



Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

LPS induce senescencia en fibroblastos cardiacos de rata a través de la vía de p38 y NF-kB

Memoria para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico

Matías Ignacio Vallejos Avendaño

Director: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

Patrocinante: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

Santiago, Chile, 2023

*Para Adam Parker Sasmak,
donde convergen las realidades.*

AGRADECIMIENTOS

Mi mayor gratitud para mi madre Paola, que pospuso su vida para guiar la mía y la volvió su prioridad por años para cuidarme. Para mi hermano, Mateo, que me otorgó libertad a cambio de la suya. Para mis padres, Juan y Fabián, que me criaron de manera alterna con lo mejor de sus mundos.

También agradecer a mi familia, por creer en mí y confiar en este proceso. A mis amigos, por apoyarme y demostrarme que había más vida después de lo académico. A mis compañeros de equipo, por mantenernos unidos y con la ilusión de llegar cada año más lejos.

Un gran reconocimiento, además, para mis profesores por entregarme el conocimiento, y aún mayor para mis estudiantes por permitirme compartir lo aprendido con ellos.

Finalmente, para quienes partieron de este mundo con la esperanza de verme aquí, donde sea que estén, muchas gracias.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUCCIÓN	10
1.1 Enfermedades Cardiovasculares	10
1.2 Corazón.....	10
1.3 Fibroblasto Cardíaco.....	10
1.4 Lipopolisacárido	12
1.4.1 Receptor TLR-4	12
1.4.2 Vía de señalización dependientes de NF- κ B.....	14
1.4.3 Vía de señalización de las MAPKs.....	14
1.5 Senescencia celular	16
1.6 Marcadores de Senescencia	17
1.7 LPS y Senescencia	18
.....	18
1.8 Fibroblastos Cardíacos Senescentes.....	19
2 HIPÓTESIS	20
3 OBJETIVO GENERAL.....	20
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
5 MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1 Reactivos	21
5.2 Modelo Animal.....	21
5.3 Aislamiento y Cultivo de Fibroblastos Cardíacos.....	21
5.4 Pasaje Celular	22

5.5	Western Blot.....	22
5.6	Ensayo β -galactosidasa.....	23
5.7	Inmunofluorescencia.....	24
5.8	Análisis Estadístico.....	25
6	RESULTADOS.....	26
6.1	LPS activa p38 en fibroblastos cardiacos.....	26
6.2	LPS activa NF-kB en fibroblastos cardiacos de rata	27
6.3	Inhibición de la vía p38 activada por LPS	29
6.4	Inhibición de la traslocación de NF-kB activada por LPS.....	30
6.5	Inducción de Senescencia por LPS	32
6.6	Participación de p38 en la Senescencia inducida por LPS.....	32
6.7	Participación de NF-kB en la Senescencia inducida por LPS	33
7	DISCUSIÓN.....	34
7.1	Inducción de Senescencia	34
7.2	Participación de la vía p38 en la senescencia de fibroblastos cardiacos inducida por LPS	34
7.3	Inducción de Senescencia vía NF-kB	35
7.4	Inducción de senescencia vía p38 y/o NF-kB	37
8	CONCLUSIONES	38
9	LIMITACIONES y PROYECCIONES	39
10	FINANCIAMIENTO.....	40
11	BIBLIOGRAFÍA.....	41

Índice de Figuras

Figura 1. Funciones de los fibroblastos cardíacos en el remodelado del tejido.....	11
Figura 2. Receptor TLR-4 y sus vías de señalización.	13
Figura 3. Vías de señalización de las MAPK.	15
Figura 4. Marcadores de senescencia celular.	17
Figura 5. Inducción de senescencia por activación de TLR4.....	18
Figura 6. Activación de la vía transduccional p38 por LPS.....	26
Figura 7. Efecto de LPS sobre los niveles de p-NF-κB en FC de rata adulta a tiempos cortos.	27
Figura 8. Efecto de LPS sobre la traslocación nuclear de p65-NF-κB en FC de rata adulta.	28
Figura 9. Efecto de LPS sobre niveles de p-p38 en FC de rata adulta tratados con SB203580.	29
Figura 10. Efecto de LPS sobre la traslocación nuclear de NF-κB en FC de rata adulta tratados con JSH-23.....	31
Figura 11. Efecto del LPS sobre la actividad SA-β-gal en FC de rata adulta tratados con SB203580.	32
Figura 12. Efecto del LPS sobre la actividad SA-β-gal en FC de rata adulta tratados con JSH-23.	33

ABREVIATURAS

ECV	Enfermedades cardiovasculares
FC	Fibroblasto Cardíaco
MEC	Matriz Extracelular
MFC	Miofibroblasto cardiaco
LPS	Lipopolisacárido
NF- κ B	Nuclear factor kappa B.
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daños endógenos
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos exógenos
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
IL	Interleuquina
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
MMP	Metaloproteinasas de Matriz
CS	Células Senescentes
pRb	Proteína del retinoblastoma
SA- β -gal	Actividad beta galactosidasa asociada a senescencia
SASP	Fenotipo secretor asociado a senescencia
ROS	Especies reactivas de oxígeno
α -SMA	Alpha Smooth Muscle Actin
FBS	Suero fetal bovino
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Essential Medium
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
WB	Western Blot
TBS	Tris-buffered saline
PBS	Phosphate-buffered saline
IF	Inmunofluorescencia
PFA	<i>para</i> - formaldehído
BSA	Bovine Serum Albumin
ROI	Región óptica de interés
ICQ	Inmunocitoquímica

RESUMEN

Encontrar nuevos tratamientos para las enfermedades cardiovasculares se ha convertido en prioridad debido a los elevados porcentaje de padecimiento a nivel mundial. El fibroblasto cardíaco es uno de los principales componentes celulares del corazón, el cual ha demostrado tener un rol central en la respuesta inflamatoria cardíaca ante estímulos nocivos, actuando como célula centinela y secretando una serie de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias. En el último tiempo se ha propuesto a la senescencia celular como un factor importante en la progresión de enfermedades cardíacas. La senescencia celular se define como una detención irreversible 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, así como promover la senescencia actuando sobre células vecinas.

El lipopolisacárido (LPS) es un conocido agonista del Toll-Like Receptor 4 (TLR4), receptor expresado en algunos tipos celulares como los FC. Esta interacción ligando-receptor activa las vías de NF- κ B, MAPKs y otras vías de señalización intracelular, las cuales promueven respuestas de inflamación temprana, induciendo la expresión de citoquinas y otros mediadores proinflamatorios. La inducción de senescencia en FC a través de la activación de TLR4 ha sido poco estudiada, sin embargo, se ha observado que los agonistas específicos de TLR-4 como LPS y Palmitato están asociados a senescencia. Aun así, en estos trabajos no se ha estudiado la participación de las vías transduccionales de NF- κ B y p38 (MAPK). Por lo tanto, en este trabajo se propuso estudiar la relación existente entre el desarrollo de senescencia en FC y las vías mencionadas anteriormente, utilizando LPS como agonista de TLR-4 para su activación e inhibidores de NF- κ B y p38 para comprobar dicha participación.

Para responder a estas interrogantes, se utilizaron FC de ratas adultas, las cuales fueron incubadas en presencia de FBS 1%, por tiempos variables según condición experimental. Los FC fueron estimulados con LPS y la activación de las vías p38 y NF- κ B se midió por Western Blot e inmunofluorescencia. La senescencia se midió a través de la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia al tiempo de 72 horas.

Los resultados sugieren que LPS activa tempranamente a las vías de señalización p-38 (aumento en la fosforilación) y NF- κ B (aumento de traslocación nuclear). Además, éstos indican que LPS induce senescencia de FC tras 72 horas de estímulo (aumento de la actividad SA-b-gal). Finalmente, LPS es capaz de inducir senescencia celular en FC a través de las vías transduccionales de NF- κ B y p38 MAPK. En este sentido se observó que el pretratamiento con JSH-23 y SB203580, disminuyó el efecto pro-senescente de LPS mediante las vías de NF- κ B y p38 MAPK, respectivamente.

En conclusión, LPS induce senescencia en FC a través de las vías transduccionales de NF- κ B y p38 MAPK.

ABSTRACT

Finding new treatments for cardiovascular diseases has become a priority due to the high percentage of cardiovascular disease worldwide. The cardiac fibroblast is one of the main cellular components of the heart, which has been shown to play a central role in the cardiac inflammatory response to harmful stimuli, acting as a sentinel cell and secreting a series of pro-inflammatory chemokines and cytokines. Cellular senescence has recently been proposed as an important factor in the progression of heart disease. Cellular senescence is defined as an irreversible arrest of the cell cycle and is characterized by the presence of a senescence-associated secretory phenotype (SASP) that is composed mostly of pro-inflammatory factors and is capable of maintaining inflammation as well as promoting senescence by acting on neighboring cells.

Lipopolysaccharide (LPS) is a well-known agonist of Toll-Like Receptor 4 (TLR4), a receptor expressed in some cell types such as CFs. This ligand-receptor interaction activates NF- κ B pathways, MAPKs, and other intracellular signaling pathways, which promote early inflammatory responses, inducing the expression of cytokines and other pro-inflammatory mediators. The induction of senescence in CF through TLR4 activation has been little studied, however, it has been observed that specific TLR-4 agonists such as LPS and Palmitate are associated with senescence. However, the involvement of the transductional pathways of NF- κ B and p38 (MAPK) has not been evaluated in these studies. Therefore, in this work we proposed to study the relationship between the development of senescence in CF and the pathways mentioned above, using LPS as a TLR-4 agonist for its activation and inhibitors of NF- κ B and p38 to verify this participation.

To answer these questions, CF from adult rats was used, which were incubated in the presence of 1% FBS, for varying times according to experimental conditions. CFs were stimulated with LPS and activation of the p38 and NF- κ B pathways was measured by Western blot and immunofluorescence. Senescence was measured through senescence-associated galactosidase activity at 72 hours.

The results suggest that LPS activates the p-38 (increased phosphorylation) and NF- κ B (increased nuclear translocation) signaling pathways early. In addition, they indicate that LPS induces HR senescence after 72 hours of stimulation (increased SA-b-gal activity). Finally, LPS is capable of inducing cellular senescence in CF through the transductional pathways of NF- κ B and p38 MAPK. In this sense, it was observed that pretreatment with JSH-23 and SB203580 decreased the pro-senescent effect of LPS through the NF- κ B and p38 MAPK pathways, respectively.

In conclusion, LPS induces senescence in CF through the transductional pathways of NF- κ B and p38 MAPK.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades Cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son un grupo de trastornos asociados al corazón y los vasos sanguíneos. Son la causa principal de muerte a nivel mundial con un estimado de 17.9 millones de personas fallecidas en 2019 (32% del total). Dentro de ellas destacan la enfermedad coronaria, cerebrovascular y arterial periférica, además de cardiopatía reumática y congénita. La mayoría de estas se pueden prevenir controlando factores de riesgo como tabaquismo, dietas poco saludables, obesidad, sedentarismo y abuso de alcohol [1]. Sobre el 75% de las muertes por ECVs se dan en países de bajos o medianos ingresos. En Chile éstas corresponden al 27,1% del total de defunciones (en referencia al 2016), de las cuales aproximadamente el 70% pudieron ser prevenidas modificando factores de riesgo como hipertensión, diabetes, colesterol no-HDL y los mencionados anteriormente [2].

1.2 Corazón

El corazón es un órgano del tamaño aproximado de un puño (250-350g), propio de organismos animales con sistema circulatorio. El Corazón bombea sangre a todo el cuerpo a través de los vasos sanguíneos (arterias) mediante contracciones rítmicas y repetidas, llevando oxígeno y nutrientes a los tejidos y retirando desechos de cada uno de ellos. Este órgano posee cuatro cavidades (dos aurículas y dos ventrículos) donde el flujo es controlado por sus válvulas [3][4]. El tejido cardíaco, está compuesto varios tipos celulares y entre ellos los más importantes son los cardiomiocitos (a cargo de la contracción muscular). Los fibroblastos cardíacos (FC) (principales células secretoras de proteínas de matriz extracelular), corresponden a células mesenquimales que en cantidad son aproximadamente 1/6 del total de células del tejido cardíaco. Entre las otras células destacan las células endoteliales y células musculares lisas (componentes de los vasos), células del sistema inmune, etc.[3][4].

1.3 Fibroblasto Cardíaco

El FC es el tercer tipo celular más predominante en el tejido cardíaco y su función principal se había descrito como la mantención de la homeostasis de la matriz extracelular (MEC). Sin embargo, estos últimos años se ha documentado nuevos roles tales como responder a señales químicas y mecánicas. Además, los FC expresan una variedad de receptores a través de los cuales modulan la proliferación/muerte celular, autofagia, adhesión, migración, recambio de MEC,

expresión de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y diferenciación a miofibroblastos cardíacos (MFC). Los componentes estructurales del corazón producidos por los fibroblastos incluyen periostina, vimentina, fibronectina y colágenos tipo I, II, III, V y VI. Además, los FC son las principales células implicadas en el proceso de remodelación fibrótica después de una lesión cardíaca, inflamación o durante el envejecimiento [4], [5]. Los FC son capaces de detectar alteraciones microambientales después de una lesión del miocardio ya que liberan citoquinas, factores de crecimiento y expresan receptores afines a estímulos inflamatorios, por lo que se les considera “células centinela”[6]. La figura 1, muestra las principales características de los FC [7].

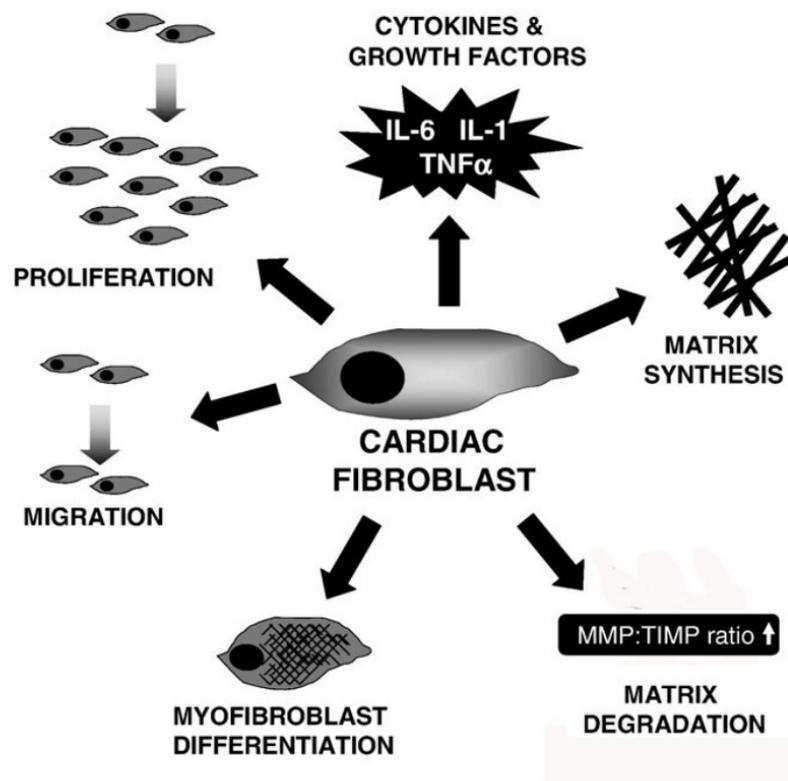


Figura 1. Funciones de los fibroblastos cardíacos en el remodelado del tejido. Los FC tienen diversas funciones celulares asociadas al remodelamiento cardíaco. Imagen de Godier-Furnémont et al. (2011). Tissue Engineering Strategies for Cardiac Regeneration [7].

1.4 Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) o endotoxina es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas y está compuesto por una región lipídica y una glicosídica. Estas moléculas desempeñan una importante función en la activación del sistema inmune al constituir el antígeno superficial más importante de este tipo de bacterias [8]. El LPS es un conocido agonista del Toll-Like Receptor 4 (TLR4), receptor expresado por las células innatas del sistema inmune y también se ha demostrado en nuestro laboratorio que los FC expresan este receptor. La interacción ligando-receptor TLR-4, activa las vías de señalización NF- κ B, ERK1/2, Akt y otras vías de señalización intracelular que promueven respuestas de inflamación temprana, induciendo la expresión de citoquinas y otros mediadores proinflamatorios [9].

1.4.1 Receptor TLR-4

Los Toll-like receptor (TLR), son una familia de receptores reconocidos por patrones (PRRs) que ejercen un papel clave en la respuesta inflamatoria y responden a o se activan mediante patrones moleculares asociados a daños endógenos (DAMPs), tales como ATP, fibronectina ED-A, ácidos nucleicos, etc.; o ligandos de patrones moleculares asociados a patógenos exógenos (PAMPs) [10], entre ellos productos microbianos como lipopolisacáridos (LPS), lipopéptidos, ADN bacteriano o flagelina [11].

Los TLR-4 son glicoproteínas integrales de la membrana y sobre la base de su considerable homología en la región citoplasmática (dominio TIR), son parte de una gran súper familia que incluye los receptores de interleuquina 1 (IL-1R) [12]. Su activación inicia vías de transducción de señales relevantes y desempeñan un papel importante en la respuesta inmune y la respuesta inflamatoria [10].

Luego del reconocimiento del ligando, TLR4 induce oligomerización y reclutamiento de adaptadores río abajo a través de la interacción con sus dominios TIR (del inglés Toll-interleukin-1 receptor). Los dominios TIR contienen 3 regiones altamente conservadas las cuales median las interacciones proteína-proteína entre los TLR y las proteínas adaptadoras. El dominio TIR del receptor es crucial para la transducción de la señal, ya que una única mutación en dominio TIR puede abolir la respuesta a LPS [13].

La estimulación de TLR4 facilita la activación de dos vías: La dependiente de MyD88 y la independiente de MyD88. La dependiente de MyD88 envuelve una fase temprana de activación de

NF- κ B, la cual conduce a la producción de citoquinas inflamatorias mientras que la vía independiente de MyD88 activa al IRF3 (del inglés "interferon regulatory factor 3"), que conduce a la producción de interferón de tipo I (IFN-I) y la expresión de genes inducibles por IFN y también involucra una fase tardía de activación de NF- κ B [14].

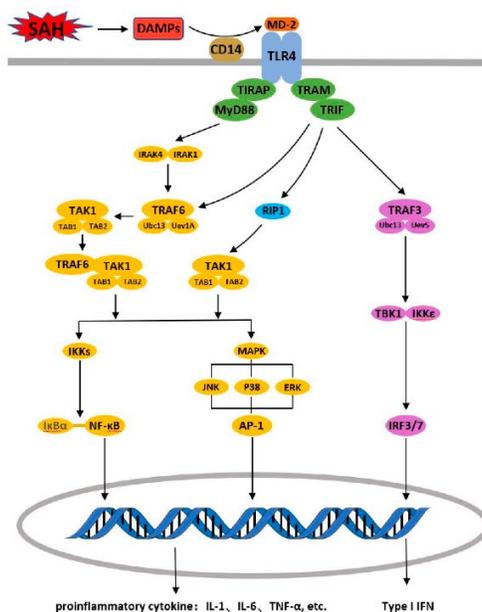


Figura 2. Receptor TLR-4 y sus vías de señalización. La activación del TLR-4 por sus respectivos ligandos conduce a la señalización de vías dependientes e independientes de MyD88, las que conducen a las respuestas inflamatorias temprana y tardía. Imagen de Wang et al. (2022). Progress in Research on TLR4-Mediated Inflammatory Response Mechanisms in Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage [15].

1.4.2 Vía de señalización dependientes de NF-kB

El NF-kB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), es un complejo proteico que controla la transcripción de genes. NF-kB se expresa en casi todas las células eucariontes, cuya principal función es la respuesta celular a estímulos de estrés, y participa fundamentalmente de la respuesta inflamatoria. En este contexto, NF-kB es activado por fosforilación, lo que permite su migración al núcleo donde lleva a cabo la expresión de genes proinflamatorios [16]. Un elemento importante en esta vía es IκBa, una proteína inhibidora de NF-kB que al unirse a éste lo mantiene en un estado inactivo secuestrado en el citoplasma, previniendo su entrada al núcleo [17]. El complejo TRAF6-TAK1-TAB1-TAB2 es el encargado de activar las IκB kinasas (IKKs), las cuales fosforilan a IκBa. Así, IκBa puede ser reconocido para su ubiquitinación y posterior degradación. De esta manera se desarma el complejo de IκBa-NF-kB, quedando NF-kB libre en su estado activo para posterior síntesis y liberación de citoquinas [18]. En varios trabajos se ha demostrado la activación de NF-KB en FC por distintos estímulos, los cuales esencialmente controla la expresión de genes proinflamatorios [9]

1.4.3 Vía de señalización de las MAPKs

La vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos, también llamada vía de las MAP cinasas o vía MAPK (de las siglas en inglés mitogen-activated protein kinases), es una ruta de transducción de señal de células eucariotas que se sitúa río abajo tras la activación de determinados receptores. Existen 4 cascadas de señalización clásicas: quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2), quinasas N-terminales C-Jun (JNK1,2y3), quinasas activadas por mitógenos p38 (p38α, β, γ y δ) y ERK5 [19].

La cascada de señalización MAPK clásica implica una serie de fosforilaciones secuenciales que comienzan con una MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK) que fosforila una MAP quinasa quinasa (MAPKK) en residuos específicos de serina/treonina, lo que a su vez conduce a una fosforilación dual de la MAPK en residuos específicos de treonina y tirosina [20]. Una vez iniciada la cascada de fosforilación se activan factores transcripcionales que regulan la transcripción de ciertos genes modificando la actividad de proteínas (incluyendo factores de transcripción) (ver figura 3).

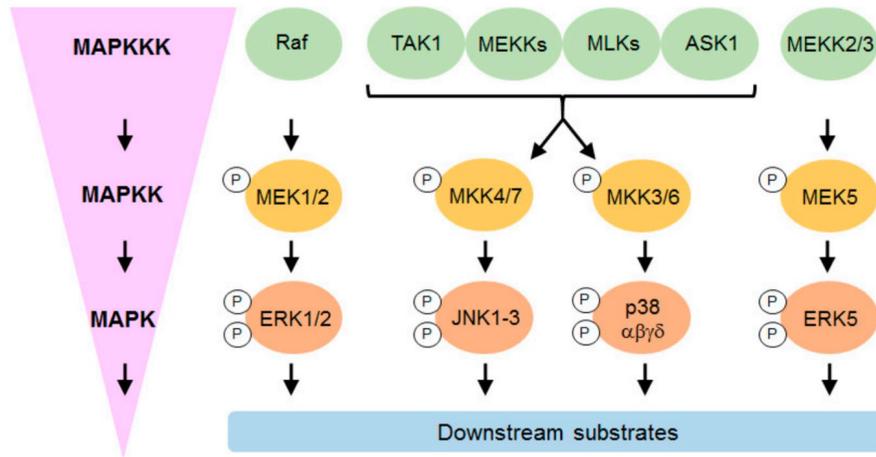


Figura 3. Vías de señalización de las MPAK. Tras la activación de distintos receptores se activan distintas vías conocidas como MAPK, las que conducen a las respuestas celulares. Imagen de Turner et al. (2019). Cardiac fibroblast p38 MAPK: A critical regulator of myocardial remodeling [19].

1.4.3.1 Vía de señalización dependiente de p38

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos p38 son una clase de proteínas quinasas activadas por mitógenos que responden a estímulos de estrés, como citoquinas, radiación ultravioleta, choque térmico y choque osmótico, y están involucradas en la diferenciación celular, la apoptosis, la autofagia y últimamente se las ha asociado a senescencia [21]. Entre los estímulos que inducen señalización de p38 en fibroblastos cardíacos se encuentra el LPS [22], citoquinas inflamatorias como IL-1y TNF α [23] y citoquinas profibróticas como TGF- β [3].

En fibroblastos, p38 α regula la expresión de ARNm y la secreción de una variedad de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF α [23]. Esta vía también modula el recambio de la MEC mediante el control de la expresión de varias MMP en fibroblastos cardíacos, como las MMP 1, 3 y 9 [24], así como el colágeno tipo I y III [25].

De manera importante, las regiones promotoras de genes que codifican para citoquinas inflamatorias tienen sitios de unión asociados a un conjunto de factores transcripcionales, incluidos NF- κ B, AP-1, C/EBP β y miembros de la familia Ets (p. ej., ELK1); los cuales pueden activarse río abajo por la vía de p38. Lo anterior implica que la activación de ambas vías transduccionales puede tener fuertes implicancias en senescencia y en la respuesta inflamatoria [19].

1.5 Senescencia celular

La senescencia celular es un proceso heterogéneo guiado por factores genéticos, epigenéticos y ambientales, que caracteriza a muchos tipos de células somáticas. Más específicamente, las células senescentes (CS) se acumulan en varios tejidos de animales envejecidos, pero no en todos. Esta acumulación se debe al incremento en la tasa de generación y/o la disminución en su tasa de eliminación. A pesar de sus desventajas, las CS previenen la propagación de células dañadas y gatillan la limpieza por parte del sistema inmune.

Hay dos tipos principales de senescencia:

- a) Senescencia Replicativa (SR): En la SR tenemos un arresto irreversible del ciclo celular en G1 después de cierto número de divisiones celulares, conocido como límite de Hayflick. Este tipo de senescencia celular está asociado a acortamiento telomérico del ADN.
- b) Senescencia prematura inducida por estrés (SPIS): La SPIS es causada por exposición repetida a dosis no tóxicas de estrés exógeno. Estos estímulos de estrés pueden ser provocados por factores dañinos al ADN, incluyendo radiación ionizante (RI) y radiación ultravioleta (RUV), transformación oncogénica, así como varios factores de estrés oxidativo (ROS) [26].

1.6 Marcadores de Senescencia

Los marcadores más característicos de senescencia celular están asociados a la sobreexpresión de proteínas supresoras como p53, que a su vez induce p21^{cip/waf}, un inhibidor de kinasas dependientes de ciclina (CDK), conduciendo al arresto del ciclo celular. Este estado permanente de arresto celular se mantiene gracias a la acción del eje p16^{ink4a}-Rb (Proteína del Retinoblastoma). Otro marcador, considerado como el “gold estándar”, es que las CS presentan también una elevada actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-gal), la cual es de los primeros marcadores que se detectan. También se exhibe heterocromatina asociada a senescencia (SAHF) así como γ-H2AX que indica daño al ADN [27].

Además, un secretoma específico de senescencia que no necesariamente está presente en todos los tipos celulares, y que corresponde al fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) que está compuesto principalmente por numerosas moléculas proinflamatorias (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF-α), factores de crecimiento (TGF-β) y metaloproteasas (MMP2, MMP9) [26].

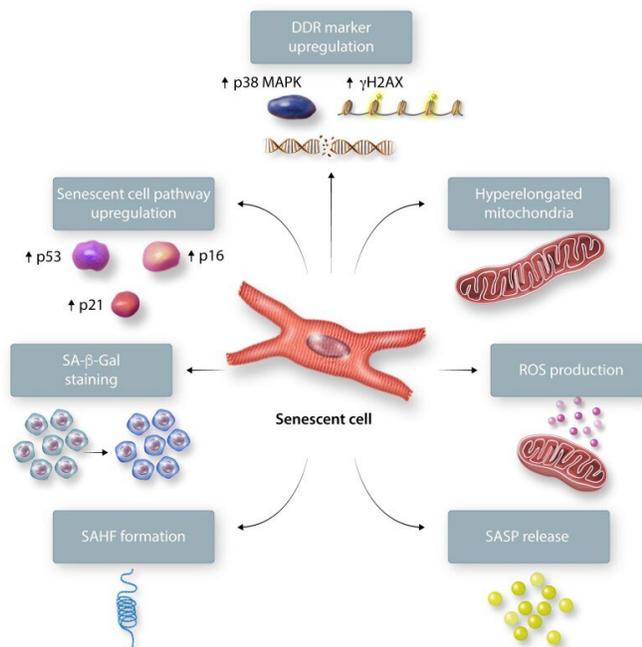


Figura 4. Marcadores de senescencia celular. Dependiendo del tipo de estímulo, las células sufren un proceso de senescencia celular caracterizado por los marcadores que se indican. Imagen de Chen et al. (2022). Senescence mechanisms and targets in the heart [27].

1.7 LPS y Senescencia

La inducción de senescencia de FC por activación de TLR4 es un tema que no ha sido estudiado en profundidad. A este respecto, se ha demostrado que LPS como agonista específico del TLR4, a través de la producción de citoquinas proinflamatorias (Vía NF- κ B, por ejemplo) y radicales libres (ROS mitocondrial), es capaz de inducir senescencia en células epiteliales de alveolos pulmonares [28], osteoclastos [29] y macrófagos en modelos de aterosclerosis [30].

En FC, los agonistas específicos de TLR-4 como Palmitato y LPS están asociados a inducción de senescencia a través de la disminución de la actividad de la AMPK que conduce a disfunción mitocondrial; y la activación del inflammasoma NLRP3 el cual produce el clivaje de la pro-IL-1beta a su forma activa IL-1 beta [31]. Trabajos de nuestro laboratorio se ha demostrado que IL-1beta induce la senescencia de los FC [32]. Estos cambios están marcados por aumento de marcadores de senescencia tales como la actividad SA- β -galactosidasa, arresto del ciclo celular y disminución de α -SMA [31]; sin embargo, en estos trabajos no se ha estudiado la participación de las vías transduccionales anteriormente indicadas en la inducción de senescencia de los FC por LPS o palmitato (ver figura 5).

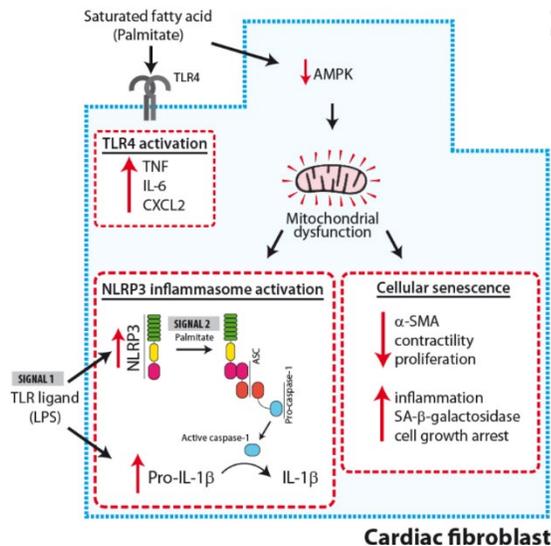


Figura 5. Inducción de senescencia por activación de TLR4. La senescencia de los FC fue inducida por palmitato, activando dos vías independientes pero paralelas. Imagen de Sokolova et al. (2017). Palmitate promotes inflammatory responses and cellular senescence in cardiac fibroblasts [31].

1.8 Fibroblastos Cardiacos Senescentes

La senescencia de los FC es un tema que ha sido abordado desde diferentes perspectivas temporales. La inducción de la senescencia temprana ha sido ligada a la prevención del aumento de lesiones fibróticas; mientras que la aparición de senescencia más tardía se ha asociado al desarrollo de la fibrosis cardiaca [33].

Los FC experimentan una forma más clásica de senescencia donde predomina la detención del ciclo celular y el desarrollo de un SASP proinflamatorio. Durante la fase aguda luego de la lesión, la aparición de senescencia dentro de los fibroblastos puede tener funciones que limitan la fibrosis excesiva y estimulan la regeneración en el área lesionada. Sin embargo, a pesar del papel de la senescencia en la limitación de la síntesis de colágeno, de todas maneras, se desarrolla un SASP proinflamatorio persistente. Estas células parecen entrar en un estado no secretor pero proinflamatorio. Si bien esto reduce la producción directa de matriz extracelular (MEC) de la célula, con el tiempo el estado inflamatorio crónico contribuye al daño tisular continuo [33].

Todos estos antecedentes en su conjunto nos llevan a plantear la siguiente hipótesis:

2 HIPÓTESIS

LPS induce senescencia en fibroblasto cardiaco a través de la activación de las vías de señalización p38 y NF-kB.

3 OBJETIVO GENERAL

Demostrar que LPS induce senescencia en fibroblastos cardiacos mediante la vía de señalización p38 y NF-kB.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Demostrar que LPS activa las vías de señalización NF-kB y p38.
2. Demostrar que LPS induce senescencia de fibroblastos cardiacos a través de las vías NF-kB y p38.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Suero fetal bovino (FBS), tripsina/EDTA, medio de cultivo DMEM/F12 y compuestos orgánicos e inorgánicos fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Germany). Estándar de peso molecular fueron adquiridos en MaestroGen (Hsinchu City, Taiwán). Reactivos para quimioluminiscencia mejorada (ECL) fueron comprados a BioRad (Hércules, California, USA). Material de plástico estéril fue obtenido en Corning Inc. (New York, NY). Bradford Reagent fue adquirido en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Colagenasa tipo II (CAS 9001-12-1) y Trypan Blue (CAS 15250-061) fueron comprados a Life Technologies Corporation (CA, EE. UU.).

Anticuerpo primario anti-fosfo-p38 rabbit (cód. #4511), anticuerpo primario anti-p38 rabbit (cód. #9212) y NF-kB rabbit (cód. #3033), b-Tubulina, anticuerpo secundario anti-rabbit (cód. #7074), anticuerpo secundario anti-mouse (cód. 7076), anticuerpo Alexa flúor mouse 488 (cód. #4408), Kit de β -galactosidasa (cód. #9860) fueron adquiridos en Cell Signaling Technology Inc. (MA, EE. UU.). Prolong Gold antifade reagent with DAPI (cód #P36935) fue adquirido en Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, EE. UU.). Inhibidor de NF-kB (JSH-23, Cayman chemicals 15036) y de p38 (SB 203580, Cayman Chemicals, código 13067).

5.2 Modelo Animal

Ratas Sprague-Dawley macho adultas de 6-8 semanas de edad, entre 250-350 gramos de peso, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, donde se mantuvieron en jaulas con ciclos de luz/oscuridad de 12horasy libre acceso a alimento y agua. Todos los estudios fueron desarrollados cumpliendo la Guía de la NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, actualizada en el 2011, y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad.

5.3 Aislamiento y Cultivo de Fibroblastos Cardiacos

Los FC fueron aislados desde corazones de ratas macho adultas Sprague-Dawley. La cirugía se hizo con investigadores con curso aprobado para el proceso. Las ratas son anestesiadas con ketamina/xilacina (el rango utilizado es de 40-90mg/kg ket. IP + 5-15mg/kg xil. IP). En el laboratorio se usa en forma regular 66mg /kg peso de Ket y 10 de Xil mg/kg peso) por vía intraperitoneal. Después de 15 minutosaproximados, se confirma ausencia de reflejos y se realiza una toracotomía para extraer el corazón utilizando tijeras quirúrgicas para seccionarlo de su unión a los grandes vasos

venosos y arteriales (en este procedimiento el animal muere y sus restos son embolsados y almacenados a -20°C hasta su eliminación). Se retiraron las aurículas, y los ventrículos fueron cortados en trozos pequeños para facilitar la digestión enzimática con colagenasa tipo II. El producto de digestión fue separado mediante centrifugación: 2 minutos a 30g, recuperando el sobrenadante y luego 10 minutos a 120g, recuperando el pellet. Este último fue resuspendido en 10 ml de DMEM/F12 suplementado con 10% de FBS y antibióticos (estreptomicina 100 µg/ml, penicilina 100 UI/ml, anfotericina B 0,25 µg/ml) y cultivados en una atmósfera con 5% de CO₂ y 37°C hasta confluencia (6-7 días).

5.4 Pasaje Celular

Los FC se mantuvieron en medio DMEM-F12/FBS 10% hasta confluencia en pasaje 0. Posteriormente, se lavaron las placas con PBS 1X y las células se soltaron con tripsina/EDTA 0,05% en PBS 1X estéril, las cuales fueron contadas en una cámara de Neubauer por el método de exclusión de Azul de Tripán. Luego, se sembraron 300.000 células/placa en placas de cultivo de 60 mm para la determinación de proteínas por Western Blot, 30.000 y 40.000 células/placa en placas de 6 pocillos de 35 mm para ensayo SA-β-gal e Inmunofluorescencia, respectivamente. Para este último caso, las células se sembraron sobre un cubreobjeto en el fondo del pocillo. Transcurridas 24 horas desde el pasaje, los fibroblastos fueron lavados con PBS 1X estéril y se reemplazó el suero 10% por: a) DMEM-F12; b) suero fetal bovino (FBS) 1% con medio DMEM-F12. Ambas condiciones se mantuvieron por 24 horas más para ensayos posteriores.

5.5 Western Blot

Las muestras para WB fueron recolectadas de las placas de cultivo de 60 mm, previamente lavadas con PBS no estéril 1X frío (3 lavados de 1 mL c/u). Se adicionaron 60 µL de buffer de lisis y se procedió a la obtención del lisado celular raspando suavemente la placa. La muestra se recolectó en tubos de Eppendorf de 1,5 mL y luego se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el pellet pasando el sobrenadante a otro Eppendorf de 1,5 mL y se procedió a realizar la cuantificación de concentración de proteínas con 1 µL 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 denaturar las proteínas.

Las proteínas fueron separadas por masa mediante electroforesis en geles de poliacrilamida preparados a partir de una solución de acrilamida/bis-acrilamida. La concentración del gel concentrador (stacking) fue 8%, mientras que la del gel separador (running) fue de 12%, para todas

las proteínas observadas. Se adicionaron volúmenes equivalentes a 20 µg de proteína por carril. La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis a 80 V por aproximadamente 2 horas hasta su separación.

Al finalizar el proceso de electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µM de poro durante 960 minutos a una corriente constante de 0,35 A en tampón de transferencia en ambiente frío. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente con BSA al 5% (p/v) para P-p38, p38 y NF-kB, y leche al 5%(p/v) para β-tubulina. Luego, se incubaron con sus anticuerpos primarios respectivos (P-p38 1:1000, P-NF-kB 1:1000, p38 1:1000) en solución de BSA 5% (p/v) durante toda la noche a 4°C.

Posterior a la incubación, las membranas se lavaron 3 veces por 10 minutos en TBS 1X/Tween-20 al 0,1% y luego incubadas durante 120 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-rabbit (1:5000) en TBS 1X/Tween-20 al 0,1%. β-tubulina fue incubada con anticuerpo primario y secundario a la vez (ambos 1:5000) por 3 horas a temperatura ambiente.

Luego de la segunda incubación, las membranas se lavaron 3 veces por 10 minutos en TBS 1X/Tween-20 al 0,1%. Para la inmunodetección, P-p38, p38 y P-NK-kB se incubaron por 3 minutos y β-tubulina 1 minuto con el reactivo quimioluminiscente ECL.

La señal luminosa fue detectada por el equipo C-DiGit (LI-COR Biosciences, Nebraska), mediante el software computacional Image Studio (LI-COR Biosciences, Nebraska).

Los niveles de proteína fueron cuantificados mediante la herramienta de cuantificación del software Image Studio y normalizados respecto al control de carga β-tubulina (NF-Kb) y p38 (P-p38), siendo los resultados expresados como veces sobre el control.

5.6 Ensayo β-galactosidasa

El kit utilizado para la detección de las células senescentes fue “Senescence Cells Histochemical Staining Kit” (Cell Signaling, USA)(cód. #9860). Mediante este kit se detectaron las células senescentes a partir de la hidrólisis del sustrato cromogénico X-gal mediante la enzima β-galactosidasa. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos con una densidad de 30.000 células por pocillo suplementadas con 10% SFB en DMEM-F12 y. Al alcanzar un 70 % de confluencia celular se realizaron los tratamientos de interés.

Transcurrido el tiempo de tratamiento, se llevó a cabo la tinción con el kit de senescencia de acuerdo con el protocolo del kit. Para ello, se retiró el medio y se lavó 3 veces con PBS 1X antes de su fijación con la solución de fijado 1X aportada por el kit (formaldehído al 20 %; glutaraldehído al 2 %; 70,4 mM Na₂HPO₄; 14,7 mM de KH₂PO₄; 1,37 M de NaCl y 26,8 mM de KCl, diluida 1:10 en H₂O Milli-Q®). Luego de 12 minutos a temperatura ambiente, se eliminaron los restos de la solución de fijado lavando nuevamente 3 veces con PBS 1X, y se añadió 1 mL de la solución de tinción por pocillo de 35 mm, compuesta por una mezcla de 10 µL de ferricianida de potasio (K₃[Fe(CN)₆] 5 mM (A); 10 µL de ferrocianida de potasio (K₄[Fe(CN)₆]•3H₂O) 5 mM (B); 50 µL de X-gal 1 mg/mL, 93 µL de “solución de tinción” y 837 µL de H₂O milli-Q. El pH de la solución se ajustó entre 5,9 y 6,1 permitiendo la visualización de la actividad β-galactosidasa únicamente de las células senescentes. Para comprobar el correcto funcionamiento del kit, uno de los pocillos se incubó a pH 4,0 (10 µL de solución A, 10 µL de solución B, 50 µL de solución X-gal y 930 µL de NaH₂PO₄) detectando la actividad de esta enzima en todas las células (senescentes y no senescentes). Las células se incubaron en oscuridad durante 18 horas a 37 °C en una estufa sin CO₂ para evitar la acidificación del medio. Transcurrido este tiempo se comprobó en el microscopio óptico a 10X la obtención de coloración azul en los pocillos. Luego, se retiró la solución de tinción y se lavó las células con PBS 1X 3 veces para eliminar los restos de solución de tinción. Para conservar la coloración se añadió 1 mL de glicerol al 70 % v/v en cada pocillo y las placas se almacenaron a una temperatura de 4°C para su posterior análisis.

Para el conteo celular, las placas fueron observadas a través del microscopio invertido Eclipse TE300 (Nikon; Tokyo, Japón) y fotografiadas a través del programa Pixit Pro en el objetivo 10X. La cuantificación del porcentaje de células con actividad β-galactosidasa positiva se realizó contando de 15 a 30 células por fotografía, obteniendo al menos 700 células por placa. Fueron consideradas positivas aquellas células en las que se observara una coloración azul intensa alrededor del núcleo y que tuvieran un gran tamaño. El resultado del ensayo se expresó como porcentaje de células positivas sobre el total de células contadas.

5.7 Inmunofluorescencia

Se retiró el medio de cultivo de las placas de 6 pocillos de 35 mm y fueron lavadas 3 veces con 1 mL de PBS 1X no estéril frío. Luego, se fijaron las células con 1 mL de PFA al 4% por 20 minutos a 4°C. Después del tiempo de incubación se volvió a lavar 3 veces con 1 mL de PBS 1X no estéril frío.

Para permeabilizar se agregó 1 mL de Tritón 0,1% por pocillo. Luego de 10 minutos se retiró el tritón y se lavó 3 veces con 1 mL de PBS 1X no estéril frío nuevamente.

El bloqueo de uniones inespecíficas se realizó con 1 mL de solución de BSA al 3% por pocillo durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se retiró el BSA 3%, se lavó 3 veces con 1 mL de PBS 1X no estéril frío y se añadió 1 mL más de esta misma solución para facilitar la manipulación del cubreobjeto al fondo del pocillo. La incubación del anticuerpo primario de NF- κ B (1:100 en BSA 3%) se realizó en cámara húmeda toda la noche. Transcurrido este tiempo, se lavó 3 veces con 1 mL de PBS 1X no estéril frío y posteriormente se realizó la incubación del anticuerpo secundario con 50 μ L Alexa Fluor 488 rabbit (1:200 en BSA 3%) por 2 horas en cámara húmeda en oscuridad. Al cumplirse el tiempo, se lavó 3 veces con 1 mL de PBS 1X no estéril frío. Finalmente, las células fueron observadas y fotografiadas en el microscopio Eclipse TE300 en su función de epifluorescencia para 488 nm con el objetivo de 20X, tomando 10 imágenes por placa. Luego, el análisis de éstas fue realizado en el programa Image J donde se cuantificó la intensidad de la señal fluorescente de la región de interés (ROI) y se normalizó por su área.

5.8 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos provienen de al menos tres experimentos independientes ($n \geq 3$) y se presentan mediante el promedio \pm SD. Los datos generados fueron analizados por ANOVA y Test de Tuckey, permitiendo determinar la significancia estadística de los resultados, considerándose significativa la diferencia entre dos grupos cuando el valor p sea menor a 0.05 ($p < 0.05$).

6 RESULTADOS

6.1 LPS activa p38 en fibroblastos cardiacos

Se evaluó la activación de p38 con LPS a tiempos cortos, midiendo la cantidad de P-p38 presente a 0, 5, 15, 30, 60 y 120 minutos a través de Western Blot. En la **Figura 6**, se presentan los niveles de P-p38 presente en los FC para cada periodo de estímulo respecto de la condición control. El mayor efecto de LPS se observa a los 60 minutos hay un mayor nivel de P-p38 siendo 2 veces respecto del control y estadísticamente significativo. Al ser este tiempo el de mayor nivel de fosforilación, se utilizó como base para el diseño experimental de los próximos resultados.

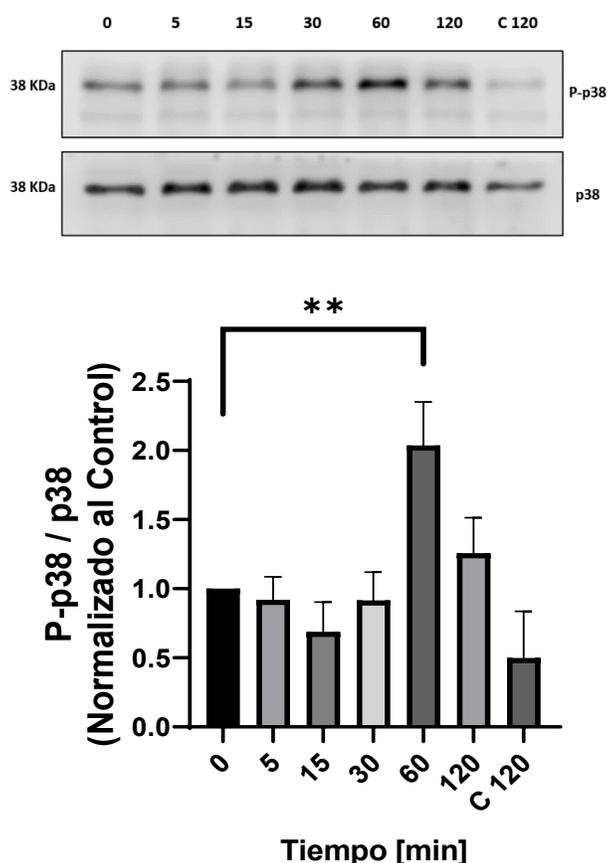


Figura 6. Activación de la vía transduccional p-p38 por LPS. Fibroblastos cardiacos de rata adulta con DMEM-F12 fueron estimulados con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 5, 15, 30, 60 y 120 minutos. Se determinó el estado de fosforilación de p38 por western blot. En el panel superior se muestra una imagen representativa, y en el panel inferior el análisis gráfico. Se utilizó como control de carga p38 Total. Expresado como veces sobre el control. ** $p < 0,01$ vs Control. N=3.

6.2 LPS activa NF-kB en fibroblastos cardiacos de rata

Se evaluó la activación de NF-KB con LPS 1[$\mu\text{g}/\text{mL}$]a tiempos cortos, midiendo la cantidad de P-p65-NF-KB presente a 0, 5, 15, 30 minutos a través de Western Blot. En la Figura 7, se presentan los niveles de P-p65-NF-KB presente en los FC para cada periodo de estímulo respecto de la condición control [34] El efecto de LPS se observa a partir de los 5 minutos teniendo un máximo a los 30 minutos, siendo 25 veces respecto del control y estadísticamente significativo. Al ser el tiempo de 30 el de mayor nivel de fosforilación, se utilizó como base para el diseño experimental de los próximos resultados.

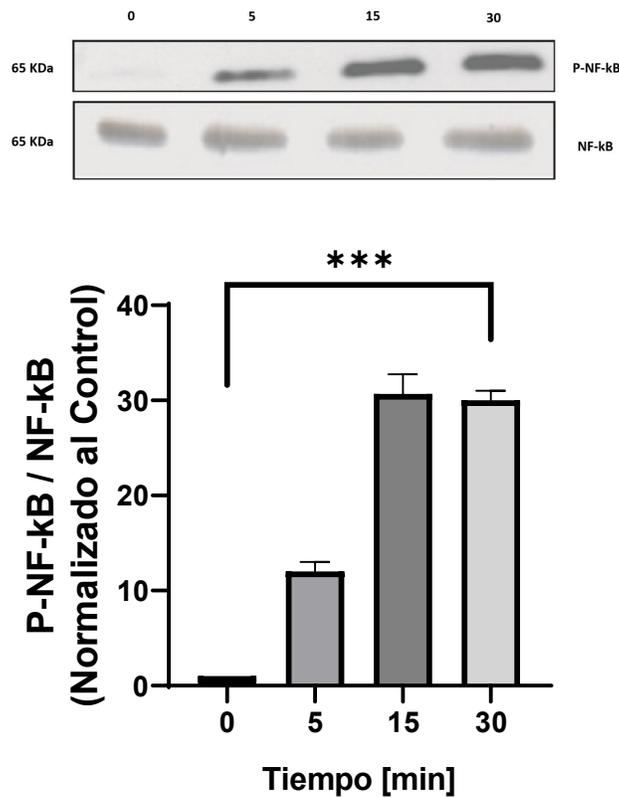


Figura 7. Efecto de LPS sobre los niveles de P-NF-kB en FC de rata adulta a tiempos cortos. Fibroblastos cardiacos de rata adulta con DMEM-F12 estimulados con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 5, 15 y 30 minutos. Se determinó el estado de fosforilación de NF-kB por western blot. En el panel superior se muestra una imagen representativa, y en el panel inferior el análisis gráfico. Se utilizó como control de carga NF-kB total. Expresado como veces sobre el control. *** $p < 0,001$ vs Control. N=3.

En la **Figura 8 A-B** se compara la presencia de p65-NF- κ B en núcleo vs citosol para FC tratados con/sin LPS por 60 minutos por inmunofluorescencia. En la condición control (**Figura 8-A**), se observa mayor intensidad de fluorescencia verde en el citosol. El análisis ROI (región óptica de interés), indica que p65-NF- κ B se encuentra localizado preferentemente en el citosol. Sin embargo, al estimular con LPS (**Figura 8-B**), se observa mayor intensidad de fluorescencia verde en el núcleo. El análisis gráfico de la ROI nos indica que la localización de p65-NF- κ B es el doble en el núcleo con respecto al citosol. Esto nos sugiere que p65-NF- κ B migra al núcleo por activación de LPS.

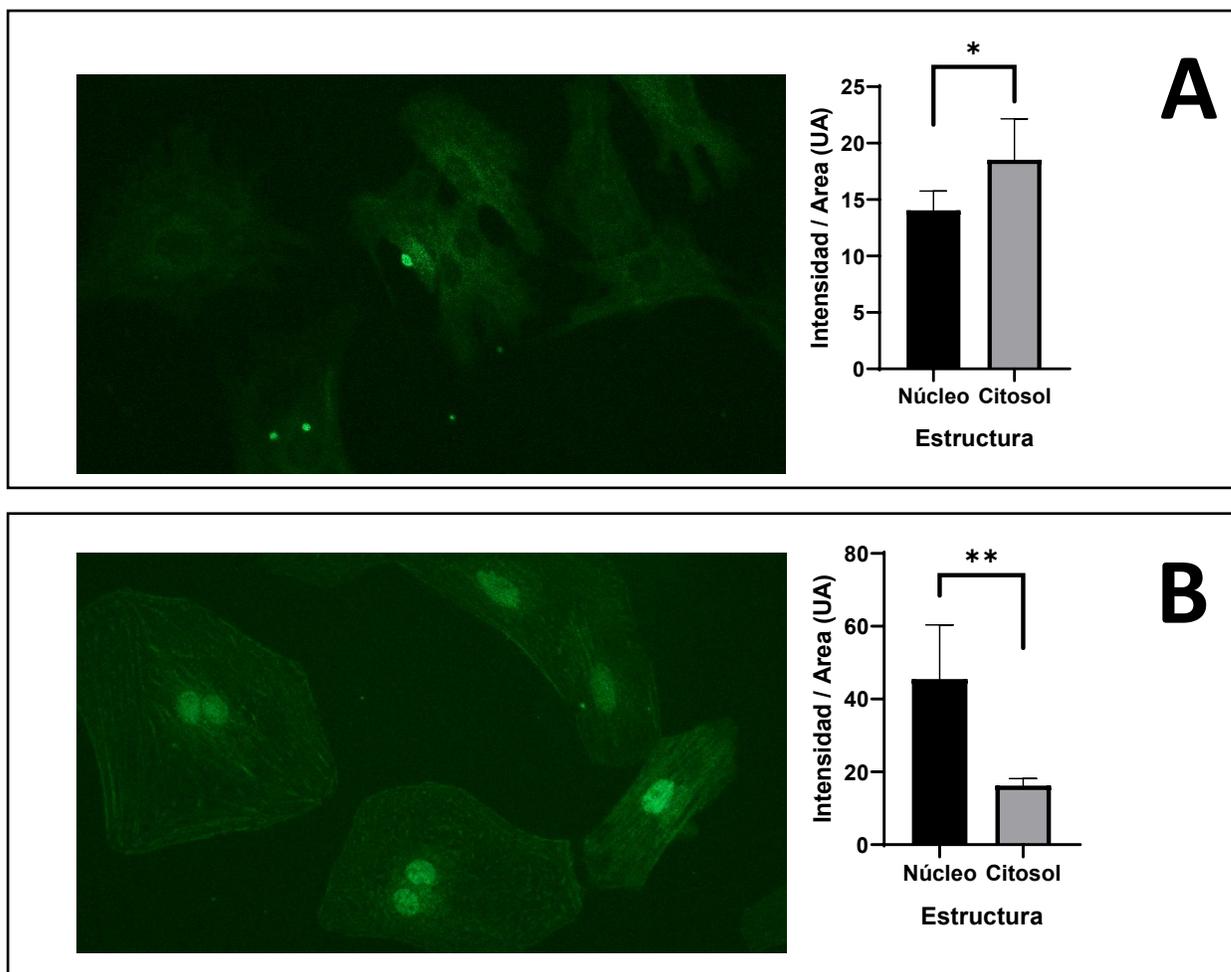


Figura 8. Efecto de LPS sobre la traslocación nuclear de p65-NF- κ B en FC de rata adulta. Fibroblastos de rata adulta DMEM-F12 estimulados con LPS 1 μ g/mL por 60 minutos. Se determinó la traslocación nuclear de p65-NF- κ B por ICQ (verde). (A) Imagen representativa de la localización de p65-NF- κ B sin LPS (izquierda) y su análisis gráfico (derecha). * $p < 0,01$ vs núcleo (citosol). N=3. (B) Imagen representativa de la localización de p65-NF- κ B con LPS (izquierda) y su análisis gráfico (derecha). ** $p < 0,001$ vs núcleo (citosol). N=3. Los gráficos se obtuvieron mediante el análisis de la intensidad lumínica de la región óptica de interés (ROI) de núcleo vs citosol. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de IF óptica con un aumento de 40x.

6.3 Inhibición de la vía p38 activada por LPS

Con el fin de evaluar si la activación de p38 está implicada en la señalización de LPS, se estimularon FC con LPS por 60 minutos en presencia/ausencia de SB203580 (*inhibidor específico de p38*).

En la **Figura 9** se muestran los niveles de P-p38 por Western Blot; en ella se observa que LPS aumenta al doble los niveles de P-p38, mientras que el inhibidor por sí mismo no mostró efecto. En presencia del inhibidor, los efectos de LPS sobre los niveles de P-p38 fueron similares a los del control.

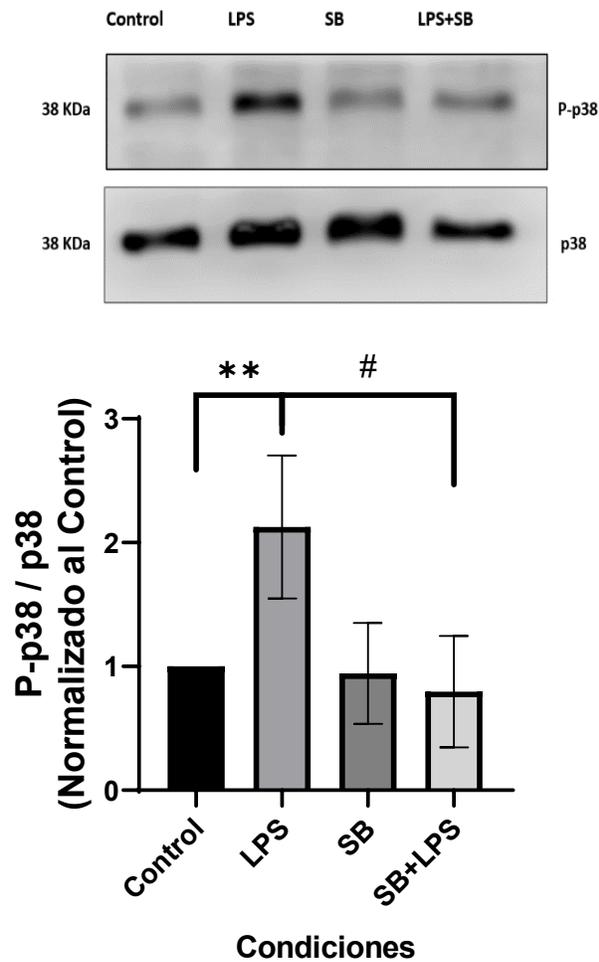


Figura 9. Efecto de LPS sobre niveles de P-p38 en FC de rata adulta tratados con SB203580. Fibroblastos cardiacos de rata adulta con DMEM-F12 estimulados con LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 60 minutos tratados 30 minutos antes con SB203580 10 μM . Se determinó el estado de fosforilación de p38 por western blot. En el panel superior se muestra una imagen representativa, y en el panel inferior el análisis gráfico. Se utilizó como control de carga p38 Total. Expresado como veces sobre el control. ** $p < 0,01$ vs Control; # $p < 0,05$ vs LPS. N=3.

6.4 Inhibición de la traslocación de NF-κB activada por LPS

Se evaluó la traslocación al núcleo de NF-κB activada por LPS a 60 minutos en presencia/ausencia de JSH-23 (*inhibidor específico de la traslocación de p65NF-κB*). Para ello se midieron los niveles de fluorescencia presente en el núcleo con respecto al citosol a través de inmunofluorescencia.

En la **Figura 10**, se observa que el control presenta mayor fluorescencia en el citosol que en el núcleo, mientras que con LPS la fluorescencia es bastante mayor en el núcleo que en el citosol. Por otro lado, para LPS en presencia de JSH-23 y JSH-23 por sí solo, la intensidad es mayor en el citosol que en el núcleo.

En el gráfico de intensidad/área en el núcleo se observa que el control presenta 20 [UA], mientras que con LPS el valor asciende a más de 40 [UA], siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado, para LPS en presencia de JSH-23 y JSH-23 por sí solo, el valor es muy cercano a 20 [UA], siendo similar al control.

En el gráfico de intensidad/área en el citosol se observa que el control presenta sobre 20 [UA], mientras que con LPS el valor está por debajo de 20 [UA], siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado, para LPS en presencia de JSH-23 y JSH-23 por sí solo, el valor es muy cercano a 30 [UA], siendo mayor que el control y LPS (ver figura 10).

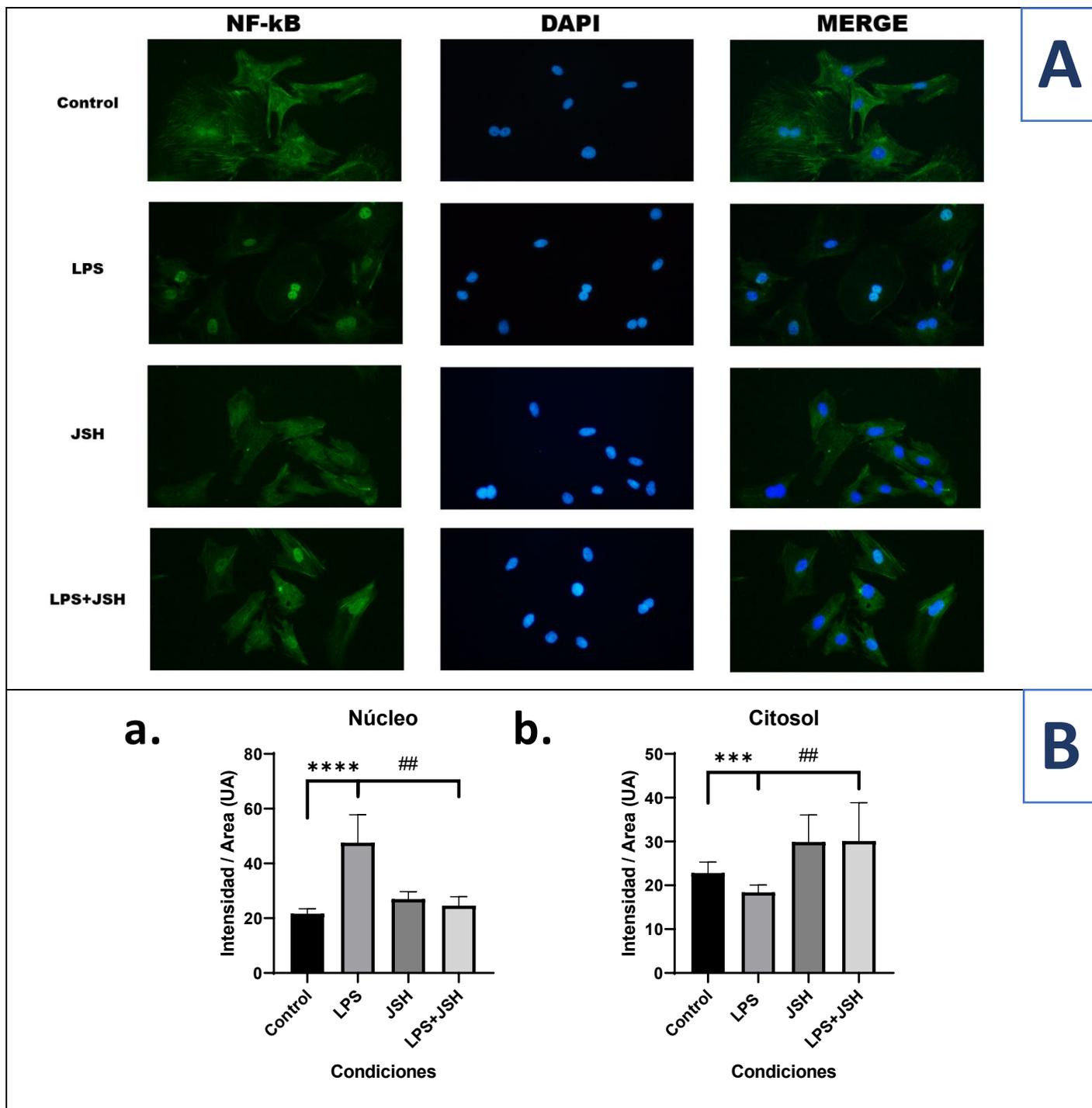


Figura 10. Efecto de LPS sobre la traslocación nuclear de NF-kB en FC de rata adulta tratados con JSH-23. Fibroblastos de rata adulta en DMEM-F12 estimulados con LPS 1 µg/mL por 60 minutos tratados 30 minutos antes con JSH-23 10 µM. (A) Comparación de imágenes representativas de la traslocación nuclear de NF-kB bajo condiciones Control, LPS, JSH y LPS+JSH a 478 [nm] (Alexa Flúor 488), 385 [nm] (DAPI) y Merge. (B) Análisis gráfico de núcleo (a) para cada condición. Los gráficos se obtuvieron mediante el análisis de la intensidad lumínica de la región óptica de interés (ROI). Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de IF óptica con un aumento de 40x. ***p<0,001 y ****p<0,0001 vs control; ##p<0,01 vs LPS. N=3. N=3.

6.5 Inducción de Senescencia por LPS

Trabajos del laboratorio han demostrado que Ang II, TGF- β , LPS inducen senescencia de FC desde las 72 [horas]. Por tanto, en base a este tiempo de estímulo y con el fin de evaluar si p38 y p65-NF- κ B participan de la senescencia inducida por LPS, se midió la actividad SA- β -gal positiva inducida por LPS en presencia de SB-203580 Y JSH-23, respectivamente.

6.6 Participación de p38 en la Senescencia inducida por LPS

Se evaluó la inducción de senescencia vía p38 en FCs estimulados con LPS por 72 [horas] en presencia/ausencia de SB203580, midiendo el porcentaje de células con actividad SA- β -gal positiva (células de coloración azul) observado al microscopio óptico. En la **figura 11**, se observa que el control tiene un 5% de células positivas para la actividad SA-b-gal; mientras que con LPS el porcentaje aumentó a un 13%, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado, para LPS en presencia de SB, el número de células positivas es ligeramente superior al control, pero significativamente inferior a la inducida solo por LPS. Finalmente, SB203580por sí mismo no fue capaz de aumentar el porcentaje de células positivas, siendo similar al control.

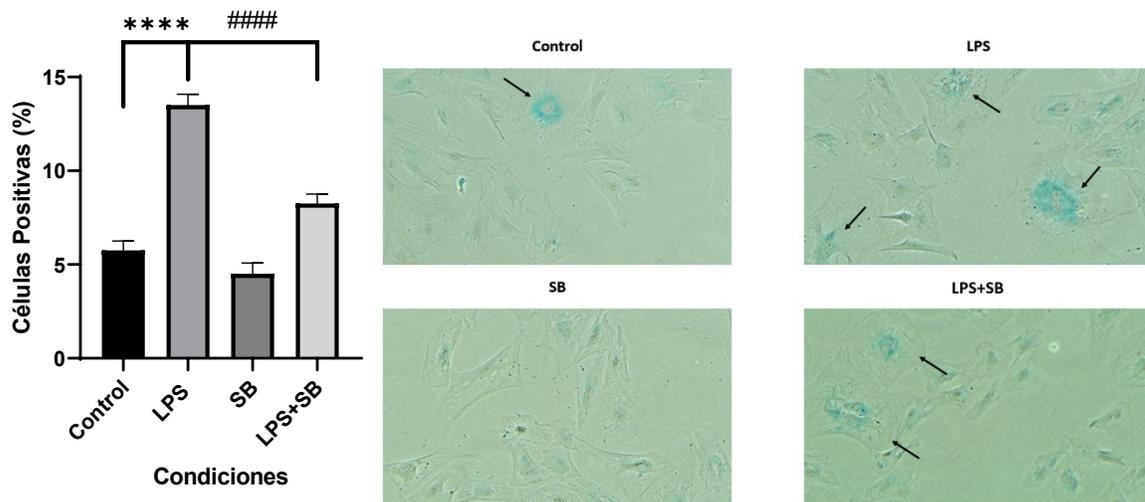


Figura 11. Efecto del LPS sobre la actividad SA- β -gal en FC de rata adulta tratados con SB203580. Fibroblastos cardiacos de rata adulta cultivados en presencia de FBS 1%, fueron estimulados con LPS 1 μ g/mL por 72 horas, y tratados 30 minutos antes con SB203580 1 μ M. Comparación de imágenes representativas de la actividad SA- β -gal para condiciones Control, LPS, SB y LPS+SB (derecha) y su análisis gráfico (izquierda). Las imágenes fueron observadas al microscopio óptico 10X. Las flechas negras indican células senescentes. Expresado como porcentaje de células positivas para SA- β -galactosidasa. **** p <0,0001 vs control; ##### p <0,0001 vs LPS. N=3.

6.7 Participación de NF- κ B en la Senescencia inducida por LPS

Se evaluó la inducción de senescencia vía p65-NF- κ B en FCs estimulados con LPS por 72 [horas] en presencia/ausencia de JSH-23, midiendo el porcentaje de células con actividad SA- β -gal positiva observado al microscopio óptico. En la **Figura 12**, se observa que el control tiene un 6% de células positivas, mientras que con LPS el porcentaje aumentó a un 13%, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado, para LPS en presencia de JSH-23, el porcentaje de células positivas fue ligeramente superior al control, pero significativamente inferior a la inducida solo por LPS. Finalmente, JSH-23 por sí mismo no fue capaz de aumentar el porcentaje de células positivas, siendo similar al control.

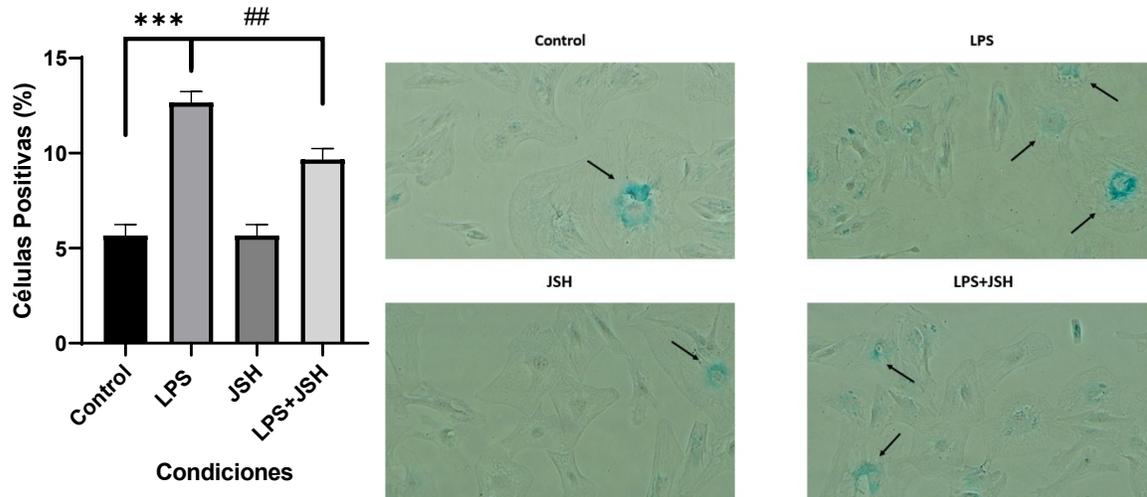


Figura 12. Efecto del LPS sobre la actividad SA- β -gal en FC de rata adulta tratados con JSH-23. Fibroblastos cardiacos de rata adulta cultivados en FBS 1%, fueron estimulados con LPS 1 μ g/mL por 72 horas y tratados 30 minutos antes con JSH-23 1 μ M. Comparación de imágenes representativas de la actividad SA- β -gal para condiciones Control, LPS, JSH y LPS+JSH (derecha) y su análisis gráfico (izquierda). Las imágenes fueron observadas al microscopio óptico 10X. Las flechas negras indican células senescentes. Expresado como porcentaje de células positivas para SA- β -galactosidasa. *** p <0,0001 vs control; ## p <0,001 vs LPS, N=3.

7 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos durante esta investigación sugieren que LPS 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] activa las vías de señalización de p38 y NF- κB a los 60 minutos. Paralelamente, esta activación está asociada a la inducción de senescencia de FC de rata adulta observada a las 72 horas de estímulo mediante actividad SA- β -gal.

7.1 Inducción de Senescencia

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que LPS 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] induce senescencia de FC en su máximo porcentaje a las 72 [horas]. Se ha reportado que el tiempo necesario para observar senescencia comienza a las 24 horas y es mayor a las 72 horas, como se ha observado en células endoteliales tratadas con LPS [35], macrófagos con LPS [36] y células del epitelio pigmentario de la retina humana (RPE) tratadas con H_2O_2 [37]. Además, en células similares al epitelio humano tipo II (A549) con LPS 15 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] se observó que la cantidad de células SA-b-gal positivas aumenta 5 veces a las 72 horas y 10 veces a las 168 horas [38]. Estos valores se condicen con los datos obtenidos con anterioridad en el laboratorio a las 72 horas. Debido a la marcada presencia de células senescentes a tiempo largo es que se decidió medir la actividad SA-b-gal para cada vía de señalización, p38 y NF- κB , simulando una condición crónica o senescencia tardía.

7.2 Participación de la vía p38 en la senescencia de fibroblastos cardiacos inducida por LPS

En esta investigación se observó mediante WB que el tiempo de mayor actividad de P-p38 es a los 60 minutos. Se ha reportado que en FC de ratón estimulados con LPS 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] se observan elevados niveles de P-p38 a las 2 horas [22], siendo bastante cercano al tiempo medido en este trabajo. Además, en líneas de melanocitos de ratón con fracción lipídica placentaria total (PTLF) [39], corazón de rata y ratón con isquemia [40] y tejido duodenal de conejos in vivo con LPS [41], se observó que tiempos de a los 60 y 120 minutos el nivel de P-p38 es de los más elevados. Esta información se condice con los resultados obtenidos en esta tesis. Es importante señalar la activación de p38 y el tiempo de máxima activación, ya que esta vía transduccional es una de las principales proteínas involucradas en la expresión de citoquinas y quimioquinas; así como también en las MMPs, αSMA que se han observado en valores elevados en la remodelación cardiaca en fibroblastos [19].

Además, se observó mediante WB que LPS 1[$\mu\text{g}/\text{mL}$] a 60 minutos aumenta al doble los niveles de P-p38 en comparación con el control, SB y LPS+SB, los cuales tienen valores similares. Se ha reportado que los inhibidores de la familia p38 MAPK (SB203580) son capaces de reducir los niveles de diversas sustancias asociadas a vías de señalización de p38, como IL-6, MMP-3 y MMP-13 en fibroblastos sinoviales reumatoides [42], COX-2 en monocitos humanos [43] y citoquinas inflamatorias (TNF, IL-6, IL-8, IL-1 e IL-1a) en sangre humana [44]. Estos resultados se condicen con los obtenidos experimentalmente en este trabajo. Cada uno de estos marcadores químicos están presentes en la composición del SASP liberado por células senescentes [33], por lo que niveles elevados de estas sustancias sugieren la presencia de este tipo de células.

Finalmente, se observó que LPS 1[$\mu\text{g}/\text{mL}$] a 72 [horas] aumenta la cantidad de células SA-b-gal positivas 3 veces en comparación al control y 1.5 veces en presencia de LPS+SB. Se ha reportado que LPS 0.1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] a 48 horas aumentó la cantidad de células SA-b-gal positivas al doble del control en células amnióticas epiteliales, donde, además se midió el tamaño celular por citometría de flujo, confirmando que se trataba de células senescentes [38]. Además, en cardiomiocitos estimulados con doxorrubicina se midieron los niveles de p-p38, p21 y p16, así como el SASP, en presencia y ausencia de SB, donde se observó los niveles de P-p38, p16 y p21 fueron mayores en ausencia del inhibidor [45]. Esto se condice con lo obtenido experimentalmente, puesto que los niveles observados de estas proteínas (p16, p21 e incluso p53), son características de las células senescentes y su condición de arresto celular, como se describe para la senescencia en células de pulmón [46]. Además, otro marcador importante es la actividad SA-b-gal elevada que se presentan las células con vías de p38 activadas y los bajos niveles en fibroblastos tratados con el inhibidor de esta vía, dando cuenta que p38 está relacionada con la aparición de senescencia en FC [33]. Por lo tanto, podemos sugerir que la vía de activación de p38 MAPK y cascada río abajo se relacionan con un estado senescente tardío, referido como tardío al tiempo de 72 h.

7.3 Inducción de Senescencia vía NF-kB

Resultados anteriores de nuestro laboratorio señalan que LPS 1[$\mu\text{g}/\text{mL}$] produce una elevada actividad (fosforilación) de p65-NF-kB a partir de los 15 minutos y sosteniéndose a los 30 min; así como también, se determinó la fosforilación de proteínas asociadas a la vía de NF-kB; p-Akt y p-ERK 1/2, las cuales tienen su mayor actividad a los 60 minutos [34].

En esta investigación se observó mediante IF que LPS 1[$\mu\text{g}/\text{mL}$] produce fosforilación y posterior migración al núcleo de p65-NF-kB a los 60 minutos. Se ha reportado en macrófagos que el

mayor tiempo de actividad migratoria de p65-NF-kB se encuentra entre 60 y 120 minutos de exposición a LPS [47], [48], [49]. Esto es consistente con el valor de tiempo observado en los resultados de la presente tesis. El aumento de este factor transcripcional es de gran relevancia porque se asocia al aumento de marcadores de senescencia como aumento de p16, p21 y actividad SA-b-gal, como se observa en células epiteliales de alveolo en fibrosis pulmonar [50]. Por otro lado, en resultados previos del laboratorio con FC, se reportó la existencia de un fenotipo secretor proinflamatorio, por lo que sería de gran importancia lograr diferenciar un fenotipo secretor proinflamatorio de uno asociado a senescencia (SASP). En este sentido, podemos mencionar trabajos recientes del laboratorio, donde se evaluó la influencia del tiempo en la cantidad de citoquinas secretadas por los FC, reportando un aumento de 10 veces en la concentración al comparar los días 3 y 10. Se debe mencionar que, en el procedimiento, hay una renovación en el medio de cultivo luego del tercer día que mantuvo hasta el décimo.

Además, se observó mediante IF que LPS 1[$\mu\text{g}/\text{mL}$] a 60 minutos aumenta al doble los niveles de fluorescencia en el núcleo asociados a la fosforilación de p65-NF-kB, en comparación con el control, JSH y LPS+JSH, los cuales tienen valores similares. Esto nos indica que p65-NF-kB migra al núcleo en presencia de LPS, pero se mantiene en el citosol en su ausencia y en presencia de JSH-23. Utilizando la técnica de IF, se ha reportado que el inhibidor de p65-NF-kB (JSH-23) es capaz de reducir la migración del factor transcripcional hacia el núcleo en otros tipos celulares, como en macrófagos de la médula ósea y células MC3T3-E1 estimuladas con RANKL y H_2O_2 [51]. Esto concuerda con lo observado experimentalmente en este trabajo. La relevancia de su migración al núcleo radica en que es uno de los eslabones finales y más críticos de la transcripción de interleuquinas y citoquinas encontradas en el SASP (por ejemplo, IL-1 α/β , IL-6, IL-8, MCP-2 y MIP-1 α , factores de crecimiento, diversas MPPs y óxido nítrico), por lo que su aumento favorece su aparición [52].

Finalmente, se observó que LPS 1[$\mu\text{g}/\text{mL}$] a 72 [horas] aumenta la cantidad de células SA-b-gal positivas 3 veces en comparación al control y 1.5 veces en presencia de LPS+JSH. Se ha reportado que en células epiteliales tratadas con LPS 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] por 24 horas se produjo un aumento de ROS que condujo a senescencia marcada por baja actividad de telomerasa [53]. Además, en cardiomiocitos tratados con Doxorubicina 0,1 [μM] por 48 horas se observó aumento de los niveles de p65-NF-kB fosforilado y senescencia determinada por aumento de p21 y p16, así como aparición del SASP [45]. Esto se condice con lo obtenido durante este trabajo. El aumento de p65-NF-kB a tiempo largo se relaciona con mayores niveles de marcadores de senescencia como actividad SA-b-

gal, p16, p21, TNF-a y MCP-1, como lo descrito a 48 horas en fibroblastos de pulmón humano tratados en presencia y ausencia de inhibidor de NF-KB [54]. Por lo tanto, podemos sugerir que la vía de activación de NF-kB y sus productos de transcripción se relacionan con un estado senescente tardío, referido como tardío el tiempo de 72 h.

7.4 Inducción de senescencia vía p38 y/o NF-kB

Todos estos datos en su conjunto sugieren que al activar el receptor TLR-4 [10] con ligandos afines (por ej. LPS [9] o Palmitato [31]), las vías de señalización p38 y p65-NF-kB, ya sea de forma dependiente [55] o independiente [56], son capaces de conducir al FC a un estado senescente [35] caracterizado por marcadores como aumento de p16, p21 y p53, SASP [45] y actividad SA- b-gal [38].

8 CONCLUSIONES

LPS activa las vías de p38 y NF- κ B en fibroblastos cardiacos de rata adulta.

LPS es capaz de inducir senescencia en fibroblastos cardiacos de rata adulta a través de vías de señalización de p38 y NF- κ B.

9 LIMITACIONES y PROYECCIONES

Medir la actividad SA- β -gal es solo uno de los parámetros para evidenciar que se trata de una célula senescente. Por lo tanto, desde el punto de vista proteico se podría medir los niveles de p21 y p16. Por otro lado, caracterizar la morfología y el tamaño (área) de las células nos permitiría establecer con certeza que estamos frente a una célula senescente. Otro ensayo que se pudo haber realizado para notar presencia de células senescentes por su SASP es la determinación de niveles de citoquinas mediante Milliplex.

También se presentaron dificultades con el modelo de rata adulta, que no fue demasiado eficiente debido a situaciones como la diferenciación de fibroblasto cardiaco a miofibroblasto en tiempos de cultivo largos, generando una heterogeneidad en las muestras analizadas y, por tanto, resultados variables. Además, los medios de cultivo utilizados como F-12 y FBS 1% pueden haber afectado la propia actividad de la célula entregando mayor incertidumbre, ya que se ha demostrado que la autofagia es capaz de inducir senescencia. Además, en nuestro laboratorio se ha demostrado que los FC cultivados en presencia de concentraciones de SFB menor al 5% tienen una marcada autofagia.

Para completar las diferentes condiciones del proyecto, se podría medir los niveles de p38 y NF-kB a las 72 horas, que fue el tiempo que se observó la actividad SA-b-gal; sin embargo, su activación podría no ser necesaria a tiempos tardíos. Por otro lado, no se estudió la interrelación entre p38 y p65-NFkB, puesto que se ha descrito cierto grado de control de p38 sobre p65-NF-KB.

10 FINANCIAMIENTO

El desarrollo de esta memoria de título se realizó en el Laboratorio de Farmacología Molecular del Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Este trabajo contó con el apoyo y financiamiento del proyecto FONDECYT “Senolytic And Senostatic Drugs For The Treatment Of Angiotensin II-Induced Reactive Cardiac Fibrosis” (N° 1210627).

11 BIBLIOGRAFÍA

- [1] World Health Organization, “Cardiovascular diseases (CVDs)”. Accedido: 26 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- [2] C. Troncoso-Pantoja *et al.*, “La mayoría de las enfermedades cardiovasculares se atribuyen a factores de riesgo que podrían ser modificados con cambios de los estilos de vida”, *Rev Med Chil*, vol. 148, n° 1, pp. 126–128, ene. 2020, doi: 10.4067/S0034-98872020000100126.
- [3] D. Dostal, S. Glaser, y T. A. Baudino, “Cardiac fibroblast physiology and pathology”, *Compr Physiol*, vol. 5, n° 2, pp. 887–909, abr. 2015, doi: 10.1002/cphy.c140053.
- [4] M. J. Ivey y M. D. Tallquist, “Defining the Cardiac Fibroblast: A New Hope”, *Circ J*, vol. 80, n° 11, p. 2269, oct. 2016, doi: 10.1253/CIRCJ.CJ-16-1003.
- [5] G. Díaz-Araya, R. Vivar, C. Humeres, P. Boza, S. Bolivar, y C. Muñoz, “Cardiac fibroblasts as sentinel cells in cardiac tissue: Receptors, signaling pathways and cellular functions”, *Pharmacol Res*, vol. 101, pp. 30–40, nov. 2015, doi: 10.1016/J.PHRS.2015.07.001.
- [6] W. Chen y N. G. Frangogiannis, “Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair”, *Biochim Biophys Acta*, vol. 1833, n° 4, p. 945, abr. 2013, doi: 10.1016/J.BBAMCR.2012.08.023.
- [7] A. F. G. Godier-Furnémont, Y. Duan, R. Maidhof, y G. Vunjak-Novakovic, “Tissue Engineering Strategies for Cardiac Regeneration”, en *Regenerating the Heart*, Humana Press, 2011, pp. 443–475. doi: 10.1007/978-1-61779-021-8_23.
- [8] S. Romero Hurtado y C. Arturo Iregui, “El Lipopolisacárido”, 26 de febrero de 2010. Accedido: 10 de junio de 2023. [En línea]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542010000100004
- [9] S. Bolívar *et al.*, “Lipopolysaccharide Activates Toll-Like Receptor 4 and Prevents Cardiac Fibroblast-to-Myofibroblast Differentiation”, *Cardiovasc Toxicol*, vol. 17, n° 4, pp. 458–470, oct. 2017, doi: 10.1007/s12012-017-9404-4.

- [10] M. Heidarzadeh, F. Roodbari, M. Hassanpour, M. Ahmadi, S. Saberianpour, y R. Rahbarghazi, "Toll-like receptor bioactivity in endothelial progenitor cells", *Cell and Tissue Research*, vol. 379, n° 2. Springer, pp. 223–230, 1 de febrero de 2020. doi: 10.1007/s00441-019-03119-2.
- [11] W. Wei *et al.*, "The Role of Toll-Like Receptor in Inflammation and Tumor Immunity", 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.00878.
- [12] S. Akira y K. Takeda, "Toll-like receptor signalling", *Nature Reviews Immunology*, vol. 4, n° 7. Nature Publishing Group, pp. 499–511, 2004. doi: 10.1038/nri1391.
- [13] Y. C. Lu, W. C. Yeh, y P. S. Ohashi, "LPS/TLR4 signal transduction pathway", *Cytokine*, vol. 42, n° 2. pp. 145–151, mayo de 2008. doi: 10.1016/j.cyto.2008.01.006.
- [14] L. A. J. O'Neill y A. G. Bowie, "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling", *Nature Reviews Immunology*, vol. 7, n° 5. pp. 353–364, mayo de 2007. doi: 10.1038/nri2079.
- [15] L. Wang *et al.*, "Progress in Research on TLR4-Mediated Inflammatory Response Mechanisms in Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage", *Cells*, vol. 11, n° 23. MDPI, 1 de diciembre de 2022. doi: 10.3390/cells11233781.
- [16] T. Lawrence, "The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation", *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 1, n° 6, 2009, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A001651.
- [17] N. Xu *et al.*, "Recombinant Ricin Toxin Binding Subunit B (RTB) Stimulates Production of TNF- α by Mouse Macrophages Through Activation of TLR4 Signaling Pathway", *Front Pharmacol*, vol. 11, sep. 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.526129.
- [18] N. D. Perkins, "Alphabetti kinase Spaghetti: the complex roles of IKK α and β in the canonical NF- κ B pathway", *Biochem J*, vol. 479, n° 11, pp. 1121–1126, jun. 2022, doi: 10.1042/BCJ20220023.
- [19] N. A. Turner y N. M. Blythe, "Cardiac fibroblast p38 MAPK: A critical regulator of myocardial remodeling", *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, vol. 6, n° 3. MDPI, 1 de septiembre de 2019. doi: 10.3390/jcdd6030027.

- [20] M. Krishna y H. Narang, "The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple", *Cell Mol Life Sci*, vol. 65, n° 22, pp. 3525–3544, nov. 2008, doi: 10.1007/S00018-008-8170-7.
- [21] T. Zarubin y J. Han, "Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway", *Cell Res*, vol. 15, n° 1, pp. 11–18, 2005, doi: 10.1038/SJ.CR.7290257.
- [22] J. Liao *et al.*, "Dexmedetomidine Promotes Lipopolysaccharide-Induced Differentiation of Cardiac Fibroblasts and Collagen I/III Synthesis through α 2A Adrenoreceptor-Mediated Activation of the PKC-p38-Smad2/3 Signaling Pathway in Mice", *Int J Mol Sci*, vol. 22, n° 23, dic. 2021, doi: 10.3390/IJMS222312749.
- [23] J. K. Sinfield, A. Das, D. J. O'Regan, S. G. Ball, K. E. Porter, y N. A. Turner, "p38 MAPK alpha mediates cytokine-induced IL-6 and MMP-3 expression in human cardiac fibroblasts", *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 430, n° 1, p. 419, ene. 2013, doi: 10.1016/J.BBRC.2012.11.071.
- [24] N. A. Turner y K. E. Porter, "Regulation of myocardial matrix metalloproteinase expression and activity by cardiac fibroblasts", *IUBMB Life*, vol. 64, n° 2. pp. 143–150, febrero de 2012. doi: 10.1002/iub.594.
- [25] F. See *et al.*, "p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodeling following myocardial infarction in the rat", *J Am Coll Cardiol*, vol. 44, n° 8, pp. 1679–1689, oct. 2004, doi: 10.1016/J.JACC.2004.07.038.
- [26] S. M. Lagoumtzi y N. Chondrogianni, "Senolytics and senomorphics: Natural and synthetic therapeutics in the treatment of aging and chronic diseases", *Free Radic Biol Med*, vol. 171, pp. 169–190, ago. 2021, doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2021.05.003.
- [27] M. S. Chen, R. T. Lee, y J. C. Garbern, "Senescence mechanisms and targets in the heart", *Cardiovasc Res*, vol. 118, n° 5, p. 1173, abr. 2022, doi: 10.1093/CVR/CVAB161.
- [28] C. O. Kim, A. J. Huh, S. H. Han, y J. M. Kim, "Analysis of cellular senescence induced by lipopolysaccharide in pulmonary alveolar epithelial cells", *Arch Gerontol Geriatr*, vol. 54, n° 2, pp. e35–e41, mar. 2012, doi: 10.1016/J.ARCHGER.2011.07.016.

- [29] R. Aquino-Martinez *et al.*, “LPS-Induced Premature Osteocyte Senescence: Implications in Inflammatory Alveolar Bone Loss and Periodontal Disease Pathogenesis”, *Bone*, vol. 132, p. 115220, mar. 2020, doi: 10.1016/J.BONE.2019.115220.
- [30] H. Wang *et al.*, “BRD4 contributes to LPS-induced macrophage senescence and promotes progression of atherosclerosis-associated lipid uptake”, *Aging (Albany NY)*, vol. 12, n° 10, p. 9240, may 2020, doi: 10.18632/AGING.103200.
- [31] M. Sokolova *et al.*, “Palmitate promotes inflammatory responses and cellular senescence in cardiac fibroblasts”, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, vol. 1862, n° 2, pp. 234–245, feb. 2017, doi: 10.1016/j.bbailip.2016.11.003.
- [32] J. Espitia, “Resolvina E1 previene la senescencia inducida por doxorubicina en células endoteliales y fibroblastos cardiacos”, Universidad de Chile, Santiago, 2022.
- [33] J. M. Osorio *et al.*, “Senescent cardiac fibroblasts: A key role in cardiac fibrosis”, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, vol. 1869, n° 4. Elsevier B.V., 1 de abril de 2023. doi: 10.1016/j.bbadis.2023.166642.
- [34] P. Ayala, “Participación de fibroblastos y miofibroblastos en la respuesta inflamatoria: Rol de los receptores de tipo toll 4.”, Universidad de Chile, 2013.
- [35] I. Abdelgawad, K. Agostinucci, B. Sadaf, y B. Zordoky, “Metformin Protects Against Liposaccharide (LPS)-induced Hyperinflammation in Doxorubicin-induced Senescent Endothelial Cells”, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 385, n° S3, p. 357, jun. 2023, doi: 10.1124/JPET.122.268800.
- [36] B. M. Hall *et al.*, “p16(Ink4a) and senescence-associated β -galactosidase can be induced in macrophages as part of a reversible response to physiological stimuli”, *Aging (Albany NY)*, vol. 9, n° 8, p. 1867, 2017, doi: 10.18632/AGING.101268.
- [37] N. Aryan, B. S. Betts-Obregon, G. Perry, y A. T. Tsin, “Oxidative Stress Induces Senescence in Cultured RPE Cells”, *Open Neurol J*, vol. 10, n° 1, p. 83, sep. 2016, doi: 10.2174/1874205X01610010083.
- [38] C. L. Dixon, L. Richardson, S. Sheller-Miller, G. Saade, y | Ramkumar Menon, “A distinct mechanism of senescence activation in amnion epithelial cells by infection, inflammation, and oxidative stress”, *Am J Reprod Immunol*, p. 79, 2018, doi: 10.1111/aji.12790.

- [39] B. Saha *et al.*, “Activation of the Mitf promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to CREB”, *Pigment Cell Res*, vol. 19, n° 6, pp. 595–605, dic. 2006, doi: 10.1111/J.1600-0749.2006.00348.X.
- [40] J. Li, E. J. Miller, J. Ninomiya-Tsuji, R. R. Russell, y L. H. Young, “AMP-Activated Protein Kinase Activates p38 Mitogen-Activated Protein Kinase by Increasing Recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the Ischemic Heart”, *Circ Res*, vol. 97, n° 9, pp. 872–879, oct. 2005, doi: 10.1161/01.RES.0000187458.77026.10.
- [41] S. Gonzalo, “La inhibición de la p38 MAPK mejora las alteraciones intestinales y el estrés oxidativo inducidos en un modelo de endotoxemia en conejo”, España, 2007.
- [42] Z. W. He, Y. H. Qin, Z. W. Wang, Y. Chen, Q. Shen, y S. M. Dai, “HMGB1 acts in synergy with lipopolysaccharide in activating rheumatoid synovial fibroblasts via p38 MAPK and NF- κ B signaling pathways”, *Mediators Inflamm*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/596716.
- [43] J. L. E. Dean, M. Brook, A. R. Clark, y J. Saklatvala, “p38 Mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, n° 1, pp. 264–269, ene. 1999, doi: 10.1074/jbc.274.1.264.
- [44] D. C. Underwood *et al.*, “SB 239063, a p38 MAPK inhibitor, reduces neutrophilia, inflammatory cytokines, MMP-9, and fibrosis in lung”, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 279, n° 5, pp. 23-5, 2000, doi: 10.1152/AJPLUNG.2000.279.5.L895/ASSET/IMAGES/LARGE/H51100135006.JPEG.
- [45] P. Huang *et al.*, “Redd1 knockdown prevents doxorubicin-induced cardiac senescence”, *Aging*, vol. 13, n° 10, pp. 13788–13806, may 2021, doi: 10.18632/AGING.202972.
- [46] P. J. Barnes, J. Baker, y L. E. Donnelly, “Cellular Senescence as a Mechanism and Target in Chronic Lung Diseases”, *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 200, n° 5, pp. 556–564, sep. 2019, doi: 10.1164/RCCM.201810-1975TR.
- [47] J. Sakai *et al.*, “Lipopolysaccharide-induced NF- κ B nuclear translocation is primarily dependent on MyD88, but TNF α expression requires TRIF and MyD88 OPEN”, doi: 10.1038/s41598-017-01600-y.

- [48] O. Sharif, V. N. Bolshakov, S. Raines, P. Newham, y N. D. Perkins, “Transcriptional profiling of the LPS induced NF- κ B response in macrophages”, *BMC Immunol*, vol. 8, n^o 1, pp. 1–17, ene. 2007, doi: 10.1186/1471-2172-8-1/TABLES/4.
- [49] S. Hobbs, M. Reynoso, A. V. Geddis, A. Y. Mitrophanov, y R. W. Matheny, “LPS-stimulated NF- κ B p65 dynamic response marks the initiation of TNF expression and transition to IL-10 expression in RAW 264.7 macrophages”, *Physiol Rep*, vol. 6, n^o 21, nov. 2018, doi: 10.14814/PHY2.13914.
- [50] Y. Tian *et al.*, “Loss of PTEN induces lung fibrosis via alveolar epithelial cell senescence depending on NF- κ B activation”, *Aging Cell*, vol. 18, n^o 1, feb. 2019, doi: 10.1111/ACEL.12858.
- [51] L. Mei *et al.*, “The Novel Antioxidant Compound JSH-23 Prevents Osteolysis by Scavenging ROS During Both Osteoclastogenesis and Osteoblastogenesis”, *Front Pharmacol*, vol. 12, p. 734774, sep. 2021, doi: 10.3389/FPHAR.2021.734774/BIBTEX.
- [52] A. Salminen, A. Kauppinen, y K. Kaarniranta, “Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP)”, *Cell Signal*, vol. 24, n^o 4, pp. 835–845, abr. 2012, doi: 10.1016/J.CELLSIG.2011.12.006.
- [53] V. Raj *et al.*, “Cholecalciferol and metformin protect against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction and senescence by modulating sirtuin-1 and protein arginine methyltransferase-1”, *Eur J Pharmacol*, vol. 912, p. 174531, dic. 2021, doi: 10.1016/J.EJPBAR.2021.174531.
- [54] L. Zhang *et al.*, “Novel small molecule inhibition of IKK/NF- κ B activation reduces markers of senescence and improves healthspan in mouse models of aging”, *Aging Cell*, vol. 20, n^o 12, dic. 2021, doi: 10.1111/ACEL.13486.
- [55] O. Tenhunen, J. Rysä, M. Ilves, Y. Soini, H. Ruskoaho, y H. Leskinen, “Identification of Cell Cycle Regulatory and Inflammatory Genes As Predominant Targets of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in the Heart”, 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000238387.85144.92.
- [56] P. Y. Ng, D. J. Ireland, y J. A. Keelan, “Drugs to block cytokine signaling for the prevention and treatment of inflammation induced preterm birth”, *Front Immunol*, vol. 6, n^o MAR, 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00166.