



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

# **EFFECTOS DE RESOLVINAS D1 Y E1 SOBRE LA EXPRESIÓN DE FACTORES PROINFLAMATORIOS EN FIBROBLASTOS CARDÍACOS**

Memoria para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico

**Claudio Andrés Espinoza Pérez**

Director: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

Patrocinante: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

---

Santiago, Chile, 2019

## **FINANCIAMIENTO**

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.

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

Esta memoria originó la siguiente presentación en congreso:

Resolvina D1 disminuye la secreción de citoquinas proinflamatorias inducidas por LPS en fibroblastos cardíacos de rata neonata. **Espinoza, C.**; Cayupi, J.; Salas, A.; Castro, E.; Díaz-Araya, G. XL Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Santa Cruz, Chile, Noviembre 2018.

*A quienes me han acompañado siempre.*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradecer a mis padres y hermano por ser mi pilar fundamental y el apoyo más grande durante todo este proceso, sin duda que este logro es de los cuatro y sin ustedes no habría sido capaz de llegar al final de todo esto. Agradezco su confianza infinita en mí, así como su esfuerzo constante para ayudarme y apoyarme estando lejos de casa, así como soportar mi carácter cuando las cosas no iban bien. A mi gatito Minino, quien con sus travesuras, juegos y compañía alegraba más aún los viajes a mi casa. Los amo con todo mi ser.

También agradecer a Camila, persona fundamental en mi vida. Muchas gracias por tu infinito apoyo, amor y sobre todo tu paciencia hacía mi cuando las cosas se ponían cuesta arriba. Gracias por compartir conmigo tu vida y por lo bien que me haces.

Luego, agradecer a todas las personas que conocí durante mi estancia en el laboratorio. Evelyn, Don José y personal de aseo. Al profesor Guillermo, por aceptarme en su laboratorio, por su constante apoyo, paciencia y enseñanzas. A mis compañeros del laboratorio, especialmente al Team Neonatos, por el trabajo codo a codo y compartir alegrías, frustraciones, y momentos inolvidables. A los muchachos del Laboratorio de Farmacología Experimental, por la buena disposición. Mi gratitud hacia ustedes es sincera.

Finalmente, agradecer a mis amigos de la universidad y de toda la vida. Felipe, Valentina, Carolina, Romina, Silvana, Vale A y tantos otros que hicieron del pregrado una experiencia grata y por otro lado, a Javier, Óscar, Juan Carlos, José, Noelia, Diego, Sebastián, Nicolás y muchos más por tantos buenos momentos en juntas, viendo partidos y tantas otras cosas, gracias a ustedes logré desconectarme cuando lo necesitaba. A los aludidos, muchas gracias. Son parte de mi vida.

<b>Índice de contenido</b>	
FINANCIAMIENTO .....	2
AGRADECIMIENTOS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ABREVIATURAS .....	8
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	12
1.- INTRODUCCIÓN.....	14
1.1.- Generalidades.....	14
1.2.- Fibroblastos cardíacos.....	14
1.3.- Respuesta proinflamatoria del fibroblasto cardíaco.....	15
1.4.- Lipopolisacárido y efectos en fibroblasto cardíaco .....	17
1.5.- Moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1.....	17
1.6.- Citoquinas y quimioquinas .....	18
1.7.- Resolución de la inflamación .....	20
1.7.1.- Resolvina D1 .....	21
1.7.2.- Resolvina E1 .....	21
1.8.- Relación entre RvD1, RvE1 y fibroblasto cardíaco.....	22
2.- HIPÓTESIS .....	24
3.- OBJETIVO GENERAL.....	24
4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
5.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
5.1.- Reactivos .....	24
5.2.- Modelo animal.....	25
5.3.- Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos neonatos.....	25
5.4.- Pasaje celular .....	26
5.5.- <i>Western Blot</i> .....	26
5.6.- Medición de citoquinas por LUMINEX .....	27
5.7.- Análisis estadístico .....	27
6.- RESULTADOS .....	28
6.1.- Efecto de las RvD1 y RvE1 en los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducido por LPS en fibroblastos cardíacos.....	28
6.2.- Efecto de la RvD1 y RvE1 en la secreción de citoquinas inducidas por LPS en fibroblastos cardíacos .....	31

6.3.- Efecto de la RvD1 y RvE1 en la secreción de quimioquinas inducidas por LPS en fibroblastos cardíacos. ....	35
6.4.- Efecto de la RvD1 y RvE1 sobre la expresión de pro-IL-1 $\beta$ inducida por LPS en fibroblastos cardíacos .....	37
7.- DISCUSIÓN.....	39
7.1.- Evaluación de los efectos de las RvD1 y RvE1 sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por LPS en fibroblastos cardíacos .....	40
7.2.- Evaluación de los efectos de las RvD1 y RvE1 sobre la secreción de citoquinas y quimioquinas inducidas por LPS en fibroblastos cardíacos .....	41
7.3.- Evaluación de los efectos de RvD1 y RvE1 sobre la expresión de pro-IL-1 $\beta$ inducida por LPS en fibroblastos cardíacos.....	44
8.- ESQUEMA RESUMEN.....	47
9.- CONCLUSIONES.....	48
10.- BIBLIOGRAFÍA.....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías de señalización del TLR4 en FC.....	16
Figura 2. Receptores y efectos biológicos de los SPM.....	22
Figura 3. Efecto de las Resolvina D1 y E1 sobre el incremento en los niveles de expresión de ICAM-1 inducido por LPS en FC. ....	29
Figura 4. Efecto de las Resolvina D1 y E1 sobre el incremento en los niveles de expresión de VCAM-1 inducido por LPS en FC. ....	30
Figura 5. Efecto de las Resolvina D1 y E1 sobre el aumento de los niveles de secreción de IL-10 inducido por LPS en FC. ....	32
Figura 6. Efecto de las Resolvina D1 y E1 sobre el aumento en los niveles de secreción de IL-6 inducido por LPS en FC. ....	33
Figura 7. Efecto de las Resolvina D1 y E1 sobre el aumento en los niveles de secreción de TNF- $\alpha$ inducido por LPS en FC. ....	34
Figura 8. Efectos de las Resolvinas D1 y E1 sobre el aumento en los niveles de secreción de MCP-1 inducido por LPS en FC. ....	36
Figura 9. Efecto de las Resolvina D1 y E1 sobre el incremento de los niveles de expresión de pro-IL-1 $\beta$ inducida por LPS en FC. ....	38
Figura 10. Esquema resumen de los efectos diferenciales de las RvD1 y RvE1 sobre la expresión de moléculas de adhesión y secreción de citoquinas en FC. ....	47

## ABREVIATURAS

ALX/FPR2	Lipoxine A4 Receptor /N-Formyl peptide Receptor 2
ANOVA	Analysis of Variance
ASC	Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a CARD
AT-RvD1	Aspirin triggered-Resolvin D1
ChemR23	Chemerin Receptor 23
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAMP	Damage-associated Molecular Pattern
DHA	Docosahexaenoic Acid
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Essential Medium-Formula 12
EPA	Eicosapentaenoic Acid
ERK1/2	Extracellular Signal-regulated Kinase1/2
FBS	Fetal Bovine Serum
FC	Fibroblasto Cardíaco
GAPDH	Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa
GPCR	G Protein-coupled Receptor
GPR32	G Protein-couple Receptor 32
gp130	Glycoprotein 130
HSP	Heat Shock Protein
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IgSF	Immunoglobulin Superfamily
IL-1R1	Interleukin-1 Receptor 1
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IRF3	Interferon Regulator Factor 3
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen-1
LPS	Lipopolisacárido Bacteriano
LTB4	Leukotriene B4
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinasas de Matriz
mRNA	Messenger RNA
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response 88
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa B
NLRP3	Nod-like Receptor Protein 3
PAMP	Pathogen-associated Molecular Patern
PBS	Phosphate-buffered Saline
PI3K/AKT	Phosphatidylinositol-3-Kinase / Protein Kinase B
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>



PMN  
PRR  
p38 MAPK  
RvD1  
RvE1  
SMC  
SPM  
STAT  
  
TBS-Tween 20  
TGF- $\beta$ 1  
TLR4  
TNF- $\alpha$   
TNF-R1/R2  
VCAM-1  
5-LOX  
15-LOX

Polimorfonucleares  
Pattern Recognition Receptors  
p38 Mitogen-activated Protein Kinase  
Resolvina D1  
Resolvina E1  
Spleen Mononuclear Cells  
Specialized Proresolving Mediators  
Signal Transducer and Activator of  
Transcription  
Tris-buffered Saline-Tween 20  
Transforming Growth Factor- $\beta$ 1  
Toll-like Receptor 4  
Tumor Necrosis Factor- $\alpha$   
Tumor Necrosis Factor-Receptor1/Receptor2  
Vascular Cell Adhesion Molecule-1  
5-lipoxygenase  
15-lipoxygenase

## RESUMEN

Los fibroblastos cardíacos han sido descritos clásicamente como células estructurales encargadas de la mantención de la homeostasis de la matriz extracelular, dejando de lado su participación en el proceso inflamatorio en respuesta a una injuria cardíaca. Sin embargo, hoy en día se les considera células “centinela” del corazón, por su capacidad de responder adecuadamente a mediadores endógenos o exógenos y su gran contribución al inicio, mantención y resolución de la respuesta al daño cardíaco.

Uno de los agentes proinflamatorios más estudiados y utilizados es el Lipopolisacárido (LPS) bacteriano, el cual es reconocido como agonista del receptor TLR4 el cual está presente en el FC, gatillando la respuesta inflamatoria y entre ella, el reclutamiento de células del sistema inmune al sitio de daño. Esta respuesta se amplifica gracias a la secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, el incremento de la expresión de proteínas de adhesión celular y la posterior diferenciación del FC a miofibroblasto cardíaco. Esta última célula posee un perfil secretor aumentado, y da inicio a la formación de la cicatriz del tejido.

La finalización de la respuesta inflamatoria es un proceso dinámico, y está determinado por la presencia de mediadores prorresolutivos en el sitio de daño. Dentro de estos mediadores, se encuentran las Resolvinas, las cuales poseen un marcado perfil antiinflamatorio, disminuyendo la secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, el reclutamiento de células del sistema inmune y aumentando la fagocitosis de restos celulares por parte de macrófagos. Hasta la fecha, no hay estudios sobre los efectos de estos mediadores en FC expuestos a condiciones inflamatorias.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de las Resolvinas D1 y E1 sobre la expresión de proteínas de adhesión celular ICAM-1 y VCAM-1, así como la secreción de citoquinas y quimioquinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 e IL-10, y la expresión de pro-IL-1 $\beta$  en FC expuestos a un agente proinflamatorio como LPS.

Para esto, los FC fueron pretratados con RvD1 o RvE1 y posteriormente estimulados con LPS durante 24 horas, luego, se recuperó el lisado celular, y se determinó la expresión de las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 mediante *Western Blot*. Por otra parte, para la determinación de citoquinas y quimioquinas, se procedió de la forma anteriormente descrita, y se recolectó el medio de cultivo, el cual fue utilizado para la medición del perfil

de citoquinas y quimioquinas secretadas por el FC mediante LUMINEX. Finalmente, para determinar pro-IL-1 $\beta$ , los FC fueron pretratados con RvD1 o RvE1 y luego estimulados con LPS durante 8 horas, transcurrido el tiempo, se recuperó el lisado celular y se determinó la expresión de esta proteína mediante *Western Blot*.

Se demostró que la Resolvina D1 y E1 disminuyeron el aumento de ICAM-1 y VCAM-1 inducido por LPS en FC. Adicionalmente solo la Resolvina D1 disminuyó significativamente la secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias tras dicho estímulo.

Estos resultados demuestran los potentes efectos antiinflamatorios de la Resolvina D1 y promueven una prometedora herramienta farmacológica en patologías cardiovasculares.

## **Resolvin D1 and E1 effects on proinflammatory factors expression in cardiac fibroblast**

### **ABSTRACT**

Cardiac fibroblasts (CF) have been classically described as structural cells - responsible for the maintenance of homeostasis of the extracellular matrix - leaving aside their role in the inflammatory process in cardiac injury. Nowadays, CF are considered "sentinel cells" of the heart, due to their ability to respond to endogenous and exogenous mediators and their contribution to the initiation, maintenance, and resolution of the cardiac damage response.

The bacterial lipopolysaccharide (LPS) is one of the most studied proinflammatory agents, which is recognized by the Toll-like receptor 4 (TLR4). TLR4 is present in CF and its activation triggers the inflammatory response with the recruitment of immune system cells to the damage site. Then, the answer is enhanced by secretion of proinflammatory cytokines and chemokines with up-regulation of cell adhesion proteins, and CF differentiation into cardiac myofibroblast, who promote the tissue scar formation due to their enhanced secretory and migratory profile.

The end of the inflammatory response is a dynamic process with the presence in injury's site of specialized pro-resolving lipid mediators (SPM). The Resolvins - a SPM Family - have an anti-inflammatory effect featured by the decrease on proinflammatory cytokines and chemokines secretion, recruitment of immune cells, and phagocytosis of cellular debris. Currently, there are no studies about the effects of these mediators on CF upon inflammatory conditions.

The objective was to evaluate the effect of Resolvins D1 and E1 on the expression of cell adhesion proteins (ICAM-1 and VCAM-1) as well as the secretion profile of cytokines and chemokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, and IL-10) induced by LPS in CF.

For this, CF were pretreated with RvD1 or RvE1 and subsequently, stimulated with LPS for 24 hours, then, the cell lysate was recovered, and the expression of adhesion proteins ICAM-1 and VCAM-1 was determined by Western Blot. On the other hand, for the determination of cytokines and chemokines, the procedure was the same as described above, then, culture medium was recollected, which was used to measure the secretion profile of cytokines and chemokines by FC using LUMINEX. Finally, to determine pro-IL-1 $\beta$ , CF were pretreated with RvD1 or RvE1 and then stimulated with LPS for 8 hours,

then, the cell lysate was recovered and the expression of this protein was determined by Western Blot.

It was demonstrated that Resolvin D1 and E1 decrease the LPS-induced up-regulation of ICAM-1 and VCAM-1 in CF, additionally only Resolvin D1 was able to reduce LPS-induced secretion of proinflammatory cytokines and chemokines.

These results demonstrate the potent anti-inflammatory effects of Resolvin D1 and promote a promising pharmacological tool in cardiovascular diseases.

## **1.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1.- Generalidades**

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un grave problema de salud pública a nivel mundial, dada su alta prevalencia y alta mortalidad, siendo la primera causa de defunción en el mundo. Estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) calculan que 17,5 millones de personas fallecieron por causa de estas patologías durante el año 2012 y se proyecta que al año 2030 esta cifra aumentará casi un 40%. Estas cifras han hecho necesario el diseño de planes preventivos para combatir los principales factores de riesgo: tabaquismo, sedentarismo, dieta desbalanceada, hipertensión arterial y diabetes mellitus<sup>[1]</sup>.

La situación en nuestro país no es diferente, ya que en el año 2014 representaron el 27,5% de las defunciones<sup>[2]</sup>. Por otra parte, datos de la Encuesta Nacional de Salud 2016-2017 marcan la elevada presencia de factores de riesgo en nuestro país, principalmente tabaquismo, sobrepeso, obesidad y sedentarismo<sup>[3]</sup>. Estos antecedentes, junto al aumento de la población de tercera edad en nuestro país y la no disminución de la prevalencia de los factores de riesgo en Chile, hacen que sea primordial comprender estas patologías y buscar nuevas estrategias terapéuticas y preventivas.

### **1.2.- Fibroblastos cardíacos**

El fibroblasto cardíaco (FC) es un tipo celular de naturaleza mesenquimal que reside en el intersticio cardíaco<sup>[4]</sup>. Los FC carecen de membrana basal, tienen un retículo endoplásmico rugoso extenso, aparato de Golgi prominente y abundante material granular citoplasmático<sup>[5]</sup>.

Los FC han sido descritos típicamente como las células sostén del tejido cardíaco. En un corazón adulto, los FC son vistos como células quiescentes que contribuyen a la homeostasis cardíaca a principalmente a través del mantenimiento de la matriz extracelular (MEC)<sup>[6]</sup>. Los FC desempeñan un papel clave en el mantenimiento de forma y función cardíaca normal, así como en el proceso de remodelamiento cardíaco durante condiciones patológicas, tales como infarto e hipertensión. Independientemente del estado normal o patológico del corazón, los FC tienen múltiples funciones, tales como la síntesis y deposición de la matriz extracelular y la comunicación célula-célula con otras células

cardíacas, incluyendo cardiomiocitos y células endoteliales<sup>[7]</sup>. No obstante, estos últimos años, varios estudios han demostrado que este fenotipo celular es capaz de detectar señales externas y responder adecuadamente a ellas, por lo que se les ha denominado células centinelas<sup>[8,9]</sup>.

Diversas investigaciones han descrito los diferentes mediadores que pueden ser reconocidos por los FC, entre ellos se destacan los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o daño (DAMPs), las cuales, al ser reconocidas por los receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR), dan inicio al proceso inflamatorio<sup>[10,11]</sup>. Algunos trabajos recientes han descrito que la activación de estos receptores en los FC se acopla a alteraciones de la función celular incluyendo cambios en la proliferación, migración, transdiferenciación a miofibroblastos, recambio de la MEC y producción de factores paracrinos profibróticos y proinflamatorios, los cuales impactan en la capacidad del corazón de responder a estímulos de daño<sup>[9]</sup>.

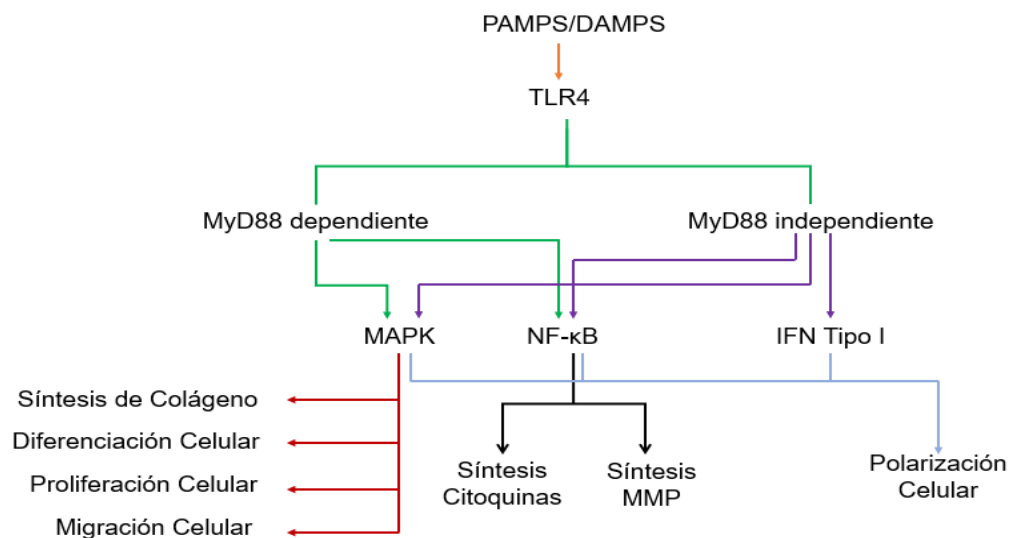
### **1.3.- Respuesta proinflamatoria del fibroblasto cardíaco**

El FC es capaz de responder de forma eficiente a los PAMPs y a los DAMPs mediante la activación de los PRRs, secretando una variedad de citoquinas y quimioquinas, las cuales pueden alterar la función de células residentes del corazón como los cardiomiocitos, células de la musculatura lisa vascular y células endoteliales, además de células circundantes como células inmunes<sup>[8]</sup>.

Los PRRs se dividen en al menos cuatro familias: *Retinoic acid-inducible gene-1-like receptors* (RLRs), *C-type lectin receptors* (CLRs), *Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing receptors* (NLRs; también conocidos como *Nod-like receptors*) y los *Toll-like receptors* (TLRs). De estos, los TLRs y los NLRs son conocidos por su participación en las respuestas inflamatorias estériles tras un infarto al miocardio<sup>[8]</sup>.

Los TLRs reconocen e interactúan con dominios altamente conservados como los PAMPs expresados exclusivamente por patógenos como por ejemplo el LPS, o los DAMPs liberados luego de la muerte celular o lesión tisular. Dentro de los TLRs, el TLR4 es uno de los más estudiados, debido a la acumulación de evidencia que describe su activación como un elemento clave en la iniciación y resolución de respuestas inflamatorias. Además, su interés en la inflamación cardíaca radica en que puede ser activado por ligandos endógenos liberados tras una lesión cardíaca como Proteínas de Shock Térmico (HSP), Hialuronato, Fibronectina y Heparán Sulfato, los cuales promueven una potente respuesta proinflamatoria mediante la activación de vías de señalización intracelular, las cuales conducen a la secreción de citoquinas y expresión de moléculas de adhesión celular<sup>[8]</sup>.

El TLR4 es expresado en los FC y su estimulación conduce a la activación de 2 vías señalizadoras: (a) la vía dependiente de MYD88, la cual activa IRF3 y guía a la producción del Interferón de tipo I (IFN R), y (b) la vía dependiente de MYD88, involucrando la activación temprana de NF-κB, induciendo la expresión de citoquinas proinflamatorias<sup>[8,12]</sup> (Figura 1). Considerando lo anteriormente dicho, resulta evidente el rol del TLR4 en la inflamación, fibrosis y remodelado cardíaco.



**Figura 1. Vías de señalización del TLR4 en FC.**

Fibroblastos cardíacos expresan TLR4 y su activación por DAMPs o PAMPs gatilla las vías de señalización dependientes e independientes de MYD88. La vía dependiente de MYD88 activa MAPK y NF-κB y controla funciones celulares asociadas a fibrosis cardíaca o inflamación. Por otro lado, la vía independiente de MYD88 activa IFN de tipo I, que también se asocia a inflamación. Modificado de Díaz-Araya et al., 2015<sup>[8]</sup>.



#### **1.4.- Lipopolisacárido y efectos en fibroblasto cardíaco**

El LPS es el ligando de activación del TLR4 más utilizado y estudiado, y es un importante componente estructural de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, puede inducir inflamación sistémica y sepsis. El LPS consta de tres secciones: Lípido A, un núcleo de oligosacáridos y una cadena O-lateral, siendo el Lípido A el principal PAMP del LPS<sup>[13,14]</sup>.

En el FC, LPS es un agonista del receptor TLR4 y activa diferentes vías de señalización intracelulares que regulan diferentes funciones del fibroblasto como síntesis de proteínas, crecimiento y supervivencia celular, entre otras<sup>[14]</sup>. La activación del TLR4 provoca su dimerización y a su vez activa ERK1/2, PI3K/Akt, y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B<sup>[15,16]</sup>.

La activación de estas vías de señalización tiene como resultado el aumento en la expresión de moléculas de adhesión celular ICAM-1 y VCAM-1<sup>[17]</sup>, la síntesis de pro-IL-1 $\beta$ <sup>[18]</sup>, la secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP-1, respectivamente, además de aumentar la secreción de la citoquina inmunomoduladora IL-10<sup>[12]</sup>.

#### **1.5.- Moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1**

Las moléculas de adhesión celular son proteínas de superficie involucradas en regular la comunicación entre una amplia gama de tipos celulares. Se han identificado y caracterizado diversas familias, como las integrinas, cadherinas, selectinas, proteoglicanos asociados a membranas y la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF). Este último grupo se caracteriza por proteínas compuestas de 90-100 aminoácidos dispuestos en un arreglo de dos hojas beta estabilizadas por un enlace disulfuro, que le otorga estabilidad y afinidad por diversos contrareceptores<sup>[19]</sup>.

La molécula de adhesión intercelular (ICAM-1 o CD54) y la molécula de adhesión vascular (VCAM-1 o CD106) son dos miembros de la IgSF que tienen implicancia crítica en el reclutamiento e infiltración de células del sistema inmune al sitio de daño. VCAM-1 une linfocitos y monocitos en circulación que expresan las integrinas  $\alpha$ 4 $\beta$ 4 y  $\alpha$ 4 $\beta$ 7, mientras que ICAM-1 es el contrareceptor para integrinas  $\beta$ 2, como LFA-1 y Mac-1<sup>[20]</sup>.

La interacción entre ICAM-1 e integrinas posee un rol importante en el reclutamiento de leucocitos y comienzo de respuestas inmunes gatilladas por antígenos. Un aumento en la

expresión de CAMs está temporalmente asociado con el secuestro e infiltración de leucocitos en el tejido del miocardio. En la inflamación cardíaca, las células residentes y leucocitos infiltrados secretan citoquinas capaces de activar la transcripción de CAMs, aumentando los niveles basales y perpetuando el reclutamiento y transmigración<sup>[21]</sup>. Además, se ha demostrado que DAMPs liberados en la zona del daño cardíaco aumentan los niveles de CAMs y actúan de manera similar a citoquinas proinflamatorias<sup>[22]</sup>.

## **1.6.- Citoquinas y quimioquinas**

Las citoquinas son pequeñas glicoproteínas producidas predominantemente por leucocitos, y regulan una gran cantidad de funciones fisiológicas y patológicas incluyendo inmunidad innata, inmunidad adquirida y un sinnúmero de respuestas inflamatorias<sup>[23]</sup>. Por otra parte, las quimioquinas son citoquinas quimiotácticas que controlan los patrones migratorios y la distribución de todas las células del sistema inmune durante la homeostasis, inflamación aguda y crónica, y durante la generación de respuestas adaptativas del sistema inmune<sup>[24]</sup>.

Como se mencionó anteriormente, el FC es capaz de secretar una variada gama de citoquinas y quimioquinas inducidas por la activación del TLR4, siendo de principal interés TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y MCP-1, las cuales inciden directamente en la magnitud de la respuesta inflamatoria y el posterior reclutamiento de células del sistema inmune al sitio de daño.

TNF- $\alpha$  es una glicoproteína de 185 aminoácidos, la cual es producida principalmente por macrófagos, pero también puede ser producida por células endoteliales tras daño tisular, células T, células NK activadas y fibroblastos. Posee dos receptores TNF-R1 y TNF-R2, ambos involucrados en procesos inflamatorios, sin embargo, TNF-R1 posee un dominio intracelular de muerte y TNF-R2 no. La activación de dichos receptores por TNF- $\alpha$  induce dos vías de señalización intracelulares, una de ellas conduce a apoptosis, mientras que la otra lleva a la transcripción genética, siendo NF- $\kappa$ B una de los principales factores de transcripción activados, lo que induce la expresión de moléculas de adhesión, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ <sup>[25,26]</sup>.

IL-1 $\beta$  (17 kDa) es una potente citoquina proinflamatoria, crucial para las respuestas de defensa del hospedero frente a patógenos y daño tisular. Es la más estudiada de la superfamilia de IL-1. Es producida por una alta variedad de tipos celulares como monocitos, macrófagos, células dendríticas y fibroblastos. Posee un precursor inactivo de 31 kDa

llamado pro-IL-1 $\beta$ , el cual es producido en respuesta a DAMPs o PAMPs<sup>[27]</sup>. Este precursor es escindido por la Caspasa-1 para producir la forma madura y activa de la citoquina<sup>[18]</sup>. La unión de la IL-1 $\beta$  al receptor de Interleuquina I de tipo I (IL-1R1), desencadena una compleja secuencia de fosforilaciones y ubiquitinaciones río abajo, resultando en la activación de la señalización de NF- $\kappa$ B, y las vías de señalización JNK y p38 MAPK, las cuales, cooperativamente, inducen la expresión de IL-8, IL-6, MCP-1, COX-2 e IL-1 $\beta$ <sup>[28,29]</sup>.

IL-6 (20 kDa) es una citoquina pleiotrópica, conocida por sus efectos proinflamatorios en células del sistema inmune como macrófagos o monocitos, y por sus efectos duales pro y antiinflamatorios en la musculatura esquelética<sup>[30]</sup>. Dentro de los efectos fisiológicos, esta citoquina se destaca por inducir la producción de proteínas de fase aguda, y su participación crucial en inflamación crónica al ejercer efectos en linfocitos T y B<sup>[31]</sup>. Esta citoquina se une al receptor IL-6R, lo que genera la activación de variadas cascadas de señalización como gp130/JAK/STAT y PI3K<sup>[32]</sup>. La actividad de STAT conduce al aumento en la transcripción de variados genes, como los que codifican para iNOS y COX-2<sup>[33]</sup>.

IL-10 (37 kDa) es una citoquina inmunoreguladora y antiinflamatoria que protege al hospedero de la inmunopatología asociada a infecciones, alergia y reacciones autoinmunes. Puede ser expresada por células del sistema inmune como células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y células NK, así como por otros tipos celulares como fibroblastos<sup>[34]</sup>. El receptor de IL-10 (IL-10R), es un complejo tetramérico consistente en dos subunidades idénticas para unión del ligando, IL-10R1, y dos subunidades señalizadoras idénticas, IL-10R2<sup>[35]</sup>. La activación del receptor gatilla la actividad de las tirosina quinasa JAK1 y TYK2, lo que río abajo activa factores de transcripción como STAT3, STAT1 y STAT5<sup>[35]</sup>. Otra vía de señalización modulada por IL-10 es la activación de NF- $\kappa$ B, la cual es inhibida por esta citoquina, disminuyendo la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ <sup>[35]</sup>.

MCP-1 (13 kDa), también llamada CCL2, es una citoquina quimiotáctica clave en la regulación de la migración e infiltración de monocitos, proceso requerido para las respuestas inflamatorias. El receptor de MCP-1, CCR2, es un GPCR, y su activación induce movilización de Ca<sup>+2</sup> y la inhibición de la Adenilato Ciclasa (AC), regulando así la quimiotaxis<sup>[36]</sup>.

## 1.7.- Resolución de la inflamación

La resolución del proceso inflamatorio fue considerada un proceso pasivo, donde las diversas citoquinas y quimioquinas involucradas en la respuesta inflamatoria se diluían y disipaban. Sin embargo, con la identificación de los mediadores lipídicos especializados pro-resolutivos (SPM), se adquirió evidencia de que la resolución de la inflamación era un proceso autolimitado que requería de una respuesta de finalización activa<sup>[37,38]</sup>.

Los SPM corresponden a mediadores químicos biosintetizados de forma endógena a partir de ácidos grasos esenciales, fundamentalmente  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6; en exudados durante la etapa resolutive de la inflamación. Su rol fisiológico define el proceso resolutivo, controlando la duración y magnitud de la inflamación, ya que son responsables de regular a los mediadores proinflamatorios. Están compuestos por cuatro familias, las que incluyen lipoxinas (LX), maresinas (MaR), protectinas (PD) y resolvinas (Rv)<sup>[38,39]</sup>.

Las Resolvinas de la serie D (RvD1-RvD6) provienen del Ácido Docosahexanoico (DHA) y son sintetizadas por leucocitos y células endoteliales durante la resolución de la inflamación. Por otra parte, las Resolvinas de la serie E (RvE1-RvE3), provienen del Ácido Eicosapentanoico (EPA) y son producidas luego de la interacción de las células endoteliales con neutrófilos, y poseen potentes efectos antiinflamatorios. El receptor para la RvD1 es el ALX/FPR2 en ratas y GPR23 en humanos, mientras que el de la RvE1 es el ChemR23, y ambos se encuentran ampliamente distribuidos en una gran variedad de tejidos<sup>[39,40]</sup>.

Dentro de los efectos más importantes de las Resolvinas se encuentra la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias y la disminución en el tráfico e infiltración de leucocitos. En este aspecto, se ha observado *in vivo* que las Resolvinas detienen la infiltración de polimorfonucleares, además de reducir la expresión de mediadores proinflamatorios<sup>[41]</sup>.

### 1.7.1.- Resolvina D1

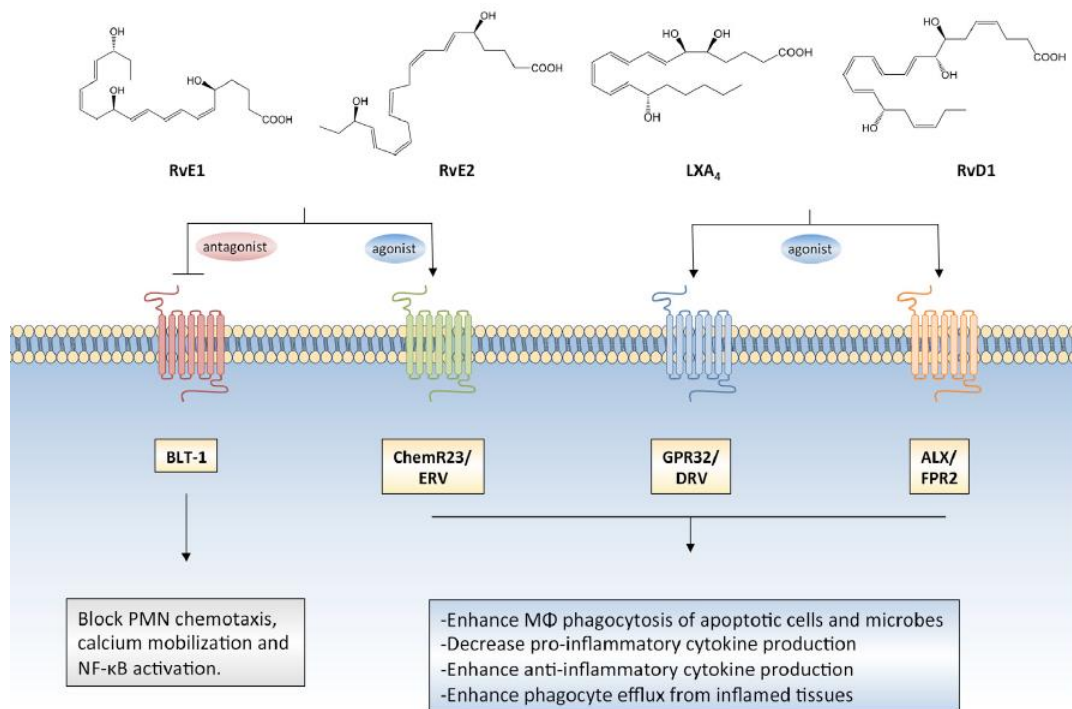
La RvD1 es un miembro de la serie D de las Resolvinas, y posee potentes efectos antiinflamatorios. Se sintetiza a partir de DHA, el cual es sometido a oxigenaciones por parte de las enzimas 15-Lipoxigenasa (15-LOX) y 5-Lipoxigenasa (5-LOX), dando como resultado RvD1<sup>[42]</sup>. Se ha descrito otra vía sintética para RvD1, la cual involucra la acetilación de la enzima Ciclooxygenasa-2 (COX-2) por aspirina, la que convierte DHA a 17R-HDHA. Posteriormente, esta molécula es oxigenada por la 5-LOX para generar AT-RvD1<sup>[43]</sup>.

Para RvD1 se han descrito dos GPCRs en humanos, GRP32 y ALX/FPR2 (Figura 2), los cuales están asociados a Proteína G<sub>i</sub>/G<sub>0</sub><sup>[40]</sup>. En humanos, el receptor ALX/FPR2 está altamente expresado en monocitos, células T y macrófagos, además de varios tipos celulares residentes como fibroblastos sinoviales y células del epitelio intestinal<sup>[41,46]</sup>. En macrófagos, la activación de ALX/FPR2 por RvD1 disminuye drásticamente los niveles de Ca<sup>+2</sup>, además de disminuir la activación de la Calcio-Calmodulina Quinasa II, CaMKII<sup>[44]</sup>.

### 1.7.2.- Resolvina E1

La RvE1 es miembro de la clase E de las Resolvinas, y al igual que su par de la serie D, posee marcados efectos antiinflamatorios. Se sintetiza a partir del EPA, y requiere la acción de varias enzimas como COX-2, 5-LOX y citocromo P450<sup>[45]</sup>.

La RvE1 posee un receptor específico, ChemR23, lo que provoca la activación del GPCR, específicamente G<sub>ai</sub>/G<sub>o</sub>, provocando un aumento en la fosforilación de MAPK/ERK, que promueve la fagocitosis de macrófagos. Por otra parte, RvE1 es un antagonista del receptor BLT1 (receptor 1 de leucotrienos B<sub>4</sub>)(Figura 2), bloqueando la unión de LTB<sub>4</sub>, inhibiendo la actividad de la AC y disminución del Ca<sup>+2</sup>, lo que inhibe la activación de la vía NF-κB, disminuyendo las señales proinflamatorias, y a la vez, promoviendo la apoptosis de células polimorfonucleares<sup>[37,38,46]</sup>.



**Figura 2. Receptores y efectos biológicos de los SPM.**

Actuando a través de sus receptores específicos, los SPM ejercen su acción biológica en leucocitos, que incluyen la atenuación del tráfico de PMN, la disminución en la producción de citoquinas proinflamatorias, así como la estimulación de la fagocitosis de macrófagos tanto de células apoptóticas como de bacterias. *Spite, Clària & Serhan, 2014*<sup>461</sup>.

### 1.8.- Relación entre RvD1, RvE1 y fibroblasto cardíaco

Actualmente no se cuenta con evidencia sobre el efecto de las RvD1 y RvE1 en FC; sin embargo, se cuenta con literatura que describe dichos efectos en este tipo celular (fibroblasto) proveniente de otros órganos como riñón, pulmón y fibroblastos gingivales.

A nivel renal, RvD1 y RvE1 inhibieron la proliferación de fibroblastos<sup>[47]</sup>, mientras que en fibroblastos pulmonares, RvD1 inhibió el máximo de expresión de la COX-2, disminuyendo los niveles de Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) estimulados por LPS. Los autores señalan que dicho efecto está mediado parcialmente por las vías de señalización PI3K/Akt y ERK2<sup>[48]</sup>. También se ha evidenciado el efecto de la RvD1 en fibroblastos gingivales humanos en el contexto de periodontitis. Los resultados mostraron que el tratamiento de los fibroblastos gingivales con RvD1 disminuye significativamente los niveles de IL-6 y MCP-1<sup>[49]</sup>.

Como se describió anteriormente, la sobreexpresión de moléculas de adhesión y citoquinas proinflamatorias en forma crónica perpetúa la inflamación, ejerciendo efectos deletéreos en el tejido cardíaco, llevándolo progresivamente hacia la fibrosis y la pérdida de funcionalidad. Las RvD1 y RvE1 han demostrado efectos antiinflamatorios en diversos tejidos y tipos celulares; sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado su efecto sobre la expresión de moléculas de adhesión y citoquinas proinflamatorias inducidas por un estímulo fuertemente inflamatorio como LPS. Por ello, estudiar los efectos de estos mediadores antiinflamatorios en FC podría originar nuevos enfoques y estrategias terapéuticas en inflamación cardíaca.

Por lo tanto, los antecedentes anteriormente descritos nos permiten formular la siguiente hipótesis

## **2.- HIPÓTESIS**

Las Resolvinas D1 y E1 disminuyen la expresión de moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 y la secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias en fibroblastos cardíacos de rata neonata estimulados con LPS.

## **3.- OBJETIVO GENERAL**

Estudiar en los fibroblastos cardíacos si las Resolvinas D1 y E1 disminuyen la expresión de moléculas de adhesión y la secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias inducidas por LPS.

## **4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**4.1.-** Demostrar que en fibroblastos cardíacos estimulados con LPS, las Resolvinas D1 y E1 disminuyen la expresión de ICAM-1 y VCAM-1.

**4.2.-** Demostrar que en fibroblastos cardíacos estimulados con LPS, las Resolvinas D1 y E1 disminuyen la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 y aumenta la secreción de IL-10.

**4.3.-** Demostrar que en fibroblastos cardíacos estimulados con LPS, las Resolvinas D1 y E1 disminuyen la expresión de pro-IL-1 $\beta$ .

## **5.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1.- Reactivos**

Suero fetal bovino (FBS), tripsina/EDTA, medio de cultivo DMEM/F12 y compuestos orgánicos e inorgánicos fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Germany). Estándar de peso molecular fueron adquiridos en MaestroGen (Hsinchu City, Taiwán). Reactivos para quimioluminiscencia mejorada (ECL) fueron comprados en PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Material de plástico estéril fue obtenido en Corning Inc. (New York, NY).



Anticuerpos primario anti ICAM-1 y anticuerpo secundario donkey Anti-goat IgG-HRP fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology Inc. (Texas, EEUU). Anticuerpo primario anti VCAM-1 fue comprado en Abcam (Cambridge, MA). Anticuerpo primario anti GAPDH y anticuerpo secundario Anti-rabbit IgG fueron obtenidos en Cell Signaling Technology Inc. (MA, EEUU). Bradford Reagent fue adquirido en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). LPS-EB Ultrapure (E. coli O111:B4), fue comprado en InvivoGen (San Diego, CA). Reactivo RvD1 (CAS 872993-05-0) y RvE1 (CAS 872993-05-0) fue comprado a Cayman Chemical Company (MI, EEUU). Colagenasa tipo II (CAS 9001-12-1) y Trypan Blue (CAS 15250-061) fueron comprados a Life Technologies Corporation (CA, EEUU). De Merck-Millipore (California, EEUU) se compró el kit multiplex (RECYTMAG-65K/MILLIPLEX MAP Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel) y el anticuerpo primario anti-IL-1 $\beta$ .

## **5.2.- Modelo animal**

Ratas *Sprague-Dawley* neonatas (2 a 3 días de edad) provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, con cumplimiento de todas las normas éticas referidas a la utilización de animales. Todos los estudios fueron desarrollados cumpliendo la Guía de la NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, actualizada en el 2011 (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-Use-of-Laboratory-Animals>).

## **5.3.- Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos neonatos**

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

#### **5.4.- Pasaje celular**

Para la realización de los experimentos, los FC se mantuvieron en medio DMEM-F12/FBS 10% hasta confluencia en pasaje 0. Posteriormente, se lavaron las placas con PBS 1X y las células se soltaron con tripsina/EDTA 0,05% en PBS 1X estéril, las cuales fueron contadas por el método de exclusión de Azul de Tripán. Luego, se sembraron 400.000 células/placa en placas de cultivo de 60 mm para la determinación de proteínas de adhesión. Transcurridas 24 horas desde el pasaje, los fibroblastos fueron lavados con PBS 1X estéril y se privaron de suero con medio DMEM-F12 por 24 horas más para ensayos posteriores.

#### **5.5.- Western Blot**

Las muestras fueron recolectadas de las placas de cultivo de 60 mm, previamente lavadas con PBS 1X no estéril frío (1 mL x 2). Luego, se adicionaron 65  $\mu$ L de Tampón de Lisis y se procedió a la obtención del lisado celular raspando suavemente la placa. La muestra fue recolectada en tubos Eppendorf de 1,5 mL y se *sonicó* por 5 minutos y luego se centrifugó a 15.000 rpm por 10 minutos. Se descartó el pellet y 5  $\mu$ L del remanente fueron utilizados para cuantificar la concentración de proteína de la muestra empleando el Método de Bradford. Posteriormente, se adicionó 20  $\mu$ L de Tampón de Carga 4X y se calentó durante 5 minutos a 100° C para denaturar las proteínas.

La separación de las proteínas por su masa se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida preparados a partir de una solución de acrilamida/bis-acrilamida. La concentración del gel concentrador (*stacking*) fue 5%, mientras que la del gel separador (*running*) fue de 10-15%, dependiendo de la proteína de interés. Se adicionaron volúmenes equivalentes a 25  $\mu$ g de proteína por carril. La electroforesis se realizó a 70 V por 30 minutos para concentrar la muestra, y luego a 100 V para la separación, en tampón de electroforesis.

Luego de realizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0,2  $\mu$ M de poro durante 90 minutos a una corriente constante de 0,35 A en tampón de transferencia. Una vez transferidas las proteínas a las membranas, se bloquearon las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con leche descremada al 5% (p/v) y posteriormente, se incubaron con los

respectivos anticuerpos primarios (ICAM-1 1:5000, VCAM-1 1:10000, IL-1 $\beta$  1:1000, GAPDH 1:2000) durante toda la noche a 4°C.

Posterior a la incubación, las membranas se lavaron durante 15 min en TBS 1X/ Tween-20 al 0,1% , y fueron incubadas durante 90 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-*rabbit* (dilución 1:5000) en TBS 1X/Tween-20 al 0,1%. Para la inmunodetección, las membranas previamente lavadas fueron incubadas por 1 minuto con el reactivo quimioluminiscente ECL y la quimioluminiscencia fue detectada por el equipo C-DiGit (LI-COR Biosciences, Nebraska) mediante el software computacional Image Studio (LI-COR Biosciences, Nebraska). Los niveles de proteína fueron cuantificados mediante la herramienta de cuantificación del software Image Studio y normalizados respecto a GAPDH, siendo los resultados expresados como veces sobre el control.

### **5.6.- Medición de citoquinas por LUMINEX**

El perfil de citoquinas secretados por FC fue medido mediante ensayo LUMINEX del medio de cultivo utilizando el *kit* multiplex (RECYTMAG-65K/MILLIPLEX MAP Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El *kit* fue diseñado para medir un perfil de citoquinas en las que se incluyen IL-6, IL-10, MCP-1 y TNF- $\alpha$ . Los niveles de citoquinas se midieron en el equipo Luminex 200 system, Multiplex Bio-Assay. La cuantificación se realizó basándose en curvas estándar para cada citoquina: IL-6: 73.2-300000 pg/mL, IL-10: 7.3-30000 pg/mL, MCP-1: 29.3-120000 pg/mL y TNF- $\alpha$ : 2.4-10000 pg/mL. Los valores se normalizaron respecto a la cantidad de proteína total y fueron expresados en veces sobre el control.

### **5.7.- Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  SD, de al menos tres experimentos independientes ( $n \geq 3$ ). Los datos obtenidos fueron analizados por ANOVA de una vía y luego mediante Test de Tukey, lo que permitió determinar la significancia estadística de los resultados, considerándose significativa la diferencia entre dos grupos cuando su valor de  $p < 0.05$ .

## 6.- RESULTADOS

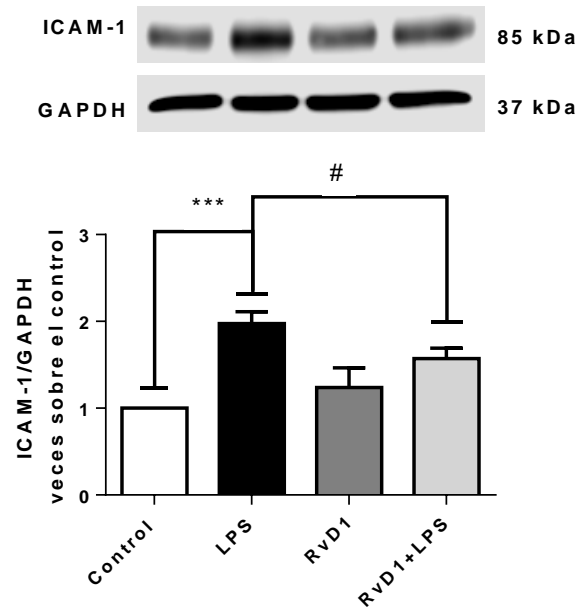
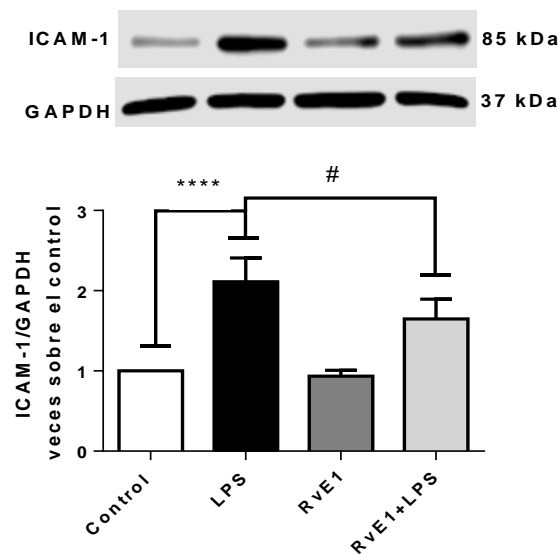
### 6.1.- Efecto de las RvD1 y RvE1 en los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducido por LPS en fibroblastos cardíacos

Algunos resultados anteriores del laboratorio mostraron un aumento en la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en FC frente a ligandos del TLR4 como LPS o Heparán Sulfato, donde se alcanzó el *peak* de expresión a las 24 horas tras el estímulo inflamatorio<sup>[12,17]</sup>. Por ello, se evaluó el efecto de RvD1 y RvE1 en la expresión de dichas moléculas de adhesión en FC estimulados con LPS.

Los FC fueron pretratados con RvD1 o RvE1 100 nM durante 30 minutos, y luego fueron estimulados con LPS 1 µg/mL durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se recuperó el lisado celular y se evaluó la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 mediante *Western Blot*.

En la figura 3A, se muestra el aumento en la expresión de ICAM-1 inducido por LPS, duplicando los niveles de expresión respecto del control. El análisis gráfico muestra que la RvD1 disminuye de una manera estadísticamente significativa los niveles de ICAM-1 inducidos por LPS, llegando a 1,6 veces sobre el control. Por otra parte, en la figura 3B, se muestra que la RvE1 también disminuye de una manera estadísticamente significativa los niveles de ICAM-1 inducidos por LPS, llegando a 1,5 veces los niveles de expresión respecto del control.

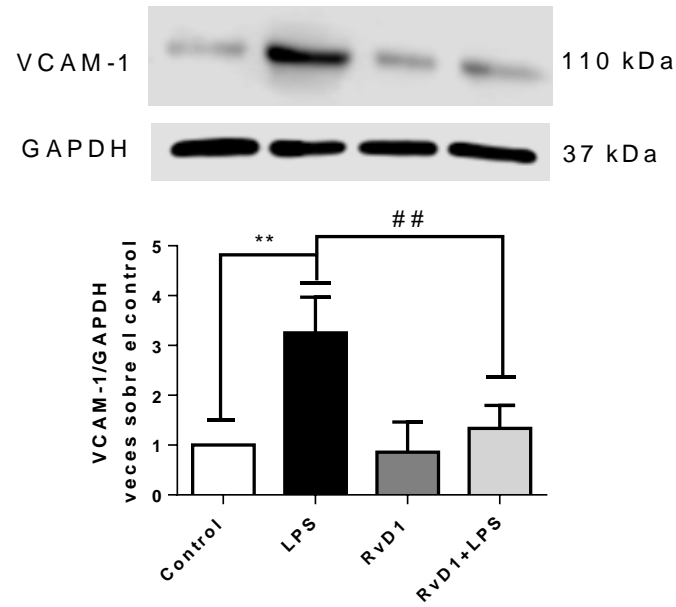
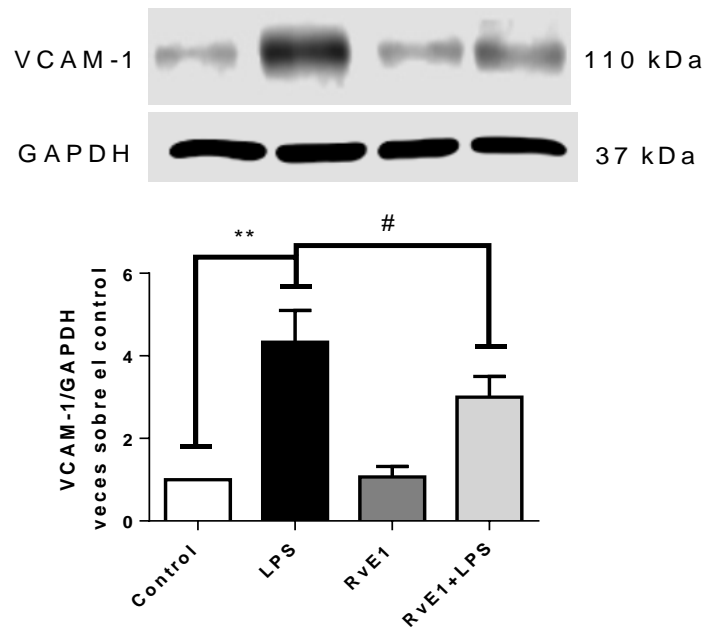
En la figura 4, se exhibe el aumento en los niveles de expresión de VCAM-1 inducido por LPS, llegando a cuadruplicar los niveles respecto al control. En la figura 4A se muestra que la RvD1 disminuye de una manera estadísticamente significativa los niveles de expresión de VCAM-1 inducidos por LPS, llegando a niveles ligeramente superiores al control. En la figura 4B, se muestra que la RvE1 disminuye de una manera estadísticamente significativa los niveles de expresión de VCAM-1 inducidos por LPS, llegando a niveles de VCAM-1 cercanos a las 2,5 veces respecto al control.

**A****B**

**Figura 3. Efecto de las Resolvina D1 y E1 sobre el incremento en los niveles de expresión de ICAM-1 inducido por LPS en FC.**

Los FC fueron pretratados con RvD1 (A) o RvE1 (B) 100 nM por 30 minutos y luego estimulados con LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 24 h y se determinó la expresión de ICAM-1 mediante *Western Blot*. Se muestra una imagen representativa del Western Blot y su respectivo análisis gráfico. Se utilizó GAPDH como control de carga.

\*\*\* p < 0,001 y \*\*\*\* p < 0,0001 vs Control, # p < 0,05 vs LPS. N = 3.

**A****B**

**Figura 4. Efecto de las Resolovina D1 y E1 sobre el incremento en los niveles de expresión de VCAM-1 inducido por LPS en FC.**

FC fueron pretratados con RvD1 (A) o RvE1 (B) 100 nM por 30 minutos y luego estimulados con LPS 1 µg/mL durante 24 h y se determinó la expresión de VCAM-1 mediante *Western Blot*. Se muestran imágenes representativas del *Western Blot* de VCAM-1, y el respectivo análisis gráfico. Se utilizó GAPDH como control de carga. \*\*  $p < 0,01$  vs control, #  $p < 0,05$  y ##  $p < 0,01$  vs LPS. N = 3.

## **6.2.- Efecto de la RvD1 y RvE1 en la secreción de citoquinas inducidas por LPS en fibroblastos cardíacos**

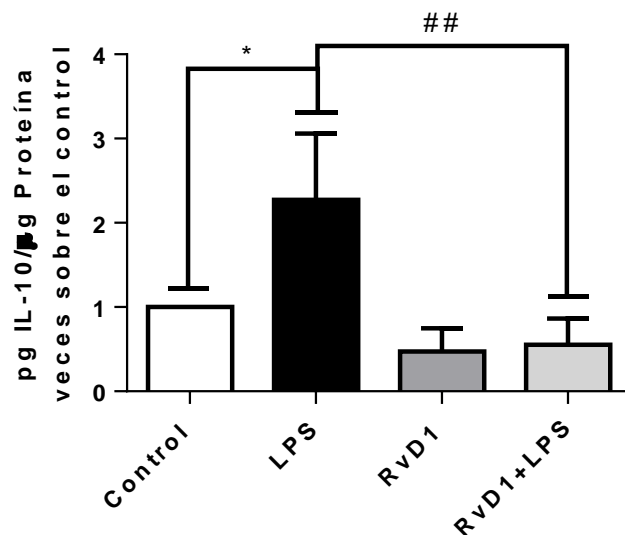
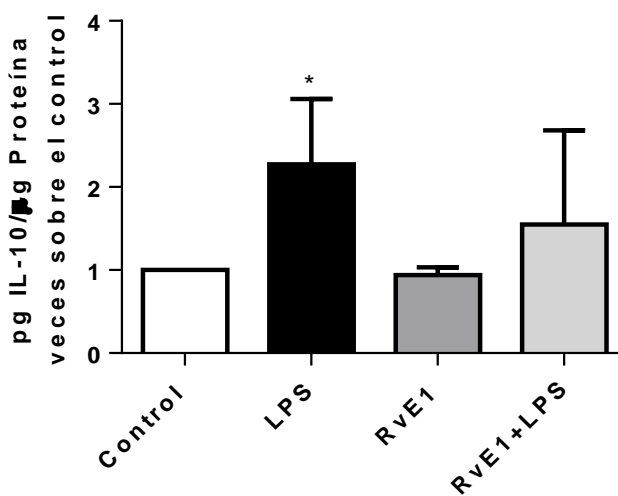
Algunos trabajos anteriores del laboratorio demostraron la capacidad del FC para responder a estímulos deletéreos como LPS, incrementando la secreción de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 e IL-10, y dicha secreción alcanzaba su máximo nivel a las 24 horas tras el tratamiento con LPS<sup>[12]</sup>. En base a esto, se evaluó el efecto de RvD1 y RvE1 en la secreción de estas citoquinas inducidas por LPS.

Los FC fueron pretratados con RvD1 o RvE1 100 nM durante 30 minutos y luego fueron estimulados con LPS 1  $\mu$ g/mL durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se recuperó el medio de cultivo y se midió el perfil de citoquinas secretadas mediante LUMINEX.

En los resultados exhibidos en la figura 5, se observa que, en los FC, LPS indujo un incremento de 2,2 veces sobre el control en la secreción de IL-10. En los resultados de la figura 5A, se observa que la RvD1 disminuyó de una manera estadísticamente significativa, dicha secreción a niveles inferiores respecto del control; mientras que, en la figura 5B, la RvE1 no mostró efecto sobre los niveles de secreción de IL-10 inducida por LPS.

En la figura 6, los resultados muestran que en los FC el LPS aumentó en 14,8 veces la secreción de IL-6 respecto del control. La figura 6A muestra que el pretratamiento con RvD1 disminuyó de una manera estadísticamente significativa la secreción de IL-6, llegando a 2,8 veces sobre el control; mientras que en la figura 6B, se muestra que la RvE1 no fue capaz de modificar la secreción de IL-6 inducida por LPS.

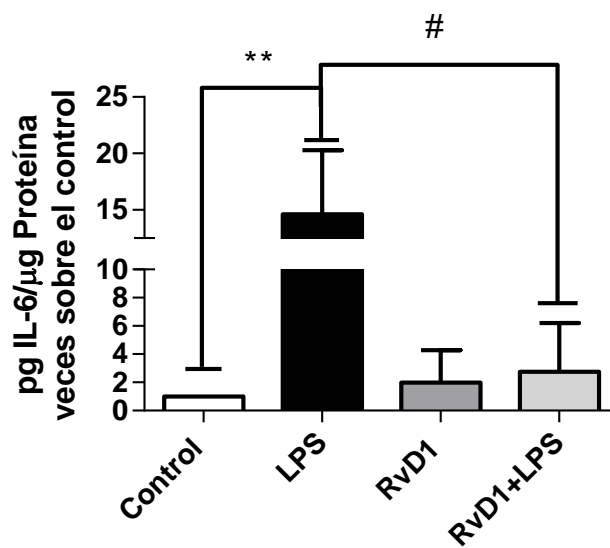
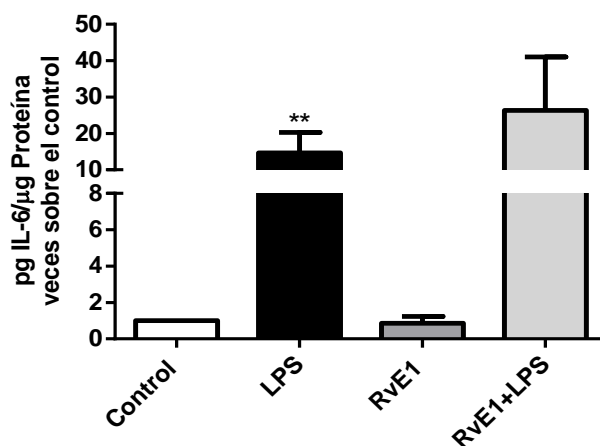
Finalmente, los resultados de la figura 7 muestran que, en los FC, el LPS indujo un enorme incremento en la secreción de TNF- $\alpha$ , llegando a aumentar 48,6 veces respecto al control. La figura 7A muestra que la RvD1 redujo de una manera estadísticamente significativa la secreción de TNF- $\alpha$ , llegando a 8 veces por sobre el nivel del control. Por el contrario, en la figura 7B se muestra que la RvE1 no fue capaz de modificar los niveles de secreción de TNF- $\alpha$  inducida por LPS.

**A****B**

**Figura 5. Efecto de las Resolvina D1 y E1 sobre el aumento de los niveles de secreción de IL-10 inducido por LPS en FC.**

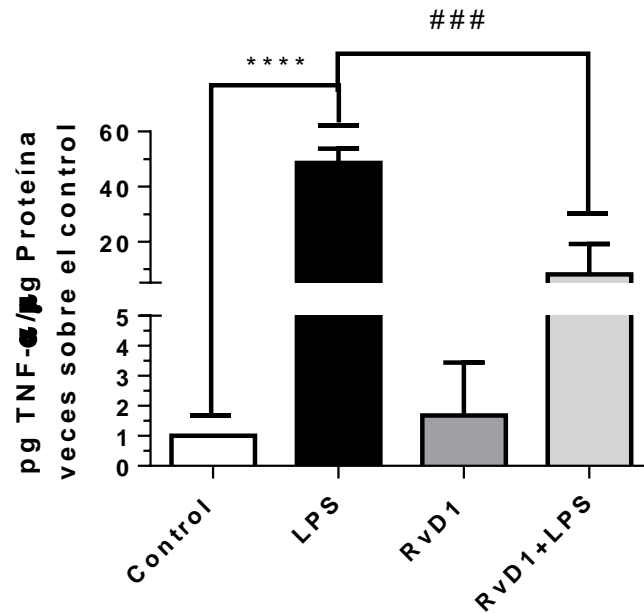
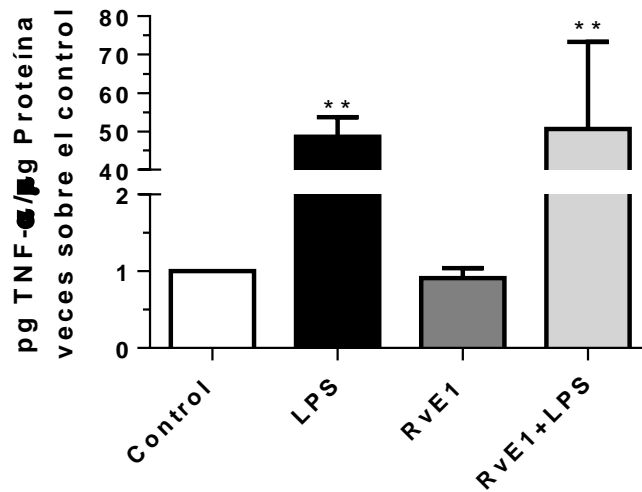
FC fueron pretratados con RvD1 (A) o RvE1 (B) 100 nM por 30 minutos y luego estimulados con LPS 1 µg/mL durante 24 h y se determinó la secreción de IL-10 mediante LUMINEX. Los resultados fueron normalizados respecto a proteína total y se expresan respecto al control. \*  $p < 0,05$  vs Control, ##  $p < 0,01$  vs LPS. N = 3.



**A****B**

**Figura 6. Efecto de las Resolvinas D1 y E1 sobre el aumento en los niveles de secreción de IL-6 inducido por LPS en FC.**

FC fueron pretratados con RvD1 (A) o RvE1 (B) 100 nM por 30 minutos y luego estimulados con LPS 1 μg/mL durante 24 h y se determinó la secreción de IL-6 mediante LUMINEX. Los resultados fueron normalizados respecto a proteína total y se expresan respecto al control. \*\*  $p < 0,01$  vs Control, #  $p < 0,05$  vs LPS. N = 3.

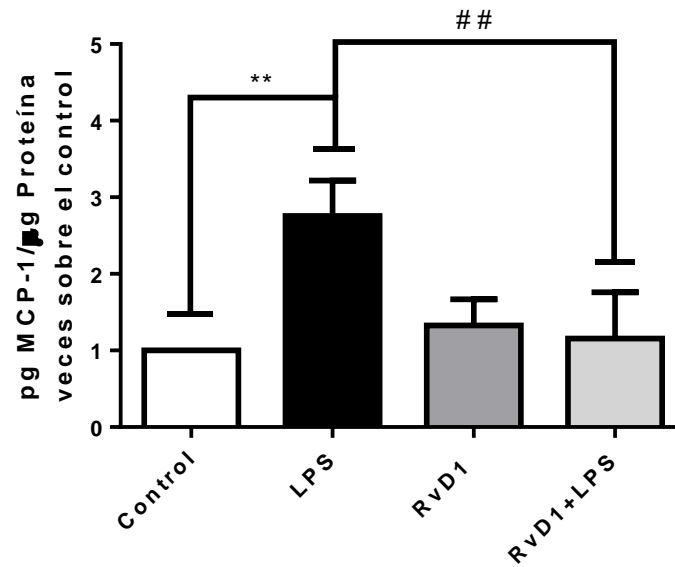
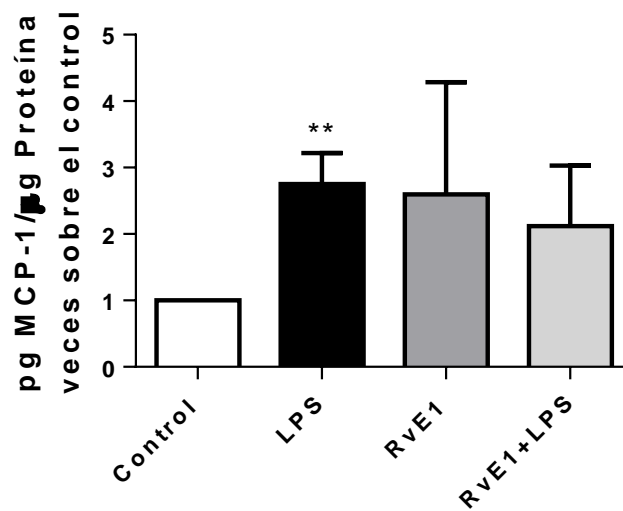
**A****B**

**Figura 7. Efecto de las Resolvina D1 y E1 sobre el aumento en los niveles de secreción de TNF- $\alpha$  inducido por LPS en FC.**

FC fueron pretratados con RvD1 (A) o RvE1 (B) 100 nM por 30 minutos y luego estimulados con LPS 1  $\mu$ g/mL durante 24 h y se determinó la secreción de TNF- $\alpha$  mediante LUMINEX. Los resultados fueron normalizados respecto a proteína total y se expresan respecto al control. \*\* p < 0,01 y \*\*\*\* p < 0,0001 vs Control, ### p < 0,001 vs LPS. N = 3.

### **6.3.- Efecto de la RvD1 y RvE1 en la secreción de quimioquinas inducidas por LPS en fibroblastos cardíacos.**

La figura 8 muestra el aumento de la secreción de MCP-1 en los FC inducida por LPS, logrando un aumento de 2,8 veces respecto a la condición control. La figura 8A muestra que la RvD1 disminuyó de una manera estadísticamente significativa los niveles de secreción MCP-1, llegando a niveles próximos al control. Mientras que, en la figura 8B, se observa que la RvE1 no fue capaz de modificar los niveles de secreción de MCP-1 inducidos por LPS.

**A****B**

**Figura 8. Efectos de las Resolvinas D1 y E1 sobre el aumento en los niveles de secreción de MCP-1 inducido por LPS en FC.**

FC fueron pretratados con RvD1 (A) o RvE1 (B) 100 nM por 30 minutos y luego estimulados con LPS 1 µg/mL durante 24 h y se determinó la secreción de MCP-1 mediante LUMINEX. Los resultados fueron normalizados respecto a proteína total y se expresan respecto al control. \*\*p < 0,01 vs Control, ## p < 0,01 vs LPS. N = 3.

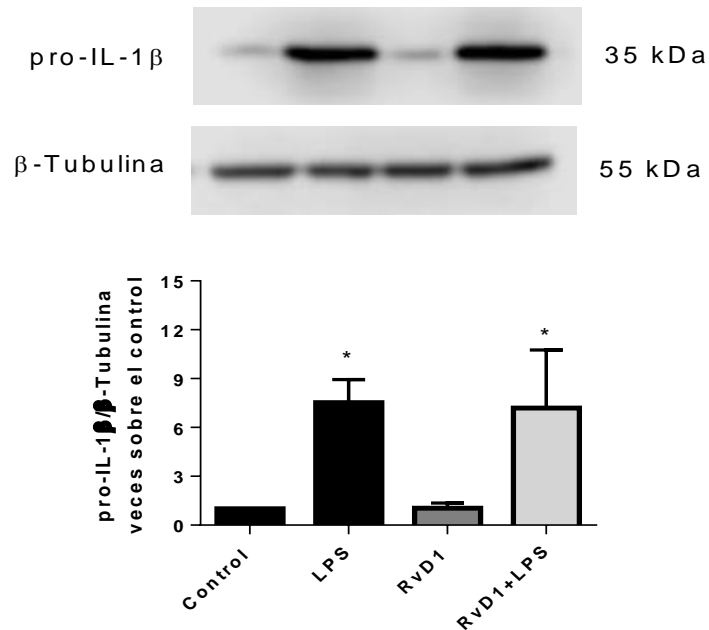
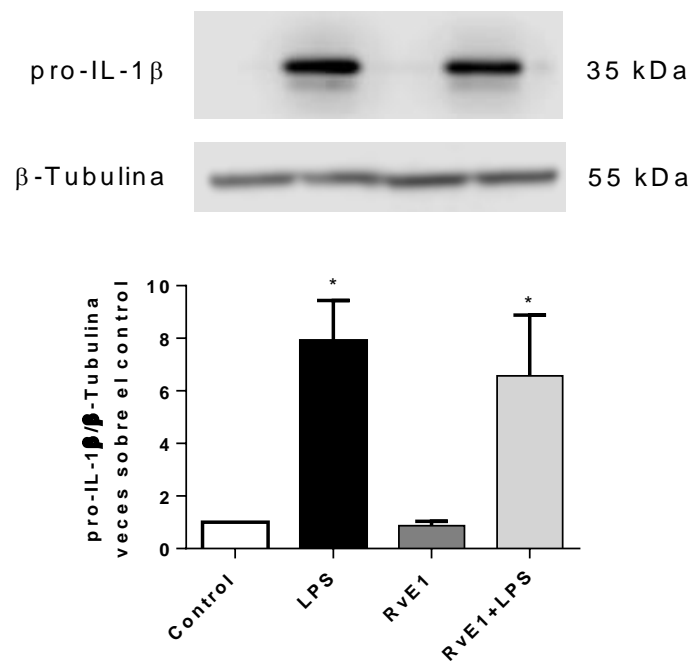
#### **6.4.- Efecto de la RvD1 y RvE1 sobre la expresión de pro-IL-1 $\beta$ inducida por LPS en fibroblastos cardíacos**

Algunos resultados previos del laboratorio han demostrado que en los FC, el LPS incrementa los niveles de expresión de pro-IL-1 $\beta$  y dicho aumento alcanza su máximo a las 8 horas tras el estímulo<sup>[18]</sup>. Por tanto, se evaluó el efecto de las RvD1 y RvE1 sobre la expresión de esta proteína, la cual es precursora de IL-1 $\beta$ , una citoquina fuertemente proinflamatoria.

Los FC fueron pretratados con las RvD1 o RvE1 100 nM durante 30 minutos, y luego fueron estimulados con LPS 1  $\mu$ g/mL durante 8 horas. Transcurrido el tiempo, se recuperó el lisado celular y se evaluó el nivel de expresión de pro-IL-1 $\beta$  mediante *Western Blot*.

Los resultados muestran que en los FC, los niveles de expresión basales de pro-IL-1 $\beta$  son bajos; sin embargo, LPS aumentó significativamente la expresión de esta proteína, lográndose aumentos de casi 8 veces respecto al control a las 8 horas de estímulo.

En las figuras 9A y 9B, los resultados muestran que las RvD1 y RvE1, respectivamente, no fueron capaces de disminuir el aumento de pro-IL-1 $\beta$  inducida por LPS a las 8 horas, manteniendo niveles de expresión similares a LPS.

**A****B**

**Figura 9. Efecto de las Resolvina D1 y E1 sobre el incremento de los niveles de expresión de pro-IL-1 $\beta$  inducida por LPS en FC.**

Los FC fueron pretratados con RvD1 (A) o RvE1 (B) 100 nM por 30 minutos y luego estimulados con LPS 1  $\mu$ g/mL durante 8 h y se determinó los niveles de expresión de pro-IL-1 $\beta$  mediante Western Blot. Se muestra una imagen representativa del Western Blot, y su respectivo análisis gráfico. Se utilizó  $\beta$ -Tubulina como control de carga. \* p < 0,05 vs control. N = 3.

## 7.- DISCUSIÓN

Los mecanismos celulares y moleculares que son gatillados en respuesta al daño cardíaco tienen un inicio caracterizado por una amplia secreción de citoquinas y quimioquinas que favorecen el reclutamiento de células del sistema inmune a la zona de daño. En este sentido, la expresión del receptor TLR4 en los FC le permite responder adecuadamente a patrones moleculares asociados a daño, y de esta forma participar activamente de la respuesta inflamatoria. Tras esto, ocurre la resolución del proceso inflamatorio, donde los principales responsables son los mediadores especializados pro-resolutivos, que contribuyen a la finalización de la inflamación y el retorno a la homeostasis del tejido. Los FC son cruciales en la formación de la cicatriz del tejido en la fase fibrótica, ya que son las células encargadas de la secreción de colágenos que conforman gran parte de las proteínas de la MEC.

Los principales resultados mostraron que LPS indujo un incremento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC, y que dicho aumento fue prevenido por el pretratamiento con las RvD1 y RvE1. También, LPS indujo una fuerte secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP-1, además de aumentar la secreción de la citoquina inmunomoduladora IL-10. Este aumento fue prevenido por RvD1, pero no así por RvE1, la cual no logró disminuir la secreción de ninguna de las citoquinas y quimioquinas evaluadas en este trabajo. Además, se mostró que LPS induce un elevado aumento en la expresión de pro-IL-1 $\beta$ , sin embargo, dicho aumento no es capaz de ser prevenido por el pretratamiento con RvD1 y RvE1.

Los resultados obtenidos en esta memoria serán discutidos y contrastados en las siguientes páginas respecto a lo que se ha reportado en la literatura.

### **7.1.- Evaluación de los efectos de las RvD1 y RvE1 sobre los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por LPS en fibroblastos cardíacos**

Si bien es cierto que el FC no es una célula del sistema inmune, ésta es capaz de expresar moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 en respuesta a daño producido por DAMPs o PAMPs. Estas proteínas son expresadas en forma basal por una gran gama de tipos celulares; sin embargo, se ha descrito en variados tipos celulares el incremento de ellas por estímulos proinflamatorios como TNF- $\alpha$ <sup>[50]</sup>, IL-1 $\beta$ <sup>[51]</sup> y LPS<sup>[12]</sup>.

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que en FC los agonistas del TLR4 como el LPS<sup>[12]</sup> o el Heparán Sulfato<sup>[17]</sup> incrementan los niveles de ICAM-1 y VCAM-1, obteniendo máxima expresión de estas moléculas de adhesión a las 24 horas tras el estímulo proinflamatorio. Estos resultados se condicen con otros obtenidos en otros tipos celulares como fibroblastos corneales<sup>[52]</sup> donde LPS aumentó la expresión de ICAM-1, así como también, en células mesangiales de riñón humano<sup>[53]</sup>, donde la exposición a LPS incrementó la expresión de VCAM-1. En FC, el aumento de los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 está directamente ligado a la adhesión de leucocitos (SMC y PMN), y que la disminución de alguna de estas proteínas, inhibe significativamente la adhesión de células del sistema inmune<sup>[12,17]</sup>.

Actualmente no hay reportes en la literatura científica acerca de los efectos de las RvD1 y RvE1 sobre la expresión de moléculas de adhesión inducidas por estímulos proinflamatorios en FC. Sin embargo, la evidencia adquirida en FC neonatos corrobora resultados previos del laboratorio en FC adultos, donde RvE1 disminuyó la expresión de ICAM-1 inducida por Angiotensina II<sup>[54]</sup>, mientras que RvD1 disminuyó la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 inducidas por LPS<sup>[55]</sup> y Heparán Sulfato<sup>[56]</sup>.

La literatura cuenta con evidencia de los efectos de las RvD1 y RvE1 sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en variados modelos de inflamación y daño tisular, los cuales serán discutidos en los siguientes párrafos. A este respecto, se ha reportado en la literatura que la RvD1 disminuye la expresión de ICAM-1 en un modelo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica por tabaquismo en ratones<sup>[57]</sup>. Así mismo, la RvD1 disminuyó la síntesis del mRNA para ICAM-1 y VCAM-1 inducida por TNF- $\alpha$  en células de la musculatura lisa vascular de humanos, y que esta disminución, a su vez, redujo drásticamente la adhesión de monocitos en este tipo celular<sup>[58]</sup>. Por otra parte, en un modelo de colitis en ratones, la AT-RvD1 disminuyó la expresión del mRNA para ICAM-1 y VCAM-1 a través de la inhibición



de la vía NF- $\kappa$ B<sup>[59]</sup>. Por otro lado, en un modelo de inflamación en células endoteliales de retina de macaco, las RvD1 y RvE1 disminuyeron la expresión de VCAM-1 inducida por IL-1 $\beta$ <sup>[60]</sup>.

Por otra parte, trabajos anteriores del laboratorio han demostrado los efectos de las RvD1 y RvE1 sobre la adhesión de SMC sobre FC inducida por agentes inflamatorios como LPS, Heparán Sulfato y Angiotensina II. Se demostró que RvD1 y RvE1 disminuyen la adhesión de SMC inducida por LPS al disminuir ICAM-1 y VCAM-1<sup>[61,62]</sup>, así mismo, se demostró que RvD1 disminuye la adhesión inducida por HS, disminuyendo los niveles de expresión de ambas proteínas de adhesión<sup>[56]</sup>, y por último, que RvE1 disminuye dicho proceso inducido por Angiotensina II al disminuir la expresión de ICAM-1<sup>[54]</sup>.

De esta forma, nuestros hallazgos se condicen con aquellos reportados en la literatura, donde las RvD1 y RvE1 muestran sus potentes efectos antiinflamatorios y disminuyen la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en diferentes modelos de inflamación, destacando así sus efectos en la disminución de los procesos inflamatorios, adhesión de células del sistema inmune y perduración de la respuesta inflamatoria.

## **7.2.- Evaluación de los efectos de las RvD1 y RvE1 sobre la secreción de citoquinas y quimioquinas inducidas por LPS en fibroblastos cardíacos**

El FC, en su rol de célula centinela, es capaz de responder adecuadamente a diferentes estímulos que causan daño y que inician una respuesta inflamatoria. Dentro de esta respuesta, la secreción de citoquinas proinflamatorias tras el daño cardíaco es un rasgo característico, y así participa del inicio, mantenimiento y finalización de la respuesta inflamatoria en el tejido cardíaco.

Resultados previos del laboratorio han demostrado como el FC es capaz de secretar citoquinas en respuesta a estímulos inflamatorios. En particular, Humeres et al., demostraron que el tratamiento de FC con LPS aumentó drásticamente la secreción de TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 e IL-10<sup>[12]</sup>. Los resultados obtenidos en esta memoria se condicen los resultados previamente mencionados, y en otras investigaciones mencionadas a continuación.

En fibroblastos pulmonares humanos se ha demostrado que LPS aumentó la secreción de MCP-1 e IL-6<sup>[63]</sup>. Otro reporte de la literatura, muestra el aumento de IL-1 $\beta$  e IL-6 en fibroblastos humanos del ligamento periodontal tras su estimulación con LPS de *Porphyromonas gingivalis* en un contexto de periodontitis<sup>[64]</sup>. En FC humanos tratados con LPS 1  $\mu$ g/mL hay evidencia de que dicho tratamiento indujo un fuerte aumento de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6, IL-8 y MCP-1, demostrando así las características inmunocompetentes y la capacidad de producir respuestas inflamatorias por parte de los FC<sup>[65]</sup>.

En la actualidad, no se ha reportado en la literatura el efecto de las Resolvina D1 y E1 sobre la secreción de citoquinas inducidas por estímulos proinflamatorios en FC; sin embargo, hay literatura sobre otros modelos y tipos celulares, y se discutirán en los siguientes párrafos.

Respecto a la RvD1, se ha reportado en modelos de retinopatía diabética en ratones que la RvD1 disminuye la secreción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en el epitelio corneal<sup>[66]</sup>. También, en un contexto de inflamación pulmonar aguda inducida por tabaquismo, en cultivos de fibroblastos pulmonares humanos, la RvD1 disminuyó la secreción de IL-8, IL-6 y MCP-1 inducidas por extractos acuosos de humo de cigarrillo<sup>[67]</sup>. Así mismo, en cultivos de microglías murinas, el pretratamiento con la RvD1 disminuyó la síntesis del mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 inducidas por LPS<sup>[68]</sup>. En un modelo *in vivo* de isquemia/reperfusión hepática en ratas, el tratamiento con RvD1 disminuyó significativamente la síntesis del mRNA de TNF- $\alpha$  e IL-6, así como la infiltración de neutrófilos en el tejido hepático<sup>[69]</sup>. En monocitos humanos estimulados con LPS, RvD1 mostró disminuir la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , además de potenciar aún más la secreción de IL-10 inducida por LPS<sup>[70]</sup>. Este último resultado difiere de nuestros hallazgos, donde en FC de rata estimulados con LPS, la RvD1 disminuyó la secreción de IL-10. Este hecho puede ser explicado en parte debido al tipo de efecto que promueve la RvD1 y el tipo celular en cuestión. Es sabido que los monocitos polarizan su diferenciación a dos tipos de macrófagos (M1, proinflamatorio y M2, profibrótico/antiinflamatorio), en respuesta al ambiente bioquímico que los rodea, y se ha demostrado que TGF- $\beta$ 1 e IL-10 polarizan los monocitos hacia el fenotipo M2, el cual posee características profibróticas y un perfil de secreción antiinflamatorio y profibrótico, secretando IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ 1<sup>[12]</sup>. Se ha demostrado en modelos de isquemia/reperfusión hepática, donde las células de Kupffer tratadas con RvD1 secretan más IL-10 respecto al tratamiento con LPS, y que dicha secreción polariza su diferenciación hacia macrófagos M2<sup>[71]</sup>. Por lo tanto, el efecto de RvD1 sobre la secreción de IL-10 parece estar influenciado

por el tipo celular, encontrándose aumentada más aún respecto al estímulo inflamatorio en células inmunes como monocitos, pero disminuida en FC.

En síntesis, los resultados encontrados con RvD1 poseen un elevado grado de correlación respecto a lo que se ha reportado en literatura, realzando los efectos antiinflamatorios mediados por la RvD1, donde la disminución de la producción de mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$ , MCP-1 e IL-6 conduce a la resolución de la inflamación y el comienzo de la reparación del tejido cardíaco dañado.

Por otra parte, nuestros resultados respecto a los efectos de la RvE1 sobre la secreción de citoquinas difieren y a la vez concuerdan con la poca evidencia que existe sobre este mediador lipídico y sus efectos en la secreción de citoquinas. No obstante, el enfoque será discutir en base a los estudios que existen, y apuntar hacia las diferencias entre los modelos y tipos celulares utilizados. A este respecto, Rey et al, demostraron en un modelo de inflamación inducido por LPS en las microglías, que la RvE1 10 nM disminuyó la síntesis mRNA de IL-6 a las 24 horas tras el tratamiento con LPS. Sin embargo, en ese mismo trabajo, demostraron que LPS 1  $\mu$ g/mL a las 24 h incrementa casi 3 veces sobre el control la expresión de ChemR23, receptor para RvE1<sup>[68]</sup>. Mientras que, en nuestro laboratorio, se demostró en FC que estímulos proinflamatorios como LPS, Heparán Sulfato o Angiotensina II no inducen la expresión de ChemR23 a las 24 horas<sup>[72]</sup>. De esta forma, una mayor cantidad de receptores pueden responder de mejor manera a concentraciones bajas de RvE1, haciendo notar sus efectos al disminuir la síntesis de mRNA de mediadores inflamatorios.

Por otro lado, Lund et al., utilizaron un modelo *in vitro* de inflamación de Islotes de Langerhans humanos inducido por LPS y evaluaron los efectos del tratamiento con RvE1 500 nM por 18 horas previo al estímulo con LPS, midiendo la secreción de TNF- $\alpha$  y MCP-1 y otras citoquinas a las 6 horas tras LPS. Demostraron que RvE1 disminuye la secreción de TNF- $\alpha$  y MCP-1 inducida por LPS en este tejido<sup>[73]</sup>. Estos resultados difieren de los obtenidos en este trabajo; sin embargo, hay una diferencia bastante importante, que es la concentración de RvE1 utilizada, la cual es 5 veces mayor a la que fue utilizada en nuestro modelo, lo que podría indicar que los efectos de RvE1 están mediados por un carácter dosis-dependiente. En este mismo sentido, Baker et al., utilizaron un modelo de inflamación *in vitro* inducido por LPS en mioblastos murinos y evaluaron los efectos del tratamiento con RvE1 100 nM en la secreción de IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1; y demostraron que la RvE1 solamente disminuyó la secreción de IL-6, mientras que, la secreción de TNF- $\alpha$  y MCP-1

no se vió afectada por RvE1<sup>[74]</sup>. Este resultado concuerda en parte con lo obtenido en nuestros hallazgos en FC, donde la RvE1 no mostró efectos sobre la secreción de TNF- $\alpha$  y MCP-1 inducida por LPS; sin embargo, no apreciamos disminución en la secreción de IL-6, mientras que este grupo de investigación si lo observó, lo que sugiere que RvE1 posee efectos tejido-específicos.

De esta forma, pareciera ser que los efectos de RvE1 sobre la secreción de citoquinas están directamente relacionados al tejido y/o tipo celular empleado, así como la concentración utilizada de este mediador lipídico. Por lo visto, RvE1 no afecta la secreción de citoquinas inducida por LPS en FC, lo que constituye la primera evidencia sobre dichos efectos en este tipo celular.

### **7.3.- Evaluación de los efectos de RvD1 y RvE1 sobre la expresión de pro-IL-1 $\beta$ inducida por LPS en fibroblastos cardíacos**

Como ya se mencionó anteriormente, el FC, en su rol de célula centinela, es capaz de responder adecuadamente a estímulos que causan una respuesta inflamatoria. Respecto de la IL-1 $\beta$ , es bien conocido que esta citoquina es fuertemente proinflamatoria, y como se describió, su secreción aumenta considerablemente tras estímulos inflamatorios asociados a daño tisular o en respuesta a patógenos. Sin embargo, su mecanismo de expresión y secreción es regulado por dos componentes clave. Boza *et al.*, demostraron en FC, que la secreción de IL-1 $\beta$  depende en primer lugar de su expresión génica a través de agentes proinflamatorios, como LPS, y dicha señal es conocida como señal 1<sup>[18]</sup>. La señal 1 induce la expresión de pro-IL-1 $\beta$ , la cual posteriormente es procesada proteolíticamente por el inflammasoma NLRP3, el cual depende de un estímulo como ATP o Angiotensina II, conocidos como señal 2, esta señal promueve su ensamblaje, el reclutamiento del adaptador ASC y este a su vez, recluta a la pro-caspasa-1, la cual se auto escinde, generando caspasa-1 activa y esta enzima es capaz de clivar pro-IL-1 $\beta$  a IL-1 $\beta$  activa, la cual queda disponible para ser secretada<sup>[18]</sup>.

Actualmente, el grueso de la literatura se ha enfocado en los efectos de las RvD1 y RvE1 sobre la secreción de IL-1 $\beta$ , y existe mínima evidencia del efecto de las RvD1 y RvE1 sobre la expresión génica de pro-IL-1 $\beta$  y los potenciales efectos de dichos mediadores lipídicos sobre el ensamblaje del inflammasoma NLRP3, así como, en la actividad de la caspasa-1, los cuales influyen directamente en la secreción de IL-1 $\beta$  activa.

En literatura hay dos trabajos que vinculan RvD1, inflammasoma NLRP3 y expresión de IL-1 $\beta$ . En uno de ellos, Yin *et al.*, en un modelo de retinopatía diabética en ratones inducida por estreptozotocina, demostraron que la administración intravitreal de 1 $\mu$ g de RvD1 disminuye la expresión génica de IL-1 $\beta$ , disminuyendo su mRNA, así como, de los componentes del inflammasoma NLRP3: receptor intracelular NLRP3, adaptador ASC y pro-caspasa-1<sup>[75]</sup>. De esta forma, se disminuye la secreción de IL-1 $\beta$ . Por otro lado, Li *et al.*, en un modelo de falla renal inducida por hiperhomocisteinemia en ratones, demostraron que RvD1 disminuye la escisión de pro-caspasa-1 a su forma activa, caspasa-1, lo que disminuye la secreción de IL-1 $\beta$  en este modelo<sup>[76]</sup>. Nuestros resultados en FC difieren de lo encontrado en el primer trabajo, donde observaron disminución en la expresión de pro-IL-1 $\beta$ ; sin embargo, la dosis de RvD1 es bastante elevada, lo que nos hace pensar que, los efectos de RvD1 sobre la expresión de pro-IL-1 $\beta$  están mediados por un carácter dosis-dependiente, o bien, dependen del tipo celular involucrado. Estos trabajos abren la posibilidad para evaluar los efectos de RvD1 sobre el inflammasoma NLRP3, la actividad de caspasa-1 y la secreción de IL-1 $\beta$  en FC, lo que será llevado a cabo en futuras investigaciones.

Respecto a RvE1, tras una búsqueda en bases de datos como PubMed, ScienceDirect o Wiley Library, no se encontraron resultados que enlacen RvE1 e inflammasoma NLRP3 o pro-IL-1 $\beta$ . Los resultados sobre IL-1 $\beta$  son completamente enfocados en su secreción, y no se hace mención sobre la expresión de pro-IL-1 $\beta$  o la actividad de la caspasa-1. Esto abre otro foco de investigación atractivo para el laboratorio, donde ya se ha planificado utilizar este tema para el desarrollo de futuras memorias de tesis.

Como se puede inferir de los antecedentes, falta mucha investigación sobre los mecanismos que utilizan las RvD1 y RvE1 para modular la secreción de IL-1 $\beta$ , especialmente en FC, donde es una de las citoquinas que sufre mayor expresión y secreción en eventos inflamatorios derivados de daño cardíaco. Sí las RvD1 y RvE1 podrían modular la secreción de IL-1 $\beta$  es una interesante pregunta a resolver.

A modo de síntesis de la discusión y en base a los resultados presentados y la literatura consultada a lo largo del desarrollo de esta memoria, las RvD1 y RvE1 parecieran poseer efectos diferenciales en cuanto a la modulación de la respuesta inflamatoria en FC. Por un lado, RvD1 disminuye simultáneamente la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, y la secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP-1. La disminución paralela de MCP-1, ICAM-1 y VCAM-1 podría significar una disminución en el proceso de migración de monocitos y de adhesión respectivamente, o sea, en el proceso de reclutamiento de monocitos hacia el sitio de daño. Por otro lado, RvE1 al modular sólo la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 podría modular exclusivamente la adhesión de monocitos y otras células del sistema inmune hacia el sitio de daño, pero sin modificar su quimiotaxis y migración. Lo anterior mostraría un cierto grado de mayor efectividad de la RvD1 frente a un proceso inflamatorio. Por lo anterior, se hace necesario la obtención y desarrollo de análogos más estables de la RvD1, siendo herramientas farmacológicas más efectivas y selectivas para el tratamiento de las patologías que cursan con procesos inflamatorios, sean estos agudos o crónicos.

## 8.- ESQUEMA RESUMEN

Fibroblasto cardíaco

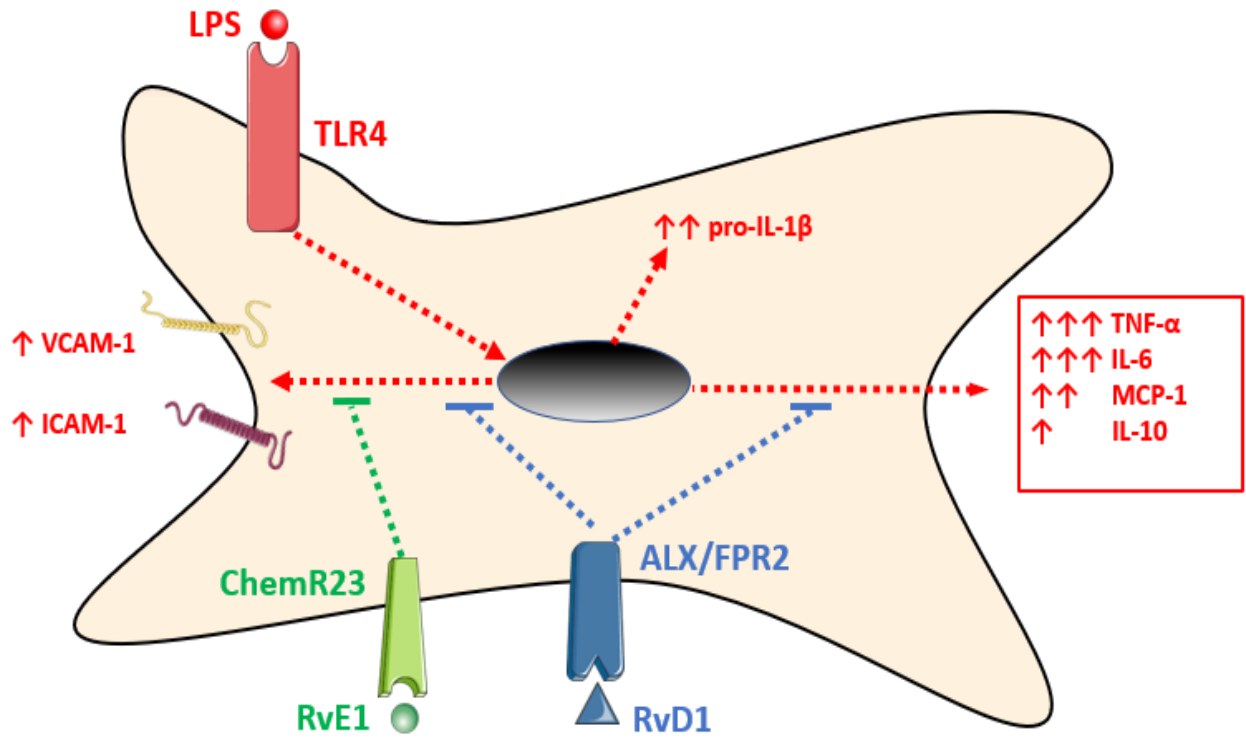


Figura 10. Esquema resumen de los efectos diferenciales de las RvD1 y RvE1 sobre la expresión de moléculas de adhesión y secreción de citoquinas en FC.

## 9.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que (Figura 10):

1.- Resolvina D1 y Resolvina E1 disminuyen la expresión de moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 inducidas por LPS en los fibroblastos cardíacos.

2.- Resolvina D1 disminuye la secreción de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP-1 inducidas por LPS en fibroblastos cardíacos.

3.- Resolvina D1 disminuye la secreción de IL-10, citoquina antiinflamatoria e inmunomoduladora.

4.- Resolvina E1 no fue capaz de disminuir la secreción de ninguna de las citoquinas inducidas por LPS en fibroblastos cardíacos.

5.- Resolvina D1 y E1 no fueron capaces de disminuir la expresión de pro-IL-1 $\beta$  inducida por LPS en fibroblastos cardíacos.

Los resultados obtenidos dan cuenta de la potencia antiinflamatoria de la RvD1, lo que la posiciona como una prometedora herramienta terapéutica en patologías cardiovasculares inflamatorias.



## 10.- BIBLIOGRAFÍA

- [1] Enfermedades Cardiovasculares, Organización Mundial de la Salud <En Línea>  
<[http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/es/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/)> (Fecha Consulta: 26 Noviembre, 2018)
- [2] Mes del Corazón, Ministerio de Salud, 2017 <En Línea>  
<<https://www.minsal.cl/mes-del-corazon-2017>> (Fecha Consulta: 26 Noviembre, 2018)
- [3] Encuesta Nacional de Salud 2016-2017: Primeros Resultados, Ministerio de Salud, 2017  
<En Línea> <[https://inta.cl/wp-content/uploads/2018/01/ENS-2016-17\\_PRIMEROS-RESULTADOS-1.pdf](https://inta.cl/wp-content/uploads/2018/01/ENS-2016-17_PRIMEROS-RESULTADOS-1.pdf)> (Fecha Consulta: 26 Noviembre, 2018)
- [4] Deb, A., Ubil, E. Cardiac fibroblast in development and wound healing. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 70: 47-55. 2014.
- [5] Snider, P., et al. Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. *Circulation Research*. 105: 934-947. 2009
- [6] Chen, W., Frangogiannis, N. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1833: 945-53. 2012.
- [7] Dostal, D., Glaser, S., Baudino, T. Cardiac fibroblast physiology and pathology. *Comprehensive Physiology*. 5: 887-909. 2015.
- [8] Díaz-Araya G., et al. Cardiac fibroblasts as sentinel cells in cardiac tissue: Receptors, signaling pathways and cellular functions. *Pharmacological Research*. Nov; 101: 30-40. 2013.
- [9] Turner, N. Inflammatory and fibrotic responses of cardiac fibroblasts to myocardial damage associated molecular patterns (DAMPs). *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 94: 189-200. 2016.
- [10] Zhang, W., et al. Necrotic myocardial cells release damage-associated molecular patterns that provoke fibroblast activation in vitro and trigger myocardial inflammation and fibrosis in vivo. *Journal of the American Heart Association*. 4: e001993. 2015.

- [11] Herum, K., et al. The Soft- and Hard-Heartedness of Cardiac Fibroblast: Mechanotransduction Signaling Pathways in Fibrosis of Heart. *Journal of Clinical Medicine*. 6: 53. 2017.
- [12] Humeres C., et al. Cardiac fibroblast cytokine profiles induced by proinflammatory or profibrotic stimuli promote monocyte recruitment and modulate macrophage M1/M2 balance in vitro. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 101: 69-80. 2016.
- [13] Beutler, B., Rietschel, E. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology*. 3: 169-176. 2003.
- [14] Ayala Jeria, Pedro Segundo.. Participación de fibroblastos y miofibroblastos en la respuesta inflamatoria: Rol de los receptores de tipo Toll 4. Tesis para optar al grado de doctor en Farmacología. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2013.
- [15] Verstrepen, L., et al. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65: 2964-2978. 2008.
- [16] Laird, M.H., et al. TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. *Journal of Leukocyte Biology*. 85: 966-977. 2009.
- [17] Olivares, F., et al. Heparan sulfate potentiates leukocyte adhesion on cardiac fibroblast by enhancing VCAM-1 and ICAM-1 expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. 1864: 831-842. 2018.
- [18] Boza, P., et al. Expression and function of toll-like receptor 4 and inflammasomes in cardiac fibroblast and myofibroblast: IL-1 $\beta$  synthesis, secretion and degradation. *Molecular Immunology*. 74: 96-105. 2016.
- [19] Springer, T. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 346: 425-434. 1990.
- [20] Bevilacqua, M., et al. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annual review of medicine*. 45: 361-378. 1994.
- [21] Bevilacqua, M., et al. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *Journal of Clinical Investigation*. 76: 2003-2011. 1985.

- [22] Chen, G.Y., Nunez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*. 10: 826-37. 2010.
- [23] Sivangala, R., Sumanlatha, G. Cytokines that mediate and regulate Immune Responses. Austin Publishing Group. 2015.
- [24] Griffith, J., Sokol, C, Luster, A. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual Review of Immunology*. 32: 659-702. 2014.
- [25] Pfeffer, K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 14: 185-191. 2003.
- [26] Parameswaran, N., Patial, S. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 20: 87-103. 2010.
- [27] López-Castejón, G., Brough, D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 22: 189-195. 2011.
- [28] Weber, A., Wasiliew, P., Kracht, M. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Science Signaling*. 3: 1-6. 2010.
- [29] Acuner Ozbabacan, S. E., et al. The structural pathway of Interleukin (IL-1) initiated signalling reveals mechanisms of oncogenic mutations and SNPs in inflammation and cancer. *PLoS Computational Biology*. 10: e1003470. 2014.
- [30] Muñoz-Cánoves, P., et al. Interleukin-6 myokine signalling in skeletal muscle: a double-edged sword?. *The FEBS Journal*. 280: 4131-4148. 2013.
- [31] Gabay, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy*. 8 (Suplemento 2). 2006.
- [32] Heinrich, P., et al. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochemical Journal*. 334: 297-314. 1998.
- [33] Dawn, B., et al. IL-6 plays an obligatory role in late preconditioning via JAK-STAT signalling and upregulation of iNOS and COX-2. *Cardiovascular Research*. 64: 61-71. 2004.
- [34] Moore, K., et al. Interleukin-10. *Annual Review of Immunology*. 11: 165-190. 1993.

- [35] Moore, K., et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*. 19: 683-765. 2001.
- [36] Deshmane, S.L., et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 29: 313-326. 2009.
- [37] Serhan, C., Chiang, N., Dalli, J. The resolution code of acute inflammation: novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Seminars in Immunology*. 27: 200-215, 2015.
- [38] Buckley, C., Gilroy, D., Serhan, D. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*. 40: 315-327, 2014.
- [39] Serhan, C. Novel lipid mediator and resolution mechanisms in acute inflammation. *The American Journal of Pathology*. 177: 1576-1591, 2010.
- [40] Krishnamoorthy, S., et al. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(4):1660-1665. 2010.
- [41] Serhan, C., et al. Novel anti-inflammatory pro-resolving mediators and their receptors. *Current Topics on Medicinal Chemistry*. 11: 629-647. 2011.
- [42] Kain, V., et al. Resolvin D1 activates the inflammation resolving response at splenic and ventricular site following myocardial infarction leading to improved ventricular function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 84: 24-35. 2015.
- [43] Serhan, C. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 510: 92-101. 2014.
- [44] Fredman, G., et al. 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*. 111: 14530-14535. 2014.
- [45] Dona, M., et al. Resolvin E1, an EPA-derived mediator in whole blood, selectively counterregulates leukocytes and platelets. *Blood*. 112: 848-855. 2008.
- [46] Spite, M., Clária, J., Serhan, C. Resolvins, Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators and their Potential Roles in Metabolic Diseases. *Cell Metabolism*. 19: 21-36. 2015.

- [47] Qu, X., et al. Resolvins E1 and D1 inhibit interstitial fibrosis in the obstructed kidney via inhibition of local fibroblast proliferation. *The Journal of Pathology*. 228: 506-519. 2012.
- [48] Wu, D., et al. Novel biphasic role of resolvin D1 on expression of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-stimulated lung fibroblasts is partly through PI3K/AKT and ERK2 pathways. *Mediators of Inflammation*. 11 páginas. 2013.
- [49] Khaled, M., et al. Effects of resolvin D1 on cell survival and cytokine expression of human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontology*. 84: 1838-1846. 2013.
- [50] Kong, D.H., et al. Emerging roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 19. 2018.
- [51] Guo, J., et al. Interleukin-1 $\beta$  induces Intercellular Adhesion Molecule-1 expression, thus enhancing the adhesión between mesenchymal stem cells and endotelial progenitor cells via p38 MAPK signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*. 41: 1976-1982. 2018.
- [52] Shaopin, Z., et al. Peptide GC31 inhibits chemokines and ICAM-1 expression in corneal fibroblast exposed to LPS or poly(I:C) by blocking the NF- $\kappa$ B and MAPK pathways. *Experimental Eye Research*. 164: 109-117. 2017.
- [53] Lee, I., et al. Role of TLR4/NADPH oxidase/ROS-activated p38 MAPK in VCAM-1 expression induced by lipopolysaccharide in human renal mesangial cells. *Cell Communication and Signaling*. 10: 33. 2012.
- [54] Ruz, F. En el fibroblasto cardiaco la resolvina E1 previene el aumento de ICAM-1 inducido por Angiotensina II. Memoria de pregrado. Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. 2018.
- [55] Sepúlveda, P. Resolvina D1 y Resolvina E1 inhiben la activación de AKT, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B dependiente de LPS y previenen la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en fibroblastos cardíacos de ratas adultas. Memoria de pregrado. Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. 2018

- [56] Velarde, V. La Resolvina D1 previene el aumento de ICAM y VCAM inducido por Heparán Sulfato en fibroblastos cardíacos. Memoria de pregrado. Fac. Cs Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. 2018.
- [57] Hsiao, H., et al. Resolvin D1 Reduces Emphysema and Chronic Inflammation. *The American Journal of Pathology*. 185: 3189-3201. 2015.
- [58] Miyahara, T., et al. D-series resolvin attenuates vascular smooth muscle cell activation and neointimal hiperplasia following vascular injury. *The FASEB Journal*. 27: 2220-2232. 2013.
- [59] Bento, A. F., et al. Omega-3 fatty acid-derived mediators 17 (R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *The Journal of Immunology*. 187: 1957-1969. 2011.
- [60] Tian, H., et al. Resolvins E1 and D1 in Choroid-Retinal Endothelial Cells and Leukocytes: Biosynthesis and Mechanisms of Anti-inflammatory Actions. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 50: 3613-3620. 2009.
- [61] Muñoz, N. Resolvina D1 disminuye la adhesión de SMC sobre fibroblastos cardíacos en ratas neonatas. Memoria de pregrado. Fac. Cs Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. 2017.
- [62] Ramírez, N. Resolvina E1 disminuye la adhesión de SMC sobre fibroblastos cardíacos en ratas neonatas. Memoria de pregrado. Fac. Cs Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. 2017.
- [63] Quan, B., Zhang, H., Xue, R. miR-141 alleviates LPS-induced inflammation injury in WI-38 fibroblasts by up-regulation of NOX2. *Life Sciences*. 216: 271-278. 2019.
- [64] Tang, L., et al. MicroRNA-146a negatively regulates the inflammatory response to *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal ligament fibroblast via TRAF6/p38 pathway. *Journal of Periodontology*. 20: 1329-1338. 2018.
- [65] Sandstedt, J., et al. Human cardiac fibroblast isolated from patients with severe heart failure are immune-competent cells mediating an inflammatory response. *Cytokine*. 113: 319-325. 2019.

- [66] Zhang, Z., et al. Resolvin D1 promotes corneal epithelial wound healing and restoration of mechanical sensation in diabetic mice. *Molecular Vision*. 24: 274-285. 2018.
- [67] Hsiao, H., et al. A novel Anti-Inflammatory and Pro-Resolving Role for Resolvin D1 in Acute Cigarette Smoke-Induce Lung Inflammation. *PLoS One*. 8: e58258. 2013.
- [68] Rey, C., et al. Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in microglial cells *in vitro*. *Brain, Behavior and Immunity*. 55: 249-259. 2016.
- [69] Zhang, T., et al. Resolvin D1 protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *International Immunopharmacology*. 28: 322-327. 2015.
- [70] Gu, Z., et al. Resolvin D1, Resolvin D2 and Maresin 1 activate the GSK3 $\beta$  anti-inflammatory axis in TLR4-engaged human monocytes. *Innate Immunity*. 22: 186-195. 2016.
- [71] Kang, J., Lee, S. Resolvin D1 protects the liver from ischemia/reperfusion injury by enhancing M2 macrophage polarization and efferocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1861: 1025-1035. 2016.
- [72] Cayupi, J. Vías de señalización intracelulares activadas por las Resolvinas D1 y 1 en fibroblastos cardíacos. Memoria de pregrado. Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. 2019.
- [73] Lund, T., et al. Resolvin E1 reduces proinflammatory markers in human pancreatic islets *in vitro*. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 118: 237-244. 2010.
- [74] Baker, L., et al. Resolvin E1 (RvE1) attenuates LPS induced inflammation and subsequent atrophy in C2C12 myotubes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 119: 6094-6103. 2018.
- [75] Yin, Y., et al. Resolvin D1 inhibits inflammatory response in STZ-induced diabetic Retinopathy rats: Possible involvement of NLRP3 inflammasome and NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Molecular Vision*. 23: 242-250. 2017.
- [76] Li, G., et al. NLRP3 inflammasome as a novel target for docosahexaenoic acid metabolites to abrogate glomerular injury. *Journal of Lipid Research*. 58: 1080-1090. 2017.