



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Efectos de Navitoclax y Resolvina D1 Sobre la Senescencia de Fibroblastos Cardiacos Inducida por Angiotensina II y LPS

Memoria para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico

Estudiante:

Víctor Javier Machuca Escobar

Director: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

Patrocinante: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

Santiago, Chile, 2022

FINANCIAMIENTO

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

Este trabajo contó con el apoyo y financiamiento del proyecto FONDECYT N° 1210627.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

FINANCIAMIENTO	2
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Generalidades.....	13
1.2 Senescencia celular.....	14
1.3 Fibroblasto cardiaco (FC)	16
1.4 Inductores de senescencia	17
1.4.1 Lipopolisacárido.....	18
1.4.2 Angiotensina II.....	19
1.5 Fármacos senolíticos y senostáticos	21
1.5.1 Navitoclax.....	21
1.5.2 Resolvina D1	22
2. HIPÓTESIS.....	24
3. OBJETIVO GENERAL.....	24
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 Reactivos	25
5.2 Modelo animal.....	25
5.3 Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardiacos	25
5.4 Pasaje celular	26
5.5 Western blot	26
5.6 Ensayo de β -galactosidasa	27
5.7 Análisis estadístico.....	28
6. RESULTADOS.....	29
6.1 Efecto senescente de Ang II y/o LPS.....	29
6.2 Efecto de resolvina y navitoclax sobre la senescencia inducida por Ang II	33
6.3 Efecto de resolvina y navitoclax sobre la senescencia inducida por LPS	33
6.4 Efecto de resolvina y navitoclax sobre la senescencia inducida por Ang II + LPS	36
7. DISCUSIÓN	38

7.1	Efecto de angiotensina II sobre fibroblastos cardiacos de rata.....	39
7.2	Efecto de LPS sobre fibroblastos cardiacos de rata	39
7.3	Efecto de angiotensina II en fibroblastos cardiaco de rata pre- tratados con LPS	40
7.4	Efecto de navitoclax en fibroblastos cardiacos de rata senescentes.....	41
7.5	Efecto de resolvina D1 en fibroblastos cardiacos de rata senescentes	42
8.	ESQUEMA RESUMEN	44
9.	CONCLUSIONES	45
10.	LIMITACIONES.....	45
11.	PROYECCIONES	45
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1</u> : Senescencia como hallmark central del envejecimiento	14
<u>Figura 2</u> : Marcadores de senescencia celular	16
<u>Figura 3</u> : Activación del receptor TLR4 en fibroblastos cardiacos	19
<u>Figura 4</u> : Angiotensina II afecta significativamente el envejecimiento	20
<u>Figura 5</u> : Mecanismo apoptótico de navitoclax	22
<u>Figura 6</u> : Efectos de la RvD1 sobre la inflamación	23
<u>Figura 7</u> : Efectos de LPS y Angiotensina II sobre la expresión de la histona γ H2A.X, p53 y p21	31
<u>Figura 8</u> : Efecto de LPS, ANG II o LPS+ANG II sobre la actividad β -galactosidasa	32
<u>Figura 9</u> : Efecto de navitoclax y resolvina sobre la actividad β -galactosidasa inducida por angiotensina II.....	34
<u>Figura 10</u> : Efecto de navitoclax y resolvina sobre la actividad β -galactosidasa inducida por LPS	35
<u>Figura 11</u> : Efecto de navitoclax y resolvina sobre la actividad β -galactosidasa inducida por angiotensina II en células pre-tratadas con LPS	37
<u>Figura 12</u> : Efectos de Navitoclax y Resolvina D1 Sobre la Senescencia de Fibroblastos Cardiacos Inducida por Angiotensina II y LPS	44

ABREVIATURAS

ECV	Enfermedades cardiovasculares.
OMS	Organización mundial de la salud
pRB	Proteína del retinoblastoma.
γ H2A.X	Histona gamma H2AX.
53BP1	p53-binding protein 1.
SASP	Fenotipo secretor asociado a senescencia.
CDK4/6	Kinasas dependientes de ciclinas 4/6.
SA- β -Gal	Actividad β -galactosidasa asociada a senescencia.
FC	Fibroblasto cardiaco.
MEC	Matriz extracelular.
Ang II	Angiotensina II.
LPS	Lipopolisacárido.
TLR4	Toll-like receptor 4.
MFC	Miofibroblasto cardiaco.
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta tipo 1.
α -SMA	Alpha Smooth Muscle Actin.
NF- κ B	Nuclear factor kappa B.
ERK1/2	extracellular signal-regulated protein kinase 1/2.
AKT	Proteína kinasa B.

ROS	Especies reactivas de oxígeno.
RAAS	Sistema renina angiotensina aldosterona.
AT1R	Receptor de angiotensina II tipo 1.
BCL-2	B-cell lymphoma 2.
SMP	Mediadores especializados pro-resolutivos.
EPA	Ácido eicosapentaenoico.
DHA	Ácido docosahexaenoico.
RvD1	Resolvina D1.
RvE1	Resolvina E1.
H ₂ O ₂	Peróxido de oxígeno.
WB	Western Blot.
DMEM-F2	Dulbecco's Modified Essential Medium - Formula 12.
GAPDH	Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa.
FBS	Suero fetal bovino.
TBS	Tris-buffered saline.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ANOVA	Análisis de varianza.
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3.
IL-1 β	Interleuquina 1 beta.
IL-6	Interleuquina 6.
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa.

PLC

Fosfolipasa C.

IP3R

Receptor de inositol trifosfato.

MAPK

Proteína kinasa activada por mitógenos.

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) se asocian fuertemente a procesos inflamatorios. Los fibroblastos cardiacos (FC) han demostrado tener un rol central en la respuesta inflamatoria cardiaca ante estímulos nocivos, actuando como célula centinela y secretando una serie de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias. La senescencia celular se define como un arresto estable del ciclo celular y se caracteriza por la presencia de un fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) que se compone en su mayoría de factores proinflamatorios y es capaz de mantener la inflamación y, además, perpetuar la senescencia actuando sobre células vecinas. En el último tiempo se ha propuesto a la senescencia celular como un factor importante en la progresión de enfermedades cardiacas. Diversos estudios han podido identificar que una acumulación aberrante de FC senescentes es responsable de la fibrosis cardiaca y el daño producido posterior a un infarto del miocardio.

La senescencia del FC ha sido sujeto de estudio recientemente y se ha podido identificar diversos actores capaces de inducirla. Uno de ellos es la angiotensina II (Ang II), el principal péptido vasoactivo del eje renina-angiotensina-aldosterona. Se ha descrito que Ang II es capaz de inducir inflamación en el tejido cardiaco y existen reportes de que también es capaz de inducir senescencia de FC. Otra molécula que ha mostrado tener un efecto proinflamatorio importante sobre los fibroblastos cardiacos es el lipopolisacárido (LPS) y podría también tener un rol en la inducción de senescencia.

Dada la importancia que está suponiendo la senescencia del FC en la fibrosis cardiaca, se vuelve fundamental encontrar herramientas que permitan contrarrestarla ya sea, eliminando células senescentes o evitando que más células se transformen en células senescentes. Dentro de las alternativas, Navitoclax ha emergido como una potencial alternativa terapéutica, ya que es capaz de erradicar células senescentes mediante la inducción de apoptosis celular. Dada la estrecha relación que existe entre la senescencia y la inflamación, otro enfoque que se está estudiando es revertir la senescencia actuando sobre el proceso inflamatorio. En este sentido, una alternativa de intervención es el uso de resolvina D1 (RvD1), un mediador especializado pro-resolutivo de la inflamación que ha demostrado tener un fuerte efecto antiinflamatorio en FC.

Este trabajo consta de dos objetivos. El primero es evaluar la inducción de senescencia de FC utilizando como estímulos la Ang II y el LPS. Además, se evalúa si la combinación de estos dos estímulos genera una inducción de senescencia mayor que cada uno por sí solo dado que comparten un mecanismo común de inducción de inflamación vía el inflamasoma NLRP3. El segundo objetivo es demostrar si navitoclax y RvD1 son capaces de atenuar la senescencia de los FC inducida por Ang II o LPS.

Para evaluar la inducción de senescencia, los FC fueron tratados con Ang II, LPS o Ang II + LPS durante 24, 48 y 72 horas, luego, se determinó la expresión de proteínas asociadas a senescencia, la histona γ H2AX, p21 y p53 mediante western blot, y se midió la actividad β -galactosidasa (SA-B-Gal). Para evaluar el efecto de navitoclax y RvD1, los FC fueron tratados con Ang II, LPS o Ang II + LPS por 24 horas, luego se realizó un lavado del medio de cultivo y se trató con navitoclax o RvD1 hasta alcanzar 72 horas de experimento. Posteriormente se evaluó la actividad SA-B-Gal.

Se demostró que Ang II y LPS inducen senescencia en FC y, si bien la combinación de ambos estímulos induce senescencia, esta no es mayor a la inducida por cada estímulo por sí solo. Además, se demostró que navitoclax y RvD1 son capaces de revertir la senescencia de FC inducida por Ang II y LPS.

Estos resultados demuestran que navitoclax, un fármaco senolítico y RvD1, un mediador especializado pro-resolutivo de la inflamación, son potenciales alternativas terapéuticas para revertir la senescencia de FC, la cual se asocia fuertemente a fibrosis cardiaca.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are strongly associated with inflammatory processes. Cardiac fibroblasts have been shown to play a central role in the cardiac inflammatory response to noxious stimuli, acting as sentinel cells and secreting a series of proinflammatory chemokines and cytokines. Cellular senescence is defined as a stable cell cycle arrest and is characterized by the presence of a senescence-associated secretory phenotype (SASP) that is composed mostly of proinflammatory factors and is capable of maintaining inflammation and, in addition, perpetuate senescence by acting on neighboring cells. Recently, cellular senescence has been proposed as an important factor in the progression of heart disease. Several studies have been able to identify that an aberrant accumulation of senescent cardiac fibroblasts is responsible for cardiac fibrosis and the damage produced after a myocardial infarction.

The senescence of cardiac fibroblasts has recently been subject of investigation, and various actors capable of inducing it have been identified. One of them is angiotensin II, the main vasoactive peptide of the renin-angiotensin-aldosterone axis. It has been described that angiotensin II is capable of inducing inflammation in cardiac tissue and some reports demonstrate that it is also capable of inducing senescence of cardiac fibroblasts. Another molecule that has been shown to have an important proinflammatory effect on cardiac fibroblasts is LPS, and it could also play a role in senescence induction.

Given the importance that cardiac fibroblast senescence has in cardiac fibrosis, it becomes essential to find tools that allow to counteract it, either by eliminating senescent cells or by preventing more cells from becoming senescent cells. Navitoclax has emerged as a potential therapeutic alternative, since it is capable of eradicating senescent cells by inducing cell apoptosis. Given the close relationship between senescence and inflammation, another approach currently being studied is to reverse senescence by acting on the inflammatory process. In this regard, an alternative intervention is the use of resolvin D1, a specialized pro-resolving mediator of inflammation that has been shown to have a strong anti-inflammatory effect on cardiac fibroblasts.

This work has two objectives. The first is to evaluate the induction of senescence in cardiac fibroblasts using angiotensin II and LPS as stimuli and evaluate if the combination of these two stimuli generates a greater induction of senescence than each one by itself, given that they share a common mechanism of inflammation induction via the NLRP3 inflammasome. The second objective is to demonstrate whether navitoclax and resolvin D1 are capable of attenuating the senescence of cardiac fibroblasts induced by angiotensin II and/or LPS.

To evaluate the induction of senescence, CFs were treated with angiotensin II, LPS or both for 24, 48 and 72 hours, then the expression of senescence-associated proteins, histone γ H2AX, p21 and p53 and β -galactosidase activity was determined. To evaluate the effect of navitoclax and resolvin D1, CFs were treated with angiotensin II, LPS or both for 24 hours and treated with navitoclax or resolvin D1 until reaching 72 hours. Subsequently, β -galactosidase activity was evaluated.

Results shown that angiotensin II and LPS are capable of inducing senescence in cardiac fibroblasts and the effect of the combination is not greater than that of each stimulus on its own. Furthermore, it was shown that navitoclax and resolvin D1 are capable of reversing senescence of cardiac fibroblasts induced by angiotensin II and LPS.

These results demonstrate that navitoclax, a senolytic drug, and resolvin D1, a specialized pro-resolving mediator of inflammation, are potential therapeutic alternatives to reverse cardiac fibroblast senescence, which is strongly associated with cardiac fibrosis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son definidas por la OMS como un grupo de desórdenes del corazón y los vasos sanguíneos donde se incluyen la cardiopatía coronaria, enfermedades cerebrovasculares, arteriopatías periféricas, entre otras. Son la principal causa de muerte en todo el mundo y se calcula que en 2015 murieron por estas causas 17,7 millones de personas, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo. La mayoría de las ECV pueden prevenirse actuando sobre factores de riesgo relacionados a los hábitos, como el consumo de tabaco, las dietas hipercalóricas y la obesidad, la inactividad física o el consumo nocivo de alcohol. Para las personas con ECV y/o con alto riesgo cardiovascular (debido a la presencia de uno o más factores de riesgo), son fundamentales la detección precoz y el tratamiento temprano, por medio de servicios de orientación o la administración de fármacos, según corresponda [1].

Chile no es ajeno a esta situación. Las ECV también son la principal causa de muerte en el país y, en el año 2014, representaron un 27,53% del total de defunciones, a expensas principalmente del ataque cerebrovascular y el infarto agudo de miocardio [2]. Ante este panorama se vuelve crítico buscar opciones de tratamiento que complementen o mejoren los ya existentes. En este sentido, investigar en detalle la progresión de estas enfermedades y buscar nuevas alternativas de tratamiento es esencial para disminuir sus altas tasas de prevalencia y mortalidad.

En el último tiempo se ha asociado a la senescencia celular como la responsable de la fibrosis cardiaca que se produce posterior a un infarto, ya que se ha observado un marcado aumento y acumulación de fibroblastos cardiacos senescentes luego de un infarto de miocardio [3]. Sin embargo, si bien existe un conocimiento importante sobre la senescencia celular en cardiomiocitos, aún no se estudia en detalle cómo se lleva a cabo este proceso en FC, por lo tanto, es deseado comprender el proceso de senescencia en FC, y como éste está involucrado en la progresión de ciertas enfermedades, entre ellas la fibrosis cardiaca, y buscar alternativas para impedirla o reducirla parecieran ser un nuevo enfoque bastante prometedor.

1.2 Senescencia celular

La senescencia celular es un proceso complejo que pueden sufrir las células ante ciertos estímulos (figura 1) y es acompañada de una serie de cambios fenotípicos. Dentro de los cambios que sufren las células durante este proceso podemos destacar el arresto del ciclo celular y la formación de un secretoma senescente, entre otros. La senescencia es un proceso biológico necesario e incluso un fuerte mecanismo de supresión de tumores, pero una acumulación aberrante de células senescentes puede tener efectos perjudiciales para la salud de las personas [4]. Esta acumulación de células senescentes se ve especialmente acelerada en ambientes de estrés, como el producido por múltiples factores de riesgo cardiovasculares [5].

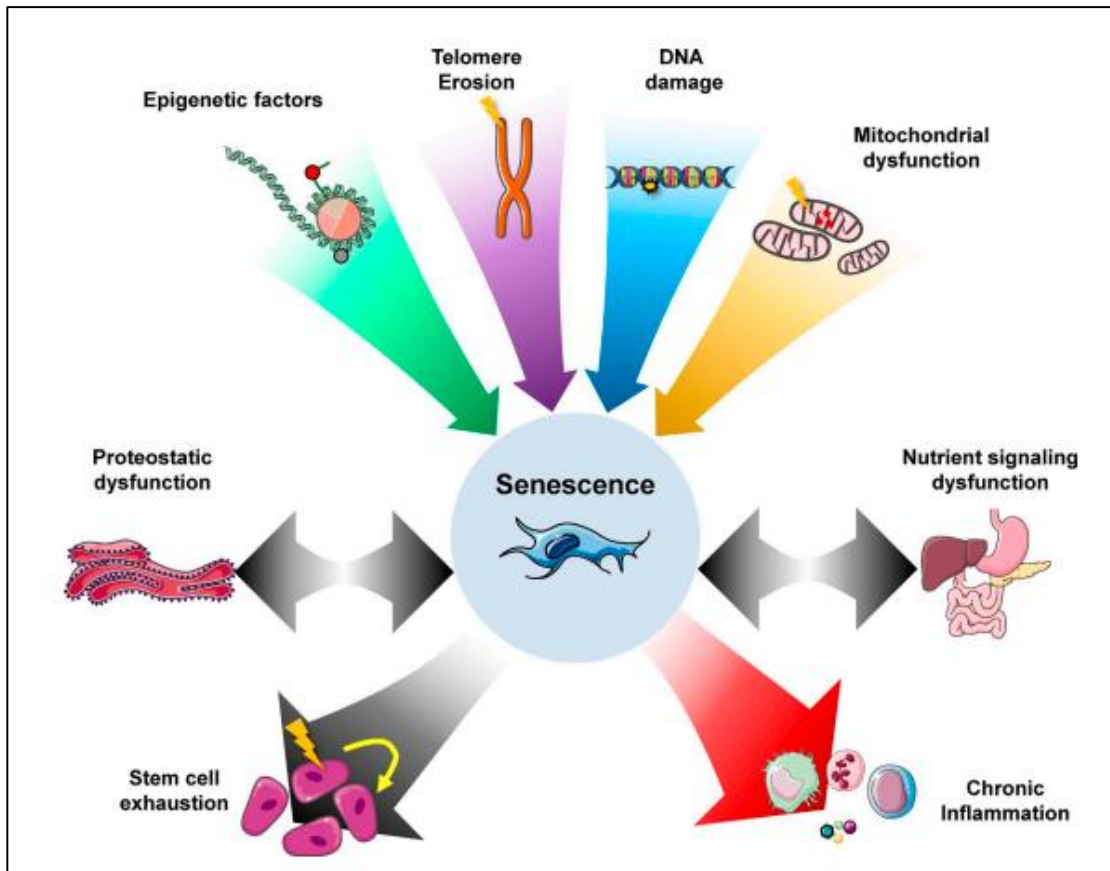


Figura 1. Senescencia como hallmark central del envejecimiento. El daño de los telómeros, la desregulación epigenética, el daño del ADN y la disfunción mitocondrial son los principales impulsores del daño en el envejecimiento. Varios de estos impulsores pueden inducir senescencia. La senescencia, a su vez, puede impulsar las características del envejecimiento consecuentes en respuesta al daño: el agotamiento de las células madre y la inflamación crónica. Otras respuestas al daño, como la disfunción proteostática y la interrupción de la señalización de nutrientes, también están vinculadas integralmente con la respuesta de la senescencia. Adaptado de López-Otín et al. (2013) [4].

A pesar de la naturaleza multifacética de la senescencia, la inducción de una detención de la proliferación es su característica definitoria. Además, la detención estable del ciclo celular es fundamental para evitar la propagación de células disfuncionales. Dos vías supresoras de tumores, p53/p21 y p16/pRb, son las responsables de la implementación de este arresto del ciclo celular [4].

Inductores de senescencia como el acortamiento de telómeros o el estrés oxidativo causan daño al ADN. El daño al ADN incrementa los niveles de γ H2AX y 53BP1 que activan cascadas de quinasas que resultan en una activación de p53. Esta proteína induce la transcripción de p21, el cual a su vez es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina. Por otra parte, p21 inhibe la actividad de CDK4/6, causando una hiperfosforilación de pRb y arresto del ciclo celular. Además de la detención del ciclo celular, la producción de una mezcla de factores secretados, denominada SASP (senescence associated secretory phenotype), es el fenotipo más relevante de las células senescentes. Las células senescentes secretan una serie de factores que incluyen citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, factores de crecimiento y proteasas. El SASP puede generar senescencia de forma autocrina y paracrina, causar remodelación de un tejido y reclutar células del sistema inmune [4]. Sin embargo, no todas las células senescentes adquieren un fenotipo secretor asociado a senescencia, estas células son denominadas células senescentes H o Helper, tienen por función mantener la homeostasis de tejidos y han mostrado ser resistentes a senolíticos [6].

La identificación de células senescentes es todo un desafío, pero existen marcadores que pueden indicar, de forma indirecta, la senescencia (ver figura 2). Las células senescentes tienen un aumento de p53/p21 o p16/pRb y marcadores asociados a reparación del ADN como γ H2AX. Las células senescentes también pueden exhibir, además del SASP, una alta actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal) [7].

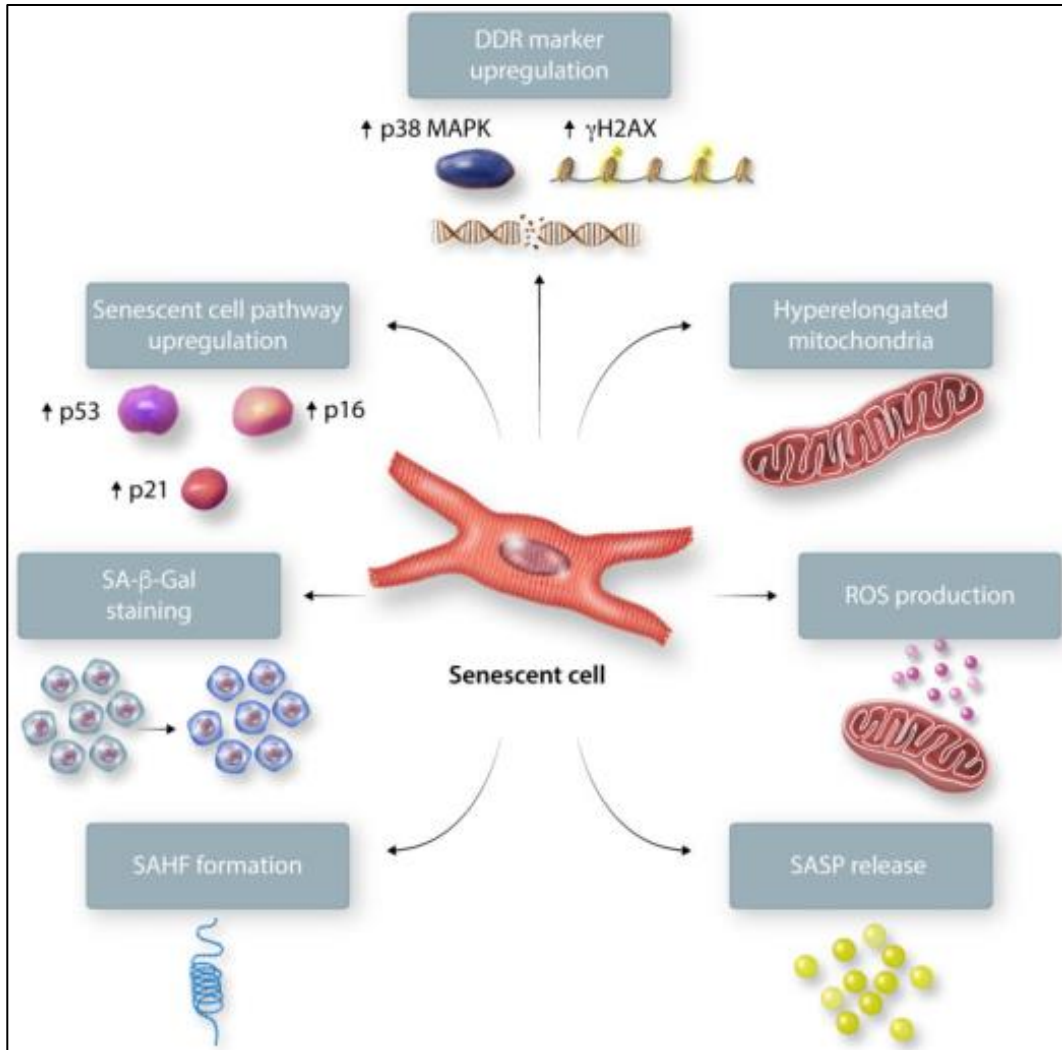


Figura 2. Marcadores de senescencia celular. Las células senescentes exhiben una detención irreversible del ciclo celular, elevación de p53, p21 y p16, elevación de los marcadores de respuesta al daño del ADN p38 MAPK y γ H2AX, mitocondrias hiperallargadas, aumento de especies reactivas de oxígeno, aumento de la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal), focos heterocromáticos asociados a senescencia (SAHF), y un fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) [7].

1.3 Fibroblasto cardiaco (FC)

El fibroblasto es la célula predominante de los tejidos conectivos del cuerpo. En el pasado, la comprensión de su función carecía de complejidad puesto que tan solo era catalogado como una célula de soporte para otros tipos celulares. Sin embargo, en la actualidad, este concepto ha sido totalmente reevaluado, al encontrar en los fibroblastos funciones muy particulares [8]. En el corazón, los fibroblastos se definen como células que producen tejido conectivo. Los componentes estructurales de la matriz extracelular

del corazón producidos por los fibroblastos incluyen periostina, vimentina, fibronectina y colágeno tipo I, III, V y VI. Además, son las principales células implicadas en el proceso de remodelación fibrótica después de una lesión cardíaca, inflamación o durante el envejecimiento [9]. Los fibroblastos cardíacos (FC) no solo modulan la homeostasis de las proteínas de la matriz extracelular, sino que también responden a las señales químicas y mecánicas. Expresan una variedad de receptores a través de los cuales modulan la proliferación y muerte celular, autofagia, adhesión, migración, expresión de citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento y diferenciación en miofibroblastos cardíacos [10].

Los fibroblastos experimentan una forma más clásica de senescencia con predominio de la detención del ciclo celular y el desarrollo de un SASP proinflamatorio y una disminución en la secreción de proteínas de la matriz extracelular [5]. Durante la fase aguda posterior a una lesión, la aparición de senescencia dentro de los fibroblastos puede tener funciones para limitar el depósito excesivo de fibrosis y estimular la regeneración en el área lesionada [5]. Sin embargo, a pesar del papel de la senescencia en la limitación de la síntesis de colágeno, se desarrolla un SASP proinflamatorio persistente después de la inducción de la senescencia de los fibroblastos. Estas células parecen entrar en un estado no secretor, pero altamente proinflamatorio. Si bien esto reduce la producción directa de matriz extracelular de la célula, con el tiempo el estado inflamatorio crónico contribuye al daño tisular continuo [5].

1.4 Inductores de senescencia

Como se mencionó anteriormente, la senescencia celular es un proceso relacionado al envejecimiento y está asociada a múltiples patologías relacionadas con la edad. Sin embargo, en los últimos años se ha podido detectar una senescencia celular acelerada o inducida, la cual sería responsable de la progresión de muchas enfermedades no relacionadas a la edad [4]; por lo tanto, el identificar compuestos que sean capaces de inducir o detener la senescencia se ha vuelto el foco principal para combatir este proceso. En este sentido, se definirá a los inductores de senescencia como aquellos compuestos capaces de producir uno o más de los factores asociados a senescencia descritos en la figura 1.

Se han descrito una serie de moléculas capaces de inducir la senescencia como, por ejemplo, tocotrienoles, curcumina o quercetina, entre otros [11]. Este trabajo se va a remitir a la Ang II y el lipopolisacárido (LPS) como moléculas capaces de inducir senescencia celular.

1.4.1 Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) está compuesto por una región lipídica y una glucosídica, es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas y desempeñan una importante función en la activación del sistema inmune al constituir el antígeno superficial más importante de este tipo de bacterias [12].

El LPS es un conocido agonista del Toll-Like Receptor 4 (TLR4) en fibroblastos cardiacos [13]. Mas aún, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que los FC y los MFC expresan el receptor TLR4. Al mismo tiempo, hemos demostrado que el LPS a través de este receptor inhibe la vía de señalización de TGF- β 1 y disminuye los niveles de α -SMA en los FC a través de su unión a TLR4 y la activación de las vías de señalización NF- κ B, ERK1/2 y Akt [13]. Además, se conoce que LPS promueve la producción de citoquinas inflamatorias que conducen a una producción excesiva de radicales libres y estrés oxidativo, y este aumento de ROS está asociado a procesos fibróticos renales y cardiacos [14]. Además, como se observa en la figura 3, se ha reportado que palmitato, un agonista TLR4, es capaz de inducir senescencia en fibroblastos cardiacos [15].

Adicionalmente, Estudios previos han demostrado que LPS, a través del aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias y radicales libres, es capaz de inducir senescencia en células epiteliales pulmonares [16, 17], en osteocitos [18] y en macrófagos en modelos de aterosclerosis [19].

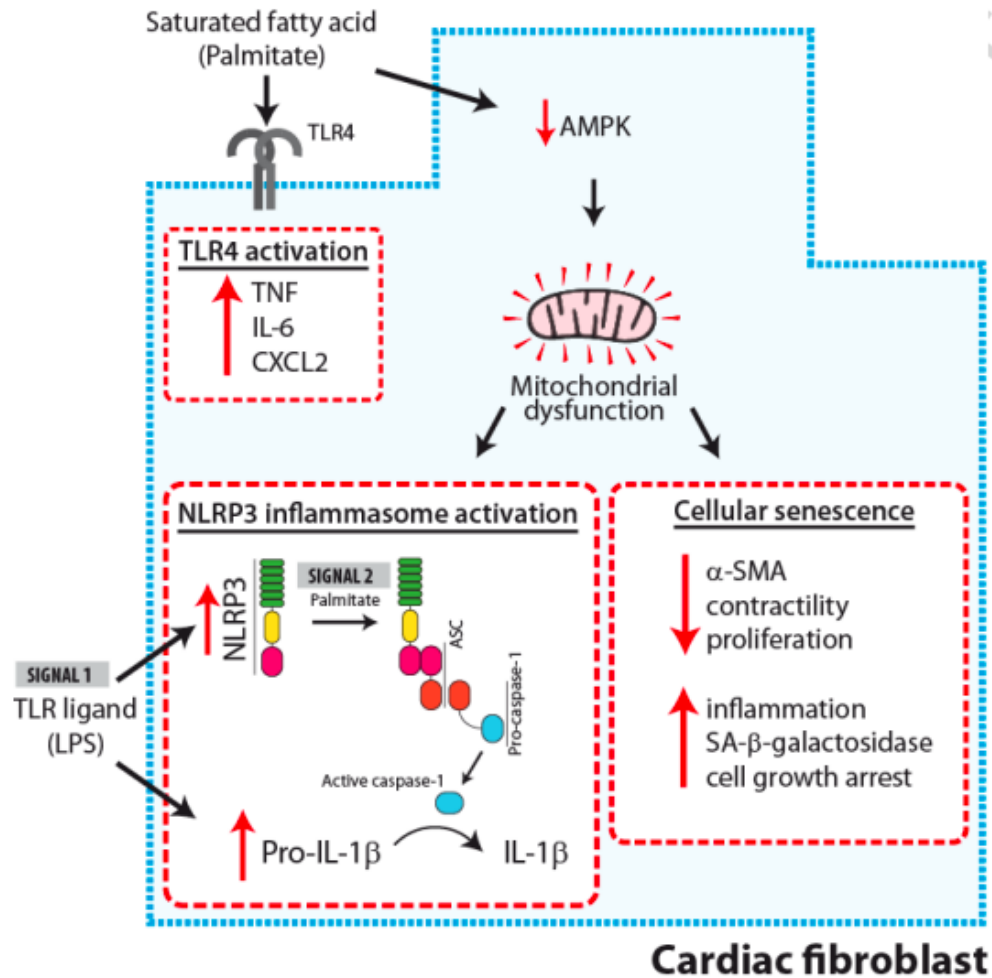


Figura 3. Activación del receptor TLR4 en fibroblastos cardiacos. Palmitato, un agonista TLR4 induce senescencia de fibroblastos cardiacos tratados con LPS por vías dependientes e independientes del inflammasoma NLRP3 [15].

1.4.2 Angiotensina II

La Ang II es el péptido activo del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). Mediante su unión al receptor AT1 (AT1R) media la vasoconstricción, liberación de vasopresina y aldosterona, fibrosis, inflamación, angiogénesis, reabsorción renal de sodio, envejecimiento vascular y aterosclerosis. Los altos niveles de Ang II se asocian a hipertensión, insuficiencia renal y fibrosis cardiaca [20].

Ang II estimula la producción de especies reactivas de oxígeno causando disfunción mitocondrial y daño celular. Ang II activa la NADPH oxidasa, produciendo ROS, vía AT1, y generando daño por estrés oxidativo. Como se observa en la figura 4, La producción de ROS es uno de los principales efectos involucrados en procesos de envejecimiento y se ha

descrito que contribuyen significativamente en la falla de órganos asociada al envejecimiento y diversas patologías como hipertensión, enfermedades cardiovasculares y falla renal [21], y el bloqueo AT1 evita este efecto. Por otra parte, Se ha demostrado que Ang II es capaz de inducir senescencia celular en células de la musculatura lisa vascular a través de la vía de señalización p53/p21, lo cual juega un rol clave en el desarrollo y progresión de aterosclerosis [22]. Adicionalmente, Jia et al. (2020) reportó inducción de senescencia en fibroblastos cardiacos de ratón con Ang II mediante la observación de un aumento de p16, p21 y SA-β-Gal [23].

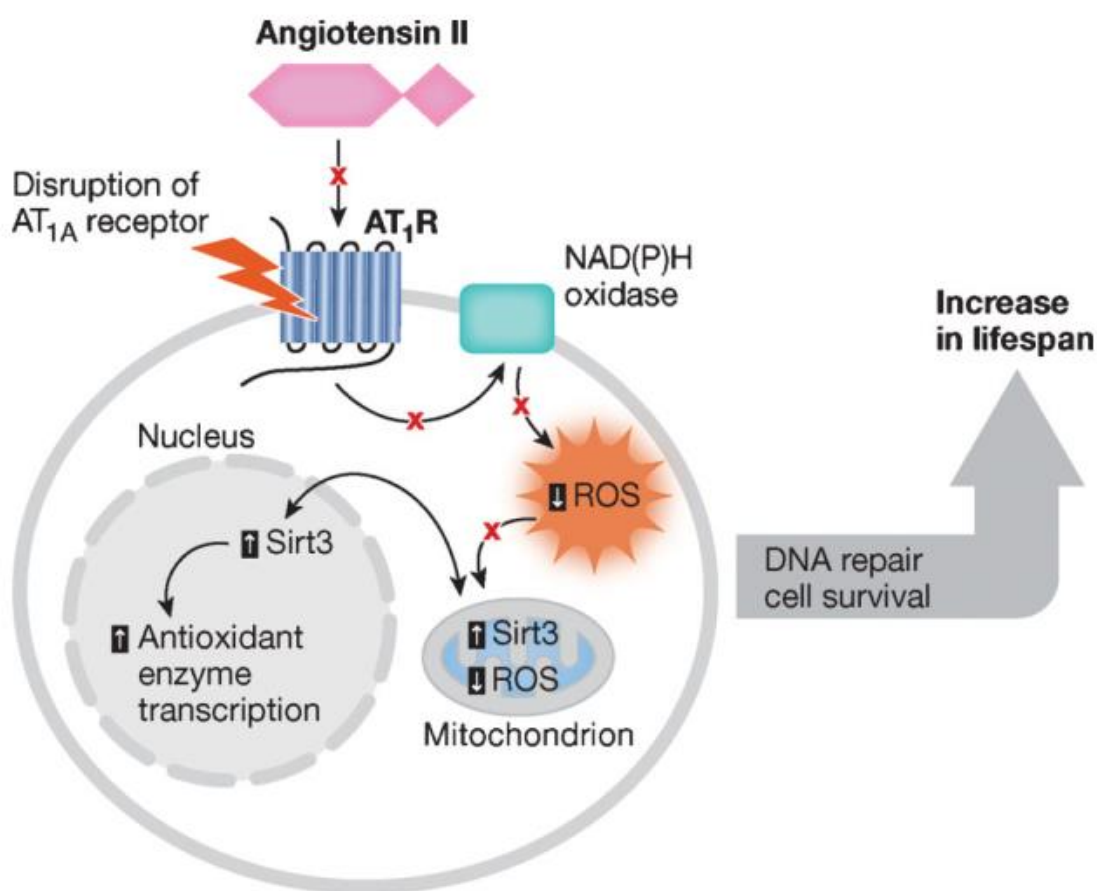


Figura 4. Angiotensina II afecta significativamente el envejecimiento. Ang II incrementa la generación de ROS y reduce la expresión del gen Sirt3, afectando la transcripción de enzimas antioxidantes. El bloqueo del receptor AT1A ayuda a preservar las mitocondrias y promueve la longevidad modulando la producción de ROS y la expresión de sirtuina [21].

1.5 Fármacos senolíticos y senostáticos

Dada la relevancia que ha supuesto conocer el rol de la senescencia celular en el desarrollo y progresión de múltiples patologías, es razonable que el foco de la investigación científica se centre en la búsqueda de estrategias farmacológicas que permitan actuar sobre el proceso senescente, ya sea eliminando las células senescentes o evitando que más células se transformen en células senescentes, esto con la finalidad de mejorar la salud de la población [24]. A raíz de esto, se han podido identificar una serie de moléculas que pueden actuar como senolíticos y/o senostáticos. Los senolíticos son compuestos que eliminan selectivamente a las células senescentes y se han desarrollado para ser utilizados como coadyuvantes para combatir células cancerosas [25]. Por otra parte, los compuestos senostáticos no matan a las células senescentes, pero inhiben la señalización paracrina y bloquean el aumento de células senescentes dado por el efecto de senescencia inducida por senescencia [25]. Los senostáticos se encargan de modular el SASP a través de dos vías principalmente, primero actuando sobre la red reguladora del SASP, lo que se conoce como efecto senostático generalizado, o actuando específicamente sobre algún componente del SASP, lo que se conoce como efecto senostático preciso [24].

1.5.1 Navitoclax

Navitoclax (ABT-263) es un compuesto perteneciente a la familia de los inhibidores de BCL-2 generado durante el desarrollo de ABT-737, cuyo mecanismo se muestra en la figura 5. Las proteínas de la familia BCL-2 son anti-apoptóticas y navitoclax, al inhibir estas proteínas, induce apoptosis celular [26]. Además, se ha demostrado que la inhibición de las proteínas BCL-2 es una novedosa estrategia senolítica [27] y que ABT-263, mediante dicho mecanismo, es un compuesto que actúa como senolítico, mostrando una mayor selectividad por células senescentes que células no senescentes [23]. Estudios previos han demostrado que Navitoclax es capaz de inhibir la fibrosis e hipertrofia cardiaca induciendo la apoptosis de células senescentes, mejorando la función cardiaca en pacientes con insuficiencia cardiaca inducida por Ang II [23].

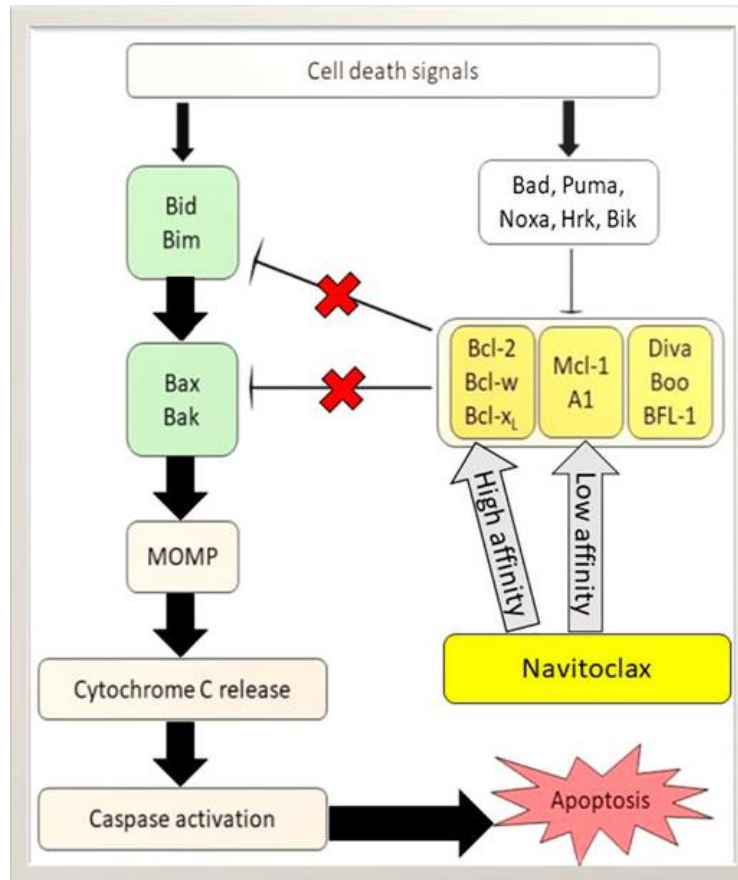


Figura 5. Mecanismo apoptótico de navitoclax. Potenciación de la actividad apoptótica en presencia de navitoclax en la vía apoptótica clásica de las proteínas de la familia del linfoma de células B 2 (BCL-2). La afinidad de navitoclax en las proteínas anti-apoptóticas BCL-2 es variada. MOMP: permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Adaptado de Anuar et al. (2020) [26].

1.5.2 Resolvin D1

Los lípidos especializados pro-resolutivos (SMP), tales como las resolvinas, protectinas, lipoxinas y maresinas, son ácidos grasos biosintetizados que logran finalizar la inflamación, protegiendo órganos y estimulando la regeneración tisular. Estos SMP disminuyen los leucotrienos, prostaglandinas, citoquinas proinflamatorias, entre otros factores. Los precursores de estos mediadores son el ácido graso esencial omega 3 (protectinas, maresinas y resolvinas) y el omega 6 (lipoxinas). Las resolvinas de la serie E provienen del ácido eicosapentaenoico (EPA), mientras que las resolvinas de la serie D provienen del ácido docosahexaenoico (DHA) y poseen distintas estereoquímicas, encontrándose tipos tales como RvD1, RvD2, RvD3 y RvD5 [28]. Para la RvD1 se ha descrito en modelos *in vivo* e *in vitro* efectos como la inhibición de migración de neutrófilos,

bloqueo de producción de mediadores proinflamatorios y reducción de la expresión de citoquinas [29]. También se ha descrito que este mediador es capaz de modular los niveles de expresión de proteínas de la MEC como el colágeno [30]. Estudios previos en el laboratorio han indagado en los efectos que poseen las resolvinas de la serie D y E en los FC. Específicamente se han evaluado los efectos de resolvina E1 y D1, y se ha podido observar que ambas tienen un potente efecto antiinflamatorio [31, 32, 33]. Además, como se muestra en la figura 6, RvD1 es capaz de atenuar la inflamación inducida por Ang II. Adicionalmente se ha observado que resolvina E1 es capaz de atenuar la senescencia del FC inducida por doxorubicina [34, 35].

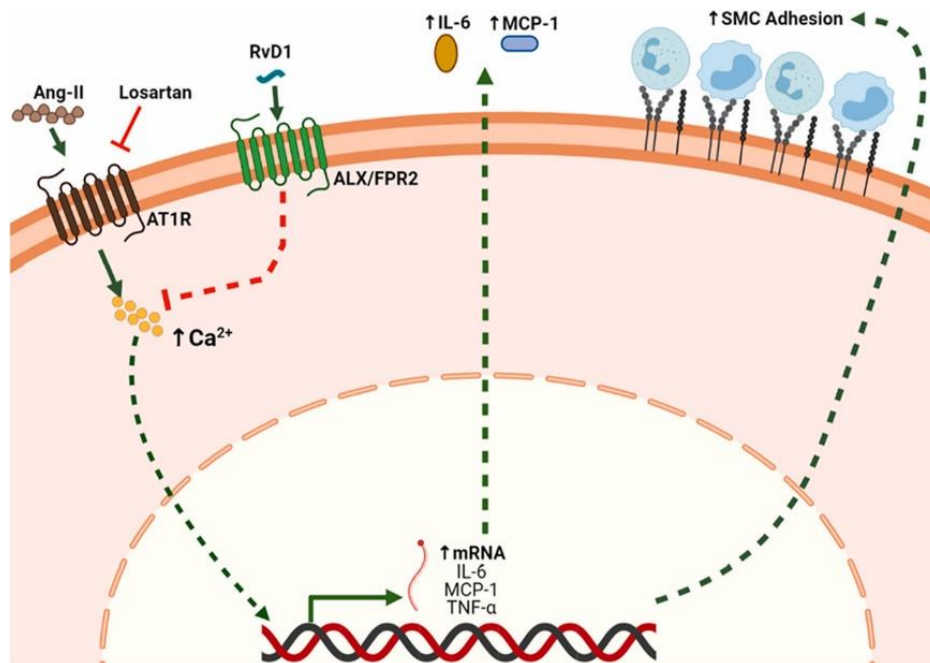


Figura 6. Efectos de la RvD1 sobre la inflamación. Ang II incrementa los niveles de ARNm de IL-6, MCP-1 y TNF- α e incrementa los niveles de proteína de IL-6 y MCP-1. Resolvina D1, mediante la unión a su receptor ALX/FPR2, reduce los niveles de Ca^{+2} y previene de manera temprana la síntesis de mediadores proinflamatorios y adhesión celular inducidas por Ang II [31].

En resumen, la senescencia del FC se ha asociado a múltiples enfermedades cardiovasculares, entre ellas la fibrosis. Existen diversos estímulos que pueden inducir la senescencia del FC y, por lo tanto, es necesario identificar intervenciones farmacológicas que permitan disminuir la senescencia del FC.

Por consiguiente, los antecedentes previamente descritos nos permiten formular la siguiente hipótesis de trabajo.

2. HIPÓTESIS

RvD1 y navitoclax atenúan la senescencia de fibroblastos cardiacos inducida por Angiotensina II y/o LPS.

3. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que RvD1 y navitoclax son capaces de atenuar la senescencia de fibroblastos cardiacos inducida por angiotensina II y/o LPS.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1. Demostrar que angiotensina II y/o LPS inducen senescencia en fibroblastos cardiacos.

4.2. Demostrar que RvD1 y navitoclax disminuyen la actividad SA- β -Gal de fibroblastos cardiacos inducida por angiotensina II y/o LPS.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Suero fetal bovino (FBS), tripsina/EDTA, medio de cultivo DMEM/F12 y compuestos orgánicos e inorgánicos fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Germany). Estándar de peso molecular fue adquirido en MaestroGen (Hsinchu City, Taiwán). Reactivo para quimioluminiscencia Clarity Max™ Western ECL fue adquirido en Bio-Rad (cód. 1705062) (Italy). Material de plástico estéril fue obtenido en Corning Inc. (New York, NY).

Anticuerpos primarios p53 mouse (cód. #2524), GAPDH rabbit (cód. #2118), Histona γ H2A.X (cód. #2577), Anticuerpos secundarios Anti-mouse (cód. #7076) y Anti-rabbit (cód. #7074), y Kit de β -galactosidasa (#9860S) fueron adquiridos en Cell Signaling Technology Inc. (MA, EEUU). Anticuerpo primario p21 (#sc-6246) mouse fue adquirido en Santa Cruz Biotechnology Inc. (Texas, EEUU). Reactivo RvD1 (cód. 10012554) y Navitoclax ABT-263 (cód. 11500) fueron adquiridos en Cayman Chemical Company (MI, EEUU). LPS-EB Ultrapure (E. coli O111:B4) adquirido en InvivoGen (San Diego, CA). Angiotensin II human (A9525-1MG), Doxorubicin (D1515) y Reactivo Bradford (B6916-500mL) adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Colagenasa tipo II (CAS No. 9001-12-1) y Trypan blue (15250-061) adquiridos en Life Technologies Corporation (CA, EEUU).

5.2 Modelo animal

Se utilizaron ratas *Sprague-Dawley*, 6-8 semanas de edad, 250-350 gramos de peso, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, con cumplimiento de los protocolos experimentales aprobados por el Comité de Ética de la Facultad. Todos los estudios fueron desarrollados cumpliendo la Guía de NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, actualizada en el 2011 [36].

5.3 Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardiacos

Los FC fueron aislados desde corazones de ratas adultas *Sprague-Dawley* a través de cirugía realizada por tesista doctoral con curso aprobado para el proceso. Las ratas fueron anestesiadas con inyección de ketamina/xilazina (2:1) 66/10 mg/Kg dosis de anestesia y

el corazón fue removido en condición de asepsia. Se extrajeron las aurículas y los ventrículos fueron cortados en trozos pequeños para facilitar la digestión enzimática con colagenasa tipo II 1 mg/mL. El producto de digestión fue separado mediante centrifugación y plasmado en placas de cultivo de 100 mm con DMEM-F12/FBS 10% para su incubación en condiciones convencionales de cultivo (5%CO₂ y 37°C) hasta alcanzar confluencia (5-6 días).

5.4 Pasaje celular

Los FC se mantuvieron en medio DMEM-F12/FBS 10% hasta confluencia en pasaje 0. Luego, las placas fueron lavadas con PBS estéril 1X y las células fueron soltadas con tripsina/EDTA 0,05% para ser contadas a través del método de exclusión azul de tripán.

Posteriormente se sembraron 350.000 células/placa en placas de cultivo de 60 mm y 20.000 células/pocillo en placas de cultivo celular de 6 pocillos (35 mm) para determinación de proteínas asociadas a senescencia y ensayo de β-galactosidasa respectivamente. Tras 24 horas se realizó el cambio de medio a DMEM-F12/FBS 1% y finalmente se realizaron los ensayos correspondientes.

5.5 Western blot

Las muestras de proteínas fueron recolectadas de las placas de cultivo de 60 mm, previamente lavadas con PBS no estéril 1X frío (3 lavados con 1 mL cada uno). Se adicionaron 45 µL de tampón de lisis y se procedió a la obtención del lisado celular raspando suavemente la placa. El lisado se recolectó en tubos de Eppendorf de 1,5 mL y luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el pellet y se procedió a realizar la cuantificación de concentración de proteínas mediante el método de Bradford. Posteriormente se adicionaron 15 µL de tampón de carga 4X y se calentó durante 5 minutos a 100°C para desnaturalizar las proteínas.

La separación de proteínas por su masa se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida preparados a partir de una solución de acrilamida/bisacrilamida. La concentración del gel concentrador fue 5%, mientras que la del gel separador fue de 15%. Se adicionaron volúmenes equivalentes a 20 µL de proteína por carril. La electroforesis se realizó, en tampón de electroforesis, a 80 V por 30 minutos para concentrar la muestra,

y luego a 120 V para la separación. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel a una membrana de PVDF de 0,22 μM de poro durante 90 minutos a una corriente constante de 0,35 A en tampón de transferencia.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se procedió a realizar el bloqueo de estas, con leche descremada al 5% (p53, p21 y GAPDH) y BSA al 5% (histona $\gamma\text{H2A.X}$), durante 1 hora. Posteriormente se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios (p53 1:1000, $\gamma\text{H2A.X}$ 1:1000, p21 1:200 y GAPDH 1:1000) durante toda la noche a 4 °C. Posterior a la incubación, las membranas se lavaron durante 15 minutos con TBS 1X/Tween-20 al 0,1% y fueron incubadas durante 120 minutos a temperatura ambiente con los anticuerpos secundario HRP (Horse radish peroxidase) anti-rabbit (1:5000) y anti-mouse (1:5000), según correspondiera, en TBS 1X/Tween-20 al 0,1%.

Para la inmunodetección, las membranas previamente lavadas fueron incubadas con la solución de luminol del kit Clarity Max™ Western ECL Substrate y la detección se realizó con un analizador de imagen (Syngene G: BOX chemi XT4; Reino Unido). Los niveles de proteína fueron cuantificados mediante el programa de procesamiento de imágenes ImageJ y normalizados respecto a GAPDH, siendo los resultados expresados como veces sobre el control.

5.6 Ensayo de β -galactosidasa

Previamente a la realización del ensayo, se descongeló el kit de β -galactosidasa y se prepararon las soluciones de fijado, tinción y pH. La solución de fijado se preparó mezclando, por cada placa de cultivo de 35 mm a fijar, 100 μL de solución de fijado 10X y 900 μL de H_2O milli-Q. La solución de tinción se preparó mezclando, por cada placa de cultivo de 35 mm a teñir, 93 μL de solución de tinción 10x, 10 μL de solución A, 10 μL de solución B, 50 μL de solución Xgal y 837 μL de H_2O milli-Q. La solución de pH se preparó mezclando, por cada placa de cultivo de 35 mm de control de pH, 10 μL de solución A, 10 μL de solución B, 50 μL de solución Xgal y 930 μL de NaH_2PO_4 . La solución de tinción se ajustó a pH 6 utilizando el pH-metro disponible en el laboratorio.

Con las soluciones de trabajo ya preparadas. Se extrajo el medio de las placas de cultivo de 35 mm y se realizaron 2 lavados con 1 mL de PBS 1X no estéril frío cada uno.

Posteriormente se añadió 1 mL de solución de fijado a cada placa durante 6 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró la solución de fijado y se realizaron 3 lavados con PBS 1X no estéril frío. Luego se agregó 1 mL de solución de tinción o 1 mL de solución pH, según correspondiera, y se dejó en incubación, en ausencia de CO₂, durante 18 horas. Transcurridas las 18 horas, se retiró la solución de tinción y de pH, según correspondiera, y se realizaron 3 lavados con 1 mL de PBS 1X no estéril frío cada uno. Se agregó 1 mL de glicerol al 70% a cada placa y se almacenó a 4 °C para su posterior observación y conteo.

Para el conteo celular, las placas fueron observadas al microscopio y fotografiadas a través del programa Pixit Pro. Se contaron no menos de 500 células por placa y fueron consideradas positivas las células en las que se observó una coloración azul alrededor del núcleo. El resultado del ensayo se expresó como el porcentaje de células positivas sobre el total de células contadas.

5.7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad®. Los resultados se expresaron como el promedio \pm EMS, de al menos tres experimentos independientes ($n \geq 3$). Los datos obtenidos fueron analizados por ANOVA de una vía y luego comparados mediante Test de Kruskal-Wallis o método LSD (Least Significant Difference) de Fisher, dependiendo si los datos son paramétricos o no paramétricos. Esto permitió determinar la significancia estadística de los resultados, considerándose significativa la diferencia entre dos grupos cuando su valor $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Efecto senescente de Ang II y/o LPS

Existe evidencia de que tanto Ang II como LPS son capaces de inducir senescencia en distintos tipos de células [23, 16], pero no hay estudios que evalúen si LPS es capaz de potenciar el efecto de Ang II. Para poder evaluar el efecto senescente de Ang II + LPS sobre FC de rata, las células previamente aisladas fueron tratadas solo con LPS 1 µg/mL, solo con Ang II 1µM o pre tratadas con LPS 1 µg/mL durante 8 horas para luego ser estimuladas con Ang II 1 µM por 24-72 horas adicionales. Posteriormente, a las 24, 48 y 72 horas, se midieron la histona γH2A.X, p53 y p21, y se realizó un ensayo de SA-β-Gal a las 24 y 72 horas, todos ellos marcadores que permiten evaluar la senescencia de los fibroblastos cardiacos.

La [figura 7A](#) muestra los resultados obtenidos a las 24 horas, donde se puede observar un aumento significativo de la histona γH2A.X en las células tratadas con LPS y la combinación de LPS + Ang II. También se observa un aumento significativo de p21 en las células tratadas con LPS y un aumento significativo de p53 en los 3 grupos experimentales (LPS, Ang II y la combinación de ambos). La [figura 7B](#) muestra los resultados a las 48 horas donde no se encontraron diferencias en los niveles de histona γH2A.X, p21 ni p53 en ninguno de los grupos experimentales. En la [figura 7C](#) se observan los resultados a las 72 horas donde se encontró un aumento significativo de la histona γH2A.X en las células tratadas con Ang II y la combinación de LPS + Ang II. También se observó un aumento significativo de p21 en los grupos tratados con LPS y los tratados con Ang II.

Para el ensayo de actividad SA-β-Gal, las células fueron tratadas solo con LPS 1 µg/mL, solo con Ang II 1µM o pre-tratadas con LPS 1 µg/mL durante 8 horas para luego ser estimuladas con Ang II 1 µM por 16 horas. Se utilizó doxorubicina como control positivo de senescencia prematura. Una vez transcurridas 24 o 72 horas se realizó el protocolo del ensayo, el cual esta descrito en la metodología. La [figura 8A](#) muestra un aumento significativo de actividad SA-β-Gal a las 24 horas en las células tratadas con LPS, Ang II y la combinación de ambos estímulos. La [figura 8B](#) también muestra un aumento significativo de la actividad SA-β-Gal a las 72 horas en las células tratadas con LPS, Ang II y la combinación de ambos estímulos.

Todos estos resultados en su conjunto muestran que LPS, Ang II y la combinación de LPS + Ang II son capaces de inducir senescencia celular en los FC de ratas, dado por el aumento de la actividad SA- β -Gal y al menos una de las tres proteínas marcadoras medidas, la histona γ H2A.X, p53 o p21.

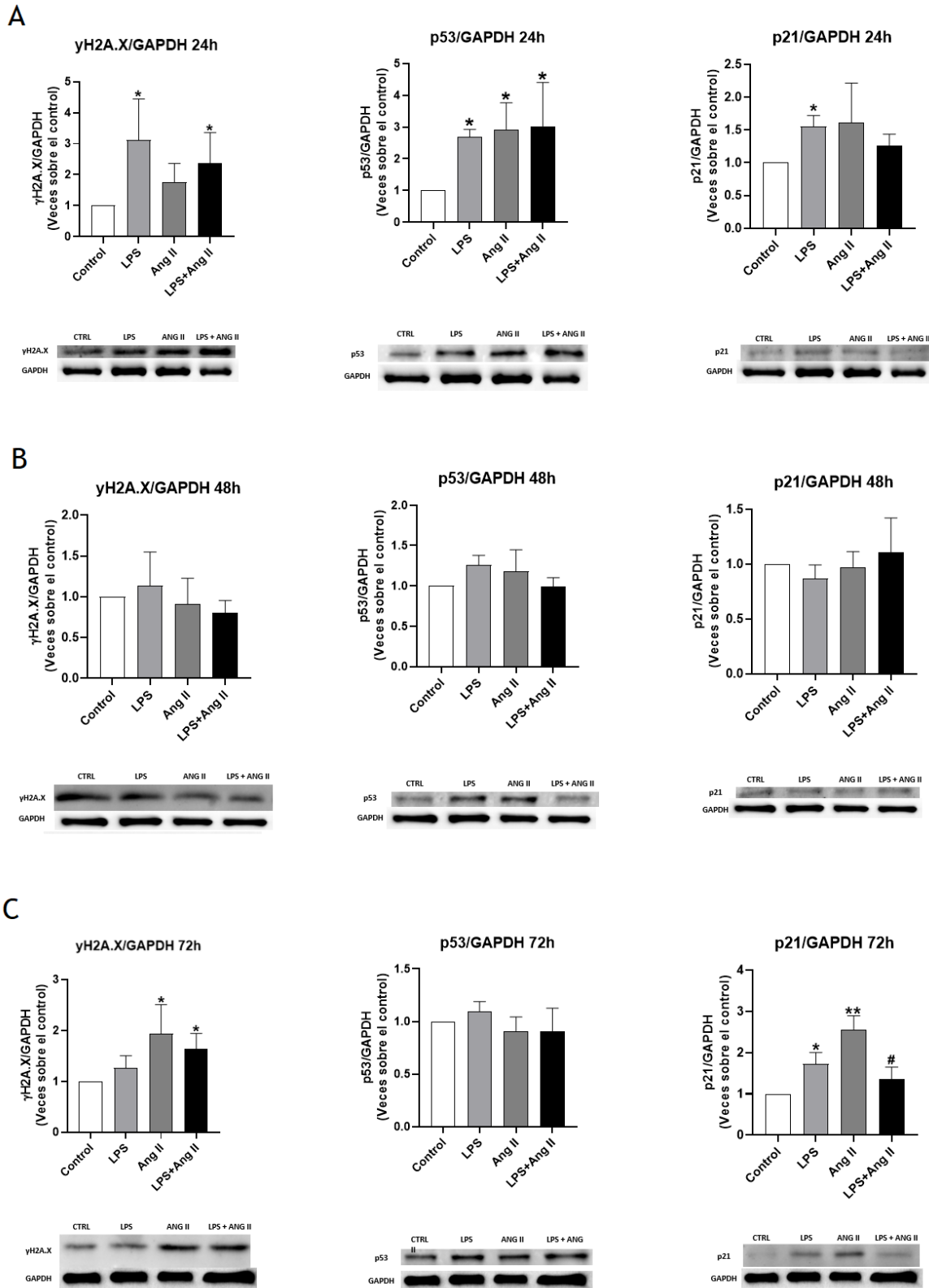


Figura 7. Efectos de LPS y Angiotensina II sobre la expresión de la histona γ H2A.X, p53 y p21. Efecto de LPS 1 μ g/mL, angiotensina II 1 μ M y la combinación de LPS + angiotensina II a 24 horas **A**, 48 horas **B** y 72 horas **C**. Número de experimentos N=6. Resultado expresado como veces sobre el control utilizando GAPDH como control. Ang II: Angiotensina II; LPS: Lipopolisacárido.

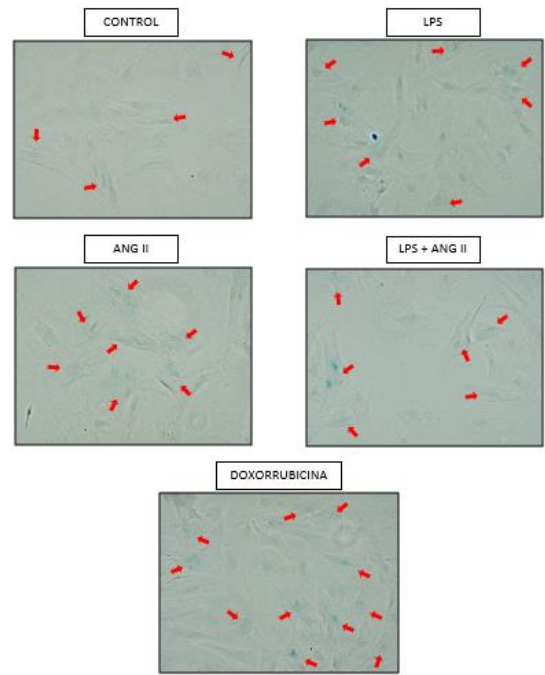
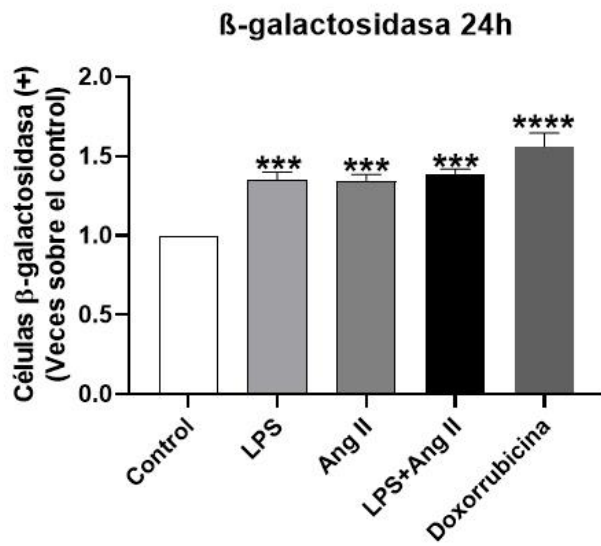
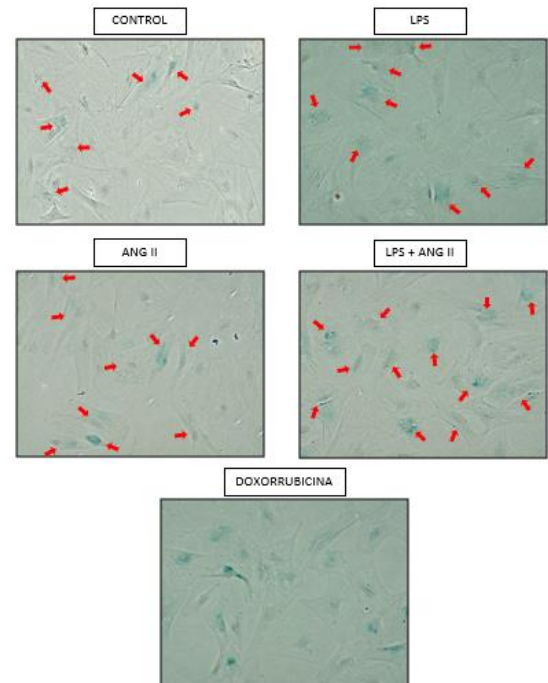
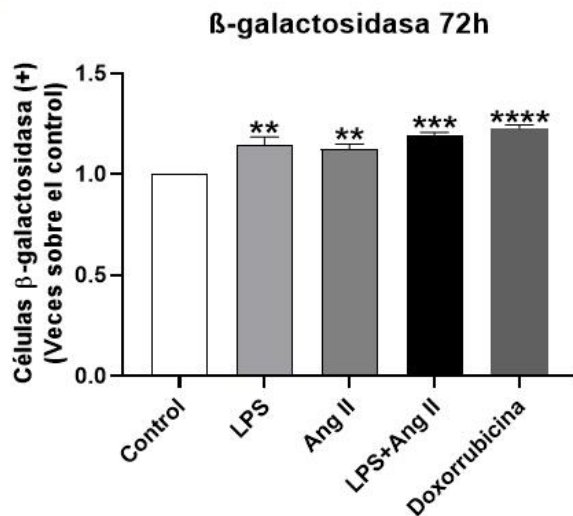
A**B**

Figura 8. Efecto de LPS, ANGII o LPS+ANGII sobre la actividad β-galactosidasa. Efecto de LPS 1 μg/mL, angiotensina II 1 μM o la combinación de LPS + angiotensina II a 24 horas **A** y 48 horas **B**. Número de experimentos N=3. Resultado expresado como veces sobre el control utilizando GAPDH como control. Ang II: Angiotensina II; LPS: Lipopolisacárido. Imágenes representativas obtenidas en microscopio con zoom 10X.

6.2 Efecto de resolvina y navitoclax sobre la senescencia inducida por Ang II

Existe evidencia previa sobre la actividad anti senescente de RvD1 y navitoclax en distintos modelos de estudio [27, 6]. Para evaluar el efecto de RvD1 y navitoclax sobre la actividad SA- β -Gal inducida por Ang II en FC de rata, las células fueron tratadas con Ang II 1 μ M durante 24 horas. Luego, se realizó un lavado y posteriormente se estimularon con RvD1 100 nM o navitoclax 1 μ M hasta alcanzar las 72 horas de experimento. Una vez transcurridas las 72 horas se realizó el ensayo de actividad SA- β -Gal.

La [figura 9A](#) muestra los resultados obtenidos con navitoclax donde se observa un aumento significativo de la actividad SA- β -Gal al tratar con Ang II respecto al control y está disminuye de manera significativa al tratar con navitoclax. De manera similar, La [figura 9B](#) muestra los resultados obtenidos con RvD1 donde se logra apreciar un aumento significativo de la actividad SA- β -Gal al tratar con Ang II comparado con el control y que se ve disminuida significativamente al tratar con RvD1. Como se esperaba, navitoclax y RvD1 no inducen actividad β -galactosidasa por si solas con respecto al control. Estos resultados en su conjunto nos indican que tanto navitoclax como RvD1 fueron capaces de disminuir la actividad SA- β -Gal inducida por Ang II.

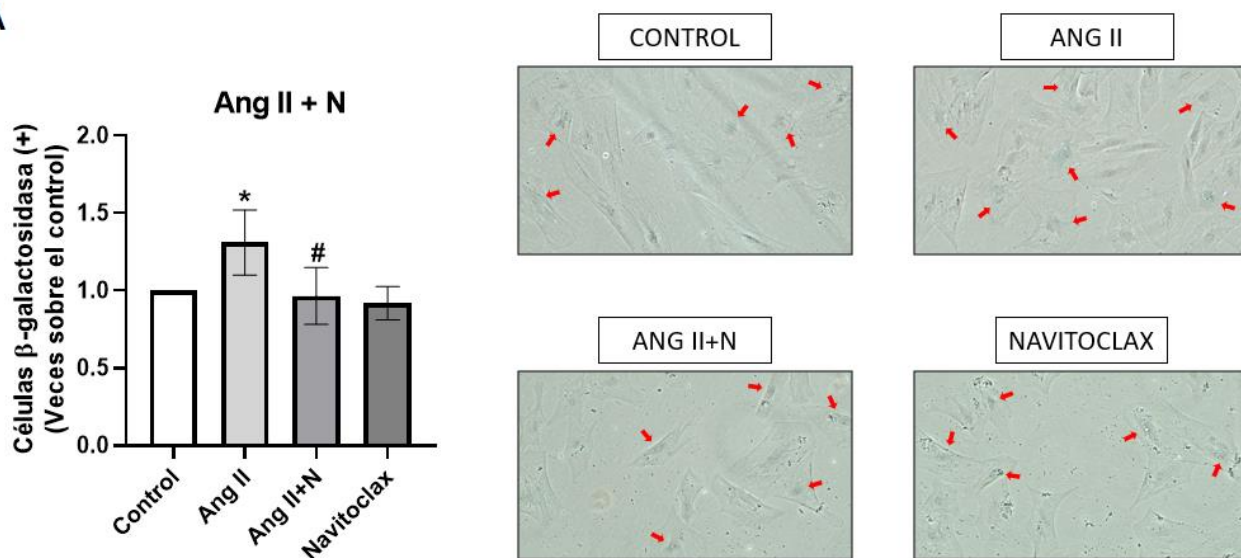
6.3 Efecto de resolvina y navitoclax sobre la senescencia inducida por LPS

Para evaluar el efecto de RvD1 y navitoclax sobre la actividad SA- β -Gal inducida por LPS, las células fueron tratadas con LPS 1 μ g/mL durante 24 horas, luego se realizó un lavado y posteriormente se estimularon con RvD1 100 nM o navitoclax 1 μ M hasta alcanzar las 72 horas de experimento. Una vez transcurridas las 72 horas se realizó el ensayo de actividad SA- β -Gal.

La [figura 10A](#) muestra los resultados obtenidos con navitoclax, donde se observa un aumento significativo de la actividad SA- β -Gal al tratar con LPS con respecto al control y que disminuye significativamente al tratar con navitoclax. Por otro lado, en la [figura 10B](#) se muestran los resultados obtenidos con RvD1 donde se aprecia un aumento significativo de la actividad SA- β -Gal al tratar con LPS con respecto al control, pero no se observa una disminución significativa al tratar con RvD1. Estos resultados nos indican que navitoclax

reverte la inducción de la actividad SA- β -Gal inducida por LPS, no así RvD1, que no redujo la actividad SA- β -Gal inducida por LPS.

A



B

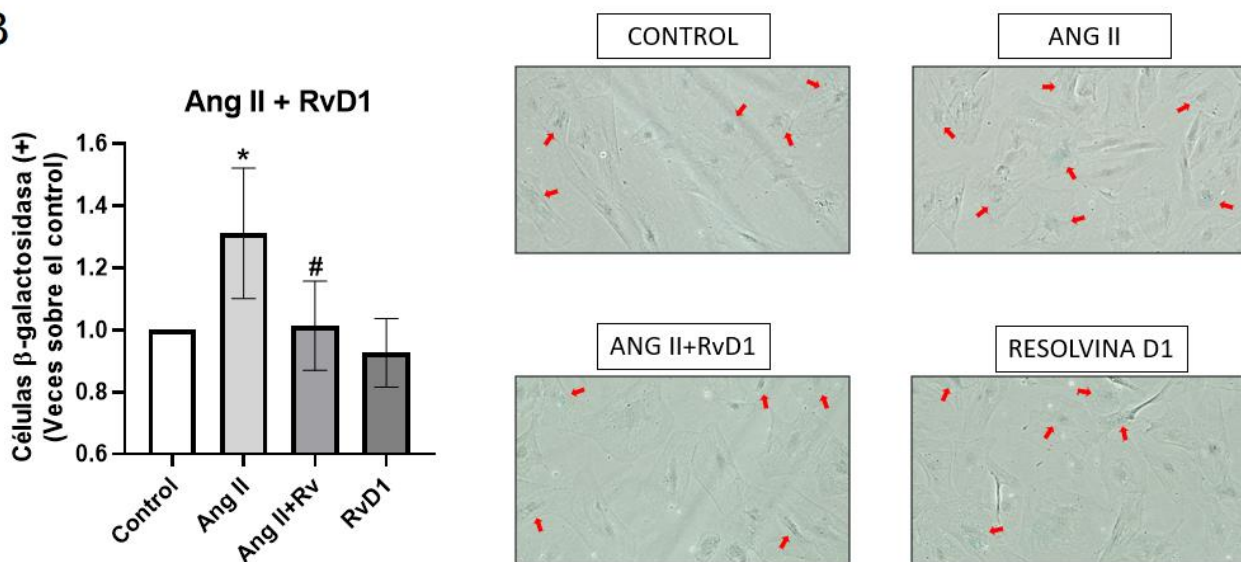
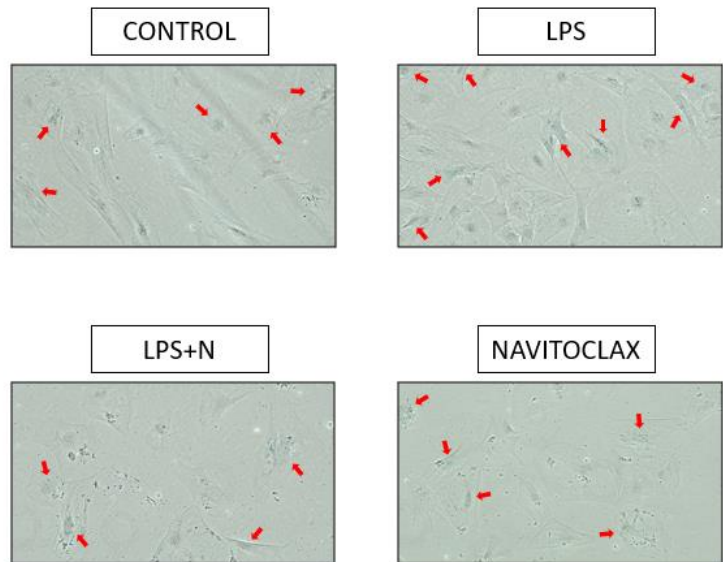
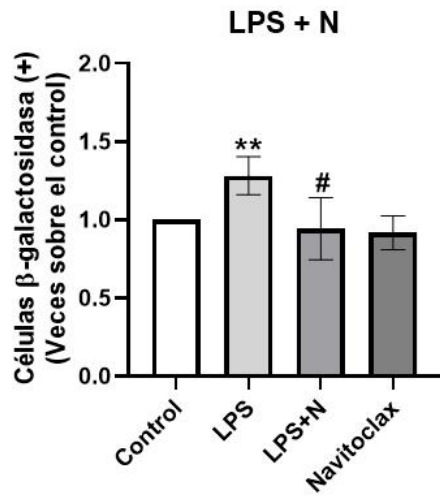


Figura 9. Efecto de navitoclax y resolvina sobre la actividad β -galactosidasa inducida por angiotensina II. Efecto de navitoclax $1\mu\text{M}$ sobre la actividad β -galactosidasa inducida por angiotensina II $1\mu\text{M}$ **A**. Efecto de resolvina D1 sobre la actividad β -galactosidasa inducida por angiotensina II $1\mu\text{M}$ **B**. Número de experimentos $N=3$. *Resultado expresado como veces sobre el control utilizando GAPDH como control. #Resultado expresado como veces sobre el grupo tratado con Ang II. Ang II: Angiotensina II; LPS: Lipopolisacárido; N: Navitoclax; RvD1: Resolvina D1. Imágenes representativas obtenidas en microscopio con zoom 10X

A



B

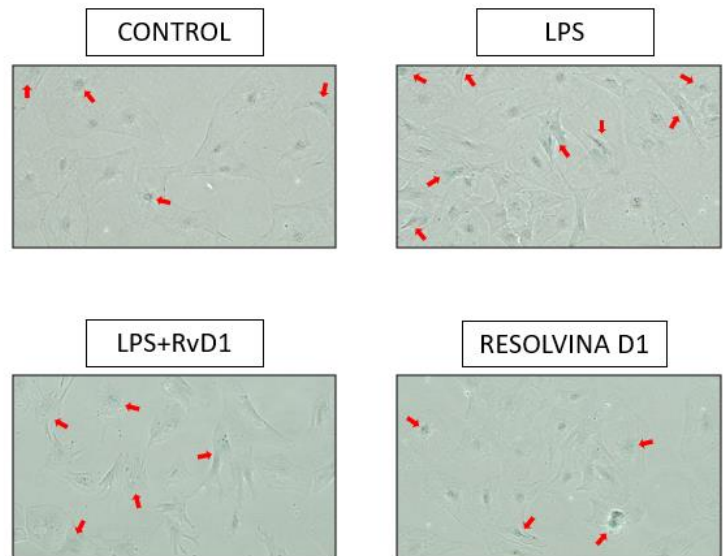
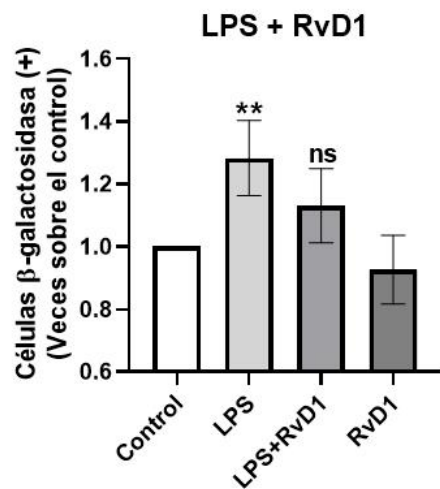


Figura 10. Efecto de navitoclax y resolvin sobre la actividad β -galactosidasa inducida por LPS. Efecto de navitoclax 1 μ M sobre la actividad β -galactosidasa inducida LPS 1 μ g/mL A. Efecto de resolvin D1 sobre la actividad β -galactosidasa inducida por LPS 1 μ g/mL B. Número de experimentos N=3. *Resultado expresado como veces sobre el control utilizando GAPDH como control. #Resultado expresado como veces sobre el grupo tratado con LPS. Ang II: Angiotensina II; LPS: Lipopolisacárido; N: Navitoclax; RvD1: Resolvin D1. Imágenes representativas obtenidas en microscopio con zoom 10X.

6.4 Efecto de resolvina y navitoclax sobre la senescencia inducida por Ang II + LPS

Evidencia previa obtenida en nuestro laboratorio indica que Ang II es capaz de activar el inflammasoma NLRP3 y aumentar la secreción de IL-1 β [37]. También está ampliamente descrito el aumento de la pro-IL-1 β inducida por LPS [38]. Por lo que se hipotetizó que Ang II vería potenciado su efecto pro-senescente en células pre-tratadas con LPS y que RvD1 y navitoclax serían capaces de detener o eliminar este efecto.

Para evaluar si RvD1 o navitoclax son capaces de detener y eliminar la senescencia inducida por Ang II en células pre-tratadas con LPS se estimularon FC con LPS durante 8 horas y luego se estimularon con Ang II durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo se realizó un lavado y se estimuló con RvD1 o navitoclax hasta alcanzar 72 horas en total.

En la [figura 11A](#) se puede observar que el estímulo con Ang II en FC pre tratados con LPS aumenta de forma significativa la actividad SA- β -Gal y que el tratamiento con navitoclax revierte dicho efecto a niveles similares al control. De manera similar, en la [figura 11B](#) se observa que Ang II aumenta de forma significativa la actividad SA- β -Gal en células pre tratadas con LPS y el tratamiento con RvD1 lo detiene a niveles similares al control. Estos resultados indican que tanto navitoclax como RvD1 son capaces de detener o eliminar el aumento de la actividad SA- β -Gal inducida por Ang II en FC de rata pre tratados con LPS.

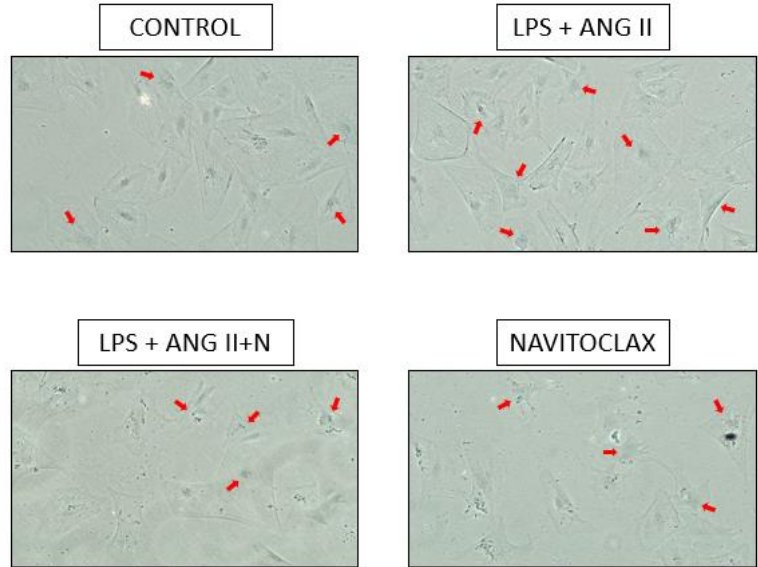
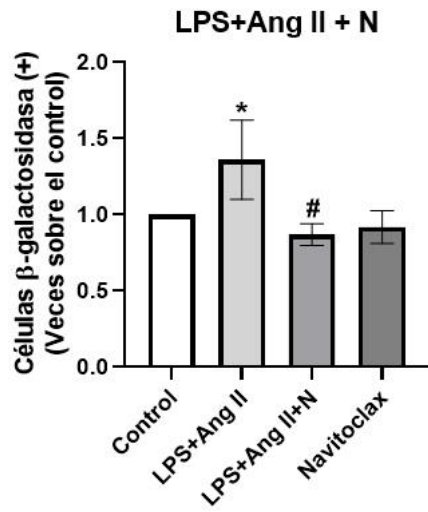
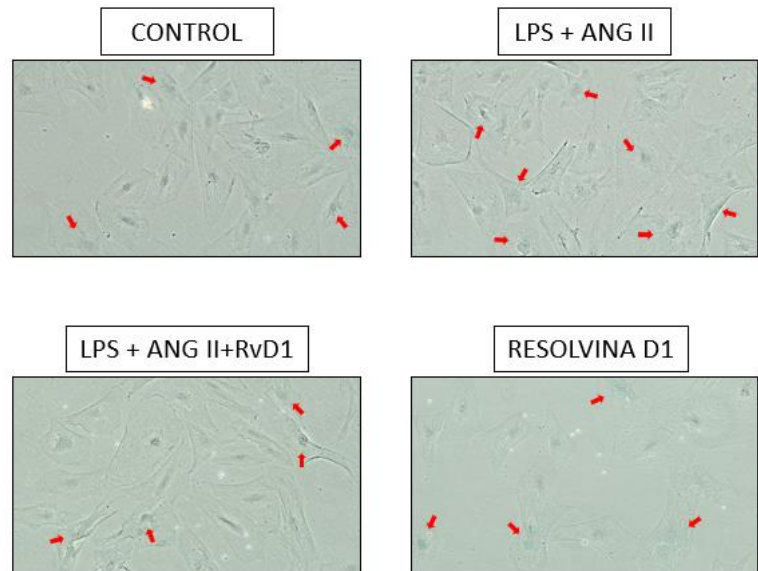
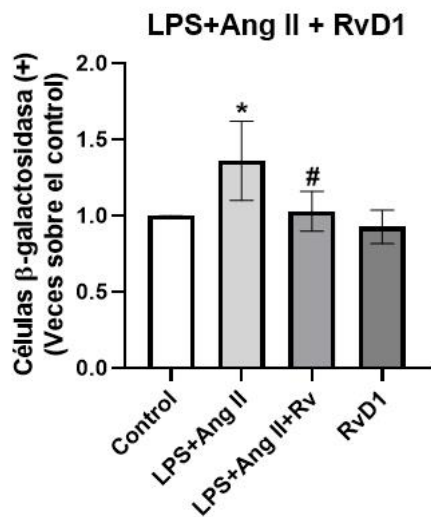
A**B**

Figura 11. Efecto de navitoclax y resolvin sobre la actividad β -galactosidasa inducida por angiotensina II en células pre-tratadas con LPS. Efecto de navitoclax 1 μ M sobre la actividad β -galactosidasa inducida por angiotensina II 1 μ M en células pre-tratadas con LPS 1 μ g/mL A. Efecto de resolvin D1 sobre la actividad β -galactosidasa inducida por angiotensina II 1 μ M en células pre-tratadas con LPS 1 μ g/mL B. Número de experimentos N=3. *Resultado expresado como veces sobre el control utilizando GAPDH como control. #Resultado expresado como veces sobre el grupo tratado con LPS+Ang II. Ang II: Angiotensina II; LPS: Lipopolisacárido; N: Navitoclax; RvD1: Resolvin D1. Imágenes representativas obtenidas en microscopio con zoom 10X.

7. DISCUSIÓN

El proceso de senescencia celular, definido generalmente como un arresto estable del ciclo celular está implicado en muchos procesos biológicos y contiene un SASP complejo que involucra una serie de factores pro inflamatorios [39]. La senescencia celular está asociada a diferentes patologías cardiovasculares donde se ha podido observar una acumulación aberrante de FC senescentes [3]. La senescencia del fibroblasto se ha asociado a fibrosis cardiaca cuya progresión lleva al desarrollo de insuficiencia cardiaca [40].

Los mecanismos por los cuales el FC se vuelve senescente han sido sujeto de estudio en los últimos años debido a la relevancia que tienen estas enfermedades dada por sus altos índices de mortalidad. Sin embargo, aún no se conoce con exactitud todos los estímulos y mecanismos que gatillan la senescencia del FC y tampoco se tienen a disposición muchas herramientas para hacer frente a esta problemática.

Aquí, se reporta a Ang II y LPS como estímulos capaces de inducir la senescencia del FC y, además, se presenta a navitoclax y RvD1 como moléculas que pueden disminuir este fenotipo senescente.

Los resultados expuestos indicaron que los estímulos con Ang II y/o LPS fueron capaces de inducir senescencia en FC en un modelo *in vitro*. Esta senescencia estaba caracterizada por un aumento en la actividad SA- β -Gal y otros marcadores ampliamente descritos que se asocian al proceso senescente. Además, se observó que el aumento de la actividad SA- β -Gal, la cual es el marcador *gold standard* para caracterizar células senescentes, fue disminuido tanto por la acción de navitoclax, un fármaco con actividad senolítica conocida, como también por RvD1, un mediador pro-resolutivo de la inflamación al cual se le propone como una nueva molécula capaz de combatir la senescencia prematura del FC, con la finalidad de ser potencialmente una nueva terapia para tratar la fibrosis cardiaca.

7.1 Efecto de angiotensina II sobre fibroblastos cardiacos de rata

Se ha estudiado ampliamente los efectos que tiene Ang II en el organismo y su efecto inductor de senescencia se ha descrito principalmente a nivel de sistema vascular. Kunieda et al. (2006) ya habían reportado que Ang II es capaz de inducir senescencia prematura de células de la musculatura lisa vascular por una vía dependiente de p21 [22]. Otros autores también han descrito que Ang II induce senescencia de células endoteliales en el contexto de disfunción endotelial [41, 42]. En cuanto a sus efectos cardiacos, estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que Ang II induce una fuerte respuesta proinflamatoria en FC caracterizada por un aumento de la expresión y secreción de citoquinas y monocitos de adhesión [31]. Adicionalmente, se demostró que este efecto ocurre vía activación del inflammasoma NLRP3 a través de la vía AT1R/PLC/IP3R/Ca⁺² [37]. En este trabajo la estimulación de FC con Ang II durante 72 horas indujo senescencia celular dada por un aumento en los niveles de la histona γ H2A.X, p21 y la actividad SA- β -Gal, lo cual es concordante con lo reportado por Jia et al. (2020) que describió que, en un modelo de insuficiencia cardiaca, el estímulo de FC con Ang II lleva a un aumento de p16, p21 y la actividad SA- β -Gal, lo que se relaciona con aumentos en la secreción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, factores de crecimiento y proteasas asociadas al SASP [23].

7.2 Efecto de LPS sobre fibroblastos cardiacos de rata

Hasta donde se tiene conocimiento, no hay reportes de estudios que demuestren que LPS es capaz de inducir senescencia en FC, pero si se han observado efectos pro-senescentes de LPS en otros modelos. Se ha descrito que LPS es capaz de inducir senescencia en osteocitos y macrófagos [18,19]. Green BB et al. (2015) demostraron que LPS es capaz de inducir senescencia en fibroblastos dérmicos bovinos [43], mientras que Ogura et al. (1996) reportaron inducción de senescencia en fibroblastos gingivales humanos al tratarlos con LPS [44]. En este trabajo se demostró que FC de rata tratados durante 72 horas con LPS muestran un aumento de p21 y de la actividad SA- β -Gal junto con una tendencia al aumento de la histona γ H2A.X, que nos permite concluir que LPS induce senescencia de FC. Este efecto de LPS podría deberse a la activación del receptor TLR4. Estudios previos en el laboratorio han mostrado que los FC expresan el receptor TLR4 y

LPS es capaz de activar dicho receptor [13]. Por otra parte, Sokolova et al. (2017) reportaron que palmitato, mediante la activación del receptor TLR4, indujo una respuesta inflamatoria dependiente del inflamasoma NLRP3 y senescencia de FC [15] y Feng et al. (2018) demostraron que LPS induce senescencia de células madre de la pulpa dental vía TLR4/NFκB/p53/p21 [45]. Por lo tanto, ya que LPS también es capaz de activar TLR4 en FC, esta podría ser la vía por la cual LPS media su efecto senescente. Sin embargo, más estudios son requeridos para evaluar el mecanismo por el cual LPS induce senescencia del FC.

7.3 Efecto de angiotensina II en fibroblastos cardíaco de rata pre- tratados con LPS

Como se mencionó previamente, Ang II es capaz de gatillar una respuesta proinflamatoria y senescente vía ensamblaje del inflamasoma NLRP3 y activación de la caspasa 1, llevando a un aumento en la secreción de IL-1β [23, 37]. Por otra parte, palmitato, un activador del receptor TLR4, también induce una respuesta proinflamatoria vía NLRP3 [15]. Además, LPS también activa TLR4 y ha mostrado inducir aumentos de los niveles de pro-IL-1β [13, 38]. En base a estos antecedentes se hipotetizó que el pre tratamiento con LPS durante 8 horas, provocaría un aumento de la pro-IL-1β, lo cual aumentaría el efecto senescente mediado por la activación del inflamasoma NLRP3 inducida por Ang II, lo que en su conjunto llevaría a un aumento de la secreción de IL-1β. Los resultados mostraron que la combinación de LPS con Ang II induce senescencia celular de fibroblastos cardíacos dado por un aumento de p21 y de la actividad SA-β-Gal junto con una tendencia al aumento de la histona γH2A.X. Sin embargo, este efecto no fue mayor que el inducido por LPS o Ang II por si solos. Esto podría deberse a que estamos trabajando con concentraciones máximas en las cuales no se logra observar un efecto aditivo de ambos estímulos en conjunto. Por otro lado, la activación del inflamasoma NLRP3 es una de las vías por las cuales Ang II podría estar induciendo senescencia, vía que también comparte la activación con LPS. Se ha descrito que dentro de los mecanismos por los cuales Ang II media sus efectos se encuentra, además de la inflamación, el aumento de ROS y daño mitocondrial, regulación al alza de distintas moléculas como TGF-β o activación de vías como MAPK [46, 47]. En este sentido la potenciación de la vía inflamatoria mediante aumento de pro-IL-1β no alcanzaría a generar un aumento significativo sobre el efecto

neto global de Ang II. Por lo tanto, evaluar la contribución de los distintos mecanismos de acción de Ang II podría ser de interés para identificar los blancos más efectivos para revertir la senescencia inducida por Ang II.

Es interesante destacar que, a diferencia de los resultados obtenidos a 24 y 72 horas, no se observaron aumentos ni de la histona γ H2A.X, p53 o p21 a las 48 horas. Esto podría deberse a una activación cíclica de la cascada de señalización o podría estar dado por el SASP de los FC senescentes. Estudios previos del laboratorio mostraron que Ang II induce la secreción de IL-6 y MCP-1 [31], mientras que LPS también induce un secretoma que se caracteriza por aumentos de la secreción de MCP-1 y TNF- α [48]. Por lo tanto, el efecto tardío podría ser consecuencia del efecto autocrino de estas citoquinas que se manifiesta tardíamente porque van aumentando sus concentraciones. Sin embargo, es necesario volver a evaluar este resultado a futuro para comprender el mecanismo que subyace estos aumentos tempranos y tardíos durante la progresión del proceso senescente. Además, tras 72 horas de estímulo con LPS, Ang II o la combinación de ambos estímulos, no se observó en ninguno de los grupos un aumento de p53, proteína que se encuentra cascada rio arriba de p21 y que se asocia al mecanismo de arresto del ciclo celular y desarrollo de senescencia. En la literatura, si bien existen descritas vías de activación de p21 que son independientes de p53 [49, 50], no se encuentran reportes de senescencia inducida por LPS o Ang II, en FC u otro modelo celular, que involucren aumento de p21 sin el respectivo aumento de p53. En lo que respecta a este trabajo es un resultado no esperado y que debe ser re evaluado a futuro para dilucidar posibles mecanismos que lo subyacen.

En conclusión, estímulos como la Ang II y LPS, pueden inducir una acumulación aberrante de FC senescentes. Esto podría, en un tejido cardiaco, llevar a un aumento de la fibrosis. Por lo tanto, se requiere el estudio de medidas para revertir dicha acumulación de FC senescentes y así evitar la el desarrollo de fibrosis cardiaca y su posible progresión a insuficiencia cardiaca.

7.4 Efecto de navitoclax en fibroblastos cardiacos de rata senescentes

Navitoclax es un inhibidor de BCL-2 con demostrado efecto senolítico capaz de eliminar células senescentes a través de la inducción de la apoptosis [27]. Es un fármaco promisorio que está siendo evaluado como alternativa terapéutica para el tratamiento de

cáncer, así como patologías asociadas a senescencia celular [26]. En este último sentido, este trabajo demostró que navitoclax es capaz de disminuir la senescencia celular inducida por Ang II, LPS y la combinación de ambos estímulos dado por una disminución en la actividad SA-β-Gal. Esto es concordante con los resultados mostrados por Jia et al. (2020) donde demostraron que navitoclax elimina FC senescentes y reduce el fenotipo SASP en un modelo de insuficiencia cardíaca inducida por Ang II [23]. Previamente ya se había descrito el papel senolítico de navitoclax en enfermedades cardiovasculares. Anderson et al. (2019) reportaron que navitoclax es capaz de reducir la senescencia de cardiomiocitos en hipertrofia cardíaca de corazones de rata envejecidos [51]. Además, Walaszczyk et al. (2019) también demostraron que navitoclax es capaz de reducir la senescencia de cardiomiocitos y que el aclaramiento de estas células senescentes mejora la supervivencia y recuperación de corazones de ratones sometidos a infarto del miocardio [52]. Los resultados encontrados con navitoclax eran esperados dado su conocida actividad senolítica, pero aún es necesario evaluar más marcadores como por ejemplo proteínas asociadas a senescencia (p53, p21) para confirmar el efecto anti senescente de navitoclax en este modelo. De la misma manera, faltó evaluar el efecto de navitoclax sobre el cambio en los niveles de las proteínas pro y anti-apoptóticas (Bax y Bcl-2 o Bcl-xl); así como también, evaluar cambios en los niveles de la pro-caspasa 3 y su forma activa, los cuales debieran aumentar con navitoclax. Este último resultado confirmaría que navitoclax está induciendo apoptosis de FC senescentes. Este trabajo se debe realizar para confirmar estos resultados.

7.5 Efecto de resolvina D1 en fibroblastos cardíacos de rata senescentes

Las resolvinas son mediadores especializados pro-resolutivos que derivan de los ácidos grasos DHA (resolvinas de la serie D) y EPA (resolvinas de la serie E) [53, 54]. Estos lípidos han mostrado tener una potente actividad antiinflamatoria. Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que tanto RvD1 como RvE1 promueven la resolución de la inflamación en FC de rata [32]. Además, RvD1 es capaz de reducir la expresión y secreción de citoquinas y la adhesión de los monocitos inducidos por Ang II en FC sin inducir apoptosis de FC [31]; y atenuar la inflamación en ratones previniendo el remodelado cardíaco y la hipertensión a través de la unión a su receptor ALX/FPR2 [33].

Debido a la importancia que ha mostrado la inflamación en el proceso de senescencia, dado que el fenotipo SASP está compuesto en gran medida por citoquinas proinflamatorias, se ha propuesto a las resolvinas como una nueva alternativa para el tratamiento de la senescencia celular. En este sentido, estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que RvE1 es capaz de atenuar la senescencia de FC de ratón inducida por doxorubicina [34]. Además, Shamon et al. (2022) reportaron que resolvina E1 también es capaz de atenuar la senescencia endotelial inducida por doxorubicina [35]. Por otra parte, Rymut et al. (2019) demostraron que RvD1 promueve la eferocitosis de macrófagos y limita la senescencia celular en un modelo de lesión pulmonar remota por isquemia y reperfusión [55]. Mientras que Kim et al. (2021) reportaron que RvD1 es capaz de suprimir la senescencia inducida por H₂O₂ en fibroblastos dérmicos [56]. En este trabajo se demostró que RvD1 es capaz de disminuir la senescencia de FC inducida por Ang II; así como también, disminuir la senescencia inducida por la combinación de Ang II con LPS dado por una disminución de la actividad SA- β -Gal. Hasta la fecha no existen reportes que muestren este efecto de la RvD1 en FC, por lo tanto, aún es necesario evaluar más marcadores de senescencia para establecer con mayor certeza estos efectos. Estos resultados preliminares son auspiciosos e indican que RvD1 podría ser un compuesto prometedor para el tratamiento de la senescencia del FC y la fibrosis cardiaca.

8. ESQUEMA RESUMEN

Fibroblasto cardiaco

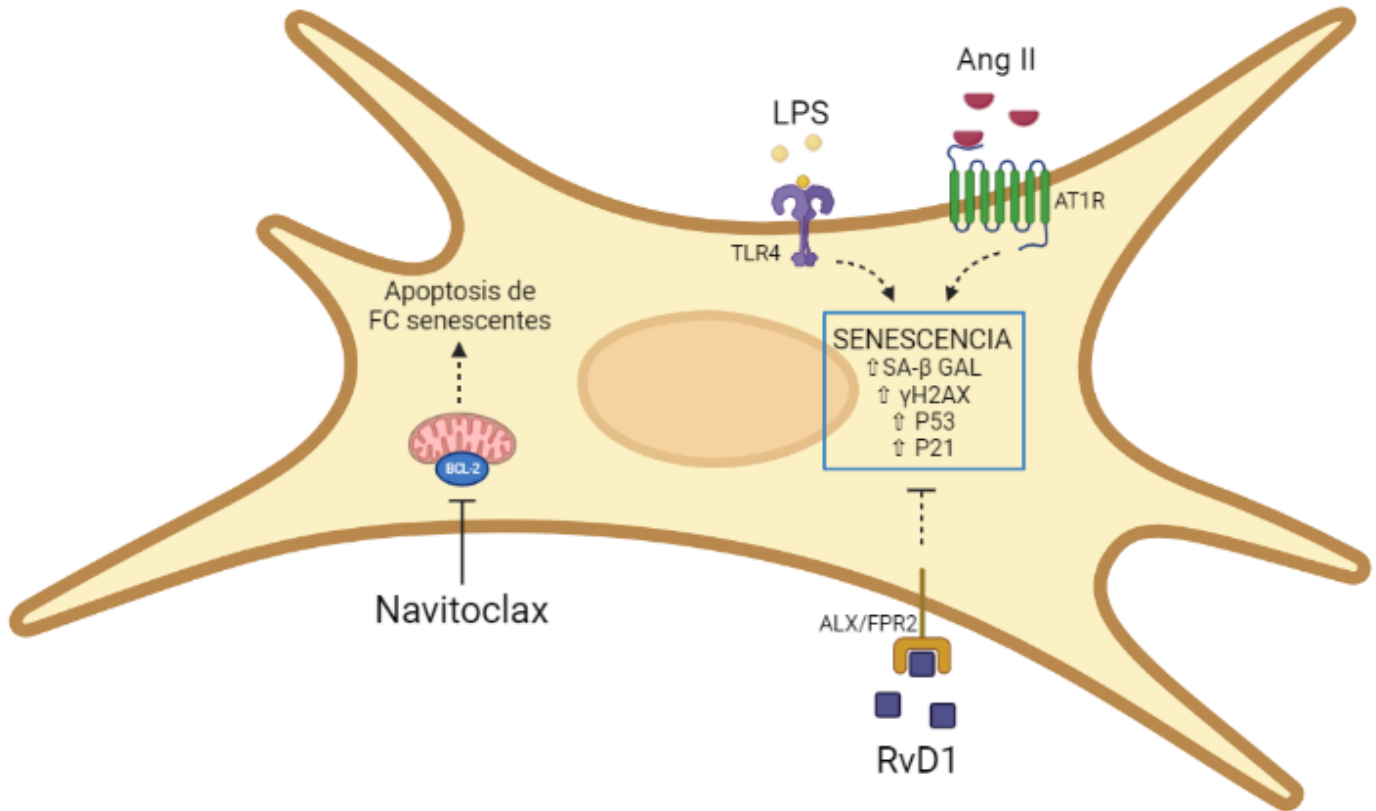


Figura 12. Efectos de Navitoclax y Resolvin D1 Sobre la Senescencia de Fibroblastos Cardiacos Inducida por Angiotensina II y LPS. Ang II y LPS inducen senescencia del fibroblasto cardiaco dada por un aumento de SA-β GAL, γH2AX, p53 y p21. Resolvin D1 revierte la senescencia de del fibroblasto cardiaco inducida por Ang II y LPS. Navitoclax induce apoptosis y elimina fibroblastos cardiacos senescentes.

9. CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos en esta memoria se puede concluir que:

1. Angiotensina II induce senescencia en fibroblastos cardiacos de rata dado por un aumento en la actividad SA- β -Gal y proteínas marcadoras de senescencia.
2. LPS induce senescencia en FC de rata dado por un aumento en la actividad SA- β -Gal y proteínas marcadoras de senescencia.
3. El tratamiento con Ang II en FC de rata pre tratados con LPS indujo senescencia, pero esta no fue superior a la inducción de cada estímulo por sí solo.
4. Navitoclax disminuye la senescencia de FC inducida por Ang II, LPS o la combinación de ambos estímulos, dado por la disminución de la actividad SA- β -Gal.
5. RvD1 disminuye la senescencia de FC inducida por Ang II y la combinación de Ang II + LPS, pero este efecto no alcanzó a ser significativo en las células tratadas con LPS solo.

10. LIMITACIONES

Dentro de las limitaciones de este trabajo se encuentran el número insuficiente de experimentos que se alcanzaron a realizar, que puede haber determinado que algunos resultados no obtuvieran significancia estadística. Además, la falta de evaluación de proteínas asociadas a senescencia (Histona γ H2AX, p53 y p21) en los experimentos con RvD1 y navitoclax. A este respecto, se podrían haber evaluado otras proteínas de senescencia como p16 y pRb; así como también, la composición del SASP. Por último, no se evaluaron las proteínas involucradas en la apoptosis.

11. PROYECCIONES

Los resultados expuestos en este trabajo muestran el rol de Ang II y LPS en la inducción de senescencia de FC. Por otra parte, se presenta a navitoclax y RvD1 como tratamientos eficaces para revertir la senescencia de FC inducida por Ang II y LPS. Sin embargo, aún

es necesario dilucidar con claridad los receptores y mecanismos celulares involucrados en todos estos efectos. Además, estos resultados se obtuvieron en un modelo *in vitro*, por lo tanto, es necesario evaluar su efectividad en un modelo in vivo para obtener una mejor aproximación a una posible nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de la fibrosis cardiaca.

12. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Enfermedades Cardiovasculares, Organización Mundial de la Salud <En Línea> <[who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))> (Fecha Consulta: 09 Enero, 2022)
- [2] Mes del Corazón 2017, Ministerio de Salud <En Línea> <minsal.cl/mes-del-corazon-2017/> (Fecha Consulta: 09 Enero, 2022)
- [3] Zhu F, Li Y, Zhang J, Piao C, et al. (2013) Senescent Cardiac Fibroblast Is Critical for Cardiac Fibrosis after Myocardial Infarction. PLoS ONE 8(9): e74535. doi:10.1371/journal.pone.0074535
- [4] Domhnall McHugh, Jesús Gil. (2018) Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. J Cell Biol. 217 (1): 65-77. doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.201708092>
- [5] Sweeney, M., Cook S.A. and Gil, J. (2022) Therapeutic opportunities for senolysis in cardiovascular disease. FEBS J. <https://doi.org/10.1111/febs.16351>
- [6] Kirkland JL, Tchkonja T (Mayo Clinic Robert and Arlene Kogod Center on Aging, Rochester, MN, USA). Senolytic drugs: from discovery to translation (Review). J Intern Med 2020; <https://doi.org/10.1111/joim.13141>
- [7] Maggie S Chen, Richard T Lee, Jessica C Garbern. (2021) Senescence mechanisms and targets in the heart. Cardiovascular Research. cvab161, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab161>
- [8] Acosta Gómez, Adriana (2006). El fibroblasto: Su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. <<https://www.redalyc.org/pdf/2312/231220955005.pdf>> (Fecha consulta: 03 febrero, 2022)
- [9] Malina J. Ivey and Michelle D. Tallquist (2016). Defining the Cardiac Fibroblast. Circ J. 80(11): 2269-2276.

[10] Díaz-Araya G, Vivar R, Humeres C, Boza P, Bolivar S, Muñoz C. (2015). Cardiac fibroblast as sentinel cells in cardiac tissue: Receptors, signaling pathways and cellular functions. *Pharmacol Res.* 101:30-40.

[11] Malavolta, Marco, Massimo Bracci, Lory Santarelli, Md Abu Sayeed, Elisa Pierpaoli, Robertina Giacconi, Laura Costarelli, et al. «Inducers of Senescence, Toxic Compounds, and Senolytics: The Multiple Faces of Nrf2-Activating Phytochemicals in Cancer Adjuvant Therapy». *Mediators of Inflammation* 2018 (2018): 1-32. <https://doi.org/10.1155/2018/4159013>.

[12] Hurtado SR, Iregui CA. El lipopolisacárido. *Rev. Med. Ver.* no.19 Bogotá Jan./June 2010.

[13] Bolívar S, Santana R, Ayala P, Landaeta R, Boza P, Humeres C, Vivar R, Muñoz C, Pardo V, Fernandez S, Anfossi R, Diaz-Araya G. Lipopolysaccharide activates toll-like receptor 4 and prevents cardiac fibroblast-to-myofibroblast differentiation. *Cardiovasc Toxicol* (2017) 17:458-470.

[14] Asgharzadeh, Fereshteh, Rahimeh Bargi, Mahmoud Hosseini, Mehdi Farzadnia, y Majid Khazaei. «Cardiac and Renal Fibrosis and Oxidative Stress Balance in Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Male Rats». *ARYA Atheroscler* 14, n.º 2 (21 de abril de 2018). <https://doi.org/10.22122/arya.v14i2.1550>.

[15] Sokolova, Marina, Leif Erik Vinge, Katrine Alfsnes, Maria Belland Olsen, Lars Eide, Ole Jørgen Kaasbøll, Håvard Attramadal, et al. «Palmitate Promotes Inflammatory Responses and Cellular Senescence in Cardiac Fibroblasts». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862, n.º 2 (febrero de 2017): 234-45. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.11.003>.

[16] Kim, Chang Oh, Ae Jung Huh, Sang Hoon Han, y June Myung Kim. «Analysis of Cellular Senescence Induced by Lipopolysaccharide in Pulmonary Alveolar Epithelial Cells». *Archives of Gerontology and Geriatrics* 54, n.º 2 (marzo de 2012): e35-41. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2011.07.016>.

[17] Wang, Y., Chen, H., Sun, C., Shen, H., and Cui, X. (2021). Metformin Attenuates Lipopolysaccharide-induced Epithelial Cell Senescence by Activating Autophagy. *Cell Biol Int* 45 (5), 927-935. doi:10.1002/cbin.11536

[18] Aquino-Martinez, Ruben, Jennifer L. Rowsey, Daniel G. Fraser, Brittany A. Eckhardt, Sundeep Khosla, Joshua N. Farr, y David G. Monroe. «LPS-Induced Premature Osteocyte Senescence: Implications in Inflammatory Alveolar Bone Loss and Periodontal Disease Pathogenesis». *Bone* 132 (marzo de 2020): 115220. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.115220>.

[19] Wang, Hui, Haiping Fu, Ruigong Zhu, Xuan Wu, Xian Ji, Xuesong Li, Hong Jiang, et al. «BRD4 Contributes to LPS-Induced Macrophage Senescence and Promotes Progression of Atherosclerosis-Associated Lipid Uptake». *Aging* 12, n.º 10 (11 de mayo de 2020): 9240-59. <https://doi.org/10.18632/aging.103200>.

[20] Wong, Marty Kwok-Shing. «Subchapter 42B - Angiotensin II». En *Handbook of Hormones (Second Edition)*, editado por Hironori Ando, Kazuyoshi Ukena, y Shinji Nagata, Second Edition., 497-500. San Diego: Academic Press, 2021. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820649-2.00126-1>.

[21] Benigni, Ariela, Paola Cassis, y Giuseppe Remuzzi. «Angiotensin II Revisited: New Roles in Inflammation, Immunology and Aging». *EMBO Molecular Medicine* 2, n.º 7 (julio de 2010): 247-57. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000080>.

[22] Kunieda, Takeshige, Tohru Minamino, Jun-ichiro Nishi, Kaoru Tateno, Tomomi Oyama, Taro Katsuno, Hideyuki Miyauchi, et al. «Angiotensin II Induces Premature Senescence of Vascular Smooth Muscle Cells and Accelerates the Development of Atherosclerosis via a P21-Dependent Pathway». *Circulation* 114, n.º 9 (29 de agosto de 2006): 953-60. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.626606>.

[23] Jia K, Dai Y, Liu A, Li X, Wu L, Lu L, Bao Y, Jin Q. Senolytic Agent Navitoclax Inhibits Angiotensin II-Induced Heart Failure in Mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2020 Oct;76(4):452-460. doi: 10.1097/FJC.0000000000000878. PMID: 32675749.

[24] Kang, Chanhee. «Senolytics and Senostatics: A Two-Pronged Approach to Target Cellular Senescence for Delaying Aging and Age-Related Diseases», s. f., 7.

[25] Short, Susan, Edward Fielder, Satomi Miwa, y Thomas von Zglinicki. «Senolytics and Senostatics as Adjuvant Tumour Therapy». *EBioMedicine* 41 (marzo de 2019): 683-92. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.01.056>.

[26] Mohamad Anuar, Nur Najmi, Nur Syahidah Nor Hisam, Sze Ling Liew, y Azizah Ugasman. «Clinical Review: Navitoclax as a Pro-Apoptotic and Anti-Fibrotic Agent». *Frontiers in Pharmacology* 11 (26 de noviembre de 2020): 564108. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.564108>.

[27] Zhu Y, Tchkonina T, Fuhrmann-Stroissnigg H, Dai HM, Ling YY, Stout MB, Pirtskhalava T, Giorgadze N, Johnson KO, Giles CB, Wren JD, Niedernhofer LJ, Robbins PD, Kirkland JL. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell*. 2016 Jun;15(3):428-35. doi: 10.1111/accel.12445. Epub 2016 Mar 18. PMID: 26711051; PMCID: PMC4854923.

[28] Muñoz NC. Resolvina D1 disminuye la adhesión de células mononucleares de bazo sobre fibroblastos cardiacos en ratas neonatas. Memoria para optar al título profesional de químico farmacéutico. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2017.

[29] Hong S, Gronert K, Devchand P, Moussignac R-L, Serhan CN. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood and glial cells: autacoids in antiinflammation. *J Biol Chem* 2003;278:14677-87.

[30] Khaled M, Shinabi N, Labban N, Batarseh G, Song F, Ruby J and Windsow L. Effects of Resolvin D1 on Cell Survival and Cytokine Expression of Human Gingival Fibroblast. *Journal of Periodontology*, 84(12), 1838-1846.

[31] Salas-Hernández, Aimeé, Felipe Ruz-Cortés, Francisca Bruggendieck, Claudio Espinoza-Perez, Jenaro Espitia-Corredor, Nelson M. Varela, Luis A. Quiñones, Carlos Sánchez-Ferrer, Concepción Peiró, y Guillermo Díaz-Araya. «Resolvin D1 Reduces Expression and Secretion of Cytokines and Monocyte Adhesion Triggered by Angiotensin II, in Rat Cardiac Fibroblasts». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 141 (septiembre de 2021): 111947. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111947>.

[32] Salas-Hernández A, Espinoza-Pérez C, Vivar R, Espitia-Corredor J, Lillo J, Parra-Flores P, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C, Díaz-Araya G. Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in rat cardiac fibroblast in vitro. *Mol Biol Rep.* 2021 Jan;48(1):57-66. doi: 10.1007/s11033-020-06133-8. Epub 2021 Jan 18. PMID: 33459958.

[33] Olivares-Silva F, De Gregorio N, Espitia-Corredor J, Espinoza C, Vivar R, Silva D, Osorio JM, Lavandero S, Peiró C, Sánchez-Ferrer C, Díaz-Araya G. Resolvin-D1 attenuation of angiotensin II-induced cardiac inflammation in mice is associated with prevention of cardiac remodeling and hypertension. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2021 Dec 1;1867(12):166241. doi: 10.1016/j.bbadis.2021.166241. Epub 2021 Aug 13. PMID: 34400298.

[34] Espitia-Corredor JA, Shamoan L, Olivares-Silva F, Rimassa-Taré C, Muñoz-Rodríguez C, Espinoza-Pérez C, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C, Díaz-Araya G. Resolvin E1 attenuates doxorubicin-induced cardiac fibroblast senescence: A key role for IL-1 β . *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2022 Nov 1;1868(11):166525. doi: 10.1016/j.bbadis.2022.166525. Epub 2022 Aug 18. PMID: 35987478.

[35] Shamoan L, Espitia-Corredor JA, Dongil P, Menéndez-Ribes M, Romero A, Valencia I, Díaz-Araya G, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C. Resolvin E1 attenuates doxorubicin-induced endothelial senescence by modulating NLRP3 inflammasome activation. *Biochem Pharmacol.* 2022 Jul;201:115078. doi: 10.1016/j.bcp.2022.115078. Epub 2022 May 10. PMID: 35551917.

[36] 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*. 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/> doi: 10.17226/12910

[37] Espitia-Corredor, Jenaro Antonio, Pía Boza, Claudio Espinoza-Pérez, José Miguel Lillo, Constanza Rimassa-Taré, Víctor Machuca, José Miguel Osorio-Sandoval, et al. «Angiotensin II Triggers NLRP3 Inflammasome Activation by a Ca²⁺ Signaling-Dependent Pathway in Rat Cardiac Fibroblast Ang-II by a Ca²⁺-Dependent Mechanism Triggers NLRP3 Inflammasome in CF». *Inflammation*, 22 de julio de 2022. <https://doi.org/10.1007/s10753-022-01707-z>.

[38] Zastona, Zbigniew, Eva M. Pålsson-McDermott, Deepthi Menon, Moritz Haneklaus, Ewelina Flis, Hannah Prendeville, Sarah E. Corcoran, Marc Peters-Golden, y Luke A. J. O'Neill. «The Induction of Pro-IL-1 β by Lipopolysaccharide Requires Endogenous Prostaglandin E₂ Production». *The Journal of Immunology* 198, n.º 9 (1 de mayo de 2017): 3558-64. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1602072>.

[39] Mehdizadeh M, Aguilar M, Thorin E, Ferbeyre G, Nattel S. The role of cellular senescence in cardiac disease: basic biology and clinical relevance. *Nat Rev Cardiol*. 2022 Apr;19(4):250-264. doi: 10.1038/s41569-021-00624-2. Epub 2021 Oct 19. PMID: 34667279.

[40] Biernacka, Anna, y Nikolaos G Frangogiannis. «Aging and Cardiac Fibrosis». *Aging and Disease* 2, n.º 2 (2011): 16.

[41] Khemais-Benkhiat S, Belcastro E, Idris-Khodja N, Park SH, Amoura L, Abbas M, Auger C, Kessler L, Mayoux E, Toti F, Schini-Kerth VB. Angiotensin II-induced redox-sensitive SGLT1 and 2 expression promotes high glucose-induced endothelial cell senescence. *J Cell Mol Med*. 2020 Feb;24(3):2109-2122. doi: 10.1111/jcmm.14233. Epub 2019 Mar 30. PMID: 30929316; PMCID: PMC7011151.

[42] Park SH, Belcastro E, Hasan H, Matsushita K, Marchandot B, Abbas M, Toti F, Auger C, Jesel L, Ohlmann P, Morel O, Schini-Kerth VB. Angiotensin II-induced upregulation of SGLT1 and 2 contributes to human microparticle-stimulated endothelial senescence and dysfunction: protective effect of gliflozins. *Cardiovasc Diabetol*. 2021 Mar 16;20(1):65. doi: 10.1186/s12933-021-01252-3. PMID: 33726768; PMCID: PMC7967961.

- [43] Green BB, McKay SD, Kerr DE. Age dependent changes in the LPS induced transcriptome of bovine dermal fibroblasts occurs without major changes in the methylome. *BMC Genomics*. 2015 Jan 27;16(1):30. doi: 10.1186/s12864-015-1223-z. PMID: 25623529; PMCID: PMC4312471.
- [44] Ogura N, Matsuda U, Tanaka F, Shibata Y, Takiguchi H, Abiko Y. In vitro senescence enhances IL-6 production in human gingival fibroblasts induced by lipopolysaccharide from *Campylobacter rectus*. *Mech Ageing Dev*. 1996 May 24;87(1):47-59. doi: 10.1016/0047-6374(96)01701-0. PMID: 8735906.
- [45] Feng, Guijuan, Ke Zheng, Tong Cao, Jinlong Zhang, Min Lian, Dan Huang, Changbo Wei, Zhifeng Gu, y Xingmei Feng. «Repeated Stimulation by LPS Promotes the Senescence of DPSCs via TLR4/MyD88-NF-KB-P53/P21 Signaling». *Cytotechnology* 70, n.º 3 (junio de 2018): 1023-35. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0180-6>.
- [46] Min LJ, Mogi M, Iwai M, Horiuchi M. Signaling mechanisms of angiotensin II in regulating vascular senescence. *Ageing Res Rev*. 2009 Apr;8(2):113-21. doi: 10.1016/j.arr.2008.12.002. Epub 2008 Dec 31. PMID: 19162241.
- [47] Chen Y, Zeng M, Zhang Y, Guo H, Ding W, Sun T. Nlrp3 Deficiency Alleviates Angiotensin II-Induced Cardiomyopathy by Inhibiting Mitochondrial Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 Feb 5;2021:6679100. doi: 10.1155/2021/6679100. PMID: 33628380; PMCID: PMC7884178.
- [48] Humeres C, Vivar R, Boza P, Muñoz C, Bolivar S, Anfossi R, Osorio JM, Olivares-Silva F, García L, Díaz-Araya G. Cardiac fibroblast cytokine profiles induced by proinflammatory or profibrotic stimuli promote monocyte recruitment and modulate macrophage M1/M2 balance in vitro. *J Mol Cell Cardiol*. 2016 Oct 27:S0022-2828(16)30392-3. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.10.014. Epub ahead of print. PMID: 27983968.
- [49] Chan CH, Gao Y, Moten A, Lin HK. Novel ARF/p53-independent senescence pathways in cancer repression. *J Mol Med (Berl)*. 2011 Sep;89(9):857-67. doi: 10.1007/s00109-011-0766-y. Epub 2011 May 19. PMID: 21594579; PMCID: PMC3296232.

[50] Park JW, Jang MA, Lee YH, Passaniti A, Kwon TK. p53-independent elevation of p21 expression by PMA results from PKC-mediated mRNA stabilization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jan 12;280(1):244-8. doi: 10.1006/bbrc.2000.4105. PMID: 11162506.

[51] Anderson R, Lagnado A, Maggiorani D, Walaszczyk A, Dookun E, Chapman J, Birch J, Salmonowicz H, Ogrodnik M, Jurk D, Proctor C, Correia-Melo C, Victorelli S, Fielder E, Berlinguer-Palmini R, Owens A, Greaves LC, Kolsky KL, Parini A, Douin-Echinard V, LeBrasseur NK, Arthur HM, Tual-Chalot S, Schafer MJ, Roos CM, Miller JD, Robertson N, Mann J, Adams PD, Tchkonja T, Kirkland JL, Mialet-Perez J, Richardson GD, Passos JF. Length-independent telomere damage drives post-mitotic cardiomyocyte senescence. *EMBO J*. 2019 Mar 1;38(5):e100492. doi: 10.15252/embj.2018100492. Epub 2019 Feb 8. PMID: 30737259; PMCID: PMC6396144.

[52] Walaszczyk A, Dookun E, Redgrave R, Tual-Chalot S, Victorelli S, Spyridopoulos I, Owens A, Arthur HM, Passos JF, Richardson GD. Pharmacological clearance of senescent cells improves survival and recovery in aged mice following acute myocardial infarction. *Aging Cell*. 2019 Jun;18(3):e12945. doi: 10.1111/accel.12945. Epub 2019 Mar 28. PMID: 30920115; PMCID: PMC6516151.

[53] Kain V, Ingle KA, Colas RA, Dalli J, Prabhu SD, Serhan CN, Joshi M, Halade GV. Resolvin D1 activates the inflammation resolving response at splenic and ventricular site following myocardial infarction leading to improved ventricular function. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Jul;84:24-35. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.04.003. Epub 2015 Apr 11. PMID: 25870158; PMCID: PMC4468047.

[54] Dona M, Fredman G, Schwab JM, Chiang N, Arita M, Goodarzi A, Cheng G, von Andrian UH, Serhan CN. Resolvin E1, an EPA-derived mediator in whole blood, selectively counterregulates leukocytes and platelets. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):848-55. doi: 10.1182/blood-2007-11-122598. Epub 2008 May 14. PMID: 18480426; PMCID: PMC2481548.

[55] Rymut N, Heinz J, Sadhu S, Hosseini Z, Riley CO, Marinello M, Maloney J, MacNamara KC, Spite M, Fredman G. Resolvin D1 promotes efferocytosis in aging by limiting senescent cell-induced MerTK cleavage. *FASEB J*. 2020 Jan;34(1):597-609. doi: 10.1096/fj.201902126R. Epub 2019 Nov 26. PMID: 31914705; PMCID: PMC6956736.

[56] Kim HJ, Kim B, Byun HJ, Yu L, Nguyen TM, Nguyen TH, Do PA, Kim EJ, Cheong KA, Kim KS, Huy Phùng H, Rahman M, Jang JY, Rho SB, Kang GJ, Park MK, Lee H, Lee K, Cho J, Han HK, Kim SG, Lee AY, Lee CH. Resolvin D1 Suppresses H₂O₂-Induced Senescence in Fibroblasts by Inducing Autophagy through the miR-1299/ARG2/ARL1 Axis. *Antioxidants* (Basel). 2021 Nov 30;10(12):1924. doi: 10.3390/antiox10121924. PMID: 34943028; PMCID: PMC8750589.