efecto de RvD1 sobre la proliferación de FC. FC fueron tratados con RvD1 (100nM) en medio DMEM/F12 enriquecido con FBS (S) 10% durante 24 y 48h. Se determinó la proliferación mediante conteo celular. * $p < 0,05$ vs C0, ** $p < 0,01$ vs C0, # $p < 0,05$ vs C24, ## $p < 0,01$ vs C24. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM (n=3). C0= control 0 horas; C24= control 24 horas; S10% 24= FBS 10% 24 horas. S10% +RvD1 24= FBS 10% 24 horas en presencia de RvD1 100 nM.

6.2 Efecto citoprotector de RvD1 en muerte de FC neonatos inducida por isquemia/reperfusión simulada.

Nuestro objetivo fue estudiar si RvD1 posee un efecto citoprotector de la muerte de FC neonatos inducida por isquemia/reperfusión simulada. Así, para cumplir con este objetivo los FC neonatos fueron tratados en un medio isquémico por 8 horas (medio salino sin glucosa, pH ácido, alta concentración de potasio y un ambiente rico en N_2); seguido de esto, los FC neonatos fueron sometidos a reperfusión simulada (I/Rs) (medio DMEM-F12 y un ambiente Aire/ CO_2 95%/5%) por 24 horas, en presencia/ausencia de RvD1 100 nM. La viabilidad celular fue cuantificada mediante conteo celular por el método de exclusión del azul de tripán. La figura 11 muestra que los FC neonatos sometidos a isquemia por 8 horas su viabilidad no fue afectada, en comparación con los FC neonatos sometidos a I/R, los cuales muestran una pérdida estadísticamente significativa de la viabilidad celular, comparado con los valores obtenidos en isquemia sin reperfusión. Este mismo efecto se

observa tanto en presencia (* $p < 0,05$ vs I) como en ausencia (* $p < 0,05$ vs I) de RvD1 100 nM. Estos resultados sugieren que la RvD1 100 nM no protege ante muerte inducida por I/Rs.

En base a todo lo anterior, podemos decir que RvD1 100 nM no presenta un efecto citoprotector ante el fenómeno de muerte celular en FC neonatos inducida por I/R.

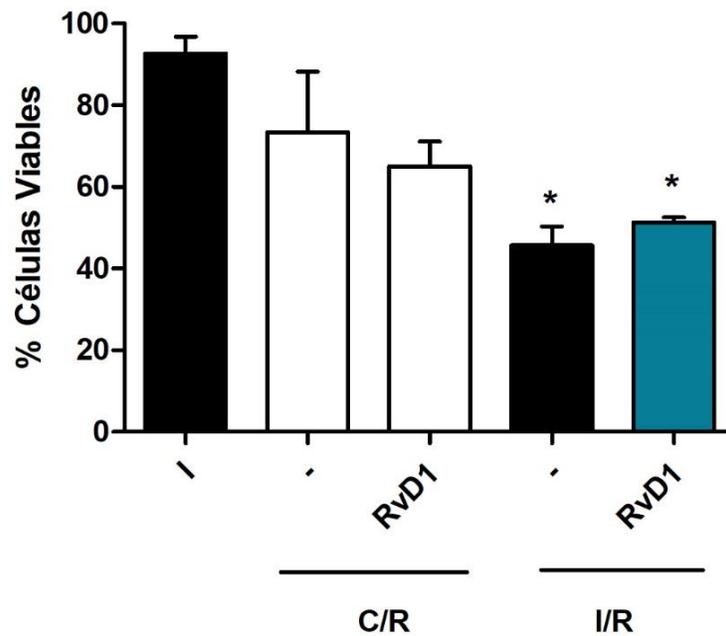


Figura 11. Efecto de RvD1 sobre la viabilidad en I/Rs. FC fueron sometidos a isquemia por 8 horas para posterior reperfusion de 24 horas, con presencia/ausencia de RvD1 100 nM. Los resultados fueron expresados como promedio \pm SEM. (n=3). * $p < 0,05$ vs I. I = isquemia; C/R = control reperfusion; I/R = isquemia/reperfusion.

6.3 Efecto de RvD1 sobre cambios en VCAM-1 e ICAM-1

Respecto de la expresión de moléculas de adhesión, hasta la fecha no existe información en la literatura de los efectos de la RvD1 en FC neonatas. Con este objetivo, se estudió si la RvD1 en un rango de concentración de 0-500 nM, afecta los niveles de expresión de VCAM-1 e ICAM-1, así como también un ensayo dependiente del tiempo de exposición.

6.3.1 Efecto de RvD1 concentración-dependiente en la expresión de VCAM-1 e ICAM-1

Como se puede apreciar en la figura 12, el estímulo de RvD1 a las distintas concentraciones (0-500 nM) no afectó los niveles de expresión de VCAM-1 (figura 12A) e ICAM-1 (figura 12B), llegando cada estímulo a valores cercanos al valor control. Esto indica que RvD1 por sí sola y de manera dosis-dependiente, no afecta los niveles de expresión de las proteínas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1.

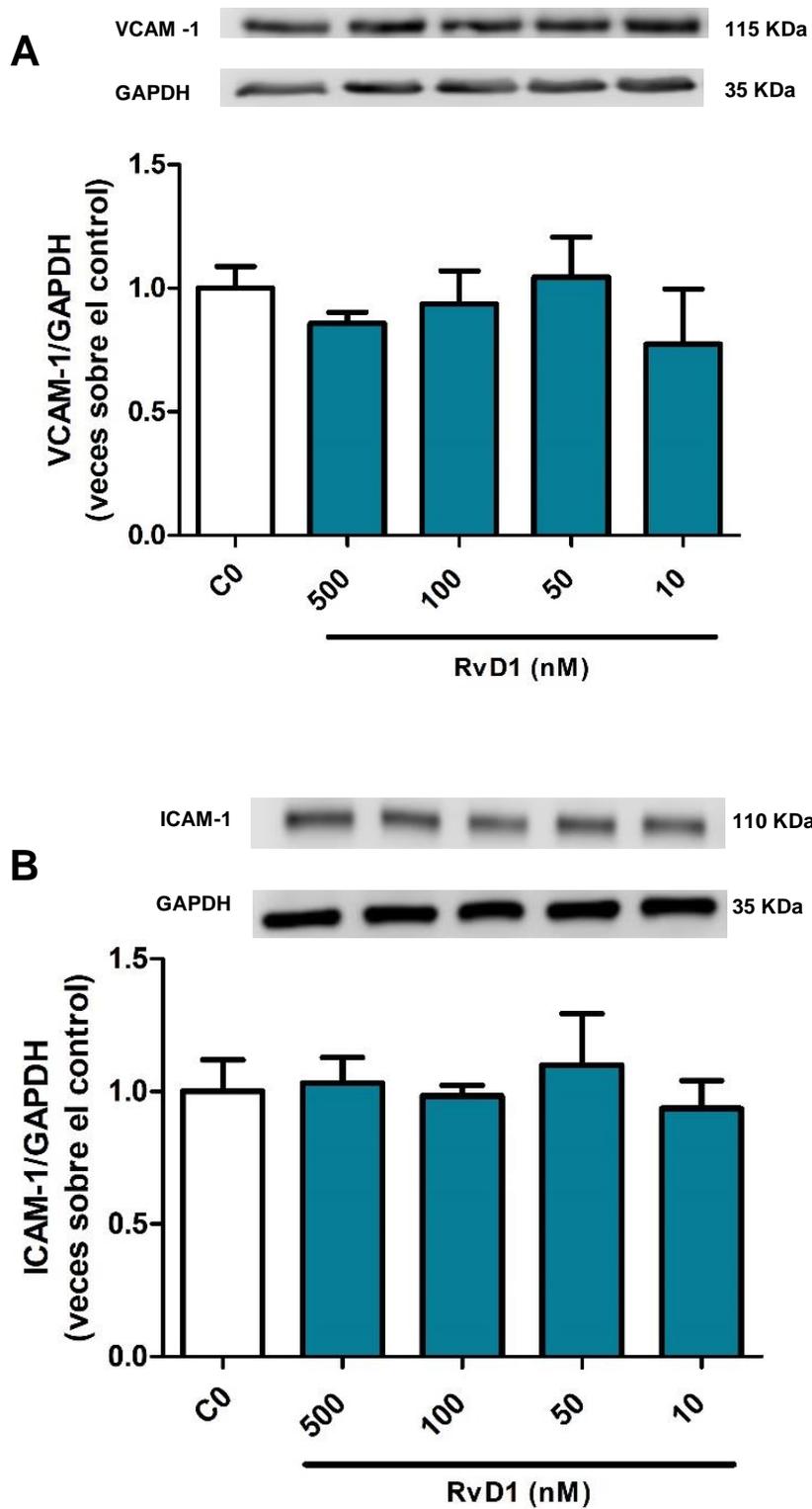


Figura 12. Efecto de RvD1 sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC. FC fueron incubados y tratados con RvD1 a diferentes concentraciones (0-500nM) a un tiempo de 24h. Los niveles de expresión de VCAM-1 (figura 12A) y de ICAM-1 (figura 12B) fueron determinados por WesternBlot. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=3).

6.3.2 Efecto tiempo-dependiente de RvD1 sobre la expresión de VCAM-1 e ICAM-1

Bajo esta misma lógica, quisimos comprobar si la RvD1 aumentaba los niveles de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 en una relación tiempo-dependiente. Así, se midió el efecto de RvD1 sobre los niveles de VCAM-1 e ICAM-1 a distintos tiempos de incubación (0-72 horas). Como podemos observar en la figura 13, la RvD1 100 nM por 0-72 horas de estímulo, no indujo cambios en los niveles de expresión de VCAM-1 (figura 13A) y de ICAM-1 (figura 13B). En su conjunto estos resultados sugieren que la RvD1, por sí misma, no modifica los niveles de expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1.

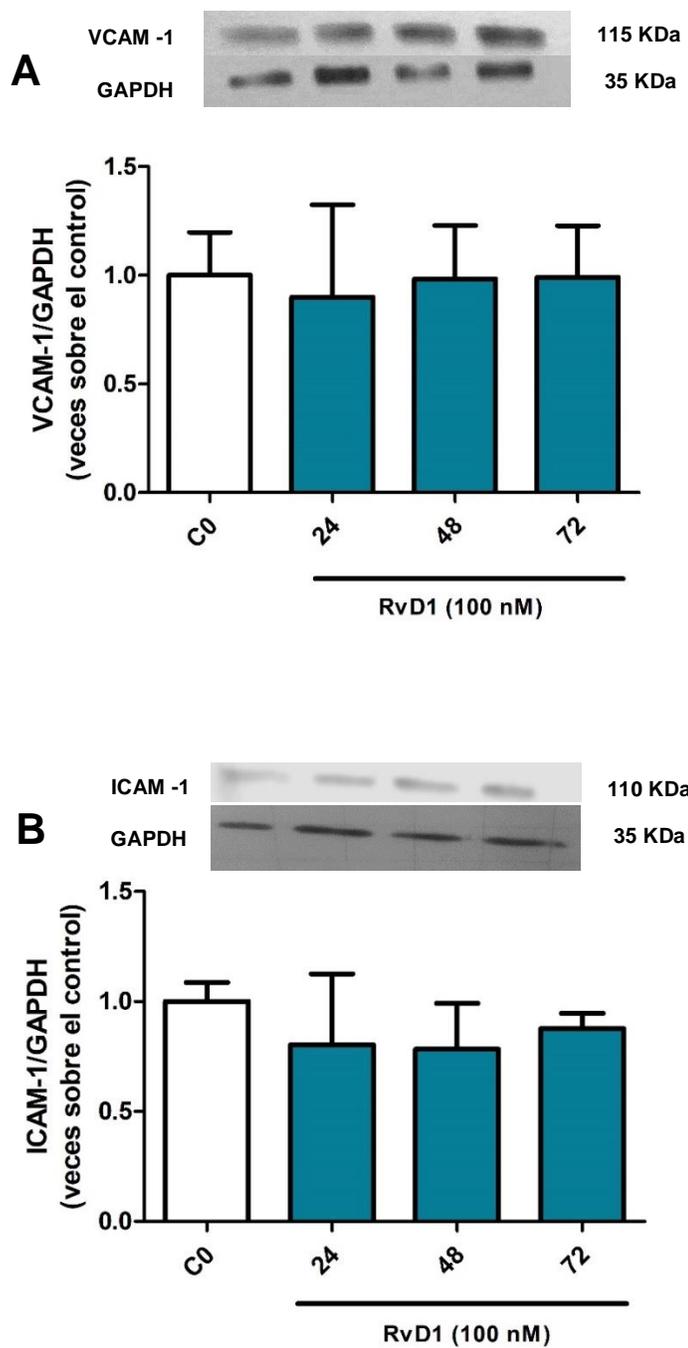


Figura 13. Efecto de RvD1 sobre los niveles de expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en FC. FC fueron tratados con RvD1 a diferentes tiempos (0-72h). los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 fueron determinados por Western Blot. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=3)

6.3.3 Efecto de la RvD1 sobre los niveles de expresión de VCAM-1 e ICAM-1 inducidos por LPS

Como ha sido mencionado anteriormente, LPS induce un fuerte aumento en los niveles de expresión de las moléculas de adhesión. Por este motivo nuestro siguiente objetivo fue estudiar si la RvD1 modifica los niveles de expresión de esas proteínas inducidas por LPS. Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que, en FC, el LPS aumenta los niveles de VCAM-1 e ICAM-1 con un efecto máximo a las 24 horas. Así, con el objetivo de conocer si RvD1 posee un efecto antiinflamatorio, se pre-estimularon FC neonatos con RvD1 100 nM por una hora, para posteriormente estimular con LPS (1 µg/ml) por 24 horas. Los resultados se cuantificaron mediante WesternBlot.

En la figura 14A, se observa que LPS aumenta de manera estadísticamente significativa los niveles de expresión de VCAM-1 con respecto al control ($***p<0,001$ vs control), mientras que la RvD1 por si misma, no muestra efecto sobre la expresión de VCAM-1. No obstante, RvD1 previno el aumento de los niveles de expresión de VCAM-1 inducido por LPS, observándose una disminución estadísticamente significativa con respecto a LPS ($###p<0,001$ vs LPS).

En el caso de ICAM-1 (fig. 14B), se puede observar que LPS aumenta significativamente los niveles de ICAM-1 ($*p<0,05$ vs control), mientras que la RvD1 por sí misma no tuvo efecto en los niveles de expresión de ICAM-1. En el caso de los FC neonatos pre-tratados con RvD1 y luego estimulados con LPS, es posible apreciar una regresión parcial en los niveles de esta proteína respecto al aumento inducido por LPS, la cual no alcanzó a ser estadísticamente diferente respecto de LPS. En su conjunto los resultados muestran que la RvD1 disminuye los niveles de expresión de moléculas de adhesión inducidos por LPS.

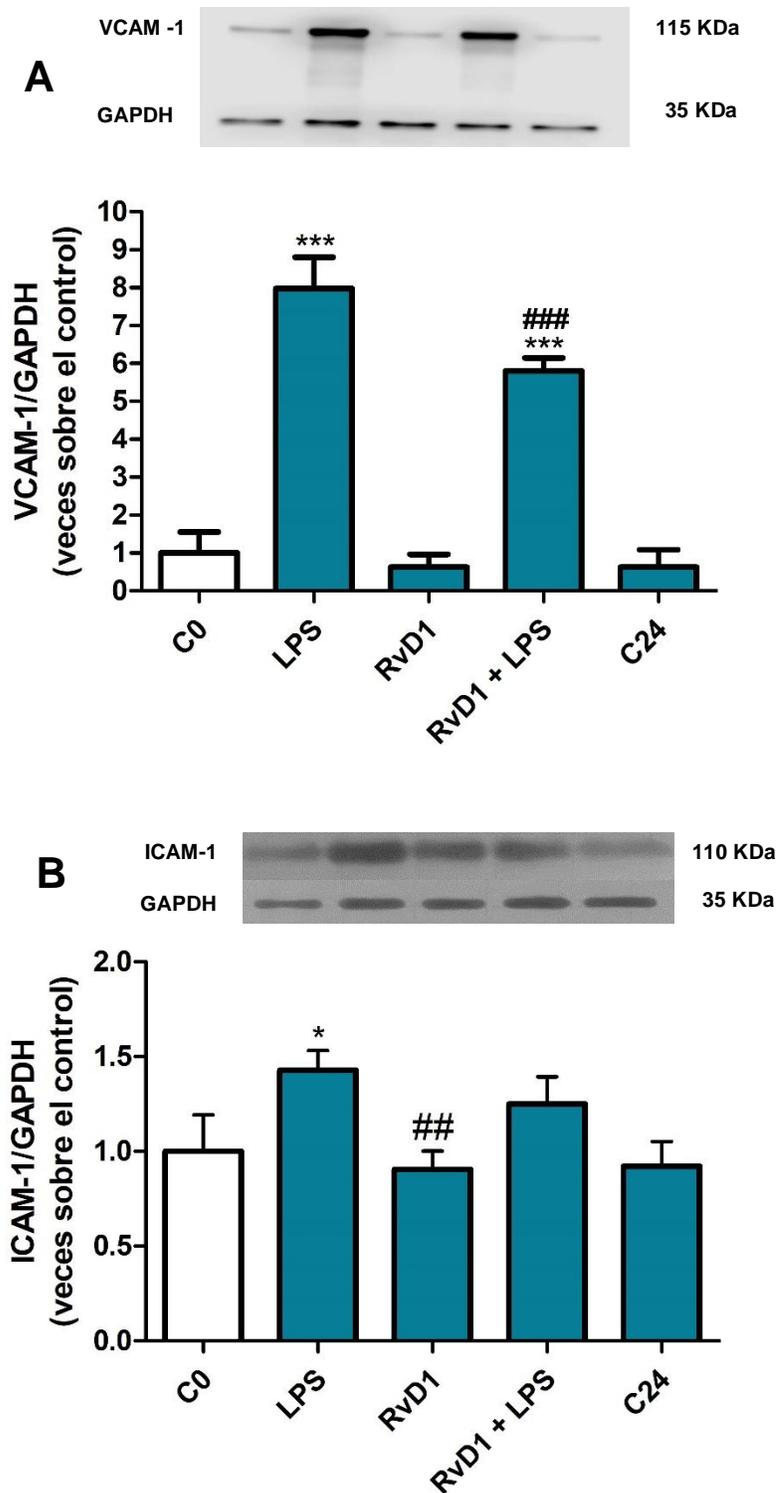


Figura 14. Efecto de RvD1 sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 FC inducidos por LPS. FC fueron pretratados con RvD1 (100nM) durante 1h, para luego agregar LPS (1ug/ml), esperando 24 horas. Los niveles de expresión de VCAM-1 (figura 14A) e ICAM-1 (figura 14B) fueron determinados por WesternBlot. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=3). ***p<0,01 vs control; ###p<0,001 vs LPS; *p<0,05 vs control. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=3).

6.4 Efecto de RvD1 sobre la adhesión de leucocitos a FCN

Las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 favorecen la adhesión de células del sistema inmune a las células que expresan esas proteínas, y específicamente en el sitio de daño tisular promueven y aumentan la respuesta inflamatoria.

Para determinar el efecto de RvD1 sobre la adhesión de SMC a FC neonatos, se realizaron ensayos de adhesión con FC neonatos, los cuales fueron pre-tratados con RvD1 100 nM durante una hora, para luego estimularlos con LPS 1 µg/ml por 24 horas. Pasado el tiempo de tratamiento de muestra, se retiró el medio de cultivo condicionado, y se reemplazó por uno fresco, en donde se realizó el ensayo de adhesión. Para tal efecto los leucocitos, y específicamente células mononucleares de bazo (SMC), fueron agregados durante 2 horas para evaluar adhesión. Se lavó placa para retirar los SMC no adheridos, posteriormente los FC fueron fijados y teñidos con cristal violeta para su posterior análisis mediante microscopía óptica.

En los resultados de la figura 15, se puede observar que los FC neonatos muestran la capacidad de adherir a los SMC; sin embargo, poseen menor capacidad de adhesión de SMC, en comparación con aquellos estimulados con LPS ($***p<0,001$). Además, se puede demostrar que el pre-tratamiento de los FC con RvD1 disminuyó la adhesión de los SMC a los FC inducida por LPS ($##p<0,01$ vs LPS). Por último, se muestra una imagen representativa (figura 15B), de la adhesión de SMC a FC (las flechas muestran los SMC adheridos a los FC).

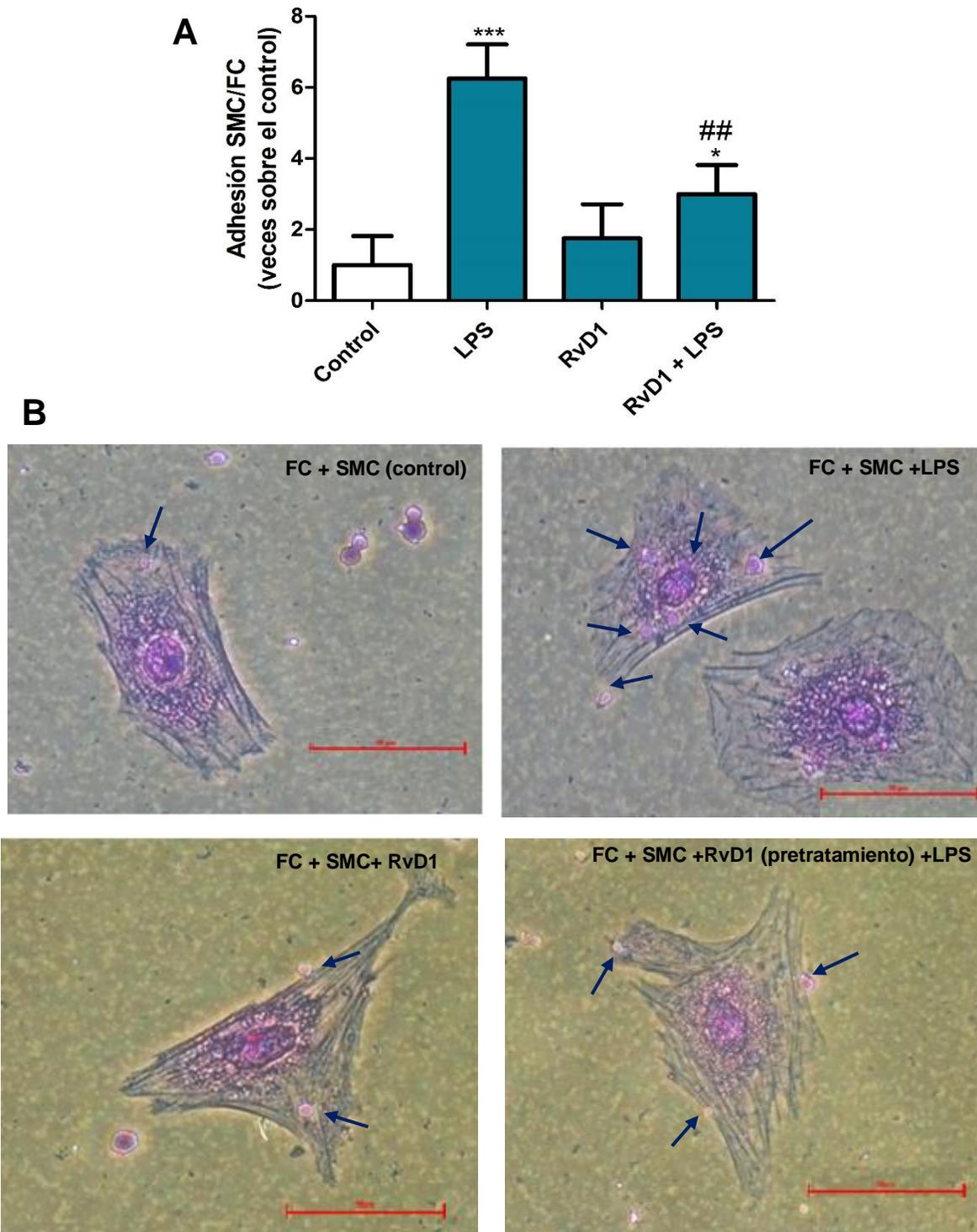


Figura 15. Efecto de RvD1 sobre el reclutamiento de SMC sobre FC. (fig. 15A) FC fueron preincubados 1 hora con RvD1 (100 nM) posteriormente con LPS (1ug/ml) por 24 horas. Luego del tiempo de incubación, se agregaron SMC y se midió la adhesión por dos horas. Los SMC no adheridos fueron removidos, y las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. *** $p < 0,001$ vs control; * $p < 0,05$ vs control; ## $p < 0,01$ vs LPS. $n=3$. (fig. 15B) Imagen representativa de adhesión de SMC sobre una monocapa de FC en cultivo, obtenida mediante tinción con cristal violeta. Se aprecia que los FC neonatos estimulados con LPS poseen mayor capacidad de adhesión de SMC.

7. DISCUSIÓN

Los fibroblastos cardíacos son células conocidas tradicionalmente por poseer un rol estructural en los tejidos, manteniendo la homeostasis de la matriz extracelular (MEC) al ser capaces de responder a señales químicas y mecánicas para regular la estructura cardíaca [5,7]. FC expresa el receptor TLR4, pudiendo responder a señales de daño como PAMPS y DAMPS, secretando una amplia variedad de citoquinas y/o quimioquinas pro-inflamatorias que inician el proceso inflamatorio necesario para la reparación y recuperación de la homeostasis del tejido [8,9]. Es ampliamente documentado en la literatura el efecto antiinflamatorio de RvD1 [18,19,24], los cuales han sido demostrados en diferentes modelos celulares, no así en FC. De esta forma es que surge el interés de realizar estudios en FC junto con RvD1, como posible terapia antiinflamatoria y útil herramienta frente a reparación cardíaca y daño por enfermedades cardiovasculares, principal causa de muerte en el mundo [1].

En el presente trabajo se investigaron los efectos citotóxicos de RvD1 sobre FCN, donde se demuestra que RvD1 no afecta la viabilidad de FCN de manera concentración-dependiente ni de manera tiempo-dependiente, y que tampoco afecta proliferación celular en FCN. Por otro lado, los estudios hechos en un modelo de isquemia/reperfusión simulada muestran que RvD1 no protege a FCN de la muerte celular inducida por este método. También, se estudiaron los efectos de RvD1 sobre la expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 en FCN tratados con LPS, en donde RvD1 muestra disminuir los niveles de expresión de estas proteínas en FCN inducidos por LPS. Finalmente, se investigó las consecuencias de la interacción física sobre FCN co-cultivados con SMC, dando cuenta de que la adhesión de SMC a FCN inducidos por LPS es prevenida al pre-tratar FCN con RvD1.

7.1 Efecto de RvD1 sobre la viabilidad y proliferación de FCN.

Como ha sido mencionado anteriormente, no existen trabajos que asocien el efecto antiinflamatorio de RvD1 en FC. Nuestro estudio consideró realizar en primera instancia, la posible citotoxicidad de este estímulo sobre FC. Los ensayos de viabilidad de forma concentración-dependiente y tiempo-dependiente, demostraron que la RvD1 no afecta, ni manera concentración dependiente y tiempo dependiente, la viabilidad de los FC. Al respecto, nuestros resultados son coincidentes con los descritos en la literatura, al menos en células de musculatura lisa de aorta de rata ^[47], donde se demostró que la RvD1 no induce citotoxicidad en un rango de concentración de 0,01-100 [nM] a tiempos de hasta 96 horas.

Luego de medir los efectos concentración-dependiente y tiempo-dependiente de RvD1, se procedió a estudiar los efectos en la proliferación celular de este mediador lipídico. Los resultados obtenidos dan cuenta de que la RvD1 100 nM por si misma no inhibió y tampoco indujo la proliferación de FCN, y que, por ende, no afecta la proliferación en FC. Datos obtenidos en nuestro laboratorio muestran ser acordes a lo obtenido en esta tesis, puesto que la RvD1 no mostró activar la vía señalización intracelular mediada por pERK1/2. Las quinasas MEK1 y MEK2 juegan un rol en la vía de las MAPK, que controlan la proliferación celular y diferenciación. Estas quinasas son activadas por una amplia variedad de factores de crecimiento, citoquinas, etc.^[48], que estimulan la proliferación celular; sin embargo, estos resultados demuestran que en los FC la RvD1 no indujo la proliferación celular.

La evidencia bibliográfica muestra resultados contradictorios entre respecto del efecto de las RvD1 sobre la proliferación celular, los cuales, al parecer, dependen del tipo celular. Evidencias sugieren que en fibroblastos de ligamento periodontales (PDL) humanos, la RvD1 aumenta la proliferación celular de estas células, las que son claves en la

regeneración de tejido suave y duro alrededor del diente, presentando un efecto protector a los ligamentos periodontales ^[45]. Por otro lado, en células epiteliales alveolares humanas tipo II, se describe que la RvD1 (10-100 [nM]), aumenta la proliferación celular, a través de la activación del receptor ALX presente en este tipo celular ^[49]. En cambio, en el trabajo Wu et al., 2013, realizado en fibroblastos de pulmón, en modelo de inflamación aguda inducida por LPS, el tratamiento con RvD1 redujo la expresión de COX-2 y PGE2, inhibiendo a tempranamente la proliferación de los fibroblastos de pulmón. En este trabajo se encontró que el aumento en la expresión de COX2 se debe parcialmente a la activación de ERK1/2 y PI3K/AKT y que la RvD1 suprime la fosforilación de PI3K/AKT y de ERK1/2 en este modelo celular ^[46]. En otro trabajo, donde se examinaron los efectos de AT-RvD1 (resolvina D1 gatillada por aspirina) en células de cáncer de pulmón A549, y los resultados dan cuenta de que AT-RvD1 no afectó la proliferación de estas células ^[50]. Por otra parte, estudios realizados utilizando RvD1 en un dispositivo para el suministro local de RvD1 al tejido vascular, basado en poli-ácido láctico-co-glicólico in vitro durante 56 días en endotelio vascular humano y células musculares lisas, dan cuenta de que RvD1 liberada desde el dispositivo atenuó la migración de estas células, la proliferación y la activación de NF- κ B inducida por TNF- α , sin evidencia de citotoxicidad ^[51]. Finalmente, otros estudios muestran que en un modelo in vivo de fibrosis tisular por obstrucción uretral unilateral (UUO) en ratones tratados con RvD1 se redujo significativamente la proliferación de miofibroblastos y la secreción de colágeno I ^[52].

En su conjunto, estos precedentes sugieren que, los datos divergentes presentes en la literatura que muestran el efecto proliferativo de RvD1, dependen del tipo celular, y no del estímulo en sí, y que la RvD1 no muestra efectos citotóxicos en ninguno de los modelos celulares antes mencionados. Hasta la fecha, no hay trabajos que describan los efectos de

RvD1 sobre la proliferación en FCN, convirtiendo este resultado en la primera evidencia que describe la acción de RvD1 en este tipo celular.

7.2 Efecto citoprotector de RvD1 en muerte de FCN neonatos inducida por isquemia/reperfusión simulada.

En enfermedades coronarias, como el infarto cardíaco, podemos observar muerte celular inducida por isquemia/reperfusión (I/R). Primero sucede el evento isquémico, caracterizado por la interrupción del flujo sanguíneo al tejido cardíaco, dejando a las células sin nutrientes ni O_2 , y la posterior restitución del flujo sanguíneo, conocida como reperfusión. Se ha investigado que los efectos de la reperfusión son complejos, incluyendo algunos efectos deletéreos referidos como daño por reperfusión, involucrando la activación de una cascada inflamatoria que ayuda a acelerar la progresión por muerte celular, ocasionada principalmente por la formación de radicales libres, aumento de los niveles intracelulares de Ca^{+2} y la infiltración de células inflamatorias leucocitarias ^[53]. Como la inflamación tiene un rol importante en el daño producido por I/Rs, se estudió si RvD1 posee un efecto citoprotector en la muerte celular inducida por este método. Los resultados indican que RvD1 no previno la muerte celular inducida por I/Rs en FCN.

Este resultado, se contradice con lo encontrado en la literatura. En modelos de daño hepático, las ratas fueron sometidas a isquemia/reperfusión agregando RvD1 intravenoso, y se demostró que la RvD1 actúa inhibiendo las cascadas inflamatorias, atenuando los niveles de IL-6, TNF- α y de mieloperoxidasas. Además, reduce la apoptosis e incrementa la fosforilación de AKT ^[44]. En otros estudios de I/R realizados en hígado de rata, la administración de AT-RvD1 intravenosa disminuyó significativamente los niveles de alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa, disminuyendo la lesión histológica producida en el hígado y los signos de inflamación del tejido ^[54]. Otros estudios, en los cuales fue realizada I/R en pulmón, ratas administradas con RvD1 100 ug/kg mostraron

mejorar el metabolismo energético inducido por I/R, además de disminuir la tasa de apoptosis, lo que resulta en la protección de la lesión pulmonar inducida por I/R [55].

En la literatura se señala que la isquemia disminuye el aporte de nutrientes y oxígeno a los tejidos lo que produce la caída en los niveles de ATP, gatillando la muerte celular de un modo dependiente del tiempo [56], por lo que se podría sugerir que la muerte inducida por la isquemia simulada sería ocasionada por la falta de elementos vitales necesarios para la sobrevivencia de FC, tales como el oxígeno y ATP. Datos del laboratorio indican que los FC sometidos a isquemia simulada mueren de un modo dependiente del tiempo, siendo significativo a partir de las 12 horas y continuando hasta las 24 horas. Además, investigaciones han demostrado que FC sujetos a hipoxia muestran una disminuida capacidad proliferativa y una aumentada capacidad para secretar citoquinas [57,58].

Así, las diferencias encontradas entre nuestros resultados y la literatura, podrían ser explicadas debido al modelo de I/R aplicado, ya que, en los modelos revisados en la literatura, se utilizaron modelos in vivo de ratas sometidas a 60 minutos de isquemia y 6 horas de reperfusión, mientras que el modelo de I/Rs utilizado en el laboratorio fue probado en células de FC in vitro, el cual fue más agresivo, incluyendo hipoxia por 8 horas, ausencia de nutrientes y pH ácido, para luego realizar la reperfusión de 24 horas. Estas diferencias complementan los efectos deletéreos atribuidos a la hipoxia en los otros trabajos, lo que influiría negativamente en la viabilidad de los FCN sujetos a isquemia simulada.

7.3 Efecto de la RvD1 sobre los niveles de expresión de VCAM-1 e ICAM-1 inducidos por LPS

A pesar de que FC no son parte del grupo de células inmunes, estos son capaces de expresar moléculas de adhesión tales como VCAM-1 e ICAM-1, además de producir citoquinas y quimioquinas en respuesta a estímulos de daño como los PAMPs, entre ellos, el lipopolisacárido bacteriano (LPS) [8,9]. Si bien ICAM-1 y VCAM-1 son constitutivamente

expresados por varios tipos celulares, estos aumentan su expresión por estímulos proinflamatorios, tales como IL-1, LPS y esteres de forbol, entre otros [59]. Resultados obtenidos en diferentes oportunidades en nuestro laboratorio, corroboran que la activación vía LPS del TLR4 en FC, induce un aumento en los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1, obteniendo una máxima expresión a las 24 horas de estímulo [8,15]. Esta información es consecuente con trabajos realizados en células renales humanas, deomstrando un aumento en los niveles de VCAM-1 inducidos por LPS [60]. En trabajos realizados en FC, se reporta un aumento en los niveles de mRNA de ICAM-1 y VCAM-1 en FC expuestos a LPS [61]. Hallazgos similares fueron realizados por Turner et al. [62], quien observó que IL-1 y TNF- α ambos inducían un aumento en los niveles de expresión de ICAM-1 a las 24 h en FC.

Como hemos mencionado anteriormente, no existen trabajos en los cuales se demuestren las propiedades antiinflamatorias de RvD1 en FCN. De esta manera, se midió primeramente si RvD1 por sí sola aumenta los niveles de estas moléculas de adhesión, ya sea de manera concentración-dependiente o tiempo-dependiente. Nuestros resultados demuestran que RvD1 no tiene efectos en la expresión de estas moléculas de adhesión de forma concentración ni tiempo-dependiente. Dentro de la revisión bibliográfica realizada, no se reportan trabajos que evalúen los efectos de RvD1 sobre las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 de manera concentración-dependiente y tiempo-dependiente, lo que da cuenta de que este resultado es la primera evidencia reportada en este ámbito.

Habiendo demostrado que por si sola, RvD1 no influye en los niveles de VCAM-1 e ICAM-1, es que se investigó el efecto de RvD1 sobre los niveles de expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en FC inducidos por LPS. Los resultados dan cuenta de que LPS aumentó de manera estadísticamente significativa los niveles de expresión de VCAM-1 con respecto al control. No obstante, RvD1 previno el aumento de los niveles de expresión de VCAM-1

inducido por LPS. En el caso de ICAM-1, se aprecia una leve disminución en los niveles de esta proteína en FC pre-tratados con RvD1 respecto al aumento inducido por LPS. Esto, a pesar de no ser significativo, marca una tendencia de los efectos de RvD1 en modelos pro-inflamatorios. En su conjunto, ambos resultados muestran que efectivamente la RvD1 disminuye los niveles de expresión de moléculas de adhesión inducidos por LPS.

Los resultados obtenidos son acordes con lo que podemos encontrar en la literatura, en donde se han reportado los efectos preventivos de RvD1 en un contexto inflamatorio. Trabajos en donde se investigó los efectos antiinflamatorios de la resolvina D1 (AT-RvD1) gatillada por la aspirina, su precursor (ácido 17 (R) -hidroxi-docosahexaenoico [17R-HDHA]) y la resolvina D2 (RvD2) en modelos de colitis inducida por dextrano sulfato sódico (DSS) en ratón ^[63], muestran que el tratamiento sistémico con AT-RvD1, RvD2 o 17R-HDHA redujeron los niveles de citocinas colónicas para TNF- α , IL-1 β , MIP-2 y CXCL1 / KC, inhibe la vía de NF- κ B y disminuye la expresión moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1 en colon de ratón con colitis inducida por DSS. Otros trabajos, realizados en células humanas alveolares, en donde se trabajó con la línea celular A549, las que fueron tratadas con IL-1 β en presencia de AT-RvD1, muestran disminuir la expresión de ICAM-1 mediada por IL-1 β ^[64]. En otros trabajos, se investigaron los efectos de la administración de AT-RvD1 utilizando modelos de ratón con daño renal agudo inducido por LPS ^[65], en donde se da cuenta de que la administración de AT-RvD1 disminuyó los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1.

De esta manera, es que damos cuenta de que nuestros hallazgos coinciden con lo encontrado en la literatura, indicando que RvD1 tiene una potente función antiinflamatoria, disminuyendo los niveles de moléculas de adhesión las cuales están en íntima relación con los procesos inflamatorios, reclutamiento de células del sistema inmune y perduración del estímulo inflamatorio.

7.4 Efecto de RvD1 sobre la adhesión de leucocitos a FCN

Durante la fase inflamatoria hay una inducción de quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión que dan lugar al reclutamiento de leucocitos hacia el área infartada [66,67]. La región infartada es, en consecuencia, dinámica y hospeda a diferentes tipos celulares, tales como neutrófilos, monocitos/macrófagos, mastocitos, fibroblastos y células vasculares, que secuencialmente se infiltran en el miocardio dañado a través una serie de eventos orquestados [62]. Dentro de la respuesta inflamatoria, existe la respuesta inmune, en donde comienza el reclutamiento leucocitario para así eliminar los organismos invasores y reparar el tejido dañado, permitiendo el retorno a la homeostasis. La resolución de la inflamación involucra el término de reclutamiento de neutrófilos, la contraregulación de mediadores proinflamatorios, la estimulación del clearance mediado por macrófagos, y el remodelamiento del tejido [19]. Dentro de esta respuesta inflamatoria, son las moléculas de adhesión celular ICAM-1 y VCAM-1 las que permiten la adhesión de células del sistema inmune al endotelio [22], siendo un paso crítico en la perduración del estímulo inflamatorio.

En la respuesta inmune, se destaca la participación de neutrófilos, quienes se infiltran al sitio de injuria dentro de las primeras horas de daño, acumulándose en el sitio de inflamación [68]. Los neutrófilos son un tipo de leucocito de la clase polimorfonucleares (PMN), los cuales son reconocidos como uno de los más importantes participantes durante el proceso inflamatorio y de defensa del organismo [69], siendo capaces de eliminar patógenos por múltiples mecanismos [70]. En segundo lugar, llegan los monocitos, los cuales pueden diferenciarse a macrófagos capaces de eliminar microbios, desechos celulares, y neutrófilos polimorfonucleares mediante fagocitosis, lo que inicia la resolución de la inflamación [21]. De esta manera, es necesario discontinuar el reclutamiento de neutrófilos en orden de resolver la inflamación [23]. Es aquí donde RvD1 tiene un rol fundamental, la cual, según las evidencias presentadas anteriormente, es capaz de mejorar la fagocitosis

de células apoptóticas y microbios en macrófagos, disminuir la producción de citoquinas proinflamatorias y la infiltración de células del sistema inmune al sitio de daño [18,19,24].

De esta manera, las terapias dirigidas a reducir el reclutamiento de neutrófilos post infarto cardiaco pueden ser beneficiosas en reducir el tamaño de infarto y, así, disminuir las complicaciones cardiacas posteriores [71,72].

Como se ha demostrado en este escrito, RvD1 muestra disminuir las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1, y como consecuencia de esto, debiera disminuir la adhesión de células del sistema inmune a FC. Es por esto que se procedió a evaluar los efectos de RvD1 en la adhesión de células mononucleares de bazo (SMC), en FC tratados con LPS. Nuestros resultados mostraron que los FC poseen la capacidad de adherir SMC, y que los FC tratados con LPS tienen una mayor capacidad para adherir este tipo celular, mostrando un evidente aumento en el porcentaje de adhesión de SMC a FCN estimulados con LPS. Estos resultados, muestran ser revertidos al pre-tratar FCN con RvD1.

Estos resultados confirman los resultados discutidos anteriormente en este mismo trabajo, en donde RvD1 demostró revertir los niveles de expresión de VCAM-1 e ICAM-1 inducidas por LPS, lo que llevaría a un menor reclutamiento de células del sistema inmune.

Los resultados obtenidos son consistentes con lo descrito en la literatura, en donde se ha demostrado que la RvD1 previene la adhesión de células del sistema inmune en distintos tipos celulares. Existen trabajos que describen el efecto de AT-RvD1 en modelos in vivo de daño pulmonar, en donde el tratamiento con AT-RvD1 demostró reducir significativamente la secreción de citoquinas mediadas por IL-1 β , moléculas de adhesión y la correspondiente adhesión de leucocitos, disminuyendo así la señalización inflamatoria [64]. En otro estudio, realizado en leucocitos polimorfonucleares humanos, la RvD1 disminuyó los niveles de moléculas de adhesión inducidas por LBT₄ (integrinas β 2), además

de potenciar la fagocitosis de macrófagos y apoptosis de PMNs, desempeñando un importante rol en la resolución de la inflamación aguda ^[73].

En la revisión bibliográfica realizada pudimos dar cuenta de que la adhesión de polimorfonucleares a FC está documentada en la literatura ^[74]. Esto toma especial importancia al comprender que la adhesión sostenida y no regulada de leucocitos genera inflamación persistente en el tejido cardíaco, mediante la liberación de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, y aumento en los niveles de ROS, lo que conlleva a fibrosis y remodelamiento cardíaco, contribuyendo a daño en el tejido ^[35].

En resumen, los resultados obtenidos muestran por primera vez el rol de la RvD1 en FC, mostrando ser un mediador lipídico antiinflamatorio que logra reducir las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 en un contexto inflamatorio, y, como consecuencia de ello, reducir la adhesión de SMC a FCN inducidos por LPS, transformando a RvD1 en una potencial herramienta terapéutica en eventos de injuria cardíaca, gracias a su rol resolutor en la inflamación.

8. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se demostró que RvD1, por si misma, no generó efectos citotóxicos en FCN, ni tampoco presentó protección frente a un estímulo deletéreo como I/Rs. Sin embargo, frente a un contexto inflamatorio, la RvD1 fue capaz de prevenir las alzas de los niveles de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1, responsables del reclutamiento leucocitario en la fase de iniciación de la inflamación, y, consecuentemente, disminuyó la adhesión de células mononucleares de bazo sobre FC.

Los resultados obtenidos de este trabajo dan cuenta del rol antiinflamatorio que ejerce RvD1, siendo una potencial herramienta terapéutica en enfermedades cardíacas relacionadas a la respuesta inflamatoria sostenida.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Organización Mundial de la Salud, OMS. Consulta en página 30 de Septiembre 2017 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>
- [2] MINSAL, Programa de actividad física para la prevención y control de los factores de riesgo cardiovasculares, Santiago, Octubre 2004.
- [3] MINSAL, Indicadores básicos de salud en Chile, DEIS, Santiago, 2011.
- [4] Colby A. Souders, Stephanie L.K. Bowers, Troy A. Baudino, "Cardiac Fibroblast" *Circulation Research* 2009; 105: 1164-1176
- [5] Porter, K. E., & Turner, N. A. (2009). Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology & therapeutics*, 123(2), 255-278.
- [6] Van Linthout S., Miteva K., Tschöpe C. (2014). Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovascular Research* 102:258–269.
- [7] Díaz-Araya, G., Vivar, R., Humeres, C., Boza, P., Bolivar, S., & Muñoz, C. (2015). Cardiac fibroblasts as sentinel cells in cardiac tissue: Receptors, signaling pathways and cellular functions. *Pharmacological research*, 101, 30-40.
- [8] Boza, P., Ayala, P., Vivar, R., Humeres, C., Cáceres, F. T., Muñoz, C., ... & Díaz-Araya, G. (2016). Expression and function of toll-like receptor 4 and inflammasomes in cardiac fibroblasts and myofibroblasts: IL-1 β synthesis, secretion, and degradation. *Molecular immunology*, 74, 96-105.
- [9] Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxidants & redox signaling*. 2006 Nov 1;8(11-12):1907-39.

- [10] Porter, K. E., & Turner, N. A. (2009). Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology & therapeutics*, 123(2), 255-278.
- [11] Uematsu S, Akira S. Toll-like Receptors and Innate Immunity. *Handbook of experimental pharmacology*. 2008; 183:1-21
- [12] Lorne E., Dupont H., Abraham E. (2010). Toll-like receptors 2 and 4: initiators of non-septic inflammation in critical care medicine?. 2010. *Intensive Care Medicine* 36:1826-35.
- [13] Arslan, F., de Kleijn, D.P., Pasterkamp, G., 2011. Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nat. Rev. Cardiol.* 8, 292–300
- [14] 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- β . *Nature immunology*. 2008 Apr 1;9(4):361-8.
- [15] Humeres, C., Vivar, R., Boza, P., Muñoz, C., Bolivar, S., Anfossi, R., ... & Díaz-Araya, G. (2016). 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*, 101, 69-80.
- [16] Peri, F., & Calabrese, V. (2014). Toll-like receptor 4 (TLR4) modulation by synthetic and natural compounds: an update. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(9), 3612–3622.
- [17] Tavener, S. A., & Kubes, P. (2005). Is there a role for cardiomyocyte toll-like receptor 4 in endotoxemia? *Trends in Cardiovascular Medicine*, 15(5), 153–157
- [18] Serhan, C. N., Chiang, N., & Dalli, J. (2015, May). The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. In *Seminars in immunology* (Vol. 27, No. 3, pp. 200-215). Academic Press.

- [19] Spite, M., Clària, J., & Serhan, C. N. (2014). Resolvins, specialized pro-resolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases. *Cell metabolism*, 19(1), 21-36.
- [20] Majno, G. *Cells, tissues and disease principles of general pathology*, New York, NY, USA: Oxford University Press, 2004.
- [21] Recchiuti, A. Resolvin D1 and its GPCRs in resolution circuits of inflammation., *Prostaglandins & Other Lipid Mediators.* , vol. 107, pp. 64-76, 2013.
- [22] Fotis, L et al. Intercellular Adhesion Molecule (ICAM-1) and Vascular Cell Adhesion (VCAM-1) at the early stages of atherosclerosis in a rat model, *InVivo* , vol. 26, nº 2, pp. 243-250, 2012.
- [23] Vinolo, M. A., Rodrigues, H. G., Nachbar, R. T., & Curi, R. (2011). Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*, 3(10), 858-876.
- [24] Serhan, C. N., & Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology*, 6(12), 1191-1197.
- [25] Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990 Aug 2;346(6283):425-34.
- [26] Osborn L., et al. (1989). Direct cloning of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*. 59:1203–1211.
- [27] Elices M.J., et al. (1990). VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA/fibronectin binding site. *Cell*. 60:577–584.
- [28] Bevilacqua M.P. (1993). Endothelial-leucocyte adhesion molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 11:767–804.
- [29] Springer T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multiple step paradigm. *Cell*. 76:301–314.

- [30] Kukiella G.L., et al. (1993). Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in ischemic and reperfused myocardium. *J. Clin. Invest.* 92:1504–1516.
- [31] 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.
- [32] Smith C.W., et al. (1991). Adherence of neutrophils to canine myocytes in vitro is dependent on intercellular adhesion molecule-1. *J. Clin. Invest.* 88:1216–1223.
- [33] Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology.* 2010 Dec 1;10(12):826-37.
- [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.
- [35] Segal A.W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Europe PMC Funders Group* 23:197–223.
- [36] Nauseef W.M. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological Reviews* 219:88–102.
- [37] Ma Y, Yabluchanskiy A, Lindsey ML. Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction. *Fibrogenesis & tissue repair.* 2013 Jun 3;6(1):1.
- [38] Summers C., et al. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology* 31:318–324.
- [39] Dutta P, Nahrendorf M. Monocytes in myocardial infarction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2015 May 1;35(5):1066-70.

[40] 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.

[41] 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.

[42] Serhan, C. N., Dalli, J., Colas, R. A., Winkler, J. W., & Chiang, N. (2015). Protectins and maresins: new pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), 397-413.

[43] Kain, V., Ingle, K. A., Colas, R. A., Dalli, J., Prabhu, S. D., Serhan, C. N., ... & Halade, G. V. (2015). Resolvin D1 activates the inflammation resolving response at splenic and ventricular site following myocardial infarction leading to improved ventricular function. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 84, 24-35.

[44] Zhang, T., Shu, H. H., Chang, L., Ye, F., Xu, K. Q., & Huang, W. Q. (2015). Resolvin D1 protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *International immunopharmacology*, 28(1), 322-327.

[45] Mustafa, M., Zarrouh, A., Bolstad, A. I., Lygre, H., Mustafa, K., Hasturk, H., ... & Van Dyke, T. E. (2013). Resolvin D1 protects periodontal ligament. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 305(6), C673-C679.

- [46] Wu, D., Zheng, S., Li, W., Yang, L., Liu, Y., Zheng, X., ... & Jin, S. (2013). Novel biphasic role of resolvin D1 on expression of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-stimulated lung fibroblasts is partly through PI3K/AKT and ERK2 pathways. *Mediators of inflammation*, 2013.
- [47] Wu, B., Mottola, G., Chatterjee, A., Lance, K. D., Chen, M., Siguenza, I. O., ... & Conte, M. S. (2017). Perivascular delivery of resolvin D1 inhibits neointimal hyperplasia in a rat model of arterial injury. *Journal of vascular surgery*, 65(1), 207-217.
- [48] 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.
- [49] Zheng, S., Wang, Q., D'Souza, V., Bartis, D., Dancer, R., Parekh, D., ... & Thickett, D. R. (2017). ResolvinD 1 stimulates epithelial wound repair and inhibits TGF- β -induced EMT whilst reducing fibroproliferation and collagen production. *Laboratory Investigation*.
- [50] Liu, Y., Yuan, X., Li, W., Cao, Q., & Shu, Y. (2016). Aspirin-triggered resolvin D1 inhibits TGF- β 1-induced EMT through the inhibition of the mTOR pathway by reducing the expression of PKM2 and is closely linked to oxidative stress. *International journal of molecular medicine*, 38(4), 1235-1242.
- [51] Lance KD, Chatterjee A, Wu B, Mottola G, Nuhn H, Lee PP, Sansbury BE, Spite M, Desai TA, ConteMS. 2017. Unidirectional and sustained delivery of the proresolving lipid mediator resolvin D1 from a biodegradable thin filmdevice. *J Biomed Mater Res Part A* 2017;105A:31–41.
- [52] Qu, X., Zhang, X., Yao, J., Song, J., Nikolic-Paterson, D. J., & Li, J. (2012). Resolvins E1 and D1 inhibit interstitial fibrosis in the obstructed kidney via inhibition of local fibroblast proliferation. *The Journal of pathology*, 228(4), 506-519.

- [53] Logue SE, Gustafsson AB, Samali A, Gottlieb RA. Ischemia/reperfusion injury at the intersection with cell death. *J Mol Cell Cardiol* 2005;38:21-33.
- [54] Zhang, T., Xiu, H. H., Liu, J. X., Ma, Y., Xu, K. Q., & Huang, W. Q. (2017). Protective effect of aspirin-triggered resolvin D1 on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats: The role of miR-146b. *International immunopharmacology*, 51, 140-147.
- [55] Zhao, Q., Wu, J., Hua, Q., Lin, Z., Ye, L., Zhang, W., ... & Hu, X. (2016). Resolvin D1 mitigates energy metabolism disorder after ischemia–reperfusion of the rat lung. *Journal of translational medicine*, 14(1), 81.
- [59] Dustin M.L., et al. (1986). Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. immunol.* 137(1):245-54.
- [60] Lee I et al. 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; 10:33
- [61] R. Kacimi, J.S. Karliner, F. Koudssi, C.S. Long, Expression and regulation of adhesion molecules in cardiac cells by cytokines: response to acute hypoxia, *Circ. Res.* 82 (5) (1998) 576–586.
- [62] N.A. Turner, A. Das, D.J. O'Regan, S.G. Ball, K.E. Porter, Human cardiac fibroblasts express ICAM-1, E-selectin and CXC chemokines in response to proinflammatory cytokine stimulation, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43 (10) (2011) 1450–1458.
- [63] Bento, A. F., Claudino, R. F., Dutra, R. C., Marcon, R., & Calixto, J. B. (2011). Omega-3 fatty acid-derived mediators 17 (R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered

resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *The Journal of Immunology*, 187(4), 1957-1969.

[64] Cox Jr, R., Phillips, O., Fukumoto, J., Fukumoto, I., Parthasarathy, P. T., Mandry, M., ... & Kolliputi, N. (2015). Resolvins decrease oxidative stress mediated macrophage and epithelial cell interaction through decreased cytokine secretion. *PloS one*, 10(8), e0136755.

[65] Chen, J., Shetty, S., Zhang, P., Gao, R., Hu, Y., Wang, S., ... & Fu, J. (2014). Aspirin-triggered resolvin D1 down-regulates inflammatory responses and protects against endotoxin-induced acute kidney injury. *Toxicology and applied pharmacology*, 277(2), 118-123.

[66] Braunwald E., Kloner R.A. (1985). Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J. Clin. Invest.* 76:1713–9.

[67] Dewald O., et al. (2005). CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ. Res.* 96:881–889.

[68] Bujak M., et al. (2008). Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am. J. Pathol.* 173:57–67.

[69] Brinkmann V., et al. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535 (2004).

[70] Amulic, B., et al. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 459–489.

[71] Benson V., McMahon A.C., Lowe H.C. (2007). ICAM-1 in acute myocardial infarction: a potential therapeutic target. *Curr. Mol. Med.* 7:219–27.

[72] Frangogiannis N.G., Entman M.L. (2005). Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc. Med.* 15:163–9.

[73] Couture P., et al. (2009). Adhesion and transcellular migration of neutrophils and B lymphocytes on fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* 315(13): 2192-2206.

[74] Krishnamoorthy, S., Recchiuti, A., Chiang, N., Yacoubian, S., Lee, C. H., Yang, R., ... & Serhan, C. N. (2010). Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4), 1660-1665.