



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

RESOLVINA E1 DISMINUYE LA ADHESIÓN DE SMC SOBRE FIBROBLASTOS CARDIACOS EN RATAS NEONATAS

Memoria para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico

NINOSKA RAMÍREZ SAAVEDRA

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:

Ninoska Ramírez Saavedra, Raúl Vivar, Guillermo Díaz-Araya. La Resolvina E1 previene la adhesión de SMC sobre fibroblastos cardiacos estimulados con LPS. XXXIX Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Puerto Varas, Chile, 2017.

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, quiero agradecer a mis padres, quienes forjaron la mujer que soy hoy. Me enseñaron que la vida está llena de obstáculos, pero no importa cuantas veces nos caigamos en el camino, lo importante es seguir adelante. Gracias por apoyarme en cada paso que di, en cada problema que tuve y por soportar mi mal humor y desorden. A Diego, mi hermano, por su loco sentido del humor y compañía en los días grises.

A la Universidad por permitirme crecer como profesional y al cuerpo docente que la conforma. A los funcionarios, que participaron de manera activa en mi vida universitaria, tía Gladys, Daniela y Sandra, sin ustedes esto no estaría sucediendo, gracias por rescatarme. A Evelyn por escucharme cuando necesite un consejo o simplemente conversar para escapar del laboratorio. A don José por el buen humor y su buena disposición en ayudar.

Al profe Guillermo por creer en mí y permitirme ser parte de su laboratorio. Por el apoyo incondicional y comprensión ante los problemas. A mis compañeritos fibros, por el apoyo, las bromas y el intercambio de conocimiento. En especial a Natalia con quien afronté esta etapa y con quien compartí las dichas y tristezas; a Parrita por su asesoría y compañía en los eternos experimentos de I/R; a Pablo por tolerar mi mal humor, por alegrarme los días y por apoyarme hasta el final.

A mis amigueetos, Natalia, Alejandra, Carla, Rodolfo y Carlos, que fueron parte fundamental en todos estos años de universidad, ya sea para estudiar, vacacionar, celebrar o simplemente pasar el rato. A mis mujeres locas, Katherine, Natalia, Carolina y Alejandra, que siempre estuvieron para apoyarme y me enseñaron a disfrutar "las cosas de chicas". Amiguitos todos, me alegra que sean parte de mi vida, sin ustedes esta etapa hubiera sido una tortura china, todos se ganaron un lugar en mi corazón y espero contar con ustedes siempre.

ÍNDICE GENERAL

PORTADA	1
FINANCIAMIENTO	2
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE GENERAL	5
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	12
SUMMARY	13
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Epidemiología	14
1.2 Tejido cardíaco	14
1.2.1 Fibroblastos cardíacos	15
1.3 Inflamación	17
1.3.1 Toll Like Receptor	18
1.3.2 Adhesión celular	21
1.3.3 Resolución de la inflamación	22
1.4 Resolvina E1	24
1.4.1 Receptor de Resolvina E1	25
1.4.2 Biosíntesis de Resolvina E1	25
1.4.3 Inactivación metabólica de Resolvina E1	26
1.4.4 Propiedades antiinflamatorias y pro-resolutivas de	

Resolvina E1	26
2. HIPÓTESIS	28
3. OBJETIVO GENERAL	28
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 Reactivos	29
5.2 Modelo animal	29
5.3 Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardiacos neonatos	30
5.4 Pasaje celular	30
5.5 Aislamiento de SMC	31
5.6 Ensayos de adhesión	31
5.7 Simulación de Isquemia/Reperusión	32
5.8 Viabilidad y proliferación celular por conteo con TripanBlue	32
5.9 Viabilidad celular por AlamarBlue®	33
5.10 Electroforesis en geles de poliacrilamida	33
5.11 Electrotransferencia de proteínas	34
5.12 Inmunowestern Blot (IWB)	34
5.13 Expresión de resultados y análisis estadístico	35
6. RESULTADOS	36
6.1 Evaluación del efecto de RvE1 sobre la viabilidad de FC	36
6.1.1 Medición por la técnica de AlamarBlue®	36
6.1.2 Medición por la técnica de conteo celular	38
6.2 Evaluación del efecto de RvE1 sobre la proliferación de FC estimulada por FBS 10%	38
6.3 Evaluación del efecto de RvE1 sobre la protección en la viabilidad de FCN en muerte celular inducida por Isquemia/Reperusión	39

6.4 Evaluación del efecto de RvE1 sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC	40
6.5 Evaluación del efecto de RvE1 sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC inducidos por LPS	42
6.6 Efecto de RvE1 en la adhesión de SMC sobre FC inducidos por LPS	43
7. DISCUSIÓN	45
7.1 Efecto de RvE1 sobre la viabilidad, proliferación y citoprotección celular	46
7.2 Efecto de RvE1 sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 y, consecuentemente, adhesión celular	48
8. CONCLUSIÓN	51
9. BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías de señalización dependiente de MyD88 e independiente de MyD88	21
Figura 2. Biosíntesis de mediadores lipídicos bioactivos en tejido adiposo blanco (WAT)	24
Figura 3. Curva de calibración de FCN a sembrar por pocillo.	37
Figura 4. RvE1 no presenta citotoxicidad en FC a concentración dependiente	37
Figura 5. RvE1 no presenta citotoxicidad en FC a tiempo dependiente.	38
Figura 6. RvE1 disminuye la proliferación de FC	39
Figura 7. RvE1 no protege de la muerte celular provocada por Isquemia/Reperfusión simulada	40
Figura 8. RvE1 no modifica los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC	42
Figura 9. RvE1 no disminuye los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC inducidos por LPS	43
Figura 10A. Fotografías representativa (10X) que demuestra la adhesión de SMC sobre FC	44
Figura 10B. RvE1 disminuye significativamente la adhesión de SMC sobre FC.	45

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilato ciclasa
ADP	Adenosina difosfato
Akt	Proteína quinasa 3
ALX/FPR2	Receptor formilpeptido 2 asociado a proteína G
α -SMA	Alfa-actina de músculo liso
μ g	Microgramo
μ l	Microlitro
μ m	Micrometro
ANOVA	Análisis de la varianza
APS	Persulfato de amonio
BSA	Albúmina de suero bovino
BAD	Promotor de muerte asociado a BCL2
BAX	Proteína 4 tipo BCL2
BLT1	Receptor de leucotrieno B4
CAM	Moléculas de adhesión celular
CCL19	Ligando 19 de quimioquina C-C
CCL21	Ligando 21 de quimioquina C-C
ChemR23	Receptor de quemarina 23
CO ²	Dioxido de carbono
COX	Ciclooxigenasa
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CYP	Citocromo P450 monooxigenasa
DAMP	Patrones asociados a daño
DHA	Ácido docosahexahenoico
DMEM-F12	Medio de mantención modificado Dulbecco, formula 12
Erk 1/2	Quinasa regulada extracelularmente 1/2
FC	Fibroblasto cardiaco

FCN	Fibroblastos cardiacos neonatos
g	Gramo
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
ECV	Enfermedad cardiovascular
EPA	Ácido eicosapentaenoico
h	Horas
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IL-1	Interleuquina 1
IRS	Receptor de insulina
kDa	Kilodalton
LOX	Lipooxigenasa
LPS	Lipopolisacarido
LT	Leucotrieno
LTA	Ácido lipoteico
LTB4	Leucotrieno B4
LX	Lipoxina
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MaR	Maresinas
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MDM2	regulador negativo del supresor tumoral p53
MEC	Membrana extracelular
MFC	Miofibroblasto cardiaco
mA	Miliamperes
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinasa
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero

MyD88	Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
NF-κB	Factor nuclear κB
p53	Proteína supresora de tumores
PAMP	Patrones asociados a patógenos
PD	Preotectinas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG	Prostaglandinas
PI3K	Fosfoinositol-3-quinasa
PIP2	Fosfatidilinosito 4,5-bisfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PMN	Polimorfonucleares
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
Ras	Proteína G monomérica
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rv	Resolvina
RvD1	Resolvina D1
RvE1	Resolvina E1
s	Segundo
SEM	Error promedio estándar
SPM	Mediadores lipídicos especializados
TBS	Tampón tris-salino
TEMED	N, N, N', N' –tetrametil-etilendiamina
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TIR	Dominio de receptor tipo toll/interleuquina 1
TLR	Receptor de tipo toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TX	Tromboxano
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1
WB	Western blot
ω3/ ω6	Omega 3/Omega 6

RESUMEN

Los fibroblastos cardiacos (FC) actúan como células centinelas del corazón, ya que responden ante cualquier elemento interno o externo que afecte la homeostasis del sistema. Entre ellos, uno de los más estudiados es el lipopolisacárido bacteriano (LPS), capaz de desencadenar una respuesta inflamatoria, caracterizada por: activación de vías proinflamatorias, producción de citoquinas y factores de crecimiento, expresión de proteínas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1, que permiten el reclutamiento e infiltración de células del sistema inmune, entre otros, con el fin de reparar el daño.

La Resolvina E1 (RvE1) es un mediador pro-resolutivo especializado (SPM), proveniente del ácido eicosapentaenoico (EPA) al que recientemente se le han atribuido propiedades antiinflamatorias, provocando el cese o inhibición del reclutamiento de células del sistema inmune, sin embargo, en FC no existe evidencia de su actividad.

El objetivo de este trabajo fue identificar los efectos que la RvE1 provocaba en FC, con el fin de esclarecer si era capaz de disminuir la adhesión de células mononucleares de bazo (SMC) al disminuir los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1, inducidas por LPS; no sin antes demostrar que por sí solas no modificaban las condiciones basales del organismo. Es decir, RvE1 no presenta citotoxicidad, pero disminuye la proliferación de FC, tampoco fue capaz de proteger frente a condiciones de isquemia/reperfusión. Sin embargo, no provocó cambios en los niveles de expresión basales de ICAM-1 y VCAM-1 por sí sola, pero al pre-incubar FC con RvE1 y luego estimularlos con LPS, los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 mostraron una marcada tendencia a disminuir, y como consecuencia de ello, se observó una significativa disminución de la adhesión de SMC a FC. Estos resultados permiten deducir que RvE1 si posee propiedades resolutivas en FC, participando activamente en el cese del reclutamiento de células del sistema inmune.

SUMMARY

Cardiac fibroblasts (CF) act as sentinel cells of the heart, as they respond to any internal or external element that affects the homeostasis of the system. Among them, one of the most studied is the bacterial lipopolysaccharide (LPS), capable of triggering an inflammatory response, characterized by: activation of proinflammatory pathways, production of cytokines and growth factors, expression of adhesion proteins such as ICAM-1 and VCAM-1, which allow the recruitment and infiltration of cells of the immune system, among others, in order to repair the damage.

Resolvin E1 (RvE1) is a specialized pro-resolutive mediator (SPM), derived from eicosapentaenoic acid (EPA), which has recently been attributed anti-inflammatory properties, causing the cessation or inhibition of the recruitment of cells of the immune system, however, in FC not there is evidence of its activity.

The objective of this work was to identify the effects that the RvE1 caused in FC, in order to clarify if it was able to decrease the adhesion of spleen mononuclear cells (SMC) by decreasing the expression levels of ICAM-1 and VCAM-1, induced by LPS; not without first demonstrating that by themselves they did not modify the basal conditions of the organism. In other words, RvE1 does not present cytotoxicity, but decreases the proliferation of FC, nor was it able to protect against ischemia / reperfusion conditions. However, it did not cause changes in the basal expression levels of ICAM-1 and VCAM-1 by themselves, but by pre-incubating FC with RvE1 and then stimulating them with LPS, the expression levels of ICAM-1 and VCAM-1 showed a marked tendency to decrease, and as a consequence, a significant decrease in the adhesion of SMC to FC was observed. These results allow to deduce that RvE1 does have resolute properties in FC, participating actively in the cessation of the recruitment of cells of the immune system.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), constituyen un grave problema de salud pública, debido a su elevada prevalencia y a que representan el mayor índice de muertes en todo el mundo. Se calcula que, durante el 2012, la tasa alcanzó los 17,5 millones de personas, incentivando una serie de planes preventivos para sus principales factores de riesgo: presión arterial elevada, sedentarismo, tabaquismo, dislipidemia y diabetes mellitus. Si bien, en su mayoría pueden ser prevenidas, el ritmo de vida ajetreado y las malas condiciones alimenticias son el principal interferente para reducir su incidencia **(1)**.

En Chile, el panorama no es muy diferente, puesto que durante el 2011 la tasa de fallecimientos a causa de una ECV alcanzó el 27,1%, siendo las más prevalentes las enfermedades cerebrovasculares e isquemias. Con estos antecedentes, sumados al hecho de que la población anciana en Chile aumenta cada año y que las nuevas generaciones se encuentran bajo algún factor de riesgo, se vuelve fundamental la investigación de estas patologías y sus posibles tratamientos **(2)**.

1.2 Tejido cardiaco

El corazón es el órgano responsable de suministrar sangre al organismo, ayudando a eliminar desechos metabólicos a través de los vasos sanguíneos. Este proceso, se realiza mediante dos circuitos en paralelo; la bomba del lado izquierdo se encarga de proporcionar oxígeno y nutrientes a todo el cuerpo, mientras que la bomba del lado derecho lleva sangre a los pulmones para su re-oxigenación **(3)**.

En pocas palabras, el corazón es un órgano altamente especializado, complejo y compartimentado, compuesto de células contráctiles (cardiomiocitos); un sistema de

conducción aislado y direccionado, capaz de generar y conducir impulsos nerviosos por sí solo, que sincronizan la contracción de la cámara; válvulas que permiten la generación de altas presiones y un flujo sanguíneo direccionado; circulación coronaria, que provee de sangre oxigenada al músculo cardíaco, las venas cavas, las venas pulmonares, la aorta y el tronco pulmonar (3).

A nivel celular, el tejido cardíaco se encuentra constituido por un 25-35% de cardiomiocitos, pero existe discrepancia sobre la composición de células no-miocíticas, que representan el otro 65-75% del total (4). Las cardíacas no-miocíticas son un grupo diverso de células e incluyen fibroblastos, mastocitos, células endoteliales, células de musculatura lisa, adipocitos, glóbulos blancos, y otras células inmunológicamente activas (5). Durante muchos años, se creyó que el tejido cardíaco no-miocítico se componía principalmente de fibroblastos cardíacos (FC), ya que representaban el mayor número celular (60%). Sin embargo, estudios recientes revelaron que del porcentaje de células cardíacas no-miocíticas, las células que en mayor prevalencia se encontraban eran las endoteliales, superando el 60%, mientras que los FC ni siquiera alcanzaban un 20% (4). No obstante, los FC han adquirido un rol fundamental como células centinelas (6), además de mantener el equilibrio homeostático, mediante secreción y renovación de los componentes de la matriz extracelular (MEC) en áreas dañadas (4).

1.2.1 Fibroblastos

Los FC son células de origen mesenquimal y corresponden a un grupo altamente heterogéneo, ya que pueden derivar de fibroblastos residentes, de transición endotelial a mesenquimal, de células progenitoras circulantes derivadas de medula ósea, monocitos y fibrocitos (7). Se ubican en el intersticio cardíaco y están presentes en todos los

compartimientos del corazón, formando un esqueleto fibroso (8). Por otra parte, forman parte del sistema de conducción, donde aparentemente, establecen una barrera que aísla los impulsos nerviosos, permitiendo que la conducción sea unidireccional (4).

Los FC son capaces de responder a señales químicas y mecánicas, gracias a la presencia de variados tipos de receptores que le permiten efectuar múltiples funciones (6). Son esenciales en la cicatrización de heridas, al ser capaces de modular la proliferación, migración y muerte celular, además de facilitar el reclutamiento y la adhesión de células inmunes innatas (6,8). Juegan un rol fundamental en el desarrollo, la remodelación y regeneración cardíaca, ya que son células metabólicamente muy activas, que se encargan de la producción de todos los componentes de la MEC, incluidas fibras de proteínas y sustancia fundamental amorfa, colágeno (tipo I, III, V y VI), periostina, vimentina y fibronectina. Además, producen una gran cantidad de proteoglicanos, glicoproteínas, factores de crecimiento (TGF- β , PDGF), citoquinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6), matriquinas y proteasas (MMP), que ejercen efectos autocrinos y paracrinos en las células cardíacas, promoviendo su proliferación, contracción y apoptosis (5,8).

Una vez activados, los FC pueden diferenciarse a miofibroblasto cardíaco (MFC), proceso que ocurre en dos etapas. Durante la primera, se producen proto-MFCs a partir de FCs, que a su vez producen fibras de estrés de actina citoplasmática (β -actina y γ -actina) y pequeños complejos de adhesión, permitiendo su migración al área dañada. Posteriormente, los proto-MFC inician la producción de colágeno y una membrana rica en fibronectina; dando paso a la segunda etapa, luego de 20-30 horas debido a la acumulación de citocinas y estrés mecánico, que finalmente estimulan la maduración a MFC. El final del proceso se determina, principalmente, con la producción de α -SMA (α -actina del músculo liso) (8,9).

1.3 Inflamación

La reparación del tejido cardíaco dañado es un proceso complejo que depende de una secuencia orquestada de acontecimientos celulares (**10,11**), y en la cual, el sistema inmune tiene un rol fundamental.

El inicio de la inflamación aguda está controlado por autacoides, constituidos por mediadores lipídicos: eicosanoides, moléculas de señalización derivadas de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) esenciales n-6, ácido linoléico o ácido araquidónico (AA), siendo prostaglandinas (PGs), prostaciclina, tromboxanos (TX), leucotrienos (LT), lipoxinas (LX) y ácidos grasos hidroxí- e hidroperoxy-, sus representantes moleculares (**12**). Estos mediadores son producidos mediante oxidación enzimática por la acción de ciclooxigenasas (COX), lipooxigenasas (LOX) y monooxigenasas citocromo P450 (CYP); y juegan un rol clave en la regulación del flujo sanguíneo, permeabilidad endotelial, diapédesis de PMN, migración transendotelial y quimiotaxis de PMNs hacia el tejido dañado o hacia algún patógeno infiltrado (**13**).

El proceso inflamatorio se realiza en tres etapas superpuestas: inflamatoria, proliferativa y de maduración (**11**). La etapa inflamatoria se desencadena con la muerte repentina de células cardíacas, activando vías del sistema inmune innato y una respuesta inflamatoria intensa pero transitoria; que permite la migración de células del sistema inmune con el fin de eliminar las células muertas y los desechos de la MEC. Luego se reprime, dando paso a la etapa proliferativa, donde células mononucleares y subpoblaciones de macrófagos secretan citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , IL-1 β e IL-6) y factores de crecimiento que reclutan, activan y facilitan la proliferación de células reparadoras mesenquimales (fibroblastos cardíacos y miofibroblastos); para finalizar con la apoptosis de la mayoría de estas células lesionadas, dando lugar a la maduración del infarto y la formación de una cicatriz compuesta de colágeno entrecruzado (**8, 10, 11**).

Si bien, la inflamación aguda constituye una respuesta con características protectoras para el hospedero, su activación descontrolada e inapropiada conduce a una inflamación crónica, la que puede causar un mayor daño tisular, provocando fibrosis y un mal funcionamiento de los órganos involucrados, concluyendo en importantes enfermedades (cardiovasculares, asma, neurodegenerativas, síndrome metabólico, entre otras) (13, 14).

1.3.1 Toll Like Receptor

Las células inmunes innatas identifican patrones moleculares asociadas a daño (DAMPs), como proteína de choque térmico y ácido hialurónico; y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como lipopolisacáridos (LPS), ácido lipoteico (LTA) y fibronectina (15), a través de su interacción con los Toll Like Receptor (TLR), una familia de proteínas de membrana compuesta de 13 miembros en mamíferos, aunque solo 10 están presentes en humanos (11). Entre ellos, TLR 3,7 y 9 reconocen como ligando al ARN de hebra doble o simple o al ADN no metilado de virus o bacterias, mientras que TLR2 y TLR4 son típicamente activados por peptidoglicano y lipopolisacáridos (LPS) de bacterias, respectivamente (16). Sin embargo, solo TLR2 y TLR4 reflejan importancia en la señalización de una respuesta inflamatoria postinfarto (11). No obstante, estudios sugieren que TLR2 podría no afectar críticamente la respuesta inflamatoria, pero podría modular (directa e indirectamente) la deposición del tejido fibroso; mientras que TLR4 fue identificado como un componente clave de la respuesta inmune innata (17).

Los TLRs son recetores de tipo 1 y en su estructura destacan las repeticiones extracelulares ricas en leucina, una región transmembrana, y el dominio intracelular TIR

(receptor Toll/IL-1). Pequeñas diferencias en la región extra e intracelular del TLR, dan a lugar a diferentes respuestas ante productos microbianos específicos (18).

Trabajos de nuestro laboratorio han demostrado que tanto FC, como MFC expresan el TLR4, y que tras su activación secretan una amplia gama de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión (6,19).

TLR4 fue el primer TLR descrito, y originalmente, fue denominado Toll humano (hToll) (18). Su ligando de activación más utilizado en los estudios es LPS, un importante componente estructural de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Está constituido de tres partes: lípido A, un centro de oligosacáridos y una cadena lateral O, siendo el lípido A el principal PAMP del LPS (15).

Luego de que LPS es reconocido por TLR4, este se somete a una oligomerización e inicia el reclutamiento de sus adaptadores río abajo mediante interacciones con dominios TIR (15), desencadenando una respuesta proinflamatoria mediante diversas vías de señalización, a través de las cuales se regulan múltiples funciones celulares, como síntesis de proteínas, crecimiento y supervivencia celular, metabolismo de glucosa e inflamación (20, 21).

La primera vía involucrada es la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/Akt, presente en el metabolismo, crecimiento, proliferación y supervivencia celular (22, 23). Pertenece a una familia de enzimas de transducción de señales dividida en tres clases (20): clases IA, activadas por receptores de tirosina quinasa o Ras; la clase IB, activada mediante proteína G heterotriméricas o Ras; la clase II, activada a través de receptores de insulina, receptores de factor de crecimiento e integrinas; y las de clase III, que se consideran constitutivamente activas (22). Esta vía es estimulada fisiológicamente por la activación de receptores de membrana tirosina quinasa, que autofosforilan y fosforilan el sustrato del receptor de insulina

(IRS), que a su vez, fosforila la subunidad p85 de PI3K lo que genera un cambio conformacional en la proteína, provocando la unión de la subunidad catalítica p110 y su activación. Luego, esta PI3K activa, fosforila PIP2, convirtiéndolo en PIP3, lo que conduce a la activación de Akt, permitiendo la inactivación de factores pro-apoptóticos, tales como Bad, procaspasa-9 y factores de transcripción. Además, Akt inactiva el gen supresor de tumores (p53), mediante la activación de MDM2, que se transloca al núcleo para unirse a p53, impidiendo su actividad como factor de transcripción de genes pro-apoptóticos. Finalmente, Akt es capaz de activar a mTOR, una proteína serina/treonina quinasa considerada como la reguladora central del crecimiento celular, ya que regula la traducción proteica, en respuesta a nutrientes y factores de crecimiento. (21 - 24)

La segunda vía es la ERK1/2, que implica una vía de supervivencia, y permite la activación de genes protectores y anti-apoptóticos, mediante un mecanismo que involucra Raf/MEK/ERK. Esta vía de señalización fosforila Bad, inactivándolo, lo que permite a BCL2 formar homodímeros y efectuar una respuesta anti-apoptótica. Además, esta vía induce la fosforilación de Bim, provocando su disociación con BCL2, lo que permite a BCL2 unirse a Bax, evitando que este se active al formar homodímeros (20).

La tercera, corresponde a una de las principales vías de activación, la del Factor Nuclear kappa B (NF- κ B), que al activarse desencadena una respuestas por dos cascadas de señalización diferentes, una dependiente de MyD88 (**Figura 2A**), que corresponde a la principal vía por la cual se expresan una serie de citoquinas, (TNF- α , IL-1 β , IL-6, entre otras), quimioquinas (MCP-1, IL.8 IL-10) y moléculas de adhesión (E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1) y la otra independiente de MyD88 (**Figura 2B**), caracterizada por la producción de interferones (15, 20).

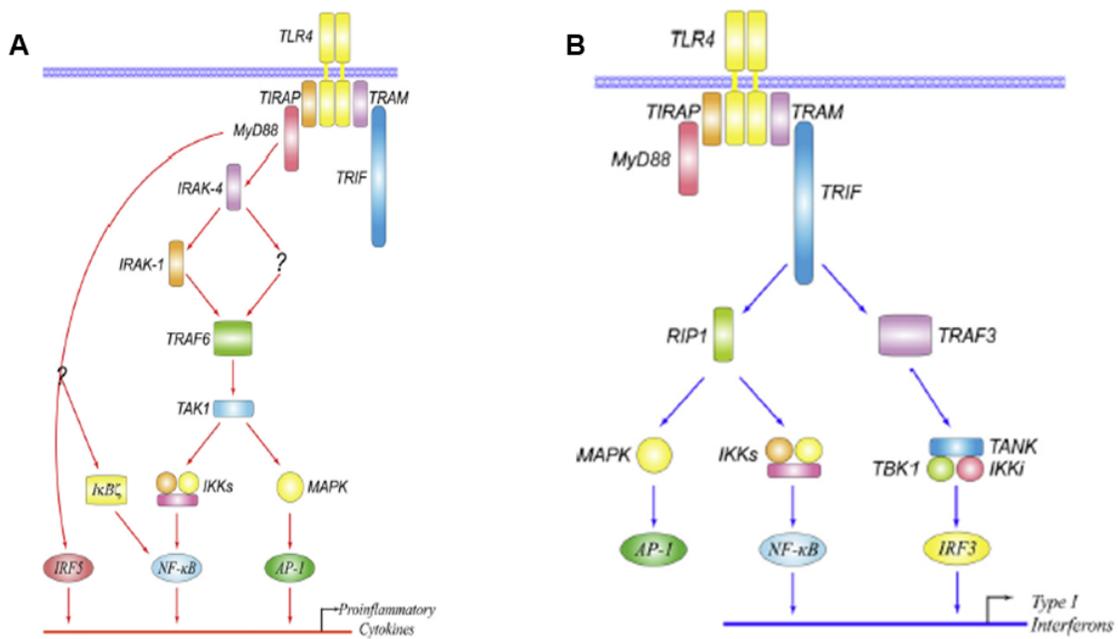


Figura 1. Vías de señalización dependiente de MyD88 (A) e independiente de MyD88 (B). (15)

1.3.2 Adhesión celular

Durante la inflamación del tejido, se activa una cascada de adhesión (19), donde fibroblastos, miofibroblastos y leucocitos infiltrados, secretan citoquinas, principalmente IL-1 β y TNF- α , capaces de activar la transcripción de CAMs mediante el mecanismo de señalización de NF- κ B (25), incrementando sus niveles basales y perpetuando el reclutamiento y la trans migración de leucocitos. Cuando ocurre un daño en el tejido cardiaco, los neutrófilos son los primeros en acudir al sitio de daño, seguidos por monocitos y linfocitos (26).

Los primeros pasos de la cascada de adhesión, esta mediada por receptores de las familias selectinas, integrinas e inmunoglobulinas. Las selectinas atraen leucocitos circulantes y dirigen su desplazamiento a lo largo del endotelio vascular, una vez activados, por quimioquinas presentes en células endoteliales, los leucocitos desencadenan señales intracelulares que convierten las integrinas de baja afinidad, por integrinas de alta afinidad.

Esto permite que las integrinas activadas interactúen con su contrarreceptor endotelial de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF), para modular la firme adhesión celular y la extravasación (19).

Las moléculas de adhesión celular (CAM) corresponden a proteínas de superficie involucradas en la comunicación de diversos tipos celulares. ICAM-1 y VCAM-1 son miembros de la IgSF, que tienen un rol fundamental en el reclutamiento e infiltración de células inmunes al área de daño (26). VCAM-1 es el encargado de mediar la adhesión de monocitos, linfocitos y diversas células inmunitarias a la superficie de células endoteliales, mediante la expresión de integrinas $\alpha 4\beta 4$ y $\alpha 4\beta 7$, promoviendo la migración a través del endotelio (25); mientras que ICAM-1 es el contrarreceptor para la integrina $\beta 2$ y es expresado por la activación de células endoteliales y leucocitos (19, 24).

1.3.3 Resolución de la inflamación

La resolución de la inflamación fue considerada un proceso pasivo, donde quimioattractantes y otros mediadores químicos involucrados en la respuesta inflamatoria solo se diluían y disipaban. Pero con la identificación de los mediadores pro-resolutivos, se obtuvo evidencia de que la resolución de la inflamación era un proceso autolimitado que requería una respuesta de programación activa (27-29).

En individuos sanos, la reparación de los tejidos dañados depende de la supresión oportuna del proceso inflamatorio (11), mediante mecanismos de acción basados en agonistas endógenos antiinflamatorios y/o pro-resolutivos, denominados mediadores pro-resolutivos especializados (SPM), que permiten recuperar la homeostasis del tejido expuesto (27).

Los SPM corresponden a mediadores químicos biosintetizados de manera endógena a partir de ácidos grasos esenciales, principalmente omega 3 y omega 6, en exudados durante la etapa resolutive de la inflamación aguda. Ejercen un rol fisiológico que

define el proceso resolutivo, controlando la duración y magnitud de la inflamación, ya que son los responsables de regular a los mediadores proinflamatorios. Por otra parte, los SPM son potentes quimioattractantes, estimulan la absorción de leucocitos polimorfonucleares (PMN), permitiendo estimular la cicatrización y regeneración de tejidos. Están compuestos por cuatro familias de mediadores químicos incluyendo lipoxinas (LX), resolvinas (Rv), maresinas (MaR) y protectinas (PD) **(28,29)**.

Las LXs provienen del AA, un ácido graso $\omega 6$ que es liberado y movilizado durante la inflamación. Son biosintetizadas predominantemente a través de un evento metabólico transcelular comprometido durante la interacción de leucocitos con el epitelio del tejido tracto gastrointestinal o bronquial, y dentro de los vasos durante la interacción de leucocitos con plaquetas **(30)**.

Las Rvs provienen principalmente de PUFAs $\omega 3$, dando lugar a la formación de dos líneas diferentes de Rv. RvE1 proveniente del ácido eicosapentaenoico (EPA) y RvD1 del ácido decosahexaenoico (DHA). Pero, también pueden ser producidas por medio de una reacción inducida por COX-2 en presencia de aspirina **(30)**. Sus receptores son ChemR23 y ALX/FPR2, respectivamente, y se encuentran distribuidos en una gran variedad de tejidos **(28)**.

Las MaRs y PDs, también provienen de PUFAs $\omega 3$, específicamente del DHA. Las primeras son biosintetizadas a partir de macrófagos humanos por la 12-LOX **(31)**; mientras que las últimas son biosintetizadas por eosinófilos **(32)** (ver figura 3).

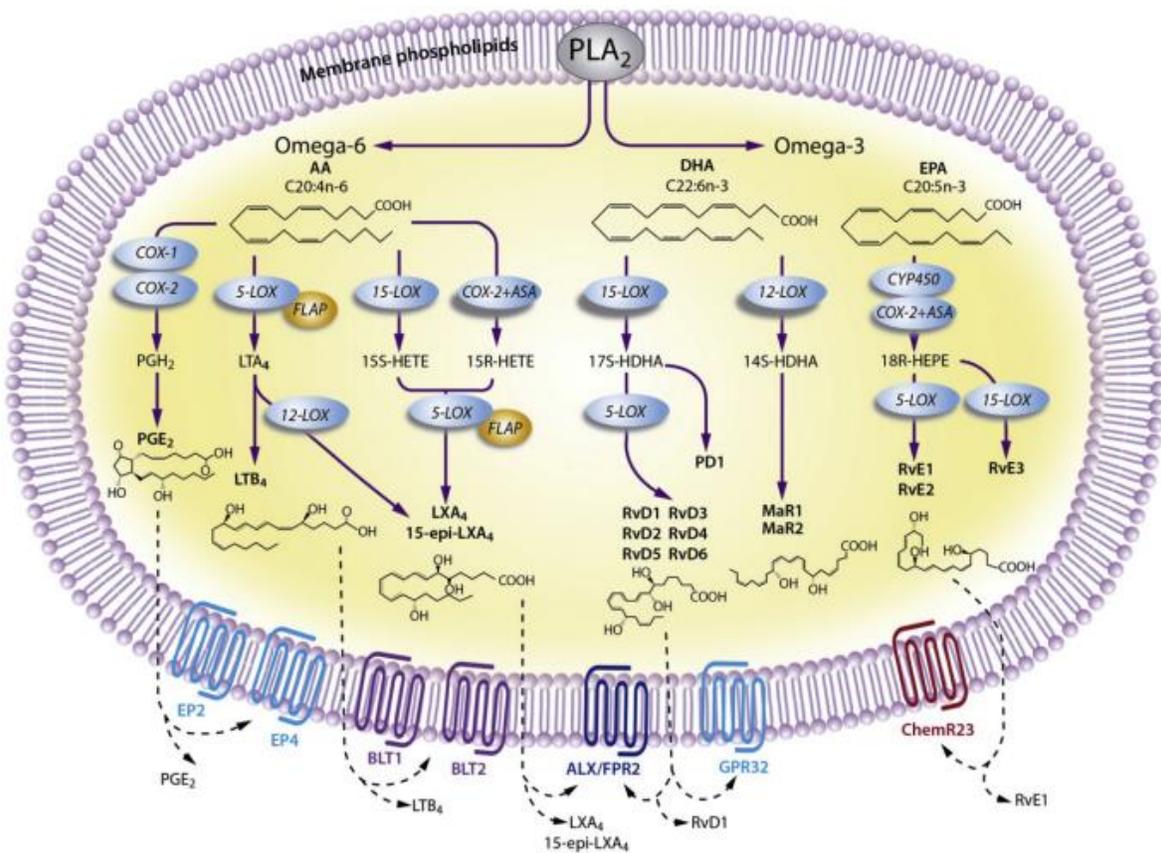


Figura 2. Biosíntesis de mediadores lipídicos bioactivos en tejido adiposo blanco (WAT) (33).

1.4 Resolvina E1

La RvE1 fue identificada originalmente en un exudado inflamatorio en pata de ratones, en un modelo de inflamación aguda. Mediante el análisis de espectrometría de masa en tándem con cromatografía líquida (LC-MS/MS) de los componentes derivados del exudado, se demostró la existencia de ácidos grasos monohidroxilados derivados de EPA, como 18-hidroxi-EPA (18-HEPE) y 5-HEPE, pero además mostraron un nuevo compuesto trihidroxilado, el 5,12,18 triHEPE, al que denominaron RvE1 (34).

1.4.1 Receptor de Resolvina E1

La RvE1 interactúa específicamente con ChemR23, provocando la activación de una vía transduccional del receptor acoplado a proteína G (GPCR), específicamente Gai/Go, ocasionando un aumento en la fosforilación de MAPK/ERK, que lleva a un aumento de la fagocitosis de macrófagos. Por otra parte, la RvE1 también interactúan como antagonistas de BLT1 (receptor de leucotrienos B4 LTB4), bloqueando su unión con LTB4, ocasionando inhibición en la actividad de adenilato ciclasa (AC) y disminución del calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), lo que finalmente promueve la apoptosis de PMN, además de la inhibición de la activación de la vía NF- κ B, atenuando las señales proinflamatorias inducidas por LTB4 (28,29).

1.4.2 Biosíntesis de Resolvina E1

La biosíntesis de RvE1 se realiza en el exudado a partir de ω 3, que es transportado al sitio de daño con la producción de edema durante la inflamación, y existen dos formas para concretarlo (28). La primera, es dependiente de aspirina y requiere un tratamiento con aspirina en el sitio local de inflamación, para convertir EPA en 18R-HEPE y 15R-HEPE, vía COX-2 acetilada en células vasculares endoteliales. Estos ácidos grasos, son liberados y rápidamente se convierten en RvE1 y 15-epi-LXA₅, por acción de 5-LOX. La segunda forma es independiente de aspirina, y está controlada por la enzima CYP, donde EPA es convertido en 18-HEPE mediante oxidación alílica (actividad similar a LOX) y en ácido 17,18-epoxieicosapentaenoico (17,18-EEP) por epoxidación de olefinas (34).

1.4.3 Inactivación metabólica de Resolvina E1

Al igual que otros autacoides, la RvE1 es generada en respuesta a un estímulo. Actúa localmente y puede ser rápidamente inactivada por un metabolismo posterior a través de vías enzimáticas, entregando como productos como 20-hidroxi-RvE1, 20-carboxi-RvE1, 19-hidroxi-RvE1, 18-oxo-RvE1 y 10,11-dihidro-RvE1, que son biológicamente inactivos al compararlos con RvE1 y podrían actuar como biomarcadores transitorios de inactivación para RvE1 (34).

1.4.4 Propiedades antiinflamatorias y pro-resolutivas de RvE1

La RvE1 ha demostrado, en variados modelos experimentales de inflamación, una potente acción protectora ante el daño tisular provocado por leucocitos y la excesiva expresión de genes proinflamatorios, otorgándole efectos antiinflamatorios y pro-resolutivos (34, 31).

Sobre PMN, la RvE1 es capaz de reducir dramáticamente su infiltración en áreas de inflamación, regular su migración epitelial y transendotelial y su quimiotaxis. Además, RvE1 interactúa con BLT1, el receptor de leucotrienos B4 (LTB₄), en PMN humanos como un agonista/antagonista parcial, provocando una inhibición de la respuesta de calcio inducida por LTB₄ (34), este antagonismo finalmente suprime la infiltración de leucocitos, la señalización intracelular de NF-κB y la MAPK, de este modo, reduce la biosíntesis y secreción de mediadores proinflamatorios (31). RvE1 también, induce la fagocitosis, generación de ROS y la muerte de los patógenos. En células dendríticas, la RvE1 inhibe la producción de IL-12, inhibe la liberación de IL-6, IL-23 y TNF-α y disminuye la quimiotaxis en respuesta a CCL21 y CCL19. Mientras que, en macrófagos promueve la fagocitosis de PMNs; y en plaquetas, juegan un rol importante en la coagulación sanguínea, cicatrización

de heridas e inflamación, ya que RvE1 bloquea tanto la agregación plaquetaria estimulada por el agonista del receptor tromboxano, U46619, como la estimulada por ADP de manera dosis-dependiente (34).

Investigaciones recientes, demuestran que las Rv son más potentes que los tratamientos antiinflamatorios actuales, y su utilidad se extiende a diversos tejidos y/o patologías incluyendo: vascular, respiratorio, dérmico, renal, ocular, cáncer, fibrosis y cicatrización, pero poco se sabe de su utilidad a nivel cardiaco (29). Como se describió anteriormente, moléculas importantes en la respuesta inflamatoria son la expresión de ICAM-1 y VCAM-1; sin embargo, hasta la fecha se desconoce si las Rvs son capaces de disminuir la expresión de estas moléculas de adhesión, y más aún, si consecuente con este hecho, se observa una disminución en la adhesión de leucocitos.

Los antecedentes anteriormente expuestos nos permiten formular la siguiente hipótesis.

2 HIPÓTESIS

En fibroblastos cardiacos, la Resolvina E1 previene el aumento de los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por LPS, y consecuentemente, disminuye la adhesión de células mononucleares derivadas de bazo sobre los fibroblastos cardiacos.

3 OBJETIVO GENERAL

Demostrar que, en fibroblastos cardiacos la Resolvina E1 disminuye los niveles de ICAM-1, VCAM-1 y la adhesión de células mononucleares derivadas de bazo inducidos por LPS.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.2 Demostrar que RvE1 es inocua en fibroblastos cardiacos.
- 4.3 Demostrar que en FC estimulados con LPS, el pretratamiento con RvE1 disminuye los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1.
- 4.4 Demostrar que la RE1 disminuye la adhesión de células mononucleares de bazo, sobre fibroblastos cardiacos estimulados con 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). RvE1 (CAS 872993-05- 0) fue comprado a Cayman Chemical Company (MI, EEUU). Colagenasa tipo II (CAS 9001-12-1) y Trypan Blue (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 Modelo animal

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

5.3 Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardiacos neonatos

Se utilizó el procedimiento descrito por procedimientos ya establecidos en el laboratorio. Brevemente, las ratas se decapitaron e inmediatamente se les removió el corazón bajo condiciones de asepsia, se retiraron las aurículas y los ventrículos siendo cortados en pequeños trozos para facilitar las sucesivas digestiones posteriores con pancreatina y colagenasa II. El producto de las digestiones se sometió a un pre-plaqueo por 2 horas a 37°C, en medio de cultivo 5% FBS y 10% FCS en frascos para cultivo celular. Por adhesión diferencial al plástico se separaron los FC de cardiomiocitos. Transcurridas las 2 horas, se cambió el medio por DMEM-F12 enriquecido con 10% FBS, dejando proliferar a los FC hasta confluencia en condiciones convencionales de cultivo (5% de CO₂ y 37°C).

5.4 Pasaje celular

Para la realización de los experimentos, las células se mantuvieron en pasaje 0, en medio DMEM-F12 suplementado con 10% FBS hasta confluencia. Posteriormente, los FC fueron soltados con tripsina 1%, previo lavado con PBS 1x estéril para eliminar todo FBS, y se contaron por el método de exclusión de Tripán Blue en cámara de Neubauer. Se sembraron FC en placas plásticas de cultivo celular de 60 mm a una concentración de 300.000 células/cm³ en medio DMEM-F12 enriquecido con 10% FBS (pasaje 1).

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

5.5 Aislamiento de SMC

Para la obtención de SMC (células mononucleares de bazo, principalmente linfocitos y monocitos), se disectaron bazos de rata desde la cavidad abdominal (35), y filtraron a través de un tamiz de disociación celular (tamaño de poro: 380 µm) hasta la obtención de una suspensión homogénea. Para depletar granulocitos y eritrocitos, la suspensión fue vertida en 7 ml de Ficoll-Histopaque® (1.077 g/ml) y centrifugada a temperatura ambiente por 30 minutos y 400g. La interface rica en SMC fue recibida y lavada dos veces con PBS 1X, pH 7.4. Para lisar los eritrocitos remanentes, se re-suspendió el pellet en NH₄Cl 0.85 M durante 5 minutos para ser nuevamente lavada con PBS. Finalmente, los SMC purificados fueron centrifugados y re-suspendidos en PBS + 3% FBS para experimentos posteriores.

5.6 Ensayos de adhesión

Se sembraron de 80.000 células en DMEM-F12 + FBS 10% en placas de 35 mm, luego de su adhesión a las placas (4-6 horas), se procedió a cambiar el medio por DMEM-F12 por 24 horas y se realizó el estímulo correspondiente (LPS, con y sin RvE1). Finalizado el estímulo, se retiró el medio y se lavó una vez con PBS 1X estéril, para luego agregar DMEM-F12, y posteriormente, se agregaron los SMC en relación 1:5 (FC : SMC). Se dejaron actuar durante dos horas, para luego retirar el medio y lavar gentilmente dos veces con PBS 1X estéril. Se agregó 1 ml de cristal violeta (5 mg/ml, MeOH 20%) y se dejó actuar

por 20 minutos. A continuación, se lavaron las placas con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente, para finalmente, analizarlas mediante microscopía óptica.

5.7 Simulación de Isquemia/Reperusión

Simulación de isquemia: se realizó con un medio isotónico preparado con iones presentes en el medio extracelular (HEPES 25 mM, NaCl 115 mM, KCl 12 mM, MgCl₂•6H₂O 1,2 mM, CaCl₂•2H₂O 2 mM, ácido láctico 20 mM), con altas concentraciones de potasio, carente de glucosa y a pH ligeramente ácido (pH=6.2). Además, fue necesario simular un ambiente hipóxico, para lo cual, se difundió nitrógeno en una cámara sellada por 10 minutos, desplazando todo el oxígeno presente. Estas condiciones se mantuvieron durante 8 horas, a una temperatura de 37°C en incubadora.

Simulación de reperusión: los FC fueron sacados de la cámara hipóxica y se les realizó un cambio del medio isquémico por DMEM-F12, en presencia y/o ausencia de RvE1 100nM. Posteriormente, fueron dejados en incubadora a 37°C, en condiciones ambientales aire/CO₂ 95%/5%, durante 24 horas. Las células control fueron incubadas en DMEM-F12, medio de cultivo empleado estándar, por 8 horas para isquemia y 24 horas para reperusión.

5.8 Viabilidad y proliferación celular por conteo con Tripán Blue

Para estos ensayos se utilizaron placas de 35 mm con 150.000 FC sembrados en cada una. Al finalizar las horas de estímulo correspondientes, 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 Tripán Blue, se tomó una alícuota de 20 µl del medio de las células y se mezcló con 20 µl de Tripán Blue, y mediante

un microscopio óptico, fue posible observar y contabilizar células vivas en una cámara de Neubauer.

5.9 Viabilidad celular por Alamar Blue®

Para estos ensayos se utilizaron placas Corning de 24 pocillos, en las cuales se sembraron 50.000 FC. 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 la fluorescencia a 585 nm (λ excitación) y 570 nm (λ emisión).

5.10 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de los extractos proteicos (obtenidos mediante el lisado celular y cuantificados a través del método de Bradford), de acuerdo con su masa molecular, se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida según Laemmli, 1970. Para la detección de VCAM-1 e ICAM-1 se cargaron 30 μ g de extracto proteico. Los geles concentrador (3,78 mL de upper buffer 4x [Tris base 30 g, HCl pH 6.8; 20 mL SDS 10%, 500 mL agua destilada] + 1,98 mL A/BA [145 g Acrilamida + 5 g bis - Acrilamida, 500 mL agua destilada] + 150 μ L APS 10% + 30 μ L TEMED + 9,24 mL de agua destilada para dos geles) y separador (5 mL de lower buffer 4x [Tris base 90 g, HCl pH 8.8, 20 mL SDS 10% + 500 mL de agua destilada] + 6 mL A/BA [145 g Acrilamida + 5 g bis - Acrilamida, 500 mL agua destilada] + 150 μ L APS 10% + 30 μ L TEMED + 9 mL de agua destilada para 2 geles) fueron al 5% y 10% respectivamente. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 Volt en tampón de electroforesis 1x (Tris base 30,25 g, Glicina 144 g, SDS 10 g, agua 1000 mL para tampón de electroforesis) durante aproximadamente 100 minutos.

5.11 Electrotransferencia de proteínas

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

5.12 Inmunowestern Blot (IWB)

Una vez transferidas, las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (TBS; Tween-20 0,1% (TBS-T) + leche sin grasa 5% p/v), durante 1 hora a temperatura ambiente, y se realizaron 3 lavados suaves de 5 minutos con TBS-T al 0,1%. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios en tampón de incubación (TBS-T 0,1%) a una dilución 1:5000 para VCAM-1, 1:5000 para ICAM-1, durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Posterior a la incubación, las membranas se lavaron 3 veces por 5 min en TBS-T al 0,1%, y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente; anti-IgG Rabbit (1:3000) o anti-IgG Goat (1:5000) en TBS-T al 0,1%.

Posterior a la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron 3 veces por 5 min en TBS-T al 0,1%, luego se incubaron con el sustrato quimioluminiscente EZ-ECL para detectar las proteínas y se expusieron por aproximadamente 10 segundos a la película de fotografía AGFA. Después de realizada la detección de las proteínas de interés, se sometió a las membranas de nitrocelulosa nuevamente al proceso de bloqueo, para ser incubadas con anticuerpo primario anti-GAPDH, de igual manera que fueron incubados los anteriores anticuerpos primarios, para ser utilizadas como control de carga.

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

5.13 Expresión de resultados y análisis estadístico

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

6 RESULTADOS

6.1 Evaluación del efecto de RvE1 sobre la viabilidad de FC.

De acuerdo con la literatura, RvE1 posee efectos antiinflamatorios y pro-resolutivos, que han sido estudiados en diversos tipos celulares, pero no existía ninguna evidencia de su administración en FC, por lo que fue imprescindible realizar una serie de ensayos que permitieran demostrar que no presentaran citotoxicidad ni afectaran su ciclo celular de tal modo que pudiera interferir en los resultados.

En primera instancia, se decidió evaluar viabilidad celular mediante dos técnicas diferentes, por Alamar Blue® y por conteo celular, mediante la técnica de exclusión de Tripán Blue, permitiendo contabilizar solo las células vivas. Para ello, FC fueron tratados con RvE1 a diferentes concentraciones (0-500nM) y/o a diferentes tiempos (24 y 48h) con una concentración estándar de 100nM.

6.1.1 Medición por la técnica de Alamar Blue®

Para el método que involucra al Alamar Blue®, fue necesario estandarizar la cantidad de FCN que fueron sembrados por placa, previo al análisis, determinando la cantidad óptima de células que favoreciera su lectura. Para la obtención de una curva de calibración se sembraron desde 10.000 a 50.000 células por pocillo, a las que luego se agregó Alamar Blue®, y finalmente, se midió la fluorescencia emitida a 585 nm (λ excitación) y 570 nm (λ emisión).

Los resultados obtenidos (**Figura 3**), demuestran una tendencia prácticamente lineal entre los FCN sembrados y su fluorescencia emitida, entregando un índice de correlación de 0,9737. Sobre los 40.000 se observa una mejor linealidad, por lo que se escogió sembrar 50.000 FCN por pocillos para los experimentos.

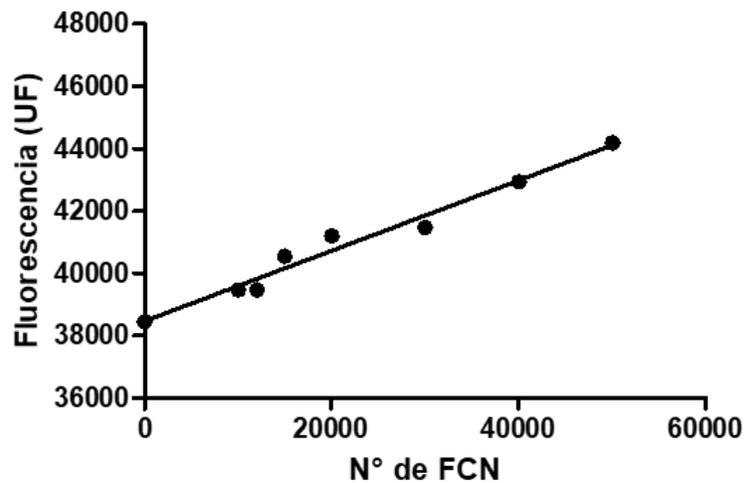


Figura 3. Curva de calibración de FCN a sembrar por pocillo. Se sembraron cantidades crecientes (0 a 50.000) de FC en placas Corning de 24 pocillos. Luego se agregó Alamar Blue®, para finalmente leer su fluorescencia. Se observa una buena correlación lineal sobre los 40.000 FC, por lo que se escogió sembrar 50.000 FC por pocillo para el análisis de viabilidad. $R^2=0,9737$.

Luego del análisis de fluorescencia, los resultados (**Figura 4 A-B**), muestran que RvE1 por sí sola no afecta la viabilidad celular respecto a su control, ni a tiempo ni a dosis dependiente.

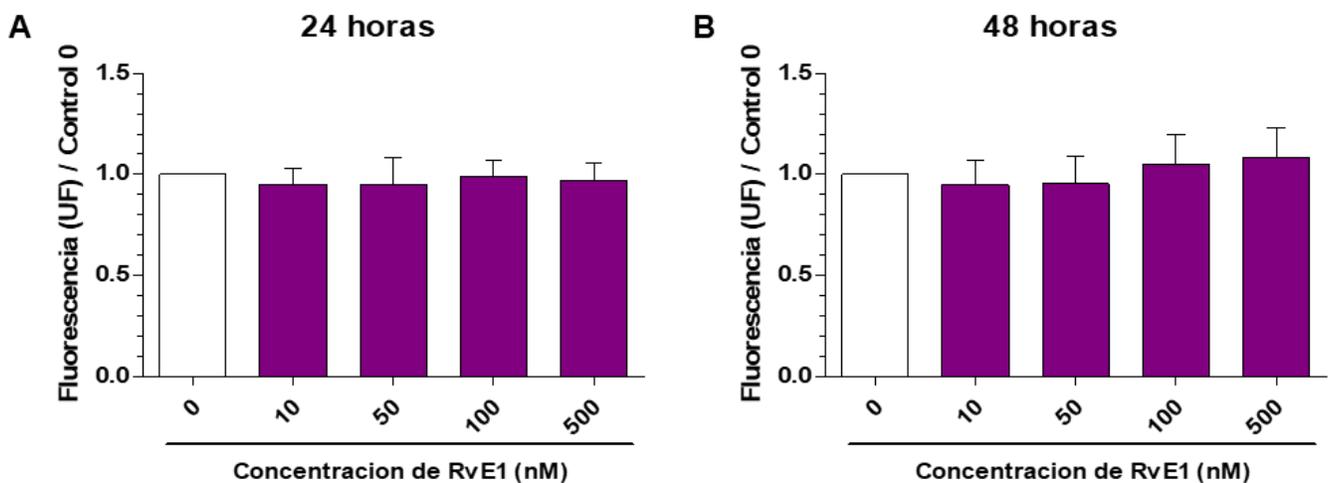


Figura 4. RvE1 no presenta citotoxicidad en FC a concentración dependiente. FC fueron tratados con RvE1 a diferentes concentraciones (0-500nM) y a diferentes tiempos (24 y 48h). Posteriormente, su viabilidad fue analizada por Alamar Blue®. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=3).

6.1.2 Medición por la técnica de conteo celular

Al igual que por el método anterior, los resultados del conteo celular a tiempo dependiente (**Figura 5**), mediante exclusión por Azul de Tripan, demostraron que RvE1 no modifica la viabilidad celular de FC.

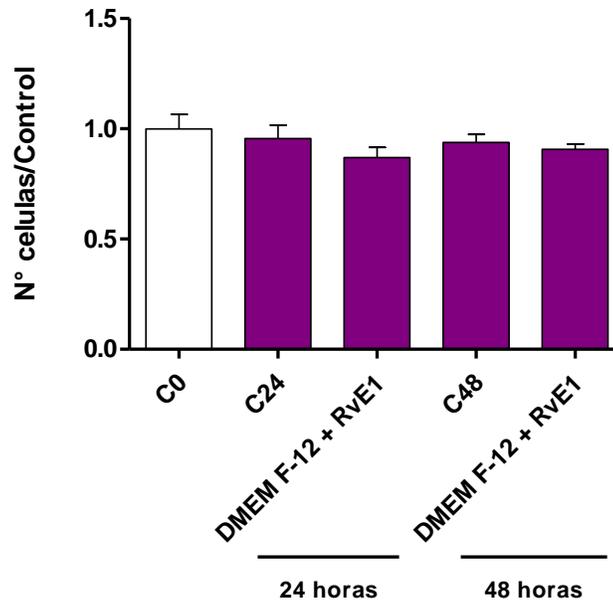


Figura 5. RvE1 no presenta citotoxicidad en FC a tiempo dependiente. FC fueron tratados con RvE1, en medio de cultivo DMEM-F12, a diferentes tiempos (24 y 48h). Posteriormente, su viabilidad fue analizada por conteo celular por exclusión con Tripan Blue. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=3).

Al coincidir los resultados expuestos por ambas técnicas, podemos concluir que RvE1 por sí sola no presenta citotoxicidad sobre FC, ni a tiempo ni a concentración dependiente.

6.2 Evaluación del efecto de RvE1 sobre la proliferación de FC estimulada por FBS 10%.

Una vez corroborado que RvE1 no afecta la viabilidad en FC, se estimó su efecto sobre la proliferación celular. Para lo cual, FC fueron tratados con RvE1 (100nM) en medio

DMEM/F12 enriquecido con FBS 10% durante 24 y 48 horas. Los resultados (**Figura 6**), demuestran que en presencia de FBS 10%, los FC muestran un aumento progresivo del número celular, con una tendencia a duplicar el valor del día anterior. Sin embargo, al preincubar con RvE1, este valor disminuye significativamente a ambos tiempos de estudio.

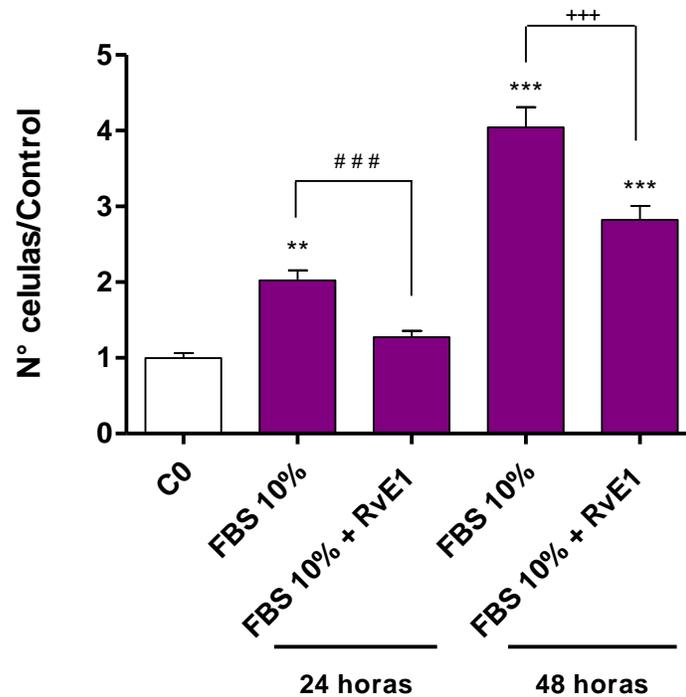


Figura 6. RvE1 disminuye la proliferación de FC. FC fueron tratados con RvE1 (100nM) en medio DMEM/F12 enriquecido con FBS 10% durante 24 y 48h. Se determinó la proliferación mediante conteo celular. ***p<0,001 vs control; **p<0,01 vs control; ###p<0,001 vs suero 24h; +++p<0.001 vs suero 48h. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=3).

6.3 Evaluación del efecto de RvE1 sobre la protección de la viabilidad de FC en muerte celular inducida por Isquemia/Reperfusión.

Teniendo en cuenta que RvE1 no es citotóxica pero que sí afecta el ciclo celular de los FC, fue importante evaluar si presentaba algún tipo de protección frente a un cambio en el medio que provoque muerte celular. Para ello, los FC fueron expuestos a un medio isquémico que emula las condiciones ambientales generadas por un infarto, durante 8

horas. Posteriormente, se cambió el medio por DMEM/F12, simulando reperfusión, con lo que se recuperó las condiciones biológicas normales, por un periodo de 24 horas. Los resultados (**Figura 7**), demuestran que RvE1 no fue capaz de proteger de muerte celular frente a condiciones de isquemia/reperfusión, ya sea administrada durante la isquemia y/o durante la reperfusión. El porcentaje de muerte se mantiene prácticamente inalterado, un 10-20% en isquemia y un 40-50% en reperfusión, tal y como se menciona en la literatura.

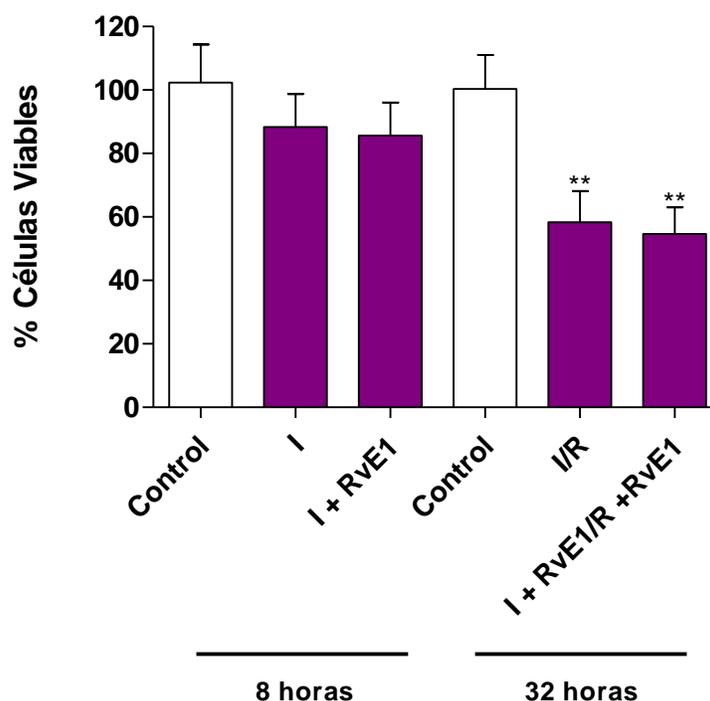


Figura 7. RvE1 no protege de la muerte celular provocada por Isquemia/Reperfusión simulada. FC fueron tratados con RvE1 (100nM) por 8h en un medio isquémico. Luego, se cambió el medio por DMEM F-12, simulando reperfusión. Posteriormente, se realizó conteo celular. **p<0,01 vs control. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=3).

6.4 Evaluación del efecto de RvE1 sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC.

La literatura expresa que RvE1 tiene efecto antiinflamatorio y pro-resolutivo, por lo que se decidió evaluar su efecto en la adhesión de células del sistema inmune. En primera

instancia, fue necesario corroborar si RvE1 por sí sola, tenía alguna influencia en los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1. Por lo que se realizaron ensayos de WB, en los que se midió su efecto a diferentes concentraciones (0-500nM), y para este caso, los FC fueron incubados con RvE1 por 24h; y a diferentes tiempos (0-72h), utilizando una concentración fija de RvE1 (100nM). Los resultados indicaron que, a diferentes concentraciones RvE1 no modificó significativamente los niveles de expresión de ICAM-1 (**Figura 8 A**) y VCAM-1 (**Figura 8 B**); y del mismo modo, tampoco modificó los niveles de expresión de ICAM-1 (**Figura 8 C**) y VCAM-1 (**Figura 8 D**) a diferentes tiempos.

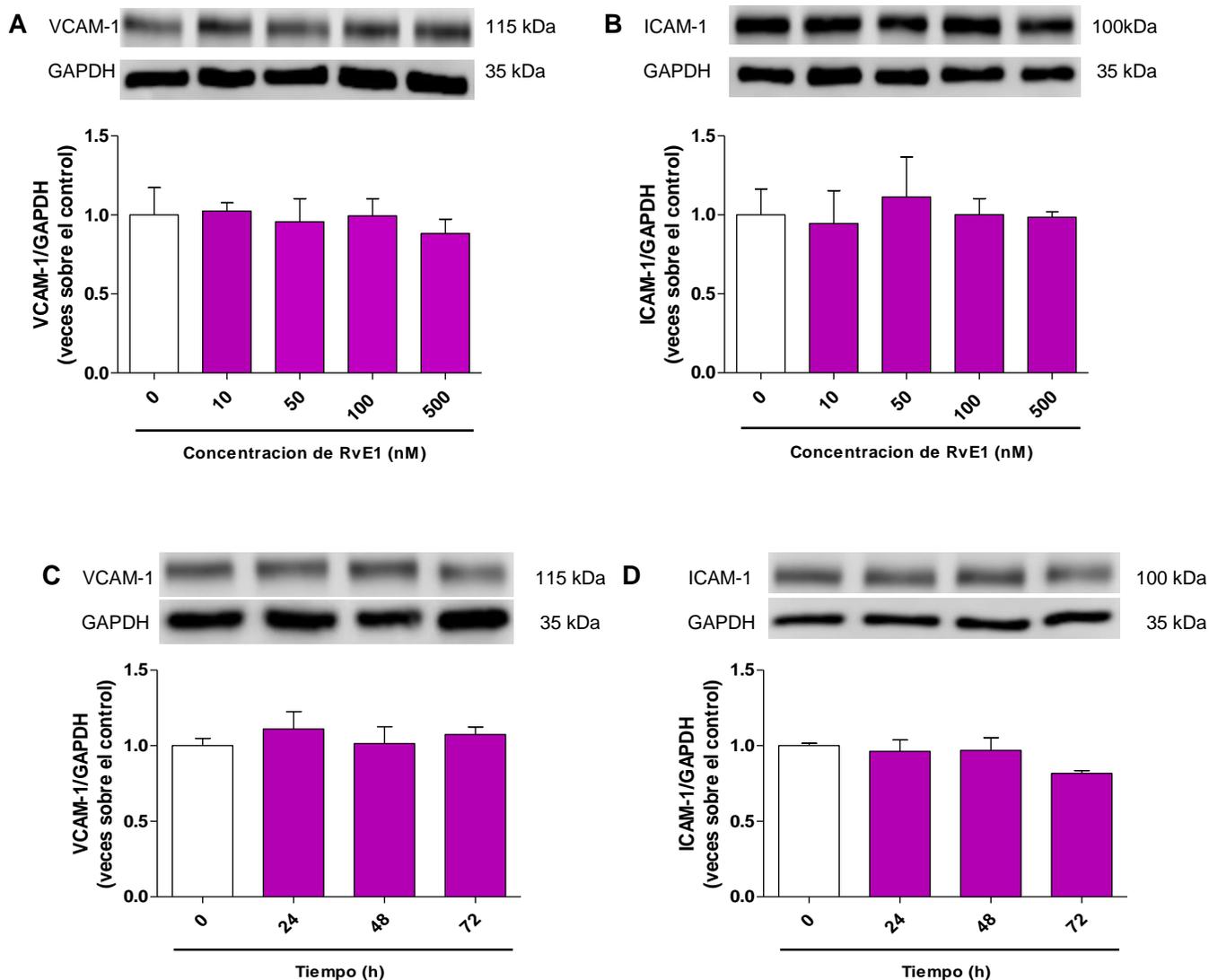


Figura 8. RvE1 no modifica los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC. FC fueron tratados con RvE1 a diferentes concentraciones (0-500nM) y a diferentes tiempos (24-72h). Se determinó la expresión de VCAM-1 (A y C) y de ICAM-1 (B y C), por WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. (n=3)

6.5 Evaluación del efecto de RvE1 sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC inducidos por LPS.

Como fue demostrado en la **Figura 8**, RvE1 por sí sola no es capaz de modificar los niveles de expresión basales de ICAM-1 y VCAM-1, lo que proporcionó la respuesta esperada para evaluar su efecto frente a un estímulo proinflamatorio como el LPS. Para

este análisis, los FC fueron pre-incubados con RvE1 (100nM) durante 1 hora, para luego ser estimulados con LPS (1µg/ml) por 24 horas. Los resultados fueron analizados por WB, e indicaron que RvE1 tiene una marcada tendencia a disminuir los niveles de expresión de VCAM-1 (**Figura 9 A**) y de ICAM-1 (**Figura 9 B**); mientras que los niveles de las proteínas de adhesión se mantuvieron prácticamente inalterados en FC tratados solo con RvE1, y presentaron un considerable aumento al ser estimulados con LPS (VCAM-1 cuadruplicó su valor control, mientras que ICAM-1 solo lo duplicó).

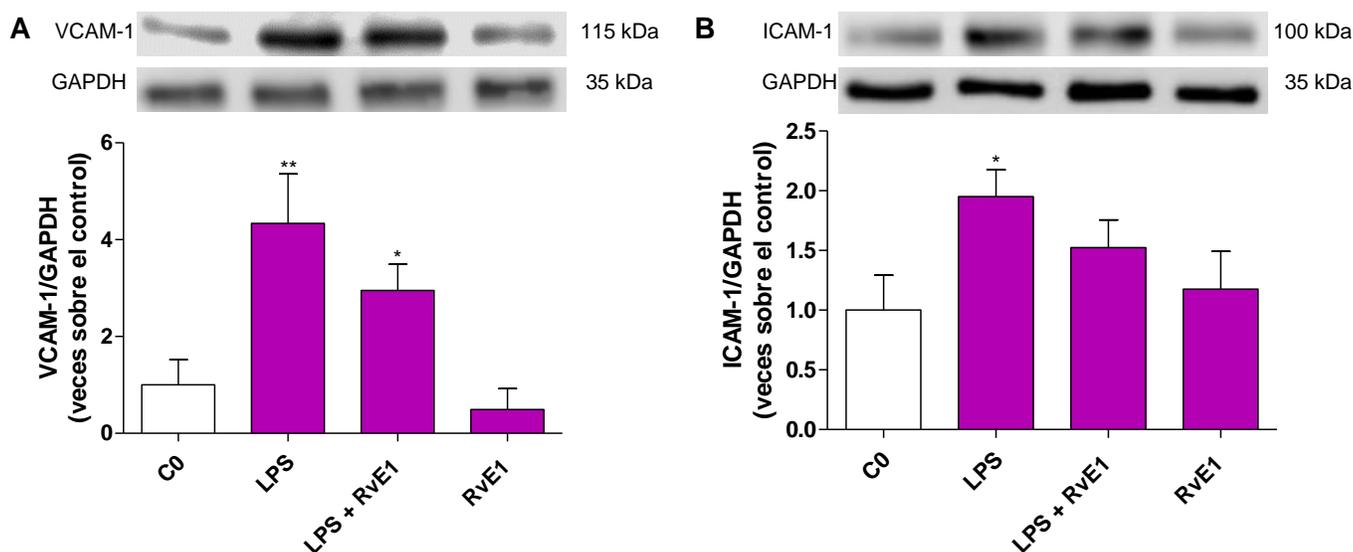


Figura 9. RvE1 no disminuye los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC inducidos por LPS. FC fueron previamente tratados con RvE1 (100nM) durante 1h, posteriormente se agregó LPS (1µg/ml) por 24 horas. Se determinó la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, por WB. Como control de carga se utilizó GAPDH. **p<0,01 vs control; *p<0,05. Los resultados se expresan como promedio ± SEM. (n=3)

6.6 Efecto de RvE1 en la adhesión de SMC sobre FC inducidos por LPS.

Con los resultados anteriores, se decidió hacer un último experimento que pusiera en evidencia el efecto de RvE1, mediante la evaluación de adhesión de SMC sobre FC. Para ello, FC fueron pretratados con RvE1 (100nM) durante 1 hora, para luego ser estimulados con LPS (1µg/ml) durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, los FC fueron

incubados con SMC, según el protocolo de adhesión, para finalmente ser fotografiados con un aumento de 10X al microscopio (**Figura 10A**). El análisis de las fotografías demostró que los FC estimulados con LPS, aumentaron significativamente la adhesión de SMC, mientras que en aquellos que solo poseían RvE1 los SMC prácticamente no se adhirieron, muy similar al control. Por otra parte, al pretratar los FC con RvE1, y luego estimularlos con LPS, la adhesión presentó una importante y significativa disminución (**Figura 10 B**).

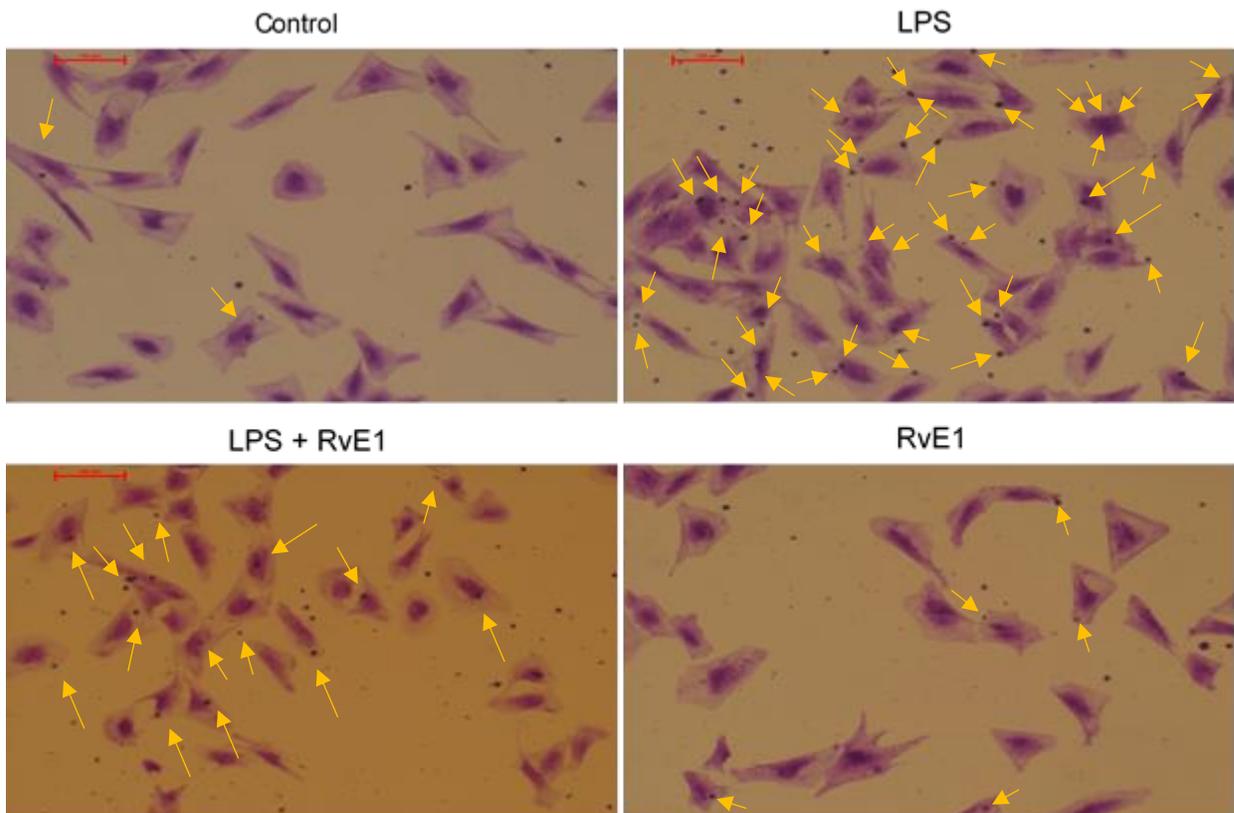


Figura 10A. Fotografías representativa (10X) que demuestra la adhesión de SMC sobre FC. Las flechas señalan SMC adheridos a los FC en distintas condiciones de tratamiento. Se realizó tinción con cristal violeta.

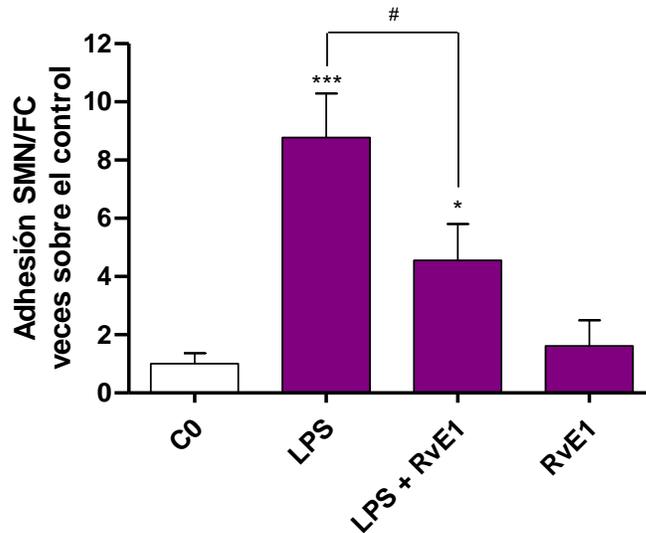


Figura 10B. RvE1 disminuye significativamente la adhesión de SMC sobre FC. FC fueron previamente tratados con RvE1 (100nM) durante 1h, posteriormente se agregó LPS (1µg/ml) por 24 h. Los SMC fueron aislados según protocolo, para finalmente ser agregados a los FC por 2h, luego se lavaron, fijaron y tiñeron con cristal violeta, para finalmente ser fotografiados (10X) al microscopio. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM, de la suma de SMC adheridos a FC, en 10 secciones diferentes de cada muestra. (n=3).

7. DISCUSIÓN

El descubrimiento de las Rvs es relativamente nuevo; sin embargo, la literatura ya cuenta con una amplia gama de estudios en diversos tipos celulares, que avalan sus propiedades antiinflamatorias y pro-resolutivas. En pacientes que han sufrido un infarto al miocardio, la mortalidad se ha visto disminuida cuando incorporan a su dieta suplementos de PUFAs ω 3 (precursores de las Rvs) y siguen un tratamiento con aspirina (36). Lo anterior es un reflejo de que el tratamiento con fármacos que modulan la respuesta proinflamatoria o resolutorias de la inflamación, son una buena alternativa de tratamiento para reducir la morbimortalidad originada por problemas cardiacos. Pero como ya se mencionó anteriormente, poco se sabía sobre el uso de las RvE1 y su uso en tejido cardiaco, y más específicamente, no existía ninguna evidencia sobre su actividad en FC.

En el presente trabajo, se investigaron los efectos que presenta la RvE1 sobre FC, en cuanto a viabilidad, citoprotección y proliferación. Además, se investigó si era capaz de

producir efectos antiinflamatorios y pro-resolutivos, como si lo hace en otros tipos celulares, mediante la medición de los niveles de proteínas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1), para finalizar con la adhesión celular.

Los principales resultados obtenidos en esta tesis demuestran que, si bien RvE1 no presentó citotoxicidad en FC, tampoco fue capaz de proteger ante el daño provocado por isquemia/reperfusión. Sin embargo, la RvE1 fue capaz de disminuir la proliferación celular inducida por suero. Además, al ser administradas bajo condiciones no estimuladas (normales), no alteraron los niveles de las proteínas de expresión (ICAM-1 y VCAM-1). Por el contrario, bajo condiciones proinflamatorias, mostraron una tendencia a disminuir los niveles de estas proteínas de adhesión, y consecuentemente, una significativa disminución en la adhesión celular.

7.1 Efecto de RvE1 sobre la viabilidad, proliferación y citoprotección celular

Nuestros resultados muestran que estos derivados lipídicos no son citotóxicos, ya que no inducen la muerte celular, y en literatura no hay datos publicados que evidencien que RvE1 por si misma produzca efectos citotóxicos. Este resultado permite concluir, que la utilización de la RvE1 como herramienta farmacológica sería beneficioso desde el punto de vista que no representa un riesgo para la viabilidad de estas células cardiacas. Sin embargo, ello no significa que no pueda presentar efectos citotóxicos en otros tipos celulares, lo que debería ser estudiado con posterioridad. La falta de efectos citotóxicos se encuentra demostrado en otros tipos celulares, como en células de musculatura lisa venosa (VMSC) (37), donde se utilizaron concentraciones de 10 y 100 nmol/L, durante 6-8 horas, y no se alteró la viabilidad celular. Por otra parte, en células dendríticas (DC) (38), tampoco se vio afectada la viabilidad celular cuando las DC de piel abdominal de ratas fueron pre-

estimuladas por 30 minutos con RvE1 (200ng/mouse), y luego expuestas a radiación con luz ultravioleta por 24 horas. También, un ensayo por reducción de azul de formasan (MTT) en un modelo *in vitro* de I/R en células cardíacas (39), se demostró que RvE1 no afecta la viabilidad celular de manera concentración dependiente (0-1000nM). No obstante, en nuestros resultados, la RvE1 tampoco demostró presentar citoprotección ante un daño inducido por isquemia/reperfusión simulada al aplicar RvE1 durante la isquemia y/o durante la reperfusión. En contraparte, en un modelo experimental de infarto cardíaco en un corazón de rata, se analizó *in vivo*, y posteriormente *in vitro* en células cardíacas, que la RvE1 sí protege de la pérdida de viabilidad celular. *In vivo*, las ratas fueron expuestas 30 minutos de isquemia y 4 horas de reperfusión, treinta minutos antes de esta última etapa, se inyectaron distintas concentraciones de RvE1 (0-0,3mg/kg) de manera intravenosa. Mientras que *in vitro*, se utilizó una línea celular, H9c2, las que fueron incubadas con diferentes concentraciones de RvE1 (0-1000nM) bajo condiciones normales, 16 h de hipoxia o 16 h de hipoxia y 2 h de reoxigenación. Los resultados *in vivo* mostraron una disminución en el tamaño del área infartada, de manera dosis dependiente; mientras que *in vitro*, mostraron un aumento de la viabilidad en ambas condiciones (hipoxia e hipoxia/reoxigenación), con un máximo efecto cuando utilizaron RvE1 100nM, y una disminución de la apoptosis de manera dosis dependiente, respaldada por una disminución en la actividad de la caspasa 3 inducida por hipoxia e hipoxia/reoxigenación (39). Estos resultados confirman que la RvE1 protege de la pérdida de la viabilidad, y que los resultados son dependientes del contexto celular y del modelo experimental utilizado.

En cuanto a la proliferación celular, nuestros resultados demostraron que sí, que efectivamente la RvE1 inhibe la proliferación celular. En respaldo de este hallazgo, en la literatura también existen datos en que se muestra que RvE1 inhibe la proliferación, en esta ocasión de fibroblastos renales, en un modelo animal de obstrucción uretral unilateral

(UUO), donde las células fueron estimuladas con PDGF-BB y RvE1 (1ng/ml) por 24h, dando como resultado una significativa inhibición de la proliferación de fibroblastos renales primarios. Este resultado se confirmó con ensayos de WB, donde la RvE1 inhibió la inducción de la activación de la segunda fase de Akt y ERK (8h después de la obstrucción), dos importantes quinasas responsables de modular la viabilidad y proliferación celular, inducida por PDGF-BB. Además, la RvE1 fue capaz de prevenir el aumento de c-myc y de la ciclina-D1 (proteína que comanda el proceso de proliferación celular). Ambos blancos promueven la progresión del ciclo celular y la disminución de p21 cip1, que inhibe la progresión del ciclo celular, ambos casos inducidos por PDGF-BB (40).

Por otro lado, la literatura muestra resultados divergentes en cuanto al efecto de citoprotección que presentan las Rvs, unos que apoyan nuestra hipótesis y otros que no, y eso podría deberse a que la respuesta está dada por el tipo celular o por el modelo animal utilizado.

7.2 Efecto de RvE1 sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 y, consecuentemente, adhesión celular.

Los monocitos se adhieren espontáneamente a las células endoteliales bajo condiciones estáticas, pero para que ocurra una significativa adhesión, se requiere la expresión de ciertas proteínas de membrana, tales como L-selectina, E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1, las que son expresadas mediante citoquinas proinflamatorias.

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que los FC expresan las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 las cuales son aumentados por estímulos pro-inflamatorios, y que estas proteínas son responsables de adherir a células del sistema inmune entre ellas monocitos y neutrófilos (35) En este mismo contexto, y también en

nuestro laboratorio, se ha demostrado que los FC son capaces de liberar al medio extracelular citoquinas y quimioquinas, las cuales inducen migración de leucocitos. (35)

Nuestros resultados muestran que tanto los niveles basales de ICAM-1 como VCAM-1 se mantienen inalterados al ser estimulados con RvE1 por sí misma, lo que estaría indicando que RvE1 no modifica la funcionalidad en cuanto a la capacidad adhesiva de los FC. Sin embargo, nuestros resultados indicaron que, al agregar un estímulo proinflamatorio como LPS, que en variados estudios de nuestro laboratorio y otros, ha demostrado aumentar los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1, RvE1 mostró una marcada tendencia a disminuir estos niveles en aumentados por LPS. Esto podría indicar que RvE1 participa en la disminución de la expresión de las proteínas de adhesión, lo que estaría respaldando el cese de la migración y reclutamiento de PMN observado en varios modelos experimentales, entre ellos: piel, (38, 41) periodontitis, (42) peritonitis, (43, 44) colitis (45, 46) y depresión (47)

En condiciones de daño, un estímulo proinflamatorio como LPS favorece la migración y adhesión (reclutamiento), de células del sistema inmune, esto se logra gracias a la expresión de proteínas de adhesión celular. El trabajo de esta tesis permitió mostrar que, bajo estas mismas condiciones, RvE1 fue capaz de disminuir la adhesión de células del sistema inmune, específicamente SMC sobre los FC. Por otro lado, nuestros resultados mostraron que la RvE1 no disminuyó de manera estadísticamente significativa los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1. Este resultado parece algo contradictorio, pero nosotros observamos una tendencia a la disminución en sus niveles de expresión. En este sentido, resultados de nuestro laboratorio demostraron que la adhesión de células del sistema inmune a los FC depende de la expresión simultánea de ambas proteínas de adhesión y que basta la disminución de una de ellas para que la adhesión se vea absolutamente bloqueada. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que basta una leve disminución de una de ellas para que la adhesión de leucocitos se vea francamente disminuida. Este

resultado se sustenta con otras investigaciones en el área, donde, por ejemplo, se ha demostrado que RvE1 estimula el desprendimiento de L-selectina (otra proteína de membrana utilizada en adhesión) y reduce la expresión de CD18 ($\beta 2$, antígeno implicado en la unión del contrarreceptor de ICAM-1 e ICAM-2), tanto en PMN como en monocitos, experimento realizado en sangre total (36). En otro trabajo, realizado en un cocultivo de células del endotelio coroidal de la retina (CREC) y leucocitos, la RvE1 demostró inhibir la expresión de VCAM-1 y la transmigración de PMN a través de las barreras de CRECs (48). Otra investigación, mostró que la adhesión de monocitos sobre células epiteliales de pulmón se redujo significativamente luego de una inhalación de LPS, previo a una perfusión de aceite de pescado, pero también, redujo la producción de citoquinas proinflamatorias, disminuyendo el Rolling y la adhesión de monocitos en células endoteliales, así como también, disminuyó el reclutamiento de PMN al compartimento broncoalveolar (49). Otro reporte, indicó que al inyectar (100 ng/mouse) de RvE1 en la cavidad peritoneal 48 horas después de iniciada la peritonitis, se indujo una reducción del número de neutrófilos (44). Finalmente, en un modelo de obstrucción renal, RvE1 inhibió la infiltración de macrófagos y fibrosis (40).

Con estos resultados en su conjunto, se demuestra que, a pesar de la amplia gama de modelos experimentales empleados en las investigaciones, el efecto producido neto es muy similar en cada caso. Se destaca entonces, que el efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de células del sistema inmune inducidos por distintos estímulos proinflamatorios puede ser modulado por la RvE1. Esto podría deberse a que los mecanismos de activación de RvE1 son similares, y como está indicado en la literatura, RvE1 posee un marcado efecto antiinflamatorio al disminuir los niveles de expresión de moléculas de adhesión y disminuir el reclutamiento de células del sistema inmune, frenando el estímulo inflamatorio.

En su conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis permiten demostrar que en FC la RvE1 es no citotóxica y muestra un claro efecto resolutor de la inflamación, disminuyendo la adhesión de SMC sobre los FC. Estos resultados permitirían sugerir que la RvE1 podría ser una buena alternativa terapéutica en la cual la inflamación es uno de los principales partícipes y causantes de su cronicidad.

8. CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo, se logró demostrar que RvE1, por si misma, no presenta efectos citotóxicos en FC
2. RVE1 no fue capaz de brindar un efecto citoprotector ante un daño de muerte celular inducida por I/R simulada.
3. Rve1 mostró efectos inhibitorios en la proliferación de FCN.
4. RvE1 no demostró conseguir una disminución estadísticamente significativa en los niveles de expresión de las moléculas de expresión, ICAM-1 y VCAM-1, en FCN estimulados con LPS.
5. RvE1 disminuyó la adhesión de SMC sobre FCN.

Con estos hallazgos, podemos deducir que en los FC la presencia y activación de loa receptores para la RvE1, desencadenan una respuesta antiinflamatoria, disminuyendo las proteínas de membrana encargadas del reclutamiento de células del sistema inmune, lo que consecuentemente podría para concluir con una efectiva disminución en la respuesta proinflamatoria. Lo anterior, permitiría utilizar a las RvE1 o a sus futuros análogos agonistas, como promisorios fármacos para favorecer una temprana y efectiva resolución de la inflamación, evitando la cronicidad de las respuestas inflamatorias, y con ello, la progresión de patologías donde la respuesta inflamatoria es la principal causante.

Finalmente, podemos demostrar que se cumple con la hipótesis planteada.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. “Enfermedades cardiovasculares”, Organización Mundial de la Salud, [consulta en línea: 19 de mayo de 2016], <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/s/>>
2. “Enfoque de riesgo para la prevención de enfermedades cardiovasculares”, MINSAL, Consenso 2014
3. Furtado M., Costa M, Rosenthal N. *The cardiac fibroblast: Origin, identity and role in homeostasis and disease*. International Society for Differentiation. 92(3): 93-101, 2016
4. Pinto A., Ilinykh A., Ivey M., Kuwabara J. *Revising Cardiac Cellular Composition*. Circulation Research. 118:400-409, 2016
5. Varga I., Kyselovic J., Galfiova P., et al. *The Non-cardiomyocyte Cells of the Heart. Their Possible Roles in Exercise-Induced Cardiac Regeneration and Remodeling*. Exercise for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment Volume. 999: 117-136, 2017
6. Díaz-Araya G., Vivar R., Humeres C., et al. *Cardiac fibroblast as sentinel cells in cardiac tissue: receptor, signaling pathway and celular function*. Pharmacological Research. 110:30-40, 2015
7. Krenning G., Zeisberg E., Kalluri R. *The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis*. Journal of Cellular Physiology. 225(3): 631–637, 2012
8. Deb A., Ubil E. *Cardiac fibroblas in development and wound healing*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 70: 47–55, 2014
9. Davis J., Molkentin J. *Myofibroblast: trust your heart and let fate decide*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 70: 9-18, 2014

10. Chistiakov D., Orekhov A., Bobryshev Y. *The role of cardiac fibroblasts in post-myocardial heart tissue repair*. *Experimental and Molecular Pathology*. 101: 231–240, 2016
11. Frangogiannis N. *The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling*. *Nature Reviews Cardiology*. 11: 255,265, 2014
12. Kain V., Prabhu SD, Halade GV. *Inflammation revised: inflammation versus resolution of inflammation following myocardial infarction*. *Basic Research in Cardiology*. 109(6): 444, 2014
13. Spite M., Claria J., Serhan C. *Resolvins, specialized proresolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases*. *Cell Metabolism*. 9(1): 21-36, 2014
14. Serhan C, Chiang N, Dalli J. *New pro-resolving n-3 mediators bridge resolution of infectious inflammation to tissue regeneration*. *Molecular Aspects of Medicine*. XXX:1-17, 2017
15. Lu Y, Yeh W, Ohashi P. *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. *Cytokine*. 42(2):145-151, 2008
16. Fliss P, Jowers T, Brinkmann M., et al. *Viral mediated redirection of NEMO/IKK γ to autophagosomes curtails the inflammatory cascade*. *PLoS Pathogen*. 8(2): e1002517-e1002517, 2012
17. Frangogiannis N. *The mechanistic basis of infarct healing*. *Antioxidants & redox signaling*. 8(11-12):1907-39, 2006
18. Pålsson-McDermott E, O'Neill L. *Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4*. *Immunology*. 113(2):153-162, 2004
19. Olivares-Silva F, Landaeta R, Aránguiz P, et al. *Heparan Sulfate Potentiates Leukocyte Adhesion on Cardiac Fibroblast by Enhancing Vcam-1 And Icam-1 Expression*. *Molecular basis of disease*. 1864(3): 831-842, 2017

20. Pourrajab F, Yazdi M, Zarch M. *Cross talk of first-line defense TLRs with PI3K/Akt pathway, in preconditioning therapeutic approach.* Molecular and Cellular Therapies. 3 (1): 4, 2015
21. Pinzón C, Serrano M, Sanabria M. *Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos.* Ciencia de la salud. 7 (2): 47-66, 2009
22. Hassan B, Akcakanat A, Holder A. *Targeting the Pi-kinase/Akt/mTOR signaling pathway.* Surgical Oncology Clinics of North America. 22(4): 641-664, 2013
23. Lui X, Cohan J. *The role of PI3K/Akt in human herpesvirus infection: from the Bench to the Bedside.* Virology. 479-480: 568-577, 2015
24. Guo H, German P, Bai S. *The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma.* Molecular Genetics and Genomics. 42(7): 343–353, 2017
25. Arita M. *Mediator lipidomics in acute inflammation and resolution.* Biochemistri. 52(4):313–319, 2012
26. Serhan C, Krishnamoorthy S, Recchiuti A, et al. *Novel anti-inflammatory – Pro-resolving mediatores and their receptor.* Curr Top Med Chem. 11(6), 629–647, 2011
27. Serhan C, Chiang N, Dalli J. *The resolution code of acute inflammation: novel pro-resolving lipid mediators in resolution.* Seminars in Immunology. 27: 200-215, 2015
28. Serhan C. *Novel lidip mediator and resolution mechanisms in acute inflammation.* 177(4): 1576-1591, 2010
29. Buckley C, Gilroy D, Serhan D. *Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute. inflammation.* Immunity. 40: 315-327, 2014
30. Sekia H, Tania Y, Arita M. *Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1.* Prostaglandins and Other Lipid Mediators. 89: 126-130, 2009

31. Lim JY, Park CK, Hwang SW. *Biological Roles of Resolvins and Related Substances in the Resolution of Pain*. BioMed Research International. Doi:10.1155/2015/830930,2015
32. Claria J, López-Vicario C, Ruis V, et al. *Pro-resolving actions of SPM in adipose tissue biology*. Molecular Aspects of Medicine. 58:83-92, 2017
33. Claria J, López-Vicario C, Ruis V, et al. *Pro-resolving actions of SPM in adipose tissue biology*. Molecular Aspects of Medicine. 58:83-92, 2017
34. Weitz-Schmidt G, Chreng S. *Cell Adhesion Assays*. Methods in Molecular Biology. 757: 15-30, 2011
35. Humeres C, Vivar R, Boza, et al. *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, 2016
36. Dona M, Fredman G, Schwab J, et al. *Resolvin E1, an EPA-derived mediator in whole blood, selectively counterregulates leukocytes and platelets*. Blood. 112(3): 848–855, 2008
37. Ho K, Spite M, Owens C, et al. *Aspirin-Triggered Lipoxin and Resolvin E1 Modulate Vascular Smooth Muscle Phenotype and Correlate with Peripheral Atherosclerosis*. Vascular Biology, Atherosclerosis and Endothelium Biology. 177(4): 2116-2123, 2010
38. Sawada Y, Honda T, Hanakawa S, et al. *Resolvin E1 inhibits dendritic cell migration in the skin and attenuates contact hypersensitivity responses*. Experimental Medicine. 212(11): 1921–1930, 2015
39. Keyes K, Ye Y, Lin Y, et al. *Resolvin E1 protects the rat heart against reperfusion injury*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 299: H153–H164, 2010.

40. Qu X, Zhang X, Yao J, et al. *Resolvins E1 and D1 inhibit interstitial fibrosis in the obstructed kidney via inhibition of local fibroblast proliferation*. *Journal of Pathology*. 228: 506–519, 2012
41. Serhan C, Clish C, Brannon J, et al. *Novel Functional Sets of Lipid-derived Mediators with Antiinflammatory Actions Generated from Omega-3 Fatty Acids via Cyclooxygenase 2–Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and Transcellular Processing*. *Experimental Medicine*. 192(8): 1197–1204, 2000
42. Hasturk H, Kantarci A, Ohira T, et al. *RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis*. *Federation of American Societies for Experimental Biology*. 20(2): 401-403, 2005
43. Bannenberg G, Chiang N, Ariel A, et al. *Molecular Circuits of Resolution: Formation and Actions of Resolvins and Protectins*. *Immunology*. 174:4345-4355, 2005
44. Schif-Zuck S, Gross N, Assi N, et al. *Satiated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b^{low} macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids*. *European Journal of Immunology*. 41(2): 366–379.
45. Arita M, Yoshida M, Hong S, et al. *Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102(21): 7671–7676, 2005
46. Ishida T, Yoshida M, Arita M, et al. *Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium induced colitis*. *Inflammatory Bowel Diseases*. 16(1): 87–95, 2010
47. Deyama S, Shimoda K, Suzuki H, et al. *Resolvin E1/E2 ameliorate lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors via ChemR23*. *Psychopharmacology*. 2017

48. Tian H, Lu Y, Sherwood A, et al. *Resolvins E1 and D1 in Choroid-Retinal Endothelial Cells and Leukocytes: Biosynthesis and Mechanisms of Anti-inflammatory Actions*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 50(8): 3613-3620, 2009
49. Hecker M, Linder T, Ott J, et al. *Immunomodulation by lipid emulsions in pulmonary inflammation: a randomized controlled trial*. Critical Care 19:226, 2015