

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**EFFECTOS DE RESOLVINA D1 SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA  
INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II Y LIPOPOLISACÁRIDO EN  
FIBROBLASTOS CARDÍACOS DE RATA ADULTA**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Doctor en Farmacología por :**

**Aimeé Viviana Salas Hernández**

**Director de Tesis: Dr. Guillermo Díaz Araya**

**Santiago-CHILE**

**Diciembre 2020**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

**Aimeé Viviana Salas Hernández**

Ha sido aprobado por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen público rendido el día \_\_\_\_\_.

**Directores de Tesis:**

Dr. Guillermo Díaz Araya \_\_\_\_\_

**Comisión Informante de Tesis:**

Dr. Juan Diego Maya (Presidente) \_\_\_\_\_

Dr. Ramón Rodrigo \_\_\_\_\_

Dr. Mauricio Boric \_\_\_\_\_

Dra. María Carmen Molina \_\_\_\_\_

La presente tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Farmacología Molecular, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias y Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, bajo la Dirección del Dr. Guillermo Díaz Araya.

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- Proyecto FONDECYT regular 1170425 (Dr. Guillermo Díaz Araya)
- Beca OAICE-CAB-03-031-2015 de la Universidad de Costa Rica
- Beca PED-118-2015-I del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Telecomunicaciones de Costa Rica.

Los resultados obtenidos durante la realización de la presente tesis, han sido publicados y presentados en publicaciones y congresos de la especialidad.

## **PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS**

### **Congresos**

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

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

**Salas-Hernández, A.**, Ruz, F., Díaz-Araya, G. Expresión de los receptores ALX/FPR2 y ChemR23 para las resolvinas D1 y E1 en fibroblastos cardíacos de rata. Congreso XXXIX de la Sociedad de Farmacología de Chile. Puerto Varas, Chile. 2017.

Ruz F., **Salas-Hernández, A.**, Sepúlveda, P., Vivar, R., Díaz-Araya, G. En el fibroblasto cardíaco la Resolvina E1 previene el aumento de ICAM-1 inducido por Ang II. Congreso XXXIX de la Sociedad de Farmacología de Chile. Puerto Varas, Chile. 2017.

### **Manuscritos**

Bolívar S, Espitia-Corredor JA, Olivares-Silva F, Valenzuela P, Humeres C, Anfossi R, Castro E, Vivar R, **Salas-Hernández A**, Pardo-Jiménez V, Díaz-Araya G. In cardiac fibroblasts, interferon-beta attenuates differentiation, collagen synthesis, and TGF- $\beta$ 1-induced collagen gel contraction. Cytokine. 2020 Nov 4:155359. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155359. Epub ahead of print. PMID: 33160814.

**Salas-Hernández Aimeé**, Espinoza Claudio, Vivar Raúl, Espitia-Corredor Jenaro, Lillo Jose, Parra-Flores Pablo, Sánchez Ferrer Carlos, Peiró Concepción, Díaz-Araya Guillermo. Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in rat cardiac fibroblast in vitro. 2020. Molecular Biology Reports. (ACEPTADO)

“El verdadero viaje de descubrimiento  
no consiste en buscar nuevos paisajes  
sino en tener nuevos ojos”

Marcel Proust.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que todo, quiero dar gracias infinitas a Dios.

Gracias al Dr. Guillermo Díaz por la oportunidad de trabajar bajo su dirección, desarrollar esta tesis en su laboratorio y por su generosidad para compartir sus conocimientos conmigo.

Gracias también a la comisión evaluadora por sus valiosos aportes.

Gracias a la Universidad de Costa Rica (en especial a la Facultad de Farmacia), así como al Ministerio de Ciencia Tecnología y Telecomunicaciones de Costa Rica. Instituciones que confiaron en mí y me becaron para realizar mis estudios doctorales.

Gracias a los compañeros de los distintos laboratorios en los que tuve la oportunidad de realizar experimentos de la tesis, gracias por la ayuda y las experiencias compartidas, en especial agradezco a Raúl Riquelme, mi amigo y compañero de estudio y Catalina Salinas por formarme en mis inicios en el trabajo del laboratorio y por su tremenda generosidad y apoyo en los momentos más oscuros de este proceso, además por ser el puente con mi coach Rodrigo Arévalo a quien también agradezco su poderoso acompañamiento.

Al “fibros team” por caminar conmigo y apoyarme en el día a día, tanto en la realización de los experimentos como en la convivencia en el laboratorio, el trabajo en equipo fue fundamental.

Al Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética por recibirme por varios meses y permitirme desarrollar parte importante de esta investigación en su laboratorio.

Además, quiero agradecer y dedicar este trabajo a mi familia, en especial a mis padres Eduardo y Flora, mis hermanos Arianne y Eduardo Alonso y a mi novio Luis Quiñones, sin ellos esto no habría sido posible.

También a mis amigos de vida y especialmente a Greivin López, Julio Alfaro, Leonardo Steller y Rodbin Campos, gracias por confiar en mí de la forma en que lo hicieron.

Agradezco también el apoyo de mis coaches mentores y compañeros de Newfield Network, en especial a Juan Pablo Contreras, Rosa María Kutscher y Sandra Quiroga; a mis mentores y compañeros de Gestalt

Empowerment, particularmente a mi grupo 7Kimün. Gracias también a mis compañeros de Alianza Pachamama, en especial a mi mentor Jorge Villegas. En estas 3 grandes comunidades he aprendido a conectar con el propósito de lo que emprendo en la vida, a encontrar la fuerza y la motivación necesaria para transitar el camino y a disfrutar en el proceso y celebrar los pequeños y grandes pasos. Los momentos y experiencias compartidos con cada uno de ustedes han sido vitales para cumplir esta meta y las que vengan, tanto personales como profesionales.

Gracias a cada una de las personas que de una u otra forma aportaron en la realización de esta tesis y/o me brindaron su apoyo personal. Se qué son muchos.

También quiero expresar mi gratitud y respeto por la vida de los animales de laboratorio.

Finalmente, gracias a mí misma...por sostener.

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	6
ÍNDICE DE FIGURAS .....	10
ÍNDICE DE TABLAS .....	13
ABREVIATURAS .....	14
RESUMEN.....	17
SUMMARY .....	18
1. INTRODUCCIÓN .....	19
1.1 Inflamación cardíaca .....	19
1.2 Respuesta inflamatoria aguda .....	19
1.3 Citoquinas .....	21
1.4 Proteínas de adhesión.....	23
1.5 Mediadores lipídicos especializados pro-resolutivos (SPM).....	25
1.6 Resolvinas .....	26
1.7 Fibroblastos cardíacos.....	30
1.8 Estímulos proinflamatorios y su efecto en FCs .....	31
2. HIPÓTESIS .....	35
3. OBJETIVO GENERAL .....	35
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
5.1 Materiales.....	36
5.2 Animales .....	37
5.3 Aislamiento de fibroblastos cardíacos .....	37
5.4 Western Blot .....	38
5.5 Determinación de movimientos de Ca <sup>+2</sup> intracelular .....	39
5.6 Determinación de niveles de cAMP intracelular .....	39



5.7 Determinación de los niveles de RNAm de proteínas de adhesión y citoquinas mediante RTqPCR.....	40
5.8 Medición de citoquinas secretadas por luminex .....	45
5.9 Ensayo de adhesión de SMC a FCs (tinción con cristal violeta).....	45
5.10 Análisis estadísticos .....	46
6. RESULTADOS .....	47
6.1 Resultados del objetivo específico 1: Evaluar en FCs de rata los efectos de RvD1 sobre los segundos mensajeros cAMP y Ca <sup>2+</sup> asociados a la activación de los receptores ALX/FPR2.....	47
6.2. Resultados del objetivo específico 2: Determinar el efecto de RvD1 sobre la expresión de proteínas de adhesión ICAM-1, VCAM-1, la expresión/secreción de las citoquinas IL-6, MCP-1 TNF- $\alpha$ y la adhesión de monocitos inducidos por Ang II en FCs de rata. ....	50
6.3. Resultados del objetivo específico 3: Determinar el efecto de RvD1 sobre la expresión de proteínas de adhesión ICAM-1, VCAM-1, la expresión/secreción de las citoquinas IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ y la adhesión de monocitos inducidos por LPS en FCs.....	64
7. DISCUSIÓN.....	71
7.1 Receptores ALX/FPR2 en FCs .....	71
7.2 Efecto de la resolvina D1 sobre la respuesta inflamatoria gatillada por Ang II en FCs .....	75
7.3 Efecto de la resolvina D1 sobre la respuesta inflamatoria gatillada por LPS en FCs. de RvD1. .	79
7.4 Limitaciones.....	83
8. CONCLUSIONES .....	83
9. REFERENCIAS .....	86
10. ANEXOS.....	98
10.1 Certificado del CICUA .....	98
10.2 Resultados ensayo de Ca <sup>2+</sup> con WRW4.....	99
11.MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Eventos temporales coordinados de la inflamación aguda autolimitada.....	21
Figura 2. Biosíntesis y estructuras de los SPM.....	27
Figura 3. Expresión de receptores ALX/FPR2 en fibroblastos cardíacos de rata adulta.....	47
Figura 4. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de cAMP intracelular en FCs de rata adulta.....	48
Figura 5. Efecto de RvD1 en la liberación de Ca <sup>+2</sup> citoplasmático en FCs de rata adulta.....	49
Figura 6. Efecto de RvD1 en la liberación de Ca <sup>+2</sup> nuclear de FCs de rata adulta .....	50
Figura 7. Niveles de mRNA de IL-6 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs.....	51
Figura 8. Niveles de mRNA de MCP-1 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs.....	51
Figura 9. Niveles de mRNA de TNF- $\alpha$ en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs.....	52
Figura 10. Niveles de mRNA de ICAM-1 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs.....	52
Figura 11. Niveles de mRNA de VCAM-1 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs .....	53
Figura 12. Niveles de secreción de IL-6 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs .....	53
Figura 13. Niveles de secreción de MCP-1 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs .....	54
Figura 14. Niveles de secreción de TNF- $\alpha$ en FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24 hrs.....	54
Figura 15. Niveles de proteína ICAM-1 determinados en lisados celulares de FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24hrs.....	55
Figura 16. Niveles de proteína VCAM-1 determinados en lisados celulares de FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24hrs .....	56
Figura 17. Efecto de Ang II sobre la adhesión de SMC a FCs de rata adulta.....	57
Figura 18. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de IL-6 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs.....	58
Figura 19. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de MCP-1 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs.....	58

Figura 20. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de TNF- $\alpha$ en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs.....	59
Figura 21. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de ICAM-1 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs.....	59
Figura 22. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de VCAM-1 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs.....	60
Figura 23. Efecto de RvD1 sobre lo niveles de secreción de IL-6 en FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24 horas.....	60
Figura 24. Efecto de RvD1 sobre lo niveles de secreción de MCP-1 en FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24 horas.....	61
Figura 25. Efecto de RvD1 sobre lo niveles de secreción de TNF- $\alpha$ en FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24 horas.....	61
Figura 26. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de proteína ICAM-1 determinada en lisados celulares de FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24 y 48 horas .....	62
Figura 27. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de proteína VCAM-1 determinada en lisados celulares de FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24 y 48 horas .....	62
Figura 28. Efecto de RvD1 sobre la adhesión de SMC a FCs de rata adulta gatillada por Ang II durante 24 horas.....	63
Figura 29. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de IL-6 en FCs de ratas adultas estimulados con LPS durante 3 y 6 hrs.....	64
Figura 30. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de MCP-1 en FCs de ratas adultas estimulados con LPS durante 3 y 6 hrs.....	65
Figura 31. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de TNF- $\alpha$ en FCs de ratas adultas estimulados con LPS durante 3 y 6 hrs.....	65
Figura 32. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de ICAM-1 en FCs de ratas adultas estimulados con LPS durante 3 y 6 hrs .....	66
Figura 33. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de VCAM-1 en FCs de ratas adultas estimulados con LPS durante 3 y 6 hrs .....	66
Figura 34. Efecto de RvD1 sobre los niveles de secreción de IL-6 en FCs de rata adulta estimulados con LPS durante 24 horas .....	67
Figura 35. Efecto de RvD1 sobre los niveles de secreción de MCP-1 en FCs de rata adulta estimulados con LPS durante 24 horas .....	67
Figura 36. Efecto de RvD1 sobre los niveles de secreción de TNF- $\alpha$ en FCs de rata adulta estimulados con LPS durante 24 horas .....	68

Figura 37. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de proteína ICAM-1 determinada en lisados celulares de FCs de rata adulta estimulados con LPS durante 24 horas .....	68
Figura 38. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de proteína VCAM-1 determinada en lisados celulares de FCs de rata adulta estimulados con LPS durante 24 horas .....	69
Figura 39. Efecto de RvD1 sobre la adhesión de SMC a FCs de rata adulta gatillada por LPS durante 24 horas .....	70
Figura 40. Efecto de WRW4 como antagonista del efecto de RvD1 sobre la liberación de $Ca^{+2}$ citoplasmático en FCs de rata adulta.....	99
Figura S1. Niveles de mRNA de IL-10 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs. ....	100
Figura S2. Niveles de secreción de IL-10 en FCs de rata adulta estimulados con angiotensina II durante 24 horas.....	100
Figura S3. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de IL-10 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs. ....	101
Figura S4. Efecto de RvD1 sobre los niveles de secreción de IL-10 en FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24 horas .....	101
Figura S5. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de IL-10 en FCs de ratas adultas estimulados con LPS durante 3 y 6 hrs.....	102
Figura S6. Efecto de RvD1 sobre los niveles de secreción de IL-10 en FCs de rata adulta estimulados con LPS durante 24 horas.....	102
Figura S7. Niveles de mRNA de IL-1 $\beta$ en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs. ....	103
Figura S8. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de IL-1 $\beta$ en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs. ....	103
Figura S9. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de IL-1 $\beta$ en FCs de ratas adultas estimulados con LPS durante 3 y 6 hrs.....	104

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características y secuencias de los partidores para citoquinas y proteínas de adhesión.....	42
Tabla 2. Condiciones de amplificación para RTqPCR .....	44
Tabla 3. Resumen de resultados obtenidos sobre las proteínas estudiadas respecto a los estímulos proinflamatorios con Ang II, LPS y el efecto de RvD1 previo a estos estímulos.....	70

## ABREVIATURAS

AA: Acido araquidónico  
ALX/FPR2: Receptor de lipoxina o receptor 2 del peptido N-formyl  
Ang II: Angiotensina II  
ARA II: Antagonistas del receptor de angiotensina II  
ATP: Adenosín trifosfato  
AT-RvD1: Resolvina D1 gatillada por aspirina  
AT1R: Receptor-1 de angiotensina II  
AT2R: Receptor-2 de angiotensina II  
°C: Grados Celsius  
CaMKII: Calcio/Calmodulina proteína kinasa II  
cAMP: Adenosín monofosfato cíclico  
cDNA: Acido desoxirribonucleico complementario  
COX-2: Ciclooxygenasa 2  
Ct: Del inglés *Threshold cycle*  
D1: Resolvina D1  
DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño  
DHA: Acido Docosaheptaenoico  
DNA: Acido desoxirribonucleico  
dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato  
DMEM: Medio de mantención modificado Dulbecco  
DPEC: Dietilpirocarbonato  
ECL: Quimioluminiscencia aumentada  
EPA: Ácido eicosapentaenoico  
FBS: Suero fetal bovino  
FC: Fibroblastos Cardíacos  
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa  
GPCR: Receptor acoplado a proteína G  
HS: Heparán sulfato  
HSP: Proteína de estrés térmico  
HTA: Hipertensión arterial  
ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1  
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

IgG: Inmunoglobulina G  
IL: Interleucina  
IM: Infarto al miocardio  
ISO: Isoproterenol  
kDa: Kilo Dalton  
Kg: Kilogramo  
LPS: Lipopolisacárido  
LTB4: Leucotrieno B4  
LX: Lipoxina  
mA: Miliampere  
MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos-1  
MEC: Matriz extracelular  
MeOH: Metanol  
MFC: Miofibroblasto cardíaco  
mL: Mililitro  
mm: Milímetros  
mM: Milimolar  
mg: Miligramo  
NF- $\kappa$ B: Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas  
nM: nano molar  
PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos  
PBS: Buffer fosfato salino  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
pg: picogramos  
PLC: Fosfolipasa C  
PMN: Polimorfonucleares  
p/v: Relación peso/volumen  
RAAS: Sistema renina angiotensina aldosterona  
RIPA: : Tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación  
RNA: Ácido ribonucleico  
RNAm: Ácido ribonucleico mensajero  
rpm: Revoluciones por minuto  
RT: Retrotranscripción  
RT-qPCR: Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real

Rv D1: Resolvina D1  
SEM: Error medio  $\epsilon$   
SD: Sprague Dawley  
SDS: Dodecilsulfato sódico  
SPM: Mediadores preresolutivos especializados  
TAE: Solución tamponada con Tris, acetato y EDTA.  
TBS: Solución salina tamponada con Tris  
TBST: Solución salina tamponada con Tris y polisorbato 20  
TLR4: Toll Like Receptor tipo 4  
TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral-alfa  
TGF- $\beta$ 1: Factor de crecimiento transformante-beta1  
TLRs: Receptores de tipo Toll  
Tm: Temperatura de fusión  
vs: Versus  
 $\mu$ g: Microgramo  
 $\mu$ L: Microlitro  
 $\mu$ M: Micromolar  
V: Volts  
VCAM-1: Molécula de adhesión vascular celular-1  
WRW4 : Antagonista del receptor 2 del péptido N-formyl  
WB: Western Blot  
5-LOX: 5 Lipooxigenasa  
15-LOX: 15 Lipooxigenasa



## RESUMEN

La inflamación en tejido cardíaco es mediadora importante del desarrollo de enfermedades cardiovasculares. En ella, participan los fibroblastos cardíacos (FCs) expresando proteínas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1, secretando citoquinas como IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  e IL-10, aumentando la adhesión de monocitos a los FCs y con ello la respuesta inflamatoria. La Angiotensina II (Ang II) desencadena una respuesta que induce remodelamiento del tejido cardíaco, caracterizado por fibrosis y es una de las principales causantes de hipertensión arterial, a través de un mecanismo que implica un proceso inflamatorio; sin embargo, sus efectos en FCs no están caracterizados. Por otra parte, LPS es un estímulo proinflamatorio asociado a patógeno cuya respuesta en FCs aumenta la expresión de dichas proteínas de adhesión y citoquinas, además de la adhesión de monocitos. Resolvin D1 (RvD1), mediador lipídico que ha mostrado favorecer la resolución de la inflamación en diferentes modelos experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro*, no ha sido estudiada en cuanto a sus efectos sobre la respuesta proinflamatoria gatillada por Angiotensina II y LPS en FCs. El objetivo de esta investigación fue determinar los efectos *in vitro* de RvD1 vía ALX/FPR2 sobre la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, de las citoquinas IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ , y la adhesión de monocitos, en FCs de rata tratados con LPS y/o Ang II. Para esto se utilizaron cultivos primarios de FCs de ratas adultas. La presencia del receptor ALX/FPR2 se determinó mediante Western Blot (WB), y su funcionalidad a través de la medición de los niveles de cAMP por inmunodetección y los niveles intracelulares relativos de Ca<sup>+2</sup> con sonda fluorescente. Los niveles de las citoquinas MCP-1, IL-6, TNF $\alpha$  se cuantificaron por inmunodetección. Los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 se determinaron por WB. Los niveles de expresión (mRNA) de las proteínas de adhesión y citoquinas se determinaron mediante RTqPCR. Finalmente, se realizaron ensayos de adhesión celular de células mononucleares de bazo a FCs. Los resultados más relevantes de esta investigación son: i) detección de receptores ALX/FPR2; ii) RvD1 inhibe el aumento de Ca<sup>+2</sup> intracelular gatillado por Ang II. iii) RvD1 por sí sola no modificó los niveles de mRNA y secreción de proteínas de adhesión y citoquinas; iv) Angiotensina II aumentó los niveles de mRNA de IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$ , la secreción de IL-6 y MCP-1 y la adhesión celular, vía AT1R; v) RvD1 previno estos incrementos en todos los casos excepto para RNAm de TNF- $\alpha$ ; vi) RvD1 previno el aumento en los niveles de secreción de IL-6, MCP-1, VCAM-1 y el aumento de la adhesión celular gatillado por LPS. En conclusión, podemos señalar que RvD1 mostró ser capaz de contrarrestar algunos efectos proinflamatorios de Ang II y LPS en FCs, aportando evidencia sobre el rol activo de FCs en el proceso inflamatorio, los que al responder a RvD1 previenen el aumento de proteínas proinflamatorias. Adicionalmente, se abre una posibilidad de evaluar el potencial terapéutico de RvD1 a nivel cardiovascular, debido a su contribución a la resolución de la inflamación e inicio de la reparación del tejido cardíaco dañado.

## SUMMARY

Inflammation in cardiac tissue is an important mediator of the development of cardiovascular diseases. Cardiac fibroblasts (CFs) participate in inflammation, expressing adhesion proteins such as ICAM-1 and VCAM-1 and secreting cytokines such as IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  and IL-10. These actions allow monocyte adhesion to CFs and concomitantly activation of the inflammatory response. On the other hand, Angiotensin II (Ang II) triggers a response that induces remodeling of heart tissue, characterized by fibrosis, which is one of the main causes of hypertension, through a mechanism involving an inflammatory process. However, the inflammatory effects on CFs are not well characterized. Besides, LPS, a pathogen-associated proinflammatory stimulus increases the expression of adhesion protein and cytokines, and to monocyte adhesion to CFs. Moreover, Resolvin D1 (RvD1), a lipid mediator that has been shown to promote resolution of inflammation in several experimental models, both *in vivo* and *in vitro*, has not been studied in terms of the proinflammatory effects triggered by Angiotensin II and LPS on CFs. The main goal of this research was to determine the *in vitro* effects of RvD1 via ALX/FPR2 on adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 expression, the cytokines IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  expression, and the adhesion of monocytes, in rat CFs treated with LPS and/or Ang II. In order to do that, CFs cultures of adult rats from primary cultures were used. The presence of the ALX / FPR2 receptor was determined by Western Blot (WB) and its functionality both, by measuring cAMP levels through immunodetection and relative intracellular levels of Ca<sup>+2</sup> with a fluorescent probe. The levels of MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 were quantified by immunodetection. ICAM-1 and VCAM-1 levels were determined by WB. The expression levels (mRNA) of the adhesion proteins and cytokines were determined by RT-qPCR. Finally, cell adhesion tests of spleen mononuclear cells to CFs were performed. Most relevant results of this research are: i) detection of ALX / FPR2 receptors, ii) RvD1 inhibits the intracellular Ca<sup>+2</sup> increase triggered by Ang II. iii) RvD1 by itself did not modify levels of mRNA, and secretion of adhesion proteins and cytokines iv) Angiotensin II increases IL-6, MCP-1 and TNF- $\alpha$  mRNA levels, as well as IL-6 and MCP-1 secretion and cell adhesion, via AT1R v) RvD1 prevented these increases in all cases, except for TNF- $\alpha$  mRNA vi) RvD1 prevented increased levels of IL-6, MCP-1, VCAM-1 secretion, and increased LPS-triggered cell adhesion. In conclusion, our results suggest that RvD1 may be able to counteract some proinflammatory effects of Ang II and LPS in CFs, providing evidence on the active role of CFs in the inflammatory process, which when responding to RvD1, prevent the increase of proinflammatory proteins. Additionally, these results bring us the possibility of evaluating the cardiovascular therapeutic potential of RvD1, due to its contribution to the resolution of inflammation and the initiation of repairing of the damaged cardiac tissue.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Inflamación cardíaca

Las enfermedades cardiovasculares son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos [1]. A nivel mundial, son la mayor causa de muerte y una de las principales causas de discapacidad. Un 30% de todas las muertes que se producen en el mundo cada año son atribuibles a este tipo de enfermedades [2].

Uno de los factores implicados en las enfermedades cardiovasculares es la inflamación, la cual en el tejido cardíaco es causada principalmente por: i) patógenos externos (virus, bacterias, etc.), ii) estrés endógeno como infarto al miocardio (IM) o hipertensión arterial (HTA), iii) agentes químicos, y iv) enfermedades autoinmunes [3]. Aunque cada uno de estos estados patológicos tiene su propia etiología característica, patogénesis y progresión de la enfermedad, comparten el componente inflamatorio y sus mecanismos.

La inflamación a nivel cardíaco se activa para limitar el daño tisular, eliminar los desechos y las células muertas e iniciar el proceso de cicatrización. La respuesta inflamatoria puede ser aguda, como respuesta necesaria a la infección o IM, o crónica, como en patologías como HTA, aterosclerosis, secuelas remotas de IM o enfermedades autoinmunes [4].

Inicialmente, se pensó que los procesos inflamatorios eran exclusivamente atribuibles a las células inmunitarias, como los neutrófilos, monocitos y los macrófagos. Sin embargo, las células residentes del tejido en el sitio de la inflamación, tales como fibroblastos cardíacos (FCs), ahora se reconocen como participantes importantes en la inflamación cardíaca [5]. Los FCs secretan citoquinas capaces de activar la transcripción de moléculas de adhesión celular, aumentando los niveles de éstas y perpetuando el reclutamiento y transmigración de células de la inmunidad [6].

### 1.2 Respuesta inflamatoria aguda

La inflamación se define como la reacción de defensa del organismo en respuesta al daño en el tejido o a una infección, y consiste en una serie de cambios celulares y moleculares que ocurren en el sitio de la lesión [7]. Los tejidos y células de los organismos reconocen el daño y se induce una respuesta inmune innata y luego adaptativa. Las señales de daño pueden ser de dos tipos: i) Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y ii) patrones moleculares asociadas al daño (DAMPs).

Los PAMPs se presentan en el contexto de una infección microbiana, es decir, están presentes en diversos organismos pero ausentes en el huésped y proporcionan señales exógenas que alertan al sistema inmunitario de la presencia de patógenos, promoviendo así la inmunidad. Un ejemplo de PAMP es el lipopolisacárido (LPS) que es una endotoxina de la que está compuesta mayoritariamente la membrana externa de las bacterias Gram negativas [8].

Los DAMPs por su parte, son liberados por las células como señales de peligro endógeno que alertan al sistema inmune innato de la muerte celular no programada y en respuesta al estrés. Se ha demostrado que DAMPs liberados en la zona del daño cardíaco aumentan los niveles de moléculas de adhesión celular y actúan de manera similar a citoquinas proinflamatorias [9]. Ejemplos de DAMPs son: el adenosín trifosfato (ATP), componentes de la matriz extracelular (MEC), las mismas citoquinas, entre otros [10].

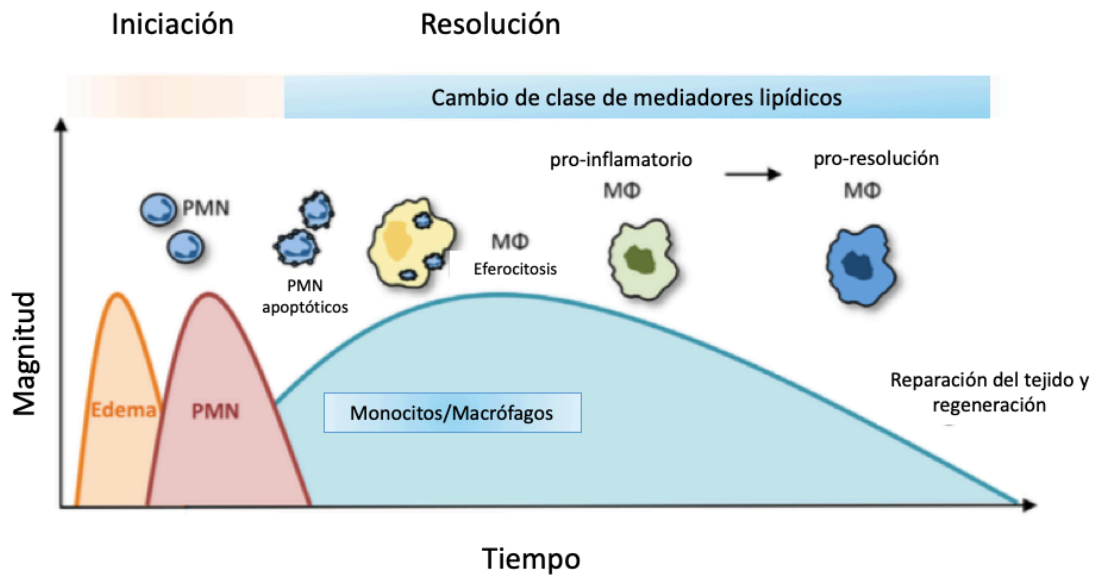
La respuesta inflamatoria, según su duración, puede clasificarse en aguda o crónica. Cuando la respuesta es autolimitada e idealmente permanece solo mientras se elimina el daño y ocurre la reparación, esto es lo que se conoce como inflamación aguda [11]. Sin embargo, si la reacción es descontrolada podría llegar a ser persistente y transformarse en inflamación crónica, ocasionando disfunción o fibrosis tisular [12].

La respuesta inflamatoria aguda se divide en dos fases llamadas iniciación y resolución (Ver figura 1), las que se traslapan [11].

La fase de iniciación se caracteriza por edema del tejido resultado del aumento en el flujo sanguíneo y del aumento en la permeabilidad de la vasculatura. En esta fase participan principalmente mediadores lipídicos como los cisteinil-leucotrienos, prostaglandinas, histamina y bradicinina. En esta etapa se liberan al medio gran cantidad de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ), la interleucina 6 (IL-6), la proteína quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1), la interleucina 1 (IL-1), entre otras. También participan moléculas de adhesión como ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1) y VCAM-1 (molécula de adhesión vascular 1) que permiten la adhesión de los leucocitos al endotelio [13]. En esta fase, las células polimorfonucleares (PMN) migran al área del daño para generar la defensa contra la invasión microbiana o el agente dañino. La migración de los PMN es conducida por la presencia del leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) y citoquinas presentes en el exudado. Los PMN tienen la función de fagocitar y degradar patógenos [11].

La llegada de los PMN empieza la etapa de resolución. Estas células llegan en número suficiente para eliminar los patógenos y posteriormente irán desapareciendo por apoptosis. En la etapa de resolución también hay secreción de citoquinas, como la interleucina 10 (IL-10) y otros factores, como por ejemplo el factor de crecimiento transformante beta ( $TGF-\beta$ ) [14] y recientemente se ha descubierto que, en la transición de una etapa a otra se requiere de la síntesis de mediadores lipídicos especializados pro-resolutivos (SPM) [15, 16]. Otras células que participan son los monocitos, los que se infiltran a la zona

de la lesión y al llegar se diferencian en macrófagos. Los macrófagos responden a los PAMPs y DAMPs y, por lo tanto, captan las células apoptóticas y con esto favorecen la disminución de los mediadores inflamatorios. Los macrófagos además de eliminar a los PMN, eliminan microbios y desechos celulares. El aclaramiento activo de las células apoptóticas es un evento clave para la resolución de la inflamación [15]. Un aclaramiento fallido puede llevar a necrosis celular y exacerbar la respuesta inflamatoria [11].



**Figura 1. Eventos temporales coordinados de la inflamación aguda autolimitada.** La respuesta inflamatoria se puede dividir en 2 fases generales: iniciación y resolución. El cambio temporal en los mediadores de lípidos que son biosintetizados por leucocitos en el tejido es crítico para avanzar desde el inicio hasta la resolución, un proceso conocido como cambio de clase de mediadores lipídicos [11].

### 1.3 Citoquinas

Las citoquinas son pequeñas glicoproteínas producidas predominantemente por los leucocitos y su función es regular una gran cantidad de funciones fisiológicas y patológicas incluyendo la inmunidad innata, la inmunidad adquirida y un sin número de respuestas inflamatorias [17].

Las citoquinas constituyen una compleja red de interacciones que conecta distintos tipos celulares y en la cual cada una actúa al inducir o suprimir su propia síntesis o la de otras citoquinas o sus receptores. A la vez, las citoquinas favorecen de manera sinérgica la acción de otras citoquinas o bien actúan como verdaderos antagonistas de sus efectos biológicos y se caracterizan por su efecto redundante, hecho que subraya la importancia de su función reguladora. Sus propiedades biológicas sugieren un papel clave en la hematopoyesis, la inmunidad, las enfermedades infecciosas, la tumorigénesis, la homeostasis, la reparación de tejidos y el desarrollo y crecimiento celular.

Generalmente actúan como moléculas de señalización al unirse a sus propios receptores de glucoproteína en las membranas celulares [18].

Las citoquinas pueden clasificarse en grupos según sus funciones comunes. De esta forma tenemos citoquinas de las siguientes familias: interferones, factor de necrosis, interleucinas, factores de crecimiento, quimioquinas y moléculas de adhesión [18].

Dada la gran cantidad y diversidad de citoquinas que existen, se hará una breve referencia a aquellas cuyas funciones están ligadas de forma directa al proceso inflamatorio y que están incluidas en la presente investigación:

- TNF- $\alpha$ : Es una glicoproteína de 185 aminoácidos, la cual es producida principalmente por macrófagos y también puede ser producida por células endoteliales tras daño tisular, células T, células asesinas naturales (NK) activadas y fibroblastos. Posee dos receptores TNF-R1 y TNF-R2, ambos involucrados en procesos inflamatorios; TNF-R1 posee un dominio intracelular de muerte mientras que TNF-R2 no lo posee. 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 génica, siendo el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) uno de los principales factores de transcripción activados, lo que induce la expresión de moléculas de adhesión, interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) y el mismo TNF- $\alpha$  [19-21].
- IL-1 $\beta$ : Es una citoquina pro-inflamatoria potente que es crucial para las respuestas de defensa del huésped a la infección y la lesión. Pesa 17 KDa y es producida y secretada por varios tipos de células, como los monocitos, macrófagos, células dendríticas y fibroblastos. Se produce como un precursor inactivo denominado pro-IL-1 $\beta$  de 31 KDa en respuesta a PAMPs o DAMPs [22]. Este precursor es clivado por la caspasa-1 para producir la forma madura y activa de la citoquina [23]. La unión de la IL-1 $\beta$  al receptor de interleucina 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 de la quinasa c-Jun n-terminal (JNK) y p38 de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), las cuales, cooperativamente, inducen la expresión de otras citoquinas: interleucina 8 (IL-8), IL-6, MCP-1, e IL-1 $\beta$  [24, 25].
- IL-6: es una citoquina pleiotrópica de 20 KDa, 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 [26]. Esta citoquina se destaca por inducir la

producción de proteínas de fase aguda, y su participación es crucial en inflamación crónica al ejercer efectos en linfocitos T y B [27]. Esta citoquina se une al receptor IL-6R, lo que genera la activación de variadas cascadas de señalización como gp130/JAK/STAT y fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) [28]. La actividad de STAT conduce al aumento en la transcripción de variados genes, como los que codifican para las enzimas óxido nítrico sintasa (iNOS) y la COX-2 [29].

- MCP-1: Es una citoquina de 13 KDa, que está implicada en la quimiotaxis y en la activación de los distintos tipos celulares que participan en la inflamación. Es 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 receptor acoplado a proteína G (GPCR), y su activación induce movilización de  $Ca^{+2}$  y la inhibición de la Adenilato Ciclasa, regulando así la quimiotaxis [30].
- IL-10: Es una citoquina de 37 KDa, 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 [31]. 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 [32]. La activación del receptor gatilla la actividad de las tirosina kinasa JAK1 y TYK2, lo que a su vez activa factores de transcripción como STAT3, STAT1 y STAT5 [32]. 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- $\alpha$  [32].
- TGF- $\beta$ : Es una proteína de 25 KDa que regula diferentes funciones celulares como proliferación, apoptosis, diferenciación, migración, síntesis de MEC y tiene un papel clave en el desarrollo del organismo. La activación del receptor del TGF- $\beta$  propicia su fosforilación en residuos de serina/treonina y dispara la fosforilación de proteínas efectoras intracelulares (smad), que una vez activas, se translocan al núcleo para regular la transcripción de genes y llevar a cabo sus funciones biológicas [33].

#### 1.4 Proteínas de adhesión

En los tejidos animales la adhesión se realiza por medio de las denominadas proteínas de adhesión, las cuales se encuentran ancladas a la membrana plasmática. La adhesión sirve para anclar y situar a las

células para formar andamiajes tridimensionales, como una forma de comunicación celular y para que las células se puedan mover por el tejido o entre tejidos. Es decir, el grado de adhesión y a quién se adhieren las células es un tipo de información útil para la célula. Hay que tener en cuenta que las células no se desplazan nadando sino reptando. Por tanto, para moverse las células necesitan primero perder la adhesión que las mantiene fija y posteriormente exponer otras moléculas que permitan crear puntos de anclaje y arrastrar el citoplasma en la dirección del movimiento [34, 35] .

Las proteínas de adhesión se disponen en la superficie celular, pudiendo difundir lateralmente por la membrana. Cuando se unen a una molécula extracelular, quedan ancladas. Individualmente, la fuerza con la que se adhieren no es muy grande pero al ser muchas moléculas generan una fuerte adhesión actuando a modo de velcro. Algunas de las moléculas de adhesión pueden interactuar lateralmente entre sí y con otras proteínas, para formar grupos que aumentan la fuerza de adhesión en puntos determinados de la superficie celular formando uniones focales y complejos de unión. Pueden variar el tipo y la cantidad de moléculas de adhesión que exponen en su membrana plasmática mediante el control de su síntesis y degradación, o secuestrándolas temporalmente en compartimentos internos mediante endocitosis y exocitosis. Otro mecanismo es mediante la activación o inactivación temporal de las moléculas que están en la membrana [34, 35] .

Hay dos tipos de moléculas de adhesión, aquellas que unen la célula con la MEC y aquellas que establecen uniones directas entre dos células contiguas. Dentro de estos dos tipos, las moléculas de adhesión se subdividen en 4 tipos: cadherinas, inmunoglobulinas, selectinas y algunos tipos de integrinas [36].

Dentro de las inmunoglobulinas (IgSF) se encuentran ICAM-1 y VCAM-1, moléculas que tienen implicancia crítica en el reclutamiento e infiltración de células del sistema inmune al sitio de daño a nivel cardiovascular.

- ICAM-1: Es una glucoproteína transmembrana de 532 aminoácidos, que tiene una masa molecular que oscila entre 75 y 115 KDa. También es llamada CD54. Es el contrarreceptor para integrinas  $\beta$ 2, como LFA-1 y Mac-1 [37]. Se expresa en varias células tanto hematopoyéticas como no hematopoyéticas, incluidas las células endoteliales, leucocitos que no sean granulocitos, basófilos, células T, células B, fibroblastos y células cancerosas. ICAM-1 se une a dos integrinas que pertenecen a la subfamilia beta2 CD11a / CD18 (LFA-1) y CD11b / CD18 (Mac-1) en la superficie de los leucocitos. Es una molécula clave en procesos inflamatorios e inmunomediados y funciona como una señal co-estimuladora que es importante para la migración transendotelial de los leucocitos y la activación de las células T. ICAM-1 puede ser inducida en condiciones inflamatorias por TNF- $\alpha$  en un proceso que involucra a IKK-beta.



ICAM-1 participa en la transducción de señales transmembrana en el proceso regulador de la proliferación celular a través de la ruta de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y, finalmente, la ruta AP-1 [36].

- VCAM-1: También llamada CD106, es una glicoproteína de 90 KDa que se expresa predominantemente en células endoteliales donde es inducible por las citoquinas. Facilita la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular a través de su interacción con su contrarreceptor de integrina (VLA-4), importante en la mediación de la adhesión selectiva de leucocitos mononucleares. También se expresa en la superficie de otras células, incluyendo macrófagos de tejidos, células dendríticas, fibroblastos de médula ósea, mioblastos, ovocitos, células de Kupffer, células de Sertoli y células cancerosas. La regulación de VCAM-1 en las células endoteliales por las citoquinas se produce como resultado de una mayor transcripción génica, por ejemplo en respuesta al TNF- $\alpha$  e IL-1. La región promotora del gen VCAM-1 contiene sitios funcionales para NF- $\kappa$ B en tándem [38].

### 1.5 Mediadores lipídicos especializados pro-resolutivos (SPM)

Hoy en día, se reconoce que la resolución de la inflamación es un proceso dinámico, programado y autolimitado, cuya regulación se logra mediante varios mecanismos fisiológicos que actúan tanto a nivel sistémico como local, proporcionando control sobre las acciones reguladoras específicas de tejido necesarias para limitar la lesión inflamatoria y restaurar la homeostasis [39]. Esto mediante mecanismos de acción basados en agonistas endógenos antiinflamatorios y/o pro-resolutivos, denominados SPM [39]. Los SPM son moléculas de señalización que fueron identificados en exudados inflamatorios e incluyen cuatro diferentes familias: lipoxinas (LX), resolvinas (Rv), protectinas (PD) y maresinas (MaR). Estas moléculas se generan de forma rápida de manera transcelular, actúan y se inactivan localmente, e inhiben las acciones del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual regula la expresión de genes de moléculas proinflamatorias, y contrarregulan la infiltración de leucocitos PMN [39].

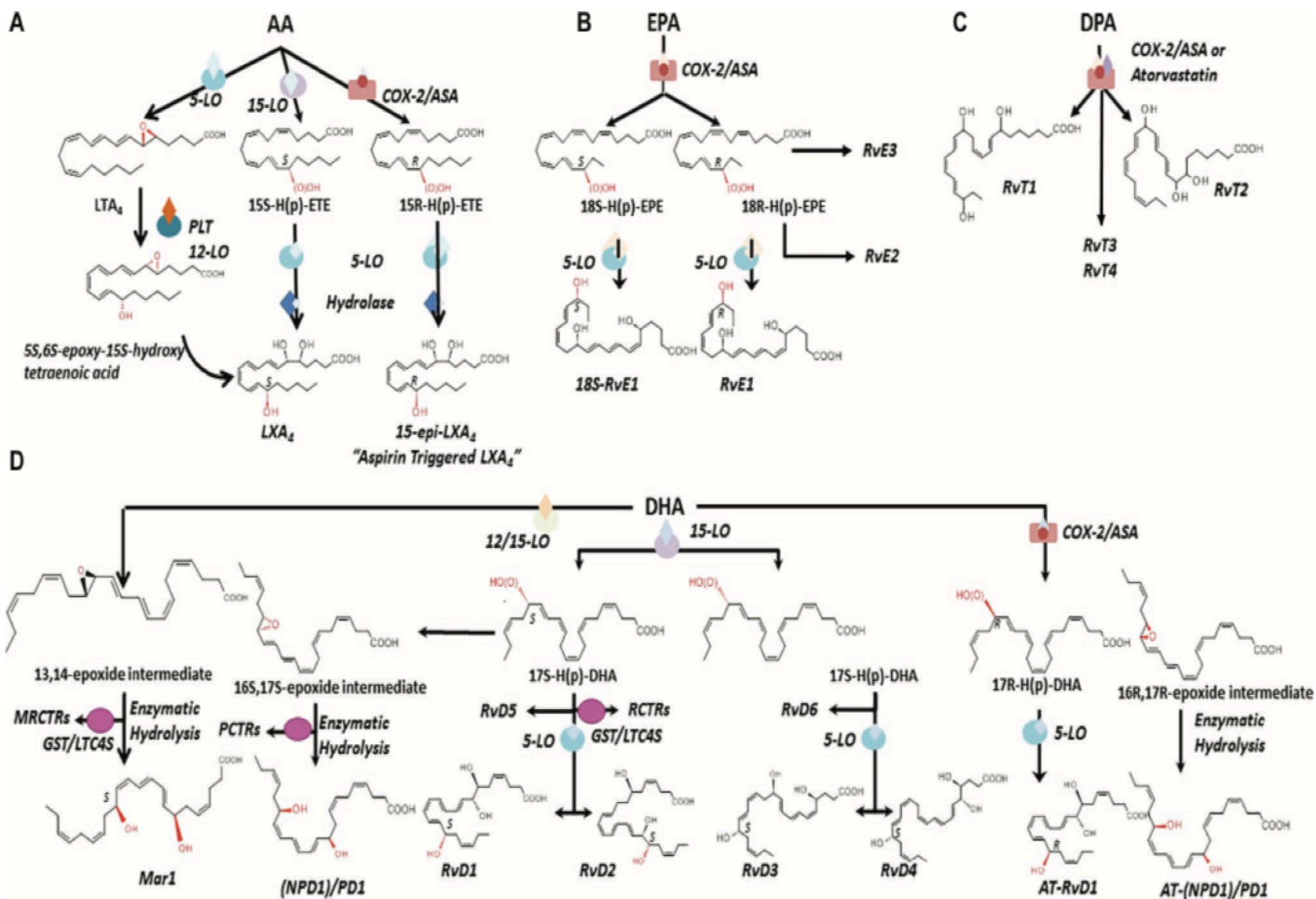
El descubrimiento de los SPM ofrece nuevas posibilidades para tratar los desórdenes inflamatorios, ya que hasta ahora los esfuerzos se han orientado hacia eliminar o contrarrestar a los causantes de la inflamación y poco se ha estudiado sobre los efectos de favorecer o potenciar la resolución del proceso inflamatorio. Todos los SPM identificados hasta la fecha parecen estar involucrados en la resolución de la inflamación aguda, actuando como potentes agonistas que pueden controlar la duración y la magnitud de la inflamación [2]. Particularmente, las Rv han mostrado ser una novedosa herramienta farmacológica pues han mostrado resultados favorables en diferentes modelos de inflamación [15].

## 1.6 Resolvinas

### 1.6.1 Generalidades

Las Rv son moléculas pequeñas, estereoespecíficas, que fueron identificadas por análisis basados en sistemas lipídicos de exudados murinos generados tras inflamación aguda. Se producen a través de una interacción célula-célula entre células endoteliales/leucocitos y células endoteliales/neutrófilos durante la inflamación aguda y se han categorizado en series D y E, debido a que derivan de los ácidos docosahexaenoico (DHA) y el eicosapentaenoico (EPA) respectivamente [15, 40] (Ver Figura 2). DHA y EPA a su vez son derivados del ácido graso esencial  $\omega$ 3 y son importantes componentes estructurales de los fosfolípidos, a los que se les atribuyen efectos antiinflamatorios y citoprotectores [41].

El nombre Rv es debido a su rol en la fase de resolución de la inflamación, la cual favorecen sin causar inmunosupresión al actuar como potentes agonistas que pueden controlar la duración y magnitud de la inflamación. Existe una gran cantidad de evidencia que indica que las Rv poseen poderosas acciones antiinflamatorias e inmuno-reguladoras que incluyen el bloqueo de la producción de mediadores proinflamatorios y la regulación del tráfico de leucocitos. En este sentido, se ha observado *in vivo* que las Rv detienen la infiltración y transmigración de PMN, además de reducir la expresión de citoquinas [41]. 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 [42]. Sin embargo, poco se ha estudiado sobre sus efectos a nivel del tejido cardiaco.



**Figura 2. Biosíntesis y estructuras de los SPM.** Se ilustran las vías biosintéticas que conducen a (A) lipoxinas, (B) resolvinas de la serie E, (C) SPM derivadas del DPA, (D) resolvinas, protectinas y maresinas de la serie D. Se muestran las estructuras y estereoquímicas de algunos miembros de cada familia de SPM. AA, ácido araquidónico; EPA, ácido eicosapentaenoico; DPA, ácido docosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; LO, lipoxigenasa; COX-2, ciclooxigenasa 2. MCTR, conjugado de maresina en la regeneración de tejidos; RCTR, conjugado de resolovina en la regeneración de tejidos; PCTR, conjugado de 27roteína en la regeneración de tejidos [15].

## 1.6.2 Resolvina D1

### 1.6.2.1 Características Generales

La RvD1 es un derivado del ácido docosahexaenoico (DHA) y es considerada un producto de biosíntesis trans-celular entre leucocitos y células endoteliales. Su presencia se ha detectado *in vivo* en exudados resolutivos. La síntesis de la RvD1 implica la acción de las enzimas 15-lipooxigenasa (15-LOX) y 5-lipoxigenasa (5-LOX) [43]. Otra vía para la biosíntesis de RvD1 es activada por aspirina que acetila a la enzima COX-2 que convierte DHA a 17R-HDHA. Luego, esta molécula es convertida por la 5-LOX para dar como producto AT-RvD1 (RvD1 derivada de la inhibición de la COX-2 por aspirina). En cuanto a su degradación, la rápida conversión de RvD1 por la enzima eicosanoide oxidoreductasa a 8-oxo y 17-oxo-RvD1 disminuye en gran medida su bioactividad [44].

La RvD1 se une a dos GPCR: GPR32 (presente solo en humanos) y ALX/FPR2 (presente en humanos y roedores como rata y ratón) [45]. En neutrófilos humanos y células hl-60 humanas, los receptores ALX/FPR2 están asociados a la proteína G de tipo Gi/o y tienen como efector la inhibición de las enzimas Adenilato ciclasa, Fosfolipasas C, A<sub>2</sub> y D [46] [47]. Como mecanismo de transducción secundario en neutrófilos se han asociado a la activación de proteína G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub> llevando de igual forma a la estimulación de Fosfolipasa C, A<sub>2</sub> y D [48]. Esto lleva a inhibir la fosforilación de ERK1/2 y a inhibir al factor NF-κB [49].

Los receptores para RvD1 pueden selectivamente mediar las acciones de esta resolvina bajo diferentes condiciones. Las acciones pro-resolutivas se atribuyen principalmente a la activación de los receptores ALX/FPR2. En humanos este receptor está altamente expresado en células inmunes, fibroblastos sinoviales, células mesangiales, células endoteliales y células epiteliales [42].

### 1.6.2.2 Evidencia de los efectos de RvD1 en la respuesta inflamatoria

Sobre los efectos de RvD1 sobre la respuesta inflamatoria existe gran cantidad de evidencia publicada tanto en modelos experimentales en animales como en modelos humanos. Algunos de los efectos que se han encontrado y que se atribuyen a la acción de RvD1 son los siguientes: detener el reclutamiento de neutrófilos, regular la producción de citoquinas, promover la remoción linfocítica de fagocitos, regular la migración de células T, inhibir la inducción de NF-κB y COX-2, ejercer efecto protector en isquemia reperusión, fibrosis y neovascularización [39].

Dentro de los posibles ejemplos de lo anterior, en ensayos *in vivo* se ha encontrado que RvD1 limitó la infiltración de PMN de una manera dependiente de la dosis en un modelo de peritonitis en ratones [50]. La administración de RvD1 antes o después de isquemia-reperfusión inducida resultó en una reducción de la lesión renal funcional y morfológica. Además, RvD1 redujo los niveles séricos de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  e IL-6 en ratones con isquemia reperfusion inducida y daño agudo al riñón [51]. A nivel renal, RvD1 inhibió la proliferación de fibroblastos en ensayos *in vivo* e *in vitro* realizados en ratones [52].

En ensayos *in vitro* se encontró que: RvD1 en tejido pulmonar humano inhibe la fosforilación de TAK1 una proteína efectora que regula tanto las vías MAP-quinasa como NF- $\kappa$ B, inhibiendo así la fosforilación de ERK1/2 y la translocación de p65- NF- $\kappa$ B, lo que lleva a una disminución de la expresión de las citoquinas IL-6 e IL-8 [53]. Por otro lado, en fibroblastos pulmonares humanos y cepas de células epiteliales tratadas con IL-1 $\beta$  o poli (I: C), la RvD1 bloquea la fosforilación de ERK1/2 y también la translocación de NF- $\kappa$ B p65 [53], también en este mismo tipo celular RvD1 inhibió el peak 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 [54]. Además, RvD1 demostró ser un potente regulador de PMN humanos y murinos y detuvo la migración transendotelial de neutrófilos [55]. Además, se ha evidenciado el efecto de la RvD1 en fibroblastos gingivales humanos en cultivo, 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 [56]. En FCs de ratón se encontró que RvD1 disminuye la expresión de la enzima COX-2 y aumenta los niveles de la enzima 5-LOX que es la encargada de mediar en la síntesis de las resolvinas [57].

Con relación a la temática de la presente investigación, cabe mencionar que, acerca de las acciones de RvD1 sobre la expresión de proteínas de adhesión y sobre la expresión/secreción de citoquinas en FCs no hay información publicada hasta el momento. Interesantemente, a pesar de que RvD1 ha demostrado efectos antiinflamatorios en diferentes modelos de inflamación [15], hasta la fecha, comparativamente se ha publicado poco sobre los efectos de la RvD1 a nivel de inflamación cardíaca y como ya mencionó, menos aún específicamente en FCs. Los fibroblastos poseen identidad posicional, es decir, su morfología y función se relaciona con el órgano del cual provienen y la ubicación en la que se encuentran en ese órgano en particular, debido a requerimientos biofísicos diversos que hace que sean diferentes en términos de proliferación, síntesis de colágeno, expresión de metaloproteinasas (enzimas que pueden descomponer colágeno), contractilidad y función inmunomoduladora [58, 59]. Por lo tanto, lo que ocurre en otros fibroblastos no necesariamente ocurrirá en los FC y esto hace necesario responder a la pregunta

de sí a nivel cardíaco y particularmente en células como los FCs se expresan los receptores para las Rv y si éstas podrían ejercer algún efecto para favorecer la resolución de la inflamación.

### 1.7 Fibroblastos cardíacos

Los FCs son células estromales, que constituyen el tejido de sostén del corazón desde su desarrollo embrionario, y aunque no son las células más numerosas, su rol es clave en la mantención de la homeostasis no sólo de la estructura tisular, sino que también en la homeostasis de la respuesta inflamatoria. Morfológicamente, se caracterizan por su forma de huso plana. Los FCs son reconocidos por su rol estructural en la síntesis de MEC la cual está compuesta principalmente por diferentes tipos de colágeno, formando una red tridimensional que cubre agrupaciones de miocitos proporcionando soporte al estrés mecánico [60]. Se cree que la comunicación intercelular entre FCs y cardiomiocitos contribuyen en el mantenimiento del funcionamiento eléctrico y mecánico del corazón [5].

Los FCs poseen diferentes clases de receptores, los que dan cuenta de la respuesta de estas células frente a los estímulos proinflamatorios. Entre los más importantes en la regulación de sus funciones celulares están: a) los receptores de cininas B1 y B2, su estimulación mediante los respectivos agonistas activan vías de señalización comunes que disminuyen la síntesis y secreción de colágeno a través de óxido nítrico y secreción de prostaciclina I<sub>2</sub>; b) el receptor  $\beta_2$  adrenérgico ( $\beta_2$ -AR) cuya estimulación activa a la proteína quinasa A (PKA) y proteínas de intercambio activadas directamente por cAMP (EPAC), promoviendo efectos diferenciales asociados a disminución de la secreción de colágeno, proliferación y autofagia; c) los receptores de angiotensina II (AT1R y AT2R); y su activación aumenta la síntesis de colágeno y estimula la proliferación celular; mientras que su sobreexpresión activa apoptosis; d) receptores asociados a células inmunes como Toll like receptor 4 (TLR4), NLRP3 y el receptor de interferón, cuya activación le permite a los FCs participar en la respuesta inflamatoria de la reparación cardíaca a través de la modulación de las funciones celulares descritas y la liberación de citoquinas [5].

En condiciones de daño cardíaco, los FCs desempeñan un rol relevante en el proceso de cicatrización y remodelamiento del tejido cardíaco, y han sido denominados células centinelas de la inflamación por su capacidad de responder de forma eficiente a los PAMPS, y a los DAMPS [5, 61]; a través de la secreción de citoquinas (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1, IL-8), factores de crecimiento (TGF- $\beta$ 1), metaloproteasas y moléculas de adhesión celular (ICAM-1, VCAM-1). Así, de esta forma, pueden interactuar y modificar la función no sólo de las células cardíacas residentes como los cardiomiocitos, células del músculo liso vascular y células endoteliales, sino que también, la de las células circundantes como las células inmunes (linfocitos, monocitos, macrófagos) [5, 62, 63] y de esta forma modular la

proliferación celular, muerte celular, autofagia, adhesión, migración, expresión de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y diferenciación a miofibroblastos cardíacos (MFCs) [5].

En FCs, la liberación de MCP-1, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP) -1 y RANTES, permite el reclutamiento de leucocitos [64]. También se ha demostrado que los FCs al expresar ICAM-1 y VCAM-1 permiten la adhesión de leucocitos a los mismos FCs [65]. Los neutrófilos y los linfocitos B también se adhieren a los FCs [66]. Estos descubrimientos respaldan la idea de los FCs actúan como reclutadores no especializados de células inmunes, una función que anteriormente se pensaba que era exclusiva de las células endoteliales. Una vez reclutados, los leucocitos infiltrados están en contacto directo con las células cardíacas en el sitio de la lesión. Es ampliamente conocido que los leucocitos pueden modular el comportamiento fenotípico de los FCs a través de la liberación de diferentes citoquinas inflamatorias / antiinflamatorias, como el TGF- $\beta$ 1 de los neutrófilos o el TNF- $\alpha$  de los monocitos [67]. Así, se sabe entonces que los FCs, participan activamente en el proceso de adhesión y migración de células de la inmunidad a los mismos FCs, procesos que en conjunto se conocen como reclutamiento celular [65].

La respuesta inflamatoria de los FCs se ha empezado a conocer y caracterizar por su respuesta frente a estímulos proinflamatorios como el LPS y Ang II entre otros, por lo que a continuación se hará referencia a esta respuesta.

## 1.8 Estímulos proinflamatorios y su efecto en FCs

### 1.8.1 LPS

El LPS, es uno de los componentes principales de la membrana de las bacterias Gram-negativas, consta de tres secciones: Lípido A, un núcleo de oligosacáridos y una cadena O-lateral, siendo el Lípido A, el principal PAMP del LPS [68, 69].

El LPS es un ligando capaz de activar específicamente el receptor tipo Toll 4 (TLR4), lo que conduce a la producción de citoquinas /quimioquinas pleiotrópicas que a su vez regulan las respuestas inmunitarias inflamatorias innata y adaptativa [70]. El TLR4 es uno de los receptores más estudiados, y la evidencia encontrada describe su activación como un elemento clave en la iniciación y resolución de respuestas inflamatorias. Con relación a la inflamación cardíaca, el TLR4 puede ser activado por ligandos endógenos liberados tras una lesión cardíaca por 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 [5].

El TLR4 es expresado en los FCs y su estimulación conduce a la activación de 2 vías señalizadoras: i) la vía independiente de MYD88, la cual activa IRF3 y guía a la producción del Interferón de tipo I (IFN

R); ii) la vía dependiente de MYD88, que a su vez activa ERK1/2, PI3K/Akt, y al factor de transcripción NF- $\kappa$ B induciendo la expresión de citoquinas proinflamatorias [5, 71, 72] como pro-IL-1 $\beta$  [23], TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP-1, IL-10 [65], y moléculas de adhesión celular como ICAM-1 y VCAM-1 [73]. Considerando lo anteriormente dicho, resulta evidente el rol del TLR4 en la inflamación, fibrosis y remodelado cardíaco.

### 1.8.2 Angiotensina II

La angiotensina II (Ang II), es un péptido bioactivo considerado el producto principal del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) [74]. El RAAS es un sistema hormonal que regula la presión sanguínea, el volumen extracelular corporal y el balance de sodio y potasio [75].

La elevación crónica de Ang II estimula varios mecanismos fisiopatológicos incluyendo la generación de estrés oxidativo, estimulación del sistema nervioso, alteraciones en la hemodinámica renal y activación del sistema inmune. En particular, se ha demostrado que un sistema inmunitario activado contribuye al desarrollo de hipertensión, la cual es considerada un importante factor de riesgo de mortalidad y morbilidad cardiovascular [76]. Así, la Ang II es uno de los principales factores implicados en el daño tisular causantes de la hipertensión. Este péptido regula el proceso inflamatorio, actuando como agente pro-inflamatorio, y promueve efectos pro-fibróticos [77]. Además, activa las células circulantes y participa en su adhesión al endotelio activado y la posterior transmigración a través del aumento en la síntesis de moléculas de adhesión y citoquinas. Además, Ang II promueve la infiltración de células inmunes hacia el miocardio y causa desbalance de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias versus anti-inflamatorias y activación de cascadas transduccionales pro-inflamatorias [78]. También, Ang II conduce a la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno y a la hipertrofia, proliferación, migración, senescencia, apoptosis de las células vasculares y deposición de la MEC [79].

Para realizar sus efectos fisiológicos, Ang II se une a dos tipos de receptores transmembrana acoplados a proteína G, denominados AT1R y AT2R. Estos receptores poseen un 30% de homología en su secuencia y funcionalmente son distintos [80]. La mayoría de los efectos de la Ang II, como la vasoconstricción, proliferación celular, deposición de la MEC y migración son mediados por la activación del receptor AT1.

La unión específica de Ang II al AT1R activa varias vías de señalización intracelular, donde la vía de la proteína Gq/11 activa a la fosfolipasa C (PLC) [81], y por cascada de señalización a la proteína quinasa C (PKC), además de aumentar el Ca<sup>+2</sup> intracelular citosólico [5]. El AT1R promueve la activación de la vía de señalización MAPK, que induce la proliferación de FCs y la expresión de factores profibróticos. También, Ang II a través de AT1R incrementa la síntesis y secreción de TGF- $\beta$ 1, lo que se ha asociado



a fibrosis cardiaca y efectos antiinflamatorios. Esto último, a pesar de que el AT1R promueve la inflamación en tejido cardiaco a través de síntesis y secreción de TNF- $\alpha$  [5, 82]. Entre las señales intracelulares involucradas en la inflamación inducida por Ang II tras la activación del receptor AT1R están la producción de especies reactivas de oxígeno y la activación del factor NF- $\kappa$ B como las más conocidas [83].

Para inhibir los efectos provocados por la activación del receptor AT1, se utilizan los antagonistas del receptor de Ang II (ARA II), entre los cuales se encuentra Losartán. Este fármaco posee 10.000 veces más selectividad por el AT1R que por el AT2R, y se caracteriza por ser el ARA II con más antigüedad en el mercado para el tratamiento de la hipertensión [84].

Por otra parte, la unión de Ang II a los AT2R ejerce, generalmente, acciones opuestas a las de AT1R a través de la producción de óxido nítrico y la activación de fosfatasa que inhiben las funciones de la vía MAPK y provoca fundamentalmente vasodilatación, apoptosis y actividad antiproliferativa [85]. Además, se ha reportado que su activación resulta beneficioso en ratas hipertensas, disminuyendo la fibrosis y disfunción cardiaca [5, 82]. Para antagonizar al AT2R se utiliza, entre otros, el fármaco PD123319, el cual es además considerado un agente vasoconstrictor [86].

Con relación a la presencia de los receptores de Ang II en FCs, se sabe que tanto el AT1R como el AT2R están presentes en el tejido cardíaco y eso incluye específicamente a MFCs y FCs [5, 87]. La hipertensión o infarto cardiaco promueve la expresión de AT1R en FCs asociado a fibrosis. La activación del AT1R induce proliferación celular e incrementa la síntesis de proteínas de la MEC.

Además, los núcleos de los FCs poseen sitios de unión AT1R y AT2R que están acoplados a la movilización de  $\text{Ca}^{+2}$  intranuclear, lo cual produce incremento en la transcripción, y la liberación de óxido nítrico, respectivamente [88].

#### 1.8.2.1 Angiotensina II y $\text{Ca}^{+2}$

La Ang II vía receptor AT1R estimula la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$ , llevando a un aumento de este ión a nivel intracelular. Esto hasta ahora se ha explicado por la activación de diferentes mecanismos: i) A través de la participación de las proteínas ORAI 1 y STIM1. Tras la activación de la fosfolipasa C, se forma IP3 que lleva a la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  del retículo endoplásmico. La disminución de la concentración de este ión en el retículo endoplásmico es detectada por la proteína STIM1. STIM1 entonces se reubica cerca de la membrana plasmática y activa a ORAI 1 a través de la interacción proteína-proteína y favorece la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a la célula. ii) Inducción de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  denominados TPRC y LTCC, que al activarse incrementan la entrada del ión calcio a la célula. iii) Inducción de la proteína transmembrana

ANO1 y de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  voltaje dependientes VDCC, los cuales se activan con el aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  y llevan a un aumento aún mayor de la entrada de este ión [81].

En resumen, a partir de los antecedentes presentados, las enfermedades cardiovasculares representan una de las principales causas de muerte y discapacidad a nivel mundial. Un factor fisiopatológico común en muchas de estas enfermedades es la inflamación aguda, la cual si no se resuelve adecuadamente se transforma en inflamación crónica llevando a desarrollar fibrosis en el tejido cardiaco. En la respuesta inflamatoria cardíaca participan de forma activa los FCs, secretando citoquinas, expresando proteínas de adhesión y aumentando así la interacción con las células de la inmunidad. En la regulación de la respuesta inflamatoria aguda participan diferentes mediadores, y recientemente se ha reconocido la participación de los SPM, entre los cuales están las resolvinas, las que hasta ahora mostrado favorecer la resolución en diferentes modelos de inflamación tanto *in vivo* como *in vitro*, y poco se ha estudiado sobre su posible efecto en la resolución de la inflamación a nivel cardiaco, menos aún se conoce su efecto sobre la respuesta inflamatoria de los FCs. Siendo que la participación de los FCs se ha empezado a caracterizar por su respuesta frente a estímulos como el LPS y Ang II, estos estímulos se han elegido para en la presente investigación.

Hasta la fecha no hay publicaciones que evidencien el efecto de las Rv sobre la respuesta inflamatoria en FCs. Particularmente no hay información sobre los efectos de la RvD1 sobre estas células en cuanto a los efectos sobre la expresión de proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, la secreción/expresión de IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  y la adhesión de monocitos a los FCs.

Dado lo anterior, esta investigación busca determinar los efectos sobre la respuesta anti-inflamatoria de la RvD1 en cuanto a la expresión de proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, la expresión/secreción de citoquinas IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  y la adhesión de monocitos a los FCs, inducidas ya sea por Ang II o LPS.

## **2. HIPÓTESIS**

RvD1, vía receptor ALX/FPR2, disminuye la expresión de ICAM-1, VCAM-1, de las citoquinas IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  y la adhesión de monocitos, en los procesos pro-inflamatorios gatillados por Ang II y/o LPS en FCs de rata.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Determinar los efectos *in vitro* de RvD1 vía ALX/FPR2 sobre la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, de las citoquinas IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ , y la adhesión de monocitos, en FCs de rata tratados con LPS y/o Ang II.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar en FCs de rata los efectos de RvD1 sobre los segundos mensajeros cAMP y Ca<sup>+2</sup> asociados a la activación de los receptores ALX/FPR2.
2. Determinar el efecto de RvD1 sobre la expresión de proteínas de adhesión ICAM-1, VCAM-1, la expresión/secreción de las citoquinas IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  y la adhesión de monocitos inducidos por Ang II en FCs de rata.
3. Determinar el efecto de RvD1 sobre la expresión de proteínas de adhesión ICAM-1, VCAM-1 y la expresión/secreción de las citoquinas IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  y la adhesión de monocitos inducidos por LPS en FCs de rata.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Materiales

El DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium); No 12500062), el suero bovino fetal (FBS; N° 04-001-1<sup>a</sup>), la tripsina (EDTA; 0.5%), EDTA 0.2% (Solución 10X (No 03-051-5B), la solución de penicilina-estreptomicina-anfotericina B (N° 03- 033-1B) y la solución de azul de trypan (0,5%) (N° 03-102-1B) se obtuvieron de Biological Industries (Cromwell, CT, EE. UU.) La colagenasa, tipo II, polvo (N° 17101015), el inhibidor de fosfatasa y la sonda FLUO4-AM (F14201) se obtuvo de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EEUU.). Todas las sales inorgánicas, metanol (N° 106035) y el inhibidor de proteasa se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). El estándar de peso molecular de proteínas (10–245 kDa; N° Ab116028) y el anticuerpo primario para ICAM-1 se adquirió de Abcam (Cambridge, MA). Los anticuerpos primarios para ALX/FPR2,  $\beta$ -tubulina y el buffer Tris Acetate-EDTA (TAE) 50x se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EE. UU.), los anticuerpos primarios para VCAM-1 y GAPDH y los anticuerpos secundarios para IgG anti-conejo (N° 7074) e IgG anti-ratón (N° 7076) conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) se adquirieron de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE. UU.). Todo el material plástico se obtuvo de Corning Incorporated (Corning, NY, EE. UU.). Reactivos para quimioluminiscencia (ECL) fueron comprados en PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Angiotensina II humana, Isoproterenol clorhidrato (ISO) (I-5627), Bradford Reagent, Losartán potásico, agua calidad PCR y Ficoll Histopaque-1083 fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Missouri, USA). LPS-EB Ultrapure (E. Coli O111:B4), fue comprado en InvivoGen (San Diego, CA). Se adquirió membrana de nitrocelulosa de 0,45 mm tamaño de poro en Bio-Rad (CA, EE. UU.). El kit multiplex (RECYTMAG-65 K / MILLIPLEX MAP Rat Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel) se adquirió de Merck-Millipore (Temecula, CA). RvD1 (CAS 872993-05-0) y el kit ELISA para cuantificar cAMP fue adquirido a Cayman Chemical Company (MI, USA).

De Omega-Biotek (Norcross, GA, USA) se obtuvo Total RNA Kit I, E.Z.N.A. De Applied Biological Materials (Richmond, BC, Canadá) se obtuvo 5X All-in-one RT Master Mix. De Eurogentec (Seraing, Bélgica) se obtuvo Takyon Rox SYBR Master Mix dTTP blue y los partidores de los genes en estudio. De New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) se obtuvo DNase I. De Fermelo Biotec (Santiago, Chile) fue adquirida agarosa Lafken grado analítico. De Biotium Inc (Hayward, CA, USA) se obtuvo: GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10.000 x en DMSO. USA).

## 5.2 Animales

Se obtuvieron ratas macho adultas Sprague-Dawley (SD) de 250-350g (de 6-8 semanas de edad) de las instalaciones del bioterio de animales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, Santiago, Chile. Todos los estudios siguieron la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio [89] y los Principios Rectores Internacionales para la Investigación Biomédica de Animales, según lo publicado por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas [90]. Los protocolos experimentales (CBE2017-08 CYQ-UCH y CBE2017-13 CYQ-UCH) fueron aprobados por el Comité de Bioética para la Investigación Animal de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile (Ver Anexo 1).

## 5.3 Aislamiento de fibroblastos cardiacos

Se realizaron los protocolos de aislamiento y cultivo de FCs de rata adulta, implementados y estandarizados previamente en el laboratorio [23].

De manera breve, ratas macho adultas Sprague-Dawley fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de ketamina/xilaxina (66/10 mg/Kg peso), se esperó el tiempo suficiente hasta alcanzar sedación profunda, y luego se extrajeron sus corazones bajo condiciones de asepsia. Los corazones (por separado) se cortaron en pequeños trozos (1-2 mm) para posteriormente pasar el tejido a digestión en solución de colagenasa II por 1 hora y 15 minutos bajo condiciones de incubación a 37°C y agitación a 125 rpm.

El producto de la digestión fue centrifugado a 500 rpm por 2 min, tras lo cual el sobrenadante se separó y se centrifugó a 1000 rpm por 10 min. El pellet resultante se resuspendió en 4 mL de medio DMEM-F12 + 10% FBS/ antibióticos (estreptomina 100 µg/mL y penicilina 100 unidades/mL). Este volumen de 4 mL se repartió en 2 placas de cultivo que se incubaron durante 24 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>). Luego de este tiempo, las células adheridas a la placa (FCs) se lavaron 2 veces con 5 mL de PBS para eliminar debris y células no adheridas (cardiomiocitos).

Los fibroblastos adheridos a las placas de cultivo, se dejaron proliferar hasta confluencia (5 días) en medio de cultivo DMEM-F12 + 10% FBS. Una vez alcanzada la confluencia se realizó el pasaje mediante tripsinización (1 pasaje como máximo) y las células fueron sembradas en DMEM-F12 + 10% FBS. La cantidad de FCs sembrados dependió de la densidad de células que se requirió en cada experimento.

Pasadas 24 horas de haberse realizado el pasaje de las células, los FCs fueron privados de suero por 18-24 h y cultivados con medio de mantención DMEM-F12, antes de ser utilizados en las distintas condiciones experimentales.

La pureza de la población de FCs fue confirmada mediante el uso de diversos marcadores celulares. Los FC mostraron marcaje positivo para vimentina (Santa Cruz Biotechnology, California, EEUU) y negativos contra actina sarcomérica y desmina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU).

#### 5.4 Western Blot

FCs se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de  $3,5 \times 10^5$  células/placa y permanecieron en incubación por 24 h. Pasado este tiempo se les privó de suero, quedando en medio DMEMF12 por 24 horas. Transcurrido este tiempo se les cambió el medio y se les colocó medio DMEMF12 fresco 1 hora antes de los estímulo estudiados: LPS, Ang II, TGF- $\beta$ , RvD1, losartán, PD123319, Losartán + Ag II (1 hora después), PD123319 + Ang II (1 hora después), RvD1+ Ang II (1 hora después), Ang II + RvD1 (1 hora después). Los estímulos fueron por 24 h para los ensayos para determinación de la proteína ALX/FPR2 y por 24 y 48 horas h para la determinación de los niveles de ICAM-1 y VCAM-1.

Una vez finalizado el tiempo de estímulo, las células se lavaron con PBS frío y luego para obtener los extractos de proteínas totales, los FCs se lisaron con tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,2; EDTA 5mM; NaCl 150 mM; Tritón X-100 1%(v/v); SDS 0,1% (v/v); deoxicolato 1%; aprotinina 20 mg/mL; leupeptina 1 mg/mL; PMSF 1 mM y Na3VO4 1 mM) junto con inhibidores de fosfatasa y proteasa. El lisado se sonicó por 5 min y luego se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min a 4°C. El extracto de proteínas (sobrenadante) se recuperó en un tubo Eppendorf nuevo, se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford y se combinó en una razón de 3: 1 con tampón de carga Laemli (glicerol 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol 20%, SDS 5%, 125 mM Tris y 0,01% azul de bromofenol, pH 6,8), para ser almacenado (el extracto) a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La separación y resolución de las proteínas de acuerdo a su masa se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida preparados a partir de una solución 29:1 de acrilamida: bisacrilamida. Los geles concentradores (stacking) y separadores (running) se prepararon respectivamente al 5% y 12% para las determinaciones de los niveles de ALX/FPR2 y al 5% y 10% para las determinaciones de ICAM-1 y VCAM-1. Los geles se cargaron con 25  $\mu\text{g}$  de extracto proteico de cada una de las condiciones experimentales. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 70V por 30 minutos y luego se pasó a 100V durante 60 minutos. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0,2  $\mu\text{m}$  de poro durante 90 min a una corriente constante de 350 mA. Una vez transferidas las proteínas a las membranas, estas se bloquearon durante 1

h a temperatura ambiente con solución de leche descremada en TBST al 5%(p/v) y posteriormente, se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. Las diluciones de los anticuerpos para FPR2, ICAM-1, VCAM-1 y GAPDH (control de carga) fueron 1:1000, 1:5000, 1:2000, 1:1000 respectivamente.

Posterior a la incubación, las membranas se lavaron 3 veces con TBST por 15 min y luego se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG respectivo (dilución 1:1000), en tampón de bloqueo TBST.

Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 3 min con el reactivo quimioluminiscente ECL y se visualizaron con el equipo digital LICOR® y el programa Image StudioDigits®. Los valores de proteínas se cuantificaron y normalizaron de acuerdo con los niveles de GAPDH.

### 5.5 Determinación de movimientos de $Ca^{+2}$ intracelular

FCs se sembraron sobre cubreobjetos de 25mm en placas de 35 mm a una densidad de 50 000 células/placa y permanecieron en incubación por 24 h. Pasado este tiempo se les privó de suero, quedando en medio DMEMF12 por 24 horas. Transcurrido este tiempo se les cambió el medio y se les colocó medio DMEM/F12 fresco 1 hora antes del ensayo para determinar los niveles de calcio. Pasado este tiempo, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron 2 veces con 1mL de medio Krebs (NaCl 145 mM, KCl 5mM,  $CaCl_2$  2,6 mM,  $MgCl_2$  1 mM, HEPES-Na 10 mM, glucosa 5,6 mM, pH 7.4). Luego, se cargaron con una sonda sensible a  $Ca^{+2}$ , Fluo-4AM (4,4  $\mu$ M), durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con solución Krebs para sacar el exceso de sonda y se conservaron en 500  $\mu$ L de esta solución y se estimularon con 25  $\mu$ L de vehículo, Ang II, RvD1, RvD1 + Ang II (1 minutos después), WRW4 + RvD1 (1 minuto después) + Ang II (1 minuto después) a las concentraciones correspondientes. A través de microscopia confocal 40x se observaron cambios en la fluorescencia de la sonda debido a movilización de  $Ca^{+2}$  intracelular a longitudes de onda de Excitación/Emisión de 494/506 nm. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Image J (Bethesda, MD).

### 5.6 Determinación de niveles de cAMP intracelular

FCs se sembraron 60 mm a una densidad de 200000 células/placa y permanecieron en incubación por 24 h. Pasado este tiempo se les privó de suero, quedando en medio DMEM/F12 por 24 h. Transcurrido este tiempo se les cambió el medio y se les colocó medio DMEM/F12 fresco 1 h antes del ensayo para determinar los niveles de cAMP intracelular.

Los niveles de cAMP se determinaron mediante el kit ELISA desarrollado por Cayman Chemical Company. Los FCs fueron estimulados con vehículo, ISO, RvD1, RvD1+ISO por 10 min. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

Transcurrido el tiempo, se eliminó el medio de las células y se agregó 80  $\mu$ L de HCl 0,1 N cuidando de cubrir toda la placa. Luego de 20 min a temperatura ambiente, se rasparon las placas para despegar las células, se llevaron las muestras a tubos plásticos y se centrifugó (1000g) a 4° C. El sobrenadante se recuperó en un tubo plástico y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford [91]. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso. Para usar el kit, se utilizó el procedimiento descrito por el fabricante para lisados celulares [92].

### 5.7 Determinación de los niveles de RNAm de proteínas de adhesión y citoquinas mediante RTqPCR

FCs se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de  $3,5 \times 10^5$  células/placa y permanecieron en incubación por 24 h. Pasado este tiempo se les privó de suero, quedando en medio DMEM/F12 por 24 h. Transcurrido este tiempo se les cambió el medio y se les colocó medio DMEM/F12 fresco 1 h antes de los estímulos estudiados: LPS, Ang II, losartán, PD123319, losartán + Ag II (1 h después), PD123319 + Ang II (1 h después), RvD1, RvD1 + Ang II (1 h después), RvD1 + LPS (1 h después). Los estímulos fueron por 3 y 6 h.

#### 5.7.1 Extracción de RNA total

Finalizado el tiempo de estimulación se extrajo el RNA total de FCs mediante el método de extracción por afinidad en columnas de sílica-gel. Para ello, se adquirió el kit comercial E.Z.N.A.® Total RNA Kit I, de la empresa Omega-Biotek y se siguieron las instrucciones del fabricante. Primero se desechó el medio de cultivo celular y se agregaron 350  $\mu$ L de buffer de lisis TRK a cada placa. Inmediatamente, se procedió a raspar y recolectar el producto de lisis en un Eppendorf libre de RNAsa. Para lograr una óptima homogenización se succionó 10 veces con una jeringa desechable de 1mL (tuberculina). Luego se agregaron 350  $\mu$ L de etanol al 70% y se vortexeó por 10 segundos. En seguida, se transfirió la mezcla a una mini columna RNA HiBind® que ya estaba insertada en un tubo colector de 2mL y se centrifugó durante 1 min a 10.000 rcf. El RNA unido a la membrana de sílica se lavó con 500 $\mu$ L de RNA wash buffer I y se centrifugó a 10.000rcf por 1 min. Seguidamente, se realizaron dos lavados consecutivos utilizando 500 $\mu$ L de RNA wash buffer II con las mismas condiciones del primer lavado. Cuando el proceso de lavado culminó, se centrifugó la mini columna a velocidad máxima durante 2 min con el propósito de secarla completamente. Una vez seca, se transfirió a un nuevo tubo colector libre de RNAsa



y se eluyó el RNA en dos pasos consecutivos utilizando 40 y 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). En cada elución se centrifugó a velocidad máxima por 1 min.

#### 5.7.2 Purificación del RNAm

El proceso de digestión estuvo constituido por dos etapas. En la primera de ellas, 5 $\mu\text{g}$  de cada muestra de RNA, fueron incubadas a 37°C por 50 minutos con 2  $\mu\text{L}$  DNAsa, 5 $\mu\text{L}$  Buffer 10x y suficiente agua calidad PCR a fin de completar un volumen de 50  $\mu\text{L}$ . En la segunda etapa, se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,5M y se incubó a 75°C por 10 min con la finalidad de detener la acción de la enzima.

Una vez terminado el proceso de digestión, se determinó la pureza del RNA total midiendo la absorbancia de cada muestra a distintas longitudes de onda (260/280 y 260/230) en un espectrofotómetro Nanodrop DeNovix DS-11. La razón 260/280 se utilizó para determinar una posible contaminación con proteínas y se consideró como aceptable un valor mayor a 1,7. El índice 260/230 se utilizó para determinar contaminación con sales y compuestos fenólicos, y para un RNA puro su valor óptimo debería ser menor a 1,5. Por lo tanto, las muestras fueron aceptadas cuando cumplían ambos criterios.

#### 5.7.3 Electroforesis de RNA en gel de agarosa

Con la finalidad de verificar la integridad del RNA total en las muestras post digestión y descartar aquellas que presentaran degradación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). En cada carril se cargaron 2,5  $\mu\text{L}$  de muestra más 1  $\mu\text{L}$  de buffer de carga para RNA. En seguida, se realizó la separación electroforética a 100V por 15 minutos, empleando como buffer de corrida TAE (Tris, acetato y EDTA). Una vez terminada la separación, los geles fueron sumergidos en una solución reveladora compuesta por 100 mL de TAE y 10  $\mu\text{L}$  de Gel Red 10.000x a temperatura ambiente por 25 minutos. Luego los geles fueron fotografiados sobre un transluminador UV Dyna Light utilizando una cámara Olympus modelo NOC-5060. Las muestras fueron almacenadas a -80°C a la espera de su siguiente procesamiento.

#### 5.7.4. Síntesis de cDNA

Se realizó la reacción de transcripción reversa a cada una de las muestras para obtener cDNA utilizando el kit comercial 5X *All-in-one* RT Master Mix, de la empresa Applied Biological Materials. La reacción se llevó a cabo en presencia de 0,5 $\mu\text{g}$  del RNA total, 4 $\mu\text{L}$  de Master Mix, 1,6  $\mu\text{L}$  50mM de  $\text{MgCl}_2$  y suficiente agua calidad PCR para un volumen final de 20 $\mu\text{L}$ . Una vez preparada cada reacción, se

colocaron en el termociclador G-Storm Modelo GS00482 y se incubaron a 25°C durante 10 min. Luego se realizó la reacción de transcripción reversa a 42°C por 15 min y finalmente, para detener la reacción, la enzima fue desnaturada incubando el producto de la reacción a 85°C durante 5 min. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso en los ensayos de qPCR.

### 5.7.5 Diseño de partidores específicos

Para las reacciones de PCR en tiempo real, previamente se diseñaron partidores específicos para cada gen en estudio a partir de las secuencias de genes disponibles en GenBank (NCBI, NIH). La fabricación de cada par de partidores (tabla 1) fue solicitada a la empresa Eurogentec (Seraing, Bélgica).

Tabla 1. Características y secuencias de los partidores para citoquinas y proteínas de adhesión

GEN	Nº DE ACCESO (GenBank)	ORIENTACIÓN	SECUENCIA DE PARTIDORES	TAMAÑO DEL PRODUCTO
<b><math>\beta</math>-tubulina</b>	NM_173102.2	Sentido	5' -ACC-GTA-GCC-ATG-AGG-GAA-AT- 3'	180pb
		Antisentido	5' -GCC-ACC-TGT-AGC-TTC-ATT-GT- 3'	
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	NM_031512.2	Sentido	5' -TCC-CAT-TAG-ACA-GCT-GCA-CT- 3'	174pb
		Antisentido	5' -GCC-ACA-GGG-ATT-TTG-TCG-TT- 3'	
<b>IL-6</b>	NM_012589.2	Sentido	5' -AGC-CAG-AGT-CAT-TCA-GAG-CA- 3'	161pb
		Antisentido	5' -GTT-GGA-TGG-TCT-TGG-TCC-TT- 3'	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	NM_012675.3	Sentido	5' -AGC-TGT-CTT-CAG-GCC-AAC-AT- 3'	174pb
		Antisentido	5' -ACA-GCC-TGG-TCA-CCA-AAT-CA- 3'	
<b>IL-10</b>	NM_012854.2	Sentido	5' -AGC-AAA-GGC-CAT-TCC-ATC-CG- 3'	194pb
		Antisentido	5' -AAG-GCT-TGG-CAA-CCC-AAG-TA- 3'	
<b>MCP-1</b>	NM_031530.1	Sentido	5' -ACC-ACT-ATG-CAG-GTC-TCT-GT- 3'	157pb
		Antisentido	5' -AGT-TCT-CCA-GCC-GAC-TCA-TT- 3'	
<b>ICAM-1</b>	NM_012967.1	Sentido	5' -ATC-GGG-ATG-GTG-AAG-TCT-GT- 3'	168pb
		Antisentido	5' -GAA-GCC-CGC-AAT-GAT-CAG-TA- 3'	
<b>VCAM-1</b>	NM_012889.1	Sentido	5' -TTG-AGC-AGG-TCA-GGT-TCA-CA- 3'	180pb
		Antisentido	5' -ACA-CCG-GGA-AAG-CTC-TTG-TT- 3'	

Una vez adquiridos, los partidores liofilizados fueron reconstituidos para obtener una concentración 100 $\mu$ M y diluyeron para su uso a una concentración de 4 $\mu$ M. La concentración de partidores utilizada para los ensayos posteriores de qPCR fue 1 $\mu$ M, según las recomendaciones del fabricante.

Cabe señalar que aunque IL-1 $\beta$  no estaba dentro de lo propuesto inicialmente en esta tesis, igualmente se incorporó a las citoquinas analizadas.

### 5.7.6. Estandarización de partidores mediante curva de fusión

A continuación, se procedió a realizar una curva de disociación (curva de fusión) para cada par de

partidores, con el objetivo de comprobar la amplificación específica del producto de interés y descartar la existencia de dímeros de partidores o uniones a sitios inespecíficos. Para ello, se hicieron ensayos qPCR a distintas temperaturas de alineamiento 55, 58, 60 y 65°C. El análisis del punto de fusión (del inglés *melting point*) deriva de la observación de la temperatura a la que la doble cadena de DNA se desnaturaliza, lo que es dependiente de su longitud y composición de nucleótidos, lo cual producirá un único peak si la amplificación genera solo un producto durante la qPCR [93].

#### 5.7.7. Eficiencia de amplificación

Para obtener comparaciones válidas entre diferentes muestras evaluadas en este ensayo, es importante determinar la eficiencia de amplificación. Esta eficiencia se estableció a partir de una curva estándar, utilizando diluciones seriadas de cDNA obtenido de una muestra control. Se realizaron diluciones seriadas de esta muestra por un factor de 10 en KCl al 0,001% (p/v) y se sometieron a qPCR en tiempo real, del cual se obtuvieron los valores de Ct que permiten calcular la eficiencia  $E$  de la reacción. Ct (del inglés *threshold cycle*) corresponde al número de ciclos en el cual la fluorescencia detectada es significativamente mayor al nivel umbral, es decir, supera la fluorescencia basal. Esquematizando los valores Ct por el logaritmo de cada dilución, se generará un gráfico cuya pendiente está relacionada con la eficiencia de la reacción. La pendiente de esta línea y la eficiencia de amplificación pueden relacionarse por la ecuación  $E = 10^{(-1/pendiente)}$  donde  $E$  es la eficiencia de la reacción; y *pendiente* se refiere a la pendiente del gráfico de valores de Ct versus el logaritmo de la cantidad de templado inicial. Una pendiente entre -3,6 y -3,1 corresponde a una eficiencia entre 90% a 110% [93] [94].

#### 5.7.8. PCR en tiempo real (qPCR)

La reacción de PCR se realizó a un volumen final de 20 $\mu$ L, de los cuales 10 $\mu$ L correspondieron a Takyon Rox SYBR-Green Master Mix dTTP blue de la empresa Eurogentec, el cual está constituido por la enzima Takyon™ DNA polimerasa, SYBR-Green®, MgCl<sub>2</sub> 2,5mM y dNTPs. A la anterior mezcla se le agregó 1 $\mu$ L de cada partidor (sentido y antisentido), 5,5 $\mu$ L de agua calidad PCR y 2,5 $\mu$ L de cDNA diluido (1:20). El procesamiento de las muestras se realizó en un termociclador modelo MxPro-Mx 3000P (Stratagene, USA). Cada condición experimental se analizó en triplicado tanto para el gen de expresión constitutiva  $\beta$ -Tubulina como para el gen de interés. Con el objeto de descartar una posible contaminación externa en la mezcla de reacción que pudiese aumentar inespecíficamente la fluorescencia registrada por el equipo, se utilizó un control negativo sin templado (NTC: *No Template Control*) y para descartar contaminación del mRNA con DNA genómico se utilizó un control con RNA como templado

(No RT: *No Reverse Transcription Control*).

Para el proceso de amplificación se empleó un protocolo de temperaturas recomendado por el fabricante, con 3 min de denaturación inicial a 95°C para activar la enzima, luego 40 ciclos consecutivos de 10 segundos de denaturación a 95°C seguido de 1 min de alineamiento a la temperatura óptima de los partidores (60°C) y 20 seg a 72°C para la extensión (tabla 2).

Tabla 2. Condiciones de amplificación para RTqPCR

SEGMENTO	CICLOS	PROCESO	TEMPERATURA – TIEMPO
1	1	Activación	95°C – 3 minutos
2	40	Denaturación	95°C – 10 segundos
		Alineamiento	60°C – 1 minuto
		Extensión	72°C – 20 segundos
3	1	Curva de Fusión	95°C – 30 segundos
			60°C – 30 segundos
			95°C – 30 segundos

La intensidad de fluorescencia emitida debido a la unión entre la doble hebra formada y el reactivo SYBR-Green al final de cada ciclo de extensión (segmento 2), refleja la cantidad de productos formados. Para determinar la especificidad de estos productos, se agregó al final de la reacción de PCR un ciclo adicional llamado curva de fusión o de *melting* en donde las muestras se denaturaron durante 30 seg a 95°C, se hibridaron a 60°C durante 30 seg y durante 10 minutos se realizó un aumento gradual de la temperatura (0,02°C por segundo) hasta alcanzar 95°C por 30 seg. La finalidad de la aplicación de un gradiente de temperatura creciente, es evaluar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados y determinar la  $T_m$  (temperatura de *melting*) de los amplicones con el objetivo de comprobar su especificidad. Esta  $T_m$  debe corresponder a una curva con un único máximo, que es específico para cada producto génico [94].

#### 5.7.9. Análisis de los cambios en los niveles de mRNA

Las cuantificaciones de cada gen se llevaron a cabo utilizando el método matemático de cuantificación relativa normalizada. Este método se basa en el modelo delta-delta Ct desarrollado por PE Applied Biosystems. Para ello, los valores obtenidos de Ct para cada gen de interés se normalizaron con los valores de Ct obtenidos para el gen constitutivo ( $\beta$ -Tubulina) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Razón de expresión} = \frac{\text{E gen de interés}^{\Delta C_T (\bar{x} \text{ control} - \bar{x} \text{ estímulos})}}{\text{E gen de referencia}^{\Delta C_T (\bar{x} \text{ control} - \bar{x} \text{ estímulos})}}$$

La eficiencia de la reacción se consideró como máxima (100%) si todo el cDNA blanco disponible se

duplica en un ciclo de amplificación, en cuyo caso se presume que el valor exponencial de E es 2,0 [95]. Cuando la razón de expresión es igual a uno, significa que no existen cambios en la expresión del gen de interés en las condiciones con estímulo farmacológico versus a la condición control. Un valor por encima de uno, refleja sobre-expresión y por debajo del mismo indica disminución en la expresión relativa del gen de interés.

#### 5.8 Medición de citoquinas secretadas por luminex

FCs se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de  $3,5 \times 10^5$  células/placa y permanecieron en incubación por 24 h. Pasado este tiempo se les privó de suero, quedando en medio DMEM/F12 por 24 h. Transcurrido este tiempo se les cambió el medio y se les colocó medio DMEM/F12 fresco 1 h antes de los estímulos estudiados: LPS, Ang II, RvD1, losartán, PD1233319, losartán + Ag II (1 h después), PD1233319 + Ang II (1 hora después), RvD1+ Ang II (1 hora después), Ang II + RvD1 (1 h después), RvD1 + LPS (1 h después). Los estímulos fueron por 24 h y pasado este tiempo, los medios de cultivo de cada placa fueron recolectados en tubos eppendorf y centrifugados a 10 000 rpm durante 15 min. Los sobrenadantes se recuperaron y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

El perfil de citoquinas secretados por FCs 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 pg/ $\mu\text{g}$  proteína.

#### 5.9 Ensayo de adhesión de SMC a FCs (tinción con cristal violeta)

FCs se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de 50 000 células/placa y permanecieron en incubación por 24 h. Pasado este tiempo se les privó de suero, quedando en medio DMEM/F12 por 24 h. Transcurrido este tiempo se les cambió el medio y se les colocó medio DMEM/F12 fresco 1 h antes de los estímulos estudiados: LPS, Ang II, RvD1, losartán + Ag II (1 h después), PD1233319 + Ang II (1 h después), RvD1+ Ang II (1 h después), Ang II + RvD1 (1 h después), RvD1 + LPS (1 hora después). Los estímulos fueron por 24 h.

### 5.9.1 Aislamiento de monocitos desde bazo

Para obtener células mononucleares de bazo (SMC), principalmente linfocitos y monocitos), se diseccionaron bazos de ratas Sprague Dawley de la cavidad abdominal y se recibieron en una placa con 4 mL de PBS estéril y luego se trituraron y filtraron a través de un tamiz de disociación celular (tamaño de poro: 380  $\mu$ m) hasta obtener una suspensión homogénea. Para separar y poder eliminar los granulocitos y los eritrocitos, se usó Ficoll-Histopaque® 1083 en una proporción 1: 1 respecto de la solución obtenida en la suspensión celular, y luego se centrifugó en una centrífuga basculante con un rotor a 180 ° a temperatura ambiente durante 30 min y 400 g. La interfaz rica en SMC se recibió y se lavó dos veces con PBS. Finalmente, los SMC purificados se centrifugaron y se resuspendieron en PBS / FBS al 3%, para el experimento posterior.

### 5.9.2 Co-cultivo y tinción con cristal violeta

Los FCs después del estímulo correspondiente por 24 h, se les retiró el medio de cultivo y se lavaron una vez con PBS estéril. Luego se les colocó 1mL de medio DMEM-F12. Se añadieron SMC a las placas en una proporción de 5: 1 (SMC: FCs) y se incubaron durante dos h. Los medios se eliminaron y las placas se lavaron suavemente dos veces con PBS estéril. Se añadió 500  $\mu$ l de cristal violeta (5 mg / ml, MeOH al 20%) y se dejó actuar durante 20 min. Pasado el tiempo, las placas se lavaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente hasta que se analizaron por microscopía óptica.

Con las imágenes obtenidas, se contaron tanto los FCs observados en cada una de ellas como los SMC adheridos a los FCs.

### 5.10 Análisis estadísticos

Todos los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM de al menos cinco experimentos. Cada réplica se consideró como un experimento biológico independiente pues en cada una de estas los FCs provinieron de un animal diferente. Las diferencias entre los grupos analizados se analizaron con un ANOVA unidireccional seguido de una prueba de Tukey para comparar los efectos de las condiciones en estos parámetros. La significancia fue aceptada en  $p < 0.05$ . Se utilizó GraphPad Prism Software 6.0 para los cálculos estadísticos y realizar las representaciones gráficas de los resultados.

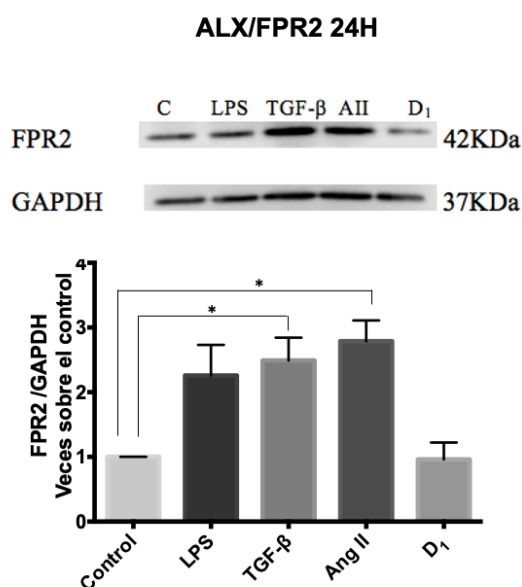
## 6. RESULTADOS

6.1 Resultados del objetivo específico 1: Evaluar en FCs de rata los efectos de RvD1 sobre los segundos mensajeros cAMP y  $Ca^{+2}$  asociados a la activación de los receptores ALX/FPR2.

### 6.1.1 Presencia del receptor ALX/FPR2

Se determinó la presencia de receptores ALX/FPR2 en FCs de rata adulta en muestras de proteínas obtenidas tras lisado celular. La detección se llevó a cabo mediante WB. Además, se determinó si los niveles del receptor se modificaban por efecto de la RvD1 misma o frente a estímulos proinflamatorios (LPS y Ang II) o profibróticos (Ang II y TGF- $\beta$ ).

Los resultados obtenidos (Figura 3), muestran que en FCs de rata adulta se detectó la presencia de la proteína ALX/FPR2 y que Ang II y TGF- $\beta$  inducen un aumento significativo en sus niveles de expresión. El estímulo con LPS mostró una tendencia al aumento en la expresión del receptor; sin embargo, esta no llegó a ser estadísticamente significativa.

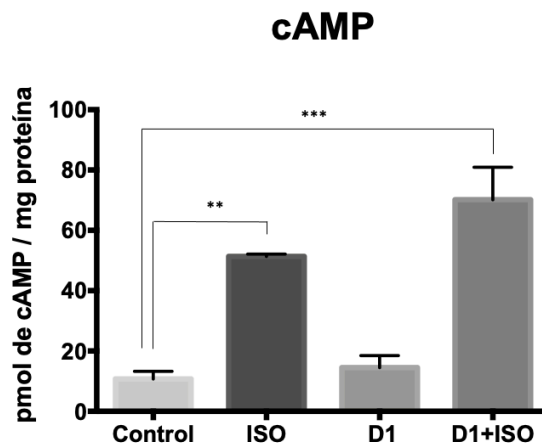


**Figura 3. Expresión de receptores ALX/FPR2 en fibroblastos cardíacos de rata adulta.** FCs se estimularon con LPS (1  $\mu$ g/mL), Ang II (1 $\mu$ M), TGF- $\beta$  (10ng/mL) y RvD1 (D1; 0,1  $\mu$ M) durante 24 horas y se determinaron los niveles proteicos de ALX/FPR2 mediante Western Blot. En la parte superior se muestra una imagen representativa de las bandas y en la parte inferior el análisis gráfico. Los resultados se expresan como promedio ( $\pm$  SEM) de 5 experimentos independientes.\*  $p < 0,05$ .

## 6.1.2 Funcionalidad del receptor

### 6.1.2.1 Efecto sobre los niveles de cAMP intracelular

Se determinó el efecto de RvD1 sobre los niveles intracelulares de cAMP. FCs fueron incubados 10 minutos con RvD1 (0,1  $\mu\text{M}$ ) en presencia/ausencia de ISO 10  $\mu\text{M}$  (usado como control positivo). Los resultados obtenidos (Figura 4) muestran que, por sí sola, la RvD1 no produjo cambio de los niveles de cAMP intracelular. Además, RvD1 mostró una tendencia a potenciar la respuesta inducida por ISO.



**Figura 4. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de cAMP intracelular en FCs de rata adulta.** FCs privados de suero fueron incubados 10 minutos en diferentes condiciones: control (vehículo de la solución de RvD1(D1), isoproterenol (ISO) 10 $\mu\text{M}$ , RvD1 0,1 $\mu\text{M}$ , RvD1 + ISO (10 minutos después). Se midieron los niveles de cAMP por inmunoensayo kit ELISA. Los resultados representan 5 experimentos independientes expresados como la media  $\pm$  SEM, \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### 6.1.2.2 Efecto sobre los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

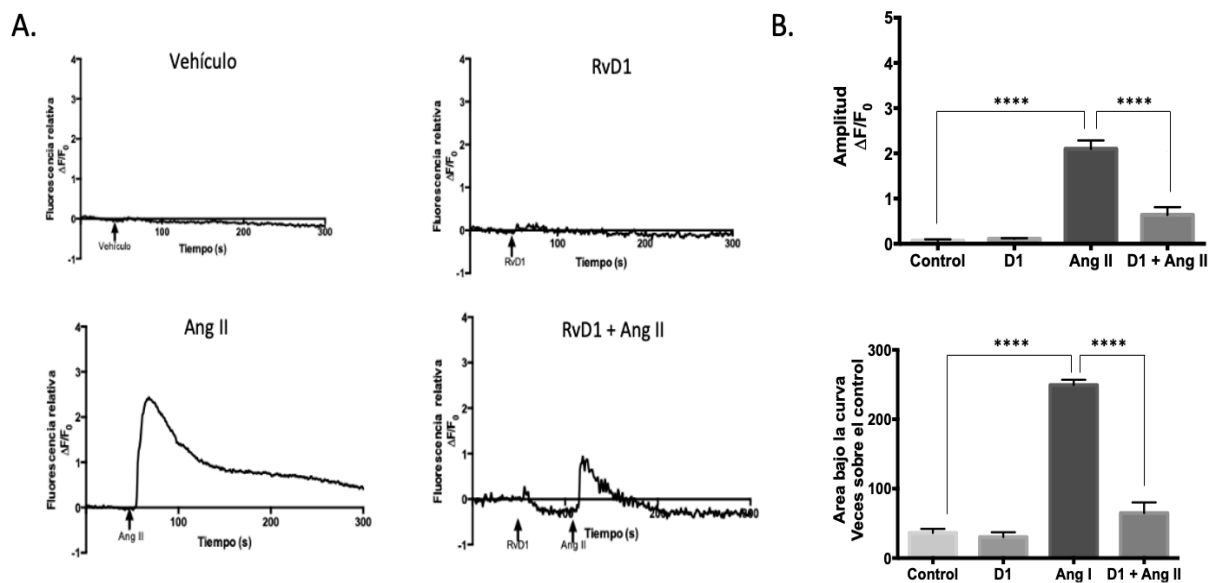
Para evaluar el efecto de RvD1 sobre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático y nuclear se utilizó microscopía confocal, preincubando las células con sonda FLUO-4AM (4,4  $\mu\text{M}$ ), sonda sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  que permite identificar movimientos o incrementos relativos del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Se estimuló con control (vehículo de la RvD1), RvD1, Ang II (como control positivo) y RvD1, 1 minuto previo al estímulo con Ang II. A nivel citoplasmático y nuclear (Figuras 5 y 6) respectivamente, la RvD1 por sí sola no produjo cambios significativos en la fluorescencia relativa correspondiente a una señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que se refleja en que no hubo cambios respecto al control en los parámetros de área bajo la curva y amplitud de la señal.



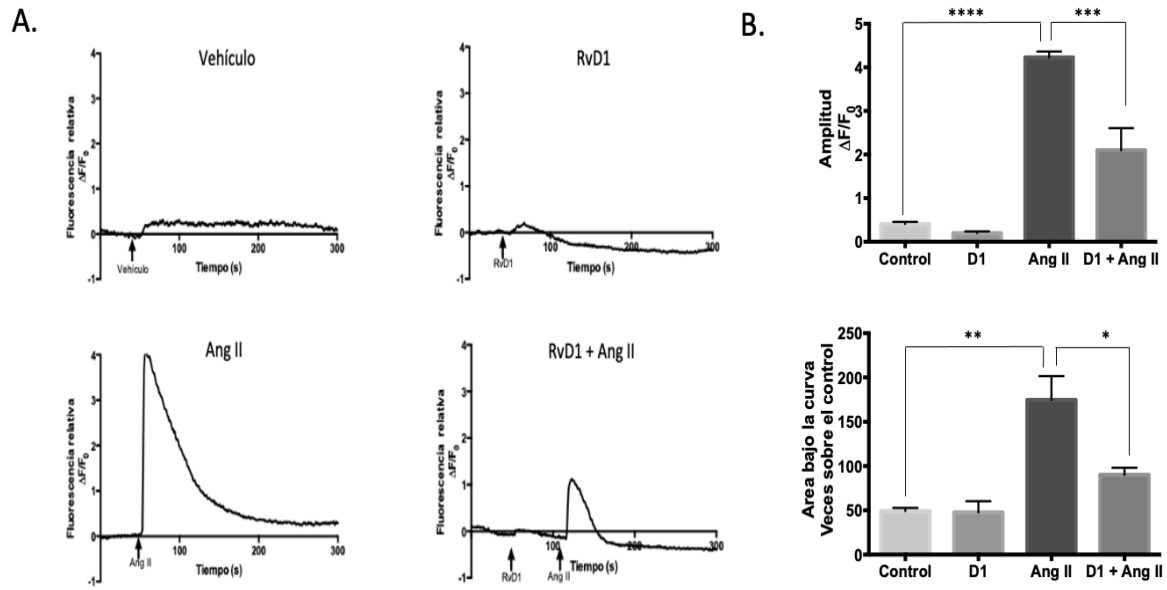
Ang II produjo, respecto al control, un aumento significativo en la fluorescencia relativa de la señal de  $\text{Ca}^{+2}$ , lo que a su vez se vio reflejado en aumento significativo en la amplitud y área bajo la curva. Esto tanto a nivel citoplasmático como nuclear.

Por otra parte, al estimular con RvD1 y un minuto después agregar Ang II, se obtuvo una disminución de la señal de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular citoplasmática y nuclear inducida por Ang II, e igualmente disminución en la amplitud de la señal y del área bajo la curva con respecto al estímulo de Ang II.

Además, se realizaron ensayos utilizando el WRW4, antagonista del receptor ALX/FPR2, con el objetivo de comprobar que los efectos de la RvD1 sobre los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático y nuclear estaban mediados por acción de la RvD1 sobre su receptor. Los resultados obtenidos (Anexo 2, Figura 40) no permitieron dilucidar esto, pues el WRW4 por sí mismo aumentó los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$ .



**Figura 5. Efecto de RvD1 en la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático en FCs de rata adulta.** FCs fueron incubados por 30 minutos con sonda FLUO-4AM y luego estimulados con vehículo, Ang II (0,1  $\mu\text{M}$ ), RvD1 (D1; 0,1  $\mu\text{M}$ ), RvD1 1 min antes de Ang II. A) Imágenes representativas de las cinéticas de  $\text{Ca}^{+2}$  B) Análisis gráfico de los datos de amplitud (izquierda) y área bajo la curva (derecho) de la curva de fluorescencia relativa. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5), donde 2 células fueron analizadas en cada n. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM. \*\*\*\*p<0,0001.



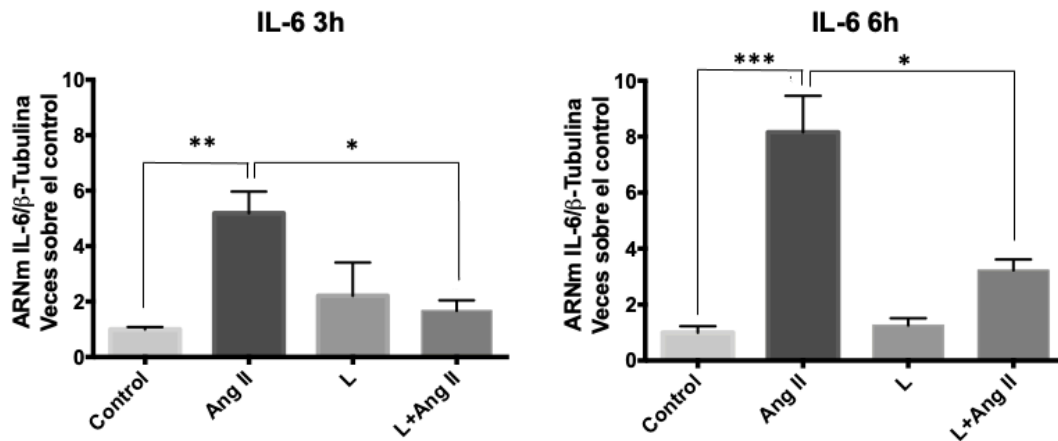
**Figura 6. Efecto de RvD1 en la liberación de  $Ca^{+2}$  nuclear de fibroblastos cardíacos de rata adulta.** FCs fueron incubados por 30 minutos con sonda FLUO-4AM y luego estimulados con vehículo, Ang II (0,1  $\mu$ M), RvD1 (D1; 0,1  $\mu$ M), RvD1 1 min antes de Ang II. A) Imágenes representativas de las cinéticas de  $Ca^{+2}$  B) Análisis gráfico de los datos de amplitud (izquierda) y área bajo la curva (derecho) de la curva de fluorescencia relativa. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5), donde 2 células fueron analizadas en cada n. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .

6.2. Resultados del objetivo específico 2: Determinar el efecto de RvD1 sobre la expresión de proteínas de adhesión ICAM-1, VCAM-1, la expresión/secreción de las citoquinas IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  y la adhesión de monocitos inducidos por Ang II en FCs de rata.

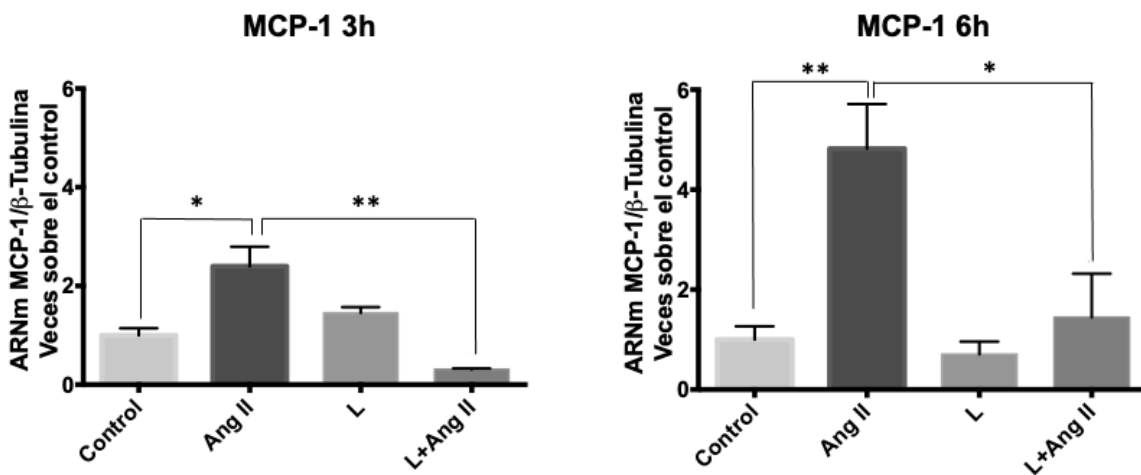
6.2.1. Efecto de Ang II sobre niveles de RNAm de citoquinas y proteínas de adhesión:

Los FCs fueron tratados con diferentes estímulos durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se extrajo el RNA para posteriormente llevar a cabo una retrotranscripción y obtener el cDNA a partir del cual se llevó a cabo la RTqPCR, la cual permitió determinar Los niveles de mRNA de los genes de interés, en este caso, los genes de las citoquinas y proteínas de adhesión en estudio.

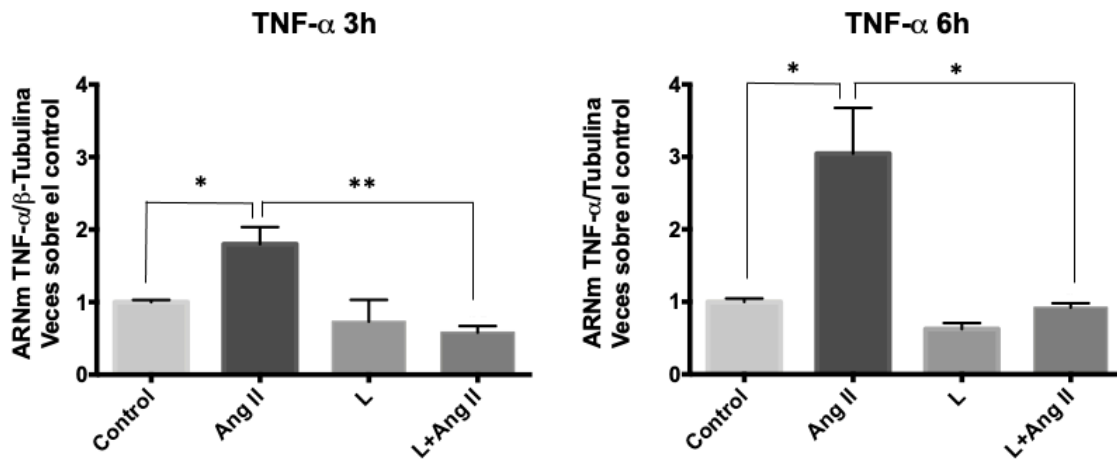
En los resultados obtenidos se observa que Ang II aumentó significativamente los niveles de mRNA de IL-6 (Figura 7), MCP-1 (Figura 8), TNF- $\alpha$  (Figura 9), tanto a las 3 como a las 6 horas; y el pretratamiento con losartán previno este efecto. Por otra parte, Ang II no modificó los niveles de mRNA de ICAM-1 y VCAM-1 (Figuras 10 y 11) ni de IL-10, IL-1 $\beta$  (Figura S1 y S7).



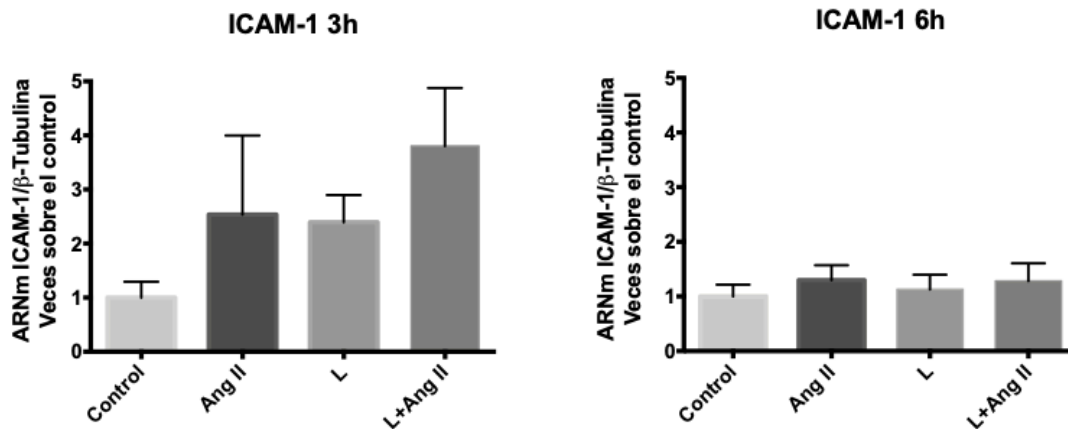
**Figura 7.** Niveles de mRNA de IL-6 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs. FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con Ang II (1 $\mu$ M), Losartán (1 $\mu$ M), Losartán (1 $\mu$ M) + Ang II (1 $\mu$ M) una hora después. Los valores relativos de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM. \*p<0,05, \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001.



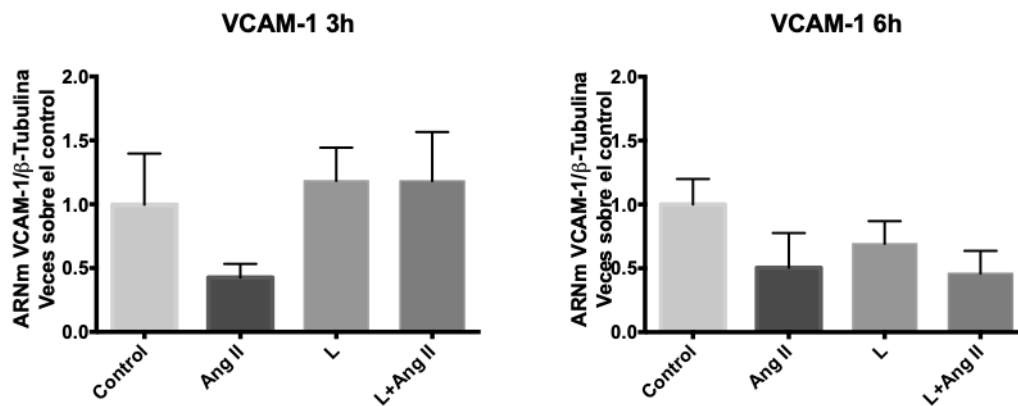
**Figura 8.** Niveles de mRNA de MCP-1 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs. FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con Ang II (1 $\mu$ M), Losartán (1 $\mu$ M), Losartán (1 $\mu$ M) + Ang II (1 $\mu$ M) una hora después. Los valores relativos de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM. \* p<0,05 y \*\*p<0,01.



**Figura 9. Niveles de mRNA de TNF- $\alpha$  en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs.** FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con Ang II ( $1\mu\text{M}$ ), Losartán ( $1\mu\text{M}$ ), Losartán ( $1\mu\text{M}$ ) + Ang II ( $1\mu\text{M}$ ) una hora después. Los valores relativos de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes ( $n=5$ ) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM. \* $p<0,05$  vs control; \*\* $p<0,01$ .



**Figura 10. Niveles de mRNA de ICAM-1 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs.** FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con Ang II ( $1\mu\text{M}$ ), Losartán ( $1\mu\text{M}$ ), Losartán ( $1\mu\text{M}$ ) + Ang II ( $1\mu\text{M}$ ) una hora después. Los valores relativos de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes ( $n=5$ ) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM.

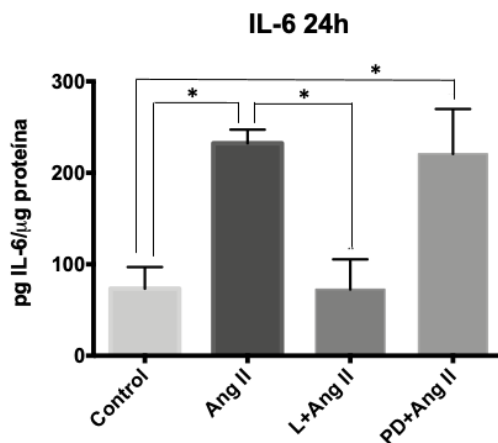


**Figura 11.** Niveles de mRNA de VCAM-1 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs en FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con Ang II (1 $\mu$ M), Losartán (1 $\mu$ M), Losartán (1 $\mu$ M) + Ang II (1 $\mu$ M) una hora después. Los valores relativos de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM.

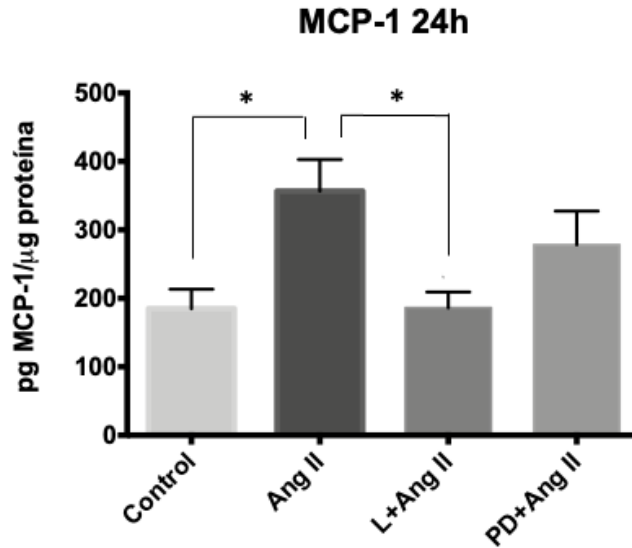
### 6.2.2 Efecto de Ang II sobre la secreción de citoquinas:

Los FCs fueron tratados con diferentes estímulos durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se recuperó el medio de cultivo y se midió el perfil de citoquinas secretadas mediante LUMINEX ELISA.

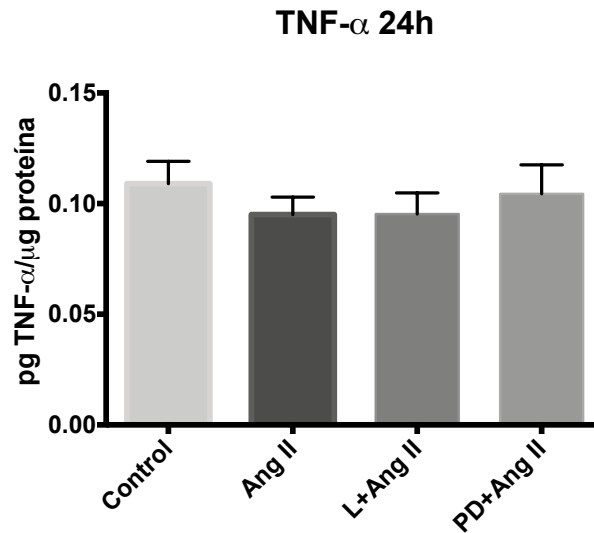
En los resultados obtenidos se observa que Ang II aumentó significativamente los niveles secretados de IL-6 (Figura 12) y MCP-1 (Figura 13), y no modificó los niveles de TNF- $\alpha$  (Figura 14) e IL-10 (Figura S2), respecto al control. Además, se puede ver que el aumento que indujo Ang II sobre IL-6 y MCP-1 fue disminuido de forma significativa al tratar con losartán previo al estímulo con Ang II, y no hubo disminución con el pretratamiento con PD123319 (antagonista AT2R).



**Figura 12.** Niveles de secreción de IL-6 en FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24 horas. FCs fueron estimulados con Ang II 1 $\mu$ M en presencia y ausencia de Losartán 1 $\mu$ M y PD123319 1 $\mu$ M). Los antagonistas fueron agregados 1 hora antes del estímulo con Ang II. Los valores de IL-6 se obtuvieron en pg por  $\mu$ g de proteína de cada muestra. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de 7 experimentos independientes. \*  $p < 0,05$ .



**Figura 13. Niveles de secreción de MCP-1 en FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24 horas.** FCs fueron estimulados con Ang II 1μM en presencia y ausencia de Losartán 1μM y PD123319 1μM (. Los antagonistas fueron agregados 1 hora antes del estímulo con Ang II. Los valores de MCP-1 se obtuvieron en pg por μg de proteína de cada muestra. Los resultados representan el promedio ± SEM de 7 experimentos independientes. \* p<0,05.

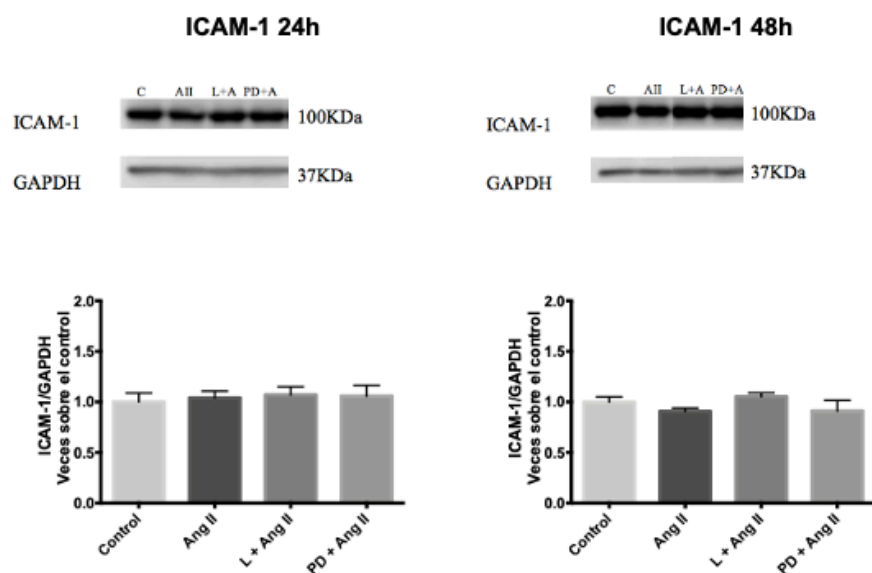


**Figura 14. Niveles de secreción de TNF-α en FCs de rata adulta estimulados durante 24 horas.** FCs fueron estimulados con Ang II 1μM en presencia y ausencia de Losartán 1μM y PD123319 1μM. Los antagonistas fueron agregados 1 hora antes del estímulo con Ang II. Los valores de TNF-α se obtuvieron en pg por μg de proteína de cada muestra. Los resultados representan el promedio ± SEM de 7 experimentos independientes.

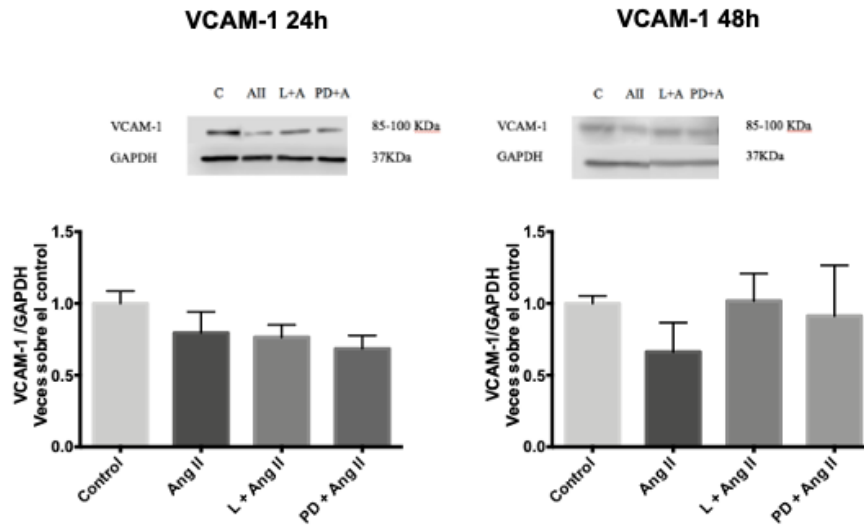
### 6.2.3 Efecto de Ang II sobre niveles de proteínas de adhesión:

Los FCs fueron tratados con diferentes estímulos durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se lisaron las células y se recuperaron las proteínas, las cuales se separaron mediante electroforesis y su detección se llevó a cabo mediante inmunoblot.

En los resultados obtenidos se observa que Ang II no modificó los niveles de ICAM-1 (Figura 15) y VCAM-1 (Figura 16). Tanto losartán como PD 123319, no mostraron efectos.



**Figura 15.** Niveles de proteína ICAM-1 determinada en lisados celulares de FCs de rata adulta estimulados con Ang II en presencia y ausencia de losartán y PD123319 durante 24 y 48 horas. FCs fueron estimulados con Ang II 1 $\mu$ M en presencia y ausencia de Losartán 1 $\mu$ M y PD123319 1 $\mu$ M. Los antagonistas fueron agregados 1 hora antes del estímulo con Ang II. Los valores de ICAM-1 fueron determinados mediante Western Blot y se expresaron como veces sobre el control sin tratar. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de 5 experimentos independientes.

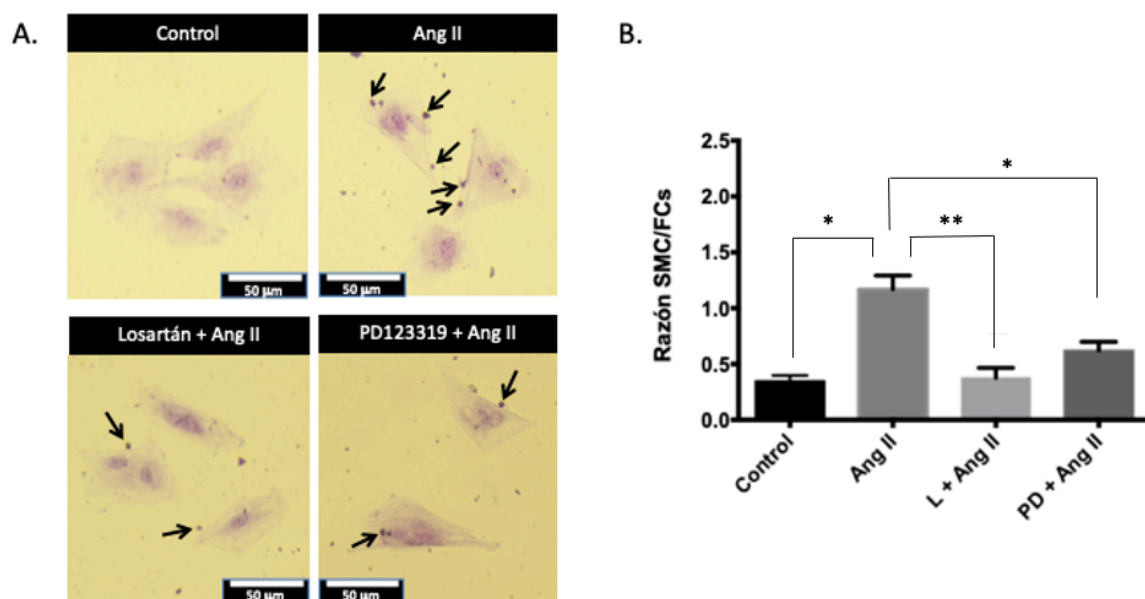


**Figura 16. Niveles de proteína VCAM-1 determinada en lisados celulares de FCs de rata adulta estimulados con Ang II en presencia y ausencia de losartán y PD123319 durante 24 y 48 horas.** FCs fueron estimulados con Ang II  $1\mu\text{M}$  en presencia y ausencia de Losartán  $1\mu\text{M}$  y PD123319  $1\mu\text{M}$ . Los antagonistas fueron agregados 1 hora antes del estímulo con Ang II. Los valores de VCAM-1 fueron determinados mediante Western Blot y se expresaron como veces sobre el control sin tratar. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes.

#### 6.2.4 Efecto de Ang II sobre la adhesión de SMC a FCs:

Los FCs fueron estimulados con Ang II  $1\mu\text{M}$  durante 24 horas en presencia y ausencia de losartán o PD123319. Posteriormente se retiró el estímulo y los FCs se incubaron durante 2 horas con SMC en una relación 5 SMC: 1 FC. Los resultados obtenidos (Figura 17) muestran que Ang II aumenta significativamente la adhesión de SMC a los FCs. El efecto producido por Ang II fue contrarrestado significativamente con el pretratamiento con losartán y también con el pretratamiento con PD123319.

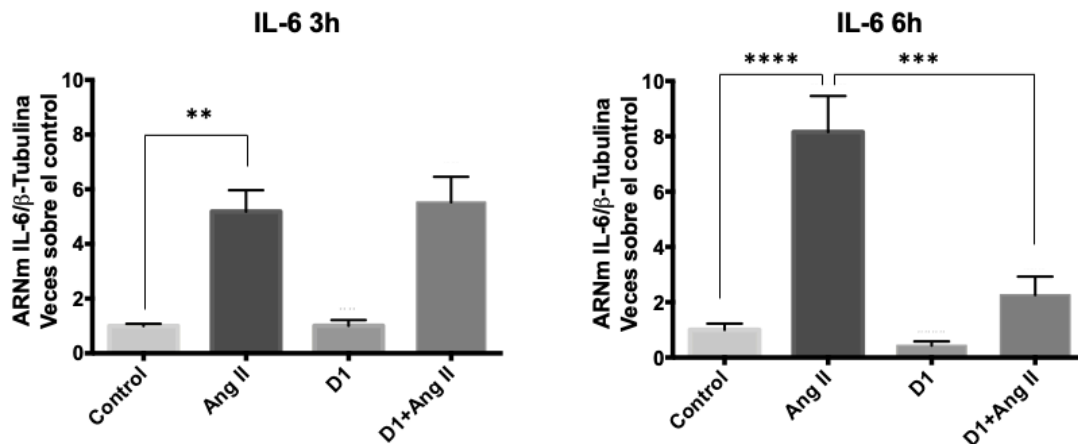




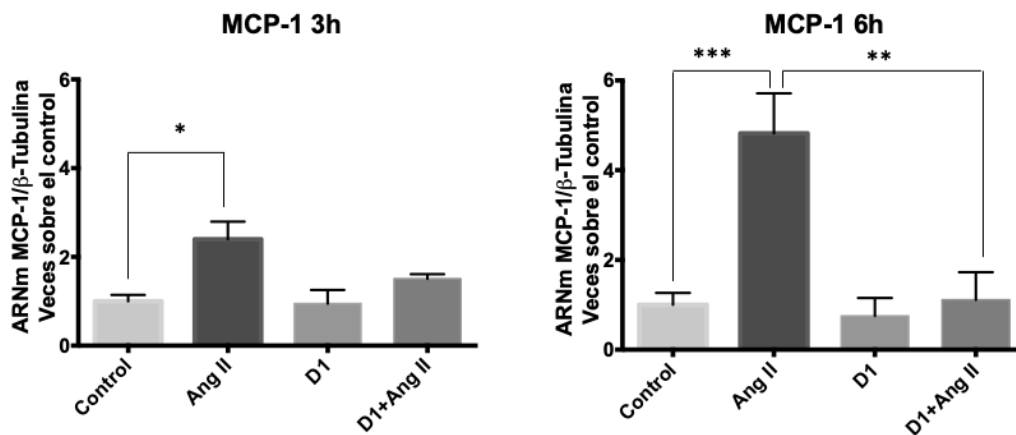
**Figura 17. Efecto de Ang II sobre la adhesión de SMC a FCs de rata adulta.** FCs de rata fueron estimulados con Ang II 1 $\mu$ M en presencia y ausencia de Losartán 1 $\mu$ M y PD123319 1 $\mu$ M. Los antagonistas fueron agregados 1 hora antes del estímulo con Ang II. A. Imágenes representativas de la adhesión de SMC a FCs con cada uno de los estímulos. Las flechas negras señalan SMC adheridos a FCs. B. Análisis gráfico de la razón de adhesión de SMC/FCs. Los resultados muestran la media  $\pm$  SEM para tres experimentos independientes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

#### 6.2.5 Efecto de RvD1 sobre los niveles de mRNA de citoquinas y proteínas de adhesión gatillados por Ang II en FCs:

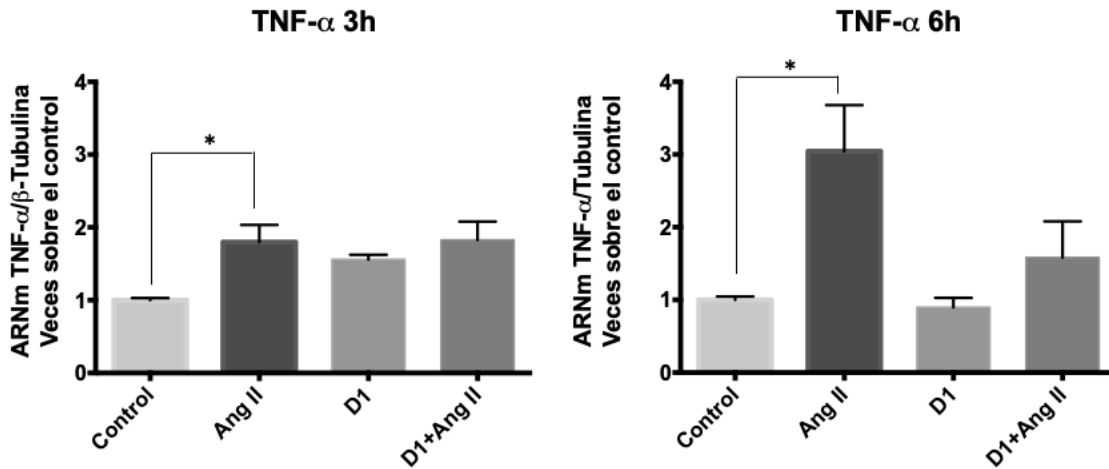
En los resultados obtenidos se observa que RvD1 previene el aumento del mRNA de IL-6 (Figura 18) y MCP-1 (Figura 19) a las 6 horas post estímulo. Por otra parte, RvD1 no previno el aumento de mRNA de TNF- $\alpha$  en ninguno de los tiempos observados (Figura 20). Con respecto a IL-10 (Figura S3), IL-1 $\beta$  (Figura S8), ICAM-1 (Figura 21) y VCAM-1 (Figura 22), se puede observar que Ang II no produjo cambios significativos en los niveles de mensajeros de estas citoquinas y proteínas de adhesión y RvD1 no ejerce ningún cambio significativo sobre lo observado con Ang II. Además, RvD1 por sí misma no modifica los niveles de mRNA de ninguna de las citoquinas o proteínas de adhesión en estudio.



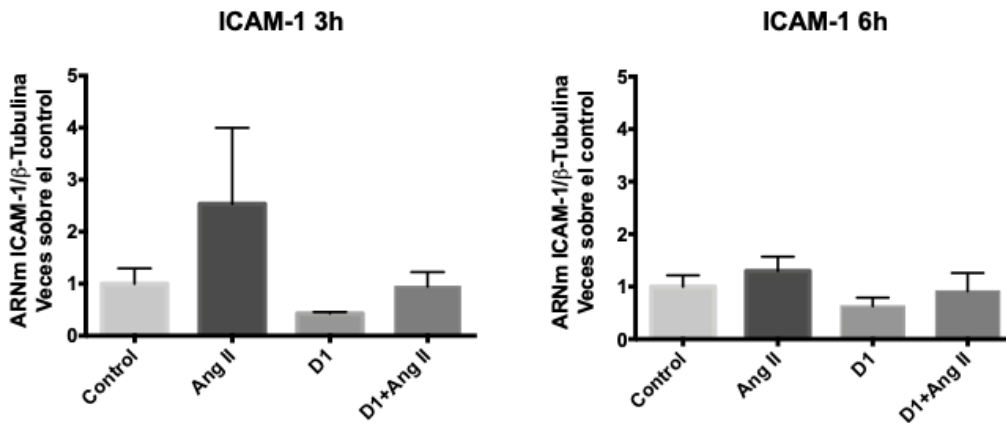
**Figura 18.** Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de IL-6 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs. FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con Ang II (1 $\mu$ M), RvD1 (100nM), RvD1 (D1; 100nM) + Ang II (1 $\mu$ M) una hora después. Los valores relativos de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 y \*\*\*\*p<0,0001.



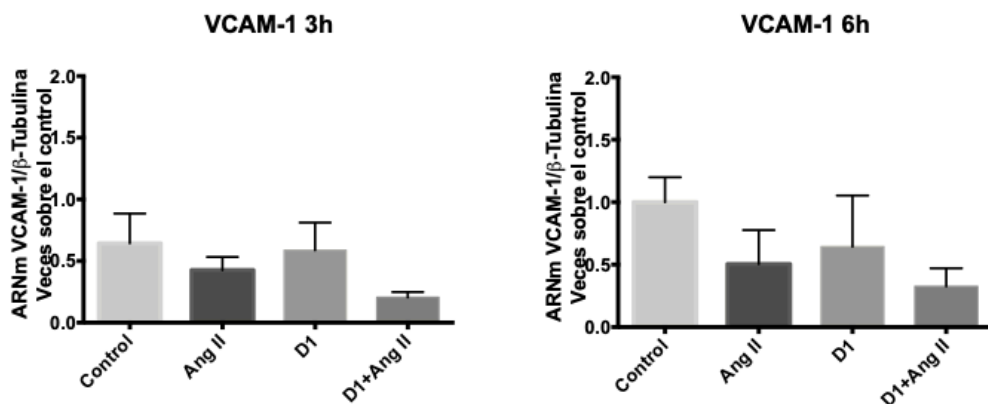
**Figura 19.** Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de MCP-1 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs. FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con Ang II (1 $\mu$ M), RvD1 (100nM), RvD1 (D1; 100nM) + Ang II (1 $\mu$ M) una hora después. Los valores de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM \*p<0,05; \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001.



**Figura 20. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de TNF- $\alpha$  en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs.** FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con Ang II (1 $\mu$ M), RvD1 (100nM), RvD1 (DS1; 100nM) + Ang II (1 $\mu$ M) una hora después. Posteriormente se midieron los niveles de mRNA de TNF- $\alpha$  1 mediante RTqPCR. Los valores de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM. \*p<0,05.



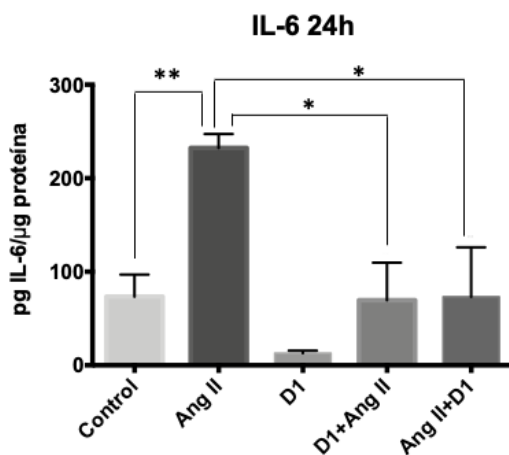
**Figura 21. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de ICAM-1 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs.** FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con Ang II (1 $\mu$ M), RvD1 (D1; 100nM), RvD1 (100nM) + Ang II (1 $\mu$ M) una hora después. Los valores de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5) tanto para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM.



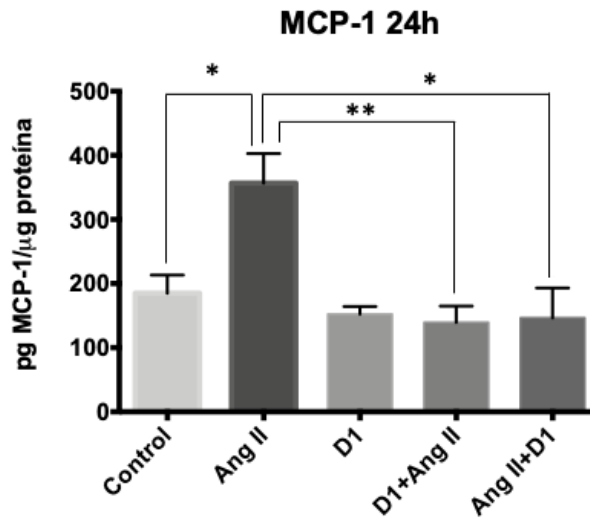
**Figura 22.** Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de VCAM-1 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs. FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con Ang II (1 $\mu$ M), RvD1 (100nM), RvD1 (D1; 100nM) + Ang II (1 $\mu$ M) una hora después. Los valores de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5) tanto para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM.

### 6.2.6 Efecto de RvD1 sobre la secreción de citoquinas

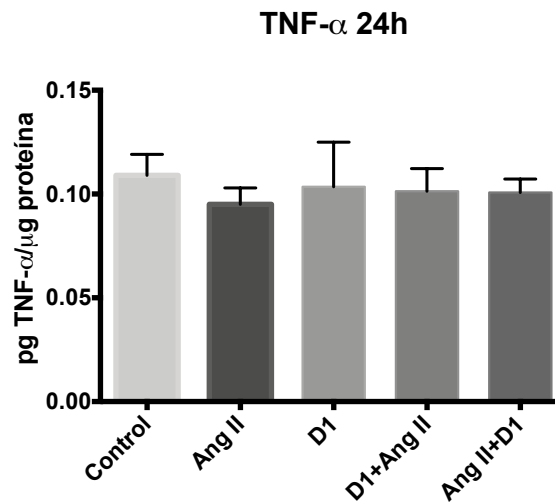
Los resultados obtenidos muestran que Ang II aumenta significativamente la secreción de IL-6 (Figura 23) y MCP-1 (Figura 24) vs el control, y este efecto es prevenido de forma significativa tanto con el pretratamiento con RvD1 1 hora antes del estímulo con Ang II, como con el tratamiento con RvD1 1 hora después al estímulo con Ang II. Por otra parte, Ang II no modificó los niveles de TNF- $\alpha$  (Figura 25) e IL-10 (Figura S4) vs el control y el estímulo con RvD1 no generó ningún cambio sobre este efecto de Ang II. Además, la RvD1 por sí sola no produjo cambios en la secreción de IL-6, MCP-1, IL-10 y TNF- $\alpha$  con relación al control.



**Figura 23.** Efecto de RvD1 sobre los niveles de secreción de IL-6 en FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24 horas. FCs fueron estimulados con Ang II 1 $\mu$ M en presencia y ausencia de RvD1 100nM. La RvD1 (D1) fue agregada 1 hora antes o 1 hora después del estímulo con Ang II. Los valores de IL-6 se obtuvieron en pg por  $\mu$ g de proteína de cada muestra. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de 7 experimentos independientes. \* p<0,05; \*\*p<0,01.



**Figura 24. Efecto de RvD1 sobre los niveles de secreción de MCP-1 en FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24 horas.** FCs fueron estimulados con Ang II 1μM en presencia y ausencia de RvD1 (D1; 100nM). La RvD1 fue agregada 1 hora antes o 1 hora después del estímulo con Ang II. Los valores de MCP-1 se obtuvieron en pg por μg de proteína de cada muestra. Los resultados representan el promedio ± SEM de 7 experimentos independientes. \* p<0,05; \*\*p<0,01.

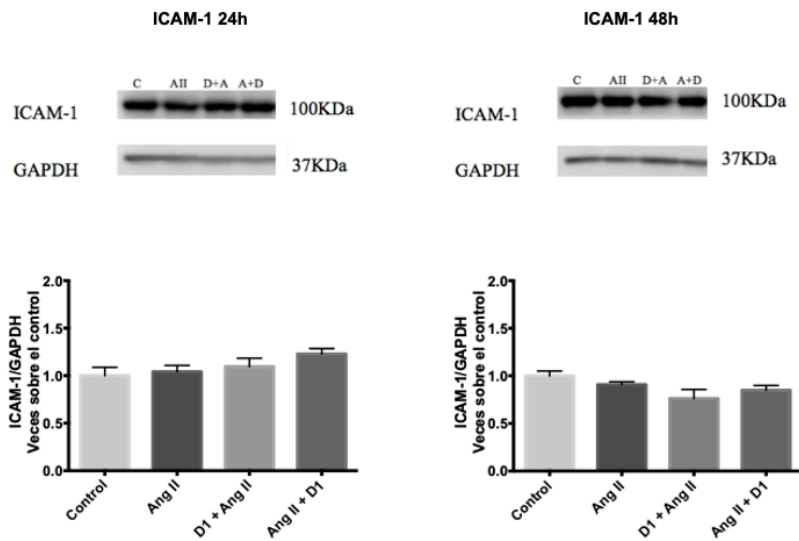


**Figura 25. Efecto de RvD1 sobre los niveles de secreción de TNF-α en FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24 horas.** FCs fueron estimulados con Ang II 1μM en presencia y ausencia de RvD1 (D1; 100nM). La RvD1 fue agregada 1 hora antes o 1 hora después del estímulo con Ang II. Los valores de TNF-α se obtuvieron en pg por μg de proteína de cada muestra. Los resultados representan el promedio ± SEM de 7 experimentos independientes.

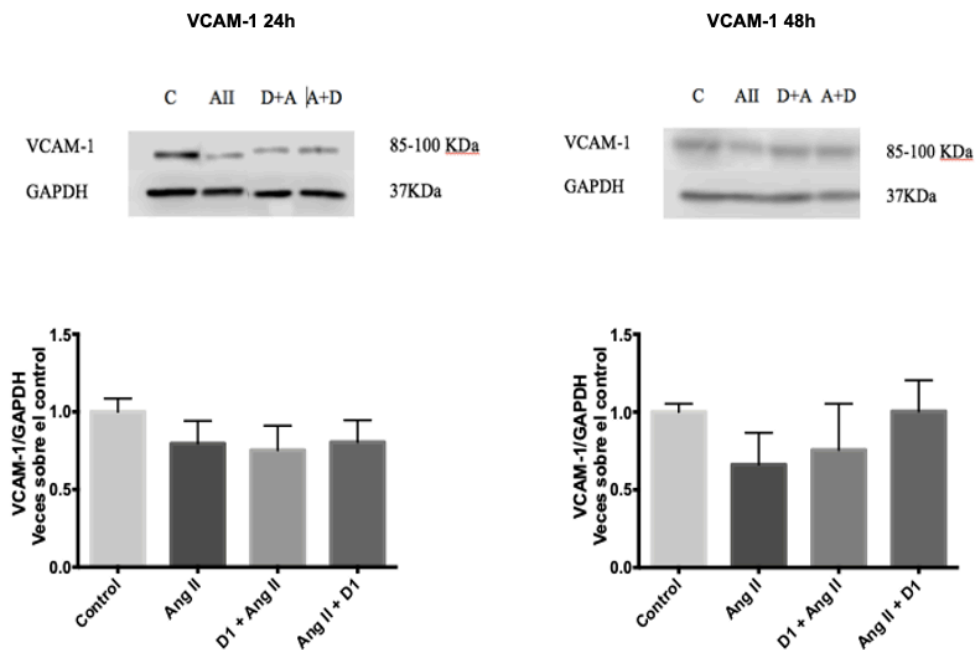
### 6.2.7 Efecto de RvD1 sobre los niveles de proteínas de adhesión

En los resultados obtenidos se observa que Ang II no modificó los niveles de ICAM-1 (Figura 26) y VCAM-1 (Figura 27) tal y como ya se había visto en resultados anteriores de esta misma tesis. Además,

se observó que la RvD1 por sí misma no modificó los niveles de las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en FCs de rata adulta tanto a las 24 como a las 48 horas.



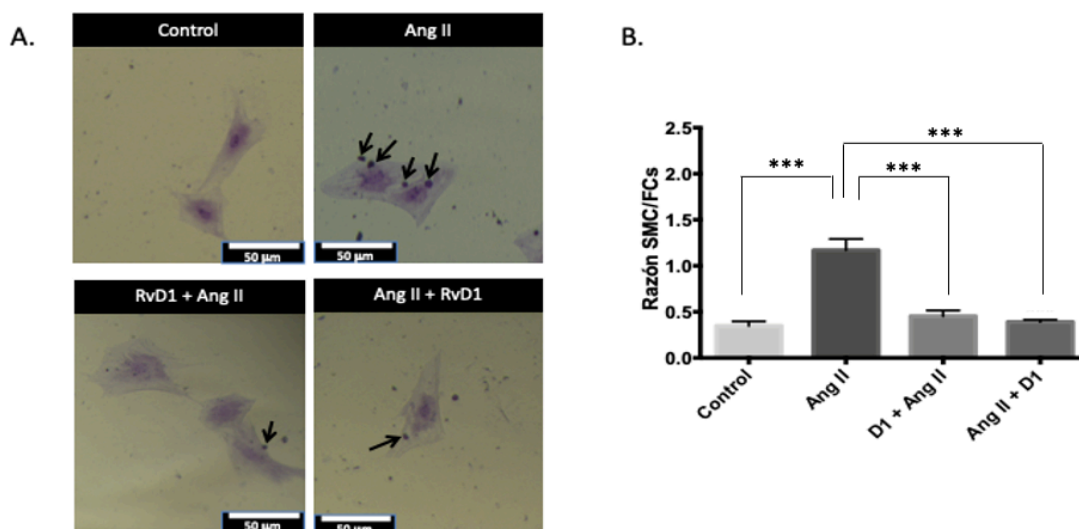
**Figura 26.** Efecto de la RvD1 sobre los niveles de proteína ICAM-1 determinada en lisados celulares de FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24 y 48 horas. FCs fueron estimulados con Ang II 1 $\mu$ M en presencia y ausencia de RvD1 (D1; 100nM). La RvD1 fue agregada 1 hora antes o 1 hora después del estímulo con Ang II. Los valores de ICAM-1 fueron determinados mediante Western Blot y se expresaron como veces sobre el control sin tratar. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes.



**Figura 27.** Efecto de la RvD1 sobre los niveles de proteína VCAM-1 determinada en lisados celulares de FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24 y 48 horas. FCs fueron estimulados con Ang II 1 $\mu$ M en presencia y ausencia de RvD1 (D1; 100nM). La RvD1 fue agregada 1 hora antes o 1 hora después del estímulo con Ang II. Los valores de VCAM-1 fueron determinados mediante Western Blot y se expresaron como veces sobre el control sin tratar. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes.

### 6.2.8 Efecto de RvD1 sobre la adhesión de SMC a FCs mediada por Ang II

Los FCs fueron estimulados durante 24 horas con Ang II 1  $\mu$ M, RvD1 0,1  $\mu$ M, una hora antes y una hora después del estímulo con Ang II. Posteriormente se retiró el estímulo y los FCs se incubaron durante 2 horas con SMC en una relación 5 SMC: 1 FC. Los resultados obtenidos (Figura 28) muestra que Ang II aumenta significativamente la adhesión de SMC a los FCs y que este efecto fue contrarrestado significativamente al estimular con RvD1 antes o después del estímulo con Ang II. La RvD1 por sí sola no produjo ningún cambio.

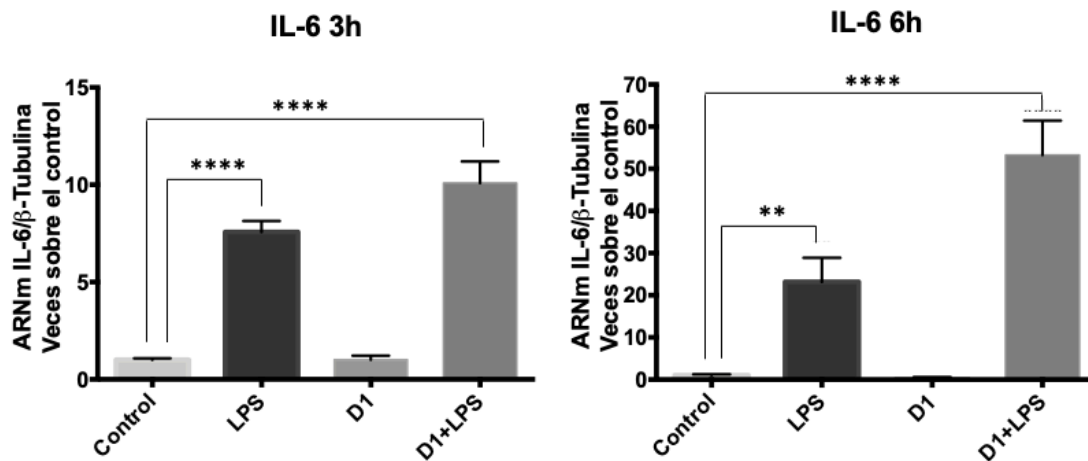


**Figura 28.** Efecto de RvD1 sobre la adhesión de SMC a FCs de rata adulta gatillada por Ang II durante 24 horas. FCs fueron estimulados con Ang II 1  $\mu$ M en presencia y ausencia de RvD1 100 nM. LA RvD1 fueron agregados 1 hora antes o 1 hora después del estímulo con Ang II. A. Imágenes representativas de la adhesión de SMC a FCs con cada uno de los estímulos. Las flechas negras señalan SMC adheridos a FCs. B. Análisis gráfico de la razón de adhesión de SMC/FCs. Los resultados muestran la media  $\pm$  SEM para tres experimentos independientes. \*\*\* $p$ <0,001.

6.3. Resultados del objetivo específico 3: Determinar el efecto de RvD1 sobre la expresión de proteínas de adhesión ICAM-1, VCAM-1 y la expresión/secreción de las citoquinas IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  y la adhesión de monocitos inducidos por LPS en FCs de rata.

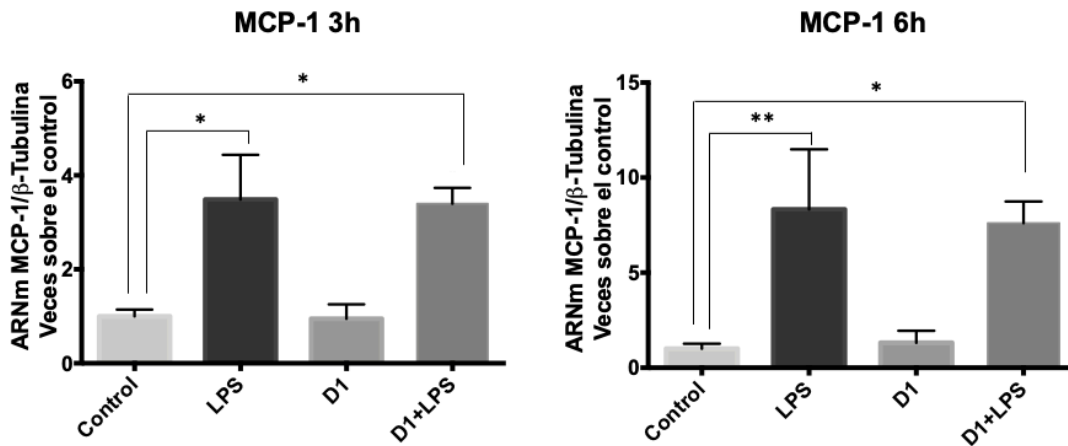
6.3.1 Efecto de RvD1 sobre los niveles de mRNA de citoquinas y proteínas de adhesión gatillados por LPS en FCs:

En los resultados obtenidos se observa que LPS aumenta significativamente los niveles de mRNA de IL-6 (Figura 29), MCP-1 (Figura 30), TNF- $\alpha$  (Figura 31), IL-10 (Figura S5), IL-1 $\beta$  (Figura S9), ICAM-1 (Figura 32) y VCAM-1 (Figura 33) en FCs tanto a las 3 como a las 6 horas. Por otra parte, RvD1 no previno el aumento del mRNA de IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-10, ICAM-1 y VCAM-1 gatillado por LPS en FCs tanto a las 3 como a las 6 horas post estímulo.

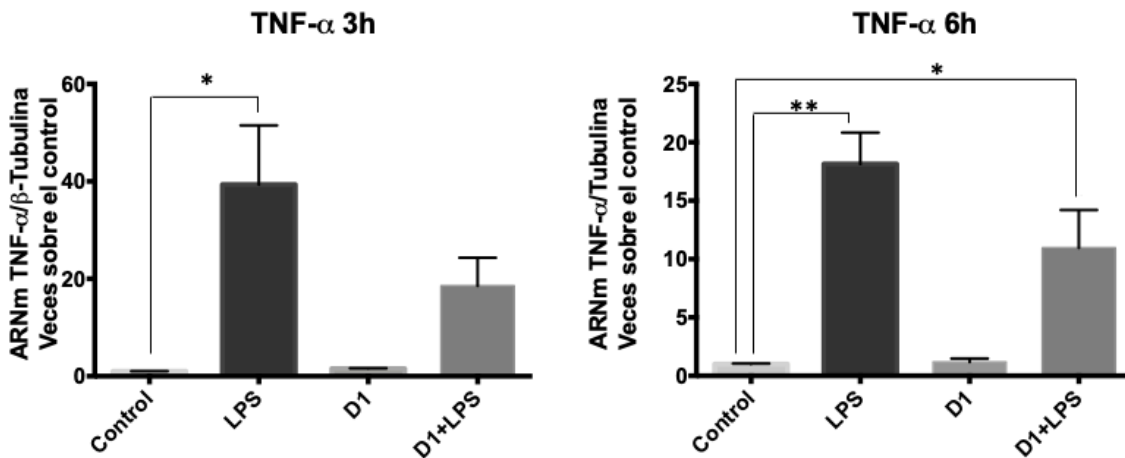


**Figura 29. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de IL-6 en FCs de ratas adultas estimulados con LPS durante 3 y 6 hrs.** FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con LPS (1  $\mu$ g/mL), RvD1 (D1, 100nM), RvD1 (100nM) + LPS (1  $\mu$ g/mL) una hora después. Los valores relativos de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM. \*\*p<0,01 y \*\*\*\*p<0,0001.

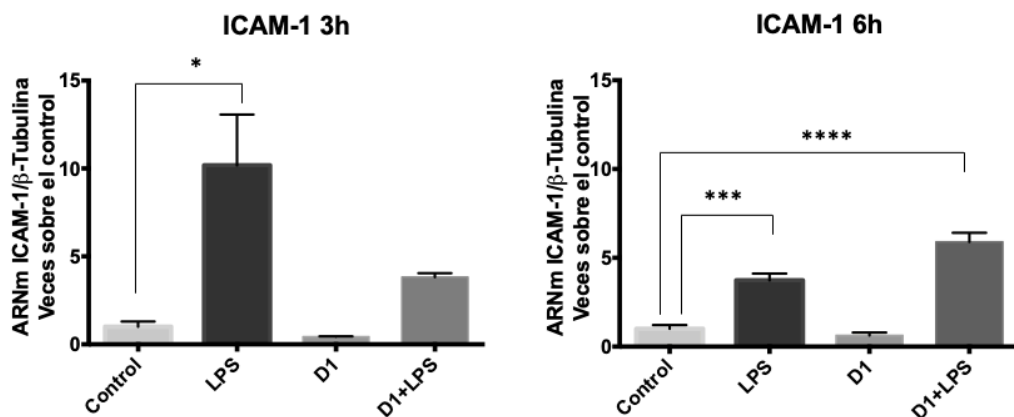




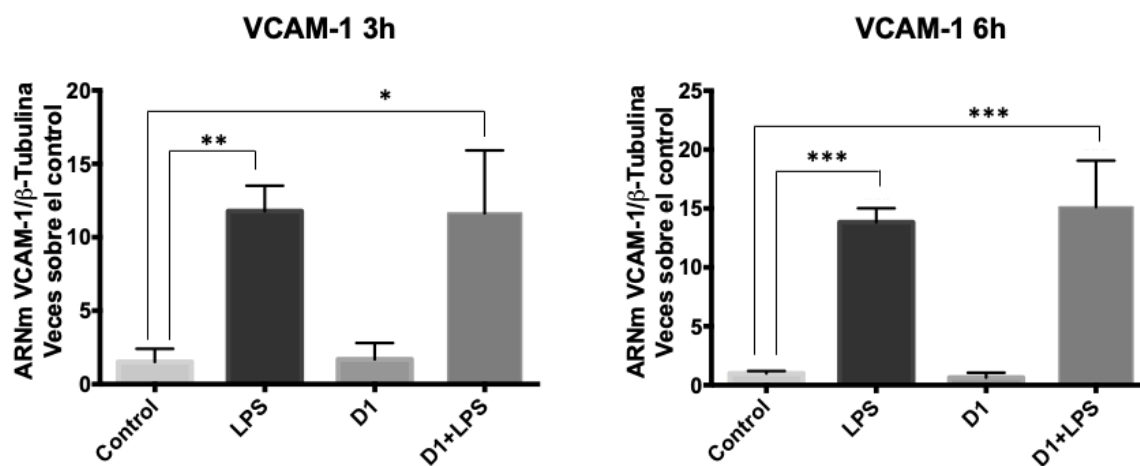
**Figura 30.** Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de MCP-1 en FCs de ratas adultas estimulados con LPS durante 3 y 6 hrs. FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con LPS (1  $\mu$ g/mL), RvD1 (100nM), RvD1 (D1; 100nM) + LPS (1  $\mu$ g/mL) una hora después. Los valores de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM. \* $p$ <0,05 y \*\* $p$ <0,01.



**Figura 31.** Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de TNF- $\alpha$  en FCs de ratas adultas estimulados con LPS durante 3 y 6 hrs. FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con LPS (1  $\mu$ g/mL), RvD1 (100nM), RvD1 (100nM) + LPS (1  $\mu$ g/mL) una hora después. Los valores de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM. \*  $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01.



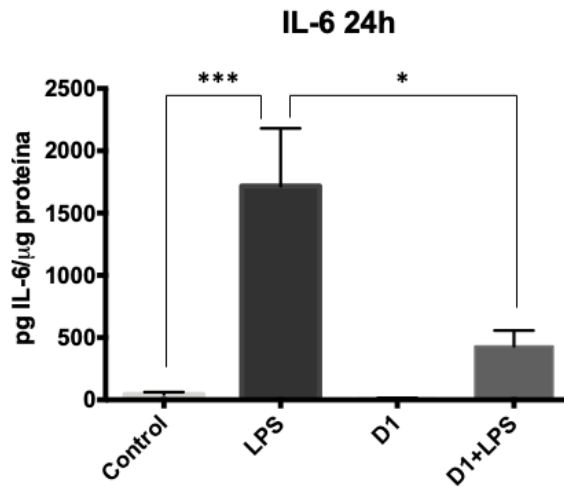
**Figura 32.** Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de ICAM-1 en FCs de ratas adultas estimulados con LPS durante 3 y 6 hrs. FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), RvD1 (D1; 100nM), RvD1 (100nM) + LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) una hora después. Los valores de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes ( $n=5$ ) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM. \*  $p<0,05$  \*\*\* $p<0,001$  \*\*\*\* $p<0,0001$ .



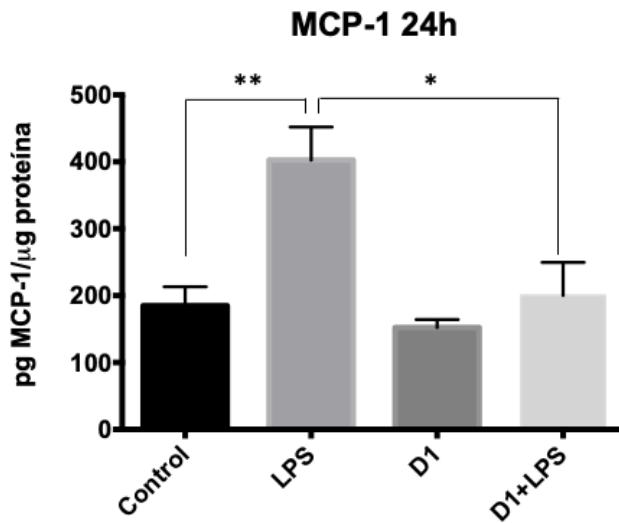
**Figura 33.** Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de VCAM-1 en FCs de ratas adultas estimulados con LPS durante 3 y 6 hrs. FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), RvD1 (D1; 100nM), RvD1 (100nM) + LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) una hora después. Los valores de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes ( $n=5$ ) tanto para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM. \*  $p<0,05$  \*\* $p<0,01$  y \*\*\* $p<0,001$ .

### 6.3.2 Efecto de RvD1 sobre la secreción de citoquinas gatillada por LPS en FCs.

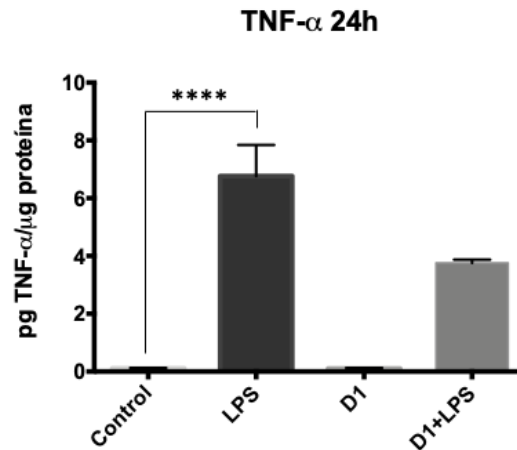
Los resultados obtenidos muestran que LPS aumenta significativamente la secreción de IL-6 (Figura 34), MCP-1 (Figura 35), TNF- $\alpha$  (Figura 36) e IL-10 (Figura S6) vs el control. RvD1 previno el aumento de IL-6 y MCP-1. La RvD1 por sí sola no produjo cambios en la secreción de IL-6, MCP-1, IL-10 y TNF- $\alpha$  con relación al control.



**Figura 34. Efecto de RvD1 sobre los niveles de secreción de IL-6 en FCs de rata adulta estimulados con LPS durante 24 horas.** FCs fueron estimulados con LPS (1  $\mu$ g/mL) en presencia y ausencia de RvD1 (D1; 100nM). La RvD1 fue agregada 1 hora antes del estímulo con LPS. Los valores de IL-6 se obtuvieron en pg por  $\mu$ g de proteína de cada muestra. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de 7 experimentos independientes. \* $p$ <0,05; \*\*\*  $p$ <0,001.



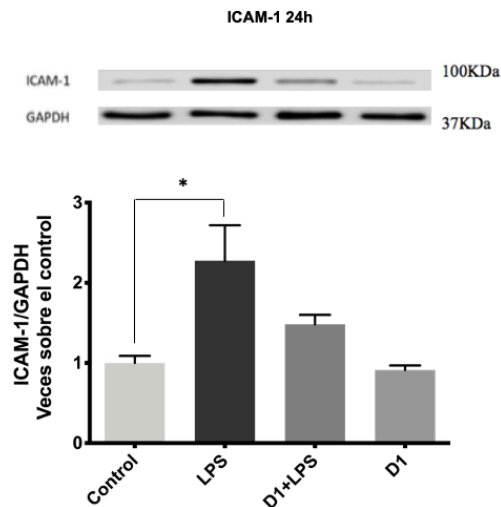
**Figura 35. Efecto de RvD1 sobre los niveles de secreción de MCP-1 en FCs de rata adulta estimulados con LPS durante 24 horas.** FCs fueron estimulados con LPS (1  $\mu$ g/mL) en presencia y ausencia de RvD1 (D1;100nM). La RvD1 fue agregada 1 hora antes del estímulo con LPS. Los valores de MCP-1 se obtuvieron en pg por  $\mu$ g de proteína de cada muestra. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de 7 experimentos independientes. \* $p$ <0,05; \*\*  $p$ <0,01.



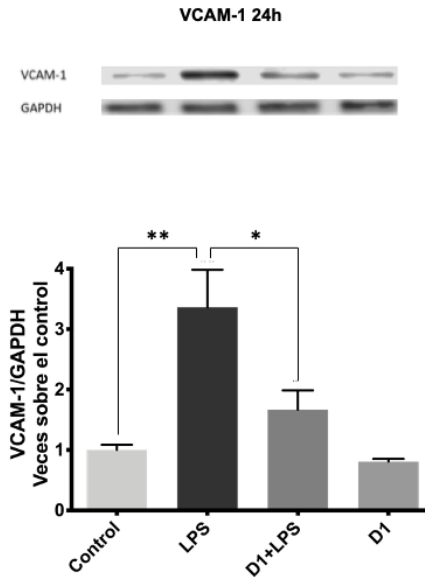
**Figura 36. Efecto de RvD1 sobre los niveles de secreción de TNF- $\alpha$  en FCs de rata adulta estimulados con LPS durante 24 horas.** FCs fueron estimulados con LPS (1  $\mu$ g/mL) en presencia y ausencia de RvD1 (D1; 100nM). La RvD1 fue agregada 1 hora antes del estímulo con LPS. Los valores de TNF- $\alpha$  se obtuvieron en pg por  $\mu$ g de proteína de cada muestra. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de 7 experimentos independientes. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 6.3.3 Efecto de RvD1 sobre los niveles de proteínas de adhesión gatilladas por LPS en FCs.

En los resultados obtenidos se observa que LPS aumentó significativamente los niveles de ICAM-1 (Figura 37) y VCAM-1 (Figura 38). Por otra parte, RvD1 previno el aumento de VCAM-1 inducido por LPS a las 24 horas post-estímulo. Además, se observó que la RvD1 por sí misma no modificó los niveles de las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en FCs de rata adulta a las 24 horas.



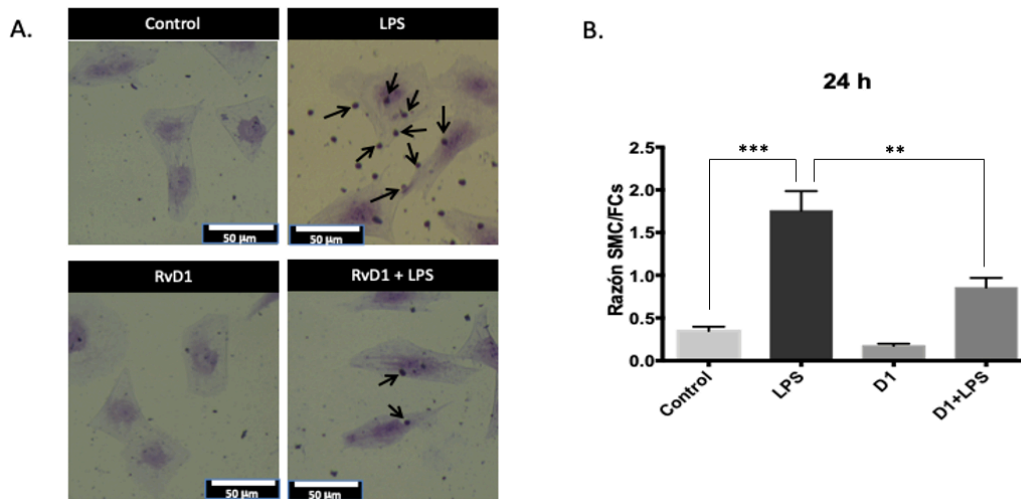
**Figura 37. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de proteína ICAM-1 determinada en lisados celulares de FCs de rata adulta estimulados con LPS durante 24 horas.** FCs fueron estimulados con LPS (1  $\mu$ g/mL) en presencia y ausencia de RvD1 (D1; 100nM). La RvD1 fue agregada 1 hora antes del estímulo con LPS. Los valores de ICAM-1 fueron determinados mediante Western Blot y se expresaron como veces sobre el control sin tratar. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes. \*  $p < 0,05$ .



**Figura 38. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de proteína VCAM-1 determinada en lisados celulares de FCs de rata adulta estimulados con LPS durante 24 y 48 horas.** FCs fueron estimulados con LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en presencia y ausencia de RvD1 (D1; 100nM). La RvD1 fue agregada 1 hora antes del estímulo con LPS. Los valores de VCAM-1 fueron determinados mediante Western Blot y se expresaron como veces sobre el control sin tratar. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

#### 6.3.4 Efecto de RvD1 sobre la adhesión mediada por LPS

Los FCs fueron estimulados durante 24 horas con LPS y RvD1 0,1  $\mu\text{M}$  una hora antes de LPS. Luego se retiró el estímulo y los FC fueron incubados por 2 horas con SMC en una relación 5 SMC : 1 FC. Los resultados obtenidos (Figura 39) muestran que LPS aumentó significativamente la adhesión de SMC y este efecto fue prevenido con el pretratamiento con RvD1. La RvD1 por sí sola no produjo cambios sobre la adhesión de SMC a FCs.



**Figura 39.** Efecto de RvD1 sobre la adhesión de SMC a FCs de rata adulta gatillada por LPS durante 24 horas. FCs fueron estimulados con LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en presencia y ausencia de RvD1 (D1; 100nM). La RvD1 fue agregada 1 hora antes del estímulo con LPS. A. Imágenes representativas de la adhesión de SMC a FCs con cada uno de los estímulos. Las flechas negras señalan SMC adheridos a FCs. B. Análisis gráfico de la razón de adhesión de SMC/FCs. Los resultados muestran la media  $\pm$  SEM para tres experimentos independientes. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

A continuación un resumen comparativo de los principales resultados obtenidos con relación a los objetivos 2 y 3:

Tabla 3. Resumen de resultados obtenidos sobre las proteínas estudiadas respecto a los estímulos proinflamatorios con Ang II, LPS y el efecto de RvD1 previo a estos estímulos.

		Efecto de Ang II vs Control	Efecto de RvD1+ Ang II vs Ang II	Efecto de LPS vs Control	Efecto de RvD1+LPS vs LPS
IL-6	mRNA	↑	↓	↑	Sin cambio
	Proteína	↑	↓	↑	↓
MCP-1	mRNA	↑	↓	↑	Sin cambio
	Proteína	↑	↓	↑	↓
TNF- $\alpha$	mRNA	↑	Sin cambio	↑	Sin cambio
	Proteína	Sin cambio	Sin cambio	↑	Sin cambio
ICAM-1	mRNA	Sin cambio	Sin cambio	↑	Sin cambio
	Proteína	Sin cambio	Sin cambio	↑	Sin cambio
VCAM-1	mRNA	Sin cambio	Sin cambio	↑	Sin cambio
	Proteína	Sin cambio	Sin cambio	↑	↓
Adhesión SMC a FCs		↑	↓	↑	↓

IL-6: interleucina 6; MCP-1: proteína quimioattractante de monocitos 1; TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1; VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1; SMC: células mononucleares de bazo; FCs: Fibroblastos cardiacos; ↑: aumento; ↓: disminuye

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Receptores ALX/FPR2 en FCs

Hasta la fecha, no existe evidencia publicada sobre la expresión de los receptores de la RvD1 ni sobre sus vías de señalización en FCs. Por ello, se investigó su presencia en FCs de rata adulta y se evaluó la expresión de estos en presencia de estímulos proinflamatorios como LPS, Ang II y en presencia de estímulos profibróticos como Ang II y TGF- $\beta$ . Además, para determinar la vía de señalización intracelular activada por RvD1 en FCs, se midieron los niveles de cAMP en presencia/ausencia de ISO y los niveles intracelulares de señales de Ca<sup>+2</sup> en presencia/ausencia de Ang II.

Resultados previos y aún no publicados de nuestro laboratorio, han mostrado que, la RvD1 es capaz de prevenir efectos proinflamatorios en FCs de ratas SD neonatas [96]; sin embargo, la expresión de los receptores ALX/FPR2 no se conocía y menos aún hay referencias que relacionen la expresión de estos receptores con alguno de los estímulos utilizados: Ang II, LPS y TGF- $\beta$ .

Con relación a Ang II, además no hay evidencia publicada sobre los efectos de este péptido sobre la expresión de ALX/FPR2 en otros tipos celulares. En ese sentido nuestros hallazgos son novedosos en cuanto a que muestran que Ang II incrementa los niveles de ALX/FPR2 en FCs de rata SD adulta.

Con respecto al estímulo con LPS, en otros tipos celulares se ha visto que LPS aumenta la expresión de ALX/FPR2; por ejemplo, en un estudio realizado en monocitos humanos se demostró que los niveles del receptor ALX/FPR2 disminuyeron drásticamente tras su diferenciación a macrófagos; sin embargo, esos mismos macrófagos estimulados con LPS presentaron un gran aumento de la expresión del mRNA de dicho receptor, aunque ese cambio no fue traducido en un aumento en los niveles proteicos del mismo, mostrando una inhibición postranscripcional en la síntesis del receptor [97]. En células de microglía humana [98] y células de microglía murinas [99], LPS aumentó los niveles de proteína de ALX/FPR2. Además, en células endoteliales vasculares de ratón LPS mostró incrementar tanto los niveles de mRNA como de proteína [100]. Cabe mencionar, que en enterocitos humanos, el estímulo con LPS e IL-1 $\beta$  incrementaron solo un poco la expresión de ALX/FPR2 en comparación con el que se observó con el estímulo directo con otras citoquinas proinflamatorias tales como IL-6 e interferón gamma (INF- $\gamma$ ) [101]. Nuestros resultados no mostraron frente al estímulo con LPS un aumento significativo de los receptores ALX/FPR2, aunque si observamos una tendencia al aumento, que quizás con un aumento en el tamaño de la muestra podría llegar a ser significativo; sin embargo, esto tendría que ser comprobado. En cuanto a los efectos de TGF- $\beta$ 1, se encontró en células microgliales murinas [102] que este estímulo a través de la activación de las vías SMAD3 y ERK1/2, fue capaz de inhibir la expresión de FPR2 estimulada por LPS; igualmente en otro estudio, también en microglía murina, se encontró que TGF- $\beta$ 1 disminuyó

los niveles de FPR2 [103]. Cabe mencionar que tanto el estímulo AngII como TGF- $\beta$  se han asociado a aumentar la diferenciación de FCs a miofibroblastos, por lo que el aumento de receptores ALX/FPR2 encontrado en la presente investigación podría eventualmente estar asociado a que en miofibroblastos haya mayor cantidad de receptores que en FCs, lo cual tendría que ser comprobado en futuras investigaciones.

Para RvD1 no se encontró evidencia que la relacionara con aumentar la expresión del receptor ALX/FPR2; sin embargo, es importante destacar que estos antecedentes y el resultado encontrado sugieren que la RvD1 no autoregula la expresión de su receptor ni hacia la alza ni hacia la baja.

Por lo tanto, con esta evidencia y resultados en su conjunto se puede concluir que los cambios inducidos en la expresión del receptor ALX/FPR2 son dependientes tanto del tipo celular como del estímulo utilizado, y que estos cambios pueden manifestarse en diferentes niveles del proceso de síntesis de los receptores. A la vez, es claro y coincidente con nuestros hallazgos que el receptor sí puede variar su expresión, ante distintos estímulos y procesos [104].

Con relación a los efectos de RvD1 sobre los niveles de cAMP intracelular en FCs de ratas SD adultas, los resultados obtenidos son discordantes de lo reportado en la literatura, pues se esperaba que RvD1 disminuyera los niveles de cAMP como se ha visto en neutrófilos humanos [47] y esto no ocurrió, lo que aporta evidencia de que los receptores ALX/FPR2 en FCs de ratas adultas no estarían acoplados a este tipo de proteína Gi.

Por otro lado, ensayos paralelos a esta investigación llevados a cabo en nuestro laboratorio en FCs de ratas SD neonatas, mostraron que el estímulo de RvD1 + ISO aumentó significativamente los valores de cAMP intracelular respecto a lo que lo aumentaría el estímulo con ISO solo. Además, en este mismo tipo celular se encontró que, al estimular con RvD1 e ISO en presencia de WRW4, que es un antagonista selectivo del receptor ALX/FPR2, los niveles de cAMP se incrementan a valores semejantes a los que se encontró con ISO solo, indicando así que la potenciación de la respuesta es gatillada por activación del receptor ALX/FPR2 [105].

Con respecto a esto, en la literatura publicada hasta ahora, se indica que en FCs la co-estimulación de receptores asociados a las proteínas efectoras G<sub>s</sub>-G<sub>q</sub> lleva a un mayor aumento en los niveles de cAMP intracelular, pues al menos otros dos receptores acoplados a la vía G<sub>q</sub> (P2Y y AT1R) son capaces de inducir una potenciación similar en los niveles de cAMP inducidos por ISO [106]. Antecedentes obtenidos en nuestro grupo de investigación mostraron otro caso similar, en el que la bradicinina (BK) por sí sola no modificó los niveles de cAMP intracelular; sin embargo, produjo un efecto potenciador sobre la señalización de ISO [107]. Además, se encontró que este resultado es gatillado vía G<sub>q</sub>-PLC-CaMKII y al utilizar un inhibidor de CaMK-II se previno el efecto, indicando que CaMKII juega un



papel preponderante en la potenciación en este caso [107], lo que podría deberse a que la CaMKII activa la adenilato ciclasa de tipo 5, la que al ser activada por Gs induciría un mayor aumento de cAMP.

Resultados similares se han observado en FCs de rata adulta, causados por Ang II o UTP donde el efecto sinérgico sobre la respuesta inducida por ISO se eliminó al inhibir a la fosfolipasa C (PLC); además la sobreexpresión de la proteína  $G_q$  aumentó dicha potenciación [108]. En este mismo estudio se encontró que la quelación del  $Ca^{+2}$  intracelular atenuó la potenciación; y al utilizar agentes farmacológicos que aumentan directamente el  $Ca^{+2}$  intracelular, se vio potenciada la acumulación de cAMP inducida por ISO. También se encontró que utilizando inhibidores del complejo  $Ca^{+2}$ -calmodulina el efecto sinérgico sobre cAMP disminuye de forma significativa [108]. Esta vía podría ser interesante de estudiar para el caso de la RvD1 e ISO. De acuerdo entonces a los resultados obtenidos en la presente investigación y a los antecedentes mencionados, una posible explicación es que los receptores ALX/FPR2 estuviesen acoplados a proteína del tipo G, que lleve a un aumento de calcio intracelular.

Con respecto a esto, el estímulo con RvD1 por sí sola no produjo cambios significativos en los niveles de  $Ca^{+2}$  intracelular, tanto a nivel citoplasmático como nuclear, lo que indicaría que el receptor de RvD1 no estaría acoplado a proteína  $G_q$ . Esto estaría en concordancia con el efecto que se ha visto en PMN humanos donde el estímulo con RvD1 no produjo cambios significativos en los niveles de  $Ca^{+2}$  [49]. Sin embargo, hay otras publicaciones donde se reporta que la RvD1 produjo aumento de  $Ca^{+2}$  intracelular, por ejemplo, en células goblets conjuntivales de rata en las la RvD1 incrementó la secreción de mucina por aumento del  $Ca^{+2}$  intracelular debido a que el receptor ALX/FPR2 en estas células estaría acoplado a proteínas  $G_q$  [109]. Además, se ha visto que la AT-RvD1 (RvD1 gatillada por Aspirina) en células de glándulas submandibulares de ratón aumenta  $Ca^{+2}$  intracelular [110].

Si bien es cierto la evidencia muestra la posibilidad de que la RvD1 en FCs no modifique los niveles de  $Ca^{+2}$  intracelular, otra posibilidad es que no se hayan detectado cambios significativos en los niveles de este ión por el tipo de sonda empleado en el ensayo. La sonda utilizada, FLUO-4AM, tiene una constante de afinidad (Kd) de 345 nM [111]; y con esta se puede medir una elevación de  $Ca^{+2}$  más grande, como las observadas con Ang II, ya que presenta una saturación baja, pero se tendrían dificultades para medir cambios en los niveles de  $Ca^{+2}$  alrededor de los niveles en reposo [111]. Para enfrentar esto se podría usar una sonda más afín como la FURA-2, que tiene una Kd de 140 nM [112], lo que permitiría medir las variaciones de  $Ca^{+2}$  alrededor de la concentración basal siempre que el interés no esté especialmente en determinar grandes aumentos de este ion pues la sonda se podría saturar rápidamente. Si la RvD1 en FCs movilizara  $Ca^{+2}$ , esto indicaría que los receptores ALX/FPR2 están acoplados a  $G_q$ , y esto podría explicar el efecto sinérgico de la RvD1 sobre la liberación de cAMP inducido por ISO, ya que, como se ha descrito anteriormente, podría ser un ejemplo más de coestimulación de proteínas  $G_q$ -Gs [107,108].

Por lo tanto, nosotros no descartamos la posibilidad de que el receptor este acoplado a proteína Gq, aunque esta propuesta debiera ser evaluada posteriormente.

Con respecto al estímulo con RvD1 previo al estímulo con Ang II y los efectos que sobre el  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular se observaron, no existen antecedentes previos publicados. Se ha descrito un caso similar en el que la estimulación de macrófagos de ratón con ácido araquidónico (AA) o ATP, causó un incremento en los niveles de fosfo-CaMKII y el tratamiento con RvD1 disminuyó este efecto vía ALX/FPR2, suprimiendo el aumento de calcio citosólico y disminuyendo la activación de la CaMKII [113]. Sobre la CaMKII se ha demostrado que esta media en otros procesos celulares en enfermedades en las que la inflamación crónica es importante, por ejemplo, CaMKII desencadena la apoptosis inducida por estrés del retículo endoplásmico en macrófagos [114], que podría ser importante en enfermedades en las que mecanismos como la apoptosis leucocitaria y la necrosis secundaria subyacen a la patología, tales como la aterosclerosis avanzada y ciertas enfermedades autoinmunes [115].

Además se ha reportado en células caliciformes de rata que la RvD1 es capaz de bloquear el aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular estimulado por histamina a través del receptor H1, el cual está acoplado a proteína Gq [116]. Los receptores acoplados a proteína G (GPCR), incluidos los receptores de histamina, liberan  $\text{Ca}^{+2}$  de las reservas intracelulares de este ión ubicadas en el retículo endoplásmico. La liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  a su vez activa la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  desde el medio extracelular. Las reservas de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelulares se rellenan a través de una bomba ATPasa que bombea  $\text{Ca}^{+2}$  de vuelta al retículo endoplásmico [117]. Este antecedente sugiere RvD1 bloquean el aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular estimulado por histamina ya sea alterando directamente el receptor de histamina o afectando un paso antes de la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular y que su efecto no sería a nivel de afectar el depósito de calcio intracelular [116]. Este resultado tiene algunas similitudes con los ensayos realizados en la presente investigación, pues el receptor AT1R de Ang II también está acoplado a proteína Gq y es una posibilidad que los efectos preventivos encontrados con RvD1 sobre el aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  causado por Ang II en FCs pudiera explicarse por un mecanismo que no esté asociado a afectar las reservas de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. Se requerirán más estudios para poder tener conclusiones más certeras al respecto.

Con esta evidencia podemos considerar además otro escenario. Se ha publicado que con relación a la proteína  $G_i/G_o$  que si bien es cierto la subunidad  $\alpha$  inhibe a la enzima adenilato ciclasa, los efectos por la activación de la subunidad  $\beta\gamma$  también tiene otros efectos. El complejo  $\beta\gamma$  puede activar al canal de potasio rectificador hacia adentro regulado por proteína G (GIRK por sus siglas en inglés) y puede inhibir a los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo P/Q y N gatillados por voltaje, generando una serie de efectos fisiológicos según el tipo celular al que se refiera [118]. En este sentido, se ha demostrado que Ang II modula la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje tipos L- y T-type, expresados en la membrana plasmática de células de la zona glomerulosa en muchas especies [119]. Además, la subunidad  $\beta\gamma$  puede

activar a fosfolipasa C, y con eso activar el mecanismo efector asociado a esta enzima, en el que podría esperarse aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  [118, 120].

Es importante mencionar que el  $\text{Ca}^{+2}$  participa de manera importante en la respuesta inflamatoria. Con el incremento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, se activan otras vías de señalización y factores de transcripción que finalmente se unen al ADN y dan lugar a la producción de todas las proteínas, entre ellas las citoquinas, relacionadas con la cascada inflamatoria. Dentro de estas vías están: la vía de la calmodulina-calcineurina, la vía de la CaMKII, que tiene como factores de transcripción la proteína unida al elemento de respuesta al monofosfato de adenosina cíclico (CREB, del inglés *cyclic-adenosine monophosphate-responsive element binding protein*) y el factor aumentador del miocito 2 (en inglés, *myocyte enhancer factor 2*), la vía del factor nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) [121, 122]. Una vez en el núcleo, el factor se une a secuencias específicas en las regiones promotoras de los genes blancos y activa la transcripción [123]. Ang II al aumentar el  $\text{Ca}^{+2}$  estaría activando vías de señalización que llevan a la producción de proteínas de la inflamación y RvD1 al disminuir significativamente la señal de calcio, podría estar previniendo los estos efectos proinflamatorios.

Colectivamente, estos resultados indican que en FCs están presentes los receptores ALX/FPR2 y la expresión de estos puede modificarse ante la presencia de estímulos proinflamatorios/profibróticos tales como Ang II y TGF-beta. Respecto al mecanismo efector de estos receptores en FCs, lo observado con  $\text{Ca}^{+2}$  sugiere que estos receptores podrían estar acoplados a proteína Gi/o e impedir así la entrada de calcio desde el medio extracelular y lo observado con cAMP sugiere que los ALX/FPR2 podrían estar asociado a proteína Gq y activar así el sistema  $\text{G}_q\text{-PLC-CaMKII-adenilato ciclase de tipo 5}$  e inducir así un mayor aumento de cAMP. El acoplamiento a Gi/o y Gq, ambos mecanismos se han reportado como el mecanismo efector primario y secundario para los receptores ALX/FPR2 en neutrófilos humanos [45], por lo que quizás ambos podrían estar participando en la respuesta en FCs. Sin duda se requieren ensayos adicionales para dilucidar con mayor claridad que está ocurriendo, principalmente a nivel de los efectos sobre el  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular.

## 7.2 Efecto de la resolvina D1 sobre la respuesta inflamatoria gatillada por Ang II en FCs.

Con respecto al estímulo con Ang II y los niveles de mRNA de las citoquinas en estudio: IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , nuestros resultados coinciden parcialmente con lo encontrado en la literatura. Por ejemplo, en FCs de ratas neonatas *Wistar* se encontró mediante análisis de Northern blot, que el estímulo con Ang II provocó un aumento en los niveles mRNA de IL-6 y de MCP-1 en los primeros 30 minutos y continuó elevado aún a las 2 horas [124, 125]. La diferencia en los tiempos en que se consiguieron los máximos niveles de mRNA de estas citoquinas en nuestra investigación, pueden explicarse por

diferencias en la cepa de rata utilizada y diferencias en los protocolos de experimentación (distintas concentraciones de Ang II, por ejemplo). Además, nuestros resultados son similares a lo encontrado en la literatura respecto a TNF- $\alpha$ , donde también en ratas neonatas *Wistar* mediante análisis de Northern blot, el estímulo de FCs con Ang II en ratas provocó en las primeras 4 horas un aumento sustancial en los niveles de mRNA de esta citoquina [126]. Nuestros resultados dan cuenta de un aumento temprano sostenido en los niveles de mRNA de TNF- $\alpha$ .

En el caso de la IL-1 $\beta$  y la IL-10, el estímulo con Ang II no modificó los niveles de mRNA de estas citoquinas en ningunos de los tiempos experimentales. Sobre esto, se encontró en la literatura un reporte donde mediante análisis de RT-qPCR, se obtuvo un aumento significativo en los niveles de mRNA de IL-1 $\beta$  en respuesta al estímulo con Ang II en FCs de rata; sin embargo, el aumento observado fue leve y medido tras 12 horas de incubación [127]. Esto sugiere que en FCs de rata la IL-1 $\beta$  podría ser una proteína cuyo gen aumente la expresión de forma más tardía que otras proteínas inflamatorias como es el caso de IL-6 y MCP-1. Mientras que para IL-10 no hay datos publicados.

Con respecto a los resultados de los niveles de secreción de las citoquinas, no hay antecedentes publicados en FCs sobre el efecto que Ang II causa sobre los niveles de IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-10. En otros modelos se ha visto lo siguiente: En ratones, el estímulo con Ang II en riñón aumentó los niveles proteicos de IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  e IL-10 [128]. También hay evidencia en células mensangiales de glomérulo de rata, donde Ang II aumentó los niveles de IL-6 y MCP-1 secretadas al medio de cultivo y no modificó los niveles secretados de TNF- $\alpha$  [129]. Esto último concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación, donde Ang II incrementó los niveles secretados de IL-6 y MCP-1 y no así de TNF- $\alpha$  y a la vez muestran evidencia de que el efecto de la Ang II sobre distintos tipos celulares en distintas especies animales en cuanto al perfil de secreción de citoquinas no siempre es el mismo.

Respecto a los resultados obtenidos con las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, hasta ahora no se han encontrado antecedentes que coincidan con los resultados obtenidos en esta investigación.

En la literatura se reporta el aumento de mRNA de ICAM-1 durante las 2 primeras horas tras el estímulo con Ang II en fibroblastos vasculares adventicios de ratas *Sprague Dawley* [130]. Esta diferencia podría explicarse entonces considerando que el gen que codifica para ICAM-1 podría aumentar su expresión de forma más temprana tras el estímulo con Ang II de modo que ya en los tiempos analizados en nuestra investigación ese aumento ya no se pudo detectar de forma significativa. Además, se ha descrito que Ang II aumenta los niveles de estas proteínas (ICAM-1 y VCAM-1) en células endoteliales [63].

Con relación a los efectos de Ang II en la adhesión de SMC a FCs. Se ha demostrado en estudios *in vivo* que, las interacciones entre neutrófilos y FCs podrían exacerbar la respuesta inflamatoria conduciendo a un proceso inflamatorio crónico. Lo anterior ocurriría por el aumento en la producción local de quimioquinas y la incapacidad de los FCs de eliminar las células reclutadas [131]. Otros estímulos pro-

inflamatorios (como LPS o HS) han mostrado aumentar los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 en FCs y aumentar la adhesión de SMC a FCs [65, 73] y se ha demostrado que el aumento de la adhesión causada por estos estímulos está en relación directa con el aumento de ambas proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 [65]. Por lo anterior, dado que Ang II no produjo un aumento en los niveles de ICAM-1 o VCAM-1 tanto a nivel de mRNA como de proteína encontrada en los lisados celulares, no se esperaban cambios en la adhesión de SMC a FCs. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que Ang II aumenta significativamente la adhesión de SMC a FCs. Esto podría explicarse debido a que si bien es cierto ICAM-1 y VCAM-1 son proteínas que participan de forma importante en el proceso de adhesión celular, no son las únicas. Respecto a esto, se ha reportado previamente en la literatura que entre las proteínas de adhesión que desempeñan un rol importante en la función de los fibroblastos cardíacos están las integrinas, que permiten que los FCs interactúen con las proteínas de la ECM [132]. Por ejemplo, se ha encontrado que la estimulación de FCs de rata con Ang II aumentó la expresión de las integrinas  $\alpha 8$  y  $\beta 1$  [133-136]. La sobreexpresión de las integrinas puede aumentar la expresión y la activación de TGF- $\beta$ , citoquina importante en la respuesta fibrótica a nivel cardíaco [137] [138]. Por otra parte, se ha encontrado que la estimulación de fibroblastos por TGF- $\beta$  aumenta la expresión de integrinas  $\alpha 5 \beta 1$  [139].

Esto nos hace pensar que quizás también en la adhesión de los SMC a los FCs gatillada por Ang II estén participando las integrinas. Esto, claro está, deberá ser comprobado en futuros estudios.

Otra posible explicación es que el efecto de Ang II sobre las proteínas ICAM-1 y VCAM-1 no haya sido el aumento de los niveles de proteína total en los FCs sino más bien un aumento en los niveles de estas proteínas localizados en la superficie de la membrana de los FCs, donde finalmente estas moléculas ejercen su función. Esto también requerirá ser evaluado en futuras investigaciones.

Por otra parte, en la presente investigación el pretratamiento con losartán previno el aumento en los niveles de mRNA y proteína secretada para todos los casos donde Ang II causó un incremento. Es decir losartán previno el aumento de mRNA y proteína secretada de IL-6 y MCP-1 y previno el aumento los niveles de mRNA de TNF- $\alpha$ . Además, losartán previno el aumento en la adhesión de SMC a FCs, aportando evidencia de que este efecto está mediado por el AT1R. Hasta la fecha, no existe en la literatura reportes que evidencien que estos efectos disminuyan con el uso de antagonistas del receptor AT1. Lo anterior estaría indicando que este efecto es mediado por la acción de la Ang II a través de su receptor AT1.

Con estos resultados de manera colectiva podemos afirmar entonces que Ang II aumenta los niveles de mRNA de IL-6, MCP-1 y TNF- $\alpha$ , aumenta los niveles de proteína secretada de IL-6 y MCP-1, aumenta la adhesión de SMC a FCs y todos estos efectos son ejercidos a través de su receptor AT1, lo que nos sugiere que los efectos proinflamatorios de Ang II vía AT1R ocurren tanto a nivel transcripcional como

de secreción de estas citoquinas, excepto para TNF- $\alpha$  donde el efecto solo fue observado a nivel transcripcional.

Con respecto a los efectos de RvD1 sobre los efectos de Ang II es muy poco lo que se ha publicado hasta el momento, hasta ahora se reporta lo siguiente: en un modelo *in vivo* de aneurisma de aorta abdominal en ratones con infusión de Ang II, la RvD1 fue capaz de disminuir interferón  $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1, entre otros, al día 28 de tratamiento [140]. Estos resultados publicados coinciden con lo obtenido en la presente investigación con respecto a MCP-1, donde RvD1 previno con respecto a esta citoquina tanto el aumento de los niveles de mRNA como de proteína secretada. Dada la escasa información disponible, consideramos que nuestros hallazgos aportaran evidencia novedosa en este tema. MCP-1 es una de las quimioquinas mediadoras de la migración de monocitos y macrófagos al tejido dañado. Cuando este proceso es crónico se exagera el daño local. Además, media el aumento de la expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  en monocitos, y se ha asociado a producir efectos proapoptóticos, profibróticos, angiogénicos, entre otros [141]. Además en la presente investigación observamos que RvD1 previno el aumento de IL-6, tanto mRNA como proteína secretada. No hay antecedentes previamente publicados sobre este efecto en FCs. Se sabe que la IL-6 participa en la proliferación de fibroblastos y aumenta la diferenciación a miofibroblastos y el desarrollo de fibrosis. Esta citoquina además media mecanismos apoptóticos, al activar factores asociados a la apoptosis como la caspasa-3 y smad-3 y disminuir la expresión del factor antiapoptótico Bcl2 [142]. Por lo tanto, Ang II podría a través del aumento de MCP-1 e IL-6 estar favoreciendo mecanismos apoptóticos, profibróticos, angiogénicos, los cuales podrían prevenirse con RvD1.

Sobre el efecto de RvD1 para prevenir el aumento de la adhesión de SMC a FCs, como se mencionó anteriormente se sabe que Ang II aumenta los niveles de las integrinas [132] [133] [134] y sugerimos que estas podrían ser las proteínas de adhesión que estarían participando en el aumento de la adhesión, pues además hay evidencia de que las resolvinas reducen la expresión de estas proteínas. Por ejemplo, las resolvinas, entre ellas las de la serie D, actúan directamente sobre los PMN y reducen la expresión superficial de los receptores de adhesión CD11b / CD18 (integrina) [11]. Se sabe que los fibroblastos cardíacos (CF) expresan integrinas, tales como  $\alpha$ 1 $\beta$ 1,  $\alpha$ 2 $\beta$ 1,  $\alpha$ 3 $\beta$ 1,  $\alpha$ 4 $\beta$ 1,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1,  $\alpha$ 6 $\beta$ 1, así como  $\alpha$ v $\beta$ 1,  $\alpha$ v $\beta$ 3 y  $\alpha$ v $\beta$ 5 [143]. Estos pares de integrinas juegan papeles críticos en la remodelación cardíaca a través de la interacción ECM-integrina [143]. Hasta ahora no ha encontrado evidencia de que la RvD1 disminuya los niveles de integrinas en FCs. Sin embargo, dado este efecto de la RvD1 de disminuir la expresión de integrinas en PMN [11], existe la probabilidad de que este mismo efecto podría estarse dando en FCs. Claro esta, se deben realizar más estudios para comprobar esto.

### 7.3 Efecto de la resolvina D1 sobre la respuesta inflamatoria gatillada por LPS en FCs.

Con respecto a los efectos de LPS sobre los niveles de mRNA de las citoquinas en estudio, nuestros resultados coinciden con lo descrito en la literatura en FCs humanos, donde se evidenció mediante RT-qPCR, que el tratamiento con LPS a distintos tiempos aumentó de manera significativa los niveles de mRNA de IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  [144]. Hasta el momento, no se han encontrado reportes en la literatura que demuestren los efectos de LPS en FCs sobre los niveles de mRNA de IL-10. En otros tipos de fibroblastos también existe evidencia que coincide con nuestros hallazgos. Por ejemplo, en fibroblastos humanos pulmonares se observó que LPS aumentó los niveles de mRNA de MCP-1 e IL-6 [145]. En fibroblastos duodenales humanos se vio que el estímulo con LPS aumentó los niveles de mRNA de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 [146]. También, en fibroblastos gingivales humanos se encontró que el estímulo con LPS aumentó los niveles de mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  [147].

Con relación a los niveles de mRNA de las proteínas de adhesión, en la literatura, no se encontró evidencia similar a estos resultados en FCs de rata *Sprague Dawley*. No obstante, se ha reportado en fibroblastos corneales de ratas *Wistar* y de humanos, que el estímulo con LPS provocó un aumento en los niveles de mRNA de ICAM-1 [148]. En el caso de VCAM-1, se encontró aumento en los niveles de mRNA de esta molécula de adhesión luego del estímulo con LPS a las 6 horas en fibroblastos sinoviales y duodenales de humano [146, 149]. Los resultados obtenidos en esta investigación conciben con estos reportes.

Con respecto a los niveles de citoquinas secretadas y de proteínas de adhesión expresadas, ambos por el estímulo con LPS, nuestros resultados coinciden con lo que previamente se ha reportado al respecto, es decir, que el tratamiento de FCs con LPS aumenta significativamente la secreción de TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 e IL-10, así como los niveles de proteínas ICAM-1 y VCAM-1 [65].

En FC humanos tratados con LPS 1  $\mu\text{g/mL}$  hay evidencia de que dicho tratamiento indujo un fuerte aumento en la secreción 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 [150]. Estos resultados y antecedentes expuestos reafirman el hecho de que los FCs son capaces de responder ante una condición proinflamatoria. Además, en fibroblastos pulmonares humanos se demostró que LPS aumentó la secreción de MCP-1 e IL-6 [145]. Otro reporte de la literatura, mostró 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 [151].

Por otra parte, en los FC las proteínas ICAM-1 y VCAM-1 están expresadas constitutivamente, pero durante un evento inflamatorio cardíaco se ha visto un aumento en los niveles de expresión, lo que se han asociado a la infiltración y activación de leucocitos al sitio de daño. Tal incremento de la adhesión de SMC a FCs se ha reportado al estimular células cardíacas con LPS, IL-1, TGF- $\beta$ 1, ésteres de forbol,

entre otros [73]. Con respecto a los resultados obtenidos en cuanto a la adhesión de SMC a FCs, nuestros hallazgos concuerdan con antecedentes de nuestro laboratorio donde se observó en FCs de ratas neonatas estimulados con LPS y heparán sulfato un aumento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, obteniendo máxima expresión de estas moléculas de adhesión a las 24 horas tras el estímulo proinflamatorio, lo que a su vez aumentó la adhesión de SMC a FCs [65, 73,152,153]. Estos resultados conciben con otros obtenidos en otros tipos celulares como fibroblastos corneales donde LPS aumentó la expresión de ICAM-1 [154], así como también, en células mesangiales de riñón humano donde la exposición a LPS incrementó la expresión de VCAM-1 [155].

Con respecto al efecto de la RvD1 sobre los efectos de LPS de aumentar los niveles de mRNA de las citoquinas y proteínas de adhesión en estudio, nuestros resultados no coinciden con hallazgos previos reportados en la literatura en otros modelos celulares. Ya que, en la literatura se reporta por ejemplo, que 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 [15, 99]. Además, 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 [156]. En un modelo de inflamación en células epiteliales de córnea humana, la RvD1 redujo los niveles de mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and IL-8 [157]. 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 esta disminución, a su vez, redujo drásticamente la adhesión de monocitos en este tipo celular [158]. También, 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 [159]. Las diferencias obtenidas podrían explicarse debido al modelo utilizado en estas investigaciones y a que para LPS el efecto de RvD1 podría ser más tardío en cuanto a la disminución de los mensajeros y no alcanza a hacer frente al poderoso estímulo de LPS a tiempos tempranos (como los que acá observamos), pero sí a tiempos más tardíos (tiempos en los cuales nosotros no evaluamos los niveles de mRNA). Además, cabe considerar que, en esta investigación la concentración de LPS utilizada es 1/5 de la concentración de Ang II (0,2  $\mu$ M LPS vs 1  $\mu$ M Ang II) y aún con esto, los efectos de LPS sobre las citoquinas y proteínas de adhesión fueron más intensos que los que se observaron con AngII, por lo que sin duda la respuesta de LPS como proinflamatorio es mucho más potente. Para ambos estímulos, se utilizaron las concentraciones que previamente se han utilizado en otras investigaciones reportadas en la literatura.

En cuanto a los niveles de citoquinas secretados, RvD1 sí previno el aumento de los niveles de secreción de IL-6, MCP-1 y mostró una tendencia a prevenir el aumento de TNF- $\alpha$ . Hasta ahora, no se ha reportado evidencia acerca del efecto de la RvD1 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.

Se ha reportado en monocitos humanos estimulados con LPS, que la RvD1 disminuyó la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , además de potenciar aún más la secreción de IL-10 inducida por LPS [160]. Se ha demostrado en modelos de isquemia/reperfusión hepática, donde 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 [161]. 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, y no así en FC.

Por otra parte, se ha encontrado en modelos de retinopatía diabética en ratones que la RvD1 disminuye la secreción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en el epitelio corneal [162]. 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 [163].

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 MCP-1 e IL-6 conduce a la resolución de la inflamación y el comienzo de la reparación del tejido cardíaco dañado.

Además, nuestros resultados son similares a lo que se ha reportado para otra resolvina, la RvE1, con la que se observó que esta disminuyó el reclutamiento de PMN en modelos de piel [164], periodontitis [165], peritonitis, colitis [166], entre otros.

Sobre los niveles de proteínas de adhesión, los resultados obtenidos coinciden parcialmente con lo reportado en la literatura, pues RvD1 solo previno el aumento de VCAM-1 y no así el de ICAM-1. En la literatura hay evidencia de los efectos de la RvD1 sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en variados modelos de inflamación y daño tisular. Por ejemplo se ha visto que la RvD1 disminuye la expresión de ICAM-1 en un modelo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica por tabaquismo en ratones [167]. Por otro lado, en un modelo de inflamación en células endoteliales de retina de macaco, la RvD1 disminuyó la expresión de VCAM-1 inducida por IL-1 $\beta$ .

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 se ha encontrado que la disminución de alguna de estas proteínas, inhibe significativamente la adhesión de células del sistema inmune [65,73]. Dado que RvD1 disminuyó los niveles de VCAM-1 era de esperarse que la adhesión de SMC a FCs también disminuyera. Estos resultados se complementan con resultados previos de nuestro laboratorio, donde RvD1 logró

disminuir la adhesión gatillada por LPS de SMC a FCs de ratas neonatas [96]; y también la adhesión de SMC a FCs de rata adulta gatillada por HS [153].

Con respecto a los efectos de RvD1 de prevenir el aumento en la adhesión de SMC a FCs gatillada por LPS, estos resultados concuerdan con los observados para RvD1 respecto a la adhesión gatillada por LPS en FCs neonatos y por HS en FCs adultos, y en ambos casos RvD1 previno el aumento de la adhesión. 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- $\alpha$  y disminuir el reclutamiento de neutrófilos hacia el ventrículo izquierdo de ratas infartadas. Incluso, mostró modular el tráfico de monocitos y el aclaramiento de macrófagos [43]. Por otro lado, la AT-RvD1 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 [130].

Las diferencias encontradas entre la respuesta inflamatoria gatillada por Ang II respecto a la de LPS, así como las diferencias en los efectos inhibitorios que RvD1 presentó sobre los efectos proinflamatorios de AngII y LPS pueden explicarse debido a que, si bien ambos son estímulos proinflamatorios, sus acciones farmacológicas ocurren por mecanismos distintos. Se ha reportado que, Ang II favorece la producción de diferentes moléculas consideradas DAMPs, tales como las especies reactivas de oxígeno (ROS), citoquinas como MCP-1, además de aumentar la expresión de los receptores TLR4 que reconocen estos DAMPs y otros [168]. Sin embargo, Ang II por sí misma no activa al receptor TLR4 sino que como es conocido y se ha mencionado ampliamente, sus efectos son ejercidos principalmente a través de los receptores AT1R y AT2R. LPS en cambio, es un PAMPs, es reconocido directamente por el receptor TLR4, desencadenando así su respuesta inflamatoria. Antecedentes publicados hacen referencia a que la respuesta inflamatoria de los PAMPs ha mostrado ser más robusta que la que desencadenan los DAMPs por ejemplo en cuanto a la inducción de citoquinas [169].

En su conjunto estos resultados refuerzan la idea de los FC como células especializadas en la adhesión 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 VCAM-1, ofrece nuevas perspectivas en respuesta al daño, y por lo tanto, posiciona a este mediador lipídico como un importante agente terapéutico por sus efectos pro-resolutivos en daño cardíaco.

Una vez más, en general, las diferencias encontradas pueden explicarse debido a los tipos celulares y de estímulo proinflamatorio utilizado, considerando además las diferencias en la potencia de la respuesta que cada estímulo puede desencadenar. Sin embargo, consideramos que nuestros hallazgos y la evidencia existente en la literatura, aportan evidencia para considerar que la RvD1 ejerce un importante efecto antiinflamatorio a nivel de la expresión de proteínas proinflamatorias en la etapa transcripcional y además que la respuesta de la RvD1 será particular para los diferentes tejidos.

## 7.4 Limitaciones

Este trabajo se enfocó en los efectos proinflamatorios en FCs en cultivo que gatillaron Ang II y LPS, específicamente sobre la expresión /secreción de IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-1  $\beta$ , ICAM-1 y VCAM-1 y el efecto sobre la adhesión de SMC a FCs. Además, se determinó el efecto que RvD1 causó al ser utilizado previo a estos estímulos. Lo anterior, se llevó a cabo en un sistema aislado bajo condiciones controladas tal como lo es el cultivo celular. El uso de un modelo *in vitro* como este, resulta útil para estudiar la respuesta inflamatoria de los FC y la interacción con otras células, como este caso los SMC. Sin embargo, nuestro modelo *in vitro* no considera el resto de células presentes en el tejido cardiaco, tales como cardiomiocitos, células vasculares, neutrófilos y linfocitos; los que pueden influenciar el comportamiento y actividad de monocitos y/o FCs. Tampoco este modelo considera las respuestas fisiológicas propias del organismo completo, las cuales es de esperar influyan las respuestas que ocurren en los diferentes tipos celulares del organismo, en este caso las ratas SD. Bajo estas condiciones, si bien es cierto nuestros resultados aportan evidencia valiosa para conocer y comprender más sobre la participación de los FCs y la RvD1 en la respuesta inflamatoria cardíaca en rata y pueden ofrecer indicios de lo que podría esperarse en seres humanos, lo cierto es que es indispensable realizar ensayos en modelos *in vivo* en animales y por supuesto en FCs humanos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por otra parte, en esta investigación, los niveles de proteína ICAM-1 y VCAM-1 fueron determinados mediante inmunoblot, técnica que permite separar e identificar proteínas de acuerdo a su peso molecular y permite determinar niveles relativos de las proteínas, mas no permite establecer su localización celular o cambios en ese sentido. Este trabajo no contempló ensayos para evaluar posibles cambios en la localización celular de las proteínas estudiadas. Considerando el aumento observado con Ang II sobre la adhesión de SMC a FCs y la relevancia que tendrían los posibles efectos de Ang II sobre ICAM-1 y VCAM-1 se hace necesario considerar incluir este tipo de ensayos en futuras investigaciones.

## 8. CONCLUSIONES

Con respecto a la hipótesis planteada para esta investigación: RvD1, vía receptor ALX/FPR2, disminuye la expresión de ICAM-1, VCAM-1, de las citoquinas IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  y la adhesión de monocitos, en los procesos pro-inflamatorios gatillados por Ang II y/o LPS en FCs de rata, se logro detectar la presencia de los receptores ALX/FPR2 en los FCs y se observó que la RvD1 no modificó los niveles basales de Ca<sup>+2</sup> intracelular y si inhibió los niveles de Ca<sup>+2</sup> frente al estímulo positivo con Ang II. RvD1 disminuyó los niveles de proteína VCAM-1, la secreción de IL-6 y MCP-1 y la adhesión de SMC a FCs

gatillado por LPS, además, RvD1 disminuyó la expresión/secreción de IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  (solo mRNA) y la adhesión de SMC a FCs gatillado por Ang II. Por otra parte, el estímulo con Ang II no aumentó la expresión de ICAM-1 y VCAM-1. Finalmente, cabe mencionar que RvD1 por sí misma no modificó la expresión de ninguna de las proteínas estudiadas, ni la adhesión de SMC a FCs, sus efectos se observaron solamente frente a la presencia de los estímulos proinflamatorios con Ang II y LPS.

Los resultados obtenidos en esta investigación aportan la primera evidencia de la expresión de los receptores ALX/FPR2 en FCs de rata adulta, sugiriendo la capacidad de los FCs de responder a la acción de la RvD1. Esto se sumaría a los aportes que resaltan el rol de los FCs como participantes activos del proceso inflamatorio cardíaco así como también del proceso de reparación del tejido, más aún al tomar en cuenta que los niveles de los receptores se incrementan frente a estímulos proinflamatorios-profibróticos. La RvD1 podría estar ejerciendo sus efectos a través del receptor ALX/FPR2 modificando los niveles de Ca<sup>+2</sup> intracelular, ión que se sabe participamente de manera importante en diferentes vías de señalización que llevan a la producción de proteínas de la inflamación. RvD1 al disminuir significativamente la señal de calcio, podría estar previniendo los estos efectos proinflamatorios.

Con respecto a los efectos de Ang II vía receptor AT1R sobre los fibroblastos cardíacos podemos afirmar entonces que Ang II aumenta los niveles de mRNA y proteína secretada de IL-6, MCP-1 y aumenta los niveles de mRNA de TNF- $\alpha$  en FCs de rata adulta lo que nos permite decir que los efectos proinflamatorios de Ang II repercuten tanto a nivel del proceso de transcripción como de secreción de estas proteínas y este efecto es ejercido a través de su receptor AT1. Lo que además corrobora la expresión de estos receptores en los FCs y de nuevo aporta evidencia de la capacidad de estas células de responder frente a estímulos proinflamatorios-profibróticos como la Ang II, que a través del aumento de MCP-1 e IL-6 podría estar favoreciendo mecanismos apoptóticos, profibróticos, angiogénicos y favorecer el daño cardíaco.

La RvD1 mostró ser capaz de contrarrestar algunos de los efectos proinflamatorios de Ang II y LPS; y posee un elevado grado de correlación respecto a lo que se ha reportado en literatura en otros tipos de fibroblastos y otros tipos celulares, confirmando los efectos proresolutivos de la inflamación que han reportado. En este caso, RvD1 disminuyó la producción de mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 y la adhesión de SMC a FCs, lo cual a nivel cardiovascular podría contribuir a la resolución de la inflamación y el comienzo de la reparación del tejido cardíaco dañado.

En su conjunto estos resultados refuerzan la idea de los FC como células centinelas, participantes activos en la adhesión 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 VCAM-1 (para el caso de LPS) y probablemente también de otras proteínas de adhesión, ofrece

nuevas perspectivas en respuesta al daño, y por lo tanto, posiciona a este mediador lipídico como un importante agente terapéutico por sus efectos pro-resolutivos en daño cardíaco

Finalmente, es importante señalar que no se encontró en esta investigación diferencia significativa al utilizar RvD1 antes o después del estímulo con Ang II, esto aporta evidencia de que la RvD1 tiene efectos proresolutivos y además preventivos de la inflamación y esto hace que su utilidad en el tratamiento de procesos inflamatorios sea más amplia.

Futuras investigaciones permitirán dilucidar con mayor claridad los mecanismos implicados en los efectos encontrados para RvD1 en FCs de rata, tanto en lo que respecta al mecanismo efector asociado a su receptor como a las vías de señalización implicadas en sus efectos proresolutivos frente a los efectos gatillados por Ang II y LPS.

A su vez, los resultados obtenidos sugieren que los FCs cardíacos si bien tienen la capacidad de responder a distintos estímulos pro-inflamatorios, la respuesta no es la misma para todo tipo de estímulo, sino que tiene sus particularidades en cuanto a la intensidad de la respuesta y en cuanto a las moléculas que se incrementan, dado que por ejemplo la respuesta de Ang II y LPS mostró similitudes y también importantes diferencias.

## 9. REFERENCIAS

- [1] Organización Mundial de la Salud, «Enfermedades cardiovasculares,» 2018. [En línea]. Available: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/es/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/). [Último acceso: 30 11 2018].
- [2] Organización Panamericana de la Salud, «Prioridades para salud cardiovascular en las Américas,» Washington D.C., 2011.
- [3] Fairweather D, Petri M, Coronado M y Cooper L , «Autoimmune heart disease: role of sex hormones and autoantibodies in disease pathogenesis,» *Expert Review of Clinical Immunology*, vol. 3, n° 8, pp. 269-84, 2012.
- [4] Marchant D, «Inflammation in myocardial diseases,» *Circ Res*, vol. 110, n° 1 , pp. 126-144, 2012.
- [5] Díaz-Araya G, Vivar R, Humeres C, Boza P, Bolivar S y Muñoz C, «Cardiac fibroblasts as centinel cells in cardiac tissue: Receptors, signaling pathways and cellular functions,» *Pharmacological Research*, n° 101, pp. 30-40, 2015.
- [6] Bevilacqua M et al, «Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes and related leukocytes cell lines,» *Journal of Clinicañ Investigation*, vol. 76, pp. 2003-2011, 1985.
- [7] Majno G, *Cells, tissues and disease principles of general pathology*, New York, USA: Oxford University Press, 2004.
- [8] Romero S, Iregui C, «El Lipopolisacárido.,» *Revista de Medicina Veterinaria.*, n° 19, pp. 37-45, 2010
- [9] Chen G, Nunez G, «Sterile inflammation:sensing and reacting to damage,» *Nature Reviews Immunology*, vol. 10, pp. 826-837, 2010.
- [10] Tang D, Kang R, Coyne C, Zeh H, Lotze M, «PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity,» *Immunol Rev*, vol. 249, n° 1, pp. 158-175, 2012
- [11] Sansbury B, Spite M, «Resolution of acute inflammation and the role of resolvins in immunity, thrombosis and vascular biology,» *Circ Res*, vol. 119, n° 1, pp. 113-130, 2016.
- [12] Kai H et al, «Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis.,» *Hypertens Research*, vol. 28, n° 6, pp. 483-490, 2005.
- [13] Fotis L et al, «Intercellular Adhesion Molecule (ICAM-1) and Vascular Cell Adhesion (VCAM-1) at the early stages of atherosclerosis in a rat model,» *In vivo*, vol. 26, n° 2, pp. 243-250, 2012.
- [14] Rosas-Ballina M, Olofsson O, Ochani M et al, «Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit,» *Science*, vol. 334, n° 6052, pp. 98-101, 2011.
- [15] Recchiuti A, «Resolvin D1 and its GPCRs in resolution circuits of inflammation,» *Prostaglandins & Other lipid mediators*, vol. 107, pp. 64-76, 2013.

- [16] Serhan C, Chiang N y Van Dyke T, «Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators,» *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, nº 5, pp. 349-361, 2008.
- [17] Sivangala R, Sumanlatha G, «Cytokines that mediate and regulate immune responses,» *Austin Publishing Group*, 2015.
- [18] Jawetz M & Adelberg, «Immunology,» de *Medical Microbiology*, New York, McGraw-Hill.
- [19] Lin, C et al, «Tumor necrosis factor-alpha induces VCAM-1-mediated inflammation via c-Src-dependent transactivation of EGF receptors in human cardiac fibroblast.,» *J Biomed Sci*, vol. 22, nº 1, p. 53, 2015.
- [20] Parameswaran N, Patial S, «Tumor Necrosis Factor-alpha Signaling in Macrophages,» *Crit Rev Eukariot Gene Expr*, vol. 20, pp. 87-103, 2010
- [21] Pfeffer K, «Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors,» *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 14, pp. 185-191, 2003.
- [22] Lopez-Castejon G, Brough D, «Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion,» *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 22, nº 4, pp. 189-195, 2011.
- [23] Boza P, Ayala P, Vivar R, Humeres C, Caceres F, Muñoz C et al, «Expression and function of toll-like receptor 4 and inflammasomes in cardiac fibroblast and myofibroblast: IL-1 $\beta$  synthesis, secretion and degradation.,» *Mol Immunol*, vol. 74, pp. 96-105, 2016.
- [24] Weber A, Wasiliew P, Kratch M, «Interleukin-1 (IL-1) Pathway,» *Science Signaling*, vol. 3, pp. 1-6, 2010.
- [25] Acuner S, et al «The structural pathway of interleukin (IL-1) initiated signaling reveals mechanisms of oncogenic mutations and SNPs in inflammation and cancer,» *PLoS Comput Biol*, vol. 10, 2014.
- [26] Muñoz-Cánoves P, et al «Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword,» *FEBS J*, vol. 280, pp. 4131-4148, 2013.
- [27] Gabay C, «Interleukin-6 and chronic inflammation,» *Arthritis Res Ther*, vol. 8, 2006.
- [28] Heinrich P, et al, «Interleukin-6-type cytokine signaling through the gp130/Jak/STAT pathway,» *Biochem J*, vol. 334, pp. 297-314, 1998.
- [29] 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*, vol. 64, pp. 61-71, 2004.
- [30] Deshmane S, et al, «Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview,» *Journal of Interferon & Cytokine Research*, vol. 29, pp. 313-326, 2009.
- [31] Moore K, et al, «Interleukin-10,» *Annu Rev Immunol*, vol. 11, pp. 165-190, 1993.
- [32] Moore K, et al, «Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor,» *Annu Rev Immunol*, vol. 19, pp. 683-765, 2001.

- [33] Goumans M, Ten Dijke P, «TGF- $\beta$  Signaling in Control of Cardiovascular Function,» *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 10, n° 2, p. a022210, 2018.
- [34] Hynes R, «Cell adhesion: old and new questions,» *Trends in neurosciences*, vol. 9, n° 12, pp. M33-M37, 1999.
- [35] Luo B, Carman C, Springer T, «Structural basis of integrin regulation and signaling,» *Annual review of immunology*, vol. 24, pp. 619-647, 2007.
- [36] Springer, T «Adhesion receptors of the immune system,» *Nature*, vol. 346, pp. 425-434, 1990.
- [37] Bevilacqua M et al, «Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease,» *Annual review of medicine*, vol. 45, pp. 361-378, 1994.
- [38] Kong D, Kim Y, Jang J, Lee S «Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer,» *Int J Mol Sci*, vol. 19, n° 4, p. 1057, 2018.
- [39] Serhan C, «Systems approach to inflammation resolution: identification of novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators,» *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 7, n° 1, pp. 44-48, 2009
- [40] Haeggstrom J, «Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease,» *Chemical Reviews*, n° 111, pp. 5866-5898, 2011
- [41] Valenzuela R, Tapia G, González M, y Valenzuela A, «Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas,» *Revista Chilena de Nutrición*, vol. 38, n° 3, 2011.
- [42] Serhan C, Krishnamoorthy S, Recchiuti A y Chiang N, «Novel anti-inflammatory–Pro-resolving mediators and their receptor,» *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 11, n° 6, pp. 629-647, 2011.
- [43] Kain V, Ingle K, Colas R, Dalli J, 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*, vol. 84, pp. 24-35, 2015
- [44] Serhan C, «Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology,» *Nature*, vol. 7503, n° 510, pp. 92-101, 2014.
- [45] Bäck M et al, «Formylpeptide receptors: FPR2/ALX. IUPHAR/BPS. Guide to PHARMACOLOGY.,» 06 09 2020. . [En línea]. Available: <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=223..>
- [46] Fiore S, Romano M, Reardon EM, Serhan C «Induction of functional lipoxin A4 receptors in HL-60 cells,» *Blood.*, vol. 81, n° 12, pp. 3395-403, 1993.
- [47] Lad PM, Olson C, Smiley P «Association of the N-formyl-Met-Leu-Phe receptor in human neutrophils with a GTP-binding protein sensitive to pertussis toxin,» *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 82, n° 3, pp. 869-873, 1985.



- [48] Partida-Sánchez S, Cackayne D, Monard S et al « Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo.,» *Nat. Med.*, vol. 7, n° 11, p. 1209-1216, 2001.
- [49] Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, et al «Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors,» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, n° 4, pp. 1660-1665, 2010
- [50] Sun Y-P, Oh S, Uddin J, Yang R et al «Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer: stereochemical assignments, anti-inflammatory properties and enzymatic inactivation. .,» *J Biol Chem*, vol. 282, n° 9323, p. 9334, 2007.
- [51] Luan H, Wang C, Sun J et al «Resolvin D1 Protects Against Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury by Increasing Treg Percentages via the ALX/FPR2 Pathway.,» *Front Physiol*, vol. 11, p. 285, 2020.
- [52] Qu X, Zhang X, Song J, Nikolic-Paterson D y Li J, «Resolvins E1 and D1 inhibit interstitial fibrosis in the obstructed kidney via inhibition of local fibroblast proliferation,» *The Journal of Pathology*, vol. 228, n° 4, pp. 506-519, 2012.
- [53] Hsiao H, Thatcher T, Levy E, Fulton R et al «Resolvin D1 Attenuates Polyinosinic-Polycytidylic Acid-Induced Inflammatory Signaling in Human Airway Epithelial Cells via TAK1,» *The Journal of Immunology*, vol. 193, n° 10, pp. 4980-4987, 2014.
- [54] 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 Inflamm*, vol. 49, 2013.
- [55] Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP et al «Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter pro-inflammation signals.,» *J Exp Med*, vol. 196, pp. 1025-1037, 2002
- [56] Khaled M et al, «Effects of resolvin D1 on cell survival and cytokine expression of human gingival fibroblasts.,» *J Periodontol.* , vol. 84, pp. 1838-1846, 2013.
- [57] Kain V, Halade GV, «Immune responsive resolvin D1 programs peritoneal macrophages and cardiac fibroblast phenotypes in diversified metabolic microenvironment.,» *J Cell Physiol.* , vol. 234, n° 4, pp. 3910-3920, 2019.
- [58] Brouty-Boyé D, Pottin-Clémenceau C, Doucet C, Jasmin C y Azzarone B, «Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts,» *European Journal of Immunology*, vol. 30, n° 3, pp. 914-919, 2000.
- [59] Lindner D, Zietsch C y Moritz Becher P, «Differential expression of matrix metalloproteases in human fibroblasts with different origins,» *Biochemistry Research International*, 2012.
- [60] Porter K y Turner N, «Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodelling,» *Pharmacology & therapeutics*, vol. 2, n° 31, pp. 255-278, 2009.

- [61] Turner N y Porter K, «Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction,» *Fibrogenesis Tissue Repair*, vol. 6, n° 1, p. 5, 2013.
- [62] Van Linthout S, Miteva K y Tschöpe C, «Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells,» *Cardiovascular Research*, vol. 102, n° 2, pp. 258-269, 2014.
- [63] Zhang W, Xu X, Kao R, Mele T y Kvietys P, «Cardiac Fibroblasts Contribute to Myocardial Dysfunction in Mice with Sepsis: The Role of NLRP3 Inflammasome Activation,» *PLoS ONE*, vol. 9, n° 9, 2014.
- [64] Frangogiannis N, «The inflammatory response in myocardial infarction.,» *Cardiovasc Res.*, vol. 53, n° 1, pp. 31-47, 2002
- [65] 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.* , 2016.
- [66] Lindner D et al, «Cardiac fibroblasts support cardiac inflammation in heart failure.,» *Basic Res Cardiol.* , vol. 109, n° 5, p. 428, 2014.
- [67] Gomez PF et al, «Resolution of inflammation: prostaglandin E2 dissociates nuclear trafficking of individual NF-kappaB subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts.,» *J Immunol.* , vol. 175, n° 10, pp. 6924-30, 2005.
- [68] Ayala Jeria P, «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.
- [69] Beutler B, Rietschel E «Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin.,» *Nat Rev Immunol*, vol. 3, pp. 169-176, 2003.
- [70] Rhee S., «Lipopolysaccharide: basic biochemistry, intracellular signaling, and physiological impacts in the gut.,» *Intest Res.* , vol. 12, n° 2, p. 90-95. , 2014.
- [71] Laird M et al, «TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling.,» *J. Leukoc. Biol.*, vol. 85, pp. 966-977, 2009.
- [72] Verstrepen L et al, «TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme.,» *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 65, pp. 2964-2978., 2008.
- [73] 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.* , vol. 1864, pp. 831-842, 2018.
- [74] Kumar R, Boim M «Diversity of pathways for intracellular angiotensin II synthesis.,» *Curr Opin Nephrol Hypertens.* , vol. 18, n° 1, pp. 33-39, 2009.
- [75] Muñoz-Durango N et al, «Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System beyond Blood Pressure Regulation: Molecular and Cellular Mechanisms Involved in End-Organ Damage during Arterial Hypertension.,» *Int J Mol Sci.* , vol. 17, n° 7, p. 797, 2016.

- [76] Satou R, Penrose H, Navar L «Inflammation as a Regulator of the Renin-Angiotensin System and Blood Pressure,» *Curr Hypertens Rep.*, vol. 20, n° 12, p. 100, 2018.
- [77] Biancardi V, Facholi G, Reis W et al «The interplay between Angiotensin II, TLR4 and hypertension.» *Pharmacological Research.* , n° 120, pp. 88-96, 2017.
- [78] Boza, P «Angiotensina II activa el inflammasoma en fibroblastos cardiacos.» *Tesis Doctorado en Farmacología, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas*, 2016.
- [79] Jia L, Li Y, Xiao C Du J «Angiotensin II induces inflammation leading to cardiac remodeling.» *Front Biosci* , vol. 17, pp. 221-231, 2012.
- [80] De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T et al «International union of pharmacology XXIII. The angiotensin II receptors.» *Pharmacol Rev.* , vol. 52, pp. 415-472, 2000.
- [81] Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD y Coffman TM «Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology.» *Physiological Reviews*, vol. 98, n° 3, pp. 1627-1738, 2018.
- [82] Vivar R, Soto C, Copaja M, Mateluna F et al «Phospholipase C/Protein Kinase C Pathway Mediates Angiotensin II-Dependent Apoptosis in Neonatal Rat Cardiac Fibroblasts Expressing AT1 Receptor,» *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, vol. 52, n° 2, pp. 184-190, 2008.
- [83] National Center for Biotechnology Information., «PubChem Database. Angiotensin II, CID=172198,» [En línea]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Angiotensin-II> . [Último acceso: 16 May 2020].
- [84] Schmidt B, Schieffer B «Angiotensin II AT1 Receptor Antagonists. Clinical Implications of Active Metabolites,» *Journal of Medicinal Chemistry.* , vol. 46, n° 12, pp. 2261-2270, 2003.
- [85] Barrios V, «Insuficiencias cardiacas bloqueadoras de los receptores de Angiotensina II.» *Rev. Costarricense de Cardiología. 2001[cited 2019 Oct21]Availablefrom: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-414220010003000](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-414220010003000)*.
- [86] National Center for Biotechnology Information., «PubChem Database. PD123319, CID=5311345, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/pd123319> (accessed on May 17, 2020) (77)».
- [87] Aránguiz-Urroz P, «Sobre-expresión de receptores tipo AT1 y AT2 de Angiotensina II en Fibroblastos Cardíacos adultos de rata: Participación en el equilibrio de sobrevida/muerte celular inducida por Angiotensina II.» Tesis de pregrado. Universidad de Chile, Santiago, 2006.
- [88] Tadevosyan, A, Xiao J, Surinkaew S, Naud P et al «Intracellular Angiotensin-II Interacts With Nuclear Angiotensin Receptors in Cardiac Fibroblasts and Regulates RNA Synthesis, Cell Proliferation, and Collagen Secretion,» *Journal of the American Heart Association*, vol. 6, n° 4, 2017.

- [89] National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals., Guide for the Care and Use of Laboratory Animals., Washington (DC), USA: 8th edition. National Academies Press , 2011.
- [90] Bankowski Z, Howard-Jones N «Biomedical research involving animals: proposed international guiding.» CIOMS, Geneva:, 1984.
- [91] Bradford M «A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.» *Analytical Biochemistry*, vol. 72, pp. 248-254, 1976.
- [92] Cayman Chemical, «Cyclic AMP ELISA kit Booklet,» 29 10 2017. [En línea]. Available: <https://www.caymanchem.com/pdfs/581001.pdf>. [Último acceso: 26 11 2018].
- [93] Fraga D, Meulia T, Fenster S «Real-Time PCR.» *Current Protocols Essential Laboratory Techniques.*, vol. 8, n° 1, p. 10.3.1–10.3.40, 2014.
- [94] Castro A. «Niveles de expresión y actividad catalítica de Gal3-O-sulfotransferasas en glándulas salivales labiales de pacientes con síndrome de Sjögren.» *Tesis de Magister en Ciencias Biológicas Mención Biología Celular.*, 2010.
- [95] Pfaffl M, «A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR,» *Nucleic Acids Research.* , vol. 29, n° 9, pp. 45e-45, 2001.
- [96] Muñoz N «Resolvina D1 disminuye la adhesión de células mononucleares de bazo sobre fibroblastos cardiacos en ratas neonatas,» Tesis de pregrado. Universidad de Chile, Santiago, 2017.
- [97] Waechter V et al, «Characterization of the Promoter and the Transcriptional Regulation of the Lipoxin A4 Receptor (FPR2/ALX) Gene in Human Monocytes and Macrophages.» *The Journal of Immunology.* , vol. 188 , n° 4, pp. 1856-1867. , 2012.
- [98] Zhu M et al, «Differential regulation of resolution in inflammation induced by amyloid- $\beta$ 42 and lipopolysaccharides in human microglia.» *Journal of Alzheimer's disease.* , vol. 43, n° 4, pp. 1237-50. , 2015.
- [99] Rey C et al, «Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in microglial brain.» *Behavior and Immunity.* , pp. 249-259. , 2016.
- [100] Mou H, Li Z, Kong Y, Deng B et al «Proinflammatory Stimulants Promote the Expression of a Promiscuous G Protein-Coupled Receptor, mFPR2, in Microvascular Endothelial Cells.» *Inflammation*, vol. 35, n° 2, pp. 656-664, 2011.
- [101] Gronert K et al, «Identification of a human enterocyte lipoxin A4 receptor that is regulated by interleukin (IL)-13 and interferon gamma and inhibits tumor necrosis factor alpha-induced IL-8 release.» *J. Exp. Med.*, n° 187, pp. 1285-1294. , 1998.
- [102] Le Y, Iribarren P, Gong W, Cui Y et al. «TGF- $\beta$ 1 Disrupts Endotoxin Signaling in Microglial Cells through Smad3 and MAPK Pathways.» *The Journal Of Immunology*, vol. 173, n° 2, pp. 962-968, 2004.

- [103] Paglinawan R, Malipiero U, Schlapbach R, Frei K, «TGFb directs gene expression of activated microglia to an anti-inflammatory phenotype strongly focusing on chemokine genes and cell migratory genes.» *Glia*, vol. 44, n° 3, p. 219, 2003.
- [104] Zhang L, Wang G, Chen X, Xue X et al, «Formyl peptide receptors promotes neural differentiation in mouse neural stem cells by ROS generation and regulation of PI3K-AKT signaling.» *Scientific Reports*, vol. 7, n° 1, 2017
- [105] Cayupi J, «Vías de señalización intracelulares activadas por las Resolvinas D1 y E1 en fibroblastos cardíacos.» *Memoria de pregrado. Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.* , 2019.
- [106] Meszaros G et al, «Identification of G protein-coupled signaling pathways in cardiac fibroblasts: cross talk between Gq and Gs. American Journal of Physiology...» *Cellular Physiology.* , vol. 278, n° 1, pp. 150-154, 2000.
- [107] Rivas Espinosa C, «Conversación cruzada en las vías de señalización del receptor  $\beta$ 2-adrenérgico y B2 de cininas y su efecto en la adhesión, migración, secreción de colágeno y diferenciación en fibroblastos cardíacos. Tesis de pregrado. Universidad de Chile,» 2013.
- [108] Ostrom R et al, «Angiotensin II Enhances Adenylyl Cyclase Signaling via  $Ca^{+2}$ /Calmodulin.» *The Journal of Biological Chemistry.* , n° 278, pp. 24461-24468., 2003.
- [109] Lippestad M, Hodges R, Utheim T, Serhan C, Dartt D, «Resolvin D1 Increases Mucin Secretion in Cultured Rat Conjunctival Goblet Cells via Multiple Signaling Pathways.» *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 58, n° 11, pp. 4530-4544, 2017.
- [110] Nelson J, Leigh N, Mellas R, McCall A et al «ALX/FPR2 receptor for RvD1 is expressed and functional in salivary glands.» *American Journal of Physiology*, vol. 306, n° 2, pp. 178-185, 2014.
- [111] Molecular Probes, Fluo Calcium Indicators.» [En línea]. Available: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp01240.pdf>. .
- [112] «Molecular Probes, Fura and Indo Ratiometric Calcium Indicators.» [En línea]. Available: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp01200.pdf>.
- [113] Fredman G, Ozcan L, Spolitu S, Hellmann J 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 of the United States of America*, vol. 111, n° 40, pp. 14530-14535, 2014.
- [114] Timmins JM et al, «Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways.» *J Clin Invest* , vol. 119, n° 10, pp. 2925-2941, 2009.
- [115] Tabas I, «The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis.» *Circ Res* , vol. 107, n° 7, pp. 839-850, 2010.
- [116] Li D, Hodges RR, Jiao J, Carozza RB et al «Resolvin D1 and aspirin-triggered resolvin D1 regulate histamine-stimulated conjunctival goblet cell secretion.» *Mucosal Immunol.*, vol. 6, n° 6, pp. 1119-1130, 2013.

- [117] Putney J «New molecular players in capacitative Ca<sup>2+</sup> entry.,» *J Cell Sci.* 2007, n° 120, pp. 1959-1965, 2007.
- [118] Wettschureck N, Offermanns S, «Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions,» *American Physiological Society*, vol. 85, pp. 1159-1204, 2005.
- [119] Barrett PQ, Guagliardo NA, Klein PM, Hu C, Breault DT, Beenhakker MP. Role of voltage-gated calcium channels in the regulation of aldosterone production from zona glomerulosa cells of the adrenal cortex. *J Physiol.* 2016 Oct 15;594(20):5851-5860.
- [120] Mangmool S, Kurose H, «Gi/o Protein-Dependent and -Independent Actions of Pertussis Toxin (PTX),» *Toxins*, vol. 3, n° 7, pp. 884-899, 2011.
- [121] Shulze-Luehrmann S, «Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B.,» *Immunity*, vol. 25, pp. 701-715, 2006.
- [122] Cullen PJ, Lockyer PJ «Integration of calcium and Ras signaling.,» *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 3, pp. 339-348, 2002.
- [123] López-Bojorquez, L «La regulación del factor de transcripción NF-κB. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio,» *Rev Invest Clín* , vol. 56, n° 1, pp. 83-92, 2004.
- [124] Omura T, Yoshiyama M, Kim S, Matsumoto R, Nakamura Y, Izumi, Y, Yoshikawa J. «Involvement of Apoptosis Signal-Regulating Kinase-1 on Angiotensin II-Induced Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression,» *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.*, vol. 24, n° 2, pp. 270-275, 2004.
- [125] Sano M, Fukuda K, Sato T, Kawaguchi H et al «ERK and p38 MAPK, but not NF- B, Are Critically Involved in Reactive Oxygen Species-Mediated Induction of IL-6 by Angiotensin II in Cardiac Fibroblasts,» *Circulation Research*, vol. 89, n° 8, pp. 661-669, 2001.
- [126] Yokoyama T, Sekiguchi K, Tanaka T, Tomaru K et al «Angiotensin II and mechanical stretch induce production of tumor necrosis factor in cardiac fibroblasts.,» *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.*, vol. 276, n° 6, pp. H1968-H1976, 1999; 276(6).
- [127] Shu J, Liu Z, Jin L, Wang H «An RNA sequencing study identifies candidate genes for angiotensin II induced cardiac remodeling.,» *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease.* , vol. 1864, n° 1, pp. 1-10, 2018.
- [128] Pushpakumar S et al, «Toll-like Receptor 4 Deficiency Reduces Oxidative Stress and Macrophage Mediated Inflammation in Hypertensive Kidney.,» *Scientific reports.* , vol. 7, n° 1, p. 6349, 2017.
- [129] Jinlei L et al, «Cross-talk between angiotensin-II and toll-like receptor 4 triggers a synergetic inflammatory response in rat mesangial cells under high glucose conditions.,» *Biochemical and Biophysical Research Communications.* , vol. 459, n° 2, pp. 264-269, 2015.
- [130] Chen WD, Chu YF, Li XD, Gao PJ, «Angiotensin II induces expression of inflammatory mediators in vascular adventitial fibroblasts.,» *Acta physiologica Sinica.* , vol. 67, n° 6, pp. 603-610, 2015.

- [131] Turner N, «Human cardiac fibroblasts express ICAM-1, E-selectin and CXC chemokines in response to proinflammatory cytokine stimulation. The international journal of biochemistry & cell biol. 43 (10), 1453-1458. 2011 (101),» vol. 43, n° 10, pp. 1453-1458. , 2011
- [132] Manso AM, Kang SM, Ross RS «Integrins, focal adhesions, and cardiac fibroblasts.,» *J Investig Med.* , vol. 57, n° 8, pp. 856-860, 2009.
- [133] Burgess ML, Carver WE, Terracio L et al «Integrin-mediated collagen gel contraction by cardiac fibroblasts. Effects of angiotensin II.,» *Circ Res* , n° 74, pp. 291-298, 1994.
- [134] Thibault G, Lacombe MJ, Schnapp L et al «Upregulation of alpha(8)beta(1)-integrin in cardiac fibroblast by angiotensin II and transforming growth factor-beta1.,» *Am J Physiol Cell Physiol*, n° 281, pp. C1457-C1467, 2001.
- [135] Graf K, Neuss M, Stawowy P, Hsueh WA, Fleck E, Law RE. Angiotensin II and alpha(v)beta(3) integrin expression in rat neonatal cardiac fibroblasts. *Hypertension*. 2000;35:978–984.
- [136] Kawano H, Cody RJ, Graf K, Goetze S, Kawano Y, Schnee J, et al. Angiotensin II enhances integrin and alpha-actinin expression in adult rat cardiac fibroblasts. *Hypertension*. 2000;35:273–279.
- [137] Ma LJ, Yang H, Gaspert A, et al «Transforming growth factor-beta-dependent and -independent pathways of induction of tubulointerstitial fibrosis in beta6(-/-) mice.,» *Am J Pathol* , n° 163, pp. 1261-1273, 2003.
- [138] Wang D, Sun L, Zborowska E, et al«Control of type II transforming growth factor-beta receptor expression by integrin ligation.,» *J Biol Chem* , n° 274, p. 12840–12847. , 1999.
- [139] Dalton SL, Scharf E, Briesewitz R, et al «Cell adhesion to extracellular matrix regulates the life cycle of integrins.,» *Mol Biol Cell.* , vol. 6, n° 12, pp. 1781-1791, 1995.
- [140] Spinoza M et al, «Resolvin D1 decreases abdominal aortic aneurysm formation by inhibiting NETosis in a mouse model.,» *Journal of Vascular Surgery* , vol. 68, n° 6, pp. 93S-103S, 2018.
- [141] Ying X, Frangogiannis N «MCP-1/CCL2 as a Therapeutic Target in Myocardial Infarction and Ischemic Cardiomyopathy.,» *Inflammation & Allergy - Drug Targets (Discontinued)*. , n° 6, p. 101, 2007.
- [142] Jia-Hong W et al, «Hypoxia-stimulated cardiac fibroblast production of IL-6 promotes myocardial fibrosis via TGF-B1 signaling pathway.,» *Lab Invest.*, vol. 96, n° 8, pp. 839-852, 2016.
- [143] Chen C, Li R, Ross RS, Manso AM. Integrins and integrin-related proteins in cardiac fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;93:162-174. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.11.010
- [144] Tomita K, Takashina M, Mizuno N, Sakata K et al«Cardiac fibroblasts: contributory role in septic cardiac dysfunction.,» *Journal of Surgical Research.*, vol. 193, n° 2, pp. 874-887, 2015.

- [145] Quan B, Zhang X, Song J et al «miR-141 alleviates LPS-induced inflammation injury in WI-38 fibroblasts by up-regulation of NOX2.» *Life Sciences.* , n° 216, pp. 271-278, 2019.
- [146] Pang G, Couch L, Batey R, Clancy R, Cripps A «GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$ .» *Clinical & Experimental Immunology.* , vol. 96, n° 3, pp. 437-443, 2008
- [147] Kang W, Hu Z, Ge S «Healthy and Inflamed Gingival Fibroblasts Differ in Their Inflammatory Response to Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide.» *Inflammation.* , vol. 39, n° 5, pp. 1842-1852, 2016.
- [148] Zhu S, Xu X, Wang L, Su L et al «Inhibitory effect of a novel peptide, H-RN, on keratitis induced by LPS or poly(I:C) in vitro and in vivo via suppressing NF- $\kappa$ B and MAPK activation.» *Journal of Translational Medicine.*, vol. 15, n° 1, 2017.
- [149] Wu CY, Chi PL, Hsieh HL, Luo SF, Yang CM «TLR4-dependent induction of vascular adhesion molecule-1 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: Roles of cytosolic phospholipase A2 $\alpha$ /cyclooxygenase-2.» *Journal of Cellular Physiology.* , vol. 223, n° 2, p. 480, 2010.
- [150] Sandstedt J, «Human cardiac fibroblast isolated from patients with severe heart failure are immune-competent cells mediating an inflammatory response.» *Cytokine.* , vol. 113, pp. 319-325, 2019.
- [151] Tang L et al, «MicroRNA-146a negatively regulates the inflammatory response to Porphyromonas gingivalis in human periodontal ligament fibroblast via TRAF6/p38 pathway.» *J Periodontol.* , 2018.
- [152] Silva, N «Resolvina D1 disminuye la adhesión de SMC sobre fibroblastos cardíacos en ratas neonatas.» *Memoria de pregrado Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.* , 2017.
- [153] 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.
- [154] 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.* , vol. 164, n° 109-117, 2017.
- [155] 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 Commun Signal.* , vol. 10, n° 33, 2012.
- [156] Zhang T et al, «Resolvin D1 protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats.» *International Immunopharmacology.* , n° 28, pp. 322-327, 2015.
- [157] Erdinest N, Ovadia H, Kormas R, Solomon A «Anti-inflammatory effects of resolvin-D1 on human corneal epithelial cells: in vitro study.» *J Inflamm (Lond).* , vol. 11, n° 1, 2014.



- [158] Miyahara T et al, «D-series resolvin attenuates vascular smooth muscle cell activation and neointimal hiperplasia following vascular injury.» *The FASEB Journal.* , vol. 27, pp. 2220-2232, 2013.
- [159] Bento AF 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.* , vol. 187, pp. 1957-1969, 2011.
- [160] 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.* , vol. 22, pp. 186-195, 2016.
- [161] Kang, L «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.* , vol. 1861, pp. 1025-1035. , 2016.
- [162] Zhang Z et al, «Resolvin D1 promotes corneal epithelial wound healing and restoration of mechanical sensation in diabetic mice.» *Molecular Vision.* , n° 24, pp. 274-285, 2018.
- [163] Hsiao H et al, «A Novel Anti-Inflammatory and Pro-Resolving Role for Resolvin D1 in Acute Cigarette Smoke-Induced Lung Inflammation.» *Plos One.* , vol. 8, n° 3, 2013.
- [164] Sawada Y, Honda T, Hanakawa S et al «Resolvin E1 inhibits dendritic cell migration in the skin and attenuates contact hypersensitivity responses.» *J Exp Med.* , vol. 212, n° 11, pp. 1921-1930, 2015.
- [165] Hasturk H, Kantarci A, Ohira T et al «RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis.» *FASEB J.* , vol. 20, n° 2, pp. 401-403, 2006.
- [166] Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman J «Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis.» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102, n° 21, pp. 7671-7676, 2005.
- [167] Hsiao H et al, «Resolvin D1 Reduces Emphysema and Chronic Inflammation.» *Am J Pathol.* , vol. 185, pp. 3189-3201, 2015.
- [168] Nakashima T, Umemoto S, Yoshimura K, et al. TLR4 is a critical regulator of angiotensin II-induced vascular remodeling: the roles of extracellular SOD and NADPH oxidase. *Hypertens Res.* 38(10):649-655. 2015. doi:10.1038/hr.2015.55
- [169] Eppensteiner, J., Kwun, J., Scheuermann, U., Barbas, A., Limkakeng, A. T., Kuchibhatla, M., Elster, E. A., Kirk, A. D., & Lee, J. Damage- and pathogen-associated molecular patterns play differential roles in late mortality after critical illness. *JCI insight*, 4(16), e127925. 2019. doi.org/10.1172/jci.insight.127925

## 10. ANEXOS

### 10.1 Certificado del CICUA



Santiago, a 14 de marzo de 2018

Certificado n°: **18111-CYQ-UCH**

#### CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el protocolo número **CBE2017-13 CYQ-UCH** del Proyecto de Investigación titulado **"Efecto de la resolvin E1 sobre la expresión/secreción de mediadores inflamatorios y sobre el reclutamiento de monocitos mediado por Angiotensina II en fibroblastos cardíacos."**, cuyo Investigador es la estudiante de doctorado **Aimeé Salas Hernández** y cuyo patrocinante e Investigador Responsable es el **Dr. Guillermo Díaz Araya**, del Laboratorio de Farmacología Molecular, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

Los investigadores se han comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar modificación alguna sin previa notificación y posterior y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación, para el uso de **50 *Rattus norvegicus***, machos de 250 a 350 g., provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, desde septiembre del 2017 hasta diciembre del 2019, tiempo estimado de ejecución del proyecto, el cual será financiado por **FONDECYT REGULAR 1170425**.

*El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituida por 43 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del "Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales" después de un estudio acucioso y de la acogida de las investigaciones de las observaciones exigidas por el Comité.*

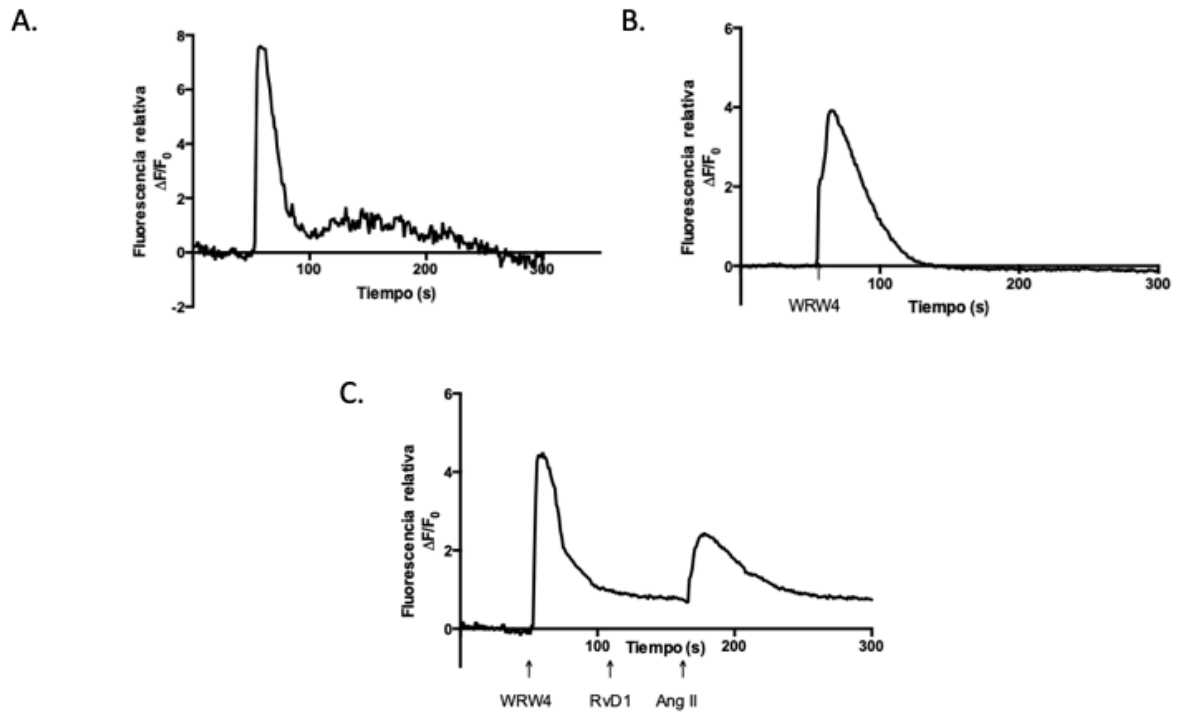
Dr. Cristian Ugaz Ruiz  
Director  
CICUA - VID  
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla  
Presidente  
CICUA - VID  
Universidad de Chile

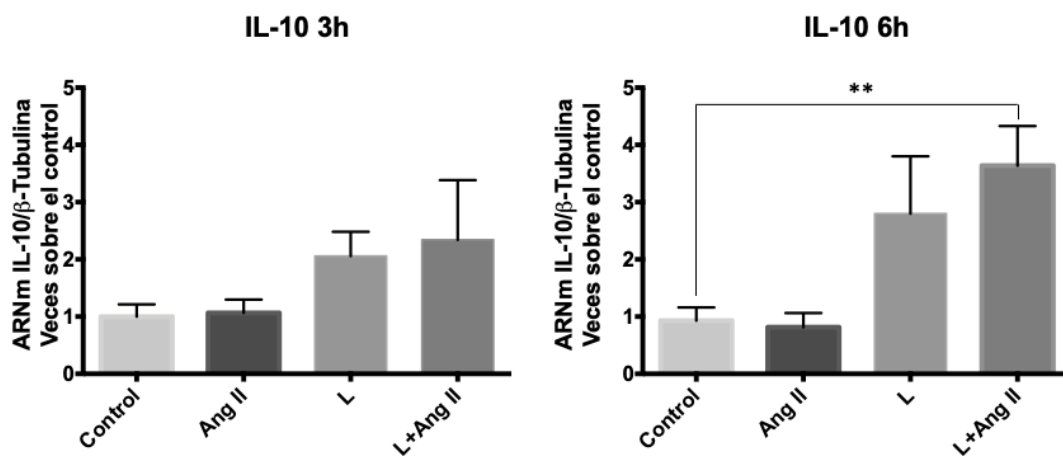
Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)  
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile  
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl

## 10.2 Resultados ensayo de $\text{Ca}^{+2}$ con WRW4

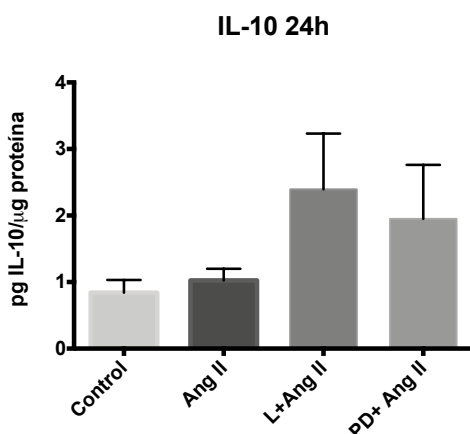


**Figura 40. Efecto de WRW4 como antagonista del efecto de RvD1 sobre la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático en FCs de rata adulta.** FCs fueron incubados por 30 minutos con sonda FLUO-4AM y luego estimulados con WRW4, WR4 + RvD1 (0,1  $\mu\text{M}$ ) 1 min después + Ang II (0,1  $\mu\text{M}$ ) 1 minuto después. A) y B) Imágenes representativas de las cinéticas de WRW4 para  $n=2$ , experimentos realizados en fechas diferentes. C) Imagen representativa de las cinética de WRW4 + 1 minutos después RvD1 + 1 minuto después Ang II.

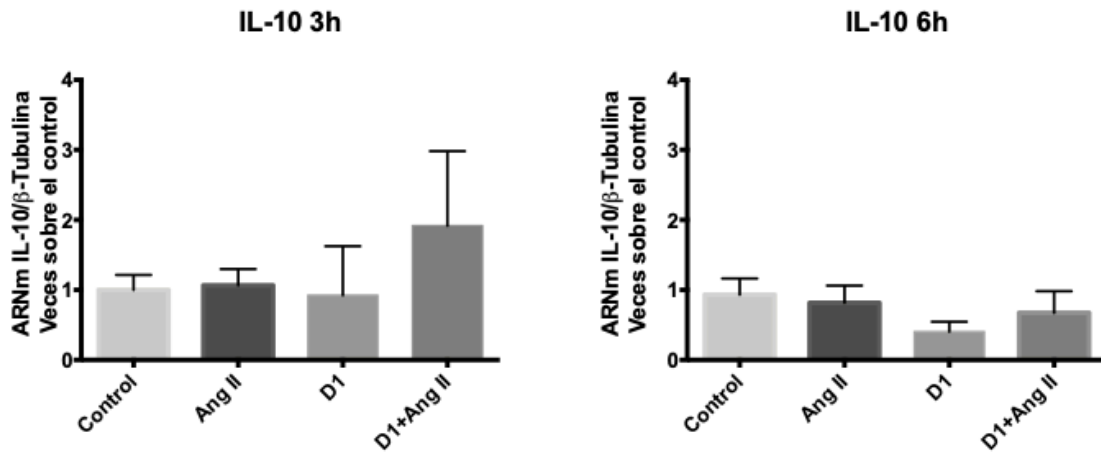
## 11. MATERIAL SUPLEMENTARIO



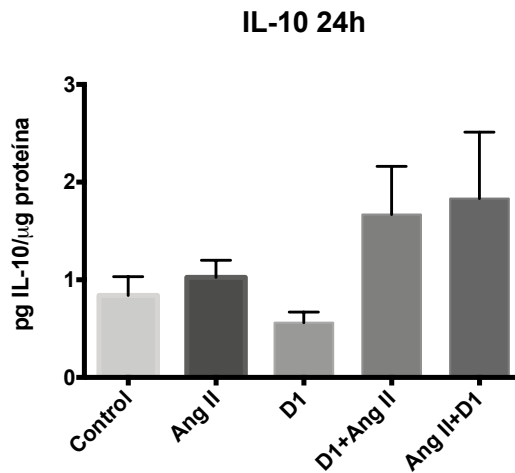
**Figura S1.** Niveles de mRNA de IL-10 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs. FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con Ang II (1  $\mu$ M), Losartán (1  $\mu$ M), Losartán (1  $\mu$ M) + Ang II (1  $\mu$ M) una hora después. Los valores relativos de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM. \*\*p<0,01.



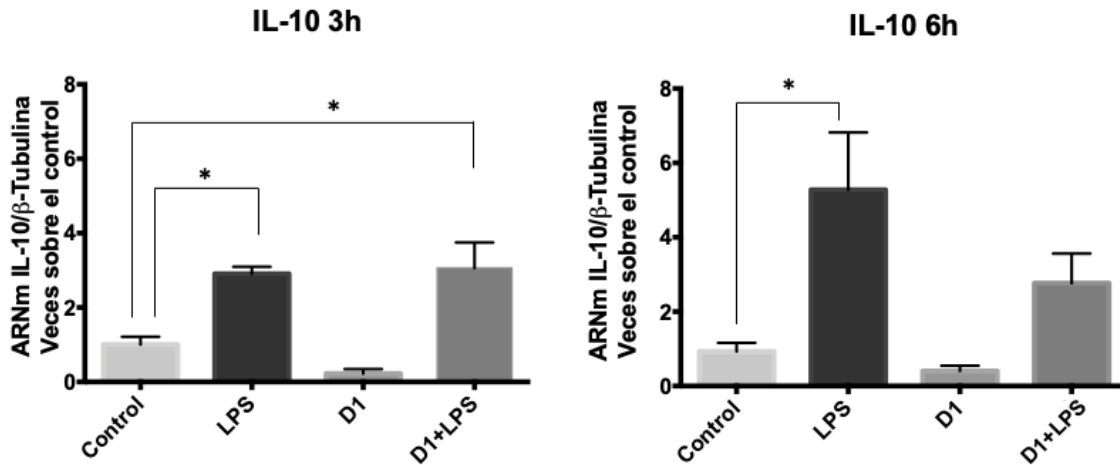
**Figura S2.** Niveles de secreción de IL-10 en FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24 horas. FCs fueron estimulados con Ang II 1  $\mu$ M en presencia y ausencia de Losartán 1  $\mu$ M y PD123319 1  $\mu$ M. Los antagonistas fueron agregados 1 hora antes del estímulo con Ang II. Los valores de IL-10 se obtuvieron en pg por  $\mu$ g de proteína de cada muestra. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de 7 experimentos independientes.



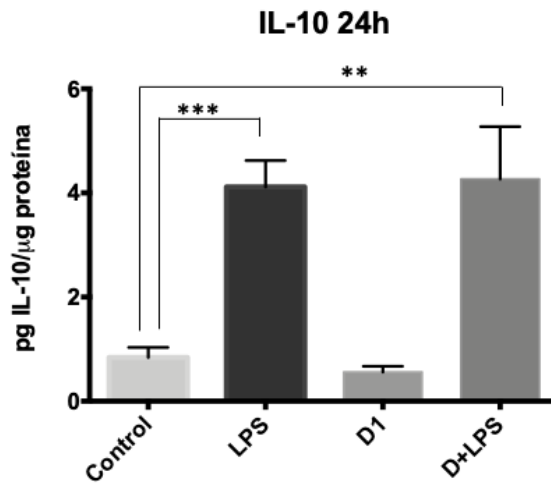
**Figura S3.** Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de IL-10 en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs. FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con Ang II (1μM), RvD1 (100nM), RvD1 (D1; 100nM) + Ang II (1μM) una hora después. Los valores de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio ± SEM.



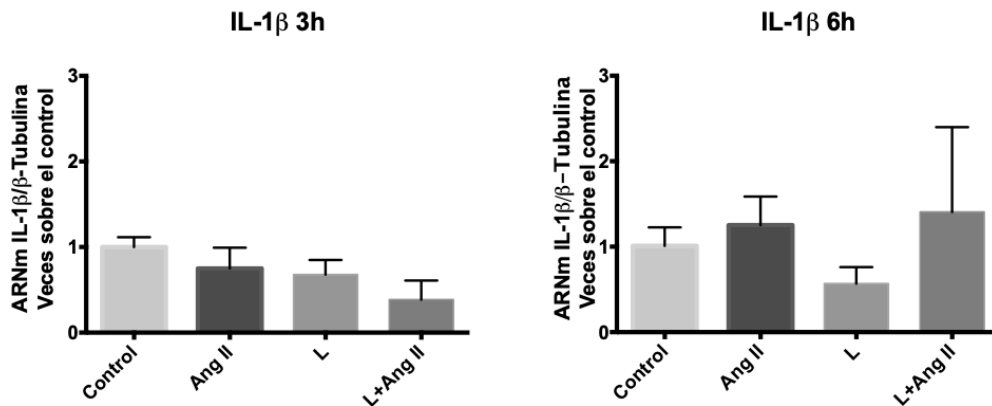
**Figura S4.** Efecto de RvD1 sobre los niveles de secreción de IL-10 en FCs de rata adulta estimulados con Ang II durante 24 horas. FCs fueron estimulados con Ang II 1μM en presencia y ausencia de RvD1 (D1; 100nM). La RvD1 fue agregada 1 hora antes o 1 hora después del estímulo con Ang II. Los valores de IL-10 se obtuvieron en pg por μg de proteína de cada muestra. Los resultados representan el promedio ± SEM de 7 experimentos independientes.



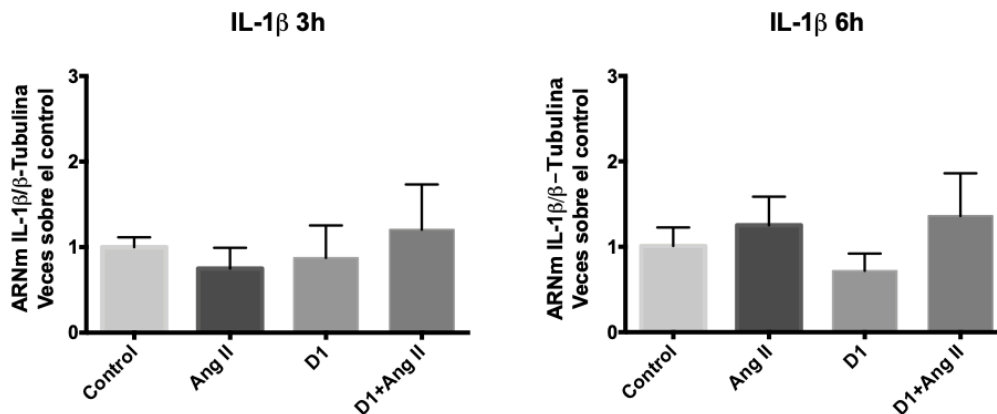
**Figura S5.** Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de IL-10 en FCs de ratas adultas estimulados con LPS durante 3 y 6 hrs. FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), RvD1 (D1; 100nM), RvD1 (100nM) + LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) una hora después. Los valores de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ .



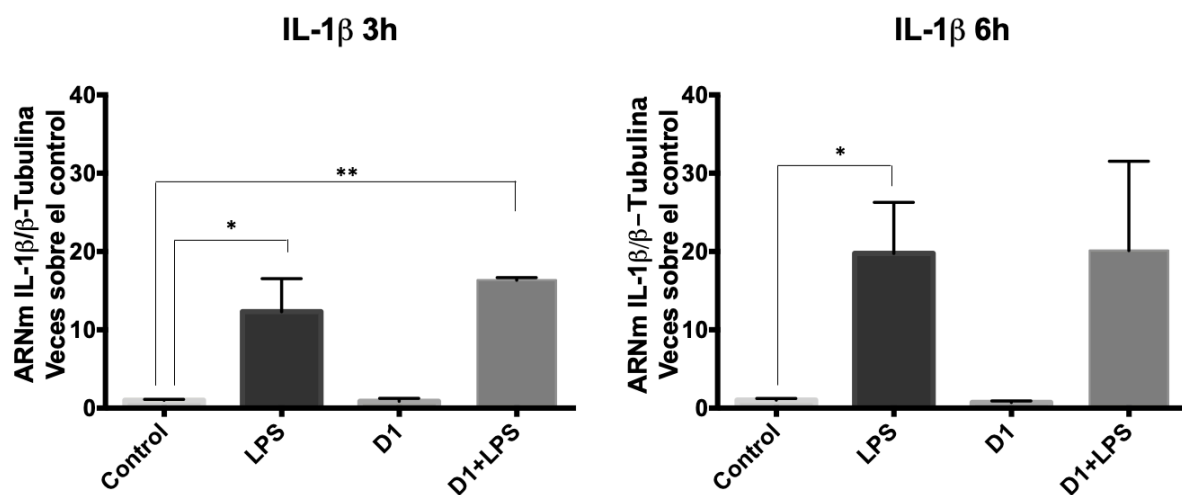
**Figura S6.** Efecto de RvD1 sobre los niveles de secreción de IL-10 en FCs de rata adulta estimulados con LPS durante 24 horas. FCs fueron estimulados con LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en presencia y ausencia de RvD1 (D1; 100nM). La RvD1 fue agregada 1 hora antes del estímulo con LPS. Los valores de IL-10 se obtuvieron en pg por  $\mu\text{g}$  de proteína de cada muestra. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de 7 experimentos independientes. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figura S7. Niveles de mRNA de IL-1 $\beta$  en FCs de ratas adultas estimulados con Angiotensina II durante 3 y 6 hrs.** FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con Ang II (1 $\mu$ M), Losartán (1 $\mu$ M), Losartán (1 $\mu$ M) + Ang II (1 $\mu$ M) una hora después. Los valores relativos de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM.



**Figura S8. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de IL-1 $\beta$  en FCs de ratas adultas estimulados con angiotensina II durante 3 y 6 hrs.** FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con Ang II (1 $\mu$ M), RvD1 (100nM), RvD1 (D1; 100nM) + Ang II (1 $\mu$ M) una hora después. Los valores de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio  $\pm$  SEM.



**Figura S9. Efecto de la RvD1 sobre los niveles de mRNA de IL-1β en FCs de ratas adultas estimulados con LPS durante 3 y 6 hrs.** FCs cardiacos de rata fueron estimulados durante 3 y 6 horas con LPS (1 μg/mL), RvD1 (D1; 100nM), RvD1 (100nM) + LPS (1 μg/mL) una hora después. Los valores de mRNA fueron obtenidos en Ct y se expresaron como números de veces sobre el control sin tratar. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes (n=5) para ambos tiempos. Los datos están expresados como promedio ± SEM. \* p<0,05, \*\*p <0,01.