



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

---

# **LA RESOLVINA D1 PREVIENE EL AUMENTO DE ICAM-1 Y VCAM-1 INDUCIDO POR HEPARÁN SULFATO EN FIBROBLASTOS CARDIACOS.**

**Memoria para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico**

**VICTOR AARON VELARDE LEPÍN**

Director: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya / Dr. Raúl Vivar Sánchez.

Patrocinante: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

2018

## **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.

*A Macarena.*

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia por ser mi pilar fundamental en este proceso. Este logro es de ustedes, ya que gracias a su amor y apoyo pude llegar hasta esta instancia. A mis hermanas, por soportar mis disparates y mi genio exacerbado por el hambre y la falta de sueño. Son mi ejemplo a seguir. A mis padres, por creer en mis capacidades y su cariño incondicional. Los amo con todo mi newen.

También, quisiera agradecer a todas las personas del laboratorio. A Evelyn, Chumi, Don José y personal del aseo. Al profesor Guillermo; por ser mi mentor y por introducirme al mundo de la investigación. Gracias por su paciencia y enseñanzas. A mis fibros, con los cuales trabajé codo a codo en el laboratorio y compartí momentos que siempre recordaré. Además, agradezco al profesor Raúl por recibirnos en su laboratorio para ocupar sus equipos. Mi gratitud a ustedes es sincera.

Por último, agradezco a las personas que me acompañaron durante el transcurso del pregrado. A mis amigos del grupo 3, gente que con su luz me iluminaron en los momentos agobiantes de la universidad. Especial mención para Kaki, Jaz, Edi, Gustavo, Nicole, Pablo y Felipe. Al equipo +turbo F.C y Paok F.C. por las alegrías dentro y fuera de la cancha. Lamento haber errado el penal. A mis amigos del barrio, al club Boca Seca F.C., ya que con ustedes logré desconectarme cuando las cosas estaban cuesta arriba. Por los cleteos, risas, consejos y cervezas; gracias. A los aludidos, espero de alguna u otra manera poder retribuirles. Son parte de mí.

## Índice de contenido

<b>FINANCIAMIENTO</b> .....	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>4</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>10</b>
<b>RESOLVIN D1 PREVENTS THE INCREASE OF ICAM-1 AND VCAM-1 INDUCED BY HEPARÁN SULFATE IN CARDIAC FIBROBLASTS</b> .....	<b>12</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>14</b>
1.1. TEJIDO CARDIACO .....	14
1.2. RECEPTOR TLR-4.....	15
1.3. HEPARÁN SULFATO .....	17
1.4. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR .....	18
1.5. RESOLVINAS .....	19
1.5.1. <i>Resolvina D1</i> .....	20
1.6. INFLAMACIÓN DEL TEJIDO CARDIACO.....	21
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>23</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>23</b>
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>23</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
5.1. REACTIVOS.....	23
5.2. ANIMALES.....	24
5.3. AISLAMIENTO DE FIBROBLASTOS CARDIACOS .....	24
5.4. AISLAMIENTO DE CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES DE BAZO.....	25
5.5. PASAJE CELULAR.....	25
5.6. WESTERN BLOT (WB) .....	26
5.7. ENSAYOS DE ADHESIÓN <i>IN VITRO</i> Y TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA .....	26
5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	27
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
6.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE VÍAS TRANSDUCCIONALES ERK1/2 Y NF- $\kappa$ B POR HS EN FC.....	28
6.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE RVD1 SOBRE VÍAS TRANSDUCCIONALES ERK1/2 Y NF- $\kappa$ B EN FC .....	30
6.3. EFECTO PREVENTIVO DE RVD1 SOBRE LAS VÍAS TRANSDUCCIONALES ERK1/2 Y NF- $\kappa$ B EN FIBROBLASTOS ESTIMULADOS CON HS .....	32
6.4. EFECTO DE RVD1 SOBRE EL AUMENTO DE ICAM-1 Y VCAM-1 INDUCIDO POR HS EN FC. 34	
6.5. ESTUDIO DE EFECTO DE RVD1 SOBRE LA ADHESIÓN DE SMC A UN CULTIVO DE FC TRATADOS CON HS.....	36

.....	37
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
7.1. HEPARÁN SULFATO ACTIVA LAS VÍAS ERK1/2 Y NF-κB EN FC .....	39
7.2. EFECTO DE RVD1 SOBRE VÍAS ERK1/2 Y NF-κB EN FC.....	40
7.3. EFECTO PREVENTIVO DE RVD1 SOBRE LAS VÍAS ERK1/2 Y NF-κB AL SER INDUCIDAS POR HS.....	42
7.4. EFECTOS DE RVD1 SOBRE LOS NIVELES DE VCAM-1 E ICAM-1 INDUCIDOS POR HS EN FC	45
7.5. EFECTOS DE RVD1 SOBRE LA ADHESIÓN DE SMC A UN CULTIVO DE FC.....	47
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>51</b>

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. *Efecto de HS sobre activación de vías transduccionales ERK1/2 y NF- $\kappa$ B en fibroblastos cardíacos de rata adulta.*

Figura 2. *Efecto de RvD1 sobre vías transduccionales ERK1/2 y NF- $\kappa$ B en fibroblastos cardíacos.*

Figura 3. *Efecto preventivo de RvD1 sobre activación de vías transduccionales ERK1/2 y NF- $\kappa$ B inducidas por HS.*

Figura 4. *Efecto preventivo de RvD1 sobre aumento de ICAM-1 y VCAM-1 inducido por HS en fibroblastos cardíacos.*

Figura 5. *Efecto preventivo de RvD1 sobre la adhesión de SMC a FC inducida por HS.*

Figura 6. *Mecanismo propuesto de los efectos de RvD1*

## **ABREVIATURAS**

ALX/FPR2	Lipoxine A4 receptor/N-formyl peptide receptor 2
ANP	Atrial natriuretic peptide
Ang II	Angiotensina II
$\alpha$ -SMA	Smooth muscle actin alpha
AT-RvD1	Aspirin-triggered resolvin D1
BNP	Brain natriuretic peptide
FC	Cardiac fibroblast
CM	Cardiac myocyte
DAMPS	Danger-associated molecular patterns
DHA	Docosahexaenoic acid
ECM	Extracellular matrix
EPA	Eicosapentaenoic acid
ERK	MAP kinases
ET-1	Endotelina-1
GAG	Glucosaminoglicanos
HMGB1	High-mobility group box-1
HS	Heparan sulfato
HSPG	Heparan sulphate proteoglycans
HTA	Hipertensión arterial
ICAM-1	Intercelular adhesión molecule-1
IgSF	Immunoglobulin super family
IL-1	Interleuquina-1
IL-6	Interleuquina-6
IL-8	Interleuquina-8
IM	Infarto al miocardio
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
LOX	Lipooxigenasa
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LRR	Leucine-rich repeat
Lx	Lipoxinas
MaR	Maresinas
MCF	Miofibroblasto cardiaco
MCP-1	Monocyte Chemoattractant protein-1
MMP	Metaloproteinasas
MyD-88	Myeloid differentiation primary response protein
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
PAMPS	Pathogen-associated molecular patterns
PD	Protectinas
PMN	Polimorfonucleares
ROS	Reactive oxygen species
Rv	Resolvinas
RvD1	Resolvina D1
RvE1	Resolvina E1
SMC	Spleen mononuclear cells
SPM	Specialized pro-resolutive mediators
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta



TLR-4	Toll like receptor 4
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
$\mu$ g	Microgramos
UI	Unidades internacionales
VCAM-1	Vascular cell adhesión molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## **RESUMEN**

Históricamente, los fibroblastos cardiacos han sido clasificados como células que regulan la homeostasis de la matriz extracelular, y se ha prescindido de su participación en el proceso inflamatorio. Sin embargo, hoy en día son consideradas células “centinela” del corazón, ya que contribuyen de gran manera al inicio, mantención y resolución de la respuesta al daño cardiaco.

La necrosis del tejido provoca la liberación de diversos patrones moleculares asociados a daño (DAMP's). Entre ellos, el heparán sulfato (HS), constituyente de la matriz extracelular, es censado por el receptor TLR-4 presente en el fibroblasto cardiaco (FC), gatillando la cascada inflamatoria y el reclutamiento de células inflamatorias al sitio de daño. Esta respuesta se sostiene gracias a la secreción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, sobre-expresión de moléculas de adhesión y la diferenciación de FC a un fenotipo denominado miofibroblasto cardiaco (MFC), que al poseer propiedades secretoras y migratorias aumentadas comienza la formación de la cicatriz del tejido, dando inicio a la fase fibrótica.

El cese de la respuesta inflamatoria es un proceso activo y cuando las señales de freno son insuficientes, la respuesta se perpetúa dando origen a enfermedades como arritmia e insuficiencia cardiaca. Dentro de las señales de freno, las resolvinas han mostrado potentes efectos anti-inflamatorios reduciendo el reclutamiento de leucocitos y promoviendo la eliminación de restos celulares por parte de los macrófagos. A la fecha, no hay estudios sobre los efectos de resolvinas cuando FC son tratados con HS.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la resolvina D1 (RvD1) en las vías transduccionales ERK1/2 y NF- $\kappa$ B, los niveles de ICAM-1 y VCAM-1, además de la adhesión de células mononucleares de bazo FC sobre FC, bajo un estímulo endógeno. Se demostró que la RvD1 disminuye la actividad de p65/NF- $\kappa$ B y el aumento de moléculas de

adhesión inducido por HS. En consecuencia, RvD1 mostró atenuar el aumento de adhesión de SMC a FC, posicionándola como una alternativa de gran valor terapéutico en el curso de patologías cardiovasculares.

## **RESOLVIN D1 PREVENTS THE INCREASE OF ICAM-1 AND VCAM-1 INDUCED BY HEPARÁN SULFATE IN CARDIAC FIBROBLASTS**

Historically, cardiac fibroblasts have been classified as cell regulating extracellular matrix protein homeostasis, and their participation in the inflammatory process has been overlooked. However, nowadays they are considered "sentinel" cells of the heart, since they contribute greatly to the initiation, maintenance and resolution of the cardiac damage response.

Tissue necrosis causes the release of various molecular patterns associated with damage (DAMP's). Among them, heparan sulfate (HS), constituent of the extracellular matrix, is counted by the TLR-4 receptor present in the FC, triggering the inflammatory cascade and the recruitment of inflammatory cells to the damage site. This response is sustained thanks to the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines, over-expression of adhesion molecules and the differentiation of FC to a phenotype called cardiac myofibroblast (MFC), which owing to its increased secretory and migratory properties begins the formation of scar tissue, starting the fibrotic phase.

The cessation of the inflammatory response is an active process and when the brake signals are insufficient, the response is perpetuated giving rise to diseases such as arrhythmia and heart failure. Within the brake signals, resolvins have shown potent anti-inflammatory effects by reducing the recruitment of leukocytes and promoting the removal of cellular debris by macrophages. To date, there are no studies on the effects of resolvins when FC are treated with HS.

The objective of this work was to evaluate the effects of resolvin D1 (RvD1) in transduction pathways ERK1/2 and NF- $\kappa$ B, ICAM-1 and VCAM-1 levels, as well as the adhesion of spleen mononuclear cells over FC, under an endogenous stimulus. It was shown that RvD1 decreases the activity of p65 / NF- $\kappa$ B and the increase in adhesion

molecules induced by HS. Consequently, RvD1 showed attenuating the increase of adhesion of SMC to FC, positioning it as an alternative of great therapeutic value in the course of cardiovascular pathologies.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Tejido cardiaco**

En el corazón mamífero la función cardiaca se regula mediante una serie de eventos coordinados entre los grupos celulares mayoritarios que residen en este órgano. Dentro del grupo de células no-musculares, los fibroblastos cardiacos (FC) son las células encargadas de regular la homeostasis de la matriz extracelular (ECM) y así las señales mecánicas, químicas y eléctricas (Porter y Turner, 2009). Esta matriz está compuesta principalmente por colágeno, formando una red tridimensional que cubre agrupaciones de miocitos proporcionando soporte al stress mecánico. Dado esto es la importancia de una función apropiada de los FC, que va más allá de mantener la ECM (Porter y Turner, 2009). A pesar de su gran presencia en el tejido cardiaco, los FC han sido históricamente pasados por alto a la hora de comprender los mecanismos que rigen el desarrollo cardiaco, fisiología y desarrollo de patologías.

Cuando el proceso inflamatorio se desregula en el tejido cardiaco, este va perdiendo contractibilidad y la capacidad para bombear la sangre a los demás órganos (Lunde et al, 2016) . Es decir, pierde su función. La inflamación en el corazón puede ser provocada por factores exógenos: virus, bacteria, hongos, etc. resultando en un proceso no-estéril. También por IM, HTA, agentes químicos o factores asociados a la respuesta inmune, como desencadenantes de una respuesta inflamatoria estéril (Zheng et al. 2011) y enfermedades autoinmunes (Fairweather et al., 2012). Aunque cada uno de estos estados patológicos son de distinta etiología, patogénesis y evolución tienen en común varios mecanismos inflamatorios.

Recientemente, los FC han llamado la atención de los investigadores por su función secundaria en el proceso inflamatorio, importante en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares.

Muchas de estas funciones de los FC son llevados a cabo mediante diferenciación a miofibroblastos (MFC), células que son capaces de expresar proteínas contráctiles, incluyendo la actina de músculo liso alfa ( $\alpha$ -SMA), además de presentar propiedades secretoras aumentadas (Lunde et al, 2016). El stress mecánico y citoquinas, e.g., factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), son las principales señales responsables en la diferenciación (Dobaczweski et al., 2011). Los MFC responden a estos estímulos alterando su actividad proliferativa y migratoria, modificando el recambio de la ECM a través de una producción alterada de metaloproteínasas (MMP) de matriz y colágeno, y modulando la secreción de citoquinas bioactivas (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, TGF $\beta$ ), péptidos vasoactivos (Ang II, ET-1, ANP, BNP) y factores de crecimiento (e.g., VEGF) (Porter y Turner, 2011). Sin ir más lejos, las fibras de colágeno producidas por los MFC luego de un infarto al miocardio conforman la cicatriz del tejido. Además del proceso de cicatrización en la región, ocurre fibrosis y crecimiento de cardiomiocitos en las zonas no infartadas causando alteraciones en la forma y tamaño del corazón, un proceso llamado remodelamiento cardíaco (Lunde et al., 2016).

Respecto a esto, la capacidad que tienen los FC para responder de manera eficiente a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) o patrones moleculares asociados a daño (DAMPS) secretando una amplia gama de citoquinas y de quimioquinas, ha replanteado el rol de estas células, catalogándolas como “centinelas” debido a sus funciones en el proceso inflamatorio (Diaz-Araya et al., 2015).

## **1.2. Receptor TLR-4**

Los TLR son una familia de receptores de transmembrana tipo I expresados en células del sistema inmune innato, con funciones de primera línea en la defensa contra patógenos (Uematsu y Akira, 2008). Los dominios citoplasmáticos de los TLRs son altamente

conservados y compartidos con miembros de la familia de receptores de interleuquina 1 (IL-1R), y se les denomina dominios de tipo Toll/IL-1 (TIR). Sin embargo, ambos receptores no están relacionados estructuralmente: los IL-1R presentan dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina (Ig), mientras que los TLR poseen repeticiones ricas en leucina (LRR). Estas últimas son las encargadas del reconocimiento de diversos patrones moleculares (Akira et al., 2006).

Estos receptores reconocen y son activados por motivos estructurales altamente conservados conocidos como PAMP's, entre ellos el LPS, que son exclusivamente expresados por bacterias o también pueden reaccionar frente a DAMP's como HMGB1, fibronectina ED-A, y heparán sulfato (HS) (Okamura et al., 2001; Tsung et al., 2005; Wong et al., 2011) liberados al espacio extracelular luego de daño al tejido (Chen y Frangogiannis, 2013). Recientemente, ha aumentado la evidencia de la actividad de los TLR en células no-inmunes, como los fibroblastos. Por ejemplo, la activación del TLR2 en fibroblastos gingivales se encontró que promueve la secreción de citoquinas (Into et al., 2010) y el TLR3 se caracterizó como un factor crucial en la diferenciación de FC a MFC en fibroblastos pulmonares (Sugiura et al., 2009). Además, TLR4 promueve la proliferación, liberación de citoquinas, fibrosis y remodelamiento del ventrículo izquierdo (Zeuke et al., 2002; Timmers et al., 2008; He et al., 2012). El receptor TLR-4 ha sido el más estudiado debido a evidencia que lo relaciona con la iniciación y resolución de respuestas inflamatorias (Sabroe et al., 2008).

La estimulación de TLR4 promueve la activación de dos vías de señalización: (a) la vía independiente de MyD-88, la cual activa IRF-3 y lleva a la producción de interferón tipo I y (b) la vía dependiente de MyD-88, que implica la activación temprana de NF- $\kappa$ B induciendo la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. Por medio de la segunda vía, TLR recluta y activa varias quinasas río abajo como IRAK-1, IRAK-4 y otras que conlleva a la activación



y migración nuclear de NF- $\kappa$ B (Diaz-Araya et al., 2015). TLR4 se encuentra ampliamente expresado en el miocardio y sus niveles aumentan en varios modelos de infarto cardiaco (Frantz et al., 2008). El *knock-out* de este receptor en ratas sometidas a infarto, muestran menor hipertrofia y remodelado cardiaco asociado a una disminución en el tamaño del infarto y a una menor respuesta inflamatoria (Riad et al., 2008). Considerando que los FC son capaces de expresar este receptor y la relación que posee este tipo celular en las patologías cardíacas, parece evidente que TLR-4 cumple un rol importante en la modulación de la fibrosis y remodelado en el corazón.

### **1.3. Heparán sulfato**

Heparán Sulfato es un glicosaminoglicano (GAG), particularmente, un polisacárido lineal compuesto de subunidades de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina alternadamente (Lunde et al, 2016). Este polisacárido lineal no ramificado se encuentra unido en sitios específicos con residuos de serina a proteínas denominadas proteoglicanos (Strand et al., 2015). Los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) están presentes en la superficie celular y MEC de varios tejidos. Entre todos los tipos de HSPG, sólo algunos poseen siempre HS en su estructura: los sindecanos 1-4 (parte de la membrana celular), glipicanos 1-6 (anclados a la superficie celular), perlecán, agrina y colágeno XVIII (Götte, 2003).

La importancia de HS y su interacción electrostática con ligandos ha sido claramente demostrada en el desarrollo, homeostasis y patologías en todas las células de mamíferos y sus sistemas (Bishop et al., 2007). Debido a su ubicación, los HSPG están involucrados directamente en procesos inflamatorios. Se ha descrito que participan en adhesión celular,

como receptores de quimioquinas, reservorio de citoquinas, en migración de leucocitos, modulación de la actividad angiogénica y señalización celular (Parish, 2001; An et al., 2010). Además de estas interacciones, una parte importante de la función de estos proteoglicanos es la liberación enzimática del dominio extracelular sustituido por el GAG hacia la ECM y los fluidos del cuerpo. Se ha visto que la actividad degradativa de heparanasas, metaloproteinasas, especies reactivas de oxígeno (ERO) y leucocitos gatilla la escisión y liberación de HS, que actúa como DAMP y ligando del TLR4 (Fridman et al., 1987; Raats et al., 1997; Johnson et al., 2002), con consecuencias en el proceso inflamatorio como activación de leucocitos y secreción de citoquinas (Akbarshahi et al., 2011; Brennan et al., 2012; Goodall et al., 2014). Incluso, FC y CM muestran niveles elevados de moléculas de adhesión celular, e.g., ICAM-1 y VCAM-1 acompañados de una activación de la vía NF- $\kappa$ B al tratarlos con fragmentos escindidos de sindecano-4, un HSPG (Strand et al., 2015). Esta evidencia sugiere que la porción sustituida con HS induce cascadas de señalización pro-inflamatorias, incluyendo vías que promueven la infiltración de células inmunes.

#### **1.4. Moléculas de adhesión celular**

Las moléculas de adhesión celular son proteínas de superficie involucradas en modular la comunicación entre una amplia variedad de tipos celulares. Se han identificado y caracterizado diversas familias, como las integrinas, cadherinas, selectinas, proteoglicanos asociados a membranas y la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF). Este último grupo se caracteriza por estar compuesto 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 (Springer, 1990). La molécula de adhesión intercelular (ICAM-1 o CD54) y la molécula de adhesión vascular (VCAM-1 o CD106) son dos miembros de la

IgSF que tienen implicancia crítica en el reclutamiento e infiltración de células inflamatorias al sitio de injuria. VCAM-1 une linfocitos y monocitos en circulación que expresan las integrinas  $\alpha 4\beta 4$  y  $\alpha 4\beta 7$ , mientras que ICAM-1 es el contrareceptor para integrinas  $\beta 2$ , como LFA-1 y Mac-1 (Bevilacqua et al., 1994).

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 trans migración (Bevilacqua et al., 2003). Además, se ha demostrado que DAMPs liberados en la zona del daño cardíaco aumentan niveles de CAMs y actúan de manera similar a citoquinas (Chen y Nuñez, 2010).

### **1.5. Resolvinas**

Las resolvinas son mediadores lipídicos especializados (SPM) endógenos, derivados de la síntesis transcelular entre células endoteliales y leucocitos (esto significa que se requieren dos tipos celulares para su síntesis). Los SPM se identificaron en exudados inflamatorios y hasta la fecha se han identificado cuatro familias distintas: Lipoxinas (Lx), Resolvinas (Rv), Protectinas (PD) y Maresinas (MaR). Hasta la fecha, todos los SPM parecen estar involucrados en la resolución de la inflamación aguda, actuando como potentes agonistas que pueden controlar la duración y magnitud de la inflamación. De entre las nuevas clases de SPM, las Rv corresponden a pequeñas moléculas estereoespecíficas identificadas por primera vez por análisis basado en sistemas lipidómicos de exudados murinos asociados a la resolución espontánea de la inflamación aguda. El ácido

eicosapentaenoico (EPA) da origen a la serie E de las resolvinas (RvE1), mientras que el ácido docosahexaenoico (DHA) origina la serie D de las resolvinas (RvD1). Sus receptores son ChemR23 y ALX/FPR2 (ambos asociados a proteína G Gi/Go), respectivamente, y se encuentran distribuidos en una gran variedad de tejidos (Serhan et al., 2011).

Entre las funciones más importantes de las Rv se encuentran el bloqueo de la producción de mediadores pro-inflamatorios y la disminución del tráfico de leucocitos. En este sentido, se ha observado *in vivo* que las Rv detienen la infiltración y transmigración de PMN, además de reducir la expresión de citoquinas (Serhan et al., 2011). 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, pero poco se sabe de su utilidad a nivel cardíaco (Chiang y Serhan, 2017).

### **1.5.1. Resolvina D1**

Las resolvinas de la serie D son una nueva familia de mediadores lipídicos derivados del ácido docosahexaenoico (DHA) que actúan en la fase de resolución de la inflamación, un proceso bioquímicamente activo (Serhan et al., 2000). El DHA es convertido a través de una serie de oxigenaciones enzimáticas. La resolvina D1 es producida en exudados resolutivos *in-vivo* y es un producto de biosíntesis trans-celular entre leucocitos y células endoteliales. RVD1 también 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) (Kain et al., 2015). Otra vía para la biosíntesis de resolvina D1 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 (Serhan, 2014).

En el corazón, la administración de RVD1 ha demostrado ser una molécula pro-resolutiva en la inflamación provocada por IM reduciendo la expresión de proteínas de la ECM y depósitos de colágeno limitando la progresión hacia disfunción del ventrículo izquierdo. Además, disminuyó el tráfico de leucocitos hacia la zona de daño modulando la salida de células inflamatorias desde el bazo, aumentó la expresión de su receptor ALX/FPR2 y de la enzima 5-LOX, enzima que participa en su biosíntesis (Kain et al., 2015). Resultados de nuestro laboratorio han demostrado la presencia del receptor ALX/FPR2 en fibroblastos cardíacos de rata, por lo que resulta llamativo ver los efectos en estas células cuando se les somete a un estímulo pro-resolutivo en un ambiente pro-inflamatorio.

## **1.6. Inflamación del tejido cardíaco**

La inflamación cardíaca se inicia para reparar el tejido dañado, remover restos celulares e iniciar el proceso de cicatrización. Este proceso agudo es necesario en caso de infarto o infección, pero se vuelve crónico en patologías como hipertensión, aterosclerosis o fibrosis (Marchant et al., 2012). Es decir, cuando se somete al corazón a un permanente estado inflamatorio, ocurre el remodelado cardíaco. Dado esto, es que se han estudiado alternativas terapéuticas que actúen en la cascada inflamatoria para prevenir el remodelamiento cardíaco, con resultados promisorios (Kempf et al, 2012). En este sentido, el fibroblasto juega un rol crucial en este proceso. Antes se creía que las acciones antiinflamatorias eran exclusivas de células del sistema inmune, tales como neutrófilos y monocitos, sin embargo, las células residentes del tejido cardíaco, como los fibroblastos, además de mantener la homeostasis de la arquitectura celular, también pueden actuar en

el proceso inflamatorio secretando quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión que favorecen la infiltración leucocitaria.

La mayoría de las células inmunes que son reclutadas al sitio del daño durante la ocurrencia de un infarto cardíaco son capaces de expresar el receptor de TLR4 (Akira y Takeda, 2004). Sumado a esto, algunos resultados de nuestro laboratorio han confirmado la presencia y activación de este receptor tras el estímulo con LPS en FC y MFC (Ayala, 2014) lo que también se ha observado en modelos de fibrosis pulmonar, donde TLR4 también ha sido detectado en células estructurales residentes del tejido como fibroblastos pulmonares y células epiteliales (Hubbard y Rothlein, 2000). En células endoteliales, LPS activa el TLR4 e induce la activación de las vías de señalización NF- $\kappa$ B, P38 y ERK 1/2, a través de las cuales se induce la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina), conjuntamente con la producción de citoquinas inflamatorias, y quimioquinas (entre ellas IL-8, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1 y TNF $\alpha$ ) (Edfeldt et al, 2002).

Asimismo, resultados de nuestro laboratorio han mostrado que HS induce un aumento en la expresión de las proteínas de adhesión celular ICAM-1 y VCAM-1 (Landaeta, 2014) y que los FC son capaces de adherir polimorfonucleares (PMN) y monocitos (Olivares, 2016). Con respecto a esto y pese a la extensa literatura que hay acerca de las citoquinas pro inflamatorias y pro fibróticas liberadas por los FC y MFC, tras un infarto cardíaco; no se conoce con exactitud como contribuye el receptor TLR4 a la secreción de estas proteínas, ni cómo es que esta activación regula la transición desde una fase inflamatoria a una fibrótica. Además, a la fecha no hay estudios que evalúen la actividad pro-resolutiva de las resolvinas en fibroblastos cardíacos luego de estimulación con heparán sulfato, simulando una causa endógena que propicie la inflamación. Con el objetivo de dar respuesta a estas interrogantes, se plantea la siguiente hipótesis.

## **2. HIPÓTESIS**

“En el fibroblasto cardiaco, la Resolvina D1 disminuye los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 y consecuentemente la adhesión de monocitos inducidos por heparán sulfato ”

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad moduladora de Resolvina D1 en la expresión de ICAM-1/VCAM-1, y adhesión de monocitos a fibroblastos cardiacos inducida por Heparan Sulfato

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar vías de señalización (ERK1/2 y NF-kB), activadas por HS y RVD1 en fibroblastos cardiacos
- Demostrar que heparán sulfato induce un aumento en la expresión de CAM's vía TLR4.
- Demostrar que la Resolvina D1 disminuye la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC estimulados con HS.
- Demostrar que la Resolvina D1 disminuyen la adhesión de SMC en un cultivo en monocapa de FC.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Reactivos**

Suero fetal bovino (FBS), tripsina/EDTA, estándar de peso molecular y compuestos orgánicos e inorgánicos fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Germany). Reactivos para quimioluminiscencia (ECL) fueron comprados en PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Material de plástico estéril fue obtenido en Corning Inc. (New York, NY). Anticuerpo primario P-p44/p42 MAPK (T202/Y204) rabbit mAb, P-NF-kappaB p65 (s536)(93H1) rabbit mAb, GAPDH (14C10) rabbit mAb, anticuerpo secundario Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody fue

comprado a Cell Signaling Technology (CST)(MI, EEUU). Anticuerpo primario anti ICAM-1 y anticuerpo secundario donkey anti-goat fue adquirido en Santa Cruz Biotechnology Inc. (Texas, EEUU). Anticuerpo primario anti VCAM-1 fue comprado en Abcam (Cambridge, MA). Heparan sulfato de riñón bovino, Bradford Reagent y Ficoll-Histopaque® 1077 fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Colagenasa tipo II (CAS 9001-12-1) y Trypan Blue Stain (CAS 15250-061) fueron comprados a Life Technologies Corporation (CA, EEUU). RvD1 (CAS 872993-05- 0) fue comprado a Cayman Chemical Company (MI, EEUU).

## **5.2. Animales**

Ratas Sprague-Dawley adultas fueron obtenidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los animales se mantuvieron en jaulas (con ciclos de luz/oscuridad de 12 h) y libre acceso a alimento y agua. Todos los estudios fueron desarrollados cumpliendo la Guía de la NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, actualizada en el 2011 (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-Use-of-Laboratory-Animals>), y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad.

## **5.3. Aislamiento de fibroblastos cardiacos**

FC fueron aislados de ratas macho Sprague-Dawley (6-8 semanas de edad), usando digestión enzimática. Las ratas fueron anestesiadas con una inyección de ketamina/xilazina 2:1 y los corazones extraídos en un ambiente aséptico. Se removieron las aurículas y los ventrículos fueron cortados en trozos pequeños (1-2 mm) para luego ser sometidos a incubación con colagenasa tipo II. Lo obtenido en la digestión fue separado mediante centrifugación a 1000 RPM por 10 minutos. El *pellet* fue resuspendido en 10 ml de DMEM/F12 suplementado con 10% de FBS y antibióticos (estreptomina 100 µg/ml,



penicilina 100 UI/ml, anfotericina B 0,25 µg/ml) y cultivados en una atmósfera con 5%CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub> y 37°C hasta confluencia (10-13 días).

#### **5.4. Aislamiento de células polimorfonucleares de bazo**

Para la obtención de SMC (células mononucleares de bazo, principalmente linfocitos y monocitos), se disectaron bazos de rata Sprague-Dawley desde la cavidad abdominal, los cuales fueron recibidos en una placa con 4 mL de PBS 1X estéril para luego ser triturado y filtrados a través de un tamiz de disociación celular (tamaño de poro: 380 µm) hasta la obtención de una suspensión homogénea. Para depletar granulocitos y eritrocitos, se utiliza Ficoll-Histopaque® 1077, el cual se utiliza en relación 1:1 con lo obtenido en la suspensión celular, para luego ser centrifugada en centrífuga *swinging bucket* con rotor en 180° a temperatura ambiente por 30 minutos y 400G. Se producirá una interface rica en SMC, la cual fue recibida y lavada dos veces con PBS 1X, pH 7,4. Finalmente, los SMC purificados fueron centrifugados y re-suspendidos en PBS + 3% FBS para experimentos posteriores.

#### **5.5. Pasaje celular**

Para la realización de todos los experimentos, las células se mantuvieron en pasaje 0 en medio DMEM/F12 suplementado con SFB al 10% hasta alcanzar confluencia de un 90%. 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 cel/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo de 60 mm para la determinación de proteínas fosforiladas y moléculas de adhesión. Además, se sembraron 60.000 cel/cm<sup>2</sup> en placas de 35 mm para los ensayos de adhesión. Transcurridas 4 horas, los fibroblastos se encuentran adheridos a la placa. Son lavados y se privan de suero con medio DMEM/F12 por 24 para ensayos posteriores.

### **5.6. Western blot (WB)**

Cantidades equivalentes de proteína fueron separadas mediante SDS-PAGE. Las muestras se recolectaron de placas de cultivo de 60 mm previamente lavadas con PBS frío no estéril (1 mL x 2). Luego, se agregaron 60 µL de amortiguador de lisis y se procedió a la recolección de la muestra raspando gentilmente la placa de cultivo. Posteriormente, se recolectó en tubos Eppendorf de 1,5 mL para someterlas a centrifugación por 10 min a 15.000 rpm. Se descartó el *pellet* y 5 µL fueron utilizados para cuantificar la proteína total de la muestra empleando el método de Bradford (Bradford, 1976). Por otro lado, a los 55 µL de muestra remanente se le agregó buffer de carga 3X y se calentaron a 100° C para completar la desnaturalización. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y bloqueadas con leche descremada (5% p/v). Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo respectivo (ICAM-1 1:3000, VCAM-1 1:10.000, p-NF-κB 1:1000, p-ERK 44/42 1:2000, GAPDH 1:1000) durante la noche a 4°C. Se incubó el anticuerpo secundario (1:3000) por 1 h a temperatura ambiente. Se utilizó ECL para la inmunodetección. Los niveles de proteína fueron determinados mediante densitometría utilizando ImageJ (Bethesda, MD) y normalizados con el nivel correspondiente de GAPDH.

### **5.7. Ensayos de adhesión *in vitro* y tinción con cristal violeta**

Se sembraron 60 mil células en DMEM-F12 + FBS 10% en placas de 35 mm para estímulo correspondiente. Transcurrido el tiempo de estímulo, se retiró el medio y se lavó una vez con PBS 1X estéril, para luego agregar DMEM-F12. Teniendo este nuevo medio de cultivo, se agregaron células leucocitarias en relación 1:5 (FC:SMC) y se incubaron durante dos horas. Luego, se retiró el medio y se lavó suavemente la placa dos veces con PBS 1X estéril. Se agregó 1 ml de cristal violeta (5 mg/ml, MeOH 20%) y se dejó actuar

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

### **5.8. Análisis estadístico**

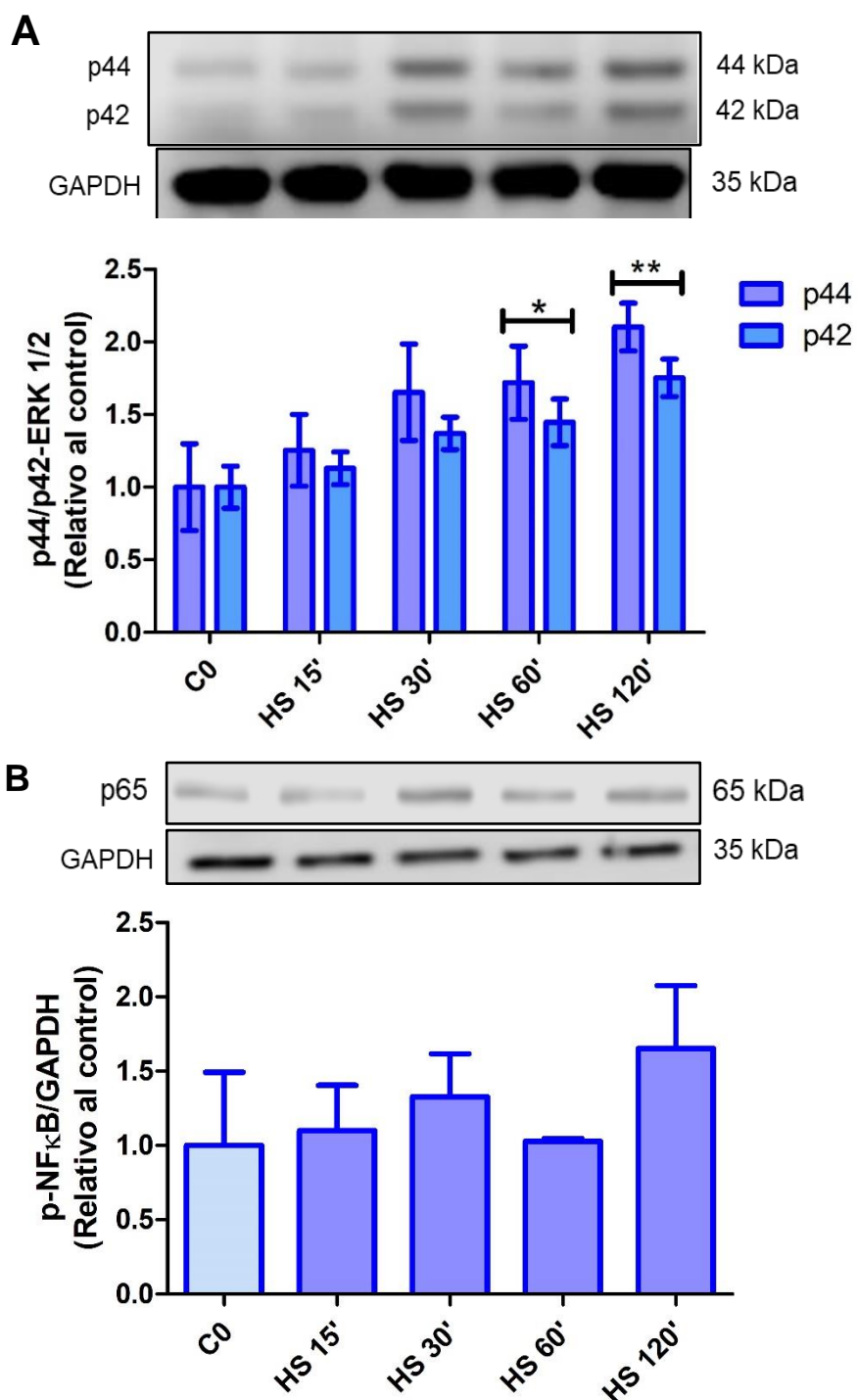
Todos los datos son presentados como el promedio  $\pm$  DS de al menos tres experimentos independientes. Las diferencias entre parámetros fueron evaluados mediante análisis ANOVA de dos vías por cada variable. Se continuó el análisis con el test de Tukey para comparar los efectos de las distintas condiciones en los parámetros. El nivel de significancia establecido fue de  $p < 0,05$ . Se utilizó el software GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA) para los análisis estadísticos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Evaluación de la activación de vías transduccionales ERK1/2 y NF- $\kappa$ B por HS en FC

Resultados de nuestro laboratorio han relacionado la activación de estas vías mediante el receptor TLR-4 con los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 en fibroblastos cardiacos adultos (Olivares, 2016), por lo que se evaluó su fosforilación inducida por un mediador estéril en este tipo celular. Las células se estimularon con HS (10 ug/mL) a tiempos de 15, 30, 60 y 120 min. Transcurrido el tiempo fueron lisadas con tampón de lisis y se identificó la fosforilación de la proteína mediante *western blot*.

En primer lugar, en la figura 1A los resultados muestran que a los 15 minutos de estímulo, HS induce la activación de la vía ERK1/2 alcanzando la máxima fosforilación a las 2 horas post-estímulo. Por otra parte, la figura 1B muestra la fosforilación de la vía p65/NF- $\kappa$ B inducida por HS y se observa que a los 30 min ya existe activación de esta vía de señalización (1,4 veces sobre el control), alcanzando un máximo a las 2 horas (1.6 veces sobre el control).



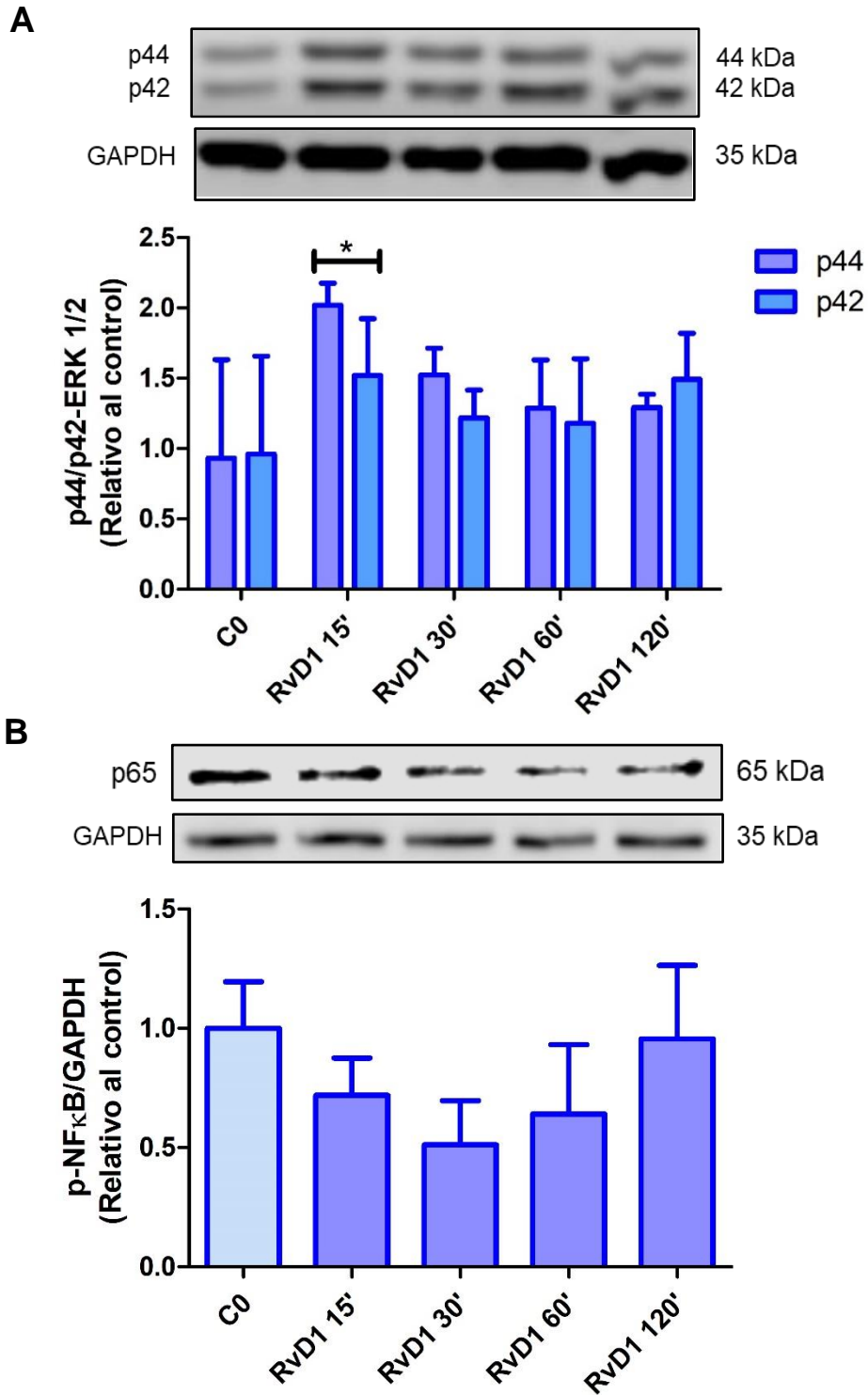
**Figura 1. Efecto de HS en los niveles de p-ERK1/2 y p65 en FC.** FC se trataron con HS (10  $\mu$ g/mL) durante 120 min. A) niveles de expresión de p-ERK1/2. B) niveles de expresión de p-65-NF-kB. Los niveles proteicos se determinaron mediante *western blot*. En la parte superior se muestra un blot representativo y en la parte inferior el análisis gráfico. Como control de carga se utilizó GAPDH. Los resultados se expresan como promedio ( $\pm$  DS) de al menos 3 experimentos independientes (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01 vs control).

## **6.2. Evaluación del efecto de RVD1 sobre vías transduccionales ERK1/2 y NF- $\kappa$ B en FC**

A continuación, se evaluó el efecto de RvD1 sobre las vías transduccionales que son activadas por HS al interactuar con el receptor TLR4. Para esto, los fibroblastos cardíacos adultos se estimularon con RVD1 (100 nM) a tiempos de 15, 30, 60 y 120 min. Transcurrido el estímulo, se procedió a lisar las células y se cuantificó la proteína fosforilada mediante *western blot*.

Los resultados graficados en la figura 2A, muestran que a partir de los 15 minutos se obtiene una respuesta celular, manifestando un máximo de fosforilación en la vía transduccional ERK1/2, aumentando en la actividad dos veces sobre el control, con un decaimiento en los niveles de expresión de pERK1/2, conforme transcurre el tiempo de estímulo.

Por otra parte, los resultados del efecto de RvD1 sobre la vía NF- $\kappa$ B muestran que hay una disminución en la fosforilación de p65-NF- $\kappa$ B, llegando a la mitad respecto al control a los 30 min de estímulo, como muestra la figura 2B, aunque los resultados no mostraron significancia.



**Figura 2. Efecto de RvD1 sobre los niveles de p-ERK1/2 y p65 en FC.** FC se trataron con RvD1 (100 nM). Los niveles proteicos se determinaron mediante *western blot*. A) niveles de expresión de p-ERK1/2. B) niveles de expresión de p-65-NF-κB. En la parte superior se muestra un blot representativo, y en la parte inferior el análisis gráfico. Como control de carga se utilizó GAPDH. Los resultados se expresan como promedio ( $\pm$  DS) de al menos 3 experimentos independientes (\* $p < 0,05$  vs control).

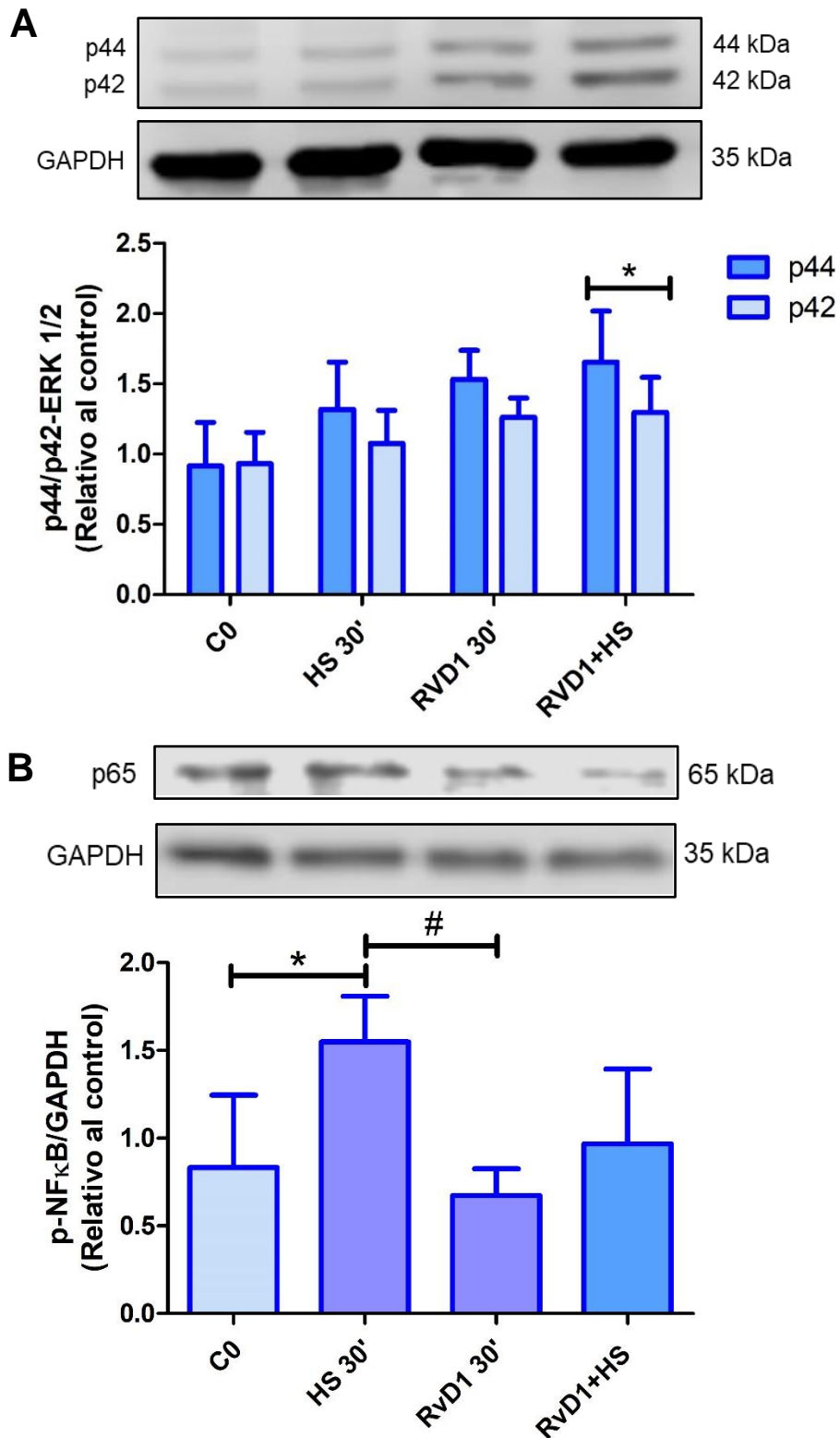
### **6.3. Efecto preventivo de RvD1 sobre las vías transduccionales ERK1/2 y NF- $\kappa$ B en fibroblastos estimulados con HS**

Para determinar si la RvD1 muestra algún efecto sobre la activación de estas vías previo a un estímulo pro-inflamatorio (HS), se pre-trataron fibroblastos cardíacos adultos con RvD1 (100 nm) y 30 min después se estimularon con HS (10  $\mu$ g/mL). Los niveles de proteínas fosforiladas fueron cuantificadas mediante *western blot*.

La figura 3A muestra los resultados del efecto sobre la vía ERK1/2. Estos señalan que al pre-tratar los FC con RvD1 se observa una mayor fosforilación con respecto a HS (1,25 veces sobre el control) y que RvD1 por sí sola (1,5 veces sobre el control), obteniéndose una activación de 1,7 veces sobre el control con ambos estímulos presentes presumiendo una respuesta aditiva.

Por otra parte, la figura 3B muestra el efecto de resolvina sobre la activación de la vía NF- $\kappa$ B inducida por HS. Los resultados señalan que el grupo con pre-tratamiento de RvD1 muestra una menor fosforilación de p65 que el grupo estimulado solo con HS (1,5 veces sobre el control), llegando a niveles cercanos mostrados por el grupo control.





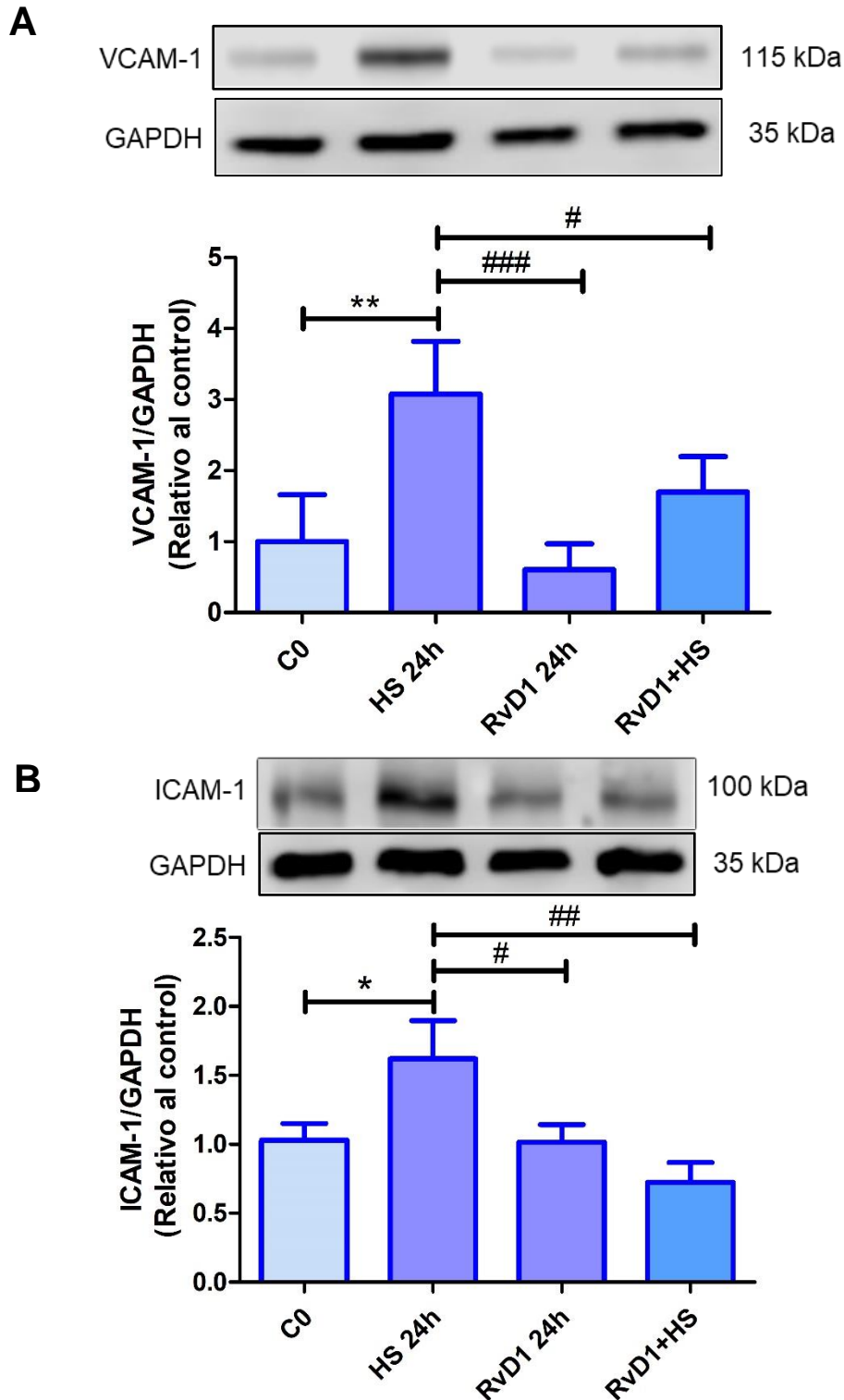
**Figura 3. Efecto de Rvd1 sobre niveles de p-ERK1/2 y p65 inducidos por HS.** FC se trataron con HS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y/o RVD1 (100 nm). A) niveles de expresión de p-ERK1/2. B) niveles de expresión de p-65-NF- $\kappa\text{B}$ . Para ver el efecto preventivo se pre-incubó 30 min antes con RVD1 y luego con HS. En la parte superior se muestra un *blot* representativo. Los resultados se expresan como promedio ( $\pm$  DS) de al menos 3 experimentos independientes (\* $p < 0,05$  vs control y # $p < 0,05$  vs HS).

#### **6.4. Efecto de RVD1 sobre el aumento de ICAM-1 y VCAM-1 inducido por HS en FC.**

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que HS induce un aumento en los niveles de las proteínas ICAM-1 y VCAM-1 en FC, proteínas que son cruciales en la interacción con células inflamatorias (Olivares, 2016). Dado esto, es que se evaluó el efecto de RVD1 sobre estas moléculas de adhesión en un contexto pro-inflamatorio. Para ello, se pre-trataron FC con RVD1 durante 30 min y posteriormente las células se estimularon con HS durante 24 horas. Finalizado el estímulo, se procedió a la lisis de las células y a la cuantificación de los niveles de proteína mediante *western blot*.

La figura 4A, muestra que HS induce un aumento en los niveles de VCAM-1, alcanzando un valor de tres veces sobre el valor control y que la RvD1 es capaz de prevenir este aumento reduciendo los niveles de esta molécula de adhesión hasta 1,7 veces sobre el control.

Por otro lado, la figura 4B muestra que HS induce un aumento en los niveles de ICAM-1 alcanzando un valor de 1,5 veces sobre el valor control y que la RvD1 previene este aumento reduciendo los niveles de esta CAM alcanzando niveles semejantes al control, sin significancia estadística.

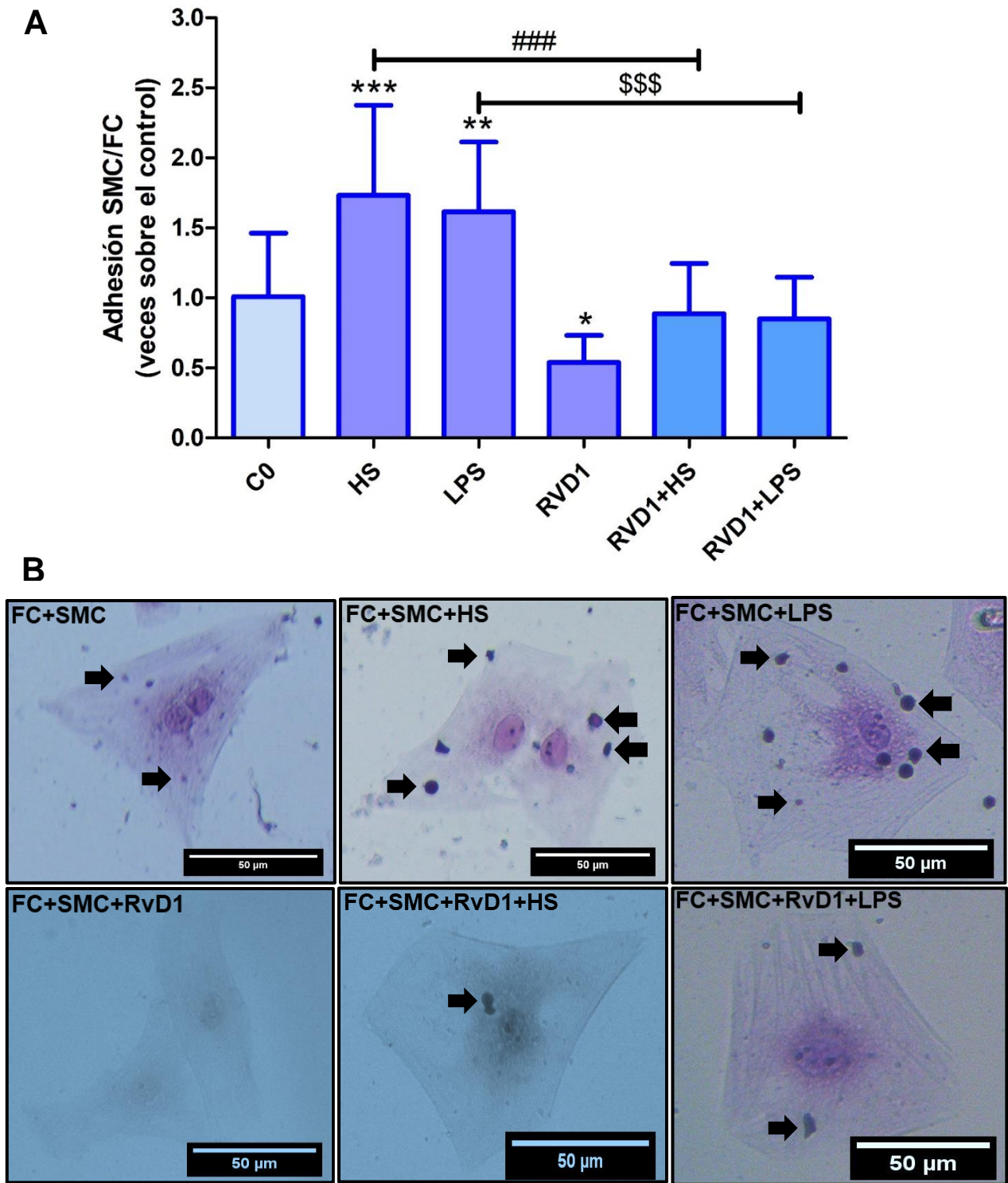


**Figura 4. Efecto de RvD1 en los niveles de VCAM-1 y VCAM-1 inducidos por HS.** FC se trataron con HS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y/o RvD1 (100 nm). Para ver el efecto preventivo se pre-incubo 30 min antes con RvD1 y luego con HS. A) niveles de expresión de VCAM-1. B) niveles de expresión de ICAM-1. En la parte superior se muestra un blot representativo. Como control de carga se utilizó GAPDH. Los resultados se expresan como promedio ( $\pm$  DS) de al menos 3 experimentos independientes (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs control y # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  vs HS).

### **6.5. Estudio de efecto de RvD1 sobre la adhesión de SMC a un cultivo de FC tratados con HS.**

Las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 participan en la respuesta inflamatoria, específicamente permitiendo la adhesión de células inflamatorias al sitio de daño, por lo que se evaluó el efecto de RvD1 sobre la adhesión de SMC sobre un cultivo de FC. Para esto previamente se estimularon FC con RvD1 (100 nM) por 30 min y luego un segundo estímulo de HS (10 µg/mL) o LPS (1 µg/mL) durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, el medio de cultivo fue retirado completamente y reemplazado por medio fresco. Luego, se realizó el ensayo de adhesión según la metodología descrita.

Los resultados ilustrados en la figura 5A indican que tanto LPS como HS generan un aumento significativo en la adhesión de SMC a FC (1,6 veces sobre el control en el caso de LPS; 1,7 veces con HS). Además, los resultados obtenidos demuestran que el pre-tratamiento de FC con RvD1 disminuyó la adhesión de SMC inducida o por HS y LPS alcanzando ambas condiciones valores cercanos al control. Por último, en la figura 5B se muestran imágenes representativas que ilustran la adhesión celular en cada una de las condiciones del ensayo.



**Figura 5. Efecto de RvD1 sobre la adhesión inducida por HS y LPS.** (A) Se sembraron 60.000 FC/pocillo y estimularon con RVD1 (10  $\mu$ M), LPS (1  $\mu$ g/ml) y/o HS (10  $\mu$ g/ml). Transcurrido el tiempo, se retiró completamente el medio condicionado y se co-incubaron con PMN según protocolo. El análisis gráfico indica que la RVD1 disminuye la adhesión de SMC inducida por HS y LPS. Los resultados se expresan como promedio ( $\pm$  DS) de al menos 3 experimentos independientes (\* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001 vs control, ### $p$ <0,001 vs HS y \$\$\$ $p$ <0,001 vs LPS). (B) Imágenes representativas de la adhesión de SMC a FC obtenidas por tinción con cristal violeta.

## 7. DISCUSIÓN

Los mecanismos que se desencadenan en la respuesta al daño cardíaco tienen un inicio que se caracteriza por una amplia secreción de citoquinas y quimioquinas que favorecen el reclutamiento de leucocitos a la zona de daño (Prabhu y Frangogiannis, 2016). Posterior a esto, ocurre la resolución o fin del proceso inflamatorio, donde los actores principales son los mediadores especializados pro-resolutivos, que contribuyen al retorno de la homeostásis. Los FC expresan el receptor TLR-4 que le permite responder a diversos patrones de daño. Además, estos son cruciales en la formación de la cicatriz en el tejido, ya que son las células encargadas de secreción de colágeno que la conforman las proteínas de la MEC (Lunde et al, 2016).

Hasta la fecha no existe evidencia sobre los efectos pro-resolutivos de la RvD1 en FC, así como también, en las vías que se activan en este tipo celular y efectos en el proceso de adhesión de células del sistema inmune. Dado esto, se investigaron los efectos de HS en FC de manera tiempo-dependiente sobre las vías transduccionales p-ERK1/2 y NF-κB. Además, se evaluaron los efectos de RvD1 en FC y su actividad frente a las vías de transducción ERK1/2 y NF-κB. También, se determinaron los efectos moduladores de RvD1 frente a un estímulo con HS sobre las vías transduccionales anteriormente mencionadas. Por último, se evaluó los efectos de la RvD1 sobre la adhesión de SMC a FC en un cultivo de monocapa de FC inducida por HS.

Los principales resultados señalan que la HS induce un aumento en la fosforilación de las vías ERK1/2 y p65. También se obtuvo un aumento de la fosforilación de ERK1/2 cuando los FC son estimulados con RvD1, sin embargo la vía NF-κB sufrió una disminución en su fosforilación bajo este estímulo. Además, la RvD1 mostró disminuir la actividad de la vía NF-κB cuando es inducida por HS. Previos resultados de nuestro laboratorio ligan el

aumento en la actividad de esta vía con los niveles de CAMS, por lo que se evaluó su efecto sobre los niveles de VCAM-1 e ICAM-1 inducidos por HS, obteniendo un efecto preventivo disminuyendo ambos niveles de proteína. Por último, se obtuvo que este descenso en los niveles de proteínas de anclaje se relaciona con un descenso en la adhesión de SMC a FC, cuando se estimulan posteriormente con un ligando estéril y no-estéril. Todo lo anteriormente expuesto vislumbra el efecto pro-resolutivo de RvD1 sobre los FC en un contexto pro-inflamatorio.

### **7.1. Heparán sulfato activa las vías ERK1/2 y NF- $\kappa$ B en FC**

El FC puede reaccionar a estímulos pro-inflamatorios de distinto carácter, por lo que su rol es crucial en el desarrollo del proceso inflamatorio (Diaz-Araya et al., 2015). Gran parte de estas respuestas celulares son mediadas por la activación del receptor TLR4 y sus vías de transducción que promueven la señal río abajo. En el corazón, se ha demostrado que la degradación crónica de MEC lleva a una generación continua de HSPG, que podrían activar receptores del sistema inmune innato como TLR4. Esto conduciría a una respuesta inflamatoria crónica, generando síntesis de proteínas de adhesión, reclutamiento de leucocitos y remodelamiento cardíaco (Strand et al., 2015).

Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que LPS y HS puede actuar como ligando de TLR4, activando cascadas de señalización río abajo como ERK1/2, Akt y NF- $\kappa$ B (Boza et al., 2016). La evidencia expuesta por esta investigación en la figura 1A se alinea con los resultados anteriores, ya que HS mostró activar la vía ERK1/2 de manera tiempo-dependiente, alcanzando una fosforilación dos veces sobre los niveles control a las dos horas de estímulo. Las ERK quinasas MEK1 y MEK2 juegan un rol en la vía de las MAPK, que controlan el crecimiento celular y diferenciación. Son activadas por una amplia variedad de factores de crecimiento, citoquinas y por la despolarización de membrana, mediante influjo de calcio (Crews et al., 1992). En el corazón, la activación de esta vía se ha

relacionado con una respuesta compensatoria/adaptativa y que en un contexto de sobrecarga de presión, esta activación conlleva a una reducción de fibrosis y a una función contráctil preservada del tejido cardíaco (Mutlak et al, 2018). Además, la regulación de estas quinasas se ha relacionado con los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales (Jiang et al., 2013) y células de cáncer mamario (Park et al., 2015), presumiendo la participación de esta vía en la extravasación de células inflamatorias al sitio de daño.

Por otra parte, HS también provocó un aumento en la fosforilación de p65/NF- $\kappa$ B de manera tiempo-dependiente, aumentando en 1,4 veces sobre los niveles control a los 30 min, como se muestra en la figura 1B. Estos resultados se alinean con evidencia anteriormente expuesta por nuestro laboratorio, que muestran una actividad similar, pero utilizando LPS como ligando del TLR-4 (Boza et al., 2016). NF- $\kappa$ B es un factor de transducción dimérico existente de forma inactiva en el citoplasma, unido a I $\kappa$ B. Controla la transcripción de ADN, producción de citoquinas y supervivencia celular (Lawrence, 2009). Exposición de la célula a LPS, ésteres de forbol o citoquinas inflamatorias gatilla la activación de NF- $\kappa$ B y su posterior translocación al núcleo. Incluso, se ha relacionado la activación de esta vía mediante HS con los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 en fibroblasto cardíaco y su participación en procesos de adhesión celular (Olivares, 2016).

Con lo anteriormente expuesto, resulta atractivo el enfoque hacia la modulación de estas vías implicadas en la respuesta del FC a un estímulo inflamatorio, para ver sus efectos en los niveles de moléculas de adhesión y su consecuente incidencia sobre el tráfico de leucocitos a la zona de daño.

## **7.2. Efecto de RvD1 sobre vías ERK1/2 y NF- $\kappa$ B en FC.**

Los mecanismos que regulan la resolución o cese de la inflamación en el tejido cardíaco no están totalmente esclarecidos y resulta atractivo impulsar este proceso activo en los



tipos celulares que participan en la respuesta adaptativa, ya que otros enfoques han dado resultados promisorios en animales; sin embargo, su aplicación en el ámbito clínico no ha dado los resultados esperados (Frangogiannis, 2014). Evidencia previa de nuestro laboratorio demuestran que el FC expresa el receptor ALX/FPR2, en el cual la RvD1 actúa como potente agonista, por lo que se vislumbra un rol importante de los FC en la restauración del balance entre mediadores inflamatorios y resolutivos. También se ha identificado en otros tipos celulares, como en fibroblastos sinoviales (Sodin-Semrl et al, 2000) y en células epiteliales de intestino (Gronert et al., 1998).

En la presente investigación, la RvD1 mostró aumentar la activación de la vía ERK1/2 en FC hasta en dos veces sobre el control a los 15 min, lo que se mantiene hasta las 2 horas de estímulo, como se aprecia en la figura 2A. Esto se contrapone a reportes que indican que RvD1 no es capaz de activar esta vía en fibroblastos de pulmón (Wu et al., 2013). En caso contrario, LXA-4 ha mostrado activar estas vías actuando como agonista del receptor ALX/FPR2 en células renales (McMahon et al. 2000). Cabe destacar que dichos estudios se realizaron en otros tipos celulares y que no existe evidencia sobre los efectos de RvD1 sobre la activación de p44 y p42 en FC. Esto afirma la idea de la heterogeneidad que existe en la respuesta según el tipo celular y estéreo-especificidad que posee el receptor (Maddox et al., 1997; Serhan et al., 2017).

Por otro lado, la RvD1 por sí sola logra aminorar la activación de la vía NF- $\kappa$ B de manera tiempo dependiente, reduciendo a la mitad la actividad a los 30 min de estímulo, con respecto al control. Esto afirma la idea de que los ácidos grasos  $\omega$ -3 y sus metabolitos pueden regular secundariamente la actividad de NF- $\kappa$ B, y así varios genes pro-inflamatorios implicados en la inflamación aguda y crónica.

El eje NF- $\kappa$ B es un sistema prominente que responde a una gran variedad de señales de daño celular, tanto externas como internas. Este complejo proteico se retiene en un estado inactivo en el citoplasma unido a I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$ , que en su conjunto se conocen como

I $\kappa$ B. Si existe un estímulo dañino, la proteína I $\kappa$ B quinasa (IKK) es activada y a su vez fosforila las proteínas I $\kappa$ B lo que las hace susceptible a degradación por ubiquitinación. Consecuentemente, el complejo sufre una translocación nuclear, puede unirse a varias áreas promotoras e inducir la transcripción de genes que están implicados en modular la respuesta inflamatoria (Kaarniranta y Salminen, 2009).

Fisiológicamente, las resolvinas actúan cuando se censa un daño de carácter estéril o no-estéril para mermar la respuesta inflamatoria y la mayoría de los estudios que se encuentran en la literatura dan cuenta de los efectos de RvD1 bajo algún estímulo pernicioso para el organismo, por lo que los resultados bajo este contexto se discuten a continuación.

### **7.3. Efecto preventivo de RvD1 sobre las vías ERK1/2 y NF- $\kappa$ B al ser inducidas por HS.**

La RvD1 participa activamente en la resolución de la inflamación y ha mostrado ejercer sus efectos sobre los FC, por lo que el próximo objetivo fue establecer si la RvD1 previene la activación de las vías ERK1/2 y NF- $\kappa$ B cuando los FC se enfrentan a un estímulo inflamatorio de carácter endógeno, como HS.

En primer lugar, la vía ERK1/2 mostró una actividad aditiva cuando se somete a los FC a ambos estímulos, como muestra la figura 3A, alcanzando un valor de 1,7 veces sobre el control. Esto se opone a estudios efectuados en fibroblastos de pulmón, donde la RvD1 logró atenuar la activación de ERK-2 cuando se estimula con LPS (Wu et al., 2013), en células PC-12 donde la RvD1 logró disminuir la activación de ERK1/2 inducida por MPP<sup>+</sup> (Xu et al., 2017). Incluso, lipoxinas que también interactúan con el receptor ALX/FPR2 también han mostrado lograr esta disminución en la activación de ERK, como en células renales (McMahon et al., 2000) y en células inflamatorias humanas (Ariel et al., 2003). Referente a la evidencia disponible, los escenarios donde se ha evaluado el efecto

preventivo de RvD1 son diversos. Además, los estímulos dañinos a los cuales son sometidos en los distintos estudios varían en potencia y mecanismo celular por el cual son censados. Por ejemplo, la respuesta inflamatoria a un patógeno e.g. LPS es más marcada desde el punto de vista de la inflamación aguda; mientras que frente a señales de daño celular e.g. HS, que son sostenidas en el tiempo y tienen un carácter más crónico será menos intensa, aunque ello dependerá del grado de daño tisular (Akbarshahi et al., 2011). Con respecto a un estímulo dañino en el tejido cardiaco, la participación de la vía de señalización ERK1/2 en la respuesta adaptativa es motivo de controversias, ya que recientemente su activación se ha relacionado con reducción de fibrosis y con una función contráctil preservada del corazón en un contexto de sobrecarga de presión (Mutlak et al., 2018).

ERK1/2 son proteínas quinasas multifuncionales que controlan varios procesos fisiológicos fundamentales y los blancos de ERK que median los efectos protectores en el corazón aún no se conocen del todo. Un estudio reciente identificó 155 sustratos de ERK1/2 que estarían involucrados en diversos procesos celulares, y muchos de estos procesos podrían contribuir al efecto adaptativo/protector (Courcelles et al., 2013). Cabe destacar que no hay estudios a la fecha sobre la modulación de RvD1 sobre la vía ERK1/2 cuando es activada por HS en fibroblastos cardiacos. Por tanto, extrapolando nuestros resultados a un contexto *in vivo*, y considerando que evaluamos los efectos de RvD1 en un contexto inflamatorio crónico de carácter estéril, proponemos que esta activación de la vía ERK tiene como fin llevar la dirección de la respuesta adaptativa/compensatoria del órgano en respuesta a injuria y en consecuencia promover una resolución de la inflamación que conserve la función del fibroblasto cardiaco.

En segundo lugar, la RvD1 mostró atenuar la activación de la vía p65/NF- $\kappa$ B inducida por HS alcanzando niveles semejantes a la condición control, como detalla la figura 3B.

Estos resultados son congruentes con estudios en un modelo de sepsis por ligación cecal, donde la RvD1 mostró reducir la fosforilación de p65 de manera dosis-dependiente (Chen et al., 2014), en un modelo de retinopatía inducido por estreptozocina (Yin et al., 2017); y en un modelo de injuria cardiaca, donde la RvD1 logra suprimir la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo (Liao et al., 2012). Incluso, en células renales la AT-RvD1 logró inhibir el aumento de NF- $\kappa$ B inducido por LPS (Chen et al., 2014) y en células epiteliales bronquiales estimuladas con IL-4, donde AT-RvD1 logró modular la expresión de NF- $\kappa$ B (de Oliveira et al., 2015).

NF- $\kappa$ B constituye un efector central en las señalizaciones de daño celular. La activación de este factor, acompañado por su translocación al núcleo posterior a un infarto al miocardio catapulta la transcripción de una amplia gama de genes incluyendo citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y moléculas de adhesión (Barnes y Karin, 1997). La expresión espacio temporal de estos mediadores en células residentes, como FC y en células inflamatorias regulan los eventos que amplifican la respuesta (citoquinas) y el reclutamiento de sub-poblaciones de leucocitos al sitio del daño (quimioquinas y CAM's) (Prabhu y Frangogiannis, 2016). El bloqueo de esta vía mejora la función cardiaca y sobrevida en cardiomiopatía inducida por TNF- $\alpha$ . Inversamente, la activación de esta vía mediante sobre-expresión de I $\kappa$ K $\beta$  en ratones transgénicos fue suficiente para provocar cardiomiopatía e insuficiencia cardiaca (Remels et al., 2018).

En suma, nuestros resultados aportan nueva evidencia sobre los efectos de RvD1 y como los FC responden a estas señales “resolutivas” o “de freno”. Por un lado, existe una activación de ERK1/2, pero por otro hay una inhibición de NF- $\kappa$ B, en un mismo intervalo de tiempo. Al superponer ambos efectos, se puede conjeturar que existe una respuesta al daño celular, a la cual se le suprime el eje maestro implicado en la inflamación y la consecuente

secreción de quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 por parte de los FC, lo que supondría una mejor resolución en la fase adaptativa, sin pérdida de función. De todos modos, para concluir esto de manera acabada es preciso evaluar otros efectos sobre esta vía de señalización como fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha/\beta$ , translocación de p65 al núcleo y unión del factor de transcripción al ADN, que podrían ser objeto de investigaciones posteriores.

#### **7.4. Efectos de RvD1 sobre los niveles de VCAM-1 e ICAM-1 inducidos por HS en FC**

En FC, ICAM-1 y VCAM-1 están expresadas constitutivamente, pero durante un evento inflamatorio cardíaco se ha visto un aumento en la expresión de CAMs, que se ha asociado a la infiltración y activación de leucocitos al sitio del daño. Tal incremento se ha reportado al estimular células cardíacas con LPS, IL-1, TGF- $\beta$ , ésteres de forbol, entre otros (Olivares, 2016).

En primer lugar, los resultados obtenidos muestran que HS induce un aumento en los niveles de ambas CAM's, alcanzando un valor de 3 veces sobre el control para VCAM-1 y 1,5 para el caso de ICAM-1, efecto graficado en la figura 4. Esto se alinea con resultados previos de nuestro laboratorio que muestran que LPS y HS son capaces de provocar un aumento en ambas CAM's vía TLR-4/p65/NF- $\kappa$ B en FC, obteniendo un nivel máximo a las 24 horas de estímulo (Olivares, 2016; Muñoz, 2017; Ramirez, 2017). Incluso, se evaluó el aumento de ICAM-1 inducido por ANGII, que sería señalizado vía ERK1/2 (Ruz, 2018). Este incremento en las CAMs se ha reportado además en cardiomiocitos y FC estimulados con HS escindido de sindecanos (Strand et al., 2015). Es de interés estudiar los efectos de HS, puesto que es un ligando endógeno para TLR4, y representaría de mejor manera lo que ocurre en eventos de inflamación estéril; mientras que LPS es un ligando exógeno para TLR4 y está más relacionado con miocarditis bacteriana (Turner, 2016).

En segundo lugar, al someter los FC a RvD1 como único estímulo no se aprecian cambios en los niveles de CAM's o incluso hay una tendencia hacia reducirlos. Esto se podría explicar en parte por la inhibición de la actividad de p65 sobre los niveles controles. Además, esto es congruente con resultados previos del laboratorio que muestran que tanto RvE1 como RvD1 no son capaces de inducir un cambio en los niveles proteicos de CAM's por sí solas (Ramirez, 2018; Muñoz, 2018).

Por último, los resultados señalan que la RvD1 previene el aumento de ambas CAM's originado por el estímulo con HS. Dicho efecto también se ha demostrado con resultados de nuestro laboratorio, donde RvD1 mostró prevenir el aumento de VCAM-1 provocado por LPS (Muñoz, 2017). Asimismo, RvD1 inhibió el aumento de VCAM-1 originado por estímulo con IL-1 $\beta$  en células epiteliales (Tian et al., 2009) y atenuó el aumento de ambas CAM's en un modelo de daño pulmonar agudo provocado por LPS (Wang et al., 2011). De igual manera, AT-RvD1 inhibió el aumento de ambas CAM's inducido por LPS en células renales (Chen et al., 2014) y el aumento en los niveles de mRNA en un modelo de colitis (Bento et al., 2011). Por otra parte, resultados de nuestro laboratorio demostraron, mediante silenciamiento de ambas moléculas de adhesión en FC, que la disminución de ICAM-1 o VCAM-1 por sí sola es una condición suficiente para que la adhesión celular de leucocitos sobre los FC caiga a niveles semejantes al control (Humeres et al., 2016).

En definitiva, los resultados presentados en esta memoria robustece el cuerpo de evidencia creciente, resaltando las propiedades anti-inflamatorias de las resolvinas. Cabe destacar que no existen estudios previos que den cuenta de los efectos preventivos de RvD1 sobre los niveles de moléculas de adhesión en FC, por lo que el presente trabajo otorga las bases para entender el mecanismo por el cual es posible modular el reclutamiento de leucocitos hacia el tejido cardiaco.

### **7.5. Efectos de RvD1 sobre la adhesión de SMC a un cultivo de FC.**

Los FC pueden modificar la cantidad, calidad y duración del infiltrado inflamatorio y tienen un rol clave en el cambio de una inflamación aguda resuelta a una de carácter crónico mediante variados mecanismos. Estas células tienen un rol reconocido en el reclutamiento de leucocitos circulantes y en la activación de células endoteliales del tejido, ya que son fuente de quimioquinas como MCP-1, MIP-1, RANTES e IP-10 y de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y TGF- $\beta$  (Porter y Turner, 2009). Así, tienen la habilidad de participar en la mantención de la respuesta inflamatoria (Van Linthout et al., 2014). Además, se ha reportado que fibroblastos de tejido pulmonar y hepático pueden interactuar directamente con leucocitos mediante el antígeno de superficie CD40, que es expresado en estas células, mientras que su ligando CD40L es expresado en células del sistema inmune. En cambio, este no parece ser el caso, ya que los FC no muestran niveles significantes de CD40 (Díaz-Araya et al., 2015). Sin embargo, existen otras interacciones ya que los FC pueden expresar moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio, que sugiere una posible adhesión de células inmune atraídas al sitio de daño.

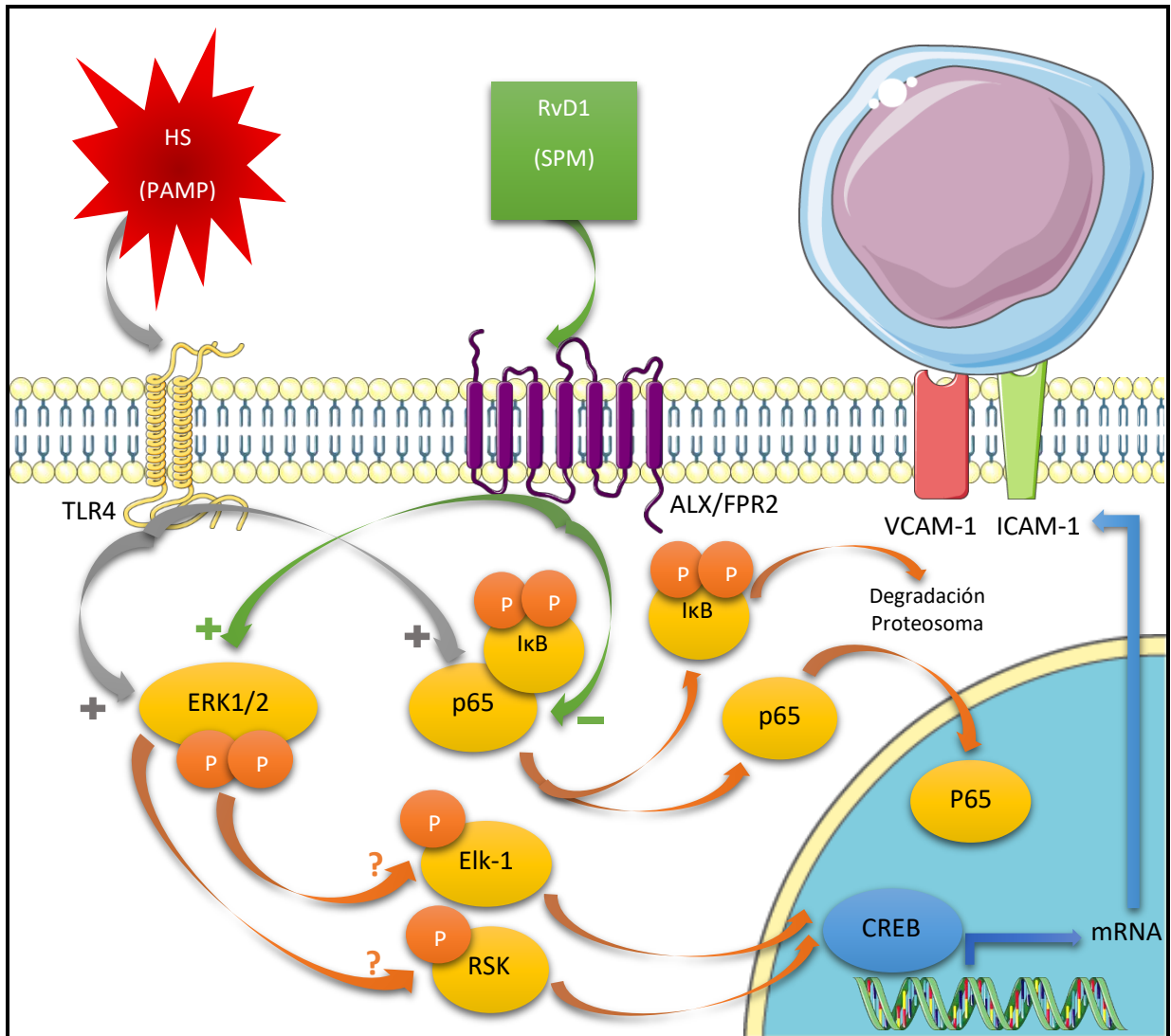
En primer lugar, nuestros resultados descritos en la figura 5 muestran que tanto HS como LPS son capaces de inducir un aumento en la adhesión de SMC, obteniendo como valor 1,7 y 1,6 veces sobre el control, respectivamente. Esto es consecuente con antecedentes del laboratorio que evidencian un aumento en la adhesión de PMN y SMC a FC inducida por HS y LPS mediada por las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 (Olivares, 2016; Muñoz, 2017; Ramírez, 2017). También la participación de ambas CAM's en la adhesión

de monocitos a fibroblastos dérmicos y gingivales ha sido previamente reportada (Cabanas y Hogg, 1991; Murakami et al., 1997).

En segundo lugar, el pre-tratamiento con RvD1 inhibió la adhesión celular entre SMC y FC inducida tanto por HS como por LPS a niveles semejantes al control. Esta evidencia complementa resultados previos de nuestro laboratorio, donde RvD1 logró disminuir la adhesión de SMC a FC originada por estímulo con LPS (Muñoz, 2018). Además, se han observado efectos similares de RvD1 en otros estudios, donde ha mostrado reducir la adhesión de PMN a células endoteliales estimuladas con TNF- $\alpha$  (Norling et al., 2012) y disminuir el reclutamiento de neutrófilos hacia el ventrículo izquierdo de ratas infartadas. Incluso, mostró modular el tráfico de monocitos y el clearance de macrófagos (Kain et al., 2015). Por otro lado, hay pruebas sobre los efectos de AT-RvD1, que ha mostrado disminuir la infiltración de leucocitos en un modelo de falla pulmonar aguda provocada por LPS, además de atenuar los niveles de moléculas de adhesión (Chen et al., 2014).

En su conjunto estos resultados refuerzan la idea de los FC como células especializadas en el reclutamiento de células inmunes, una función que solo era atribuida a células endoteliales. En ese sentido, la disminución en la adhesión provocada por RvD1, que se sustenta en el descenso de los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 ofrece nuevas perspectivas sobre la modulación del reclutamiento de células inflamatorias en respuesta al daño, y por lo tanto, posiciona a este mediador lipídico como un importante agente terapéutico por sus efectos pro-resolutivos en injuria cardiaca. Por último, a continuación se muestra la figura 6 que resume los mecanismos propuestos por los cuales la RvD1 ejercería sus efectos resolutivos en la adhesión de SMC sobre FC inducida por HS.





**Figura 6. Mecanismo propuesto por el cual la RvD1 disminuiría la adhesión de leucocitos a FC.** Cuando ocurre daño al miocardio, heparán sulfato es reconocido como DAMP por el TLR-4. Esto produce la fosforilación de ERK1/2 y p65-NF-κB, vías que están implicadas en la expresión de moléculas de adhesión. Por su parte, la RvD1 actúa como agonista del receptor ALX/FPR2 ejerciendo sus efectos resolutivos disminuyendo la actividad de la vía dependiente de p65 y aumentando la activación de ERK1/2.

## **8. CONCLUSIONES**

En la presente investigación se logró demostrar que la RvD1 por sí sola es capaz de activar la vía ERK1/2 y por otro lado, disminuir los niveles p65/NF- $\kappa$ B. Además, RvD1 logró prevenir el aumento en la actividad de NF- $\kappa$ B inducido por HS, no así en ERK1/2 donde se observó un efecto aditivo. Así, la RvD1 atenuó el aumento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en FC y el consecuente aumento en la adhesión SMC-FC provocado por HS, con lo que se confirma la hipótesis planteada.

De manera colectiva, nuestros resultados dan cuenta del potente efecto anti-inflamatorio de la RvD1 y la posicionan como un agente terapéutico atractivo en la resolución de la inflamación sostenida, especialmente en injuria cardíaca.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Akbarshahi H, Axelsson JB, Said K, Malmström A, Fischer H, Andersson R. TLR4 dependent heparan sulphate-induced pancreatic inflammatory response is IRF3-mediated. *J Transl Med.* 2011 Dec 21;9(1):1.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004 Jul;4(7):499-511.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Path recognition innate immunity. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):783-801.

An H, Qian C, Cao X. Regulation of Toll-like receptor signaling in the innate immunity. *Sci China Life Sci.* 2010 Jan 1;53(1):34-43.

Ariel A, Chiang N, Arita M, Petasis NA, Serhan CN. Aspirin-triggered lipoxin A4 y B4 analogs block extracellular signal-regulated kinase-dependent TNF-alpha secretion from human T cells. *J Immunol.* 2003 Jun 15;170(12):6266—72.

Ayala, P. Participación de fibroblastos y miofibroblastos cardiacos en el proceso inflamatorio: Rol del receptor tipo toll-4 (TLR4). Tesis Doctoral 2013.

Barnes, P.J., Karin, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med* 1997. 336, 1066–1071.

Bento AF, Claudino RF, Dutra RC, Marcon R, Calixto JB. Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *J Immunol.* 2011 Ago 15;187(4):1957-69.

Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone Jr MA. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clinical Invest.* 1985 Nov;76(5):2003.

Bevilacqua, MD, Ph. D MP, Nelson, Ph. D RM, Mannori, MD, Ph. D G, Cecconi, MD O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Ann Rev Med.* 1994 Feb;45(1):361-78.

Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature.* 2007 Abr 26;446(7139):1030-7.

Boza P, Ayala P, Vivar R, Humeres C, Tapia-Cáceres F, Muñoz C, García L, Hermoso M, Díaz-Araya G. Expression and function of toll-like receptor 4 and inflammasomes in cardiac fibroblasts and myofibroblasts: IL-1 $\beta$  synthesis, secretion, and degradation. *Mol Immunol.* 2016 Jun ;74:96-105.

Brennan TV, Lin L, Huang X, Cardona DM, Li Z, Dredge K, Chao NJ, Yang Y. Heparan sulfate, an endogenous TLR4 agonist, promotes acute GVHD after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2012 Oct 4;120(14):2899-908.

Cabanas C, Hogg N. Lymphocyte-fibroblast adhesion A useful model for analysis of the interaction of the leucocyte integrin LFA-1 with ICAM-1. *FEBS letters.* 1991 Nov 4;292(1):284-8.

Chen F, Fan FH, Wu YP, Zhu JL, Wang F, Bo LL, Li JB, Bao R, Deng XM. Resolvin D1 improves survival in experimental sepsis through reducing bacterial load and preventing excessive activation of inflammatory response. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014 Mar;33(3):457-64.

Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Rev Immunol.* 2010 Dec 1;10(12):826-37.

Chen J, Shetty S, Zhang P, Gao R, Hu Y, Wang S, Li Z, Fu J. Aspirin-triggered resolvin D1 down-regulates inflammatory responses and protects against endotoxin-induced acute kidney injury. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014 Jun 1;277(2):118-23.

Chen, W., Frangogiannis, NG. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Abr;1833(4):945-53.

Chiang N, Serhan CN. Structural elucidation and physiologic functions of specialized pro-resolving mediators and their receptors. *Mol Aspects Med.* 2017 Dic;58:114-129.

Courcelles, C, Fremin L, Voisin, S, Lemieux S, Meloche P. Thibault, Phosphoproteome dynamics reveal novel ERK1/2 MAP kinase substrates with broad spectrum of functions, *Mol. Syst. Biol.* 2013 May 28;9:669.

Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science.* 1992 Oct 16;258(5081):478-80.

De Oliveira JR, Favarin DC, Tanaka SC, Balarin MA, Teixeira DN, Levy BD, Rogério A. AT-RvD1 modulates CCL-2 and CXCL-8 production and NF- $\kappa$ B, STAT-6, SOCS1, and SOCS3 expression on bronchial epithelial cells stimulated with IL-4. *Biomed Res Int.* 2015;2015:178369.

Díaz-Araya G, Vivar R, Humeres C, Boza P, Bolivar S, Muñoz C. Cardiac fibroblasts as sentinel cells in cardiac tissue: receptors, signaling pathways and cellular functions. *Pharmacol Res.* 2015 Nov 30;101:30-40.

Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol.* 2011 Oct;51(4):600-6.

Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.* 2002 Mar 12;105(10):1158-61.

Fairweather D, Petri MA, Coronado MJ, Cooper LT. Autoimmune heart disease: role of sex hormones and autoantibodies in disease pathogenesis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2012 Mar;8(3):269-84.

Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair and remodelling *Nat Rev Cardiol.* 2014 May;11(5):255-265.

Frantz S, Erti G, Bauersachs J. Toll-like receptor signalling in the ischemic heart. *Front Biosci.* 2008 May 1;13:5772-9.

Fridman R, Lider O, Naparstek Y, Fuks Z, Vlodaysky I, Cohen IR. Soluble antigen induces T lymphocytes to secrete an endoglycosidase that degrades the heparan sulfate moiety of subendothelial extracellular matrix. *J Cell Physiol.* 1987 Jan 1;130(1):85-92.

Goodall KJ, Poon IK, Phipps S, Hulett MD. Soluble heparan sulfate fragments generated by heparanase trigger the release of pro-inflammatory cytokines through TLR-4. *PloS one.* 2014 Oct 8;9(10):e109596.

Götte M. Syndecans in inflammation. *The FASEB Journal.* 2003 Apr 1;17(6):575-91.

Gronert K, Gewirtz A, Madara JL, Serhan CN. Identification of a human enterocyte lipoxin A4 receptor that is regulated by IL-13 and IFN-gamma and inhibits TNF-alpha-induced IL-8 release. *J Exp Med.* 1998; 187:1285–1294.

He Z, Gao Y, Deng Y, Li W, Chen Y, Xing S, Zhao X, Ding J, Wang X. Lipopolysaccharide induces lung fibroblasts proliferation through toll-like receptor 4 signalling and the phosphoinositide-3-kinase-Akt pathway. *PloS One* 7, e35926.

Hubbard A and Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28(9):1379-1386.

Humeres C., Vivar R., Boza P., Muñoz C., Bolívar S., Anfossi R., Osorio J., Olivares-Silva F. Cardiac fibroblast cytokine profiles induced by proinflammatory or profibrotic stimuli promote monocyte recruitment and modulate macrophage M1/M2 balance in vitro. *J Mol Cell Cardiol*. 2016 Oct 27 pii: S0022-2828(16)30392-3.

Into T, Inomata M, Shibata K, Murakami Y. Effect of the antimicrobial peptide LL-37 on toll-like receptors 2-, 3- and 4-triggered expression of IL-6, IL-8 y CXCL10 in human gingival fibroblasts. *Cell Immunol*. 2010;264(1):104-9.

Jiang SJ, Hsu SY, Deng CR, Huang HC, Liu SL, Shi GY, Wu HL. Dextromethorphan attenuates LPS-induced adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Microcirculation*. 2013 Feb 1;20(2):190-201.

Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol*. 2002 May 15;168(10):5233-9.

Kaarniranta K, Salminen A. NF-kappaB signalling as a putative target for omega-3 metabolites in the prevention of age-related macular degeneration. *Exp Gerontol*. 2009 Nov;44(11):685-8.

Kain V, Ingle KA, Colas RA, Dalli J, Prabhu SD, Serhan CN, Joshi M, Halade GV. Resolvin D1 activates the inflammation resolving response at splenic and ventricular site following myocardial infarction leading to improved ventricular function. *J Moll Cell Cardiol*. 2015 Jul;84:24-35.

Kempf T, Zarbock A, Vestweber D, Wollert KC. Anti-inflammatory mechanisms and therapeutic opportunities in myocardial infarct healing. *J Mol Med (Berl)*. 2012 Abr;90(4):361-9.

Landaeta R. Heparan sulfato, a través de TLR-4, gatiila el aumento de IL-1 $\beta$ , ICAM-1 y VCAM-1, como la disminución de  $\alpha$ -SMA. Memoria de pregrado 2014. Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

Lawrence T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009 Dec 1;1(6):a001651.

Liao Z, Dong J, Wu W, Yang T, Wang T, Guo L, Chen L, Xu D, Wen F. Resolvin D1 attenuates inflammation in lypolysaccharide-induced acute lung injury through a process involving the PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B pathway. *Respir Res*. 2012 Dic 2;13:110.

Lunde IG, Herum KM, Carlson CC, Christensen G. Syndecans in heart fibrosis. *Cell Tiss Res*. 2016 Sep 1;365(3):539-52.

Maddox JF, Hachicha M, Takano T, Petasis NA, Fokin VV, Serhan CN. Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein linked lipoxin A4 receptor. *J Biol Chem*. 1997; 272:6972-697.

Marchant DJ, Boyd JH, Lin DC, Granville DJ, Garmaroudi FS, McManus BM. Inflammation in myocardial diseases. *Circ Res*. 2012 Ene 6;110(1):126-44.

McMahon B, Stenson C, McPhillips F, Fanning A, Brady HR, Godson C. Lipoxin A4 antagonizes the mitogenic effects of leukotriene D4 in human renal mesangial cells. Differential activation of MAP kinases through distinct receptors. *J Biol Chem*. 2000 Sep 8;275(36):27566-75.

Muñoz N. La resolvina D1 disminuye la adhesión de células mononucleares de bazo sobre fibroblastos cardiacos en ratas neonatas. Memoria de pregrado, 2017. Fac. Cs. Químicas y farmacéuticas. Universidad de Chile.

Murakami S, Shimabukuro Y, Saho T, Hino E, Kasai D, Hashikawa T, Hirano H, Okada H. Immunoregulatory roles of adhesive interactions between lymphocytes and gingival fibroblasts. *J Period Res.* 1997 Jan 1;32(1):110-4.

Mutlak M, Schlesinger-Laufer M, Haas T, Shofti R, Ballan N, Lewis YE, Zuler M, Zohar Y, Caspi LH, Kehat I. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation preserves cardiac function in pressure overload induced hypertrophy. *Int J Cardiol.* 2018 Nov 1;270:204-213.

Norling LV, Dalli J, Flower RJ, Serhan CN, Perretti M. Resolvin D1 limits polymorphonuclear leukocyte recruitment to inflammatory loci: receptor-dependent actions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Ago;32(8):1970-8.

Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF 3<sup>rd</sup>. The extra domain A of fibronectin activates toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2001 Mar 30;276(13):10229-33.

Olivares F. Heparan sulfato vía TLR4 induce la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 y aumenta la adhesión de leucocitos a fibroblastos cardiacos. Memoria de pregrado, 2016. Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

Parish CR, Freeman C, Hulett MD. Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion. *Biochim Biophys Acta Rev.* 2001 Mar 21;1471(3):M99-108.

Park GS, Kim JH. LPS Up-Regulates ICAM-1 Expression in Breast Cancer Cells by Stimulating a MyD88-BLT2-ERK-Linked Cascade, Which Promotes Adhesion to Monocytes. *Molecules and cells.* 2015 Sep 30;38(9):821.

Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodelling. *Pharmacology & Therap.* 2009 Aug;31(2):255-278.

Prabhu SD, Frangogiannis NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis. *Circ Res.* 2016 Jun 24;119(1):91-112

Raats CJ, Bakker MA, Van den Born J, Berden JH. Hydroxyl radicals depolymerize glomerular heparan sulfate in vitro and in experimental nephrotic syndrome. *J Biol Chem.* 1997 Oct 17;272(42):26734-41.

Ramirez N. Resolvina E1 disminuye la adhesión de SMC sobre fibroblastos cardiacos de ratas neonatas. Memoria de pregrado, 2017. Fac. Cs. Químicas y farmacéuticas. Universidad de Chile.

Remels AHV, Derks WJA, Cillero-Pastor B, Verhees KJP, Kelders MC, Heggermont W, Carai P, Summer G, Ellis SR, de Theije CC, Heeren RMA, Heymans S, Papageorgiou AP, van Bilsen AM. NF-κB-mediated metabolic remodelling in the inflamed heart in acute viral myocarditis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018 Ago;1864(8):2579-2589.

Riad A, Jager S, Sobirey M, Escher F, Yaulema-Riss A, Westermann D, Karatas A, Heimesaat MM, Bereswill S, Dragun D, Pauschinger M, Schultheiss HP, Tschope C. Toll-like receptor 4 modulates survival by induction of left ventricular remodelling after myocardial infarction in mice. *J Immunol.* 2008 May 15;180(10):6954-61.

Ruz F. En el fibroblasto cardiaco la resolvina E1 previene el aumento de ICAM-1 inducido por angiotensina II. Memoria de pregrado, 2018. Fac. Cs. Químicas y farmacéuticas. Universidad de Chile.

Sabroe I, Parker LC, Dower SK, Whyte MK. The role of TLR activation in inflammation. *J Pathol.* 2008 Ene;214(2):126-35.

Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-non steroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Moll Cell* 2000 Oct 16;192(8):1197-204.

Serhan CN, Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N. Novel anti-inflammatory –Pro-resolving mediators and their receptor. *Curr Top Med Chem.* 2011;11(6), 629–647.

Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature.* 2014 Jun 5;510(7503):92-101.

Serhan CN. Resolution phases of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25:101–137.

Sodin-Semrl S, Taddeo B, Tseng D, Varga J, Fiore S. Lipoxin A4 inhibits IL-1 beta- induced IL-6, IL-8, and matrix metalloproteinase-3 production in human synovial fibroblasts and enhances synthesis of tissue inhibitors of metalloproteinases. *J Immunol.* 2000; 164:2660–2666.

Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 1990 Aug 2;346(6283):425-34.

Strand ME, Aronsen JM, Braathen B, Sjaastad I, Kvaløy H, Tønnessen T, Christensen G, Lunde IG. Shedding of syndecan-4 promotes immune cell recruitment and mitigates cardiac dysfunction after lipopolysaccharide challenge in mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2015 Nov 30;88:133-44.

Sugiura H, Ichikawa T, Koaral A, Yanagisawa S, Minakata Y, Matsunaga K, Hirano T, Akamatsu K, Ichinose M. Activation of toll-like receptor 3 augments myofibroblast differentiation. *Am J Respir.* 2009 Jun;40(6):654-62

Tian H, Lu Y, Sherwood AM, Honggian D, Hong S. Resolvins E1 and D1 in choroid-retinal endothelial cells and leukocytes: Biosynthesis and mechanisms of anti-inflammatory actions. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Ago;50(8):3613-20.

Timmers L, Sluijter JP, van Keulen JK, Hoefler IE, Nederhoff MG, Goumans MJ, Doevendans PA, van Echteld CJ, Joles JA, Quax PH, Piek JJ, Pasterkamp G, de Kleijin, DP. Toll-like receptor 4 mediates maladaptative left ventricular remodelling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res.* 2008 Feb 1;102(2):257-64.

Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, Billiar TR. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemic-reperfusion. *J Exp Med.* 2005 Abr 4;201(7):1135-43.

Uematsu S, Akira S. Toll-like Receptors and Innate Immunity. *Handbook of experimental pharmacology.* 2008; 183:1-21.

Van Linthout S, Miteva K, Tschöpe C. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovasc Res.* 2014 May 1;102(2):258-69.

Wang B, Gong X, Wan JY, Zhang L, Zhang Z, Li HZ, Min S. Resolvin D1 protects mice from LPS-induced acute lung injury. *Pulm Pharmacol Ther.* 2011 Ago;24(4):434-41.

Wong Y, Sethu C, Louafi F, Hossain P. Lipopolysaccharide regulation of toll-like receptor 4 and matrix metalloprotease 9 in human primary corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Abr 25;52(5);2796-803.

Wu D, Zheng S, Li W, Yang L, Liu Y, Zheng X, Yang Y, Yang L, Wang Q, Smith FG, Jin S. Novel biphasic role of Resolvin D1 on expression of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-stimulated lung fibroblast is partly through PI3K/Akt and ERK2 pathways. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:964012.

Xu J, Gao X, Yang C, Chen L, Chen Z. Resolvin D1 attenuates MPP<sup>+</sup>-induced Parkinson Disease via inhibiting inflammation in PC-12 cells. *Med Sci Monit.* 2017 Jun 2;23:2684-2691.

Yin Y, Chen F, Wang W, Wang H, Zhang X. Resolvin D1 inhibits inflammatory response in STZ-induced diabetic retinopathy rats: Possible involvement of NLPR3 inflammasome and NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Mol Vis.* 2017 Apr 14;23:242-250.

Zeuke S, Ulmer AJ, Kusumoto S, Katus HA, Heine H. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc Res.* 2002 Oct;56(1):126-134.

Zheng Y, Gardner SE, Clarke MC. Cell death, damage-associated molecular patterns, and sterile inflammation in cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Dec 31; (12):2781-6.



