



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

# **Resolvina D1 y Resolvina E1 inhiben la activación de AKT, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B dependiente de LPS y previenen la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en fibroblastos cardíacos**

Memoria para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico

**Pablo Andrés Manuel Alejandro Sepúlveda Mayorga**

Directores: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya  
Dr. Raúl Vivar Sánchez

Patrocinante: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

---

Santiago, Chile 2018

## **FINANCIAMIENTO**

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

Este trabajo contó con el apoyo y financiamiento del proyecto FONDECYT N° 1170425

Esta memoria dio origen a la siguiente presentación a congreso:

**Pablo Sepúlveda Mayorga**, Raúl Vivar, Guillermo Díaz-Araya. Resolvina D1 inhibe la activación de ERK1/2 y NF-kB dependiente de LPS en fibroblastos cardíacos. XXXIX Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Puerto Varas, Chile, 2017.

## **AGRADECIMIENTOS**

Llegado a este punto de mi etapa universitaria, me siento agradecido de todo lo aprendido, tanto en lo educacional como en lo personal, donde mis profesores fueron una parte fundamental en este camino. Sin su constante apoyo, esto hubiese sido muy distinto. En especial al profesor Guillermo, que confió en mí y me guio en la última fase de este proceso.

Agradezco a mis amigos y compañeros del colegio, quienes siempre estuvieron allí, aunque fuese para decir alguna tontera e hicieron menos terrible la etapa del colegio. A mis amigos de la universidad que estuvieron desde el día uno a mi lado, donde sufrimos a la par con todas las pruebas y evaluaciones. Pero lo que más valoro, es su apoyo y consejo. todos quienes estuvieron a mi lado, soportando mis enojos y rabietas pero que, sin embargo, se mantuvieron a mi lado y me apoyaron en esta travesía. Todos y cada uno de ellos son y serán importantes y siempre los llevaré en mi corazón.

A mi manada que, a pesar de tener un mal día, siempre me recibieron moviendo sus colitas y me contagiaban con su alegría.

A mi familia, pilar fundamental y responsables de quien soy. Siempre con su constante apoyo y amor incondicional. Mis padres que nos inculcaron, a mis hermanos y a mí, buenos valores, enseñándonos y educándonos para ser mejores personas. Siempre esforzándose por nosotros para que estuviésemos bien, seguros y solo nos dedicáramos a estudiar. A mis hermanos que siempre hacen ameno estar en casa. A mi familia en general, sin ellos nada de esto hubiese sido posible.

*A Dios y mi familia*

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
PORTADA	1
FINANCIAMIENTO	2
AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIA	4
ÍNDICE GENERAL	5
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	12
SUMMARY	14
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1 Generalidades	16
1.2 Estructura del tejido cardiaco	16
1.3 Fibroblastos cardiacos	17
1.4 Inflamación	19
1.5 Receptores de tipo Toll	20
1.6 Adhesión celular	22
1.7 Resolución de la inflamación	23
1.8 Resolvinas D1 y E1	24
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 adultos	30
5.4 Pasaje celular	30
5.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida	31
5.6 Electrotransferencia de proteínas	31
5.7 Inmunowestern Blot	32
5.8 Expresión de resultados y análisis estadístico	32
5.9 Diseño experimental	33
5.9.1 Objetivo 1	33
5.9.2 Objetivo 2	33
5.9.3 Objetivo 3	33
5.9.4 Objetivo 4	33
6. RESULTADOS	34
6.1 Activación de las vías Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B por LPS en FC	34
6.2 Evaluación del efecto de RvD1 sobre la activación de Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B en FC	36
6.3 Evaluación del efecto de RvE1 sobre la activación de Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B en FC	38
6.4 Evaluación del efecto de RvD1 sobre la activación de Akt, ERK1/2, y NF- $\kappa$ B gatillada por LPS en FC	40
6.5 Evaluación del efecto de RvE1 sobre la activación de Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B gatillada por LPS en FC	42
6.6 Evaluación del efecto de RvD1 sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por LPS en FC	44

6.7 Evaluación del efecto de RvE1 sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por LPS en FC	46
7. DISCUSIÓN	48
7.1 Efecto de LPS sobre la activación de Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B en FC	49
7.2 Efecto de RvD1 y RvE1 sobre la activación de Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B en FC	50
7.3 Efecto de RvD1 y RvE1 sobre la activación de Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B inducidas por LPS en FC	52
7.4 Efecto de RvD1 y RvE1 sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por LPS en FC	55
8. CONCLUSIÓN	58
9. BIBLIOGRAFÍA	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. LPS activa las vías de señalización Akt, ERK1/2 y NF-κB en FC.	35
Figura 2. Efecto de RvD1 sobre Akt, ERK1/2 y NF-κB en FC.	37
Figura 3. Efecto de RvE1 sobre Akt, ERK1/2 y NF-κB en FC.	39
Figura 4. RvD1 previene la activación de Akt, ERK1/2 y NF-κB gatillada por LPS en FC.	41
Figura 5. RvE1 previene la activación de Akt, ERK1/2 y NF-κB gatillada por LPS en FC.	43
Figura 6. RvD1 disminuye los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por LPS en FC.	45
Figura 7. RvE1 disminuye los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por LPS en FC.	47

## ABREVIATURAS

$\alpha$ -SMA	Alfa-actina de músculo liso
$\mu$ g	Microgramo
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ m	Micrómetro
Akt	Proteína quinasa 3
ALX/FPR2	Receptor formilpeptido 2 asociado a proteína G
ANOVA	Análisis de la varianza
APS	Persulfato de amonio
AT-RvD1	RvD1 desencadenado por aspirina
BLT1	Receptor leucotrieno B4
CAM	Molécula de adhesión celular
ChemR23	Receptor de quemarina 23
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CREC	Células del endotelio coroideas de la retina
DAMP	Patrón molecular asociado a daño
DHA	Ácido docosahexanoico
DMEM-F12	Medio de mantención modificado Dulbecco, formula 12
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EPA	Ácido eicosapentanoico
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular
FC	Fibroblasto cardiaco
FCN	Fibroblastos cardiacos neonatos
FBS	Suero fetal bovino
g	Gramo
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
ICAM-1	Molécula 1 de adhesión celular intercelular

IgSF	Superfamilia de inmunoglobulinas
IL	interleuquina
JAK	Janus quinasas
JNK	Quinasa N-terminal c-Jun
kDa	Kilodalton
LOX	Lipooxigenasa
LPS	Lipopolisacárido
LTB4	Leucotrieno B4
LX	Lipoxina
MAMPS	Patrón molecular asociado a microbio
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MaR	Maresina
MCP-1	Proteína quimioattractante de monocitos-1
MDM2	Regulador negativo del supresor tumoral p53
MEC	Matriz extracelular
MPP+	Ion 1-metil-4-fenilpiridinio
mA	Miliamperes
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MyD88	Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
NF-κB	Factor nuclear κB
nM	Nanomolar
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno
PD	Protectina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PIP2	Fosfatidilinosito 4,5-bisfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PMN	Polimorfonucleares
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
PUFA n-3	Ácidos grasos poliinsaturados omega-3
Rv	Resolvina
SEM	Error promedio estándar
SPM	Mediadores pro-resolutivos especializados
STAT	Transductores de señal y activadores de la transcripción
TBS	Tampón tris-salino
TEMED	N, N, N', N' –tetrametil-etilendiamina
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TLR-4	Receptor tipo Toll 4
STAT	Transductores de señal y activadores de la transcripción
TNF	Factor de necrosis tumoral
VCAM-1	Molécula 1 de adhesión celular vascular
WB	Western blot

## RESUMEN

Resolvina D1 y Resolvina E1 inhiben la activación de AKT, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B dependiente de LPS y previenen la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en fibroblastos cardíacos

Los fibroblastos cardíacos (FC) son células que tienen como función regular la matriz extracelular (MEC), pueden responder a estímulos endógenos o exógenos que alteren la homeostasis del sistema, y en caso de injuria, pueden proliferar y migrar hacia el sitio de daño. Uno de los agentes proinflamatorios más estudiados y utilizados es el lipopolisacárido (LPS) bacteriano, éste desencadena la respuesta inflamatoria activando las vías de señalización Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B, que conducen a la expresión de citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento los que, a su vez, aumentan la expresión de proteínas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, L-selectina, entre otras; permitiendo que células del sistema inmune viajen desde la circulación sanguínea hasta el sitio de injuria, para cicatrizar la herida.

La inflamación puede ser terminada activamente por mediadores proresolutivos. Unos de estos mediadores son la Resolvina (Rv) D1 y E1. La RvD1 proviene del ácido docosahexaenoico y la RvE1 del ácido eicosapentaenoico. Estas se biosintetizan durante la inflamación y se les ha asociado propiedades antiinflamatorias, limitando la infiltración de neutrófilos, estimulando la fagocitosis de los macrófagos y reduciendo el nivel de dolor inflamatorio y fibrosis. Sin embargo, no existe evidencia de los efectos que podría tener en FC.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de RvD1 y RvE1 en FC, para así estudiar las acciones que tendría en un contexto inflamatorio inducido por LPS, evaluando la actividad en las vías de señalización Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B y sobre la expresión de las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1.

Los resultados obtenidos muestran que RvD1 presenta una significativa disminución de la activación de Akt y ERK1/2, no así de NF- $\kappa$ B. RvE1 disminuye significativamente la activación de ERK1/2, sin embargo, no presenta cambios significativos respecto al control en la fosforilación de Akt y NF- $\kappa$ B. Además, se demostró que en FC estimulados con LPS y pretratados con RvD1, disminuyó la activación de las vías Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B respecto a LPS, y consecuentemente disminuyó la expresión de VCAM-1, pero no de ICAM-1. Por otro lado, RvE1 disminuyó significativamente la activación de Akt, no así la activación de ERK1/2 y NF- $\kappa$ B estimuladas por LPS. Además, disminuyó la expresión de ICAM-1 estimulado por LPS, pero no de VCAM-1.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que tanto RvD1 como RvE1 poseen propiedades resolutivas en un modelo de inflamación en FC, lo cual posibilitaría su uso como nuevas herramientas terapéuticas en enfermedades cardíacas.

## SUMMARY

*Resolvin D1 and Resolvin E1 inhibit AKT, ERK1/2 and NF- $\kappa$ B activation LPS-dependent and prevent ICAM-1 and VCAM-1 expression in cardiac fibroblasts*

Cardiac fibroblasts (CF) are cells that regulate the extracellular matrix (ECM), they can respond to endogenous or exogenous stimuli that alter the homeostasis of the system, and in case of cardiac tissue injury, they can proliferate and migrate to the site of damage. One of the most studied and used proinflammatory agents is bacterial lipopolysaccharide (LPS), it triggers the inflammatory response activating the signaling pathways Akt, ERK1/2 and NF- $\kappa$ B, which lead to the expression of proinflammatory cytokines and growth factors that increase the expression of adhesion proteins such as ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, L-selectin, among others. These effects of LPS favor to the cells of the immune system extravasate to the site of injury to degrade the microorganism and heal the wound.

Inflammation can be actively terminated by proresolving mediators, such as RvD1 and RvE1. RvD1 derived from docosahexaenoic acid and RvE1 from eicosapentaenoic acid. These are biosynthesized during inflammation and have been associated with anti-inflammatory properties, limiting the infiltration of neutrophils, stimulating the phagocytic activity of macrophages and reducing the level of inflammatory pain and fibrosis. However, there is no evidence respect of the effects it could have on FC.

In this study, we investigated the role of RvD1 and RvE1 in FC, to study the actions that would have in an inflammatory context induced by LPS, evaluating the activity in the signaling pathways Akt, ERK1/2 and NF- $\kappa$ B and the expression of adhesion proteins ICAM-1 and VCAM-1.

The results show that RvD1 exert a significant decrease of Akt and ERK1/2 activity, but not NF- $\kappa$ B; RvE1 significantly decreases the activation of ERK1/2, however, it does not present significant effect in regard to the control in the phosphorylation of Akt and NF- $\kappa$ B. In addition, the pretreatment with RvD1, has decreased the activation of the Akt, ERK1/2 and NF- $\kappa$ B pathways respect to LPS, and consequently decreased the expression of VCAM-1, but not ICAM-1. On the other hand, RvE1 has significantly decreased the activation of Akt stimulated by LPS, but not of ERK1/2 nor NF- $\kappa$ B. Additionally, the expression of ICAM-1 stimulated by LPS has decreased, but not of VCAM-1.

In conclusion, our results suggest that RvD1 and RvE1 have resolutive properties in an inflammatory model in CF, which would make possible its use as new therapeutic tool in cardiac diseases.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un problema de salud pública por su alta prevalencia y constituyen la principal causa de muerte de la población adulta<sup>[1]</sup>, siendo el consumo de tabaco, la inactividad física, el uso excesivo de alcohol y la mala alimentación los principales factores de riesgo para el desarrollo de ECV<sup>[2]</sup>. A nivel mundial, entre las ECV, la enfermedad coronaria es la de mayor incidencia en mortalidad seguido por el accidente cerebrovascular<sup>[3]</sup>. Las ECV tienen una estimación actual de 17,3 millones de muertes por año y con un aumento previsto de hasta 23,6 millones de muertes para el año 2030, lo que representan el 31% de todas las muertes a nivel mundial<sup>[4]</sup>.

Las medidas de prevención cardiovascular deben comenzar por cambios en el estilo de vida. Sin embargo, estudios publicados en los últimos años sobre las tasas de cumplimiento de los cambios en el estilo de vida, por parte de los pacientes, arrojan datos alarmantes.

Son necesarias urgentes intervenciones a distintos niveles, de manera de trabajar en la prevención de las ECV y promover la adopción de estilos más saludables de vida. Además, la investigación de nuevas estrategias terapéuticas para este tipo de patologías es un desafío para las próximas generaciones, no solo a nivel nacional, sino que también a nivel mundial.

## 1.2 Estructura del tejido cardiaco

El corazón es el principal órgano del sistema cardiovascular, bombea sangre hacia todo del cuerpo a través de los vasos sanguíneos. Esta función es vital porque, para

sobrevivir, los tejidos necesitan un suministro continuo de nutrientes y oxígeno, así como también la eliminación de los desechos metabólicos.

Desde el punto de vista celular, el corazón está constituido por diversos tipos celulares. Los cardiomiocitos constituyen un 25-35% del tejido cardíaco, y la composición de células no musculares representan el otro 65-75% del total<sup>[5]</sup>.

Las células no musculares incluyen fibroblastos, mastocitos, células endoteliales, células de musculatura lisa, adipocitos, glóbulos blancos y otras células inmunológicamente activas. Estas forman la mayoría de las células cardíacas, y aunque sus proporciones exactas siguen siendo tema de debate, sus funciones en la integración cardíaca estructural y funcional se han convertido en una de los mayores temas de investigación cardíaca<sup>[6]</sup>.

Estos componentes celulares del corazón interactúan a través de medios químicos, eléctricos y mecánicos para responder a estímulos de desarrollo, homeostáticos y patológicos. Durante la homeostasis, estas células, especialmente los fibroblastos, ayudan a mantener la forma y la función del tejido cardíaco a través de las interacciones directas célula-célula, así como a través de la secreción de una amplia variedad de factores de crecimiento<sup>[7]</sup>.

### **1.3 Fibroblastos cardiacos**

Los fibroblastos se describen comúnmente como células centinelas, esto debido a su ubicación, a la organización de una red de colágeno y a su capacidad para responder a una variedad de señales, incluidas las químicas y mecánicas. Los fibroblastos están dispersos por todo el cuerpo y generalmente se definen como células de origen mesenquimático que expresan y secretan múltiples componentes de la matriz extracelular (MEC)<sup>[7]</sup>.

El fibroblasto cardiaco (FC) es esencial para mantener la homeostasis del tejido cardiaco, además desempeña papeles críticos en el desarrollo y la remodelación cardiaca. Estas células tienen numerosas funciones, que incluyen la síntesis y degradación de proteínas de la MEC, la comunicación célula-célula (esencialmente con cardiomiocitos), la señalización célula-célula con otros fibroblastos, así como con las células endoteliales y la interacción con células del sistema inmune. En homeóstasis, esas comunicaciones son necesarias para promover un equilibrio saludable de la MEC, vital para una función cardiaca adecuada<sup>[8]</sup>. Además, los FC pueden secretar factores de crecimiento (TGF- $\beta$ , PDGF) y citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) y en circunstancias de daño pueden proliferar de forma excesiva y migrar a la zona de daño, para finalmente poder diferenciarse a un fenotipo especializado en reparación de tejidos como es el miofibroblasto.

Los fibroblastos, además de producir cantidades suficientes de proteínas de la MEC en condiciones fisiológicas, no poseen microfilamentos contráctiles o fibras de estrés; sin embargo, frente a un proceso de adaptación por causa de una agresión al tejido cardiaco, los fibroblastos se diferencian a miofibroblastos expresando la  $\alpha$ -actina del musculo liso ( $\alpha$ -SMA), los cuales aceleran la síntesis de numerosas proteínas de la MEC, tales como colágeno, fibronectina y laminina, comenzando de esta manera el proceso de reparación del tejido dañado<sup>[9]</sup>.

Los FC participan en la respuesta inflamatoria, ya que estos son capaces de responder a patrones asociados a daño (DAMP), como el heparán sulfato, y a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), como el lipopolisacárido (LPS). En el FC, algunos de los receptores que responden a PAMP son los receptores tipo Toll 4 (TLR-4). La activación de este receptor causa una respuesta inflamatoria a través de la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y p38. La activación de estas rutas comúnmente conduce a la transcripción de citoquinas

y quimioquinas proinflamatorias. Esto altera la función de las células cardíacas residentes promoviendo la expresión de moléculas de adhesión, entre otros mecanismos, pero también la infiltración de células inmunitarias en el foco inflamatorio posterior al daño tisular<sup>[8-10]</sup>.

## **1.4 Inflamación**

El cuerpo humano está constantemente expuesto a estímulos nocivos externos. Se han desarrollado múltiples mecanismos para detectarlos y responder a ellos con el fin de reparar y mantener la homeostasis. Cuando hay alguna infección o trauma en el tejido, la inflamación es la respuesta adaptativa a esos estímulos<sup>[11]</sup>.

La respuesta inflamatoria aguda se puede dividir en dos fases: la fase de iniciación y la fase de resolución. La fase de iniciación se caracteriza por el edema tisular resultante del aumento del flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular; procesos que están mediados, en parte, por mediadores lipídicos como leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos, entre otros productos vasoactivos como la histamina y bradiquinina. Posteriormente, los polimorfonucleares (PMN) migran al área dañada, atraídos por señales químicas exudadas que incluyen mediadores lipídicos proinflamatorios (Leucotrieno B4 [LTB4]) y quimioquinas. Los PMN atraviesan la vasculatura mediante interacciones precisas con receptores de adhesión endotelial, y posteriormente, engloban y degradan patógenos dentro de fagolisosomas<sup>[12]</sup>. Además, liberan proteínas quimioattractantes que promueven la migración de monocitos. Cuando este paso se completa, la inflamación se resuelve mediante la muerte apoptótica de los neutrófilos que son fagocitados por macrófagos. Los macrófagos secretan citoquinas antiinflamatorias tales como la interleuquina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) para inhibir la inflamación. Los macrófagos también liberan

mediadores pro-resolutivos especializados como las lipoxinas (LX), resolvinas (Rv), protectinas (PD) y maresinas (MaR) necesarios para resolver la inflamación e inducir la cicatrización. Estos mediadores estimulan las células mesenquimales para iniciar la cicatrización. En la etapa proliferativa, los fibroblastos y células vasculares migran al sitio lesionado para cicatrizar el daño. Los fibroblastos se transforman en miofibroblastos que producen proteínas ECM y generan la cicatriz<sup>[13]</sup>.

Si bien, la respuesta inflamatoria aguda es protectora y permite la eliminación de los organismos invasores y la reparación de los tejidos dañados, esta debe ser autolimitada; debido a que una respuesta excesiva y descontrolada es un componente unificador en muchas enfermedades crónicas, incluidas las enfermedades vasculares, el síndrome metabólico, las enfermedades neurológicas y muchas otras, y por lo tanto un importante problema de salud<sup>[14]</sup>.

### **1.5 Receptores de tipo Toll (TLR)**

La respuesta a un daño cardíaco es mediada principalmente por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), presentes en células del sistema inmune innato, como las plaquetas y leucocitos. Dentro de la familia de PRR, están los receptores tipo Toll (TLR)<sup>[8]</sup>.

Los TLR reconocen PAMP y moléculas endógenas derivadas por el daño tisular o DAMP<sup>[15]</sup>.

A la fecha, se han reconocido diez tipos de TLR en humanos. TLR 1, 2, 4, 5, 6 y 10 se localizan en la membrana celular y detectan principalmente PAMP bacterianos, mientras que TLR 3, 7, 8 y 9 se localizan en endosomas o lisosomas, y principalmente detectan PAMP virales<sup>[16]</sup>.

Se ha demostrado que los FC expresan el TLR-4, y que al ser activado secreta una amplia variedad de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión<sup>[17]</sup>.

Uno de los ligandos más estudiado para el TLR-4 es el LPS, un componente de membranas celulares bacterias Gram-negativas. LPS está constituido por un glucolípido denominado lípido A, responsable de las interacciones de la molécula con TLR4, el oligosacárido central y el polisacárido O-antígeno. Los grupos fosfato y las cadenas de acilo de LPS son importantes para las interacciones con TLR4, y las alteraciones en estos pueden cambiar la molécula de ser un agonista a un antagonista<sup>[18]</sup>.

Luego de la interacción entre LPS y TLR-4, se desencadena la respuesta proinflamatoria mediante diversas vías de señalización, de las cuales se regulan funciones celulares como la síntesis de proteínas, crecimiento y supervivencia celular, entre otras.

Los ligandos de TLR-4 pueden activar la vía de señalización de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/Akt. La activación de esta vía de supervivencia conduce a la activación de genes protectores y antiapoptóticos. PI3K al activarse 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<sup>[19]</sup>.

También la activación de MAPK está implicada en respuestas mediadas por TLR-4. Las MAPK incluyen una gama de proteínas que incluyen la quinasa regulada por señal extracelular (ERK) 1 y 2, la quinasa N-terminal c-Jun (JNK) 1 y 2; y la p38. ERK1/2, que generalmente es una vía de supervivencia, permite la activación de genes protectores y anti-apoptóticos, mediante un mecanismo que involucra Raf/MEK/ERK. Esta vía fosforila Bad, lo que resulta en su inactividad. Este proceso permite a BCL2 formar homodímeros y procesar una respuesta antiapoptótica<sup>[18-19]</sup>.

Dentro de la cascada de reacción, está la vía del Factor Nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Esta vía es el principal regulador de la inmunidad innata y adaptativa; proliferación y muerte celular. Al fosforilar la quinasa activadora de  $\kappa$ B conduce a la degradación de  $\kappa$ B. Esto permite la liberación de NF- $\kappa$ B, logrando translocarse al núcleo y potenciar la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, entre otras), quimioquinas (MCP-1, IL-8, IL-10) y moléculas de adhesión (E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1)<sup>[20-21]</sup>.

### **1.6 Adhesión celular**

En la inflamación cardíaca, las células residentes y leucocitos infiltrados secretan citoquinas, las cuales son las responsables de activar la transcripción de las moléculas de adhesión celular (CAM), los cuales median la adhesión y posterior extravasación y migración de leucocitos a lo largo de la superficie endotelial. El bajo nivel constitutivo de las CAM está regulado positivamente tras la estimulación de los receptores de reconocimiento de patrón endotelial, incluidos los TLR o los receptores de citoquinas tales como el receptor 1 del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )<sup>[22-23]</sup>.

Se han identificado cinco familias de CAM, que incluyen cadherinas, integrinas, la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF), selectinas y CD44. La molécula de adhesión celular intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), son dos miembros de la IgSF y tienen implicaciones críticas en el reclutamiento y la infiltración de células inflamatorias en el sitio de la lesión. Ambas proteínas se expresan en la superficie de varios tipos de células como en leucocitos, células endoteliales y fibroblastos<sup>[24]</sup>.

La estructura del gen ICAM-1 y de VCAM-1 se rige principalmente por las vías de señalización NF- $\kappa$ B y Janus quinasas (JAK) y sus factores de transcripciones posteriores, denominadas STAT (transductores de señal y activadores de la

transcripción). En específico, la región promotora ICAM-1 también contiene muchos sitios AP-1 para su expresión, a través de rutas MAPK, siendo ERK, JNK y la quinasa p38 importantes para la expresión de ICAM-1 en células endoteliales<sup>[25-26]</sup>.

ICAM-1 interactúa con leucocitos a través de la porción  $\beta 2$  de las integrinas, como LFA-1 y MAC-1, mientras que los ligandos de VCAM-1 son las integrinas  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 4$  y  $\alpha 4\beta 7$ <sup>[25-27]</sup>.

### **1.7 Resolución de la inflamación**

Ahora se reconoce ampliamente que la resolución de la inflamación es un proceso dinámico, programado y autolimitado cuya regulación se logra mediante varios mecanismos fisiológicos que actúan tanto a nivel sistémico como local, proporcionando control sobre las acciones reguladoras específicas de tejido necesarias para limitar la lesión inflamatoria y restaurar la homeostasis<sup>[28]</sup>. Esto mediante mecanismos de acción basados en agonistas endógenos antiinflamatorios y/o pro-resolutivos, denominados mediadores pro-resolutivos especializados (SPM).

Los SPM derivan de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (PUFA n-3), el ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexanoico (DHA). El proceso por el cual los PUFA n-3 impactan en el proceso inflamatoria comienza en la incorporación de EPA y DHA en las membranas celulares, donde se pueden convertir en una amplia variedad de mediadores lipídicos bioactivos, los cuales aumentan la fagocitosis de células apoptóticas, disminuyen la expresión de citoquinas proinflamatorias y aumentan la producción de citoquinas antiinflamatorias<sup>[29-30]</sup>, esto permite conducir al término de la inflamación. Los mediadores lipídicos están compuestos por cuatro familias incluyendo lipoxinas (LX), resolvinas (Rv), maresinas (MaR) y protectinas (PD), las cuales poseen

potentes funciones antiinflamatorias, protectoras de tejidos y de estimulación de la resolución.

### **1.8 Resolvinas D1 y E1**

Las Rv, como la D1 y la E1, representan una familia de mediadores proresolutivos de la inflamación que se biosintetizan a partir del PUFA n-3, más específicamente del DHA y EPA, después de varias transformaciones enzimáticas secuenciales. Las Rv se aislaron originalmente desde exudados formados en la fase de resolución, en un modelo de inflamación aguda en roedores<sup>[31]</sup>.

La RvD1 se sintetiza fisiológicamente por conversión enzimática de DHA por la 15-lipoxigenasa (15-LOX) y 5-lipoxigenasa (5-LOX). Su producción se ha observado previamente en varios tipos de células y tejidos, incluyendo leucocitos PMN, células epiteliales y endoteliales, neutrófilos, células vasculares, sangre completa y en el cerebro. Además, la producción de RvD1 se ve reforzada por los tratamientos con aspirina. De hecho, se ha informado que la aspirina genera 17R-HDHA a través de la acetilación de ciclooxigenasa-2 (COX-2), que después de la oxigenación secuencial por 5-LOX, da como resultado la producción de 17-epi-RvD1. Este último se conoce como RvD1 desencadenado por aspirina (AT-RvD1)<sup>[32]</sup>. Por otro lado, la biosíntesis de RvE1 requiere varias enzimas, tales como COX-2 o el citocromo P450, y 5-LOX. Particularmente, la aspirina inicia la ruta biosintética mediante la acetilación de COX-2, lo que puede explicar en parte los mecanismos subyacentes a los efectos beneficiosos de la dosis baja de aspirina en las enfermedades crónicas asociadas a la inflamación. Es importante señalar que el consumo de DHA y EPA no necesariamente conducirá a la metabolización automática de Rv en condiciones normales, esto es porque las enzimas biosintéticas tienen bajos niveles de expresión en la mayoría de los tejidos en estados

normales. Estas enzimas son fuertemente inducidas por la inflamación aguda. Por ejemplo, COX-2 y LOX-15 son inducidos en el sitio de la inflamación periférica<sup>[31]</sup>.

Se han sido identificado dos receptores acoplados a proteína G (GPCR) para RvD1, ALX/FPR2 y GPR32. El primero es el receptor de la lipoxina A4, mientras que GPR32 es un receptor huérfano, ambas identificadas en fagocitos humanos. La unión de RvD1 a estos receptores desencadena acciones dependientes de ALX/FPR2 y GPR32 como el estimular la fagocitosis de macrófagos y de leucocitos apoptóticos<sup>[33]</sup>. Además, en un estudio donde se sobreexpresó ALX/FPR2 o GPR32 en macrófagos humanos, se vio que la unión de RvD1 dio como resultado una mayor potenciación de la eferocitosis, mientras que la disminución de ambos receptores determinó una baja en la respuesta fagocítica estimulada por RvD1<sup>[34]</sup>.

En literatura, se describe un efecto variado en como RvD1 interactúa con las vías de señalización. Existe evidencia en tejido hepático, donde RvD1 no afectó a la activación de Akt, ERK y NF- $\kappa$ B<sup>[35]</sup>; mientras que en macrófagos de ratón, RvD1 presentó una tendencia a disminuir la actividad de NF- $\kappa$ B<sup>[36]</sup>. Por último, RvD1 activa ERK1/2 en células conjuntivas caliciformes<sup>[37]</sup>. Por lo tanto, es necesario estudiar los efectos que presenta RvD1 sobre las vías Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B en FC.

La RvE1 interactúa específicamente con ChemR23, un GPCR. La interacción RvE1-ChemR23 también estimula la fagocitosis en los macrófagos, esto mediante la fosforilación de vías de señalización, incluida la proteína ribosómica S6, un objetivo posterior de la vía de señalización PI3K/Akt y la vía Raf/ERK<sup>[33]</sup>. Por otra parte, la RvE1 interactúa directamente con el receptor de leucotrieno B4 (BLT1), bloqueando la unión de leucotrieno B4. Al unirse RvE1 a este receptor inhibe la movilización de calcio, permite la activación de NF- $\kappa$ B *in vitro* y la infiltración de PMN *in vivo*. Además, promueve la apoptosis de PMN para, posteriormente, ser eliminados por macrófagos<sup>[33-38]</sup>.

Sin embargo, en osteoclastos se ha visto que RvE1 disminuye la translocación de NF- $\kappa$ B y atenúa significativamente la fosforilación de Akt<sup>[39]</sup>. Por otro lado, RvE1 indujo la activación de ERK1/2 y Akt en fibroblastos de riñón<sup>[40]</sup>. Debido a esto, se debe investigar en como interactúa RvE1 sobre las vías de señalización Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B en FC.

Las Rv actúan como agonistas en varias células blanco, actúan tanto en PMN como en macrófagos; y con ello, pueden estimular la resolución, mostrando variadas acciones en diferentes modelos de enfermedades inflamatorias.

En un modelo animal de peritonitis, se observó que RvD1 inhibe el reclutamiento de neutrófilos y reduce LTB<sub>4</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub> en exudados peritoneales<sup>[34]</sup>. Además, RvD1 reduce la infiltración de leucocitos y reduce los niveles de citoquinas en un modelo de lesión pulmonar aguda inducida por humo de cigarrillo en las vías respiratorias de los ratones. También promueve la diferenciación hacia macrófagos tipo M2 y la eferocitosis *in vivo*. En la uveítis en ratas, la inyección de RvD1 redujo de forma significativa el trastorno ocular inducido por LPS y los PMN, los linfocitos T, así como las citoquinas dentro del ojo<sup>[33-41]</sup>.

Por otro lado, la RvE1 reduce significativamente el tamaño de las lesiones de la córnea y la angiogénesis, así como la infiltración de células T y PMN en un modelo de inflamación inducida por virus del herpes simple. En pacientes con periodontitis agresiva, los macrófagos muestran una fagocitosis reducida, la cual mejora con el tratamiento de RvE1. En modelos murinos de colitis, el tratamiento sistémico de RvE1 reduce la infiltración de PMN, así como la disminución de citoquinas proinflamatorias<sup>[33-41]</sup>. Además, RvE1 disminuye la infiltración de neutrófilos pulmonares y reduce las citoquinas proinflamatorias después de una lesión pulmonar inducida por ácido e infección por *Escherichia coli*. Un análogo de RvE1 mejoró significativamente los signos y síntomas en un ensayo clínico de fase 2 en pacientes con síndrome de ojo seco. Esta es la primera demostración de eficacia clínica para una nueva línea de tratamiento en base a Rv<sup>[33-34]</sup>.

Estas investigaciones muestran a las Rv como posibles líneas terapéuticas para enfermedades inflamatorias, además de la versatilidad de estas al extenderse a diversos tejidos y/o patologías. Hasta la fecha se desconoce si las Rv son capaces de disminuir las moléculas de adhesión expresadas en una respuesta inflamatoria, ICAM-1 y VCAM-1; además se desconoce las vías de señalización que son activadas río abajo por las Rv en FC.

Los antecedentes anteriormente expuestos indican que: a) los FC participan en la respuesta inflamatoria, b) la inflamación es necesaria para el proceso reparativo después de un daño tisular, y c) las Rv disminuyen la respuesta inflamatoria. Sin embargo, hasta la fecha, desconocemos si las Rv pueden modular la respuesta inflamatoria en los FC. Estos antecedentes nos llevan a proponer la siguiente hipótesis:

## **2. HIPÓTESIS**

En fibroblastos cardíacos, la Resolvina D1 y la Resolvina E1 inhiben las vías de señalización AKT, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B activadas por LPS y, consecuentemente, reducen la expresión de ICAM-1 y VCAM-1.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Demostrar que las RvD1 y RvE1 inhiben las vías de señalización activadas por LPS y, en consecuencia, reducir la expresión de ICAM-1 y VCAM-1.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Demostrar que LPS activa las vías de señalización AKT, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B.
- ❖ Demostrar sí las RvD1 y RvE1 activan las vías transduccionales AKT, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B.
- ❖ Demostrar sí las RvD1 y RvE1 inhiben las vías de señalización activadas por LPS (AKT, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B).
- ❖ Demostrar que las RvD1 y RvE1 disminuyen la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducida 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, EE.UU.). Anticuerpo primario anti VCAM-1 fue comprado en Abcam (Cambridge, MA). Anticuerpo primero anti p-Akt, anti p-P44/42 MAPK (ERK1/2), anti p-NF- $\kappa$ B, anti P44/42 MAPK (ERK1/2), anti NF- $\kappa$ B, anti GAPDH y anticuerpo secundario anti-rabbit IgG fueron obtenidos en Cell Signaling Technology Inc. (MA, EE.UU.). Bradford Reagent fue adquirido en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). LPS-EB Ultrapure (E. coli O111:B4), fue comprado en InvivoGen (San Diego, CA). RvD1 y RvE1 (CAS 872993-05- 0) fue comprado a Cayman Chemical Company (MI, EE.UU.). Colagenasa tipo II (CAS 9001-12-1) y Trypan Blue (CAS 15250-061) fueron comprados a Life Technologies Corporation (CA, EE.UU.).

### **5.2 Modelo animal**

Ratas Sprague-Dawley macho adultas 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 adultos**

Se utilizó el procedimiento descrito por procedimientos ya establecidos en el laboratorio. Brevemente, las ratas se les inyectó 1µL/g peso corporal de solución ketamina:xilacina (2:1) intraperitonealmente y dejadas en lugar cerrado hasta que pierdan movilidad. Una vez la rata perdió los reflejos y estuvo bajo los efectos de la anestesia, se procedió con la intervención quirúrgica. Una vez removido el corazón se colocó en placa de 100 mm que contiene medio Gerard: NaCl (128 mM), KCl (4 mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,19 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,01 mM), MgSO<sub>4</sub> (1,39 mM), HEPES (10 mM), glucosa (5,5 mM) y piruvato de sodio (2 mM); pH 7.4). Posteriormente, el corazón se sometió a digestión enzimática con colagenasa II. La solución obtenida fue centrifugada a 500 rpm por 1 minuto, el sobrenadante, que contiene principalmente fibroblastos, fue centrifugado a 1000 rpm durante 10 minutos; luego, el pellet obtenido fue re-suspendido en medio DMEM F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y fue sembrado en placa de cultivos de 100 mm, dejando proliferar a los FC hasta confluencia en condiciones convencionales de cultivo (5% de CO<sub>2</sub> 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 400.000 células/cm<sup>3</sup> en medio DMEM-F12 enriquecido con 10% FBS (pasaje 1).

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

### **5.5 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 p-Akt, p-ERK1/2, p-NF- $\kappa$ B, VCAM-1 e ICAM-1 se cargaron 30  $\mu$ g de extracto proteico. Los geles concentrador (3,78 mL de upper buffer 4x [Tris base 30 g, HCl pH 6.8; 20 mL SDS 10%, 500 mL agua destilada] + 1,98 mL A/BA [145 g Acrilamida + 5 g bis - Acrilamida, 500 mL agua destilada] + 150  $\mu$ L APS 10% + 30  $\mu$ L TEMED + 9,24 mL de agua destilada para dos geles) y separador (5 mL de lower buffer 4x [Tris base 90 g, HCl pH 8.8, 20 mL SDS 10% + 500 mL de agua destilada] + 6 mL A/BA [145 g Acrilamida + 5 g bis - Acrilamida, 500 mL agua destilada] + 150  $\mu$ L APS 10% + 30  $\mu$ L TEMED + 9 mL de agua destilada para 2 geles) fueron al 5% y 10% respectivamente. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 Volt en tampón de electroforesis 1x (Tris base 30,25 g, Glicina 144 g, SDS 10 g, agua 1000 mL para tampón de electroforesis) durante aproximadamente 100 minutos.

### **5.6 Electrotransferencia de proteínas**

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) de 0,2  $\mu$ m 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.

## **5.7 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, 1:1000 para anti p-NF- $\kappa$ B, 1:1000 para anti p-ERK1/2, 1:1000 para anti p-Akt, 1:5000 para anti GAPDH 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 en C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR Biosciences). Las imágenes obtenidas fueron sometidas a densitometría con ayuda del programa computacional ImageJ.

## **5.8 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  $p < 0.05$ .

## **5.9. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **5.9.1 Objetivo 1**

Para determinar la activación de las vías de señalización p-Akt, p-ERK1/2 y p-NF-κB estimuladas por LPS, los fibroblastos cardiacos en pasaje 1 se mantuvieron en medio DMEM-F12 por 24 horas y se estimularon con LPS 1µg/mL durante 10, 20, 30, 60 y 120 minutos. Posteriormente, se lisaron con tampón de lisis.

### **5.9.2 Objetivo 2**

Para determinar si RvD1 o RvE1 activan las vías de señalización p-Akt, p-ERK1/2 y p-NF-κB, los fibroblastos cardiacos en pasaje 1 se mantuvieron en medio DMEM-F12 por 24 horas y se estimularon con RvD1 o RvE1 100 nM durante 10, 20, 30, 60 y 120 minutos. Posteriormente, se lisaron con tampón de lisis.

### **5.9.3 Objetivo 3**

Para determinar si RvD1 y RvE1 inhiben las vías de señalización p-Akt, p-ERK1/2 y p-NF-κB estimuladas por LPS, los fibroblastos cardiacos en pasaje 1 se mantuvieron en medio DMEM-F12 por 24 horas fueron pre-incubados con RvD1/RvE1 100 nM durante 30 minutos, para luego ser estimulados por LPS 1µg/ml por otros 30 minutos. Posteriormente, se lisaron con tampón de lisis.

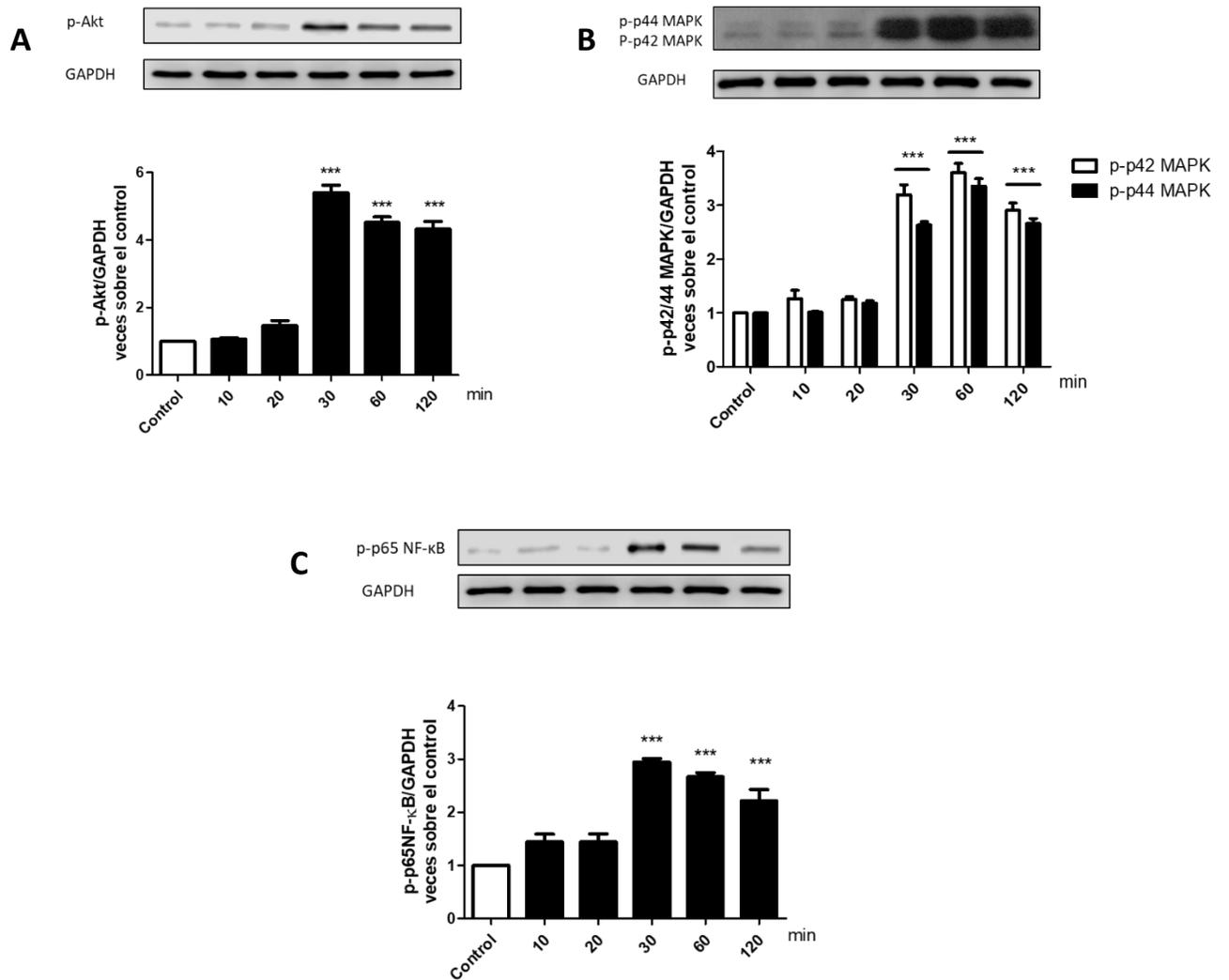
### **5.9.4 Objetivo 4**

Para determinar si RvD1/RvE1 disminuyen la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidas por LPS, los fibroblastos cardiacos en pasaje 1 se mantuvieron en medio DMEM-F12 por 24 horas fueron pre-incubados con RvD1/RvE1 100 nM durante 30 minutos, para luego ser estimulados por LPS 1µg/ml por 24 horas. Posteriormente, se lisaron con tampón de lisis.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Activación de las vías Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B por LPS en fibroblastos cardiacos.

Por resultados anteriores de laboratorio, sabemos que el receptor para LPS, TLR4, está presente en FC. Sin embargo, se debe determinar las vías de señalización activadas por LPS en FC. En la **Figura 1**, se puede observar que LPS 1 $\mu$ g/mL induce el aumento de la fosforilación, respecto al tiempo de la proteína Akt (**Figura 1 A**), teniendo un máximo a los 30 min, fosforilación que se conserva significativamente aumentada a los 60 y 120 min respecto del control. De la misma forma, ERK1/2 es fosforilada de manera significativa respecto al control a los 30 min, condición que se mantiene hasta, por lo menos, los 120 min (**Figura 1 B**); mientras que NF- $\kappa$ B alcanza un peak a los 30 min y se sostiene hasta los 120 min (**Figura 1 C**), también de una manera significativa respecto al control.

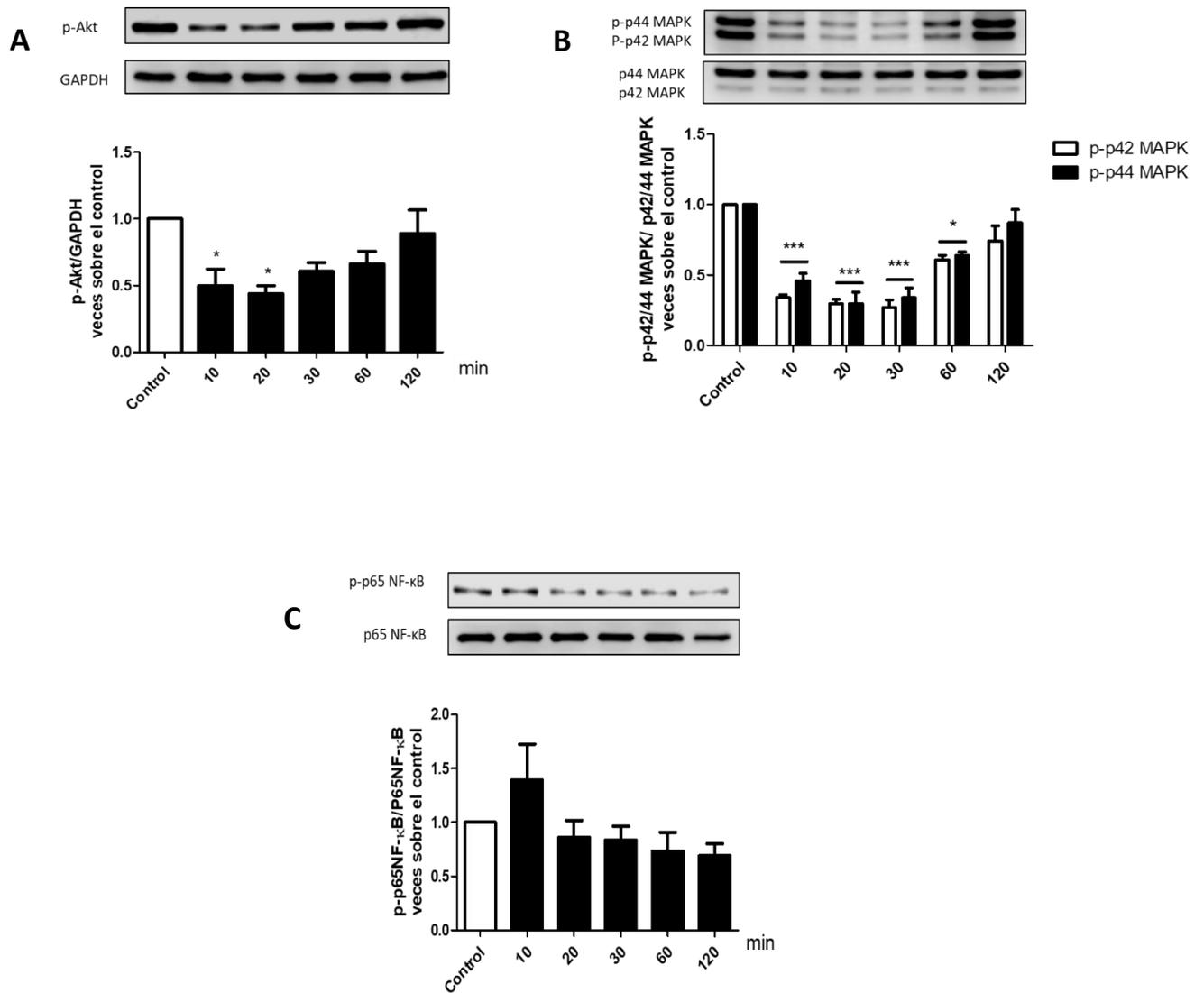


**Figura 1. LPS activa las vías de señalización Akt, ERK1/2, y NF-κB en FC.** Los FC fueron estimulados por LPS 1μg/ml por 10, 20, 30, 60 y 120 minutos. Imagen representativa de la densitometría de p-Akt (A), p-ERK 1/2 (B) y p-NF-κB (C). Como control de carga se utilizó GAPDH. \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05 vs control. Los resultados se expresan como promedio ± SEM. (n=3)

## **6.2 Evaluación del efecto de RvD1 sobre la activación de Akt, ERK1/2 y NF-κB en fibroblastos cardiacos.**

En base a literatura, sabemos que la RvD1, en diferentes modelos celulares, posee efectos antiinflamatorias y pro-resolutivos. Sin embargo, no existe ninguna evidencia del efecto que tendría en FC, y menos aún el efecto de este mediador lipídico sobre la vía de señalización activada por LPS: Akt, ERK1/2 y NF-κB

Los resultados fueron analizados por WB, e indicaron que la RvD (100nM) tiene una clara tendencia a disminuir la fosforilación basal de Akt (**Figura 2 A**), siendo esta estadísticamente significativa a tiempos tempranos, 10 y 20 min, para posteriormente aumentar de manera progresiva hasta alcanzar los niveles basales de la proteína respecto de la condición control. La fosforilación de ERK1/2 se ve disminuida (**Figura 2 B**), presentando la mayor inhibición a los 20 y 30 min de una manera estadísticamente significativa respecto de la condición control, y de la misma forma que la proteína anterior, esta recupera sus niveles normales a los 120 min de estimulación. Por otro lado, NF-κB no presenta diferencias estadísticamente significativas respecto de la condición control (**Figura 2 C**).

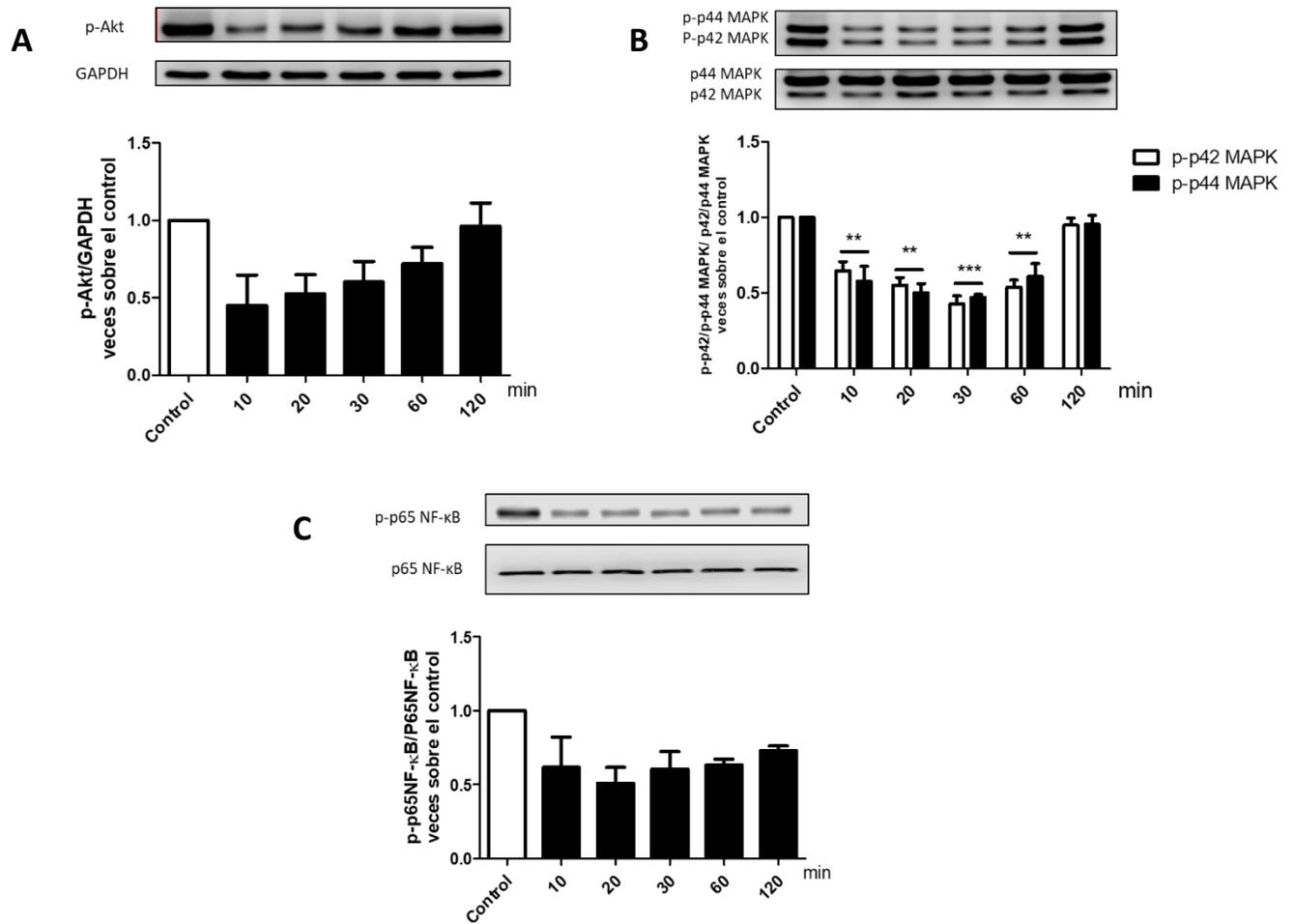


**Figura 2. Efecto de RvD1 sobre Akt, ERK1/2, y NF-κB en FC.** Los FC fueron estimulados por RvD1 100 nM por 10, 20, 30, 60 y 120 minutos. Imagen representativa de la densitometría de p-Akt (A), p-ERK 1/2 (B) y p-NF-κB (C). Se cuantificó la relación, pAkt/GAPDH, pERK/ERK total y pNF-κB/NF-κB total normalizado como veces sobre el control. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  vs control. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. (n=3)

### **6.3 Evaluación del efecto de RvE1 sobre la activación de Akt, ERK1/2 y NF-κB en fibroblastos cardiacos.**

Bajo la misma lógica, se debe determinar si la RvE1, por si sola, es capaz de modular las vías de señalización Akt, ERK1/2 y NF-κB en FC, ya que, a pesar de ser molecularmente similares, presentan receptores distintos, por lo cual, el efecto sobre la vía activada por LPS puede variar.

En la **Figura 3** podemos observar que RvE1 tiene una marcada tendencia a disminuir la fosforilación de Akt (**Figura 3 A**), presentando una mayor inhibición a tiempos tempranos, la cual vuelve a los valores del control gradualmente con el tiempo. Para ERK1/2 (**Figura 3 B**), RvE1 disminuyó significativamente la fosforilación de esta, alcanzando una máxima inhibición a los 30 min, posteriormente alcanza los niveles basales a los 120 min. Por último, RvE1 gatilla la inhibición de la fosforilación de NF-κB (**Figura 3 C**), existiendo una tendencia a mantenerla por debajo de los niveles del control hasta los 120 min de estímulo.

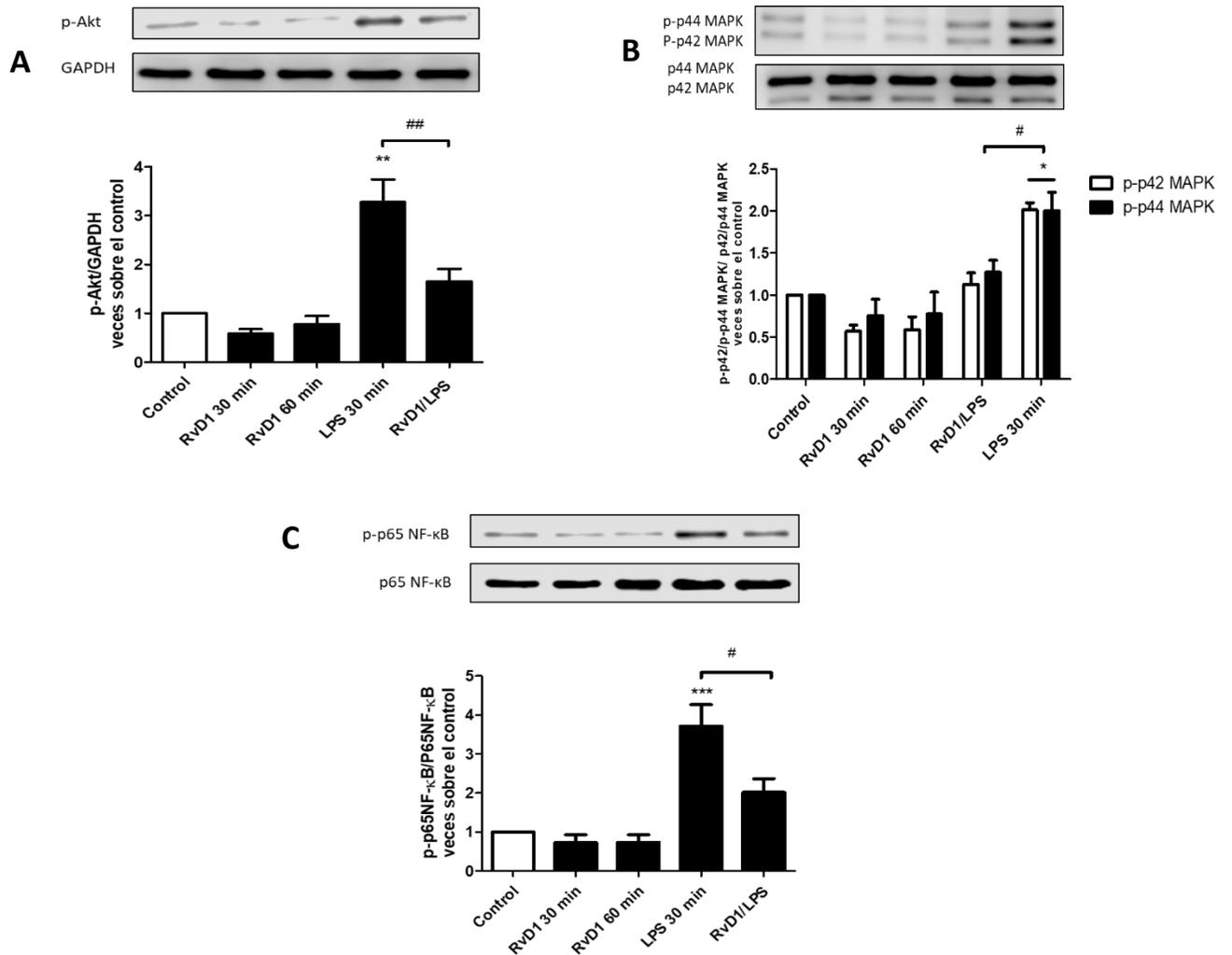


**Figura 3. Efecto de RvE1 sobre Akt, ERK1/2, y NF-κB en FC.** Los FC fueron estimulados por RvE1 100 nM por 10, 20, 30, 60 y 120 minutos. Imagen representativa de la densitometría de p-Akt (A), p-ERK 1/2 (B) y p-NF-κB (C). Se cuantificó la relación, pAkt/GAPDH, pERK/ERK total y pNF-κB/NF-κB total normalizado como veces sobre el control. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  vs control. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. (n=3)

#### **6.4 Evaluación del efecto de RvD1 sobre la activación de Akt, ERK1/2, y NF- $\kappa$ B gatillada por LPS en fibroblastos cardiacos.**

Como se observó en la **Figura 1**, LPS activa las vías de señalización ya mencionadas a los 30 min de manera significativa respecto al control, por lo que se utilizó este tiempo para evaluar el bloqueo de esta activación con RvD1. Además, sabemos por la **Figura 2** que, esta Rv tiende a disminuir por si sola la activación de Akt, ERK1/2, y NF- $\kappa$ B, pero no se sabe si es capaz de inhibir la fosforilación frente a un estímulo proinflamatorio como es el LPS. Además, para asegurar la uniformidad y consecuencia de los resultados, es que se tomarán tiempos de 30 y 60 min de estimulación con RvD1.

Como se puede observar en la **Figura 4**, LPS aumenta de manera estadísticamente significativa la fosforilación de Akt (**Figura 4 A**); se muestra que RvD1 es capaz de disminuir significativamente los niveles de Akt activados por LPS; mientras que RvD1 a 30 y 60 min presentaron una menor activación de la proteína. Para ERK1/2 (**Figura 4 B**), LPS activa una fosforilación significativa respecto al control, pero cuando se pretrata con RvD1 media hora antes, esta fosforilación es prevenida de manera significativa respecto a la respuesta de LPS. Por último, se observa que los FC al ser estimulados con LPS aumentan significativamente la activación de NF- $\kappa$ B (**Figura 4 C**), pero al ser pretratadas con RvD1 este aumento es impedido, siendo esta disminución significativa respecto a LPS. RvD1 a 30 y 60 min no presenta diferencia respecto al control.

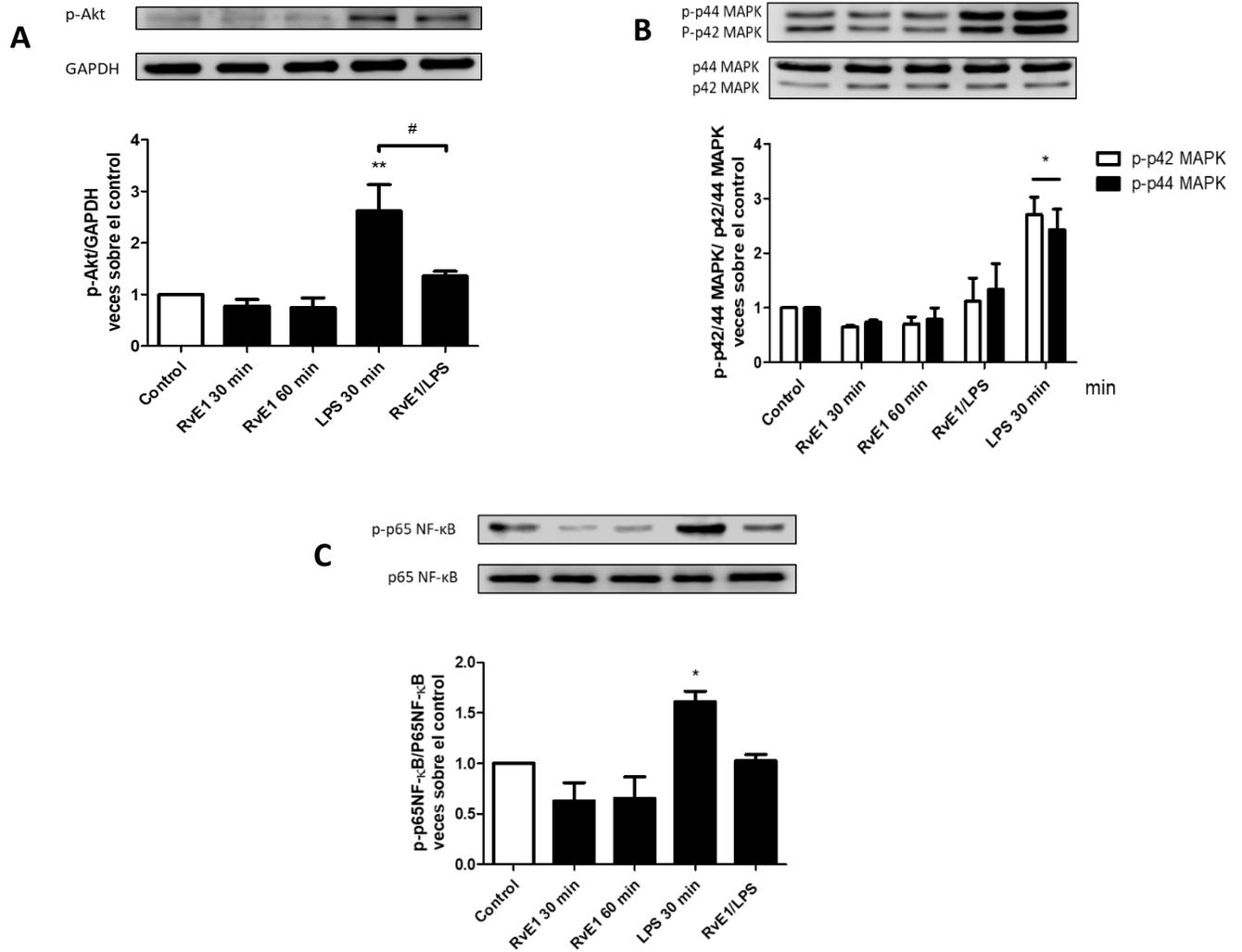


**Figura 4. RvD1 previene la activación de Akt, ERK1/2, y NF-κB gatillada por LPS en FC.** Los FC fueron estimulados por RvD1 100 nM por 30 y 60 minutos, LPS 1μg/ml por 60 minutos y un pretratamiento de RvD1 100 nM durante 30 min, para posteriormente agregar LPS por 30 minutos. Imagen representativa de la densitometría de p-Akt (A), p-ERK 1/2 (B) y p-NF-κB (C). Se cuantificó la relación, pAkt/GAPDH, pERK/ERK total y pNF-κB/NF-κB total normalizado como veces sobre el control. #p<0,05; ##p<0,01 vs RvD1/LPS; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs control. Los resultados se expresan como promedio ± SEM. (n=3)

## **6.5 Evaluación del efecto de RvE1 sobre la activación de Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B gatillada por LPS en fibroblastos cardiacos.**

Al igual que en el punto anterior, se debe evaluar el efecto que tiene RvE1 sobre un estímulo inflamatorio, como LPS. Los resultados muestran que LPS tiene una marcada respuesta sobre la activación de Akt (**Figura 5 A**), mientras que RvE1 a 30 y 60 min tiende a tener una menor fosforilación. No obstante, RvE1 previno el aumento de la fosforilación de Akt inducida por LPS, observándose una disminución significativa.

En el caso de ERK1/2 (**Figura 5 B**), se puede apreciar que LPS induce un aumento significativo en la fosforilación de ERK1/2; para los FC pretratados con RvE1 y luego con LPS, se observa una tendencia a la disminución de la fosforilación de ERK1/2. De la misma forma se ve que NF- $\kappa$ B (**Figura 5 C**), es activada de manera significativa con LPS, pero en el caso del pretratamiento con RvE1 se ve una tendencia a disminuirla.



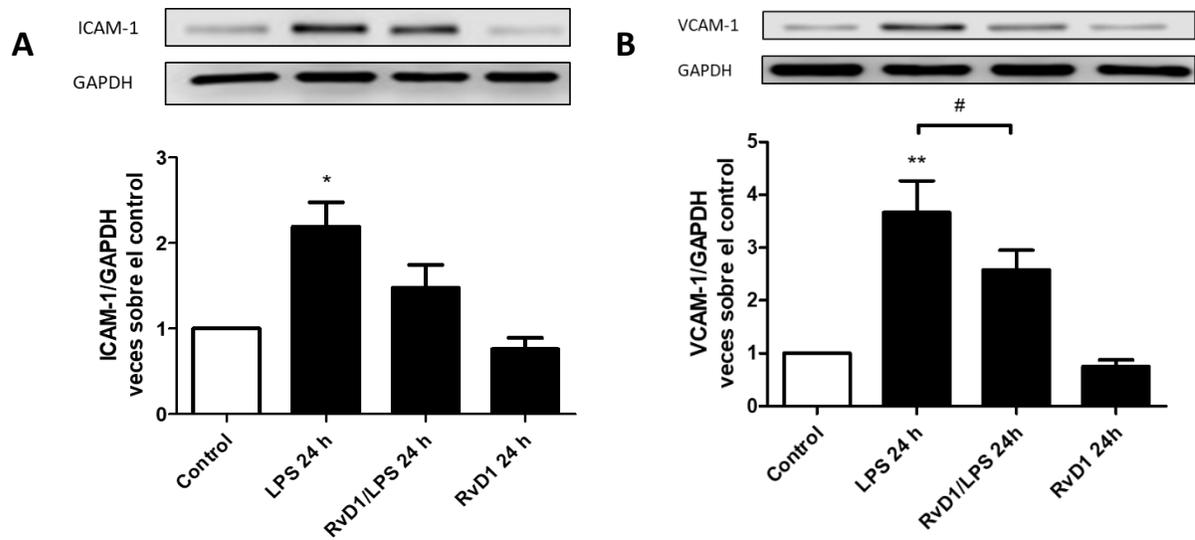
**Figura 5. RvE1 previene la activación Akt, ERK1/2, y NF-κB gatillada por LPS en FC.** Los FC fueron estimulados por RvE1 100 nM por 30 y 60 minutos, LPS 1μg/ml por 60 minutos y un pretratamiento de RvE1 100 nM durante 30 min, para posteriormente agregar LPS por 30 minutos. Imagen representativa de la densitometría de p-Akt (A), p-ERK 1/2 (B) y p-NF-κB (C). Se cuantificó la relación, pAkt/GAPDH, pERK/ERK total y pNF-κB/NF-κB total normalizado como veces sobre el control. #p<0,05 RvE1/LPS; \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs control. Los resultados se expresan como promedio ± SEM. (n=3)

## **6.6 Evaluación del efecto de RvD1 sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por LPS en FC.**

Por resultados de laboratorio, sabemos que RvD1 por si sola no es capaz de alterar los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1. Además, LPS aumenta los niveles de ambas proteínas de adhesión con un efecto máximo a las 24 horas, por lo que se utilizó este tiempo para evaluar el efecto antiinflamatorio de RvD1.

En la **Figura 6 A**, se puede observar que LPS aumenta significativamente los niveles de ICAM-1, mientras que RvD1, por si sola, no muestra efecto sobre la expresión de esta proteína. No obstante, RvD1 tiende a prevenir el aumento de expresión de ICAM-1 inducida por LPS.

En el caso de VCAM-1 (**Figura 6 B**), se aprecia un aumento significativo en la expresión de VCAM-1 al estimular los FC con LPS, mientras que RvD1 prácticamente no altera los niveles de la proteína. Sin embargo, los FC al ser pretratados una hora antes con RvD1 100 nM, previno el aumento de expresión de VCAM-1 inducida por LPS, observándose una disminución significativa respecto a LPS.

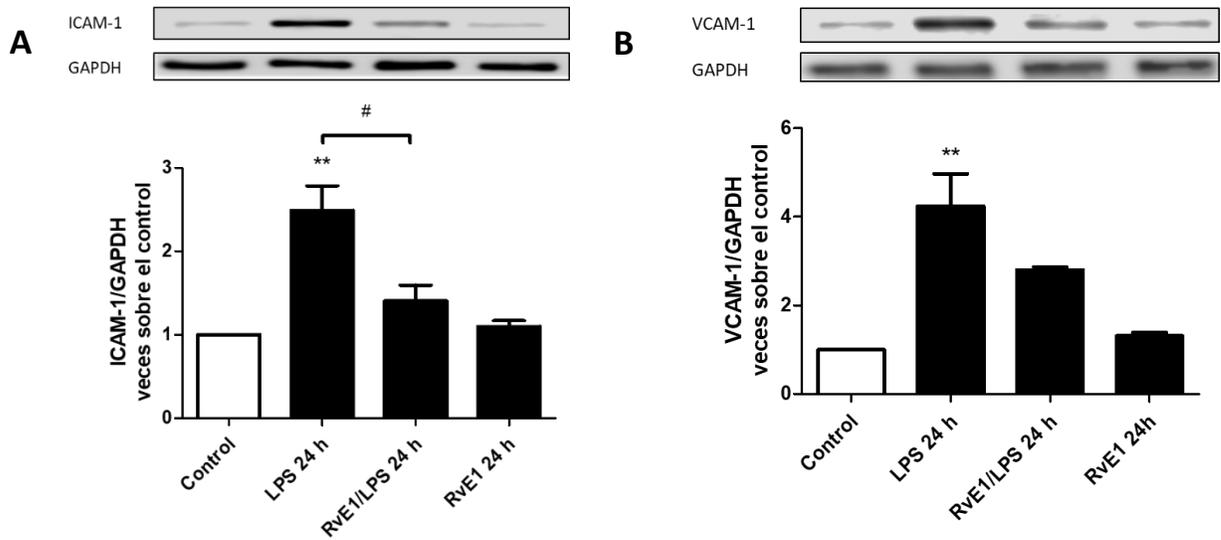


**Figura 6. RvD1 disminuye los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por LPS en FC.** Los FC fueron estimulados por RvD1 100 nM durante 24 horas; LPS 1 µg/ml por 24 horas y un pretratamiento de RvD1 100 nM durante 1 hora, para posteriormente agregar LPS por 24 horas. Imagen representativa de la densitometría de ICAM-1 (A) y VCAM-1 (B). Se cuantificó la relación, ICAM-1/GAPDH y VCAM-1/GAPDH normalizado como veces sobre el control. #p<0,05 vs RvD1/LPS; \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs control. Los resultados se expresan como promedio ± SEM. (n=3)

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

De la misma forma, se debe evaluar el efecto que tiene RvE1 sobre las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 frente a un estímulo proinflamatorio como el LPS. Se debe tomar en cuenta que, por resultados de laboratorio, RvE1 no altera los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 a diferentes tiempos. Además, que LPS posee un efecto máximo sobre ambas proteínas de adhesión a las 24 horas.

Como se puede observar en la **Figura 7**, LPS tiene un marcado aumento sobre los niveles de expresión de ICAM-1 (**Figura 7 A**) y VCAM-1 (**Figura 7 B**); mientras que RvE1 no altera la los niveles de ambas proteínas adhesión en FC. Sin embargo, se puede apreciar que RvE1 disminuye la expresión de ICAM-1 inducidos por LPS, la cual es significativa respecto a LPS. En el caso de VCAM-1, los resultados muestran que RvE1 tiende a disminuir los niveles de expresión de VCAM-1 gatillados por LPS.



**Figura 7. RvE1 disminuye los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por LPS en FC.** Los FC fueron estimulados por RvE1 100 nM durante 24 horas; LPS 1  $\mu$ g/ml por 24 horas y un pretratamiento de RvE1 100 nM durante 1 hora, para posteriormente agregar LPS por 24 horas. Imagen representativa de la densitometría de ICAM-1 (A) y VCAM-1 (B). Se cuantificó la relación, ICAM-1/GAPDH y VCAM-1/GAPDH normalizado como veces sobre el control. # $p < 0,05$  vs RvE1/LPS; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs control. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. (n=3)

## 7. DISCUSIÓN

En la actualidad, el tema de la inflamación involucra grandes estudios, y es conocido como un punto unificador para muchas enfermedades crónicas, entre ellas las ECV. Por lo cual, se hace muy importante el descubrimiento de las Rv, un término relativamente nuevo que no ha sido estudiado en FC; sin embargo, en modelos celulares como oculares, de pulmón, hígado, peritonitis, periodontitis, entre otros<sup>[38,41]</sup>; se ha demostrado que las Rv tienen propiedades antiinflamatorias y pro-resolutivas de la inflamación, lo que nos lleva a pensar en una útil herramienta farmacológica y posible terapia antiinflamatoria en un modelo cardiovascular. Hasta la fecha, hay muy poca información sobre el efecto que tendría sobre el tejido cardiaco, y más específicamente, no existe evidencia sobre el efecto que tendrían las Rv sobre los FC.

En el presente trabajo, se investigó sobre el efecto que tiene un PAMP, como es el LPS sobre los FC. De esta manera, se emularía la actividad inflamatoria en las células. Además, documentar el efecto que tienen las RvD1 y RvE1 sobre los fibroblastos. Por último, se decidió evaluar la actividad antiinflamatoria y pro-resolutiva de ambas Rv, induciendo condiciones proinflamatorias mediante LPS; incluyendo la expresión de las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, presentes en un proceso inflamatorio.

Los principales resultados indican que, RvD1 es capaz de disminuir la activación de la vía de señalización Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B inducida por LPS, y bajo la misma línea, conducir a una disminución en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1. Por otro lado, RvE1 tiende a disminuir la activación de la vía de señalización inducida por LPS, mostrando una tendencia a disminuir los de las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1.

## **7.1 Efecto de LPS sobre la activación de Akt, ERK1/2 y NF-κB en fibroblastos cardiacos.**

Para desarrollar una respuesta inflamatoria se utilizó LPS a una concentración comúnmente utilizada en el laboratorio. Este es uno de los componentes inmunoestimulantes mejor estudiados y capaz de inducir inflamación sistémica<sup>[20]</sup>. Resultados previos de nuestro laboratorio, han demostrado que los FC expresan el receptor TLR4, por lo cual es idóneo inducir una respuesta inflamatoria con este componente estructural de bacterias Gram (-). Nuestros resultados mostraron que la estimulación con LPS induce la activación de Akt, NF-κB y ERK1/2 a partir de los 30 min, y que se mantiene por lo menos hasta los 120 min. Estos resultados son similares a los descritos en monocitos y macrófagos estimulados con LPS, en los cuales se ha demostrado que LPS activa la ruta de señalización PI3K/Akt, NF-κB y ERK1/2 e induce la expresión de genes de respuesta inflamatoria como las citoquinas IL-1, IL-6 e IL-8<sup>[42,43]</sup>. Estos resultados son concordantes con otros estudios en macrófagos murinos donde LPS activa de manera tardía a Akt y NF-κB<sup>[44]</sup>. En otro trabajo, se demostró que ERK1/2 es activado por LPS después de los 30 min en la línea celular RAW264.7<sup>[45]</sup>. En macrófagos de ratones, se observó un aumento en la fosforilación de NF-κB inducido por LPS a los 30 min<sup>[46]</sup>. Por último, en una investigación hecha en cultivos neuronales de hipocampo, se mostró una activación significativa de Akt con LPS a partir de los 30 min<sup>[47]</sup>. Si bien es cierto, se activan las mismas vías de señalización, las diferencias se presentan en la temporalidad de activación de esas vías, siendo nuestros resultados de una cinética más lenta de lo que se esperaría. A este respecto, otros estudios demuestran que la activación del receptor TLR4 gatilla este tipo de vías mediante la activación de otras proteínas río arriba de las quinasas lo que podría explicar la activación más tardía de Akt, NF-κB y ERK1/2<sup>[44]</sup>.

Con estos resultados, se muestra que en FC LPS es capaz de activar la vía de señalización Akt, ERK1/2 y NF-κB. Colectivamente, con estos y otros resultados de nuestro laboratorio, podemos concluir que LPS activa vías de señalización, las que inducen un aumento de la expresión de citoquinas proinflamatorias.

## **7.2 Efecto de RvD1 y RvE1 sobre la activación de Akt, ERK1/2 y NF-κB en fibroblastos cardiacos.**

Durante la inflamación, el DHA y EPA de PUFA n-3 están disponibles para la transformación enzimática de varios mediadores antiinflamatorios y pro-resolutivos, incluyendo la RvD1 y RvE1. Estas Rv, en lugar de bloquear la inflamación en una etapa temprana, promueven la resolución oportuna de la inflamación, mediante el cese de la infiltración de leucocitos, la disminución de la secreción de factores proinflamatorios, la estimulación de la fagocitosis de los macrófagos, etc. Estas características, los hacen interesantes de estudiar en modelos de enfermedades relacionadas con la inflamación, características que se han demostrado en modelos como el asma, la retinopatía y las enfermedades periodontales<sup>[48-49]</sup>. Sin embargo, no existe evidencia del efecto resolutorio que puedan tener las RvD1 y RvE1 en FC, por lo cual lo primero que se debe hacer es evaluar el efecto que, por si sola, tienen estas Rv sobre este tipo celular.

Los resultados obtenidos dan cuenta que, RvD1 disminuyó la activación de Akt y ERK1/2; mientras que para NF-κB no hubo una diferencia significativa respecto al control. Estos resultados se contraponen a un trabajo hecho en células conjuntivas caliciformes, en las que se vio que al estimular con RvD1 promueve a la activación de ERK1/2 con un máximo de 20 min, la cual vuelve a niveles basales a los 30 min<sup>[37]</sup>. En tejido hepáticos, el tratamiento de RvD1 no causa algún cambio sustancial en la

activación de Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B<sup>[35]</sup>. Por otro lado, RvD1 presenta una tendencia a disminuir la actividad de NF- $\kappa$ B en macrófagos de ratón<sup>[36]</sup>.

En literatura se describe al factor de transcripción NF- $\kappa$ B como un mediador positivo, tanto de la inflamación y proliferación celular; así como también de la inhibición de la apoptosis<sup>[50-51]</sup>. Además, Akt y ERK1/2 están implicadas en la supervivencia celular<sup>[52]</sup>, crecimiento celular, apoptosis<sup>[53-54]</sup>, entre otras<sup>[55]</sup>. Esto es relevante porque en resultados obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio, se demuestra que RvD1 100 nM no inhibió ni indujo la proliferación en fibroblastos cardiacos neonatos (FCN). Esto indicaría que la disminución de estas vías no está asociado a sobrevida, pero si a otros efectos como, por ejemplo, la expresión de las proteínas de adhesión o la secreción de citoquinas.

Para RvE1 se observó que, Akt tiende a disminuir su activación, volviendo a niveles del control a los 120 min; ERK1/2 disminuyó significativamente su fosforilación, mientras que para NF- $\kappa$ B existe una tendencia a la inhibición de su activación. Estos resultados se contradicen con lo encontrado en la literatura; en fibroblastos de riñón, RvE1 indujo la activación rápida de ERK1/2 y Akt, pero esta respuesta no fue sostenida<sup>[40]</sup>. En células de ovario de hámster tranfectadas con ChemR23 humano, RvE1 activó la fosforilación de Akt en tiempo y dosis dependiente, de igual manera se activó ERK<sup>[56]</sup>. Mientras que en células epiteliales corneales humanas, se observó la activación tiempo dependiente de la vía PI3K/Akt con RvE1 0,1  $\mu$ M<sup>[57]</sup>. Por otro lado, RvE1 disminuye la translocación de NF- $\kappa$ B y atenúa significativamente la fosforilación de Akt<sup>[39]</sup> en osteoclastos.

Sin embargo, como se describió anteriormente, estudios in vitro han establecido que la supervivencia celular requiere de la activación de ERK1/2 y AKT<sup>[58]</sup>; mientras que NF- $\kappa$ B ha demostrado regular la proliferación en varios tipos celulares<sup>[59]</sup>. Tomando estas

consideraciones es lógico observar que RvE1 no active las vías Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B, porque en resultados anteriores a laboratorio se demostró que RvE1 disminuyó la proliferación en FCN.

En resumen, se observó que las RvD1 y RvE1 no activan las vías Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B, vías relacionadas con la proliferación y supervivencia celular. Esto tendría respaldo con lo investigado en FCN, en donde se mostró que las RvD1 y RvE1 no inducen la proliferación ni protegen frente a Isquemia/Reperfusión. Por otro lado, la diferencia con los resultados encontrados en literatura podría deberse a que la respuesta depende del tipo celular o por el modelo animal utilizado.

### **7.3 Efecto de RvD1 y RvE1 sobre la activación de Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B inducidas por LPS en fibroblastos cardiacos.**

La inflamación aguda es proceso esencialmente de defensa contra alguna infección o daño, esta respuesta desencadena la activación de varias vías, como PI3K/Akt, MAPK/ERK1/2 y NF- $\kappa$ B, que conducen a la translocación nuclear de AP-1 y NF- $\kappa$ B, las cuales controlan la expresión de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 $\beta$  e IL-6<sup>[60]</sup>. La inflamación puede ser detenida activamente por mediadores proresolutores, como la RvD1 y la RvE1. Investigaciones previas indican que RvD1 y RvE1 exhiben variados efectos farmacológicos tales como acciones antiinflamatorias y neuroprotectoras, supresión de la resistencia a la insulina, entre otras<sup>[61]</sup>. Sin embargo, no hay estudios que evalúen algún efecto en FC; en vista de tal situación, se utilizó LPS como inductor de la inflamación con el fin de evaluar e investigar las acciones proresolutivas de la RvD1 y la RvE1.

Los resultados muestran que los niveles de Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B presentan una tendencia a la disminución al ser estimuladas con RvD1 por 30 y 60 min. Además, se observa una marcada activación de estas vías por parte de LPS. Sin embargo, al haber un pretratamiento con RvD1, disminuyó significativamente de la activación de Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B. Esto podría indicar que RvD1 estaría participando en la disminución de la expresión de citoquinas proinflamatorias y del cese de la respuesta inflamatoria. Estos resultados se sustentan con otras investigaciones, por ejemplo, RvD1 inhibió la respuesta inflamatoria en ratas con retinopatía inducida por estreptozocina mediante la inhibición de la fosforilación de NF- $\kappa$ B y el bloqueo de la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>[62]</sup>. En la línea celular PC12, se utilizó el ion 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) para emular un modelo de Parkinson in vitro, donde se obtuvo que RvD1 disminuyó la activación de ERK1/2 y NF- $\kappa$ B inducidos por MPP+<sup>[63]</sup>. En fibroblastos de pulmón, se observó que LPS induce la fosforilación de Akt y ERK1/2, también se demostró que RvD1 inhibió significativamente la fosforilación de PI3K/AKT y ERK2; sin embargo, no hubo tal disminución con ERK1<sup>[64]</sup>. Por último, en tejido pulmonar de ratones se obtuvo que, LPS indujo la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y aumentó los niveles de la subunidad NF- $\kappa$ B p65 en el núcleo; RvD1 inhibió ambos efectos de LPS de una manera dosis dependiente. Además, en la misma investigación, LPS conduce a una alta actividad de la unión a ADN de NF- $\kappa$ B, pero al pretratar con 600 ng de RvD1 se observó una actividad significativamente menor<sup>[65]</sup>.

Por otro lado, RvE1 presenta una tendencia a la disminución de las vías Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B; además, los resultados dan cuenta que LPS aumentó significativamente la activación de Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B respecto al control, pero al haber un pretratamiento con RvE1 disminuyen significativamente la fosforilación de Akt y presenta una tendencia la disminución de ERK1/2 y NF- $\kappa$ B. Esto indicaría una acción resolutoria de la inflamación, lo que estaría respaldado en varios modelos experimentales, entre ellos; en

neutrófilos estimulados con *Porphyromonas gingivalis*, se halló que activaban las vías Akt y MAPK, pero al preincubarse con RvE1 se observó una disminución significativa en la fosforilación de Akt, de la misma manera disminuyó la fosforilación de ERK tanto en p42 como en p44<sup>[66]</sup>. En células epiteliales corneales humanas y macrófagos, RvE1 inhibió la inflamación corneal disminuyendo significativamente la producción de citoquinas como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  inducidas por LPS, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*<sup>[67]</sup>. En un modelo donde se utilizó concanavalina A para inducir hepatitis, se determinó que RvE1 suprimió significativamente la activación de NF- $\kappa$ B; además, RvE1 puede prevenir la activación de JNK, ERK1/2 y p38, los principales mediadores implicados en la vía AP-1, conduciendo a la disminución de los niveles de ARN mensajero de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6<sup>[61]</sup>. Por último, macrófagos pulmonares tratados con IL-33 incrementaron notablemente la tinción nuclear de NF- $\kappa$ B p65, la cual disminuyó de manera significativa al ser tratada con RvE1, suprimiendo la producción de citoquinas como IL-1 $\beta$  y IL-6<sup>[60]</sup>.

Con el conjunto de estos resultados, se demuestra que, a pesar de gran variedad de tipos celulares y modelos experimentales, el efecto de RvD1 y RvE1 es el mismo, esto se podría deber a que poseen un mecanismo de acción similar, mas no igual. Además, poseen un marcado efecto antiinflamatorio al inhibir las vías Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B, y se estaría disminuyendo la activación de factores de transcripción como AP-1 y la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B, factores que regulan mediadores proinflamatorios como las citoquinas IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  y quimioquinas involucradas en varios procesos inflamatorios<sup>[68-69]</sup>, frenando así la respuesta inflamatoria. Sin embargo, a pesar de que RvE1 no disminuyó significativamente la activación de las vías ERK1/2 y NF- $\kappa$ B activadas por LPS, no se puede descartar su acción antiinflamatoria, por lo cual, el paso siguiente es evaluar si aquellas disminuciones equivalen al cese significativo de la

secreción de citoquinas proinflamatorias, estudio que se deberá evaluar en alguna investigación futura.

#### **7.4 Efecto de RvD1 y RvE1 sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por LPS en fibroblastos cardiacos.**

Extensas investigaciones que estudian el riesgo cardiovascular, se han centrado en marcadores inflamatorios como las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1. Estas median la adhesión y migración de leucocitos a células endoteliales activadas y dañadas. La expresión de estas moléculas se puede inducir mediante la estimulación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  y endotoxinas bacterias, como LPS<sup>[22]</sup>.

Sabiendo que RvD1 y RvE1 tienen propiedades antiinflamatorias y actúan sobre las vías Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B que regulan la expresión de citoquinas, es que se evaluó el efecto de ambas Rv frente a la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidas por LPS.

Los resultados muestran que RvD1 no modifica los niveles basales de ICAM-1 y VCAM-1, esto indicaría que RvD1 no afecta la funcionalidad en cuanto a la capacidad adhesiva en los FC. Sin embargo, existe un marcado aumento de los niveles de ambas proteínas de adhesión cuando los FC se estimulan con LPS, pero cuando se pretrata con RvD1 existe una disminución significativa en los niveles de expresión de VCAM-1 y una tendencia a la disminución de ICAM-1. Esto indica que RvD1 participaría en la disminución de la expresión de las proteínas de adhesión, lo que estaría respaldado en otras investigaciones como, por ejemplo, en tejido de riñón en la cual se demostró que el tratamiento con AT-RvD1 inhibió significativamente el aumento inducido por LPS de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1<sup>[70]</sup>. En un modelo de colitis inducida por dextrano de

sodio, se halló que AT-RvD1 redujo significativamente la expresión de ARNm de ICAM-1 y VCAM-1 en comparación con el grupo tratado solo con dextrano de sodio<sup>[71]</sup>. En la línea celular epitelial alveolar humana A549, se observó una disminución significativa en la expresión de ICAM-1 inducida por IL-1 $\beta$  al ser pretratada con AT-RvD1<sup>[72]</sup>. En células endoteliales de vena umbilical humana estimuladas con TNF- $\alpha$ , se demostró que RvD1 redujo drásticamente las interacción de las células endoteliales con los PMN de manera dependiente a concentración, atenuando el reclutamiento de PMN<sup>[73]</sup>. En células del endotelio coroideo de la retina (CREC) tratadas con RvD1 y luego estimuladas con IL-1 $\beta$ , se observó una disminución en la expresión de VCAM-1; además, RvD1 inhibió la trans migración de PMN estimulada por IL-1 $\beta$  a través de monocapas de CREC<sup>[74]</sup>.

Por otro lado, RvE1 no alteró los niveles basales de las proteínas ICAM-1 y VCAM-1, pero al estimular los FC con LPS se demostró un aumento significativo de los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1. No obstante, RvE1 previno de manera significativa la expresión de ICAM-1 y presentó una tendencia en disminuir los niveles de VCAM-1 inducidos por LPS. De la misma manera que RvD1, estos resultados indican que RvE1 tiene la capacidad de disminuir las proteínas de adhesión y la infiltración de leucocitos. Esto estaría respaldado con otras investigaciones como por ejemplo, en un modelo de peritonitis inducida por el ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico, RvE1 redujo la infiltración de leucocitos y la expresión de mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$ <sup>[75]</sup>. En PMN humanos que se expusieron a RvE1, presentaron una disminución en la migración transepitelial de una manera concentración dependiente<sup>[76]</sup>. En CREC se observó una disminución en la expresión de VCAM-1 inducida por IL-1 $\beta$  al ser pretratada con RvE1; además, RvE1 inhibió la trans migración de PMN estimulada por IL-1 $\beta$  a través de monocapas de CREC<sup>[74]</sup>. También, se informó que al inyectar RvE1 en la cavidad

peritoneal en un ratón en un modelo de peritonitis, provocó la reducción en el número de neutrófilos<sup>[77]</sup>.

En resumen, los resultados muestran que RvD1 disminuyó de manera significativa los niveles de expresión de VCAM-1, pero no así de ICAM-1; y que RvE1 disminuyó de manera significativa los niveles de expresión de ICAM-1, pero no así de VCAM-1. A este respecto, los resultados muestran una tendencia a la disminución en la expresión de las CAM; sin embargo, la proteína funcional es la que se expresa a nivel de la superficie celular, por lo cual, para tener un resultado más acertado se podría realizar una citometría de flujo para evaluar solo la proteína expresada en la superficie. De todas maneras, estos resultados sirven como antecedente para posteriores investigaciones. Además, resultados anteriores de laboratorio han mostrado que en la adhesión celular actúan proteínas como ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, entre otras. Pero este proceso depende netamente de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en forma simultánea, y que basta con que una sola sea disminuida para bloquear por completo la adhesión celular. Con estos datos y otros resultados en su conjunto, se demuestra que las RvD1 y RvE1 ejercen efectos preventivos en un contexto inflamatorio, disminuyendo la expresión de las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, y consecuentemente, el reclutamiento e infiltración de PMN al tejido dañado.

Finalmente, en conjunto de los resultados obtenidos en esta tesis permiten demostrar que tanto RvD1 como RvE1 son partícipes de la resolución de la inflamación, mediante la disminución de las vías activadas por LPS y, en consecuencia, logran reducir la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1. Estos resultados permiten sugerir que RvD1 y RvE1 son una potencial herramienta terapéutica en enfermedades relacionadas con la inflamación.

## 8. CONCLUSIONES

1. LPS activó las vías de señalización Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B.
2. RvD1, por si misma, disminuye la activación de Akt y ERK1/2 y no altera la activación de NF- $\kappa$ B.
3. RvE1, por si misma, disminuye la activación de ERK1/2 y no altera la activación de Akt y NF- $\kappa$ B.
4. RvD1 inhibe las vías de señalización Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B activadas por LPS.
5. RvE1 inhibe la actividad de Akt pero no las vías de señalización ERK1/2 y NF- $\kappa$ B activadas por LPS.
6. RvD1 disminuye la expresión de VCAM-1 pero no disminuyó significativamente la expresión de ICAM-1 inducida por LPS.
7. RvE1 disminuye la expresión de ICAM-1 pero no disminuyó significativamente la expresión de VCAM-1 inducida por LPS.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Bustos P., Amigo H. *Factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en adultos jóvenes*. Revista médica de Chile. 2003; 131: 973-980.
2. "Enfermedades cardiovasculares", Organización Mundial de la Salud, [consulta en línea: 27 de febrero de 2018], <[http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/es/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/)>
3. Rondanelli R., Rondanelli R. *Estilo de vida y enfermedad cardiovascular en el hombre*. Revista médica Clínica Las Condes. 2014; 25: 69-77.
4. Monteiro L., Vasques-Nóvoa F., Ferreira L., et al. *Restoring heart function and electrical integrity: closing the circuit*. NPJ Regenerative Medicine. 2017; 2: 1-13.
5. Pinto A., Ilinykh A., Ivey M., et al. *Revising Cardiac Cellular Composition*. Circulation Research. 2016; 118:400-409.
6. Klesen A., Jakob D., Emig R., et al. *Cardiac fibroblasts: Active players in (atrial) electrophysiology?*. Herzschrittmacherther Elektrophysiol. 2018; 29:62-69.
7. Dostal D., Glaser S., Baudino T. *Cardiac fibroblast physiology and pathology*. Compr Physiol. 2015; 5:887-909.
8. Sattler S., Kennedy-Lydon T. *The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology*. Springer. 2017; 1003:38-45.
9. Ayala P. *Participación de fibroblastos y miofibroblastos cardíacos en la respuesta inflamatoria: Rol de los receptores de tipo Toll 4*. Tesis doctoral. Santiago, Universidad de Chile, Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2013; 15-77.
10. Olivares-Silva F., Landaeta R., Vivar R., et al. *Heparan sulfate potentiates leukocyte adhesion on cardiac fibroblast by enhancing Vcam-1 and Icam-1 expression*. Biochimica et Biophysica Acta. 2017; 1864: 831-842.
11. Varela ML., Mogildea M., Moreno I., et al. *Acute Inflammation and Metabolism*. Inflammation. 2018; 41:1115-1127.
12. Sansbury BE., Spite M. *Resolution of Acute Inflammation and the Role of Resolvins in Immunity, Thrombosis and Vascular Biology*. 2016; 119:113-130.
13. Chistiakov D., Orekhov A., Bobryshev Y. *The role of cardiac fibroblasts in post-myocardial heart tissue repair*. Experimental and molecular pathology. 2016; 101(2):231-240.

14. Serhan C., Chiang N., Dalli J. *The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution*. *Seminars in immunology*. 2015; 7(3):200-15.
15. Hug H., Hasan M., La Fata G. *Toll-Like Receptors: Regulators of the Immune Response in the Human Gut*. *Nutrients*. 2018; 10(2):203.
16. Gu J., Liu Y., Ye P., et al. *Roles of toll-like receptors: From inflammation to lung cancer progression*. *Biomedical Reports*. 2018; 8(2): 126–132.
17. Humeres C., Boza P., Vivar R., 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*. 2016; 101: 69-80.
18. Vallence T., Zeuner M., Williams H., et al. *Toll-Like Receptor 4 Signalling and Its Impact on Platelet Function, Thrombosis, and Haemostasis*. *Mediators of Inflammation*. 2017; 2017:9605894.
19. Pourrajab F., Yazdi M., Zarch M., et al. *Cross talk of the first-line defense TLRs with PI3K/Akt pathway, in preconditioning therapeutic approach*. *Molecular and cellular therapies*. 2015; 30: 3-4.
20. Lu Y., Yeh W., Ohashi P. *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. *Cytokine*. 2008; 42(2):145-151.
21. Silveira S., Carvalho C., Tamura E. *TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFκB pathway*. *Journal of pineal research*. 2010; 49(2):183-192.
22. Turan C., Kesebir S., Süner O. *Are ICAM, VCAM and E-selectin levels different in first manic episode and subsequent remission?*. *Journal of affective disorders*. 2014; 163:76-80.
23. Lyck R., Enzmann G. *The physiological roles of ICAM-1 and ICAM-2 in neutrophil migration into tissues*. *Current opinion in hematology*. 2015; 22(1):53-59.
24. Cheng D., Liang B. *Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) Polymorphisms and Cancer Risk: A Meta-Analysis*. *Irian Journal of public health*. 2015; 44(5):615-624.
25. Anbarasan C., Bavanilatha M., Latchumanadhas K., et al. *ICAM-1 molecular mechanism and genome wide SNP's association studies*. *Indian heart journal*. 2015; 67(3): 282–287.

26. Chen Y., Lin S., Chen J., et al. *Magnolol attenuates VCAM-1 expression in vitro in TNF- $\alpha$ -treated human aortic endothelial cells and in vivo in the aorta of cholesterol-fed rabbits*. British Journal of Pharmacology. 2002; 135(1):37-47.
27. Sousa J., Sousa T., Hirai K., et al. *Endothelium adhesion molecules ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 and VLA-4 expression in leprosy*. Microbial pathogenesis. 2014; 104:116-124.
28. Bannenberg G., Serhan C. *Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update*. Biochimica et biophysica acta. 2010; 1801(12):1260-1273.
29. Schaller M., Zahner G., Gasper W., et al. *Relationship between the omega-3 index and specialized pro-resolving lipid mediators in patients with peripheral arterial disease taking fish oil supplements*. Journal of clinical lipidology. 2017; 11(5):1289-1295.
30. Kilburg B., Reece S., Crouch M., et al. *Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators Regulate Ozone-Induced Pulmonary and Systemic Inflammation*. Toxicological sciences. 2018; 163(2):466-477.
31. Ji R., Strichartz G., Serhan C., et al. *Emerging Roles of Resolvins in the Resolution of Inflammation and Pain*. Trends in neurosciences. 2011; 34(11):599-609.
32. Benabdoune H., Rondon E., Shi Q., et al. *The role of resolvin D1 in the regulation of inflammatory and catabolic mediators in osteoarthritis*. Inflammation research. 2016; 65(8):635-645.
33. Serhan C., Chiang N., Dalli J., et al. *Lipid Mediators in the Resolution of Inflammation*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2014; 7(2):a016311.
34. Recchiuti A. *Resolvin D1 and its GPCRs in resolution circuits of inflammation*. Prostaglandins and other lipid mediators. 2013; 107:64-76.
35. Kang J., Lee S. *Resolvin D1 protects the liver from ischemia/reperfusion injury by enhancing M2 macrophage polarization and efferocytosis*. Biochimica et biophysica acta. 2016; 1861(9):1025-1035.
36. Lee H., Kundu J., Cha Y., et al. *Resolvin D1 stimulates efferocytosis through p50/p50-mediated suppression of tumor necrosis factor- $\alpha$  expression*. Journal of cell science. 2013; 126(17):4037-4047.

37. Li D., Hodges R., Serhan C., et al. *Resolvin D1 and aspirin-triggered resolvin D1 regulate histamine-stimulated conjunctival goblet cell secretion*. *Mucosal immunology*. 2013; 6(6):1119-1130.
38. Serhan C. *Novel Pro-Resolving Lipid Mediators in Inflammation Are Leads for Resolution Physiology*. *Nature*. 2014; 510(7503):92-101.
39. Herrera B., Ohira T., Gao L., et al. *An endogenous regulator of inflammation, resolvin E1, modulates osteoclast differentiation and bone resorption*. *British Journal of Pharmacology*. 2008; 155(8):1214-1223.
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*. *The journal of pathology*. 2012; 228(4):506-519.
41. Serhan C. *Novel Lipid Mediators and Resolution Mechanisms in Acute Inflammation: To Resolve or Not?* *The American Journal of Pathology*. 2010; 177(4):1576-1591.
42. Guha M., Mackman N. *LPS induction of gene expression in human monocytes*. *Cellular signalling*. 2001; 13(2):85-94.
43. Wang L., Wu J., Zhang W., et al. *Effects of aspirin on the ERK and PI3K/Akt signaling pathways in rats with acute pulmonary embolism*. *Molecular medicine reports*. 2013; 8(5):1465-1471.
44. Laird M., Rhee S., Perkins D., et al. *TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling*. *Journal of Leukocyte Biology*. 2009; 85(6):966-977.
45. Cho J., Tschlis P. *Phosphorylation at Thr-290 regulates Tpl2 binding to NF- $\kappa$ B1/p105 and Tpl2 activation and degradation by lipopolysaccharide*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102(7):2350-2355.
46. Xie S., Liu B., Fu S., et al. *GLP-2 suppresses LPS-induced inflammation in macrophages by inhibiting ERK phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation*. *Cellular physiology and biochemistry*. 2014; 34(2):590-602.
47. Zhao M., Zhou A., Xu L., et al. *The role of TLR4-mediated PTEN/PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway in neuroinflammation in hippocampal neurons*. 2014; 269:93-101.
48. Lippestad M., Hodges R., Serhan C., et al. *Resolvin D1 Increases Mucin Secretion in Cultured Rat Conjunctival Goblet Cells via Multiple Signaling*

- Pathways*. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2017; 58(11):4530-4544.
49. Liu Z., Miao G., Wang J., et al. *Resolvin D1 Inhibits Mechanical Hypersensitivity in Sciatica by Modulating the Expression of Nuclear Factor- $\kappa$ B, Phospho-extracellular Signal-regulated Kinase, and Pro- and Antiinflammatory Cytokines in the Spinal Cord and Dorsal Root Ganglion*. Anesthesiology. 2016; 124(4):934-44.
  50. Guttridge D., Albanese C., Reuther J., et al. *NF- $\kappa$ B Controls Cell Growth and Differentiation through Transcriptional Regulation of Cyclin D1*. Molecular and Cellular Biology. 1999; 19(8):5785-5799.
  51. Plümpe J., Malek N., Bock C., et al. *NF-kappaB determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration*. American Journal of Physiology. 2000; 278(1):173-183.
  52. Lu Z., Xu S. *ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis*. IUBMB Life. 2006; 58(11):621-631.
  53. Sun Y., Liu W., Liu T., et al. *Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis*. Journal of receptor and signal transduction research. 2015; 35(6):600-604.
  54. Yu J., Cui W. *Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination*. Development. 2016; 143(17):3050-3060.
  55. Song G., Ouyang G., Bao S. *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. Journal of cellular and molecular medicine. 2005; 9(1):59-71.
  56. Ohira T., Arita M., Serhan C., et al. *Resolvin E1 Receptor Activation Signals Phosphorylation and Phagocytosis*. The Journal of Biological Chemistry. 2010; 285(5):3451-3461.
  57. Zhang F., Yang H., Pan Z., et al. *Dependence of Resolvin-Induced Increases in Corneal Epithelial Cell Migration on EGF Receptor Transactivation*. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2010; 51(11):5601-5609.
  58. Jiang R., Wei L., Zhu M., et al. *Aspirin Inhibits LPS-Induced Expression of PI3K/Akt, ERK, NF- $\kappa$ B, CX3CL1, and MMPs in Human Bronchial Epithelial Cells*. Inflammation. 2016; 39(2):643-650.

59. Brantley DM., Chen CL., Muraoka RS., et al. *Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) regulates proliferation and branching in mouse mammary epithelium*. *Molecular Biology of the Cell*. 2001; 12(5):1445-1455.
60. Flesher R., Herbert C., Kumar R., et al. *Resolvin E1 promotes resolution of inflammation in a mouse model of an acute exacerbation of allergic asthma*. *Clinical science*. 2014; 126(11):805-814.
61. Kuang H., Hua X., Zhou J., et al. *Resolvin D1 and E1 alleviate the progress of hepatitis toward liver cancer in long-term concanavalin A-induced mice through inhibition of NF-κB activity*. *Oncology reports*. 2016; 35(1):307-317.
62. Yin Y., Chen F., Wang W., et al. *Resolvin D1 inhibits inflammatory response in STZ-induced diabetic retinopathy rats: Possible involvement of NLRP3 inflammasome and NF-κB signaling pathway*. *Molecular Vision*. 2017; 14(23):242-250.
63. Xu J., Gao X., Yang C., et al. *Resolvin D1 Attenuates Mpp+-Induced Parkinson Disease via Inhibiting Inflammation in PC12 Cells*. *Medical science monitor*. 2017; 2(23):2684-2691.
64. Wu D., Zheng S., Li W., et al. *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; 2013(2013):964012.
65. Liao Z., Dong J., Wu W., et al. *Resolvin D1 attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury through a process involving the PPARγ/NF-Kb pathway*. *Respiratory Research*. 2012; 2(13):110.
66. Herrera B., Hasturk H., Kantarci A., et al. *Impact of Resolvin E1 on Murine Neutrophil Phagocytosis in Type 2 Diabetes*. *Infection and Immunity*. 2015; 83(2): 792–801.
67. Lee J., Sun Y., Gjorstrup P., et al. *Inhibition of Corneal Inflammation by the Resolvin E1*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2015; 56(4):2728-2736.
68. Newton K., Dixit V. *Signaling in Innate Immunity and Inflammation*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012; 4(3): a006049.
69. Liu T., Zhang L., Joo D., et al. *NF-κB signaling in inflammation*. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2017; 17023.

70. Chen J., Shetty S., Zhang P., et al. *Aspirin-triggered resolvin D1 down-regulates inflammatory responses and protects against endotoxin-induced acute kidney injury*. Toxicology and Applied Pharmacology. 2014; 277(2):118-123.
71. Bento A., Claudino R., Dutra R., et al. *Omega-3 Fatty Acid-Derived Mediators 17(R)-Hydroxy Docosahexaenoic Acid, Aspirin-Triggered Resolvin D1 and Resolvin D2 Prevent Experimental Colitis in Mice*. Journal of Immunology. 2011; 187(4):1957-1969.
72. Cox R. Jr., Phillips O., Fukumoto J., et al. *Resolvins Decrease Oxidative Stress Mediated Macrophage and Epithelial Cell Interaction through Decreased Cytokine Secretion*. Plos One. 2015; 10(8):0136755.
73. Norling L., Dalli J., Flower R., et al. *Resolvin D1 limits PMN recruitment to inflammatory loci: receptor dependent actions*. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 2012; 32(8):1970-1978.
74. 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. 2009; 50(8):3613-3620.
75. 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. 2005; 102(21):7671-7676.
76. Campbell E., Louis N., Tomassetti S., et al. *Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution*. Federation of American Societies for Experimental Biology Journal. 2007; 21(12):3162-3170.
77. Schif-Zuck S., Gross N., Assi S., et al. *Satiated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b<sup>low</sup> macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids*. European Journal of Immunology. 2011; 41(2):366-379.