



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULARES ACTIVADAS POR RESOLVINA D1 Y E1 EN FIBROBLASTOS CARDÍACOS

Memoria para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico

JOSSETE RACHEL CAYUPI VIVANCO

Directores: Dr. Guillermo Díaz Araya
Dra. Valentina Parra Ortíz

Patrocinante: Dr. Guillermo Díaz Araya

Santiago, Chile 2019

FINANCIAMIENTO

Proyecto FONDECYT N ° 1170425 (Guillermo Díaz Araya, Investigador Principal)

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

Esta memoria dio origen a la siguiente presentación a congreso:

Cayupi-Vivanco J., Parra V., Salas A., Espinoza C., Parra P., Díaz-Araya, G.
Intracellular signaling pathways activated by Resolvin D1 and E1 in cardiac fibroblast. XL
Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Santa Cruz, Chile, 2018.

A Dios... que ilumina mi camino.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, quiero agradecer a mi madre por su apoyo y cariño en todo este proceso; a mi padre por alentarme a estudiar desde pequeña; a mis abuelos por acompañarme, confiar en mí y brindarme el apoyo necesario; y a Andrés, por incentivarme a volver a las aulas, por apoyarme y creer en mí cuando todo estuvo en contra.

Además, quiero agradecer al Dr. Guillermo Díaz Araya por permitirme trabajar en su laboratorio, por su apoyo, por brindarme las herramientas para llevar a cabo este trabajo, por su dedicación, consejos y conocimiento entregado. También, a la Dra. Valentina Parra Ortiz por sus consejos experimentales, por su apoyo y por brindarme las herramientas para cumplir con este último paso en la carrera.

A mis compañeros de laboratorio les agradezco el tiempo compartido, los momentos de distensión, la ayuda con los experimentos y la generosidad de sus conocimientos. También quiero agradecer a Sebastián Leiva por la ayuda y buena disposición para resolver todas mis inquietudes.

Finalmente, quiero agradecer a Ignacio por apoyarme, por su sabiduría, Amor y comprensión, por estar conmigo en los momentos felices y en las situaciones de estrés, por brindarme paz.

ÍNDICE GENERAL

FINANCIAMIENTO	2
AGRADECIMIENTOS.....	5
ÍNDICE GENERAL	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ABREVIATURAS	10
RESUMEN.....	13
SUMMARY	15
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. Generalidades.....	17
1.2. Tejido cardíaco y fibroblasto cardíaco	17
1.3. Fibroblasto cardíaco como célula pro inflamatoria en tejido cardíaco	18
1.4. Resolvinas.....	19
1.4.1. Resolvinas D1.....	20
1.4.2. Resolvinas E1	21
1.5. Receptor acoplado a proteína Gi/o.....	23
1.6. Vías de señalización intracelular en FCs.....	24
1.6.1. Receptor β_2 adrenérgico y cAMP.....	25
1.6.2. Receptor de angiotensina II y Ca^{2+}	26
1.7. Resolvinas en el fibroblasto cardíaco	27
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. Obtención de fibroblastos cardíacos.....	30
5.4. Pasaje celular.....	30
5.5. Determinación de movimientos de Ca ²⁺ intracelular	30
5.6. Determinación de niveles de cAMP intracelular.....	31
5.7. Preparación de extractos de proteínas totales.....	31
5.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	32
5.9. Electrotransferencia	32
5.10. Western Blot.....	32
5.11. Análisis estadístico.....	33
6. RESULTADOS	34
6.1. Evaluación de la presencia de receptores ALX/FPR2 y ChemR23 en fibroblastos cardíacos	34
6.2. Evaluación del efecto de las Resolvinas D1 y E1 en los niveles de cAMP intracelular	35
6.3 Evaluación del efecto de las Resolvinas D1 y E1 en los niveles de Ca ²⁺ citosólico	36
6.4. Evaluación del efecto de las Resolvinas D1 y E1 en los niveles de Ca ²⁺ nuclear	41
7. DISCUSIÓN.....	45
7.1. Evaluación de la presencia de receptores ALX/FPR2 y ChemR23 en fibroblastos cardíacos	46
7.2. Evaluación del efecto de las Resolvinas D1 y E1 en los niveles de cAMP intracelular	47
7.3. Evaluación del efecto de las Resolvinas D1 y E1 en los niveles de Ca ²⁺ intracelular	48
7.4. Esquema resumen de los efectos diferenciales en las vías de señalización intracelulares de las RvD1 y RvE1.	54

8. CONCLUSIONES	55
9. BIBLIOGRAFÍA.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías de señalización del receptor acoplado a proteína Gi/o	24
Figura 2. Presencia de receptores ALX/FPR2 y ChemR23 en fibroblastos cardíacos de ratas neonatas.....	34
Figura 3. Efecto de las Resolvinas D1 y E1 en los niveles de cAMP en fibroblastos cardíacos de ratas neonatas.	35
Figura 4. Efecto de la estimulación con Resolvinas D1 y E1 en la liberación de Ca ²⁺ citosólico en fibroblastos cardíacos de ratas neonatas 1 minuto previo a Ang II.	38
Figura 5. Efecto de la estimulación con Resolvinas D1 y E1 en la liberación de Ca ²⁺ citosólico en fibroblastos cardíacos de ratas neonatas 2 minutos previo a Ang II.	39
Figura 6. Efecto de la estimulación con Resolvinas D1 y E1 en la liberación de Ca ²⁺ citosólico en fibroblastos cardíacos de ratas neonatas 25 segundos posterior a Ang II.....	40
Figura 7. Efecto de la estimulación con Resolvinas D1 y E1 en la liberación de Ca ²⁺ nuclear de fibroblastos cardíacos de ratas neonatas 1 minuto previo a Ang II..	42
Figura 8. Efecto de la estimulación con Resolvinas D1 y E1 en la liberación de Ca ²⁺ nuclear en fibroblastos cardíacos de ratas neonatas 2 minutos previo a Ang II.	43
Figura 9. Efecto de la estimulación con Resolvinas D1 y E1 en la liberación de Ca ²⁺ nuclear en fibroblastos cardíacos de ratas neonatas 25 segundos posterior a Ang II.	44
Figura 10. Esquema resumen de los efectos diferenciales en las vías de señalización intracelulares de las RvD1 y RvE1.	54

ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclase
ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
ALX/FPR2	Lipoxine A4 receptor/N-formyl peptide receptor 2
Ang II	Angiotensina II
AT1R	Receptor de angiotensina II tipo 1
AT2R	Receptor de angiotensina II tipo 2
AT-RvD1	Aspirin-triggered resolvin D1
BLT1R	Receptor de leucotrieno B4
Ca ²⁺	Calcio
CaMKII	Calcio/calmodulina kinasa II
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
ChemR23	Chemerin receptor 23
COX	Ciclooxigenasa
CYP	Cytochrome P450
DAMPS	Danger-associated molecular patterns
DHA	Docosahexaenoic acid
ECV	Enfermedades cardiovasculares
ENS	Encuesta nacional de salud
EPA	Eicosapentaenoic acid
EPAC	Exchange protein activated directly by cAMP
ERK	Extracellular signal-regulated kinases (MAP kinases)
FCs	Fibroblastos cardíacos
GDP	Guanosine diphosphate
GPCR	G protein-coupled receptors
GPR32	G protein-coupled receptor 32
GTP	Guanosine triphosphate
HS	Heparan sulfato

HTA	Hipertensión arterial
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IL-10	Interleuquina-10
IL-1	Interleuquina-1
IL-6	Interleuquina-6
IL-8	Interleuquina-8
IP3R	Receptor de inositol trifosfato
ISO	Isoproterenol
LPS	Lipopolisacárido
LX	Lipoxinas
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MaR	Maresinas
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MEC	Matriz extracelular
MFC	Miofibroblasto cardíaco
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NCX	Sodium-calcium exchanger
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NLRP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NO	Óxido nítrico
PAMPS	Pathogen-associated molecular patterns
PD	Protectinas
PDGF	Platelet derived growth factor
PI3K	Fosfoinositol-3-kinasa
PKA	Proteína kinasa A
PKC	Proteína kinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMCA	Plasma membrane calcium pump

PMN	Polimorfonucleares
PTX	Pertussis toxin
RAAS	Renin–angiotensin–aldosterone system
RE	Retículo endoplasmático
ROS	Reactive oxygen species
Rv	Resolvinas
RvD1	Resolvina D1
RvD2	Resolvina D2
RvD3	Resolvina D3
RvE1	Resolvina E1
RyR	Ryanodine receptor
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SPM	Specialized pro-resolutive mediators
TGF- β	Transforming growth factor beta
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
VCAM-1	Vascular cell adhesión molecule 1
VSMC	Vascular smooth muscle cells
β 2-AR	Receptor adrenérgico beta 2

RESUMEN

“Vías de señalización intracelulares activadas por resolvina D1 y E1 en fibroblastos cardíacos”

Los fibroblastos cardíacos (FCs) son uno de los tipos celulares más importantes del corazón. Ellos contribuyen a mantener la homeostasis proteica de la matriz extracelular y participan de forma muy activa en la respuesta inflamatoria cardíaca que se origina como consecuencia de un daño tisular. Además, se denominan células centinelas de la inflamación, por su capacidad de responder de forma eficiente a través de la secreción de citoquinas y quimioquinas que favorecen el reclutamiento de leucocitos a la zona de daño.

Las resolvinas (Rv) son mediadores lipídicos especializados que participan activamente en la resolución de la inflamación. La RvD1 se biosintetiza a partir del ácido docosahexaenoico y la RvE1 del ácido eicosapentaenoico. Hasta la fecha, no existe evidencia sobre la expresión de los receptores de las Rv ni sobre sus vías de señalización intracelulares en FCs.

El objetivo de este trabajo fue demostrar la presencia de los receptores de la RvD1 y RvE1 en FCs de ratas neonas y estudiar las vías de señalización intracelular activadas por estas moléculas mediante la medición de los niveles de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) y las señales de calcio (Ca^{2+}) intracelular.

Nuestros resultados muestran que FCs de ratas neonatas poseen los receptores ALX/FPR2 y ChemR23, de las RvD1 y RvE1, respectivamente. Además, se obtuvo que los niveles de cAMP no son modificados por las Rv. Sin embargo, la RvD1 incrementó los niveles de cAMP inducidos por ISO de manera dependiente de ALX, y la RvE1 tendió a producir el mismo efecto. Por otra parte, las Rv mueven Ca^{2+} , aunque esto no haya sido significativo en términos de amplitud. También, la RvE1 redujo la amplitud y el área bajo la curva de la señal de Ca^{2+} citosólica y aumentó la amplitud de la señal de Ca^{2+} nuclear inducida por Angiotensina II (Ang II).

Por lo tanto, se concluyó que la hipótesis propuesta fue cumplida de manera parcial y que, a pesar de que ambas Rv poseen vías de señalización similares en un inicio, los mecanismos gatillados de manera posterior no se comparten.

Finalmente, en su conjunto, los resultados obtenidos nos muestran que, en los FCs, las vías de señalización gatilladas por las Rv son distintas. Lo anterior tomaría relevancia en presencia de Ang II, puesto que sólo la RvE1 moduló la amplitud de la señal de Ca^{2+} , lo que podría indicar que sólo esta Rv podría mitigar y/o prevenir la fibrosis cardíaca inducida por este péptido.

SUMMARY

“Intracellular signaling pathways activated by resolvin D1 and E1 in cardiac fibroblast”

Cardiac fibroblasts (CF) are one of the most important cell types of the heart. They contribute to maintain the extracellular matrix protein homeostasis and participate very actively in the cardiac inflammatory response that originates as a consequence of tissue damage. In addition, they are called sentinel cells of inflammation, because of their capacity to respond efficiently through the secretion of cytokines and chemokines that favor the recruitment of leukocytes to the area of damage.

Resolvins (Rv) are specialized lipid mediators that actively participate in the resolution of inflammation. RvD1 is biosynthesized from docosahexaenoic acid and RvE1 from eicosapentaenoic acid. To date, there is no evidence about the expression of Rv receptors and their intracellular signaling pathways in CF.

The objective of this work was to demonstrate the presence of RvD1 and RvE1 receptors in neonatal rats CF and to study the intracellular signaling pathways activated by these molecules by measuring cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels and intracellular calcium (Ca^{2+}) signals.

Our results showed that neonatal rats CF have ALX/FPR2 and ChemR23 receptors for RvD1 and RvE1, respectively. In addition, it was obtained that cAMP levels were not modified by Rv. However, RvD1 increased cAMP levels ISO-induced in a ALX-dependent manner, and RvE1 tended to produce the same effect. On the other hand, the Rv move Ca^{2+} , although this has not been significant in terms of amplitude. However, RvE1 reduced the amplitude and the area under the curve of the cytosolic Ca^{2+} signal whereas increased the amplitude of the nuclear Ca^{2+} signal induced by angiotensin II (Ang II).

Therefore, it concluded that the proposed hypothesis was partially fulfilled and that, although both Rv have similar signaling pathways at the beginning, the mechanisms triggered later are not shared.

Finally, as a whole, the results obtained show us that in CF, the signaling pathways triggered by Rv are different. This would be relevant in the presence of Ang II, since only RvE1 modulated the amplitude of the Ca^{2+} signal, which could indicate that only this Rv could mitigate and / or prevent cardiac fibrosis induced by this peptide.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos [1]. Son una de las mayores causas de defunciones y discapacidad a nivel mundial. Un 30% de todas las muertes que se producen en el mundo cada año son atribuibles a estas enfermedades [2]. En nuestro país la prevalencia de los factores de riesgo, tales como fumar, el sobrepeso, la obesidad, diabetes, colesterol total elevado, hipertensión y sedentarismo es muy alta, lo que hace que la población chilena esté expuesta a estas patologías [3].

La hipertensión arterial (HTA) es uno de los factores de riesgo claves en ECV tales como infarto agudo al miocardio y accidentes cerebrovasculares [4]. En Chile, la Encuesta Nacional de Salud (ENS) 2009-2010 encontró una prevalencia de HTA de 26,9% [5], mientras que la ENS 2016-2017 indica que un 27,6% de la población presenta sospecha de HTA [6].

Debido a esto, la investigación de las patologías asociadas a ECV es fundamental, para encontrar tratamientos y aliviar a los millones de personas que padecen estas enfermedades.

1.2. Tejido cardíaco y fibroblasto cardíaco

La historia natural de la patología cardíaca se caracteriza por una serie de cambios moleculares, celulares, histológicos, conformacionales, metabólicos y funcionales, que se han denominado colectivamente como remodelado cardíaco. Este último término, de hecho, describe un amplio espectro de modificaciones celulares y moleculares que incluyen: hipertrofia de los cardiomiocitos, muerte de los cardiomiocitos, desdiferenciación de los cardiomiocitos, alteraciones de la dinámica del Ca^{2+} y sensibilidad del miofilamento a este ión, modificaciones profundas del metabolismo del miocardio y fibrosis cardíaca; los cuales constituyen el mecanismo fisiopatológico común que conduce a una amplia gama de enfermedades cardíacas de diferente etiología hacia la insuficiencia cardíaca manifiesta [7]. Es aquí donde los fibroblastos cardíacos (FCs) toman un creciente interés, debido a que han demostrado participar de forma muy activa

en la respuesta inflamatoria cardíaca que se origina como consecuencia de un daño tisular [8].

1.3. Fibroblasto cardíaco como célula pro inflamatoria en tejido cardíaco

Los FCs son células estromales, que constituyen el tejido de sostén del corazón desde su desarrollo embrionario. Aunque no son las células más numerosas, su rol es clave en la mantención de la homeostasis no sólo de la estructura tisular, sino que también en la homeostasis de la respuesta inflamatoria. Morfológicamente, se caracterizan por su forma plana y por las múltiples extensiones de su membrana, semejando la forma de un huso. Los FCs son reconocidos por su rol estructural en la síntesis de matriz extracelular (MEC) y se cree que la comunicación intercelular entre FCs y cardiomiocitos contribuye en el mantenimiento del funcionamiento eléctrico y mecánico del corazón [8]. Esta matriz está compuesta principalmente por diferentes tipos de colágeno, formando una red tridimensional que cubre agrupaciones de miocitos proporcionando soporte al stress mecánico [9].

Cuando el proceso inflamatorio se desregula en el tejido cardíaco, éste va perdiendo su función mediante pérdida de contractibilidad y la capacidad para bombear la sangre a los demás órganos. La inflamación en el corazón puede ser provocada por factores exógenos patógenos: virus, bacteria, hongos, etc. resultando en un proceso no-estéril. También por infarto al miocardio, HTA, agentes químicos o factores asociados a la respuesta inmune, como desencadenantes de una respuesta inflamatoria estéril [10] y enfermedades autoinmunes [11]. Aunque cada uno de estos estados patológicos es de distinta etiología, patogénesis y evolución; tienen en común varios mecanismos inflamatorios.

Así, en condiciones de daño cardíaco, los FCs desempeñan un rol relevante en el proceso de cicatrización y también en el remodelado patológico del tejido cardíaco. Los FCs han sido denominados células centinelas de la inflamación por su capacidad de responder de forma eficiente a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS), como el lipopolisacárido (LPS), y a los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), como el heparán sulfato (HS) [8, 12]; a través de la secreción de citoquinas

(IL-6, IL-10, TNF- α , IL-1 β), quimioquinas (MCP-1, IL-8), factores de crecimiento (TGF- β 1), metaloproteasas y al expresar moléculas de adhesión celular (ICAM-1, VCAM-1). Así, de esta forma, pueden interactuar y modificar la función no sólo de las células cardíacas residentes como los cardiomiocitos, células del músculo liso vascular y células endoteliales, sino que también, la de las células circundantes como las células inmunes (linfocitos, monocitos, macrófagos) y llevar a cabo la reparación del daño cardíaco [8, 13, 14].

1.4. Resolvinas

Hoy en día, se reconoce 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 [15]. Esto mediante mecanismos de acción basados en agonistas endógenos antiinflamatorios y/o pro-resolutivos, denominados mediadores pro-resolutivos especializados (SPM) [16].

El descubrimiento de los SPM ofrece una nueva visión en el tratamiento de los trastornos inflamatorios. Los SPM son un grupo recientemente descubierto de mediadores químicos endógenos biosintetizados de manera transcelular y que fueron identificados en exudados inflamatorios. Incluyen cuatro familias distintas: lipoxinas (LX), resolvinas (Rv), protectinas (PD) y maresinas (MaR). Todos los SPM identificados hasta la fecha parecen estar involucrados en la resolución de la inflamación aguda. Actúan como potentes agonistas que pueden controlar la duración y la magnitud de la inflamación [16].

Las Rv son moléculas pequeñas, estereoespecíficas, que se producen a través de una interacción célula-célula entre células endoteliales/leucocitos y células endoteliales/neutrófilos durante la inflamación aguda. Se han categorizado en series D y E, debido a que derivan de los ácidos docosahexaenoico (DHA) y el eicosapentaenoico (EPA), respectivamente [17]. DHA y EPA a su vez son derivados de los ácidos grasos

esenciales ω 3 y son importantes componentes estructurales de los fosfolípidos, a los que se les atribuyen efectos antiinflamatorios y citoprotectores [18].

El nombre Rv es debido a su rol en la fase de resolución de la inflamación, la cual favorecen sin causar inmunosupresión al actuar como potentes agonistas que pueden controlar la duración y magnitud de la inflamación. Existe una gran cantidad de evidencia que indica que las Rv poseen poderosas acciones antiinflamatorias e inmunoregulatoras que incluyen el bloqueo de la producción de mediadores proinflamatorios y la regulación del tráfico de leucocitos. En este sentido, se ha observado *in vivo* que las Rv detienen la infiltración y transmigración de polimorfonucleares (PMN), además de reducir la expresión de citoquinas [16]. Investigaciones recientes, demuestran que las Rv no solo son más potentes que los tratamientos actuales con antiinflamatorios, sino que, además, su utilidad se extiende a diversos tejidos y/o patologías incluyendo: vascular, respiratorio, dérmico, renal, ocular, cáncer, fibrosis y cicatrización [19], pero poco se sabe de su utilidad a nivel cardíaco.

1.4.1. Resolvina D1

En los humanos se han identificado tres Rv de la serie D (RvD1, RvD2 y RvD3). La RvD1 es producida en exudados resolutivos *in-vivo* y es un producto de biosíntesis trans-celular entre leucocitos y células endoteliales. RvD1 se ha identificado en sangre y cerebro de ratas, como también en pescados. Su síntesis implica la acción de las enzimas 15-lipooxigenasa y 5-lipoxigenasa (15-LOX, 5-LOX) [20]. Otra vía para la biosíntesis de RvD1 es activada por aspirina que acetila a la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) que convierte DHA a 17R-HDHA. Luego, esta molécula es convertida por la 5-LOX para dar como producto AT-RvD1. La rápida conversión de RvD1 por la enzima eicosanoide oxidoreductasa a 8-oxo y 17-oxo-RvD1 disminuye en gran medida su bioactividad [21].

En PMN, la RvD1 se une a dos receptores acoplados a proteína G (GPCR): GPR32 y ALX/FPR2. Éstos receptores están asociados a la proteína G de tipo Gi/o según lo descrito previamente [22]. Las acciones pro-resolutivas se atribuyen principalmente a la activación de los receptores ALX/FPR2 y en humanos este receptor está altamente expresado en células inmunes, fibroblastos sinoviales, células

mesangiales, células endoteliales y células epiteliales [19]. Los receptores ALX/FPR2 y GPR32 pueden mediar selectivamente las acciones de RvD1 bajo diferentes condiciones. En términos de vías de señalización activadas por Rv, en macrófagos la RvD1 suprime el Ca^{2+} citosólico y disminuye la activación de calcio/calmodulina quinasa II (CaMKII) por activación de su receptor ALX/FPR2 [23]. Por otro lado, en fibroblastos pulmonares primarios humanos y cepas de células epiteliales tratadas con IL-1 β o poli (I: C), la RvD1 bloquea la fosforilación de ERK1/2 y también la translocación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) p65 [24]. Por otra parte, en células musculares lisas vasculares (VSMC) el tratamiento con el epímero AT-RvD1 indujo un aumento significativo en los niveles de cAMP y la actividad de PKA [25], mientras que el tratamiento de células de glándulas submandibulares de ratón con AT-RvD1 provocó la señalización intracelular de Ca^{2+} [26]. En células Goblets conjuntivales de rata RvD1 incrementó la secreción de mucina por aumento del Ca^{2+} intracelular [27], mientras que en células RAW264, similares a macrófagos murinos, previene la apoptosis por aumento de cAMP [28]. Estos resultados indican que en estos tipos celulares el receptor no estaría acoplado a proteína de tipo Gi/o, ya que la activación del FPR2 puede estimular distintas vías de transducción de señales, según el ligando y el tipo celular involucrado [29].

1.4.2. Resolvina E1

La RvE1 fue identificada originalmente en un exudado de inflamación en pata de ratones, un modelo de inflamación aguda. Mediante el análisis de espectrometría de masa en tándem con cromatografía líquida (LC-MS/MS) de los componentes derivados del exudado, se demostró la existencia de ácidos grasos monohidroxilados derivados de EPA, como 18-hidroxi-EPA (18-HEPE) y 5-HEPE, pero además mostraron un nuevo compuesto trihidroxilado, el 5,12,18 triHEPE, al que denominaron RvE1 [30].

La biosíntesis de RvE1 se realiza en forma transcelular entre células endoteliales y PMN. Se encuentra en el exudado a partir de ω 3, que es transportado al sitio de daño con la producción de edema durante la inflamación, y existen dos formas para concretarla [31]. La primera, es dependiente de aspirina y requiere un tratamiento con ésta en el sitio local de inflamación, para convertir EPA en 18R-HEPE y 15R-HEPE, vía COX-2 acetilada en células vasculares endoteliales. Estos ácidos grasos, son liberados

y rápidamente se convierten en RvE1 y 15-epi-LXA5, por acción de 5-LOX. La segunda forma es independiente de aspirina, y está controlada por la enzima CYP, donde EPA es convertido en 18-HEPE mediante oxidación alílica (actividad similar a LOX) y en ácido 17,18-epoxieicosapentaenoico (17,18-EEP) por epoxidación de olefinas [30].

La RvE1 se une a dos GPCR que se identificaron como ChemR23 y BLT1R (receptor de leucotrienos B4, LTB4). Ambos están presentes en diferentes tipos de células, como monocitos y células dendríticas para contrarregular la inflamación y promover la resolución. También se ha encontrado en fibroblastos sinoviales [32], queratinocitos [33], macrófagos y osteoblastos [34].

En células dendríticas y macrófagos el receptor ChemR23 está asociado a la proteína Gi/o y su mecanismo implica la inhibición de la proteína AC. Esto resulta en inhibición de la acumulación de cAMP y consecuentemente en disminución de la fosforilación de ERK1/2 y MAP kinasas [35].

Recientemente, se demostró que ChemR23 es necesario para las acciones antiproliferativas de RvE1 en fibroblastos cultivados de riñón. Este efecto es mediado por la inhibición de la activación sostenida de las vías ERK y AKT en respuesta a la estimulación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) [36]. Sin embargo, en células de ovario de hámster chino transfectadas con ChemR23 humano, RvE1 estimula la fosforilación de AKT y ERK pero no de p38-MAPK [37]. Además, en células H9c2 expuestas a hipoxia o hipoxia/reoxigenación, la RvE1 aumenta la actividad de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), atenúa la actividad de la caspasa-3 y aumenta la actividad de óxido nítrico sintetasa dependiente de Ca^{2+} [37]. En ensayos *in vivo* en ratones RvE1 limita el tamaño del infarto cuando se administra intravenosamente antes de la perfusión [38] y presenta efectos antiproliferativos en tejido renal [36].

También, la RvE1 interactúa como antagonista del receptor de leucotrieno B (BLT1R), expresado en PMN, para inhibir a la AC, inhibir la movilización de Ca^{2+} , inhibir la activación de NF- κ B y, en consecuencia, disminuir la infiltración de PMN, produciendo efectos opuestos a las señales proinflamatorias dependientes de BLT1R [39].

1.5. Receptor acoplado a proteína Gi/o

La versatilidad funcional del sistema de señalización mediado por la proteína G se basa en su arquitectura modular y en el hecho de que existen numerosos subtipos de proteínas G. Las subunidades α que definen las propiedades básicas de una proteína G heterotrimérica se pueden dividir en cuatro familias, $G\alpha_s$, $G\alpha_i / G\alpha_o$, $G\alpha_q / G\alpha_{11}$ y $G\alpha_{12} / G\alpha_{13}$ [40].

Las proteínas G de la familia Gi/o se expresan ampliamente en células del corazón, neuronas y células neuroendocrinas, entre otras. Se ha demostrado que las subunidades α de G_{i1} , G_{i2} y G_{i3} median la inhibición de varios tipos de AC. Debido a que los niveles de expresión de Gi y Go son relativamente altos, su activación da como resultado la liberación de cantidades relativamente altas de complejos $\beta\gamma$. La función de los miembros de la familia Gi/o se ha estudiado utilizando la *toxina pertussis* (PTX) de *Clostridium botulinum* que es capaz de ADP-ribosilar a la mayoría de los miembros de la familia $G\alpha_i/G\alpha_o$ cerca de sus extremos COOH, haciéndolo incapaz de interactuar con el receptor. Por lo tanto, el tratamiento con PTX da como resultado el desacoplamiento del receptor a la proteína G [40].

La activación del receptor acoplado a proteína Gi/o mediante su respectivo ligando lleva a una serie de acciones ejemplificadas en la Figura 1, donde se puede observar que la subunidad α_i inhibe a la proteína AC, lo que lleva a una disminución de los niveles de cAMP. Por otra parte, en contraste con otras proteínas G, los efectos de Go, que son particularmente abundantes en el sistema nervioso, parecen estar principalmente mediados por su complejo $\beta\gamma$ y se desconoce si la subunidad α_o puede regular directamente los efectores. Aquí, el complejo $\beta\gamma$ puede activar al canal de potasio rectificador hacia el interior regulado por proteína G (GIRK) y puede inhibir a los canales de Ca^{2+} tipo P/Q y N gatillados por voltaje, generando una serie de efectos fisiológicos según el tipo celular al que se refiera. Además, $\beta\gamma$ puede activar a la isoforma γ de la PI-3-quinasa (PI3K γ) y las isoformas β_2 y β_3 de la fosfolipasa C (PLC- β_2 , - β_3) [40, 41].

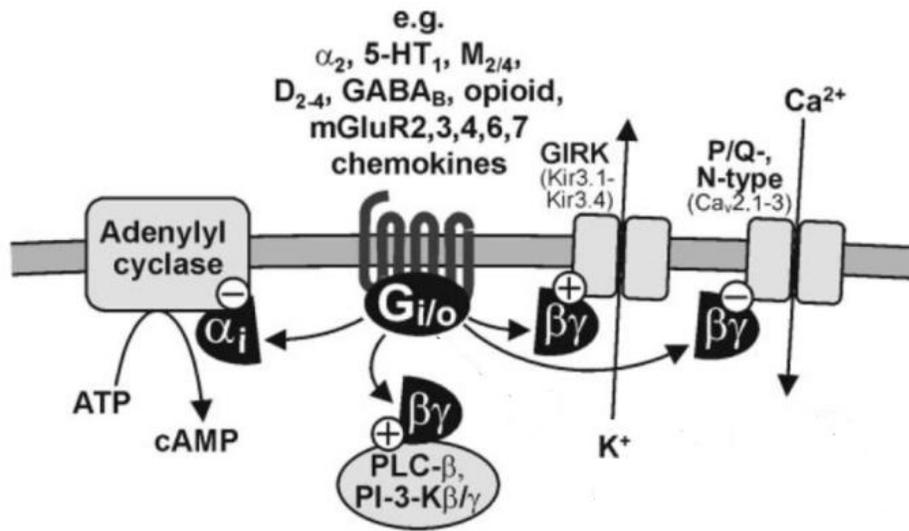


Figura 1. Vías de señalización del receptor acoplado a proteína Gi/o [40].

Algunos ejemplos de esta vía de señalización en el organismo son la adrenalina que actúa sobre los enlaces receptores α_2 acoplados a proteína Gi/o conduciendo a la contracción del músculo liso y la acetilcolina que actúa sobre los receptores M2 enlazados a Gi/o llevando a la relajación del músculo cardíaco, mediante la vía de señalización del cAMP [42].

1.6. Vías de señalización intracelular en FCs

Los FCs no solo modulan la homeostasis de la MEC, sino que también responden a señales químicas y mecánicas. Ellos expresan receptores a través de los cuales modulan la proliferación celular, muerte celular, autofagia, adhesión, migración, expresión de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y diferenciación a miofibroblastos cardíacos (MFCs) [8].

Los FCs poseen diferentes clases de receptores, y entre los más importantes en la regulación de sus funciones celulares están: A) Los receptores de cininas B1 y B2. Su estimulación mediante los respectivos agonistas, activan vías de señalización común que disminuyen la síntesis y secreción de colágeno a través de óxido nítrico y secreción de prostaciclina I_2 . B) El receptor β_2 adrenérgico (β_2 -AR). Su estimulación activa a la proteína kinasa A (PKA) y proteínas de intercambio activadas directamente por adenosin

monofosfato cíclico (EPAC), promoviendo efectos diferenciales asociados a disminución de la secreción de colágeno, proliferación y autofagia. C) Los receptores de angiotensina II (AT1R y AT2R). Su activación aumenta la síntesis de colágeno y estimula la proliferación celular; mientras que su sobreexpresión activa apoptosis. D) Receptores asociados a células inmunes como Toll like receptor 4, NLRP3 y el receptor de interferón. Su activación le permite a los FCs participar en la respuesta inflamatoria de la reparación cardíaca a través de la modulación de las funciones celulares descritas y a la liberación de citoquinas y quimioquinas [8].

1.6.1. Receptor β_2 adrenérgico y cAMP

A pesar de que el sistema adrenérgico juega un rol fundamental en la regulación de la circulación en situación fisiológica y que los receptores α y β son parte del tejido cardíaco, los FCs solo expresan el receptor β_2 adrenérgico (β_2 -AR). Esto fue demostrado a través del estudio de radioligandos [43, 44]. Además, con el uso de isoproterenol (ISO), un agonista β no selectivo, se observó el incremento de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) por esta vía. Pero, al usar un antagonista selectivo β_2 , y no con el antagonista selectivo β_1 atenolol, se observó una disminución de cAMP [8].

La estimulación del β_2 -AR, produce efectos independientes de cAMP, vía kinasa regulada por señal extracelular 1/2 (ERK1/2). Por otra parte, al activar la proteína adenilato ciclasa (AC) mediante la proteína Gs, incrementa los niveles del segundo mensajero cAMP. Este último controla la actividad de la proteína kinasa A (PKA) y la proteína de intercambio activada directamente por cAMP (EPAC), responsables de respuestas celulares como proliferación, diferenciación, secreción de proteínas de MEC, migración y transporte de iones. La vía dependiente de cAMP está implicada en la autofagia y el cAMP es un modulador crítico de la proliferación celular y de la inhibición de la síntesis de colágeno [8]. Además, EPAC y PKA promueven la adhesión a fibronectina del FC, regulan su migración y morfología e inhiben la síntesis de colágeno inducida por el factor de crecimiento transformante β_1 (TGF- β_1). Un incremento en los niveles de cAMP puede inhibir la diferenciación de FC a MFC causada por TGF- β_1 [45]. Por otra parte, los FCs de ratones tratados con ISO muestran acumulación tiempo

dependiente de interleukina 6 (IL-6), mediado por un incremento de cAMP, donde no están involucrados ni PKA, ni EPAC [46].

1.6.2. Receptor de angiotensina II y Ca²⁺

En el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS), la angiotensina II (Ang II) es el efector principal, regula la presión sanguínea y el volumen corporal extracelular, además de otras funciones fisiológicas como aumentar la secreción de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH), reabsorción tubular de Na⁺, y síntesis y secreción de aldosterona. En corazones hipertensos, Ang II induce el crecimiento de los cardiomiocitos y promueve la fibrosis cardíaca [8].

La Ang II activa dos receptores, ambos presentes en FCs, llamados AT1R y AT2R. La activación del AT1R induce proliferación celular e incrementa la síntesis de proteínas de la MEC. La hipertensión o infarto cardíaco promueve la expresión de AT1R en FCs, asociado a fibrosis. Por otra parte, el AT2R se expresa en FCs, pero su sobreexpresión no induce cambios en la viabilidad celular [8].

La unión específica de Ang II al AT1R activa varias vías de señalización intracelular, donde la vía de la proteína Gq/11 que activa a la fosfolipasa C (PLC), y por cascada de señalización a la proteína kinasa C (PKC), además de aumentar el Ca²⁺ intracelular citosólico, es la más estudiada [8]. En adición, los núcleos de FCs poseen sitios de unión AT1R y AT2R que están acoplados a la movilización de Ca²⁺ intranuclear y la liberación de NO, respectivamente [47]. En FCs la sobreexpresión de AT1R causa apoptosis inducida por Ang II, efecto que se inhibe al incubarse con inhibidores de PLC y PKC. Por otra parte, Ang II promueve el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante activación de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa y desencadena proliferación y síntesis de colágeno I, lo que lleva a fibrosis e hipertrofia cardíaca. Además, el AT1R promueve la activación de la vía de señalización proteína kinasa activada por mitógeno (MAPK), que induce la proliferación de FCs y la expresión de factores profibróticos. También, Ang II a través de AT1R incrementa la síntesis y secreción de TGF-β1, lo que se ha asociado a fibrosis cardíaca y efectos antiinflamatorios, a pesar de que el AT1R promueve la inflamación en tejido cardíaco a través de síntesis y secreción del factor de necrosis tumoral α (TNF-α) [8]. Finalmente,

el AT2R ejerce, generalmente, acciones opuestas al AT1R, a través de la producción de óxido nítrico y la activación de fosfatasa que inhiben las funciones de la vía MAPK. Además, se ha observado que es beneficioso en ratas hipertensas, disminuyendo la fibrosis y disfunción cardíaca [48].

1.7. Resolvinas en el fibroblasto cardíaco

Hasta la fecha los únicos resultados de Rv en FCs son los que se han realizado en el laboratorio, en los que se demostró que las Rv D1 y E1 por sí mismas no muestran efectos a nivel de proliferación y de citotoxicidad. Sin embargo, en una condición proinflamatoria, esto es FCs estimulados con LPS, se observó una disminución en la adhesión de células mononucleares de bazo sobre FCs, lo que se debería a una disminución en los niveles de expresión de las proteínas ICAM-1 y VCAM-1 [49, 50]. Además, no hay información disponible respecto de si los FCs expresan los receptores ALX/FPR2 y Chem23, y menos aún respecto de los cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+} y cAMP al estimular con Rv. Sin embargo, se han publicado trabajos sobre algunos de sus efectos en fibroblastos gingivales [51], periodontales [23], pulmonares [24], renales [19] y en células NIH3T3 [52].

Como los fibroblastos poseen identidad posicional, es decir, su morfología y función se relaciona con el órgano del cual provienen y la ubicación en la que se encuentran en ese órgano en particular. Esto último deriva de requerimientos biofísicos diversos, haciéndolos diferentes en términos de proliferación, síntesis de colágeno, expresión de metaloproteinasas, contractilidad y función inmunomoduladora [53, 54]. Lo que ocurre en otros fibroblastos no necesariamente ocurrirá en FCs y esto hace necesario responder a las preguntas de si los FCs expresan los receptores para las Rv, si ello es así, cuáles son las vías de señalización de las Rv en éstos. Lo anterior permitirá conocer sus efectos y proporcionar una nueva herramienta farmacológica que permita mitigar la inflamación crónica y prevenir la fibrosis cardíaca.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, se plantea la siguiente hipótesis:

2. HIPÓTESIS

Los fibroblastos cardíacos poseen los receptores ALX/FPR2 y ChemR23, y su estimulación, por RvD1 y RvE1, disminuye las señales intracelulares de cAMP y Ca^{2+} inducidas por isoproterenol y angiotensina II, respectivamente.

3. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que los fibroblastos cardíacos poseen los receptores de las Resolvinas D1 y E1, y que su estimulación disminuye las señales intracelulares de cAMP y Ca^{2+} inducidas por isoproterenol y angiotensina II, respectivamente.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demostrar que los FCs de ratas neonatas poseen los receptores ALX/FPR2 y ChemR23 para RvD1 y RvE1, respectivamente.
- Demostrar que RvD1 y RvE1 disminuyen la concentración de cAMP intracelular en presencia de ISO, en FCs de ratas neonatas.
- Demostrar que RvD1 y RvE1 disminuyen la concentración de Ca^{+2} intracelular en presencia de Ang II, en FCs de ratas neonatas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Suero fetal bovino (FBS), tripsina/EDTA, estándar de peso molecular y compuestos orgánicos e inorgánicos se adquirieron en Merck (Darmstadt, Germany). Reactivos para quimioluminiscencia (ECL) se compraron en PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Material de plástico estéril se obtuvo en Corning Inc. (New York, USA). Anticuerpo primario monoclonal ChemR23 (H-6) (sc-398769) mouse se adquirió en Santa Cruz Biotechnology Inc. (Texas, USA). Anticuerpo primario policlonal FPR2 (720293) rabbit se adquirió de Invitrogen (Massachusetts, USA). Anticuerpo secundario Anti-mouse IgG-HRP (sc-2005) se adquirió en Santa Cruz Biotechnology Inc. (Texas, USA). Anticuerpo secundario Anti-rabbit IgG HRP se compró a Cell Signaling Technology (MI, USA). Angiotensina II humana, heparán sulfato de riñón bovino, Isoproterenol clorhidrato (I-5627) y Bradford Reagent se adquirieron de Sigma-Aldrich (Missouri, USA). LPS-EB Ultrapure (E. coli O111:B4), se compró en InvivoGen (San Diego, CA). Colagenasa tipo II (CAS 9001-12-1) y Trypan Blue Stain (CAS 15250-061) se compraron a Life Technologies Corporation (CA, USA). RvD1 (CAS 872993-05-0) y RvE1 (CAS 552830-51-0) se compraron a Cayman Chemical Company (MI, USA). La sonda FLUO4-AM (F14201) se adquirió de ThermoFisher Scientific (Massachusetts, USA). El kit ELISA para cuantificar cAMP se adquirió de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI).

5.2. Modelo animal

Se utilizó cultivo primario de FCs provenientes de ratas neonatas Sprague Dawley (1-3 días de vida), obtenidas desde el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. El manejo de dichos animales se realizó de acuerdo con el protocolo establecido por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Todos los estudios fueron desarrollados cumpliendo la Guía de la NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, actualizada en el 2011 [55].

5.3. Obtención de fibroblastos cardíacos

Se utilizó el procedimiento descrito previamente [56]. Las ratas neonatas se decapitaron e inmediatamente se les removió el corazón bajo condiciones de asepsia. Se separaron las aurículas de los ventrículos y estos últimos se homogenizaron en condiciones asépticas y se sometieron a digestión en solución de colagenasa 0,005% y pancreatina 0,05% a 37°C. Luego, se realizó un plaqueo del producto de la digestión por 2 horas a 37°C en medio de cultivo que contenía suero fetal bovino (FBS) 5% y suero fetal de ternero (FCS) 10%. La adhesión diferencial de los FCs en plástico permitió aislarlos de los cardiomiocitos. Al término de 2 horas, se realizó un cambio de medio por DMEM-F12 con FBS 10%, y se dejaron proliferar los FCs hasta confluencia en placas de cultivo de 100 mm que se mantuvieron con 5% de CO₂ y 95% de oxígeno a 37°C. Los cambios de pasaje se realizaron mediante tripsinización, lo que permite la purificación de los FCs neonatos con respecto a células endoteliales.

5.4. Pasaje celular

Para la realización de todos los experimentos, las células se mantuvieron en pasaje 1 (hasta pasaje 2 como máximo) en medio DMEM/F12 suplementado con FBS 10%, hasta esperar confluencia. Posteriormente, las células se soltaron con tripsina/EDTA 0,05% en PBS 1x estéril y contadas por el método de exclusión de Azul de tripán. Las células ya contadas se sembraron en placas plásticas de cultivo celular de 35 mm (con cubre-objeto) a una concentración de 150.000 cél/pocillo para los ensayos Ca²⁺ y 450.000 cél/pocillo en placas plásticas de cultivo de 60 mm para los ensayos de cAMP y para la determinación de las proteínas FPR2 y ChemR23 en medio DMEM/F12 suplementado con FBS 10%. Se esperó 24 horas para que las células se adhirieran a la placa y luego, se lavaron y privaron con medio de cultivo DMEM/F12 por 24 horas para asegurar que las células se detuvieran en fase G₀/G₁ del ciclo celular.

5.5. Determinación de movimientos de Ca²⁺ intracelular

Los FCs se cultivaron en cubreobjetos. En estas condiciones, se cargaron con una sonda sensible a Ca²⁺, Fluo-4AM (4,4 µM), durante 30 minutos a 37°C. Las células se lavaron con solución Krebs (NaCl 145 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2,6 mM, MgCl₂ 1 mM,

Hepes-Na 10 mM, glucosa 5,6 mM, pH 7,4) para sacar el exceso de sonda. Posteriormente, las células se conservaron en 500 μ L de esta solución y se estimularon con 25 μ L de vehículo, Ang II, RvD1 y RvE1 a las concentraciones correspondientes. A través de microscopia confocal 40x se observaron cambios en la fluorescencia de la sonda debido a movilización de Ca^{2+} intracelular a longitudes de onda de Excitación/Emisión de 494/506 nm. Las imágenes se analizaron utilizando el programa Image J (Bethesda, MD).

5.6. Determinación de niveles de cAMP intracelular

Los niveles de cAMP se determinaron mediante el kit ELISA desarrollado por Cayman Chemical Company. Los FCs se estimularon con vehículo, ISO, RvD1, RvE1 y WRW4 por 10 min en duplicado. Transcurrido el tiempo, se eliminó el medio de las células y se agregó 80 μ L de HCl 0,1 N cuidando de cubrir toda la placa. Luego de 20 min de incubación a temperatura ambiente, se llevaron las muestras a tubos plásticos y se centrifugó (1000 x g) a 4° C. El sobrenadante se recuperó en un tubo plástico y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford [57]. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso. Para usar el kit, se utilizó el procedimiento descrito por el fabricante para lisados celulares [58].

5.7. Preparación de extractos de proteínas totales

Se prepararon extractos de proteínas totales para evaluar los niveles de FPR2, ChemR23 y β -tubulina en respuesta a los diferentes tratamientos experimentales Ang II, LPS y HS. Luego de 24 horas de estímulo, las células se lavaron tres veces con PBS frío y luego se lisaron con 60 μ L de buffer de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,2; EDTA 5 mM; NaCl 150 mM; Tritón X-100 1%(v/v); SDS 0,1% (v/v); deoxicolato 1%; inhibidores de proteasas y fosfatasa). El homogenizado se sonicó por 5 minutos y luego se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante o extracto de proteínas se recuperó en un tubo plástico y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford [57] empleando 2 μ L de muestra. Por otra parte, la muestra de proteínas restantes se denaturaron en buffer de carga 4x (glicerol 20%, β -mercaptoetanol 20%, SDS 5%, 125 mM Tris y 0,1% azul de bromofenol, pH 6,8) y se

calentaron a 100° C para completar la desnaturalización. Luego, las muestras se almacenaron a -20°C.

5.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación y resolución de las proteínas de acuerdo con su masa se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con 30-50 µg de extracto proteico. Los geles concentradores (3 mL de upper buffer 4x [Tris base 30 g, HCl pH 6,8; 20 mL de dodecilsulfato sódico 10%, 500 mL agua destilada] + 8 mL de acrilamida/bis-acrilamida [145 g de acrilamida + 5 g de bis - acrilamida, 500 mL de agua destilada] + 150 µL de persulfato de amonio 10% + 30 µL de tetrametiletilendiamina + 9,5 mL de agua destilada para dos geles) y separadores (5 mL de lower buffer 4x [Tris base 90 g, HCl pH 8,8, 20 mL de dodecilsulfato sódico 10% + 500 mL de agua destilada) + 8 mL acrilamida/bis-acrilamida [145 g de acrilamida + 5 g de bis - acrilamida, 500 mL de agua destilada] + 150 µL de persulfato de amonio 10% + 30 µL de tetrametiletilendiamina + 7 mL de agua destilada para 2 geles) fueron de 5% y 12%, respectivamente. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 100 V en amortiguador de electroforesis 1x (Tris base 30,25 g, glicina 144 g, dodecilsulfato sódico 10 g, agua 1000 mL para amortiguador de electroforesis) durante aproximadamente 120 minutos.

5.9. Electrotransferencia

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, USA) de 0,2 µm de poro. La electrotransferencia se realizó durante 90 minutos a una corriente constante de 350 mA en amortiguador 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, 1000 mL agua destilada]), sumergida en hielo.

5.10. Western Blot

Una vez transferidas las proteínas a las membranas, estas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con amortiguador de bloqueo (TBS; Tween-20 0,1% (TBS-T) + leche descremada 5% p/v). Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos

primarios toda la noche a 4°C en amortiguador de incubación (TBS-T 0,1%) con agitación suave. Las diluciones de los anticuerpos fueron FPR2 1:1000, ChemR23 1:500.

Después, las membranas se lavaron durante 3 veces por 5 min en TBS-T al 0,1% y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo (1:5000) anti-IgG de conejo o ratón conjugado con peroxidasa según correspondiera, en amortiguador de bloqueo TBS-T al 0,1%.

Se utilizó ECL para la inmunodetección en equipo LI-COR (Nebraska, USA). Los niveles de proteína fueron determinados mediante densitometría utilizando el software Image Studio Digits (Nebraska, USA).

Después de realizada la detección de las proteínas de interés, se sometió a las membranas de nitrocelulosa nuevamente al proceso de bloqueo, para ser incubadas con anticuerpo primario para β -tubulina (1:5000), de igual manera que fueron incubados los anteriores anticuerpos primarios, para ser utilizadas como control de carga y normalizar los niveles de proteínas.

5.11. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados mediante promedio \pm error estándar (SEM) de al menos tres experimentos independientes ($n \geq 3$), y con figuras representativas dependiendo del caso. Los datos obtenidos se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, para comparaciones múltiples, ANOVA de una vía y prueba de Tuckey, para comparaciones entre tres o más grupos y test Dunnet para comparaciones de grupos versus control; lo que permitió determinar la significancia estadística de los resultados. Se consideró $p < 0,05$ como significativo y se utilizó el software GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA) para los análisis estadísticos.

6. RESULTADOS

6.1. Evaluación de la presencia de receptores ALX/FPR2 y ChemR23 en fibroblastos cardíacos

Primero, se evaluaron los niveles proteicos de los receptores de las RvD1 y RvE1, ALX/FPR2 y ChemR23 respectivamente, mediante WesternBlot en presencia/ausencia de distintos estímulos pro-inflamatorios como Ang II, LPS y HS, ya que en la literatura no hay nada descrito sobre estos receptores en FCs.

Los resultados graficados en la Figura 2 muestran que los receptores se encuentran en los FCs de ratas neonatas. Por otra parte, la Figura 2A muestra que al agregar distintos estímulos pro-inflamatorios no hubo aumento del receptor FPR2 en FCs; mientras que en la Figura 2B solo se observó una tendencia al aumento de la presencia del receptor ChemR23 al estimular con Ang II.

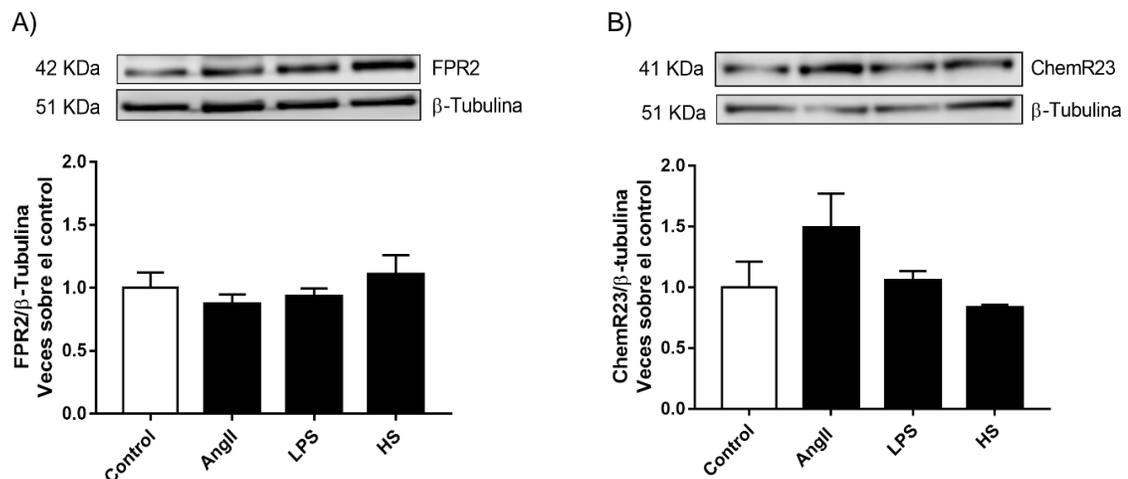


Figura 2. Presencia de receptores ALX/FPR2 y ChemR23 en fibroblastos cardíacos de ratas neonatas.

FCs se estimularon con Ang II (1 μ M), LPS (1 μ g/mL) o HS (10 μ g/mL) por 24 horas en DMEM-F12. A) Expresión de ALX/FPR2; B) Expresión de ChemR23. En la parte superior se muestran fotografías representativas y en la parte inferior el análisis gráfico. Los niveles proteicos se determinaron mediante Western-blot. Como control de carga se utilizó β -tubulina. El resultado es representativo de 3 experimentos independientes (n=3). Los datos se expresan como promedio \pm SEM.

6.2. Evaluación del efecto de las Resolvinas D1 y E1 en los niveles de cAMP intracelular

A continuación, para obtener información sobre la vía de señalización intracelular de los receptores de la RvD1 y RvE1, se evaluó el efecto de éstas sobre los niveles de cAMP con un kit ELISA. FCs privados de suero se incubaron 10 min con RvD1 o RvE1 (0,1 μ M) en presencia/ausencia de ISO (10 μ M) y WRW4 (antagonista selectivo de FPR2) (10 μ M).

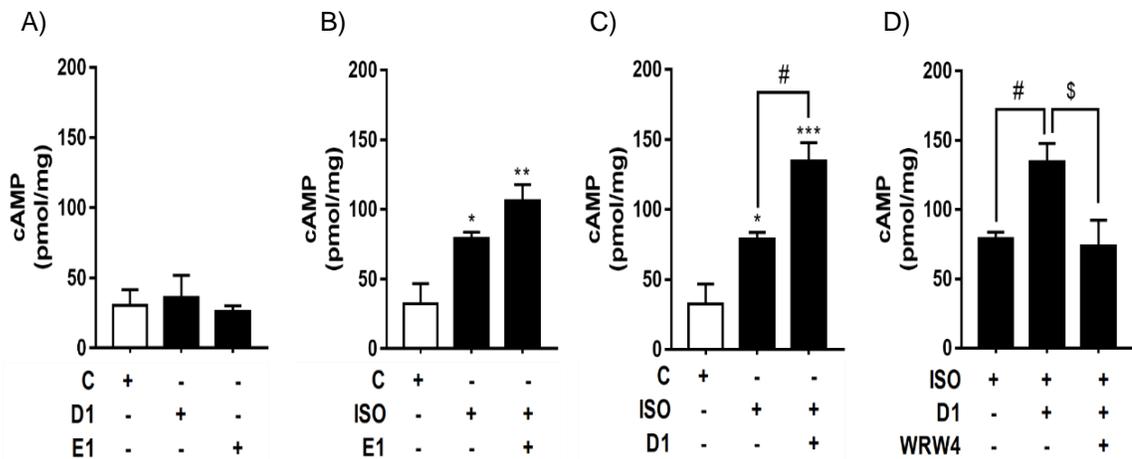


Figura 3. Efecto de las Resolvinas D1 y E1 en los niveles de cAMP en fibroblastos cardíacos de ratas neonatas.

FCs privados de suero se incubaron 10 minutos con RvD1 o RvE1 (0,1 μ M) en presencia/ausencia de ISO (10 μ M), WRW4 (antagonista selectivo de FPR2) (10 μ M). A) FCs se incubaron con RvD1 o RvE1. B-C) FCs se incubaron con ISO con o sin RvD1 o RvE1. D) FCs se incubaron con ISO con o sin RvD1 en presencia/ausencia de WRW4. Los niveles de cAMP se midieron con kit ELISA. Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes (n=4). Los datos se expresan como promedio \pm SEM. *p<0,05, **p<0,01 and ***p<0,001 vs. Ctrl; #p<0,05 vs. ISO; \$p<0,05 vs. D1+ISO.

De esta forma se determinó la influencia de las Rv en los niveles de cAMP inducidos con ISO. Teniendo en antecedente que cAMP es un segundo mensajero que refleja la activación de los receptores acoplados a proteína Gs por actividad de la subunidad G α , y que esta activación ocurre en una fase temprana. El tiempo al cual se

colectaron las muestras de estudio fue a los 10 minutos luego de su estimulación, tiempo elegido en base a antecedentes bibliográficos [59, 60, 61].

Los resultados graficados en la Figura 3A muestran que, por sí solas, las Rv no produjeron aumento de los niveles de cAMP intracelular, mientras que ISO aumentó de manera significativa la producción de cAMP (Fig. 3B-C). Sin embargo, en la Figura 3C y 3D, se observa que las Rv potenciaron la respuesta inducida por ISO, aumentando los niveles de cAMP en relación al estímulo solo por ISO. Cabe destacar que la potenciación de la respuesta es significativa solo en el caso de la RvD1, mientras que con la RvE1 solo se observó una tendencia al aumento de los niveles de cAMP.

Posteriormente, para evaluar si el aumento del nivel de cAMP intracelular producido por ISO en presencia RvD1 que se muestra en la Figura 3C, se produjo por estimulación del receptor ALX/FPR2, se estimuló en presencia del antagonista selectivo del receptor FPR2, el péptido WRW4. La Figura 3D muestra que, al estimular con ISO en presencia de RvD1 y WRW4, los niveles de cAMP disminuyeron a valores semejantes a los producido solo por ISO.

6.3 Evaluación del efecto de las Resolvinas D1 y E1 en los niveles de Ca²⁺ citosólico.

Luego, para evaluar el efecto de las Rv en los niveles de Ca²⁺ citosólico y nuclear se utilizó microscopía confocal, preincubando las células con FLUO-4AM (4,4 μM), sonda sensible a Ca²⁺ que permite identificar movimientos o incrementos relativos del Ca²⁺ intracelular. Aquí, por una parte, se estimuló con Rv y, por otra, se utilizó Ang II, ya que se sabe que mediante el receptor AT1 induce el aumento del Ca²⁺ intracelular por la vía canónica transduccional proteína Gq-Fosfolipasa C-receptores de IP₃ [8]. Por tanto, exploramos si existían diferencias en el comportamiento de los movimientos rápidos de Ca²⁺ inducidos por Ang II en presencia de Rv.

Cabe destacar que las cinéticas de estimulación con vehículo, Rv y Ang II se repiten en las Figuras 4 a 6 sólo con fines comparativos.

En la Figura 4A se muestran las cinéticas obtenidas cuando se estimularon los FCs con vehículo, RvD1 (0,1 μM), RvE1 (0,1 μM), Ang II (0,1 μM) y Ang II en presencia

de Rv con diferencias de tiempo entre cada estímulo. Tras la estimulación con vehículo no se observó cambio en la fluorescencia de la señal de Ca^{2+} ; mientras que con Ang II se observó un aumento tanto en la fluorescencia relativa de la señal de Ca^{2+} , como en la amplitud y en el área bajo la curva en comparación al control y a las Rv solas (Figuras 4B y 4C). Además, con las Rv solas se observó un leve aumento en la fluorescencia relativa de la sonda correspondiente a una señal de Ca^{2+} , pero al observar la amplitud de la señal (Figura 4B) y el área bajo la curva (Figura 4C) se muestra que no hubo diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros con respecto al control.

Por otra parte, al agregar Rv y 1 minuto después agregar Ang II, se observó que solo con la RvE1 hubo una disminución de la señal de Ca^{2+} intracelular inducida por Ang II, lo que se vio reflejado en una disminución de la amplitud de la señal (Figura 4B) y del área bajo la curva (Figura 4C) con respecto al estímulo de Ang II.

En forma adicional, se realizó el mismo ensayo, pero con una diferencia de 2 minutos entre el estímulo de Rv y Ang II (Figura 5), y no se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre la curva de fluorescencia relativa de Ca^{2+} intracelular, amplitud ni área bajo la curva en comparación a Ang II. Sin embargo, los resultados fueron diferentes respecto de la pre-estimulación con RvE1 durante un minuto en presencia de Ang II.

Finalmente, se realizó un ensayo similar, pero estimulando inicialmente con Ang II y después de 25 segundos con Rv (Figura 6). Los resultados muestran una leve tendencia al aumento del área bajo la curva con ambas Rv respecto a Ang II (Figura 6C), pero ésta no fue estadísticamente significativa.

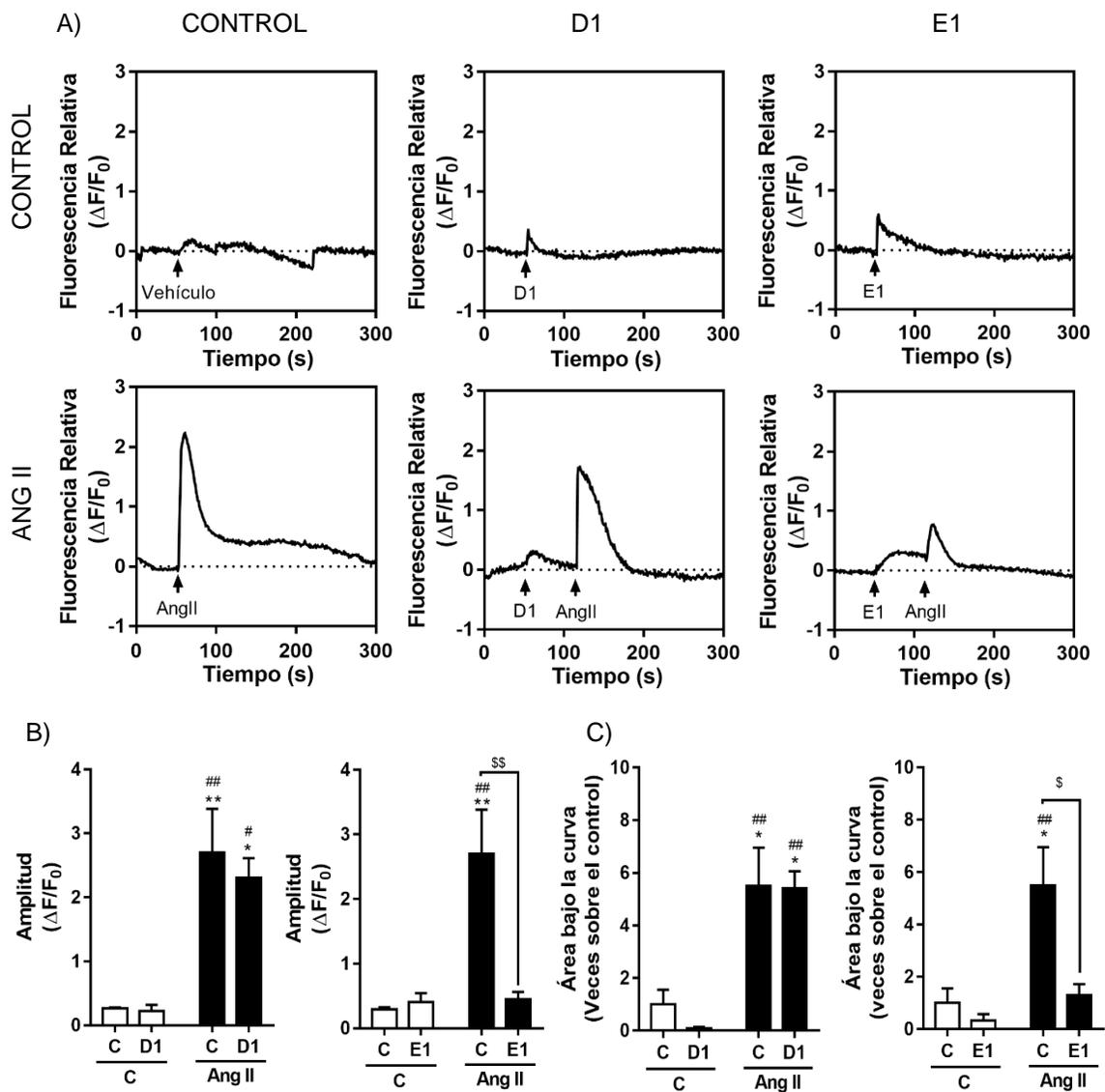


Figura 4. Efecto de la estimulación con Resolvinas D1 y E1 en la liberación de Ca^{2+} citosólico en fibroblastos cardíacos de ratas neonatas 1 minuto previo a Ang II.

FCs se incubaron por 30 minutos con la sonda FLUO-4AM y se estimularon con vehículo, Ang II (0,1 μ M), RvD1 (0,1 μ M), RvE1 (0,1 μ M) y Rv 1 minuto antes de Ang II. A) Imágenes representativas de las señales de Ca^{2+} citoplasmático. B) Amplitud de la curva de fluorescencia relativa de las señales de Ca^{2+} . C) Área bajo la curva de las señales de Ca^{2+} . Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes (n=3), donde se analizaron 5-15 células. Los datos están expresados como promedio \pm SEM. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs. Ctrl.; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ vs. Rv respectivas; § $p < 0,05$ y §§ $p < 0,01$ vs. Ang II.

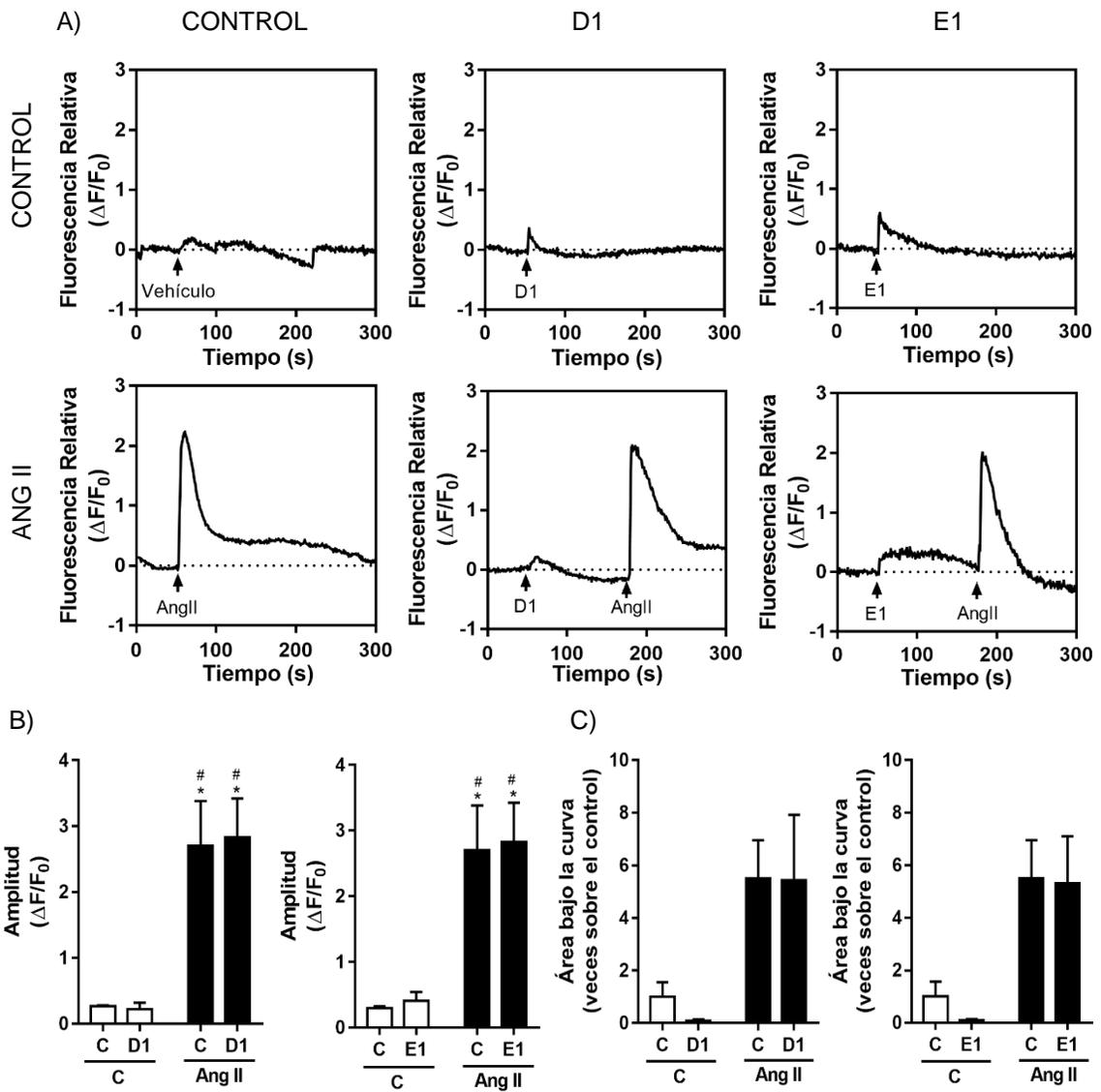


Figura 5. Efecto de la estimulación con Resolvinas D1 y E1 en la liberación de Ca^{2+} citosólico en fibroblastos cardíacos de ratas neonatas 2 minutos previo a Ang II.

FCs se incubaron por 30 minutos con la sonda FLUO-4AM y se estimularon con vehículo, Ang II (0,1 μ M), RvD1 (0,1 μ M), RvE1 (0,1 μ M) y Rv 2 minutos antes de Ang II. A) Imágenes representativas de las señales de Ca^{2+} citoplasmático. B) Amplitud de la curva de fluorescencia relativa de las señales de Ca^{2+} . C) Área bajo la curva de las señales de Ca^{2+} . Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes (n=3), donde se analizaron 5-15 células. Los datos están expresados como promedio \pm SEM. *p<0,05 vs. Ctrl.; #p<0,05 vs. Rv respectivas.

6.4. Evaluación del efecto de las Resolvinas D1 y E1 en los niveles de Ca²⁺ nuclear

Para evaluar el efecto de las Rv en las señales de Ca²⁺ nuclear se utilizaron los mismos experimentos anteriores, solo que se analizaron imágenes obtenidas desde la zona nuclear.

Las cinéticas de estimulación con vehículo, Rv y Ang II se repiten en las Figuras 7 a 9 sólo con fines comparativos.

En la Figura 7A se muestran las cinéticas de Ca²⁺ obtenidas frente a los distintos estímulos. Tras la estimulación con vehículo no se observó cambio en la fluorescencia de la señal de Ca²⁺. Después de la estimulación con Ang II se observó un aumento en la fluorescencia relativa de la señal de Ca²⁺, así como también en la amplitud y en el área bajo la curva. (Figuras 7B y 7C). Además, con las Rv solas, se observó un leve aumento en la fluorescencia relativa de la sonda correspondiente a una señal de Ca²⁺, pero al observar la amplitud de la señal (Figura 7B) y el área bajo la curva (Figura 7C) se muestra que no hubo diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros con respecto al control.

Por otra parte, al agregar Rv y 1 minuto después agregar Ang II, se observó que solo con la RvE1 hubo un aumento de la señal de Ca²⁺ intracelular inducida por Ang II, lo que se ve reflejado en un aumento estadísticamente significativo de la amplitud de la señal (Figura 7B), pero no del área bajo la curva (Figura 7C).

En forma adicional, se realizó el mismo ensayo, pero con una diferencia de 2 minutos entre el estímulo de Rv y Ang II (Figura 8). Los resultados muestran que hubo una tendencia al aumento del área bajo la curva de Ang II en presencia de ambas Rv en comparación a Ang II (Figura 8C).

Finalmente, se realizó un ensayo similar, pero estimulando con Ang II y después de 25 segundos con Rv (Figura 9). Los resultados muestran que solo se observó una tendencia al aumento del área bajo la curva para Ang II en presencia de ambas Rv en comparación a solo con Ang II (Figura 9C), pero ésta no fue estadísticamente significativa.

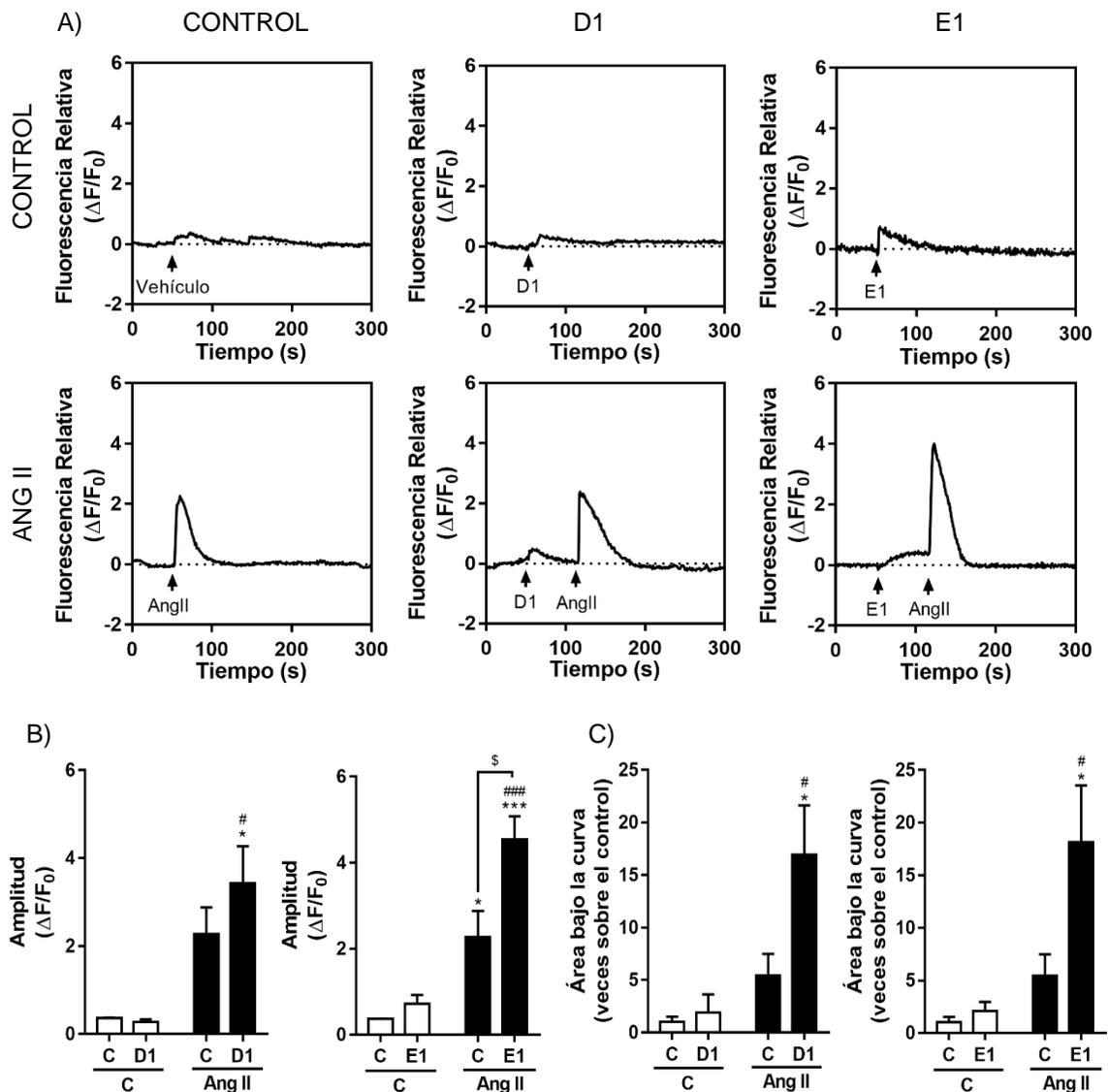


Figura 7. Efecto de la estimulación con Resolvinas D1 y E1 en la liberación de Ca^{2+} nuclear de fibroblastos cardíacos de ratas neonatas 1 minuto previo a Ang II.

FCs se incubaron por 30 min con la sonda FLUO-4AM y se estimularon con vehículo, Ang II (0,1 μ M), RvD1 (0,1 μ M), RvE1 (0,1 μ M) y Rv 1 minuto antes de Ang II. A) Imágenes representativas de las señales de Ca^{2+} nuclear. B) Amplitud de la curva de fluorescencia relativa de las señales de Ca^{2+} . C) Área bajo la curva de las señales de Ca^{2+} . Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes (n=3), donde se analizaron 5-15 células. Los datos están expresados como promedio \pm SEM. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ vs. Ctrl.; # $p < 0,05$ y ### $p < 0,001$ vs. Rv respectivas; § $p < 0,05$ vs. Ang II.

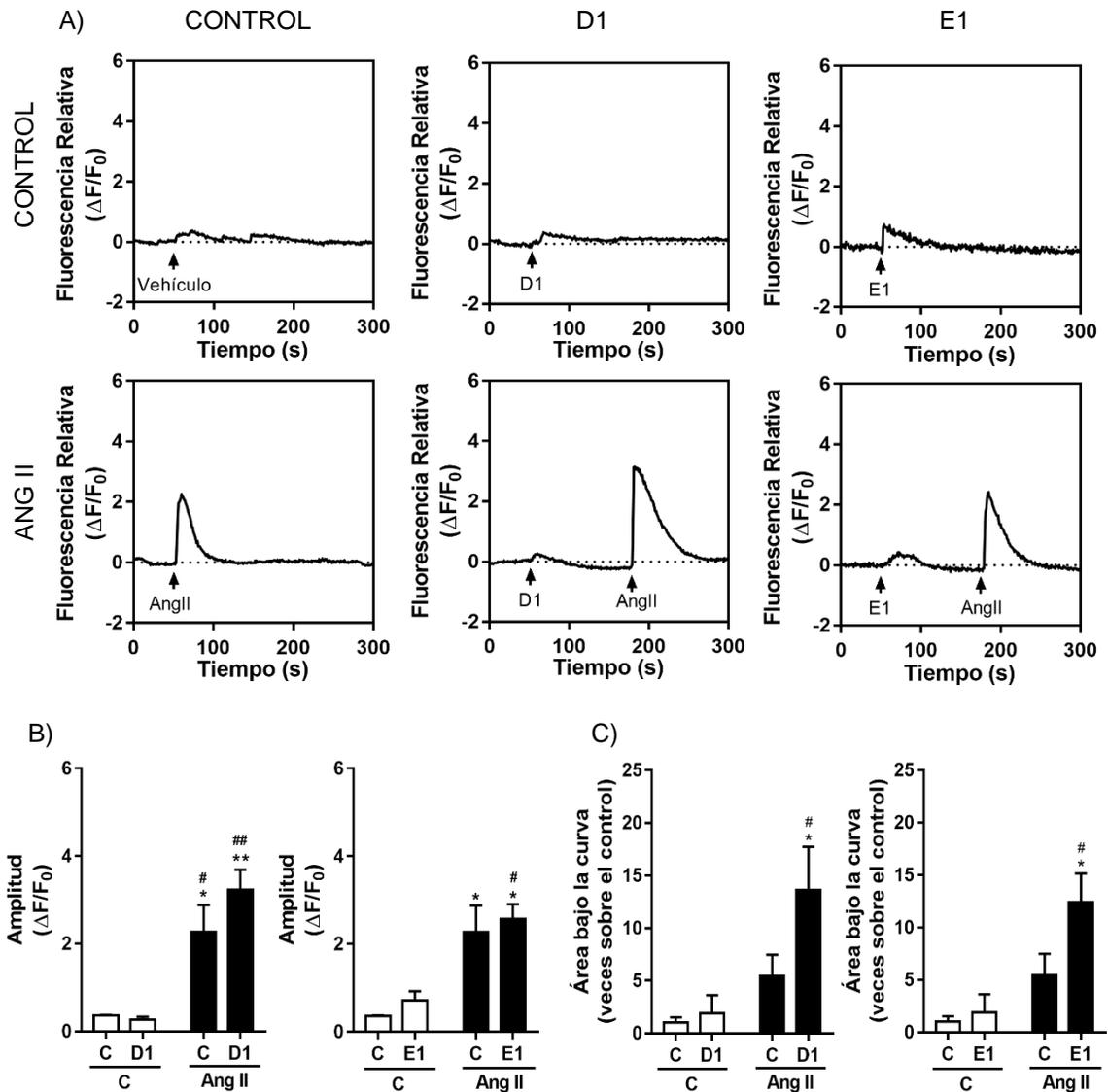


Figura 8. Efecto de la estimulación con Resolvinas D1 y E1 en la liberación de Ca^{2+} nuclear en fibroblastos cardíacos de ratas neonatas 2 minutos previo a Ang II.

FCs se incubaron por 30 minutos con la sonda FLUO-4AM y se estimularon con vehículo, Ang II (0,1 μ M), RvD1 (0,1 μ M), RvE1 (0,1 μ M) y Rv 2 minutos antes de Ang II. A) Imágenes representativas de las señales de Ca^{2+} nuclear. B) Amplitud de la curva de fluorescencia relativa de las señales de Ca^{2+} . C) Área bajo la curva de las señales de Ca^{2+} . Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes (n=3), donde se analizaron 5-15 células. Los datos están expresados como promedio \pm SEM. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs. Ctrl.; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ vs. Rv respectivas.

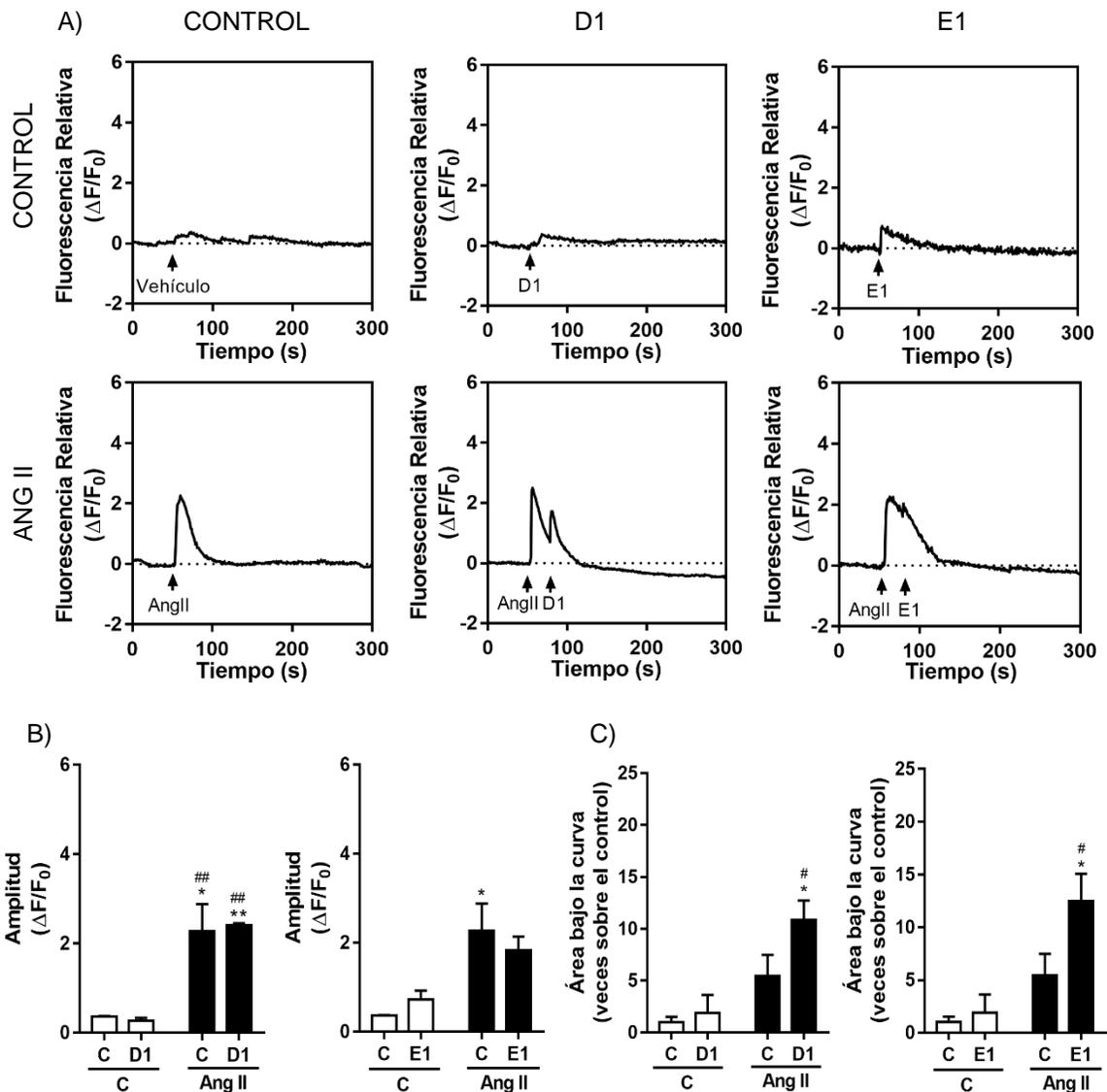


Figura 9. Efecto de la estimulación con Resolvinas D1 y E1 en la liberación de Ca^{2+} nuclear en fibroblastos cardíacos de ratas neonatas 25 segundos posterior a Ang II.

FCs se incubaron por 30 minutos con la sonda FLUO-4AM y se estimularon con vehículo, Ang II (0,1 μ M), RvD1 (0,1 μ M), RvE1 (0,1 μ M) y Rv 25 segundos después de Ang II. A) Imágenes representativas de las señales de Ca^{2+} nuclear. B) Amplitud de la curva de fluorescencia relativa de las señales de Ca^{2+} . C) Área bajo la curva de las señales de Ca^{2+} . Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes (n=3), donde se analizaron 5-15 células. Los datos están expresados como promedio \pm SEM. *p<0,05 y **p<0,01 vs. Ctrl.; #p<0,05 y ##p<0,01 vs. Rv respectivas.

7. DISCUSIÓN

Los FCs participan de forma muy activa en la respuesta inflamatoria cardíaca que se origina como consecuencia de un daño tisular, y se denominan células centinelas de la inflamación por su capacidad de responder de forma eficiente a través de la secreción de citoquinas y quimioquinas que favorecen el reclutamiento de leucocitos a la zona de daño [8]. Luego de esto, es necesario resolver el proceso inflamatorio para retornar a la homeostasis. Es aquí donde los mediadores especializados pro-resolutivos toman importancia, ya que se ha demostrado que en fibroblastos gingivales, periodontales, pulmonares y renales las Rvs tienen propiedades antiinflamatorias y pro-resolutivas de la inflamación [19, 23, 24, 51].

Hasta la fecha, no existe evidencia sobre la expresión de los receptores de las Rv ni sobre sus vías de señalización en FCs, pero la literatura indica que, en células del sistema inmune, sus receptores están acoplados a proteínas del tipo Gi/o [22, 35]. Por ello, se investigó la presencia de los receptores de la RvD1 y RvE1, ALX/FPR2 y ChemR23, respectivamente, en FCs de ratas neonatas y se evaluaron sus niveles proteicos en presencia de los estímulos pro-inflamatorios Ang II, LPS y HS. Además, se estudió la vía de señalización intracelular activada por RvD1 y RvE1 midiendo niveles de cAMP en presencia de ISO y señales de Ca^{2+} en presencia de Ang II.

Los principales resultados señalan que los receptores ALX/FPR2 y ChemR23 están presentes en FCs de ratas neonatas, y que sus niveles proteicos no cambian por los estímulos pro-inflamatorios agregados. Además, los niveles de cAMP no se modificaron por las Rv solas, pero RvD1 incrementó los niveles de cAMP inducidos por ISO de manera dependiente de su receptor ALX/FPR2, y la RvE1 tuvo una tendencia a incrementar los niveles de cAMP inducidos por ISO. Finalmente, las Rv produjeron señales intracelulares de Ca^{2+} citosólico y nuclear y, solo la RvE1, redujo la amplitud y área bajo la curva de las señales de Ca^{2+} citosólico y aumentó la amplitud de la señal de Ca^{2+} nuclear inducida por Ang II al agregarla 1 minuto previo a Ang II.

7.1. Evaluación de la presencia de receptores ALX/FPR2 y ChemR23 en fibroblastos cardíacos

Los resultados muestran que los receptores ALX/FPR2 y ChemR23, de la RvD1 y RvE1, respectivamente, están presentes en FCs de ratas neonatas. En la literatura no hay información publicada sobre la presencia de estos receptores en FCs, pero datos de nuestro laboratorio indican que estos receptores también se encuentran en FCs de ratas adultas. Además, se sabe que el receptor ALX/FPR2 está presente en células inmunes, fibroblastos sinoviales, células mesangiales, células endoteliales y células epiteliales, entre otras [19]. Además, el receptor ChemR23 se ha descrito en células dendríticas, macrófagos [35] y en fibroblastos de riñón [36]. Sin embargo, se han publicado trabajos sobre los efectos de las Rv en fibroblastos gingivales [51], periodontales [23], pulmonares [24], renales [19] y en células NIH3T3 [52], indicando que estos tipos celulares también podrían poseer los receptores de las Rv.

Por otra parte, al haberse establecido la presencia del receptor, buscamos estudiar si se induce su presencia mediante los estímulos pro-inflamatorios Ang II, LPS y HS. Nuestros resultados muestran que, al tiempo estudiado, estas moléculas no cambian los niveles de las proteínas ALX/FPR2 y ChemR23. Este resultado no concuerda con lo esperado, ya que al aplicar estímulos pro-inflamatorios, se esperaba que los receptores de estos mediadores especializados pro-resolutivos se indujeran para mantener la homeostasis del sistema, lo cual no ocurrió a las 24 horas de estímulo. Sin embargo, los niveles proteicos podrían cambiar al evaluar otros tiempos. Hasta la fecha no hay resultados publicados que relacionen la expresión de estos receptores con Ang II ni HS, solo hay trabajos que describen su relación con LPS, una endotoxina glicolipídica derivada de la membrana externa de las bacterias gramnegativas que incita una respuesta altamente inflamatoria [62]. Respecto a esto, se ha observado que en células de microglía humana el LPS produce *up-regulation* del receptor ALX/FPR2 [63]; mientras que en macrófagos M1 aumenta la expresión del mRNA de ChemR23 a las 48 horas [64], y en neutrófilos humanos la estimulación con LPS por 1 hora, incrementó los niveles de ERV-1/ChemR23 [65]. Además, en células de microglía murinas, LPS aumentó la expresión del mRNA de ALX/FPR2 a las 6 horas del estímulo y la expresión del gen de ChemR23 a las 24 horas [66]. Por lo tanto, al comparar nuestros resultados

con lo obtenido en la literatura, podemos decir que la inducción de los niveles de los receptores de las Rv o el mRNA depende del tipo celular involucrado [66]. Finalmente, estos datos nos permiten ver que es necesario evaluar los niveles de las proteínas a distintos tiempos de estímulos, ya que el tiempo de inducción de los niveles proteicos o del mRNA de los receptores es diferente en cada tipo celular evaluado.

7.2. Evaluación del efecto de las Resolvinas D1 y E1 en los niveles de cAMP intracelular

Nuestros resultados mostraron que en FCs de ratas neonatas la estimulación con RvD1 y RvE1, por sí solas, no altera los niveles de cAMP. Estos resultados concuerdan con datos de nuestro laboratorio observados en FCs de ratas adultas. Sin embargo, nuestros resultados no concuerdan con datos bibliográficos que indican que los receptores de estas Rv estarían acoplados a proteínas del tipo Gi/o [22, 35], las que mediante la subunidad $G\alpha_i$ inhiben a la proteína AC, lo que lleva a una disminución de los niveles de cAMP [42]. Por lo tanto, nuestros resultados descartarían que los receptores ALX/FPR2 y ChemR23 en FCs de ratas neonatas estén acoplados a este tipo de proteínas. Sin embargo, RvD1 en combinación con ISO potenció la respuesta adrenérgica aumentando en aproximadamente un 50% los niveles de cAMP, mientras que RvE1 en combinación con ISO solo presentó una tendencia al aumento de los niveles de cAMP. Además, al estimular en presencia del antagonista selectivo del receptor FPR2, el péptido WRW4, se obtuvo que los niveles de cAMP disminuyen a valores semejantes a los producido solo por ISO, indicando que la potenciación de la respuesta adrenérgica es gatillada por activación del receptor ALX/FPR2.

Este efecto podría ser explicado si el receptor ALX/FPR2 estuviese acoplado a proteína del tipo Gq, ya que datos bibliográficos indican que en FCs la co-estimulación de receptores asociados a las proteínas efectoras Gs-Gq lleva a un mayor aumento en los niveles de cAMP, pues al menos otros dos receptores acoplados a esta vía (P2Y y Ang II) son capaces de inducir una potenciación similar en los niveles de AMPc inducidos por ISO [59].

Resultados anteriores de nuestro laboratorio muestran efecto sinérgico de bradicinina (BK) sobre la señalización de ISO e indican que este resultado es gatillado

vía Gq-PLC-CaMKII [67]. Resultados similares se han observado en FCs de rata adulta, donde la inhibición de PLC elimina el efecto sinérgico de Ang II o UTP sobre la respuesta inducida por ISO. Además, la sobreexpresión de Gq mostró aumentar dicha potenciación. Por otro lado, utilizando inhibidores de PKC calfostina C y estaurosporina, se demostró que PKC no participa en un mayor aumento en los niveles de cAMP [60].

Por otra parte, se ha demostrado que la quelación del Ca^{2+} intracelular, un segundo mensajero clave de la vía Gq, resultó en la atenuación de dicha potenciación. Al utilizar tapsigargina y ionomicina, agentes farmacológicos que aumentan directamente el Ca^{2+} intracelular, también se potenció la acumulación de cAMP inducidas por ISO. Por otro lado, utilizando inhibidores del complejo Ca^{2+} -calmodulina el efecto sinérgico sobre cAMP se disminuyó de forma significativa [60]. En relación a este punto, utilizando un inhibidor de CaMK-II, una serina/treonina proteína kinasa regulada por el complejo Ca^{2+} -calmodulina [68] que es necesaria para la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y para la recaptación de este en los cardiomiocitos [69], se previno el aumento en la producción de cAMP inducido por ISO en presencia de BK, indicando que esta proteína juega un papel preponderante en los efectos sinérgicos.

Por lo tanto, para comprobar esta hipótesis sería interesante estudiar los mediadores intracelulares activados por RvD1 que participarían en el aumento potenciado de los niveles de cAMP, lo que se podría realizar utilizando un inhibidor de la PLC, U73122; un inhibidor de la CaMKII, KN93; y un inhibidor de la PKC, GÖ6983. También se podría utilizar un quelador del Ca^{2+} intracelular para ver si se atenúa la potenciación en los niveles de cAMP y utilizar agentes farmacológicos que aumenten el Ca^{2+} intracelular, como ionomicina o tapsigargina, para ver si el efecto se potencia.

7.3. Evaluación del efecto de las Resolvinas D1 y E1 en los niveles de Ca^{2+} intracelular

Para ver el efecto de las RvD1 y RvE1 en los niveles de Ca^{2+} intracelular y estudiar las vías de señalización de sus respectivos receptores, las células se incubaron con una sonda sensible a Ca^{2+} . Resultados anteriores de nuestro laboratorio demostraron que en FCs de rata adulta es posible evaluar movimientos de Ca^{2+} intracelular utilizando la sonda FLUO-3AM para evaluar la estimulación con Ang II 100

nM [43] y en FCs de ratas neonatas se ha demostrado, mediante la sonda FLUO-4AM, movimientos de Ca^{2+} intracelular inducidos por activación de los receptores de cininas [70]. Por lo tanto, se utilizó la sonda FLUO-4AM porque se sabe que con ella es posible evaluar movimientos de Ca^{2+} intracelular en FCs de ratas neonatas.

Además, se utilizó Ang II para evaluar las vías de señalización porque está descrito que Ang II, a través de AT1R, activa a la proteína Gq/11, la que activa a la PLC aumentando Ca^{2+} intracelular citosólico, y por cascada de señalización a la PKC [8]. En adición, los núcleos de FCs poseen al AT1R que está acoplado a la movilización de Ca^{2+} intranuclear, la cual produce el incremento en la transcripción mediante la activación de receptores de IP_3 (IP3R). Los IP3R son una familia de canales permeables a Ca^{2+} que comprenden 3 isoformas localizadas en la envoltura nuclear [47]. Es por ello, que también quisimos evaluar lo que sucedía a nivel nuclear con éste ión. Además, a nivel transcripcional se han delineado al menos tres mecanismos mediante los cuales el Ca^{2+} se encontraría regulando el proceso de expresión génica: a) activación de cascadas que llevan a fosforilaciones y desfosforilaciones que modifican las propiedades transactivantes de factores de transcripción o afectan la estructura del nucleosoma, b) interacciones proteína-proteína entre sensores de Ca^{2+} y factores de transcripción, c) cambios inducidos por Ca^{2+} en las propiedades de unión de sensores de Ca^{2+} a sitios específicos en el DNA [71, 72].

La amplitud es la diferencia entre la fluorescencia relativa inicial del *peak* y su máximo en la señal de Ca^{2+} intracelular, y ésta daría cuenta del máximo de señal de Ca^{2+} alcanzada frente a un estímulo. Por otra parte, el área bajo la curva es la integración de la señal de Ca^{2+} intracelular y nos acerca a conocer el movimiento total de Ca^{2+} intracelular en el tiempo. Éstos son parámetros que se utilizan para caracterizar la respuesta celular y establecer relaciones concentración-respuesta frente a diferentes estímulos [73]. Aunque en este caso, con la sonda FLUO-4AM, solo se puede evaluar fluorescencia relativa y no la concentración de las señales de Ca^{2+} intracelulares, igual se utilizaron para describir las señales.

Los resultados de las cinéticas de Ca^{2+} citosólico y nuclear mostraron que ambas Rv eran capaces de producir movimientos de Ca^{2+} intracelular. Este resultado no fue

estadísticamente significativo en términos de amplitud, ya que sólo se observó una tendencia mayor respecto al control, y el área bajo la curva de los movimientos de Ca^{2+} citosólicos tendió a ser menor que el control porque a pesar de que las señales de las Rv tuviesen amplitud mayor, éstas volvieron rápidamente a los niveles basales en comparación al vehículo. Por ello, la amplitud y el área bajo la curva de la señal de Ca^{2+} inducido por las Rv fue muy inferior a la alcanzada con Ang II. Esto pudo deberse al uso de una sonda no adecuada a los niveles de Ca^{2+} liberados por estimulación con las Rv. La constante de afinidad (Kd) de la sonda FLUO-4AM es de 345 nM [74], y una sonda más afín como la FURA-2, con una Kd de 140 nM [75], podría haber reflejado mejor los leves aumentos de Ca^{2+} producidos por las Rv. Esta diferencia es particularmente importante si desea medir las variaciones de Ca^{2+} alrededor de la concentración basal y si no está tan interesado en el aumento máximo de éste ion, ya que con FURA-2 podría medir con precisión los niveles de Ca^{2+} en reposo y pequeñas subidas de éste como las observadas con las Rv, aunque se podría saturar rápidamente, pero con FLUO-4 podría medir una elevación de Ca^{2+} más grande, como las observadas con Ang II, con una saturación más baja y con dificultades para medir los niveles de Ca^{2+} en reposo [74, 75]. En consecuencia, las señales de Ca^{2+} intracelular producidas por las Rv, podrían ser explicadas si ALX/FPR2 y ChemR23 se encontraran acoplados a proteínas del tipo Gi/o [22, 35], donde la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína Go podría activar a las isoformas $\beta 2$ y $\beta 3$ de la PLC [40]. Pero, contrariamente a lo indicado, se ha visto que el tratamiento de células de glándulas submandibulares de ratón con AT-RvD1 provocó aumento de la señalización intracelular de Ca^{2+} [26] y en células goblets conjuntivales de rata, la RvD1 y la RvE1, incrementaron la secreción de mucina por aumento del Ca^{2+} intracelular [27, 76]. En estas células, tanto el receptor ALX/FPR2 como el ChemR23, estarían acoplados a proteínas del tipo Gq. Con estos datos se puede ver que los receptores de las Rv pueden tener diversas vías de señalización según el tipo celular involucrado. Además, las señales de Ca^{2+} intracelular indicadas por las cinéticas, serían capaces de explicar el efecto sinérgico de la RvD1 sobre la liberación de cAMP inducido por ISO. Como se ha descrito anteriormente, si hay liberación de Ca^{2+} citosólico mediante activación de la proteína Gq, ésta puede interactuar con el receptor acoplado a proteína Gs activada por ISO en FCs [60, 67].

Posteriormente, al agregar Rv y un minuto después agregar Ang II, los resultados muestran que solo con la RvE1 hay cambios en la señal de Ca^{2+} intracelular inducida por Ang II, lo que se ve reflejado en disminución de la amplitud y el área bajo la curva, mientras que con RvD1 no se observan diferencias. Esto indicaría que su receptor podría estar acoplado a proteína del tipo Go, lo que podría coincidir con lo visto al estimular los FCs con RvE1 donde se observó un pequeño aumento de Ca^{2+} intracelular, aunque ello no fue significativo. Además, con respecto al Ca^{2+} nuclear, la RvE1 muestra un aumento en la amplitud y área bajo la curva de la señal de Ca^{2+} inducida por Ang II, lo que se podría deber a un comportamiento sinérgico. En consecuencia, al consultar la literatura no se encontraron resultados que permitieran explicar lo sucedido, indicando que faltan más estudios para evaluar el origen de la disminución de la señal de Ca^{2+} citosólica y el aumento en la señal de Ca^{2+} nuclear; aunque, respecto a esta última, podríamos especular que al igual que con Ang II [47], podría haber activación de IP3R en el núcleo, lo que permitiría obtener estos aumentos de Ca^{2+} , ya que la literatura indica que datos bioquímicos y electrofisiológicos son consistentes con la presencia de éstos receptores en la envoltura nuclear interna de algunas células [77]. Por otra parte, los resultados con la RvD1 difieren de los obtenidos con la RvE1, pero esto puede deberse a que son ligandos distintos que interaccionan con receptores diferentes y, por ende, no necesariamente tendrán las mismas vías de señalización.

Adicionalmente, al realizar el ensayo con una diferencia de 2 minutos entre los estímulos de Rv y Ang II, no se ve la disminución en la señal de Ca^{2+} inducida por Ang II que se demuestra en los resultados de 1 minuto de diferencia entre estímulos, y esto podría deberse a que las vías de recaptación de Ca^{2+} actúan rápidamente y alcanzan a normalizar los leves aumentos de Ca^{2+} intracelular producidos por ambas Rv antes de estimular con Ang II. Este resultado se podría explicar con lo encontrado en la literatura porque, como la supervivencia celular depende de la homeostasis del Ca^{2+} , los flujos de Ca^{2+} durante las reacciones de apagado coinciden exactamente con los de las reacciones de encendido [78]. En esta misma línea, respecto a la dinámica y homeostasis del Ca^{2+} celular, los estímulos inducen la entrada de Ca^{2+} externo y la formación de segundos mensajeros que liberan Ca^{2+} interno almacenado dentro del RE desde el IP3R y el receptor de rianodina (RyR), éste último especialmente en células

excitables. Una pequeña proporción de este Ca^{2+} se une a los efectores que activan varios procesos celulares. Durante las reacciones de apagado, el Ca^{2+} es recaptado por varios intercambiadores y bombas. El intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) sacan Ca^{2+} hacia el exterior celular, mientras que la Ca^{2+} -ATPasa del RE (SERCA) bombea Ca^{2+} de vuelta al RE. Además, las mitocondrias también tienen una función activa durante el proceso de recuperación, ya que secuestran el Ca^{2+} rápidamente a través de un uniportador, y luego este Ca^{2+} se libera más lentamente en el citosol para ser tratado por la SERCA y PMCA [78]. Por otra parte, en FCs humanos la actividad de Ca^{2+} está mediada por vías de señalización que incluyen IP3R, SERCA, NCX y PMCA, pero no los RyR [79].

Al estimular con Ang II y después de 25 segundos con Rv, los resultados mostraron una leve tendencia al aumento del área bajo la curva con ambas Rv en presencia de Ang II, pero ésta no fue estadísticamente significativa. Respecto a este modelo, podemos decir que no sería adecuado para evaluar aumentos de Ca^{2+} en la célula, ya que el cambio inducido por la Ang II no se acaba de resolver antes de agregar las Rv. Pero, en las señales de Ca^{2+} citosólica y nuclear, se observa que la cinética de la RvE1 parece ser más rápida que la de la RvD1. Por esto, la señal Ca^{2+} inducida por Ang II decae antes de observar el *peak* con RvD1, cosa que no alcanza a suceder con RvE1. Por otra parte, estas señales de Ca^{2+} podrían explicarse porque los niveles de Ca^{2+} inducidos por Ang II podrían sensibilizar al IP3R antes de estimular con Rv, ya que se sabe que el IP_3 y Ca^{2+} son los principales reguladores del IP3R [80].

Además, cabe mencionar que no se realizaron experimentos para caracterizar el origen de la señal de Ca^{2+} , es decir, si fue de origen intracelular o extracelular. Tampoco sabemos la magnitud de la señal. Por lo tanto, se sugiere utilizar la sonda FURA-2 para evaluar los leves incrementos en el nivel de Ca^{2+} intracelular inducido por las Rv. Para evaluar la vía de entrada de Ca^{2+} se puede utilizar medio externo sin Ca^{2+} . Para evaluar la movilización por depósitos intracelulares de Ca^{2+} se puede utilizar ácido ciclopiazónico, un inhibidor de la SERCA; U73122, un inhibidor de PLC y 2-amino-etoxidifenil borato (2-APB), inhibidor de IP3R. Finalmente, para evaluar el sistema de extracción de Ca^{2+} hacia el medio extracelular, se puede utilizar un bloqueador de PMCA, como carboxieosina, o un bloqueador de NCX, como Ni^{2+} [79].

Por último, podemos destacar que, a pesar de que ambas Rv poseen vías de señalización intracelulares similares en un inicio, al aumentar levemente los niveles de Ca^{2+} intracelular y los niveles de cAMP inducidos por ISO, los mecanismos posteriores gatillados no se comparten, según lo observado solo con la RvE1 en los niveles de Ca^{2+} citosólicos y nucleares inducidos por Ang II. Esto se puede deber a que, aunque ambas Rv poseen estructuras químicas similares, actúan en distintos receptores, los cuales pueden tener vías de señalización intracelulares diferentes y generar efectos diversos. Y esto ya se ha visto anteriormente en FCs de ratas neonatas donde RvD1 y RvE1 disminuyeron la expresión de moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 inducidas por LPS, pero sólo la RvD1 fue capaz de disminuir la secreción de citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 y MCP-1 inducidas por LPS y la secreción de IL-10, citoquina antiinflamatoria e inmunomoduladora [81]. Además, en cultivos de células goblet conjuntivales de rata y humanos, ambas Rv producen aumentos de Ca^{2+} intracelulares, pero solo la RvD1, transactiva al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) para estimular aumento de Ca^{2+} intracelular y secreción de glicoconjugados [82].

7.4. Esquema resumen de los efectos diferenciales en las vías de señalización intracelulares de las RvD1 y RvE1.

En la Figura 10 se muestran, de manera esquemática, los resultados obtenidos al estudiar las vías de señalización intracelular activadas por los receptores de las RvD1 y RvE1, ALX/FPR2 y ChemR23, respectivamente.

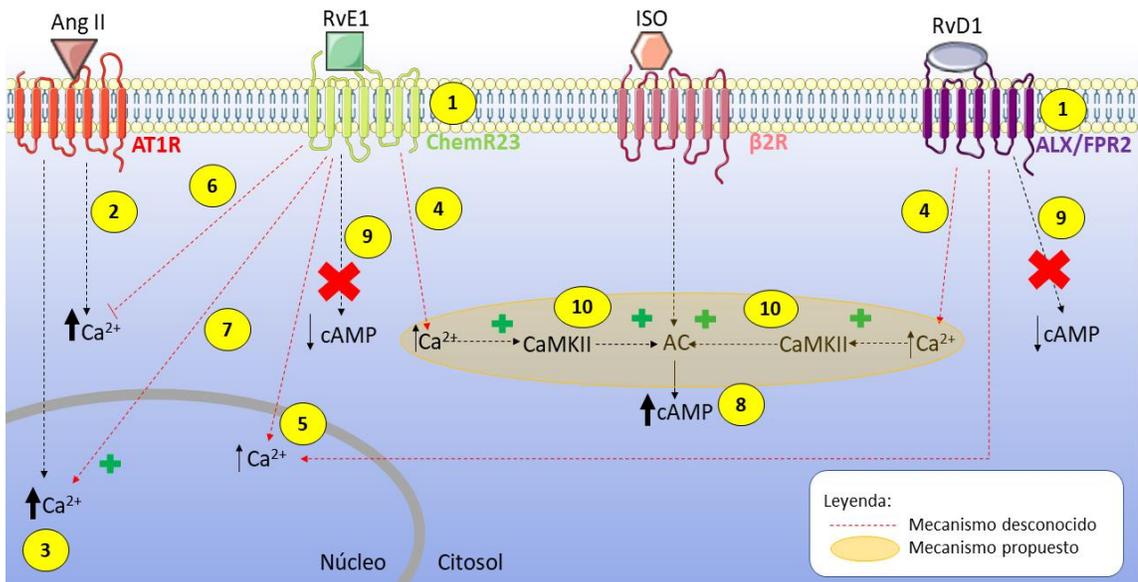


Figura 10. Esquema resumen de los efectos diferenciales en las vías de señalización intracelulares de las RvD1 y RvE1.

Los resultados obtenidos en cultivo celular de FCs de ratas neonatas indican que: 1) Los receptores ALX/FPR2 y ChemR23 se encuentran presentes, 2-3) Ang II produce señales de Ca²⁺ citosólico y nuclear. 4-5) Las Rv producen leves señales de Ca²⁺ citosólico y nuclear. 6-7) La RvE1 disminuye la señal de Ca²⁺ citosólica y potencia la señal nuclear inducida por Ang II. 8) El estímulo con ISO aumenta el cAMP intracelular. 9) Las Rv no producen disminución de los niveles de cAMP intracelular; y 10) Los aumentos de Ca²⁺ intracelular podrían activar a CaMKII y ésta a su vez, activar a la AC para potenciar la respuesta adrenérgica del ISO.

8. CONCLUSIONES

El objetivo fundamental de la presente investigación fue demostrar que los fibroblastos cardíacos poseen los receptores de las Resolvinas D1 y E1, y que su estimulación disminuye las señales intracelulares de cAMP y Ca^{2+} inducidas por isoproterenol y angiotensina II, respectivamente.

En consecuencia, se logró demostrar que los FCs de ratas neonatas poseen los receptores ALX/FPR2 y ChemR23, de las RvD1 y RvE1, respectivamente; y que sus niveles proteicos no se ven alterados en presencia de los estímulos pro-inflamatorios Ang II, LPS y HS al tiempo estudiado. Además, con respecto al estudio de las vías de señalización intracelulares, no se logró demostrar que RvD1 y RvE1 disminuyeran la concentración de cAMP intracelular en presencia de ISO, ya que la RvD1 incrementó los niveles de cAMP inducidos por ISO y este efecto fue dependiente de su receptor, y la RvE1 tendió a producir el mismo efecto. Sin embargo, las Rv por sí solas, no disminuyeron los niveles de cAMP. Por otra parte, se demostró parcialmente que RvD1 y RvE1 disminuyen la señal de Ca^{2+} intracelular en presencia de Ang II, ya que en las cinéticas de Ca^{2+} , en términos de fluorescencia relativa, se observaron movimientos de Ca^{2+} , aunque la amplitud de la señal no haya sido significativa. También, la RvE1 redujo la amplitud y el área bajo la curva de la señal de Ca^{2+} citosólica y aumentó la amplitud de la señal de Ca^{2+} nuclear inducida por Ang II.

Por lo tanto, la hipótesis propuesta se cumplió de manera parcial y, a pesar de que ambas Rv poseen vías de señalización similares en un inicio, los mecanismos gatillados de manera posterior no se comparten.

Finalmente, en su conjunto, los resultados obtenidos nos muestran que, en los FCs, las vías de señalización gatilladas por las Rv son distintas. Lo anterior tomaría relevancia en presencia de Ang II, puesto que sólo la RvE1 moduló la amplitud de la señal de Ca^{2+} , lo que podría indicar que sólo esta Rv podría mitigar y/o prevenir la fibrosis cardíaca inducida por este péptido.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Organización Mundial de la Salud, «Enfermedades cardiovasculares,» 2018. [En línea]. Available: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/. [Último acceso: 2018 11 30].
- [2] Organización Panamericana de la Salud, «Prioridades para salud cardiovascular en las Américas,» Washington D.C., 2011.
- [3] Ministerio de Salud, «Mes del corazón,» Gobierno de Chile, 4 agosto 2017. [En línea]. Available: <http://web.minsal.cl/mes-del-corazon-2017/>. [Último acceso: 27 febrero 2018].
- [4] Organización Mundial de la Salud, «Información general sobre la hipertensión en el mundo, Día mundial de la Salud 2013,» 2013. [En línea]. Available: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/87679/WHO_DCO_WHD_2013.2_spa.pdf;jsessionid=07A4B5E32FE3C8EB12AC5E2395F56D19?sequence=1. [Último acceso: 30 11 2018].
- [5] E. Lira, «Impacto de la Hipertensión arterial como factor de riesgo cardiovascular,» *Revista Médica Clínica Las Condes*, vol. 2, nº 26, pp. 156-163, 2015.
- [6] Departamento de Epidemiología, «Encuesta Nacional de Salud 2016-2017. Primeros Resultados,» 2017. [En línea]. Available: http://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17_PRIMEROS-RESULTADOS.pdf. [Último acceso: 30 11 2018].
- [7] A. P. Beltrami y P. Madeddu, «Pericytes and cardiac stem cells: Common features and peculiarities,» *Pharmacological Research*, vol. 127, pp. 101-109, 2018.
- [8] G. Díaz-Araya, R. Vivar, C. Humeres, P. Boza, S. Bolivar y C. Muñoz, «Cardiac fibroblasts as sentinel cells in cardiac tissue: Receptors, signaling pathways and cellular functions,» *Pharmacological Research*, nº 101, pp. 30-40, 2015.

- [9] K. Porter y N. Turner, «Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodelling,» *Pharmacology & therapeutics*, vol. 2, nº 31, pp. 255-278, 2009.
- [10] Y. Zheng, S. Gardner y M. Clarke, «Cell death, damage-associated molecular patterns, and sterile inflammation in cardiovascular disease,» *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, nº 12, pp. 2781-6, 2011.
- [11] D. Fairweather, M. Petri, M. Coronado y L. Cooper , «Autoimmune heart disease: role of sex hormones and autoantibodies in disease pathogenesis,» *Expert Review of Clinical Immunology*, vol. 3, nº 8, pp. 269-84, 2012.
- [12] N. Turner y K. Porter, «Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction,» *Fibrogenesis Tissue Repair*, vol. 6, nº 1, p. 5, 2013.
- [13] S. Van Linthout, K. Miteva y C. Tschöpe, «Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells,» *Cardiovascular Research*, vol. 102, nº 2, pp. 258-269, 2014.
- [14] W. Zhang, X. Xu, R. Kao, T. Mele y P. Kvietys, «Cardiac Fibroblasts Contribute to Myocardial Dysfunction in Mice with Sepsis: The Role of NLRP3 Inflammasome Activation,» *PLoS ONE*, vol. 9, nº 9, 2014.
- [15] P. Sepúlveda Mayorga, «Resolvina D1 y Resolvina E1 inhiben la activación de AKT, ERK1/2 y NF-kB dependiente de LPS y previenen la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en fibroblastos cardíacos de ratas adultas,» Tesis de pregrado. Universidad de Chile, Santiago, 2018.
- [16] C. Serhan, «Systems approach to inflammation resolution: identification of novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators,» *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 7, nº 1, pp. 44-48, 2009.
- [17] J. Haeggstrom, «Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease,» *Chemical Reviews*, nº 111, pp. 5866-5898, 2011.

- [18] R. Valenzuela, G. Tapia, M. González y A. Valenzuela, «Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas,» *Revista Chilena de Nutrición*, vol. 38, nº 3, 2011.
- [19] C. Serhan , S. Krishnamoorthy, A. Recchiuti y N. Chiang, «Novel anti-inflammatory–Pro-resolving mediators and their receptor,» *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 11, nº 6, pp. 629-647, 2011.
- [20] V. Kain, K. Ingle, R. Colas, J. Dalli, S. Prabhu, C. Serhan, M. Joshi y G. Halade, «Resolvin D1 activates the inflammation resolving response at splenic and ventricular site following myocardial infarction leading to improved ventricular function,» *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 84, pp. 24-35, 2015.
- [21] C. Serhan, «Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology,» *Nature*, vol. 7503, nº 510, pp. 92-101, 2014.
- [22] S. Krishnamoorthy, A. Recchiuti, N. Chiang, S. Yacoubian, L. Chih-Hao, R. Yang, N. Petasis y C. N. Serhan, «Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors,» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, nº 4, pp. 1660-1665, 2010.
- [23] G. Fredman, L. Ozcan, S. Spolitu, J. Hellmann, M. Spite, J. Backs y I. Tabas, «Resolvin D1 limits 5-lipoxygenase nuclear localization and leukotriene B4 synthesis by inhibiting a calcium-activated kinase pathway,» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, nº 40, pp. 14530-14535, 2014.
- [24] H.-M. Hsiao, T. Thatcher, E. Levy, R. Fulton, K. Owens, R. Phipps y P. Sime, «Resolvin D1 Attenuates Polyinosinic-Polycytidylic Acid–Induced Inflammatory Signaling in Human Airway Epithelial Cells via TAK1,» *The Journal of Immunology*, vol. 193, nº 10, pp. 4980-4987, 2014.
- [25] G. Mottola, A. Chatterjee, B. Wu, M. Chen y M. S. Conte, «Aspirin-triggered resolvin D1 attenuates PDGF-induced vascular smooth muscle cell migration via

the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A (cAMP/PKA) pathway,» *PLoS ONE*, vol. 12, nº 3, 2017.

- [26] J. Nelson, N. Leigh, R. Mellas, A. McCall, A. Aguirre y O. Baker, «ALX/FPR2 receptor for RvD1 is expressed and functional in salivary glands,» *American Journal of Physiology*, vol. 306, nº 2, pp. 178-185, 2014.
- [27] M. Lippestad, R. Hodges, T. Utheim, C. N. Serhan y D. A. Dartt, «Resolvin D1 Increases Mucin Secretion in Cultured Rat Conjunctival Goblet Cells via Multiple Signaling Pathways,» *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 58, nº 11, pp. 4530-4544, 2017.
- [28] H.-N. Lee y Y.-J. Surh, «Resolvin D1-mediated NOX2 inactivation rescues macrophages undertaking efferocytosis from oxidative stress-induced apoptosis,» *Biochemical Pharmacology*, vol. 86, nº 6, pp. 759-769, 2013.
- [29] F. Cattaneo, M. Parisi y R. Ammendola, «Distinct Signaling Cascades Elicited by Different Formyl Peptide Receptor 2 (FPR2) Agonist,» *International Journal of Molecular Science*, vol. 14, nº 4, pp. 7193-7230, 2013.
- [30] L. Claria, C. López-Vicario y V. Ruis, «Pro-resolving actions of SPM in adipose tissue biology,» *Molecular Aspects of Medicine*, nº 58, pp. 83-92, 2017.
- [31] C. Serhan, «Novel lipid mediator and resolution mechanisms in acute inflammation.,» *The American Journal of Pathology*, vol. 4, nº 177, pp. 1576-1591, 2010.
- [32] K. Kaneko, Y. T. A. Miyabe, S. Fukuda, C. Miyabe, M. Ebisawa, W. Yokoyama, K. Watanabe, T. Imai, K. Muramoto, Y. Terashima, T. Sugihara, K. Matsushima, N. Miyasaka y T. Nanki, «Chemerin activates fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis,» *Arthritis Research & Therapy*, vol. 13, nº 5, p. R158, 2011.

- [33] J. Cash, M. Bass, J. Campbell, M. Barnes, P. Kubersky y P. Martin, «Resolution mediator chemerin15 reprograms the wound microenvironment to promote repair and reduce scarring,» *Current Biology*, vol. 24, nº 12, p. 1435, 2014.
- [34] M. G. Balta, B. G. Loos y E. A. Nicu, «Emerging Concepts in the Resolution of Periodontal Inflammation: A Role for Resolvin E1,» *Frontiers in Immunology*, vol. 8, nº 1682, 2017.
- [35] V. Wittamer, J. Franssen, M. Vulcano, J. Mirjolet, E. Le Poul, I. Migeotte, S. Brézillon, R. Tyldesley, C. Blanpain, M. Detheux, A. Mantovani, S. Sozzani, G. Vassart, M. Parmentier y D. Communi, «Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids,» *Journal of Experimental Medicine*, vol. 198, nº 7, pp. 977-985, 2003.
- [36] X. Qu, X. Zhang, J. Song, D. Nikolic-Paterson y J. Li, «Resolvins E1 and D1 inhibit interstitial fibrosis in the obstructed kidney via inhibition of local fibroblast proliferation,» *The Journal of Pathology*, vol. 228, nº 4, pp. 506-519, 2012.
- [37] T. Ohira, M. Arita, K. Omori, A. Recchiuti, T. Van Dyke y C. N. Serhan, «Resolvin E1 receptor activation signals phosphorylation and phagocytosis,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, nº 5, pp. 3451-3461, 2010.
- [38] K. T. Keyes, Y. Ye, Y. Lin, C. Zhang, J. Peres-Polo, P. Gjorstrup y Y. Birnbaum, «Resolvin E1 protects the rat heart against reperfusion injury,» *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, vol. 299, nº 1, pp. H153-164, 2010.
- [39] M. Arita, T. Ohira, Y. Sun, S. Elangovan, N. Chiang y C. Serhan, «Resolvin E1 Selectively Interacts with Leukotriene B4 Receptor BLT1 and ChemR23 to Regulate Inflammation,» *The Journal of Immunology*, vol. 178, nº 6, pp. 3912-3917, 2007.

- [40] N. Wettschureck y S. Offermanns, «Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions,» *American Physiological Society*, vol. 85, pp. 1159-1204, 2005.
- [41] S. Mangmool y H. Kurose, «Gi/o Protein-Dependent and -Independent Actions of Pertussis Toxin (PTX),» *Toxins*, vol. 3, nº 7, pp. 884-899, 2011.
- [42] G. L. Patrick, «Signal transduction involving G-proteins and adenylate cyclase,» de *An introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford, Oxford University Press, 2013, p. 63.
- [43] P. Aránguiz-Urroz, «Sobre-expresión de receptores tipo AT1 y AT2 de Angiotensina II en Fibroblastos Cardíacos adultos de rata: Participación en el equilibrio de sobrevivencia/muerte celular inducida por Angiotensina II.,» Tesis de pregrado. Universidad de Chile, Santiago, 2006.
- [44] P. Aránguiz-Urroz, D. Soto, A. Contreras, R. Troncoso, M. Chiong, J. Montenegro, D. Venegas, C. Smolic, P. Ayala, W. G. Thomas, S. Lavandero y G. Díaz-Araya, «Differential Participation of Angiotensin II Type 1 and 2 Receptors in the Regulation of Cardiac Cell Death Triggered by Angiotensin II,» *American Journal of Hypertension*, vol. 22, nº 5, pp. 569-576, 2009.
- [45] D. Lu, N. Aroonsakool, U. Yokoyama, H. Patel y P. Insel, «Increase in Cellular Cyclic AMP Concentrations Reverses the Profibrogenic Phenotype of Cardiac Myofibroblasts: A Novel Therapeutic Approach for Cardiac Fibrosis,» *Molecular Pharmacology*, vol. 84, nº 6, pp. 787-793, 2013.
- [46] D. Sanz-Roza, «Los receptores β adrenérgicos en la enfermedad cardiovascular,» *Hipertensión y Riesgo Vascular*, vol. 28, nº 2, pp. 55-62, 2011.
- [47] A. Tadevosyan, J. Xiao, S. Surinkaew, P. Naud, C. Merlen, M. Harada, X. Qi, D. Chatenet, A. Fournier, B. G. Allen y S. Nattel, «Intracellular Angiotensin-II Interacts With Nuclear Angiotensin Receptors in Cardiac Fibroblasts and Regulates RNA

Synthesis, Cell Proliferation, and Collagen Secretion,» *Journal of the American Heart Association*, vol. 6, nº 4, 2017.

- [48] R. Vivar, C. Soto, M. Copaja, F. Mateluna, P. Aranguiz, J. P. Muñoz, M. Chiong, L. García, A. Letelier, W. Thomas, S. Lavandero y G. Díaz-Araya, «Phospholipase C/Protein Kinase C Pathway Mediates Angiotensin II–Dependent Apoptosis in Neonatal Rat Cardiac Fibroblasts Expressing AT1 Receptor,» *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, vol. 52, nº 2, pp. 184-190, 2008.
- [49] N. C. Muñoz Silva, «Resolvina D1 disminuye la adhesión de células mononucleares de bazo sobre fibroblastos cardiacos en ratas naonatas,» Tesis de pregrado. Universidad de Chile, Santiago, 2017.
- [50] N. Ramírez Saavedra, «Resolvina E1 disminuye la adhesión de SMC sobre fibroblastos cardiacos de ratas neonatas,» Tesis de pregrado. Universidad de Chile, Santiago, 2017.
- [51] C. Serhan, N. Chiang y T. E. Van Dyke, «Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators,» *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, nº 5, pp. 349-361, 2008.
- [52] C. Serhan, N. Chiang y J. Dalli, «The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution,» *Seminars in Immunology*, vol. 27, nº 3, pp. 200-215, 2015.
- [53] D. Brouty-Boyé, C. Pottin-Clémenceau, C. Doucet, C. Jasmin y B. Azzarone, «Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts,» *European Journal of Immunology*, vol. 30, nº 3, pp. 914-919, 2000.
- [54] D. Lindner, C. Zietsch y P. Moritz Becher, «Differential expression of matrix metalloproteases in human fibroblasts with different origins,» *Biochemistry Research International*, 2012.

- [55] National Institute of Health, «Guide for the care and use of laboratory animals,» 2011. [En línea]. Available: <http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-Use-of-Laboratory-Animals>. [Último acceso: 30 11 2018].
- [56] R. Vivar, C. Humeres, P. Ayala , I. Olmedo, M. Catalán , L. García, S. Lavandero y G. Díaz-Araya, «TGF- β 1 prevents simulated ischemia/reperfusion-induced cardiac fibroblast apoptosis by activation of both canonical and non-canonical signaling pathways,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, vol. 1832, nº 6, pp. 754-762, 2013.
- [57] M. M. Bradford, «A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding,» *Analytical Biochemistry*, vol. 72, pp. 248-254, 1976.
- [58] Cayman Chemical, «Cyclic AMP ELISA kit Booklet,» 29 10 2017. [En línea]. Available: <https://www.caymanchem.com/pdfs/581001.pdf>. [Último acceso: 26 11 2018].
- [59] G. Meszaros, A. González, Y. Endo-Mochizuki, S. Villesa, F. Villareal y L. Brunton, «Identification of G protein-coupled signaling pathways in cardiac fibroblasts: cross talk between Gq and Gs,» *American Journal of Physiology. Cellular Physiology*, vol. 278, nº 1, pp. 154-150, 2000.
- [60] R. Ostrom, J. Naugle, M. Hase, C. Gregorian, J. Swaney, P. Insel, L. Brunton y J. Meszaros, «Angiotensin II Enhances Adenylyl Cyclase Signaling via Ca²⁺/Calmodulin,» *The Journal of Biological Chemistry*, nº 278, pp. 24461-24468, 2003.
- [61] S. Hanke, B. Nümborg, G. Detlef, H. Groll y C. Liebmann, «Cross Talk between β -Adrenergic and Bradykinin B₂ Receptors Results in Accumulation and Mitogen-Activated Cooperative Regulation of Cyclic AMP Protein Kinase Activity,» *Molecular and Cellular Biology*, nº 21, pp. 8452-8460, 2001.

- [62] A. Shivashankara, A. Kumar, R. Ravi, P. Simon, P. Rai, A. Francis y M. Baliga, «Polyphenols in Chronic Diseases and their Mechanisms of Action,» de *Polyphenols in Human Health and Disease*, Academic Press, 2014, pp. 715-721.
- [63] M. Zhu, X. Wang, M. Schultzberg y E. Hjorth, «Differential regulation of resolution in inflammation induced by amyloid- β 42 and lipopolysaccharides in human microglia,» *Journal of Alzheimer's disease*, vol. 43, n^o 4, pp. 1237-50, 2015.
- [64] M. Herová, M. Schmid, C. Gemperle y M. Hersberger, «ChemR23, the Receptor for Chemerin and Resolvin E1, Is Expressed and Functional on M1 but Not on M2 Macrophages,» *The Journal of Immunology*, vol. 194, n^o 5, pp. 2330-2337, 2015.
- [65] M. Freire, J. Dalli, C. N. Serhan y T. Van Dyke, «Neutrophil Resolvin E1 Receptor Expression and Function in Type 2 Diabetes,» *The Journal of Immunology*, vol. 198, n^o 2, pp. 718-728, 2017.
- [66] C. Rey, A. Nadjar, B. Baud, C. Vaysse, A. Aubert, V. Pallet, S. Layé y C. Joffre, «Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in microglial,» *Brain, Behavior and Immunity*, vol. 55, pp. 249-259, 2016.
- [67] C. F. Rivas Espinosa, «Conversación cruzada en las vías de señalización del receptor β 2-adrenérgico y B2 de cininas y su efecto en la adhesión, migración, secreción de colágeno y diferenciación en fibroblastos cardiacos,» Tesis de pregrado. Universidad de Chile, Santiago, 2013.
- [68] E. Yang y H. Schulman, «Structural examination of autoregulation of multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II,» *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, n^o 37, pp. 26199-26208, 1999.
- [69] J. Ronkainen, S. Hänninen, T. Korhonen, J. Koivumäki, R. Skoumal, S. Rautio, Ronkainen V. y P. Tavi, «Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II represses cardiac transcription of the L-type calcium channel alpha(1C)-subunit gene (Cacna1c) by DREAM translocation,» *The Journal of Physiology*, vol. 589, pp. 2669-2686, 2011.

- [70] M. E. Catalán, «La activación de las vías transduccionales dependientes del receptor B1 de cininas reducen la expresión de colágeno I en miofibroblastos cardíacos,» Universidad de Chile, Santiago, 2013.
- [71] B. Mellstrom y J. R. Naranjo, «Mechanism of Ca²⁺ dependent transcription,» *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 11, pp. 312-319, 2001.
- [72] R. Dolmetsch, «Excitation-Transcription coupling: signaling by ion channels to Nucleus,» *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, n° 166, pp. 1-5, 2003.
- [73] M. D. Bootman, K. Rietdorf, T. Collins, S. Walker y M. Sanderson, «Ca²⁺-Sensitive Fluorescent Dyes and Intracellular Ca²⁺ Imaging,» *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2013, n° 2, pp. 83-99, 2013.
- [74] Molecular Probes, «Fluo Calcium Indicators,» 02 02 2011. [En línea]. Available: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp01240.pdf>. [Último acceso: 14 12 2018].
- [75] Molecular Probes, «Fura and Indo Ratiometric Calcium Indicators,» 02 02 2011. [En línea]. Available: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp01200.pdf>. [Último acceso: 14 12 2018].
- [76] M. Lippestad, R. R. Hodges, T. P. Utheim, C. N. Serhan y S. A. Dartt, «Signaling pathways activated by resolvin E1 to stimulate mucin secretion and increase intracellular Ca(2+) in cultured rat conjunctival goblet cells,» *Experimental Eye Research*, vol. 173, pp. 64-72, 2018.
- [77] H. Bading, «Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function,» *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 14, pp. 593-608, 2013.

- [78] M. J. Berridge, M. D. Bootman y H. L. Roderick, «Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling,» *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 4, pp. 517-529, 2003.
- [79] J.-B. Chen, R. Tao, H.-Y. Sun, H.-F. Tse, C.-P. Lau y G.-R. Li, «Multiple Ca²⁺ Signaling Pathways Regulate Intracellular Ca²⁺ Activity in Human Cardiac Fibroblasts,» *Journal of Cellular Physiology*, vol. 223, nº 1, pp. 68-75, 2010.
- [80] J. Suresh K., «Role of Thiols in the Structure and Function of Inositol Trisphosphate Receptors,» de *Membranes in Pulmonary Vascular Disease*, Current Topics in Membranes, 2010, pp. 299-322.
- [81] C. A. Espinoza, «Resolvina D1 disminuye la secreción de citoquinas proinflamatorias en fibroblastos cardíacos,» Tesis de pregrado. Universidad de Chile, Santiago, 2018.
- [82] R. Kaye, N. Botten, M. Lippestad, D. Li, R. R. Hodges, T. P. Utheim, C. N. Serhan y D. A. Dartt, «Resolvin D1, but not resolvin E1, transactivates the epidermal growth factor receptor to increase intracellular calcium and glycoconjugate secretion in rat and human conjunctival goblet cells,» *Experimental Eye Research*, vol. 180, pp. 53-62, 2019.