



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Resolvina D1 y navitoclax disminuyen el número de miofibroblastos cardiacos senescentes inducidos por TGF- β 1

Memoria para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico

Estudiante:

Juan Vicente Ortega Bustos

Director: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

Patrocinante: Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya

Codirector: Dr. Jaime Riquelme

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.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que me acompañaron en este largo camino y que hicieron posible llegar hasta el final. Agradezco a la Annto, mi pareja, por ser ese apoyo incondicional para poder salir adelante, que ha estado en las buenas y en las malas, siendo un motor fundamental en mi vida, estoy eternamente agradecido por formar parte de su vida. Agradezco por su apoyo, que a pesar de pasar por momentos muy difíciles en su vida siempre estuvo conmigo. Agradecer a mi mamá y papá por el gran esfuerzo que realizan y que han realizado día a día con el fin de que mis hermanos y yo logremos nuestras metas. A mi hermana Leslie y hermano Francisco, que están *ad portas* de convertirse en grandes profesionales. A mi suegra, por siempre hacerme recordar que este proceso no sería eterno. Agradezco al profesor Guillermo por haberme dado la oportunidad de haber sido parte de su gran equipo de trabajo, que con el tiempo pasó de ser el severo y temido profesor de farmoquímica y farmacología a convertirse en un amigo que nunca olvidaré (gracias por todos los cafecitos que se sacó). Al profesor Jaime por su bondad, consejos y apoyo en los momentos más difíciles de este trabajo, cuando todo parecía derrumbarse. Al igual como le agradezco a José Miguel y Claudio por su sabiduría, paciencia y sobre todo su amistad, eternamente agradecido de ustedes. Espero verlos pronto como PhD. A Héctor, que crecimos juntos en esta etapa de la vida, y que tanto tiempo nos ha costado, agradecerle su apoyo, compañía y amistad en estos años de estudio en la universidad. A Matías, que, sin él, esta experiencia en el laboratorio no hubiera sido de la misma forma. A Constanza y Víctor, agradecerles por su cuota de tranquilidad brindada en esos momentos de desesperación. A Jenaro, por sus enseñanzas y paciencia. Al equipo completo del laboratorio, siempre los recordaré, han hecho de esta etapa una de las más lindas de mi vida. Agradezco a los compañeros del laboratorio de Farmacología Experimental: Mane,

Fresia, Ignacio y Sofía por su amistad y los momentos compartidos. Agradezco a Bárbara, que a pesar de habernos visto en tan pocas ocasiones en persona siempre estuvo presente, aconsejando y escuchando, prestando una mano en los momentos más difíciles. Agradezco a Ana por ser un apoyo en esta etapa y siempre estar presente para cualquier clase de ayuda que pudiera necesitar, la persona determinante en la decisión a tomar en el trabajo final de titulación y que junto a todo el personal de farmacia del local 747 me ayudaron a terminar un importante ciclo. Finalmente agradecer a esas pequeñas almitas que ya no están conmigo físicamente, pero me acompañaran por toda una eternidad.

ÍNDICE DE CONTENIDO

FINANCIAMIENTO	2
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ABREVIATURAS	10
RESUMEN	12
ABSTRACT	14
1.- INTRODUCCIÓN	17
1.1.- Generalidades	17
1.2.- Corazón, Fibroblastos y miofibroblastos cardiacos.....	18
1.3.- Miofibroblastos cardiacos y factor de crecimiento transformante β	19
1.4.- Senescencia celular.....	22
1.4.1.- Marcadores celulares y moleculares de senescencia.....	22
1.4.2.- Actividad β -galactosidasa asociada a senescencia.....	23
1.4.3.- Fenotipo secretor asociado a senescencia.....	24
1.5.- Miofibroblasto senescente.....	24
1.6.- Senolíticos y senostáticos.....	25
17.- Resolvinas y Navitoclax como fármacos senomórficos.....	26
2.- HIPÓTESIS	30
3.- OBJETIVO GENERAL	30
4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5.- MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1.- Reactivos	31
5.2.- Modelo animal.....	31

5.2.1.- Ratas neonatas.....	31
5.2.2.- Ratas adultas	32
5.3.- Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos de rata neonata y adulta.....	32
5.4.- Pasaje Celular.....	33
5.5.- Western Blot.....	34
5.6.- Determinación SA- β -gal.....	35
5.7.- Inmunocitoquímica.....	37
5.8.- Cristal violeta.....	37
5.9.- Análisis estadístico	38
6.- RESULTADOS	39
6.1.- TGF- β induce senescencia de miofibroblastos cardíacos de rata adulta.....	39
6.2.- Efecto senescente del TGF- β 1 en FC de rata neonata	45
6.3.- TGF- β 1 induce la diferenciación de FC a MFC.....	47
6.4.- Efecto del Navitoclax y Resolvina D1 sobre la senescencia inducida por TGF- β 1.....	49
6.5.- Efecto del Navitoclax y Resolvina D1 en miofibroblastos cardíacos sobre los niveles de las proteínas p21 y pRb.....	50
6.6.- Efecto del Navitoclax y Resolvina D1 en miofibroblastos cardíacos sobre los niveles las proteínas pro y anti apoptóticas: Bcl-XL, Bax y procaspasa 3.....	53
6.7 Efecto del Navitoclax y Resolvina D1 en miofibroblastos cardíacos sobre los niveles de α -SMA.....	56
7.- DISCUSIÓN	58
7.1 Senescencia inducida por TGF- β 1.....	58
7.2.- TGF- β 1 induce diferenciación de FC a MFC de ratas neonatas	61
7.3.- RvD1 y Navitoclax inducen apoptosis de MFC senescentes.....	63

8.- CONCLUSIONES	67
9.- LIMITACIONES	67
10.- BIBLIOGRAFÍA	68

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1</u> : Función del fibroblasto cardiaco en el tejido cardiaco	14
<u>Figura 2</u> : Cascada de señalización vía canónica de TGF- β 1 dependiente de proteínas SMAD	16
<u>Figura 3</u> : Biomarcadores de senescencia y características principales de la célula senescente	19
<u>Figura 4</u> : Efecto de la RvD1: Respuesta resolutive de la inflamación.....	24
<u>Figura 5</u> Mecanismo de acción del navitoclax.....	25
<u>Figura 6</u> : Efecto del TGF- β 1 sobre la actividad SA- β -gal en FC de rata adulta en medio de cultivo DMEM-F12.	36
<u>Figura 7</u> : Efecto del TGF- β 1 sobre la actividad SA- β -gal en FC de rata adulta en medio de cultivo DMEM-F12/SFB 1%; 24 y 48 horas.....	37
<u>Figura 8</u> : Efecto del TGF- β 1 sobre la actividad SA- β -galactosida en FC de rata adulta en medio de cultivo DMEM-F12/SFB 1%; 72 y 96 horas.....	38
<u>Figura 9</u> : Efecto del TGF- β 1 sobre la actividad SA- β -galactosidasa en FC de rata adulta en medio de cultivo DMEM-F12/SFB 1% tratados con inhibidor SB-431542 1 μ M; 24 y 48 horas.....	40
<u>Figura 10</u> : Efecto del TGF- β 1 sobre la actividad SA- β -galactosidasa en FC de rata adulta en medio de cultivo DMEM-F12/SFB 1% tratados con inhibidor SB-431542 1 μ M 72 y 96 h.....	41
<u>Figura 11</u> : Efecto del TGF- β 1 sobre la actividad SA- β -gal en FC de rata neonata en medio de cultivo DMEM-F12/SFB 1%.	43
<u>Figura 12</u> : Efecto de TGF- β 1 sobre los niveles de α -SMA, morfología y ensamblaje de α -SMA en FC de rata neonata.....	44

Figura 13: Efecto de Resolvina D1 y navitoclax sobre la actividad SA- β -gal en MFCS de rata neonata inducidos por TGF- β 1.....47

Figura 14: Efecto de Resolvina D1 y navitoclax sobre perfil de p21 y pRb en MFCS de rata neonata inducidos por TGF- β 148

Figura 15: Efecto de Resolvina D1 y Navitoclax sobre perfil de proteínas anti y pro apoptóticas en MFCS de rata neonata inducidos por TGF- β 1.....50

Figura 16: Efecto de RvD1 y Navitoclax sobre perfil de la proteína procaspasa 3 en MFCS de rata neonata inducidos por TGF- β 1.....52

Figura 17: Efecto de Resolvina D1 y Navitoclax sobre perfil de α -SMA en MFCS de rata neonata inducidos por TGF- β 153

ABREVIATURAS

ECV	Enfermedades cardiovasculares.
OMS	Organización mundial de la salud
DMII	Diabetes Mellitus tipo 2
HTA	Hipertensión arterial
FC	Fibroblasto cardiaco
MFC	Miofibroblasto cardiaco.
α -SMA	Alpha Smooth Muscle Actin
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante
TGFR1	Receptor de TGF- β 1
TGFR2	Receptor de TGF- β 2
ERK1/2	Extracellular signal-regulated protein kinase 1/2.
SASP	Fenotipo secretor asociado a senescencia.
pRb	Fosfo retinoblastoma.

MEC	Matriz extracelular
RvD1	Resolvina D1
NF- κ B	Nuclear factor kappa B.
ERK1/2	extracellular signal-regulated protein kinase 1/2.
PI3K	Fosfatidilinositol 3 kinasa
AKT	Proteína kinasa B.
BCL-2	B-cell lymphoma 2.
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Essential Medium
SFB	Suero fetal bovino.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.

RESUMEN:

La búsqueda de nuevas terapias relacionadas a las enfermedades cardiovasculares ha cobrado gran relevancia dadas las alarmantes cifras respecto al porcentaje en el padecimiento de estas afecciones a nivel mundial. El fibroblasto cardiaco (FC) cumple un rol fundamental en esta materia, más aún cuando la literatura indica al perfil senescente y fibrótico en esta célula como responsable del deterioro en el funcionamiento del corazón. Existe evidencia que hay una estrecha relación entre la presencia de una población de miofibroblastos cardiaco (MFC) senescentes con infartos al miocardio, insuficiencia cardiaca, entre otros. La senescencia se define como el arresto irreversible del ciclo celular junto con un característico perfil secretor asociado a senescencia, más conocido como SASP.

El TGF- β 1 es una conocida citoquina proinflamatoria, profibrótica y prosenescente que los FC secretan de manera autocrina produciendo un cambio en su fenotipo, orquestando la transformación de un FC a MFC, que se caracteriza por el aumento en la expresión de α -SMA y el posterior ensamblaje de este formando fibras de estrés. Se ha descrito en la literatura la persistencia del fenotipo senescente presentando una marcada resistencia a la apoptosis

Nuevas terapias farmacológica cuyo blanco son las células senescentes han emergido en los últimos años, y estos son los llamados fármacos "senoterapéuticos". Estos fármacos se clasifican según su efecto, en donde los senolíticos inducen selectivamente la apoptosis de las células senescentes, mientras que los senomórficos o senostáticos modulan componentes del SASP sin inducir apoptosis.

En el presente trabajo se propuso estudiar el efecto de los fármacos navitoclax y Resolvina D1 (RvD1). De lo expuesto anteriormente es que en esta tesis se propuso la siguiente hipótesis: Resolvina y Navitoclax disminuyen la senescencia de FC de rata inducidos por TGF- β 1. Los objetivos fueron: a) establecer un modelo de senescencia de los MFC inducida por TGF- β 1, y en paralelo la diferenciación de FC a MFC. b) el segundo objetivo fue evaluar el efecto de los fármacos senoterapéuticos en los MFC senescentes de rata.

Para cumplir con el propósito de este trabajo se midió la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal), en FC tratados con TGF- β 1, los cuales posteriormente fueron tratados con navitoclax y RvD1. Las metodologías usadas fueron Western Blot, ensayos de actividad SA- β -gal, citoquímica con cristal violeta e inmunocitoquímica para α -SMA.

Los principales resultados fueron que el tratamiento de FC de ratas neonatas con TGF- β 1 indujo la diferenciación de FC a MFC de forma paralela a la senescencia de los MFC. Este resultado no fue estadísticamente significativo en FC de ratas adultas cultivadas en DMEM-F12, DMEM-F12 + SFB1% y DMEM-F12 + SFB1% + SB-431542. En los MFC senescentes de ratas neonatas se observó un aumento en p21 y una disminución en la fosforilación de Rb. El tratamiento con navitoclax y RvD1, disminuyó la actividad SA- β -gal, los niveles de p21 y no revirtió la disminución en la fosforilación de Rb. Del mismo modo, TGF- β 1 aumentó los niveles de Bcl-XL y disminuyó los niveles de Bax, y no disminuyó los niveles de procaspasa 3, indicando que los MFC senescentes son resistentes a la apoptosis. Navitoclax y RvD1 revirtieron los efectos de TGF- β 1. En conclusión, TGF- β 1 induce senescencia de los MFC de ratas neonatas los cuales presentan resistencia a la apoptosis. Navitoclax y RvD1 mostraron efectos senolíticos.

Resolvin D1 and navitoclax decrease the number of TGF- β 1-induced senescent cardiac myofibroblasts.

ABSTRACT

The search for new therapies related to cardiovascular diseases has gained great relevance given the alarming figures regarding the percentage in suffering from these conditions worldwide. The cardiac fibroblast (CF) plays a fundamental role in this matter, even more so when the literature indicates the senescent and fibrotic profile in a cell as responsible for the deterioration in the functioning of the heart. There is evidence that there is a close relationship between the presence of a population of senescent cardiac myofibroblasts (CMF) with myocardial infarctions, heart failure, among others. Senescence is defined as the irreversible arrest of the cell cycle together with a characteristic secretory profile associated with senescence, better known as SASP.

TGF- β 1 is a known proinflammatory, profibrotic, and prosenescent cytokine that CFs secrete in an autocrine manner, producing a change in their phenotype, orchestrating the transformation of a CF to a cardiac myofibroblast that is characterized by increased expression of α -SMA, and the subsequent assembly of this forming stress fibers. The persistence of the senescent profile has been described in the literature, presenting a marked resistance to apoptosis.

A new pharmacological therapy targeting senescent cells has emerged in recent years, and these are the so-called "senotherapeutic" drugs. According to the literature, either by selectively inducing apoptosis in senescent cells (senolytic) or by modulating components of the SASP without inducing apoptosis (senostatic or senomorphic). In the present work, it was proposed to study the effect of the drugs navitoclax and Resolvin D1 (RvD1). From the above, the following hypothesis was proposed in this thesis: Resolvin and Navitoclax decrease the senescence of rat cardiac fibroblasts induced by TGF- β 1. The objectives were: a) to establish a model of CMF senescence induced by TGF- β 1, in parallel with the differentiation of CF to CMF. b) the second objective was to evaluate the effect of the senotherapeutic drugs in the senescent CMF of rats.

To fulfill the purpose of this work, senescence-associated beta galactosidase activity (SA- β -gal) was measured in fibroblasts treated with TGF- β 1, which are subsequently treated with navitoclax and RvD1. The methodology used was Western Blot, SA- β -gal assays, cytochemistry with crystal violet, and immunocytochemistry for α -SMA.

The main results were that the treatment of CF of neonatal rats with TGF- β 1 induced the differentiation of CF to CMF in parallel with the senescence of the CMF. This result was not statistically significant in adult rats cultured in DMEM-F12, DMEM-F12 + SFB1% and DMEM-F12 + SFB1% + SB-431542. An increase in p21 and a decrease in pRb were observed in senescent CMFs from neonatal rats. Treatment with navitoclax and RvD1 decreased SA- β -gal activity, p21 levels, and did not reverse the decrease in pRb. Similarly, TGF- β 1 increased Bcl-XL levels and decreased Bax levels, and did not decrease procaspase levels, indicating that senescent CMFs are resistant to apoptosis. Navitoclax and RvD1 reversed the effects of TGF- β 1. In conclusion, TGF- β 1 induces senescence of neonatal rat CMFs which present resistance to apoptosis. Navitoclax and RvD1 showed senolytic effects.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

El incremento en la cantidad de población de adultos mayores alrededor del mundo es un hecho. En promedio, la esperanza de vida de una persona es mayor a 60 años en todos los países del mundo, incluyendo países en vías de desarrollo y subdesarrollados. En base a datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se espera que entre el 2015 y 2050 el porcentaje de individuos mayores a 60 años se duplique, pasando desde un 12% a un 22% [1]. Se ha evidenciado que el aumento de la edad de un individuo va acompañado de un aumento en enfermedades no transmisibles como lo son: diabetes mellitus tipo II (DMII), cáncer, osteoartritis, enfermedades cardiovasculares (ECV), etc. [2]. A nivel mundial se estima que hay 17,9 millones de muertes cada año producto de ECV, transformándose en la primera causa de muertes a nivel mundial. Algunas de las ECV más comunes son: hipertensión arterial (HTA), insuficiencia cardíaca, arritmias, valvulopatías, infarto del miocardio [3].

A nivel nacional las muertes a causa de ECV para el 2019 representaron el 26,6% del total de muertes para ese año, quedando en segundo lugar después del cáncer. En base a lo expuesto anteriormente es que la búsqueda de nuevas terapias que ayuden a disminuir estas preocupantes cifras es de vital importancia [4].

1.2 Corazón, Fibroblastos y miofibroblastos cardiacos

El corazón es el principal órgano del sistema cardiovascular y está compuesto de varios tipos celulares entre ellos cardiomiocitos, células endoteliales, células musculares lisas vasculares, fibroblastos cardiacos (FC) entre otras. Los FC son un tipo de célula que posee fundamentalmente un rol estructural en la composición de la matriz extracelular (MEC) del tejido cardiaco, y permiten un adecuado sostén y comunicación entre los distintos tipos celulares principales del tejido como los cardiomiocitos y células endoteliales. Además, los FC participan en distintos procesos bioquímicos y eléctricos fundamentales para mantener una correcta homeostasis en el tejido cardiaco [5]. Las distintas funciones del FC se describen en la **Figura 1**. El FC se caracteriza por poseer una morfología muy irregular en forma de huso, y por ser la principal célula secretora de proteínas de la MEC, esencialmente colágenos, proteoglicanos y glicoproteínas [6]. A su vez los FC median procesos inflamatorios ya que son capaces de secretar citoquinas y quimioquinas que conllevan finalmente a un remodelado cardiaco que es consecuencia de importantes afecciones cardiacas como lo son la hipertensión o infarto [7]. Este remodelado cardiaco está orquestado por un cambio en el fenotipo del FC en el que este se diferencia a miofibroblasto cardiaco (MFC). El FC ve aumentada su diferenciación a MFC en condiciones de carácter estresor, como lo es una sobrecarga de presión o de volumen como en la hipertensión arterial. De igual forma, la diferenciación a MFC también se produce posterior a un infarto al miocardio, en donde esta célula es requerida para una eficiente reparación del tejido dañado [8]. La transición desde un FC a un MFC se caracteriza por un aumento en la expresión y posterior ensamblaje de alfa-actina del músculo liso (α -SMA), dando lugar a las características fibras de estrés propias de los MFC, las que en condiciones fisiológicas

poseen una capacidad altamente contráctil capaz de unir y compactar el tejido sano, este proceso sustenta la cicatrización [9].

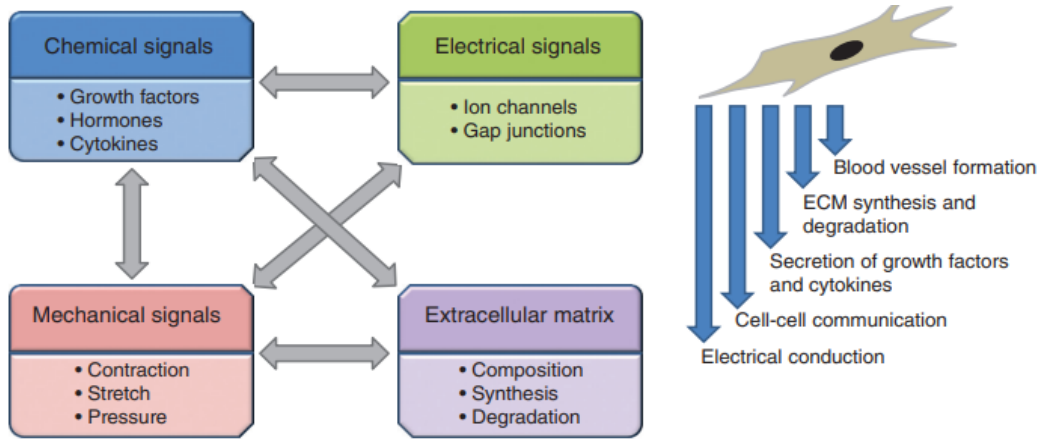


Figura 1. Función del fibroblasto cardiaco en el tejido cardiaco. El fibroblasto cardiaco posee distintas funciones, como lo son: Señalización química, mecánica, eléctrica y ser además el principal mediador de la composición de la matriz extracelular. Modificado de Dostal, D. *et al.* Comprehensive Physiology. (2015). Dynamic interactions in the heart and fibroblast function.

1.3 Miofibroblastos cardiacos y factor de crecimiento transformante β

El Factor de crecimiento transformante- β (TGF- β , por su sigla en inglés) corresponde a una citoquina con características fibrogénicas que participa en un sinnúmero de procesos fisiológicos, como lo son: deposición de matriz extracelular, proliferación celular, crecimiento, inflamación y de manera muy importante en la diferenciación del FC al MFC [8]. Con respecto a los MFC, en un interesante trabajo de Petrov *et al.*, (2008) se describieron 3 tipos de miofibroblastos: a) miofibroblastos auto inducidos, caracterizados porque el propio FC secreta TGF- β , el cual al actuar en forma autocrina induce la autodiferenciación de FC a MFC. Esta condición se presenta en condiciones de cultivo celular, debido entre otras cosas a que el estrés mecánico propio del cultivo celular induce la secreción de TGF-

β . Estos MFC se caracterizan porque aún presentan características proliferativas. b) MFC inducidos por la adición exógena de TGF- β , los cuales también se conocen como FC "activados", con la característica de que estos MFC pierden la capacidad proliferativa a mayor tiempo de cultivo. c) MFC terminalmente diferenciados, los que se caracterizan porque son FC en cultivo tratados por 7 días con TGF- β , luego son despegados y vueltos a pegar a la placa de cultivo. Estos MFC presentan daño al ADN y no proliferan [9].

Con respecto a TGF- β , Se pueden encontrar 3 isoformas de TGF- β (TGF- β 1,2 y 3), siendo la isoforma 1 la más abundante [8]. El TGF- β 1 posee dos receptores, el TGFR1 y TGFR2 de naturaleza serina/treonina kinasa. Como se puede apreciar en la **Figura 2**, la activación de los receptores desencadena la correspondiente cascada de señalización por medio de dos vías, estas son: la vía canónica y no canónica. Ambas vías comparten la misma forma de activación, el TGF- β 1 se une inicialmente al TGFR2 el cual recluta o se une al TGFR1 adyacente para posteriormente activar la cascada río abajo. La vía canónica es SMAD dependiente, es decir, una vez que TGFR2 recluta a TGFR1 este último fosforila a SMAD2 y SMAD3 presentes en el citosol, activándolas para consecuentemente formar un complejo con SMAD4, este complejo activado transloca hacia el núcleo uniéndose a promotores que inducen la transcripción de proteínas fibrogénicas, entre ellas el aumento de α -SMA y un aumento en la síntesis de colágeno [10]. Respecto a la vía no canónica en nuestro laboratorio se ha demostrado que TGF- β 1 activa tanto la vía canónica como la no canónica, activando la vía SMAD2/SMAD3, así como también la vía ERK1/2 y AKT. De esta forma previene la apoptosis del FC inducida por isquemia / reperfusión simulada [13]. A este respecto, se sabe que posterior al reclutamiento y activación del TGFR1 desencadena la activación de la vía ERK1/2 generando un aumento de las proteínas ya mencionadas anteriormente [11].

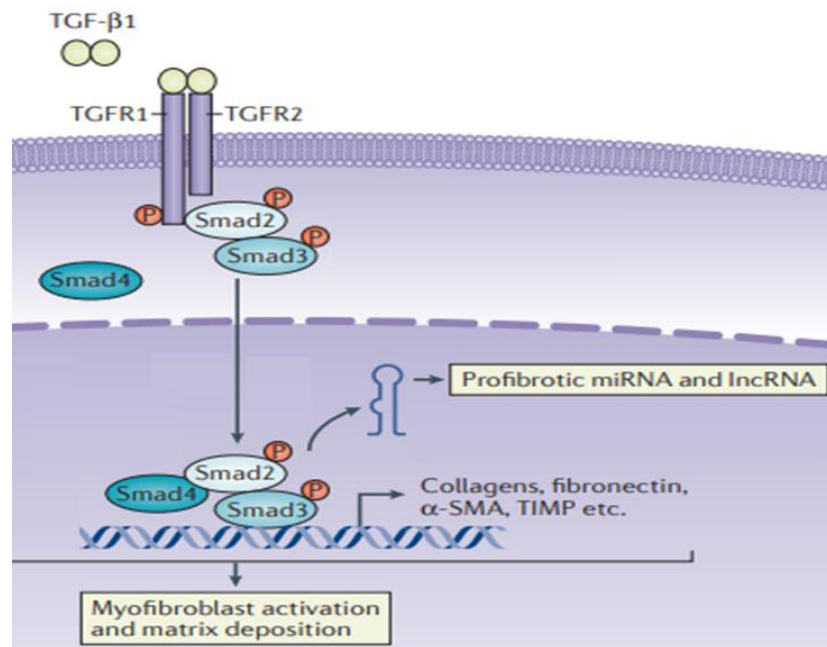


Figura 2. Cascada de señalización vía canónica de TGF-β1 dependiente de proteínas SMAD. TGF-β1 activa el receptor para TGF-β TGFR2 el que recluta al TGFR1. Luego se desencadena la vía de señalización SMAD dependiente activando la transcripción de proteínas pro fibróticas. Tomado y modificado de Xiao-Ming Meng. *et al.* Nature reviews. (2016). TGF-β: the master regulator of fibrosis.

1.4 Senescencia celular.

La senescencia celular es un proceso que consiste en la detención del ciclo celular de forma permanente [12]. Una característica principal es que la célula que entra en senescencia sigue metabólicamente activa. Este estado metabólico activo permite una constante secreción de citoquinas y quimioquinas denominado: fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, por su sigla en inglés) que pueden ejercer efectos autocrinos y paracrinos [13]. La senescencia ocurre tanto en procesos fisiológicos como patológicos. Se ha descrito que la senescencia es fundamental en el desarrollo embrionario, reparación tisular, envejecimiento fisiológico y también como el mecanismo de defensa que tiene el

organismo para evitar la aparición de células carcinogénicas. No así en la senescencia inducida, la cual es gatillada por enfermedades de base, remodelado cardiaco, agentes estresores o enfermedades relacionadas con la edad o fármacos [13, 14]. Se ha descrito que la senescencia celular se produce cuando hay un daño al ADN. Se promueve la detención del ciclo celular, pero a su vez se busca reparar el daño en la cadena del ADN, y si esto último no ocurre, se gatilla la detención del ciclo para impedir la formación de células que contengan el mismo daño. Este mecanismo es el que falla en la formación de tumores [15].

1.4.1 Marcadores celulares y moleculares de senescencia.

Actualmente se ha descrito que para caracterizar la senescencia celular se requiere de más de un marcador. Se disponen de técnicas para determinar el aumento o disminución de determinadas proteínas que participan en la señalización intracelular de la detención del ciclo celular; entre ellas la sobre expresión de p53, p21, p16 y la reducida fosforilación de la proteína del retino blastoma (pRb). También se realizan ensayos que se valen del estado metabólico de una célula senescente, ya que en este tipo de células se aprecia una alta actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal) [16], la cual es posible determinar mediante el ensayo β -gal. Este último marcador es el "Gold Standard" para caracterizar células senescentes [14-16]. En la **Figura 3** se pueden apreciar los marcadores clásicos de senescencia.

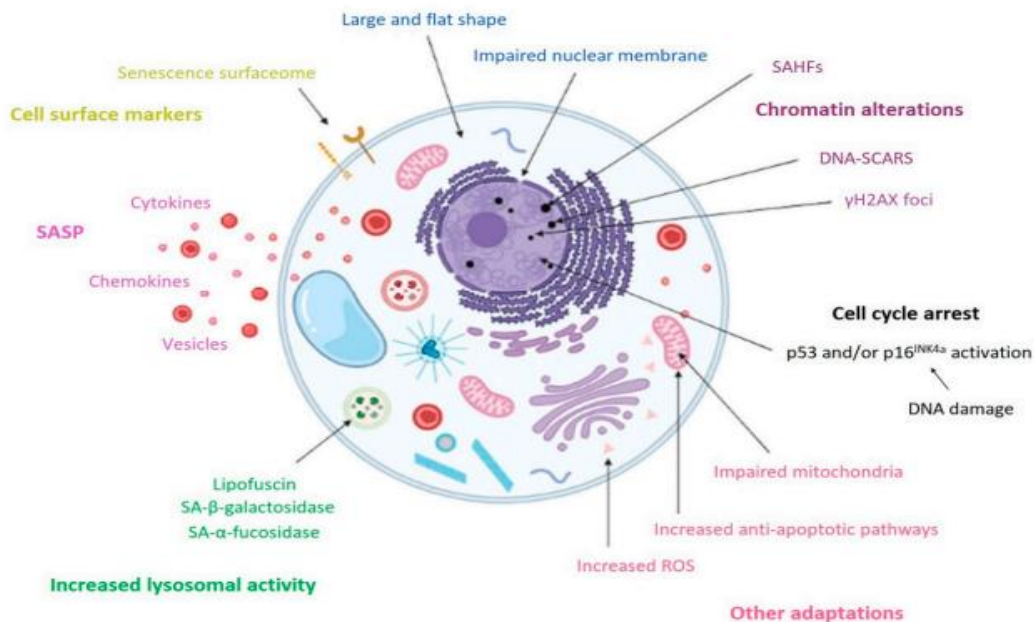


Figura 3. Biomarcadores de senescencia y características principales de célula senescente. Algunas de las principales características de la célula senescente es el aumento de la actividad SA-β-galactosidasa, cambios en la morfología y sobre expresión de proteínas que participan en la detención del ciclo celular como lo son: p53 y p21. Tomado de Natalie Kudlova. *et al.* International Journals of Molecular Sciences. (2022). Cellular Senescence: Molecular Targets, Biomarkers, and Senolytic Drugs.

1.4.2 Actividad β-galactosidasa asociada a senescencia

Como se mencionó con anterioridad, el ensayo β-gal es primordial para determinar si una célula es senescente. Este ensayo permite dar cuenta del aumento de la actividad de la enzima lisosomal β-galactosidasa. Esta enzima cataliza la hidrólisis de β-galactósidos en monosacáridos. Se ha descrito que las células senescentes poseen una mayor masa lisosomal por lo que la actividad enzimática de la β-galactosidasa estará aumentada. Al adicionar un sustrato exógeno como el X-gal (reactivo principal del ensayo β-gal) la enzima lo hidroliza transformando el compuesto X-gal en galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol-1. Posteriormente este dimeriza y precipita formando un característico sedimento de color azul-verdoso. La mayoría de los tipos celulares expresan esta enzima

que es activa a pH 4,0. La diferencia con una célula senescente radica que la masa lisosomal al estar aumentada y sumado a cambios estructurales de la enzima es capaz de activa a pH 6, condición que solo se genera en células senescentes [16].

1.4.3 Fenotipo secretor asociado a senescencia

El SASP corresponde a diversos factores solubles proinflamatorios como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, vesículas extracelulares, etc. En un tejido que es incapaz de eliminar la población de células senescentes, los factores proinflamatorios se ven aumentados, paralelamente con aumento de población de células senescentes, esto debido a que el SASP posee la cualidad ejercer efectos autocrinos y paracrinos. Esto desencadena finalmente la senescencia inducida por senescencia, llevando al tejido a un estado más susceptible al daño o funcionar parcialmente gatillado por la acumulación de células senescentes producto de la respuesta inflamatoria del SASP [17].

1.5 Miofibroblasto senescente

Ya hemos mencionado que el cambio de fenotipo del FC a MFC va acompañado de aumento en la expresión de α -SMA y de su ensamblaje para dar lugar a las características fibras de estrés de los MFC y su correspondiente aumento en la síntesis y secreción de proteínas de la MEC, formando así, tejido fibrótico. Además, se ha demostrado que en esta población de MFC hay presencia de células senescentes, las cuales posteriormente serán determinantes en el desarrollo de fibrosis cardiaca y remodelado cardiaco junto a las células con un marcado perfil profibrótico [18]. Ante la exposición a agentes estresores, ya sea endógenos o exógenos, se estimula al FC a un cambio en su fenotipo, se vuelve una célula mucho más secretora con un aumento en el depósito de la MEC. En base a esto último se

ha descrito que la senescencia aparece como mecanismo para limitar el depósito de MEC, debido esencialmente a que una célula senescente secreta una menor cantidad de proteínas de la MEC y con ello impide la formación de tejido fibrótico de forma exacerbada. Sin embargo, la población de células senescentes continúa metabólicamente activas con su característico perfil secretor asociado a senescencia, el cual, es proinflamatorio actuando como agente estresor endógeno en las células vecinas en las cuales induce la secreción de proteínas de la MEC y citoquinas [19].

1.6 Senolíticos y senostáticos

Los fármacos senolíticos y senostáticos (o senomórficos) denominados también senoterapéuticos, corresponden a moléculas que tienen como blanco farmacológico las células senescentes de forma selectiva. Se pueden encontrar dos tipos de senoterapéuticos de los cuales tendrán un efecto distinto sobre células senescentes. Los senolíticos inducen apoptosis de forma selectiva mientras que los senostáticos no inducen apoptosis, si no que atenúan el SASP mediante la modificación ya sea en el perfil o en la magnitud de sus componentes [20]. Como se abordó con anterioridad, las células senescentes están estrechamente ligadas a la inflamación crónica que finalmente desencadena fibrosis y remodelado de tejido, afectando la funcionalidad del órgano en cuestión. Es por esto por lo que la eliminación o atenuación del perfil senescente de determinadas células revertirían o atenuarían la progresión de enfermedades relacionadas a la fibrosis o remodelado cardiaco. En algunos estudios se ha visto que la eliminación de cardiomiocitos senescentes mejoró la función diastólica luego de IM, debido a que la eliminación de las células senescentes permite selectivamente la presencia de células sanas [21-22]. Estos datos

proporcionan evidencia de que las células senescentes son los principales contribuyentes a la disfunción y aumento de la mortalidad después del IM. La capacidad terapéutica de los fármacos senostáticos no es del todo clara. Hay evidencia de fármacos que se les atribuyen propiedades senostáticas como lo es la metformina, la cual a la vez de poseer efectos antidiabéticos también posee un efecto cardioprotector mediante un efecto que disminuye la fibrosis y el remodelado de tejido, aunque se desconoce en profundidad como logra estos efectos. [23]

1.6.1 Resolvinas y Navitoclax como fármacos senomórficos

Las Resolvinas (Rv) pertenecen al grupo de los 4 lípidos especializados proresolutivos, entre ellos, junto con las Resolvinas se encuentran: Lipoxinas, Protectinas y Maresinas. Estos lípidos especializados activan receptores capaces de activar la resolución de la inflamación mediante la disminución de los leucotrienos, prostaglandinas, citoquinas proinflamatorias y además modular la expresión de componentes de la MEC tal y como lo es el colágeno [24-25]. El precursor de las Rv es el ácido graso esencial omega 3, el cual da origen a dos clases de Rv, las Rv-serie E y Rv-serie D. Las Rv de la serie E provienen del ácido eicosapentaenoico (EPA), mientras que las Rv de la serie D provienen del ácido docosahexaenoico (DHA) y que a su vez poseen distintas estereoquímicas dando lugar a subtipos de Rv tales como: RvD1, RvD2, RvD3 y RvD5 [26]. Las RvD1 actúan mediante la interacción con el receptor para LXA4, el ALX/FPR2 [27] y el receptor huérfano GPR32 en humanos. Tanto el GPR32 y el ALX/FPR2 están acoplados a proteínas G [28]. Anteriormente en el laboratorio se han estudiado los efectos de la RvD1 y RvE1 en FC, en donde se pudo observar que ambas series de Rv posee propiedades antiinflamatorias [29-30]. También se logró observar que la RvE1 es capaz de

atenuar la senescencia inducida por doxorrubicina en FC. Además, se ha observado que la RvE1 es capaz de atenuar la senescencia del FC inducida por doxorrubicina. Se ha visto que el efecto proresolutivo de la RvD1 viene dado ante la prevención de la síntesis de mediadores proinflamatorios como: TNF- α , IL-6 y MCP-1 tal y como se puede ver en el esquema de la **Figura 4** [31-32].

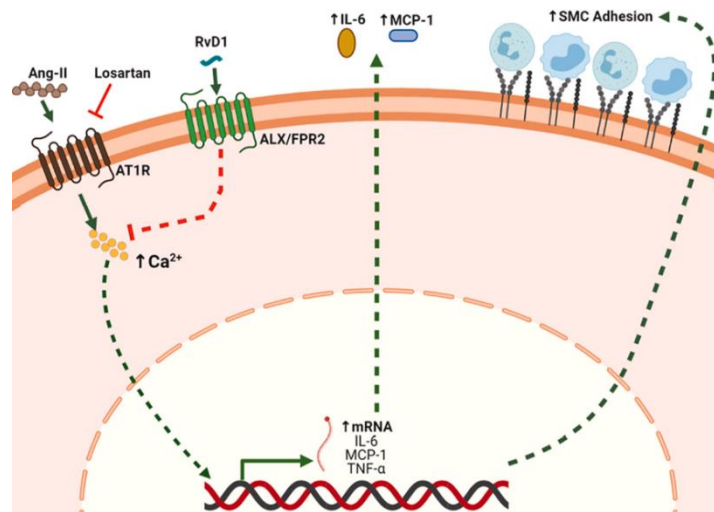


Figura 4. Efecto de la RvD1: Respuesta resolutive de la inflamación. Resolvin D1 activa el receptor ALX/RPR2 inhibiendo la liberación de calcio disminuyendo la expresión de proteínas proinflamatorias y moléculas de adhesión. Tomado de Aimee Salas-Hernandez. *et al.* Biomedicine & Pharmacotherapy (2021) Resolvin D1 reduces expression and secretion of cytokines and monocyte adhesion triggered by Angiotensin II, in rat cardiac fibroblasts.

El Navitoclax corresponde a un fármaco experimental (ABT-263) perteneciente a la familia de los inhibidores de las proteínas anti apoptóticas, como lo son: Bcl-2, Bcl-XL y Bcl-W. La proteína proapoptotica Bax, se acopla a la membrana de la mitocondria aumentando la permeabilidad permitiendo el paso de citocromo C. Posteriormente el citocromo C activa a la proteína ejecutora de la apoptosis, la caspasa 3. El Navitoclax puede unirse de forma selectiva a las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, esto gatillará la apoptosis dado el desbalance de la vía antiapoptótica [33]. En la **Figura 5** se muestra un

esquema con la actividad pro apoptótica del Navitoclax. En estudios previos se ha podido observar que el Navitoclax es capaz de inhibir la fibrosis y la hipertrofia cardiaca en pacientes que padecen insuficiencia cardiaca inducida por Ang-II [34].

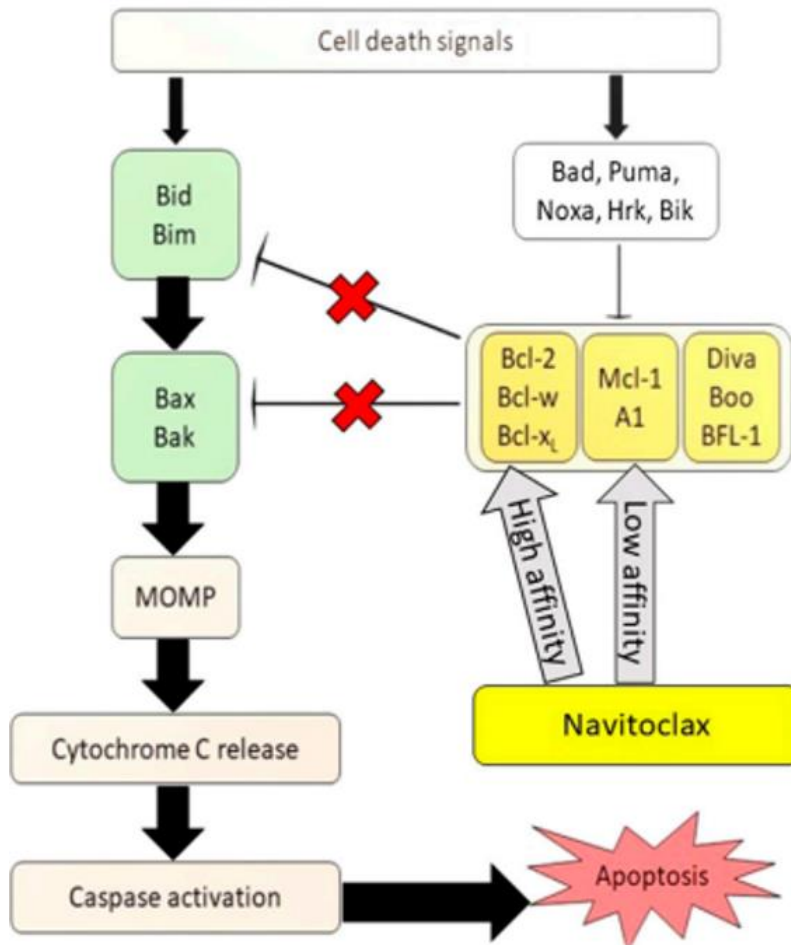


Figura 5. Mecanismo de acción del Navitoclax . Navitoclax inhibe las proteínas de la familia Bcl-2 dando lugar a la apoptosis mediante la actividad de Bax y la posterior activación de Caspasas. Tomado de Mohamad Anuar *et al.* *Frontiers in Pharmacology.* (2020). *Clinical Review: Navitoclax as a Pro-Apoptotic and Anti-Fibrotic Agent.*

Finalmente, y debido a lo anteriormente expuesto, estos es: a) que los MFC son las principales células asociadas al remodelado fibrótico del corazón y; b) que el TGF- β 1 induce la diferenciación de FC a MFC; c) la presencia de fibroblastos senescentes y el impacto que ellas tienen en el desarrollo de fibrosis cardiaca; y d) la búsqueda de nuevos

fármacos y blancos farmacológicos como una estrategia farmacológica para tratar las ECV, en la cual los fármacos senoterapéuticos podrían jugar un rol central; es que se propone en esta memoria de título evaluar si TGF- β 1 induce la senescencia de los MFC y el efecto que sobre ellas tendrían la RvD1 y navitoclax.

Estos antecedentes nos permiten postular a la siguiente hipótesis:

2.- HIPÓTESIS

Resolvina D1 y navitoclax disminuyen el número de miofibroblastos cardiacos senescentes inducidos por TGF- β 1.

3.- OBJETIVO GENERAL

Demostrar que el tratamiento farmacológico con RvD1 y navitoclax disminuyen el número de miofibroblastos cardiacos senescentes inducidos por TGF- β 1, evaluando actividad SA- β -galactosidasa, perfil de proteínas de senescencia y apoptosis.

4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Demostrar que TGF- β 1 induce senescencia de miofibroblastos cardiacos
2. Demostrar que Resolvina D1 y Navitoclax disminuyen el número de células senescentes

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Reactivos

Suero fetal bovino (SFB), 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). Reactivo RvD1 (CAS 872993-05-0) fue comprado a Cayman Chemical Company (MI, EE. UU.). Colagenasa tipo II (CAS 9001-12-1) y Trypan Blue (CAS 15250-061) fueron comprados a Life Technologies Corporation (CA, EE. UU.). Anticuerpo primario α -SMA fue adquirido en Cell Signaling Technology Inc. (MA, EE. UU.). Reactivo TGF- β 1 y Anticuerpo secundario Goat Anti-rabbit IgG-HRP fueron adquiridos en R&D Systems, Inc. (MN, EE. UU.).

5.2.- Modelo animal

5.2.1 Ratas neonatas

Ratas *Sprague-Dawley* neonatas (2 a 3 días de edad) provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, en cumplimiento de todas las normas éticas referidas a la utilización de animales. Todos los estudios fueron desarrollados cumpliendo la Guía de la NIH para el Cuidado y Uso de Animales de

Laboratorio, actualizada en el 2011 (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-Use-of-Laboratory-Animals>).

5.2.2 Ratas adultas

Ratas *Sprague-Dawley* adultas de 6-8 semanas de edad fueron obtenidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los animales se mantuvieron en jaulas (con ciclos de luz/oscuridad de 12 h) y libre acceso a alimento y agua. Todos los estudios fueron desarrollados cumpliendo la Guía de la NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, actualizada en el 2011 [48], y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad.

5.3.- Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos de rata neonata y adulta

Para las ratas neonatas se utilizó el protocolo ya establecido en el laboratorio. Brevemente, las ratas se decapitaron e inmediatamente se les removió el corazón bajo condiciones de asepsia, se retiraron las aurículas y los ventrículos siendo cortados en pequeños trozos para facilitar las sucesivas digestiones posteriores con pancreatina y colagenasa II. El producto de las digestiones se sometió a un preplaqueo por 2 horas a 37°C, en medio de cultivo 5% FBS en frascos para cultivo celular. Por adhesión diferencial al plástico se separaron los FC de cardiomiocitos. Transcurridas 2 horas, se cambió el medio por DMEM-F12 enriquecido con 10% FBS, dejando proliferar a los FC hasta confluencia en condiciones convencionales de cultivo (5% de CO₂ y 37°C).

Para las ratas adultas, los fibroblastos cardíacos de rata adulta fueron aislados de ratas macho *Sprague-Dawley* usando digestión enzimática. Las ratas fueron anestesiadas

con una inyección de ketamina/xilazina (160/16 mg/kg peso por vía intraperitoneal) y los corazones extraídos en un ambiente aséptico. Se removieron las aurículas y los ventrículos fueron cortados en trozos pequeños (1-2 mm) para luego ser sometidos a incubación con colagenasa tipo II. El producto de la digestión fue separado mediante centrifugación a 1000 RPM por 10 min. El pellet fue resuspendido en 10 ml de DMEM/F12 suplementado con 10% de FBS y antibióticos (estreptomina 100 µg/ml, penicilina 100 UI/ml, anfotericina B 0,25 µg/ml) y cultivados en una atmósfera con 5%CO₂ y 37°C hasta confluencia (6-7 días).

5.4.- Pasaje celular

Para la realización de los experimentos usando fibroblastos de rata neonata y adulta, los FC se mantuvieron en medio DMEM-F12/FBS 10% hasta confluencia en pasaje 0. Posteriormente, se lavaron las placas con PBS 1X y las células se soltaron con tripsina/EDTA 0,05% en PBS 1X estéril, las cuales fueron contadas por el método de exclusión de Azul de Tripán. Luego, se sembraron 400.000 células/placa en placas de cultivo de 60 mm para la determinación de proteínas y 20.000 células/placa para ensayo SA-β-gal. 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 fueron recolectadas de las placas de cultivo de 60 mm, previamente lavadas con PBS 1X no estéril frío (1 mL x 2). Luego, se adicionaron 50 μ L de Buffer de Lisis y se procedió a la obtención del lisado celular raspando suavemente la placa. La muestra fue recolectada en tubos de 1,5 mL. Luego se centrifugó a 15000 rpm por 10 minutos. Se descartó el pellet y 1 μ L del remanente fueron utilizados para cuantificar la concentración de proteína de la muestra empleando el Método de Bradford. Posteriormente, se adicionaron 16 μ L de Buffer de Carga 4X y se calentó durante 5 minutos a 100° C para denaturar las proteínas.

La separación de las proteínas por su masa se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida preparados a partir de una solución de acrilamida/bis-acrilamida. La concentración del gel concentrador (*stacking*) fue 5%, mientras que la del gel separador (*running*) fue de 8-15%, dependiendo de la proteína de interés. Se adicionaron volúmenes equivalentes a 20 μ g de proteína por carril. La electroforesis se realizó a 70 V por 30 minutos para concentrar la muestra, y luego a 100 V para la separación, en tampón de electroforesis. Luego de realizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 μ M de poro durante 16 horas a una corriente constante de 0,35 A en tampón de transferencia. Una vez transferidas las proteínas a las membranas, estas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con BSA al 5% (p/v) y posteriormente, se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios (α -SMA 1:5000, p21 1:10000, Bcl-2 1:1000, pRb 1:2000, BAX 1:1000, procaspasa 3 1:1000, β -tubulina 1:1000) durante toda la noche a 4°C.

Posterior a la incubación, las membranas se lavaron por 5 minutos 3 veces en TBS 1X/ Tween-20 al 0,1% e incubadas durante 90 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-rabbit (dilución 1:5000) en TBS 1X/Tween-20 al 0,1%. Para la inmunodetección, las membranas previamente lavadas fueron incubadas por 1 minuto con el reactivo quimioluminiscente ECL y la quimioluminiscencia fue detectada por el equipo C-DiGit (LI-COR Biosciences, Nebraska), mediante el software computacional Image Studio (LI-COR Biosciences, Nebraska). Los niveles de proteína fueron cuantificados mediante la herramienta de cuantificación del software Image Studio y normalizados respecto a los controles de carga GAPDH y β -tubulina, siendo los resultados expresados como veces sobre el control y ratio (BAX/Bcl- XL)

5.6.- Determinación de SA- β -gal

El kit utilizado en este trabajo para la detección de las células senescentes fue el denominado "*Senescence Cells Histochemical Staining Kit*" (Cell Signaling, USA). Mediante este kit se detectaron las células senescentes a partir de la hidrólisis por la β -galactosidasa del sustrato cromogénico X-gal. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 20.000 células por pocillo suplementado con DMEM-F12 suplementado con 10% SFB. Una vez llegaron las células a un 70 % de confluencia se realizaron los tratamientos de interés. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se llevó a cabo el protocolo de tinción con el kit de senescencia conforme el protocolo del kit. Para ello, se aspiró el medio y se lavaron 2 veces las células con PBS 1X antes de su fijación con la solución de fijado 1X aportada por el kit, compuesta por formaldehído al 20 %; glutaraldehído al 2 %; 70,4 mM Na_2HPO_4 ; 14,7 mM de KH_2PO_4 ; 1,37 M de NaCl y 26,8 mM de KCl, diluida 1:10 en H_2O Milli-

Q®. Tras 12 min a temperatura ambiente, se eliminaron los restos de fijación con 3 lavados con PBS 1X, y se añadió por pocillo 1 mL de la solución de tinción compuesta por una mezcla de 5 mM de ferricianida de potasio ($K_3[Fe(CN)_6]$); 5 mM de ferrocianida de potasio ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$); 1 mg/mL de X-gal y una solución de composición desconocida aportada por el kit denominada "*staining solution*". Para asegurar la tinción de las células senescentes, se ajustó el pH de la solución 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 detectando la actividad de esta enzima en todas las células (senescentes y no senescentes). Las células se incubaron en oscuridad durante 16 horas a 37 °C en una estufa sin CO_2 para evitar variaciones en el pH de la solución por acidificación del medio. Transcurrido este tiempo se comprobó en el microscopio óptico a 10X el desarrollo de coloración azul en los pocillos. Finalmente, se retiró la solución de tinción y se lavaron 3 veces las células con PBS 1X para eliminar los restos presentes. Para la conservación de las tinciones se añadió 1 mL de glicerol al 70 % v/v en cada pocillo y se almacenaron las placas entre 2 y 8 °C para su posterior cuantificación. Para la cuantificación del porcentaje de células β -galactosidasa positivas se utilizó un microscopio invertido Eclipse TE300 (Nikon; Tokyo, Japón) en el objetivo 10X. Se obtuvieron 50 imágenes a cada condición con el microscopio para su posterior análisis.

5.7.- Inmunocitoquímica

Los FC aislados de rata neonata son sembrados en placa de 35mm con cubreobjeto, en una cantidad de 30.000 a 40.000 células. Pasado 24 horas, se reemplaza por medio de cultivo fresco, esto es, DMEM-F12/SFB 10%. Transcurridas otras 24 horas se reemplaza medio de cultivo (DMEM-F12/SFB 10% por DMEM-F12/SFB 1%. Luego de 24 horas las células son estimuladas. Transcurrido el tiempo de experimentación las células fueron lavadas con PBS 1X frío y fijadas con paraformaldehído al 4% por 20 minutos a 4°C. Una vez hecho lo anterior los FC se trataron con glicina 100 mM por 10 minutos. Posteriormente se permeabilizaron con triton X-100 al 0,1% por 10 minutos. Luego se bloquearon con BSA al 3% por 20 minutos. Se incubaron con anticuerpo para α -SMA "overnight" (1:500; ab7817; Abcam) en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo requerido se lavaron con PBS 1X frío tres veces. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 nm por dos horas (1:500; #4410S; Cell Signalling). Luego de realizar 3 lavados con PBS 1X frío se tomaron 6 imágenes por placa con el objetivo 10x y se muestra una imagen representativa de la técnica evidenciando ensamblaje de α -SMA en fibras de estrés.

5.8.- Cristal Violeta

Las células fueron sembradas en placas de 35 mm y se tiñeron con cristal violeta 0.5% en metanol 20%. Se sembraron entre 30.000 y 40.000 FC aislados de rata neonata. Brevemente, se retiró el medio a las placas y se lavó 3 veces con PBS 1X, se añadió 1 mL de solución de cristal violeta por placa en agitación suave por 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se lavó cada placa 3 veces con PBS 1X y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez

hecho esto, se tomaron 5 imágenes por placa con el objetivo 10x y se muestra una imagen representativa de la técnica evidenciando la morfología de la célula.

5.9.-Análisis estadístico

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

6.- RESULTADOS

6.1 TGF- β induce senescencia de miofibroblastos cardiacos de rata adulta

Para poder evaluar el efecto senolítico de navitoclax y senostático de RvD1 en MFC senescentes, primero se estableció el modelo celular de experimentación. En la literatura se ha visto que el TGF- β 1 induce senescencia en fibroblastos de distintos tejidos [18,35]. A su vez, previamente en el laboratorio se describió que el TGF- β 1 induce la diferenciación de FC a MFC tras 72-96 h de tratamiento [36, 37, 38], por lo que, primero se midió la actividad SA- β -gal en FC de rata adulta tratados con TGF- β 1 a dichos tiempos. En la **Figura 6**, los FC fueron cultivados en DMEM-F12 y posteriormente tratados con TGF- β 1 10 ng/mL durante 72 y 96 h, luego se midió SA- β -gal; como control positivo se utilizó doxorrubicina 10 nM/mL. Los resultados mostraron que a las 72 y 96 h no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la actividad SA- β -gal entre los FC sin estímulo (Control), FC tratados con TGF- β 1 10 ng/mL y con el control positivo doxorrubicina. Cabe resaltar que en la condición control, hubo un gran aumento de la actividad SA- β -gal basal, alcanzando un valor por sobre el 20% a 96 h.

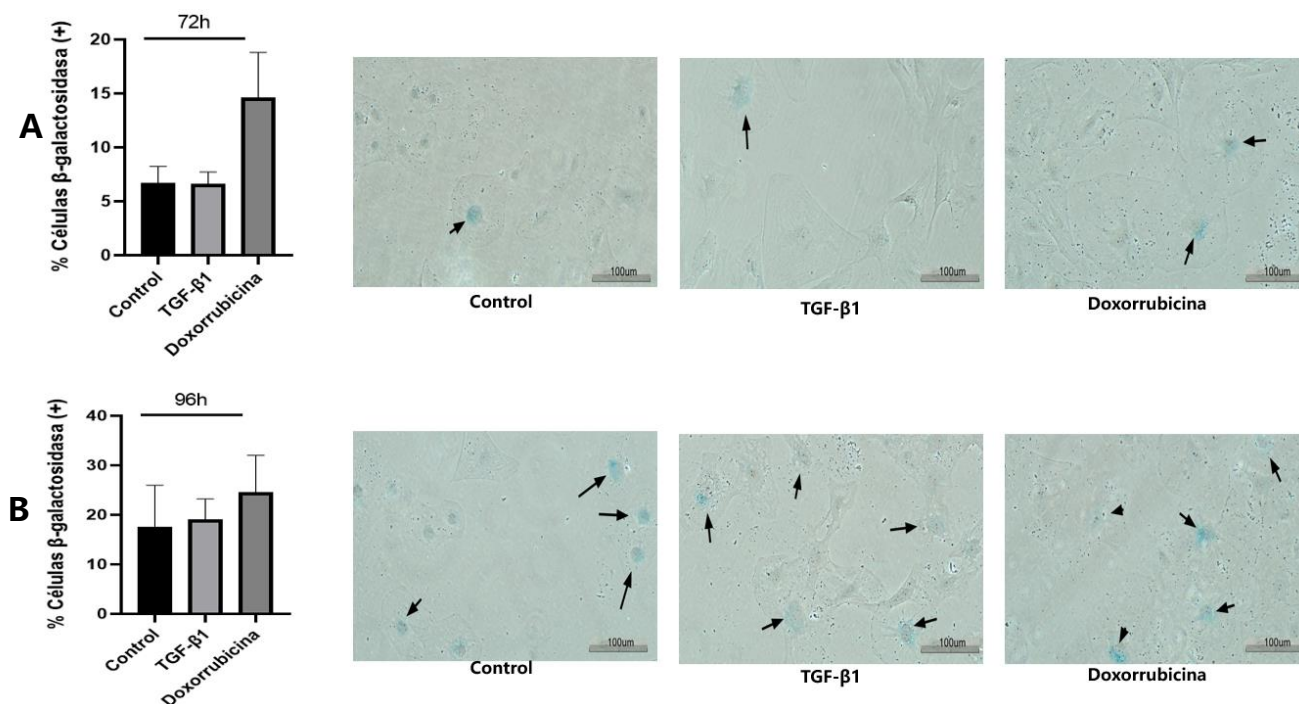


Figura 6. Efecto del TGF-β1 sobre la actividad SA-β-gal en FC de rata adulta en medio de cultivo DMEM-F12. Fibroblastos cardiacos de rata adulta tratados con TGF-β1 10 ng/mL durante 72 (A) y 96 (B) h. Estímulo de doxorubicina 10 nM como control positivo. Imágenes representativas de la tinción SA-β-gal (panel derecho) y sus respectivas cuantificaciones (panel izquierdo). Flechas negras indican células senescentes. Número de experimentos N=3. Expresado como porcentaje de células positivas a SA-β-galactosidasa.

Debido a que en la condición control se encontró una elevada actividad SA-β-gal, la que se debería a un elevado estrés originado por la condición de cultivo celular (baja presencia de nutrientes y estrés mecánico por permanencia en placa), es que se propuso cambiar la condición del medio del cultivo. Para este objetivo se realizaron ensayos de actividad SA-β-gal utilizando las mismas concentraciones anteriores respecto a los estímulos de TGF-β1 y Doxorubicina, pero esta vez en presencia de SFB 1%. La presencia de suero 1% disminuiría la falta de nutrientes permitiendo un menor estrés basal, y con ello disminuir la elevada actividad SA-β-gal en la condición control.

En estos ensayos se incluyó una temporalidad más amplia: 24 a 96 h. Con el propósito de obtener una mayor información respecto a que tiempo se produce el mayor efecto del TGF- β 1. En la **Figura 7**, los resultados mostraron que a las 24 y 48 h no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y el TGF- β 1. Mientras que a un tiempo de 48 h hubo un notorio efecto del control positivo doxorubicina respecto del control, alcanzando un 24 % de actividad SA- β -gal positiva.

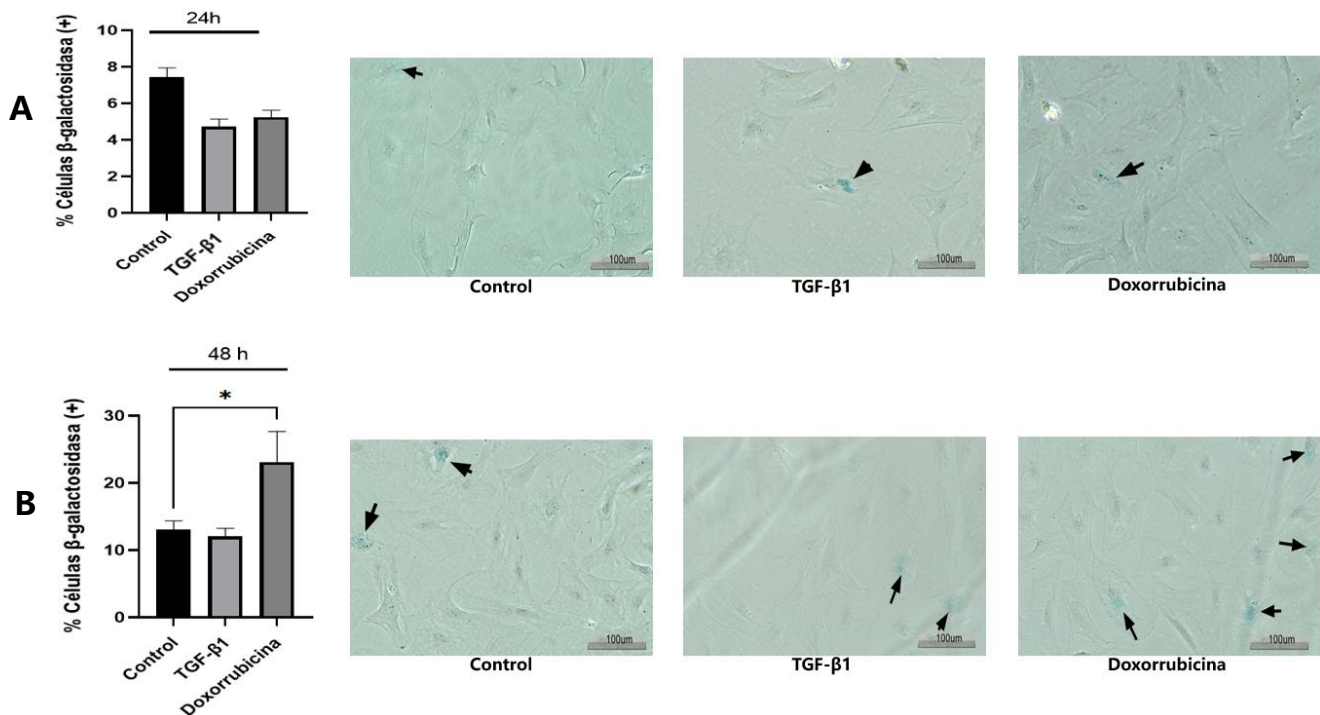


Figura 7. Efecto del TGF- β 1 sobre la actividad SA- β -gal en FC de rata adulta en medio de cultivo DMEM-F12/SFB 1%. Fibroblastos cardiacos de rata adulta con 1% SFB y tratados con TGF- β 1 10 ng/mL durante 24 (A) y 48 (B) h. Estímulo de doxorubicina 10 nM como control positivo. Imágenes representativas de la tinción SA- β -galactosidasa (panel derecho) y sus respectivas cuantificaciones (panel izquierdo). Flechas negras indican células senescentes. Número de experimentos N=4. Expresado como porcentaje de células positivas a SA- β -galactosidasa. *p<0,05 vs control 48 h.

Los resultados a tiempos más tardíos no fueron distintos. En la **Figura 8**, los resultados mostraron un aumento de actividad SA- β -gal entre las 72 y 96 h en los FC control,

siendo éste un valor por sobre el 20%. Similar a resultados anteriores, no se observaron resultados estadísticamente significativos entre los FC controles, los FC tratados con TGF- β 1 y los FC tratados con Doxorubicina. Estos resultados darían cuenta de un FC estresado, posiblemente por el estrés mecánico que implica largos tiempos de permanencia en placa (si se incluye el proceso de obtención del cultivo primario, tiempo de cultivo para proliferación y tiempos de estímulos son 15 días).

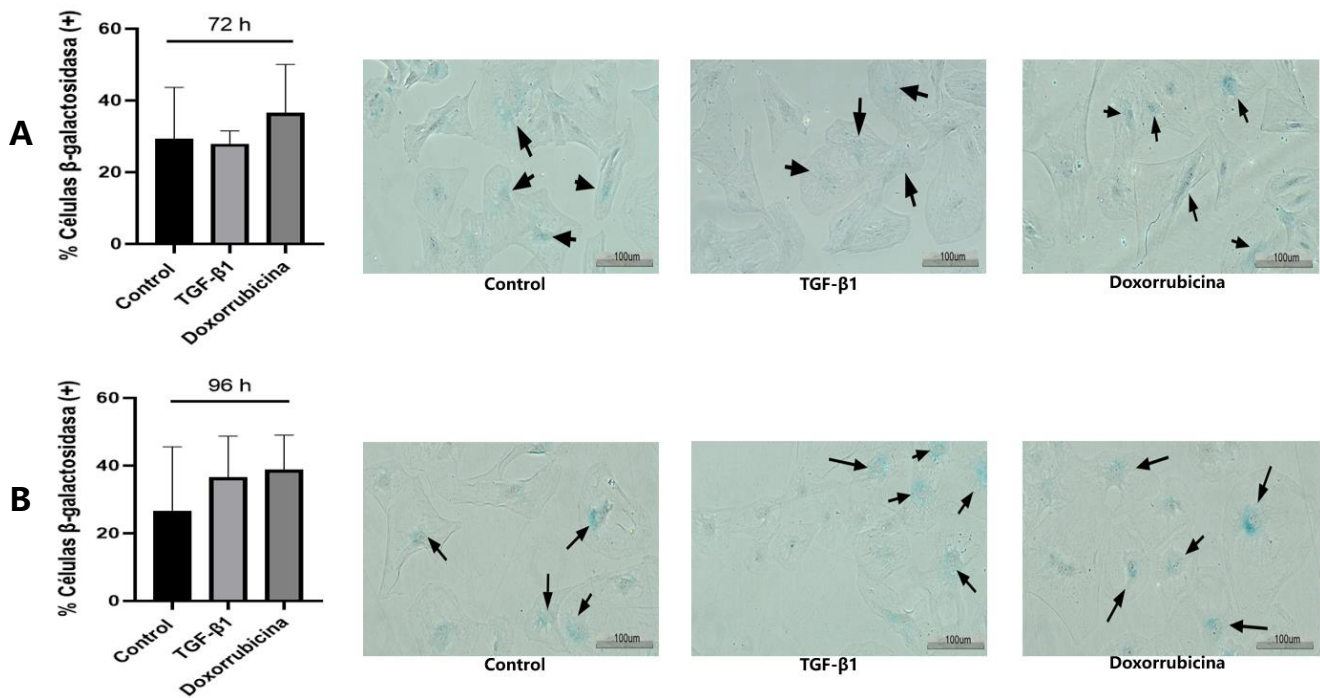


Figura 8. Efecto del TGF- β 1 sobre la actividad SA- β -galactosida en FC de rata adulta en medio de cultivo DMEM-F12/SFB 1%. Fibroblastos cardiacos de rata adulta con 1% SFB y tratados con TGF- β 1 10 ng/mL durante 72 (A) y 96 (B) h. Estímulo de doxorubicina 10 nM como control positivo. Imágenes representativas de la tinción SA- β -galactosidasa (panel derecho) y sus respectivas cuantificaciones (panel izquierdo). Flechas negras indican células senescentes. Número de experimentos N=4. Expresado como porcentaje de células positivas a SA- β -galactosidasa.

Como se mencionó anteriormente, que el propio FC secreta TGF- β 1 y que, por lo tanto, los resultados podrían estar enmascarados por el efecto autocrino de este factor, es

que se pensó en utilizar en un inhibidor del receptor de TGF- β 1 (el TGF β R) durante la etapa de cultivo para alcanzar confluencia, posteriormente eliminar el medio de cultivo con el inhibidor SB-431542 24 h antes de estimular con TGF- β 1, realizando un total de 3 lavados. Con esto lo que se busca es disminuir el efecto autocrino del propio TGF- β 1 secretado por el FC, y de esta manera marcar mayor diferencia en el efecto del TGF- β 1 exógeno respecto a los FC control.

Los resultados en la **Figura 9**, muestran el efecto que hay sobre la actividad SA- β -gal en FC cultivados en SFB al 1% en presencia del inhibidor SB-431542 (1 μ M), a los tiempos de 24 y 48 h. Los resultados muestran que en un medio de SFB al 1% al que se le adicionó el inhibidor SB-431542 desde P2 hasta alcanzar confluencia (5 días). Los resultados a los tiempos de 24 y 48 h mostraron una sustancial disminución en la actividad SA- β -gal en los FC control no superando el 3%; sin embargo, respecto a los FC tratados con TGF- β 1 se observa un pequeño aumento de la actividad SA- β -gal, aunque no fue estadísticamente significativo respecto al control. Para los FC control positivo tratados con doxorubicina se observa el doble de actividad SA- β -gal respecto al control, pero sin ser estadísticamente significativo.

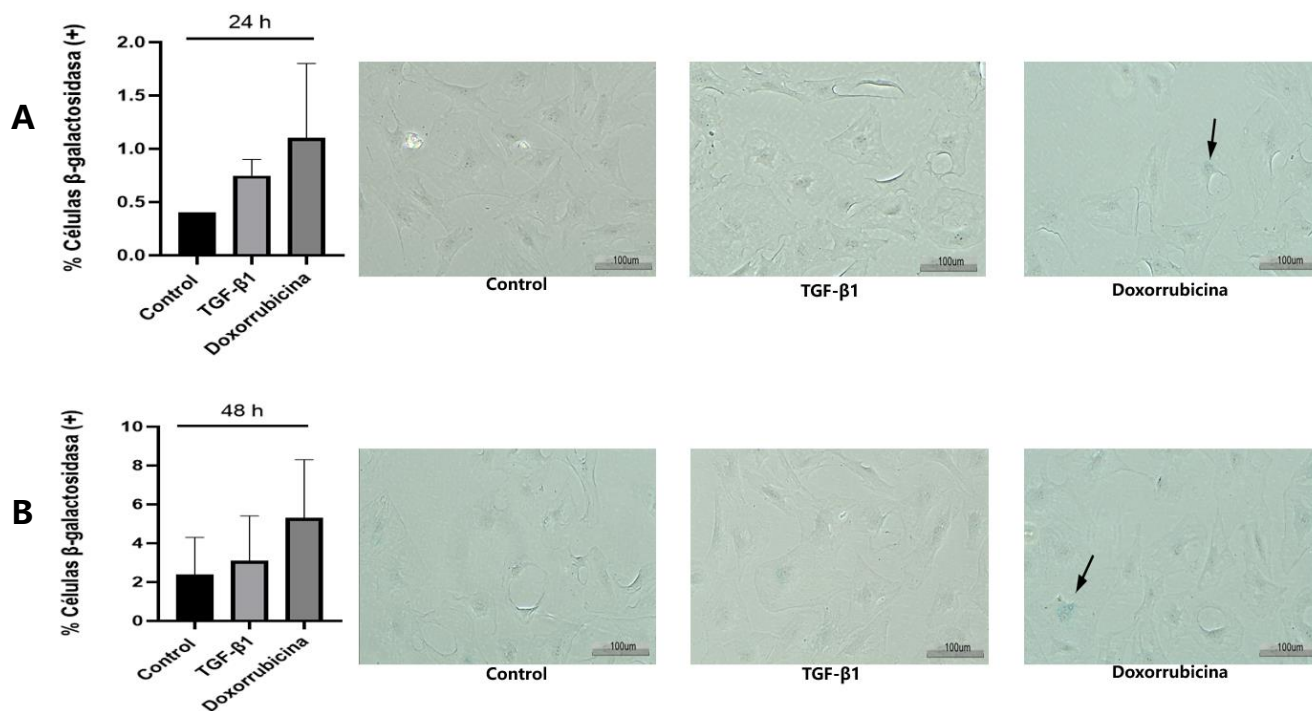


Figura 9. Efecto del TGF-β1 sobre la actividad SA-β-galactosidasa en FC de rata adulta en medio de cultivo DMEM-F12/SFB 1% tratados con inhibidor SB-431542 1μM. Fibroblastos cardiacos de rata adulta con 1% SFB y tratados con TGF-β1 10 ng/mL durante 24 (A) y 48 (B) h. Estímulo de doxorubicina 10 nM como control positivo. Imágenes representativas de la tinción SA-β-galactosidasa (panel derecho) y sus respectivas cuantificaciones (panel izquierdo). Flechas negras indican células senescentes. Número de experimentos N=3. Expresado como porcentaje de células positivas a SA-β-galactosidasa.

Los resultados de la **Figura 10** muestran la actividad SA-β-gal en los FC de rata adulta a las 72 y 96 h. A las 72 h no se observa una diferencia entre los FC tratados con TGF-β1 y los FC control. Respecto al control positivo de FC tratados con doxorubicina 10 nM los resultados mostraron un aumento aproximado del 12%. A las 96 h la actividad SA-β-gal para los FC control no superó el 10%, mientras que los FC tratados con TGF-β1 durante 96 h los resultados muestran que hubo una disminución de la actividad SA-β-gal a un 5%, siendo estadísticamente significativa con los FC control. Para los FC control positivos tratados con doxorubicina 10 nM los resultados mostraron una actividad SA-β-gal que oscila cerca del 17%.

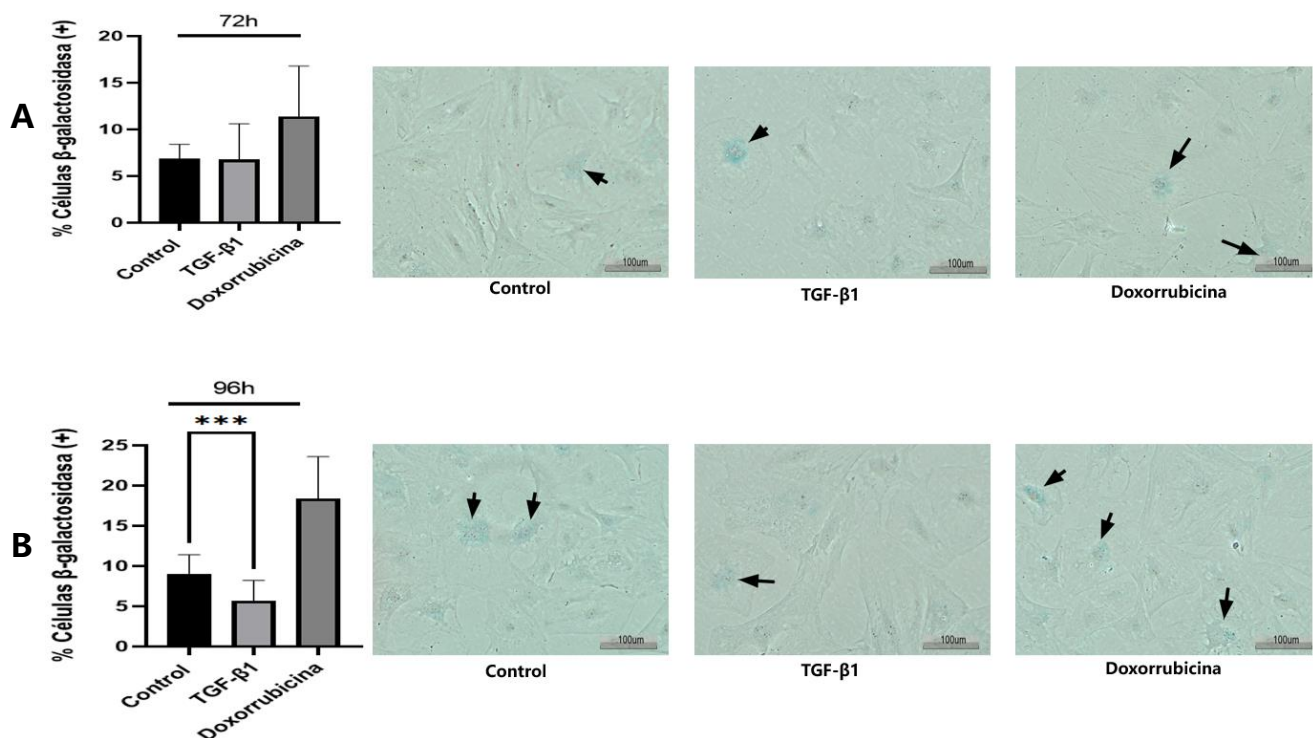


Figura 10. Efecto del TGF-β1 sobre la actividad SA-β-galactosidasa en FC de rata adulta en medio de cultivo DMEM-F12/SFB 1% tratados con inhibidor SB-431542 1μM. Fibroblastos cardiacos de rata adulta con 1% SFB y tratados con TGF-β1 10 ng/mL durante 72 (A) y 96 (B) h. Estímulo de doxorubicina 10 nM como control positivo. Imágenes representativas de la tinción SA-β-galactosidasa (panel derecho) y sus respectivas cuantificaciones (panel izquierdo). Flechas negras indican células senescentes. Número de experimentos N=3. Expresado como porcentaje de células positivas a SA-β-galactosidasa. ***p<0,001 vs control 96h.

6.2 Efecto senescente del TGF-β1 en FC de rata neonata

Dado los resultados obtenidos anteriormente, los cuales mostraron una falta de efecto que fuese significativo en el modelo celular requerido para inducir senescencia, es que se optó por cambiar la procedencia de los FC, utilizando esta vez FC aislados de rata neonata. Es sabido que los FC de rata neonata requieren menor tiempo de cultivo para alcanzar la confluencia requerida, puesto que proliferan a mayor velocidad que los FC de

rata adulta. Sumado, además, a que estos poseen una mayor capacidad de respuesta frente a estímulos exógenos. Lo anterior permitió reducir el tiempo que permanecen los FC en placa de 15 días a 6 días aproximadamente. Por lo tanto, en esta etapa se procede a realizar ensayos en FC cultivados en DMEM-F12 suplementado con 1% de SFB. Los ensayos β -gal se realizaron solo a una temporalidad de 72 y 96 h, puesto que en base a los resultados obtenidos anteriormente la mayor cantidad de efecto senescente por parte del TGF- β 1 y doxorubicina se evidenciaron en tiempos tardíos. A su vez, la concentración de los estímulos con doxorubicina se aumentó a 100 nM.

En la **Figura 11** se aprecia que tanto en tiempos tardíos de 72 y 96 h la actividad SA- β -gal para los FC control no supera el 5%. Los resultados a 96 h muestran que hay un aumento estadísticamente significativo de actividad SA- β -gal en los FC tratados con TGF- β 1 respecto al control (15% vs 4%, respectivamente). De igual forma se aprecia un aumento estadísticamente significativo de actividad SA- β -gal en los FC tratados con doxorubicina 100 nM como control positivo.

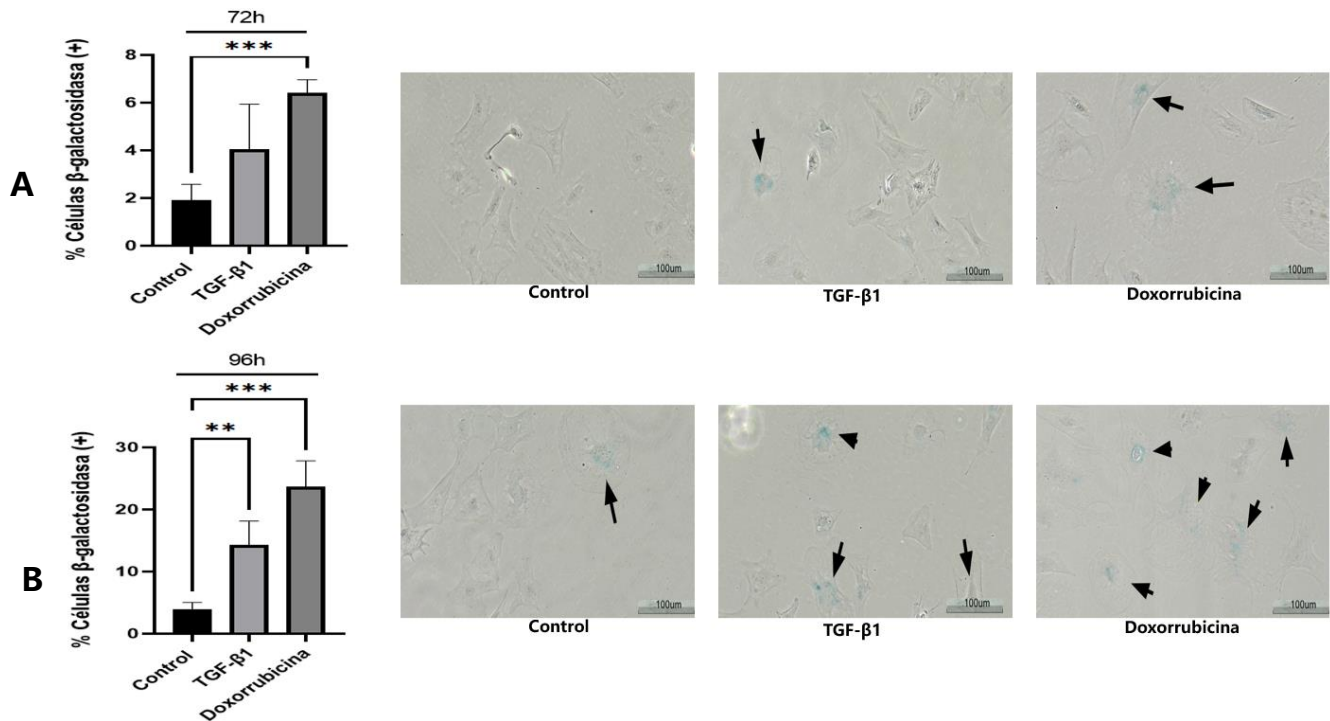


Figura 11. Efecto del TGF-β1 sobre la actividad SA-β-gal en FC de rata neonata en medio de cultivo DMDM-F12/SFB 1%. Fibroblastos cardiacos de rata adulta con 1% SFB y tratados con TGF-β1 10 ng/mL durante 72 (A) y 96 (B) h. Estímulo de doxorubicina 100 nM como control positivo. Imágenes representativas de la tinción SA-β-galactosidasa (panel derecho) y sus respectivas cuantificaciones (panel izquierdo). Flechas negras indican células senescentes. Número de experimentos N=6. Expresado como porcentaje de células positivas a SA-β-galactosidasa. ***p<0,001 vs control, **p<0,01 vs control.

6.3 TGF-β1 induce la diferenciación de FC a MFC

Una vez evidenciada la respuesta de los FC de rata neonata ante el efecto senescente del TGF-β1 y doxorubicina, se dispuso a determinar la diferenciación de FC a MFC inducida por TGF-β1. Para ello se procedió a obtener el perfil de la proteína α-SMA como marcador de diferenciación celular mediante Western Blot, tinción con cristal violeta (CV) para evidenciar cambio de morfología y finalmente se realizó una inmunocitoquímica (ICQ) para evidenciar el ensamblaje de α-SMA. Para la obtención de los niveles de α-SMA, CV e ICQ se

dispusieron FC de rata neonata ante TGF- β 1 10 ng/ mL a una temporalidad de 96 h sumado a FC sin estímulo alguno a tiempo cero como control.

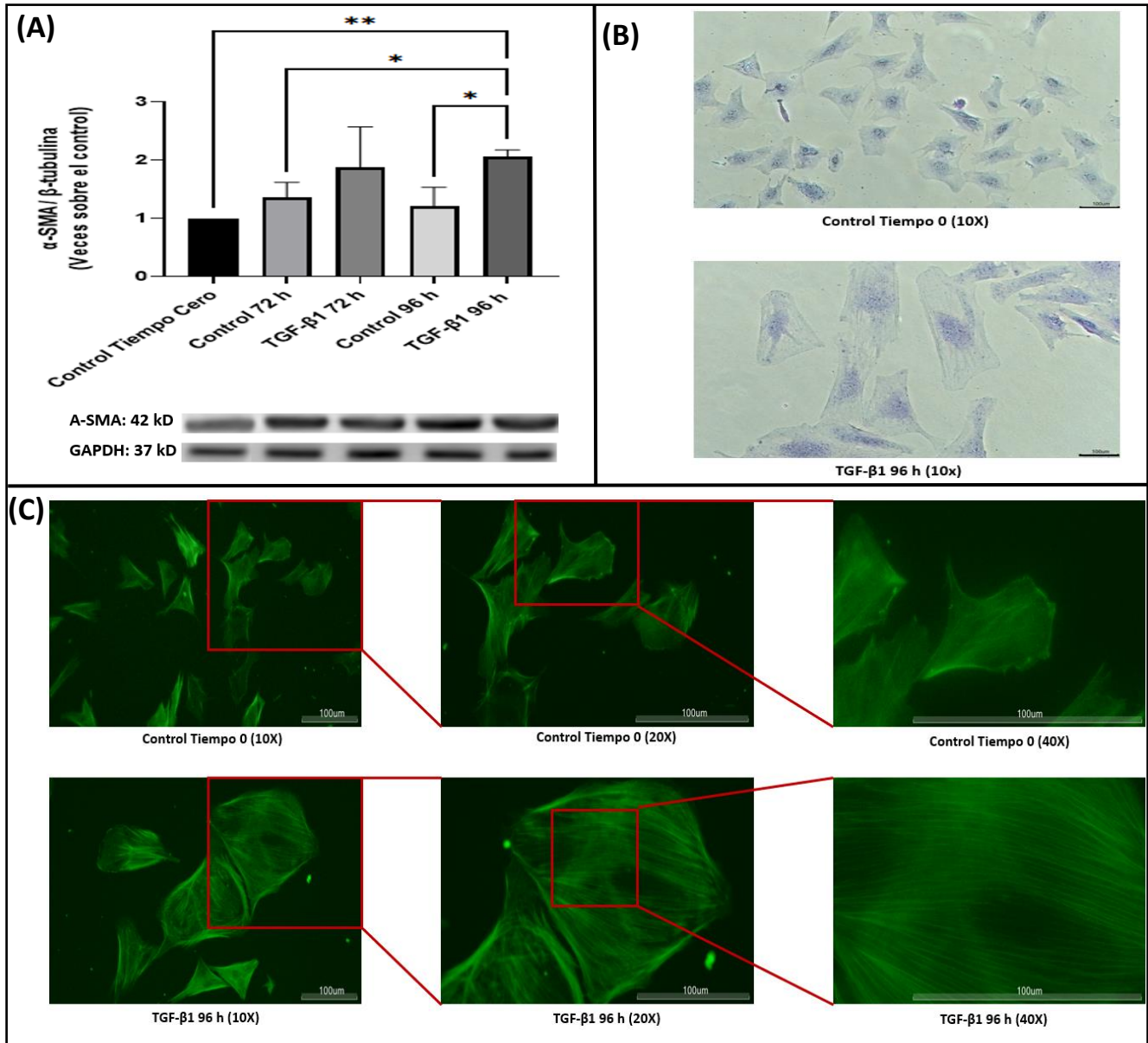


Figura 12. Efecto de TGF- β 1 sobre los niveles de α -SMA, morfología y ensamblaje de α -SMA en FC de rata neonata. (A) FC de rata neonata con 1% SFB y tratados con TGF- β 1 10 ng/mL durante 72 y 96 h usando FC sin estímulo a tiempo cero como control. Como control de carga se utilizó GAPDH. Número de experimentos N=6. Expresado como α -SMA sobre GAPDH. * p <0,05 vs control 24 h. **(B)** Imagen de CV de FC de rata neonata con 1% SFB a tiempo cero en panel superior y FC de rata neonata con 1% SFB tratados con TGF- β 1 10 ng/mL durante 96 h en panel inferior. **(C)**: Imagen de ICQ de FC de rata neonata con 1% SFB a tiempo cero. Los tres paneles superiores cuentan con aumento de 10X a 40X, de izquierda a derecha. En tres paneles inferiores, imagen de ICQ de FC de rata neonata con 1% SFB tratados con TGF- β 1 10 Ng/mL. Aumento de 10X a 40x de izquierda a derecha.

En la **Figura 12** se aprecia el perfil de α -SMA (**A**), CV en (**B**) e imágenes de ICQ en (**C**). Los resultados muestran que a medida que los FC se exponen al TGF- β 1 10 ng/ mL se aprecia una tendencia al aumento en los niveles de α -SMA, siendo a las 96 h el máximo en la expresión de la proteína con un aumento estadísticamente significativo respecto a los FC control. Respecto a la técnica de CV se observa a tiempo cero un fibroblasto de menor perímetro respecto a los FC tratados con TGF- β 1 10 ng/mL durante 96 h. En cuanto a las imágenes de ICQ los controles de tiempo cero no presentan las características fibras de estrés de los MFC que, a diferencia de los FC tratados con TGF- β 1 10 ng/mL durante 96 h, se aprecia el ensamblaje de α -SMA. Con estos resultados podemos indicar que los FC tratados por 96 h con TGF- β 1 son considerados MFC, los cuales serán denominados de esta forma de ahora en adelante.

Con estos resultados, en conjunto con los ensayos de β -gal se puede señalar que se da por finalizada la obtención del modelo celular requerido para medir el efecto senolítico y senostático del navitoclax y RvD1, respectivamente.

6.4 Efecto del Navitoclax y Resolvina D1 sobre la senescencia inducida por TGF- β 1.

Es sabido del efecto senolítico del navitoclax; sin embargo, respecto de RvD1 no hay antecedentes de si es un senolítico o senostático y no se ha explorado este efecto en MFC senescentes. Para medir el efecto de estos fármacos se utilizaron MFC obtenidos 96 h después del tratamiento con TGF- β 1, puesto que a este tiempo se evidenciaron los mayores efectos tanto en actividad SA- β -gal como en los niveles de α -SMA. Los MFC fueron tratados con RvD1 100nM y navitoclax 1 μ M durante 24 h posterior al estímulo con TGF- β 1 por 96

h. Para evidenciar el impacto que tendrán los fármacos en este modelo celular de MFC se procedió a realizar ensayo SA- β -gal; además de obtener un perfil de proteínas relacionadas a la apoptosis y senescencia.

En la **Figura 13** se muestra el efecto de RvD1 y navitoclax en los niveles de actividad SA- β -gal en MFC senescentes. Los resultados muestran que los MFC senescentes, presentan un aumento en la actividad SA- β -gal estadísticamente significativa respecto a los FC control (12,5% vs 2,5%, respectivamente). En los FC tratados con RvD1 100 nM y navitoclax 1 μ M sin previo tratamiento con TGF- β 10 ng/ mL, los resultados muestran una actividad SA- β -gal semejante al control; mientras que en los MFC senescentes se observa que luego del tratamiento con RvD1 (TGF- β 1+ RvD1) y navitoclax (TGF- β 1+navitoclax) hay una disminución estadísticamente significativa en la actividad SA- β -gal respecto a los FC sin tratamiento de TGF- β 1, obteniéndose en ambas condiciones experimentación una actividad SA- β -gal por debajo del 5%. No se observa una diferencia entre el efecto del navitoclax y RvD1 tanto en los FC tratados previamente con TGF- β 1 y en los FC sin previo tratamiento.

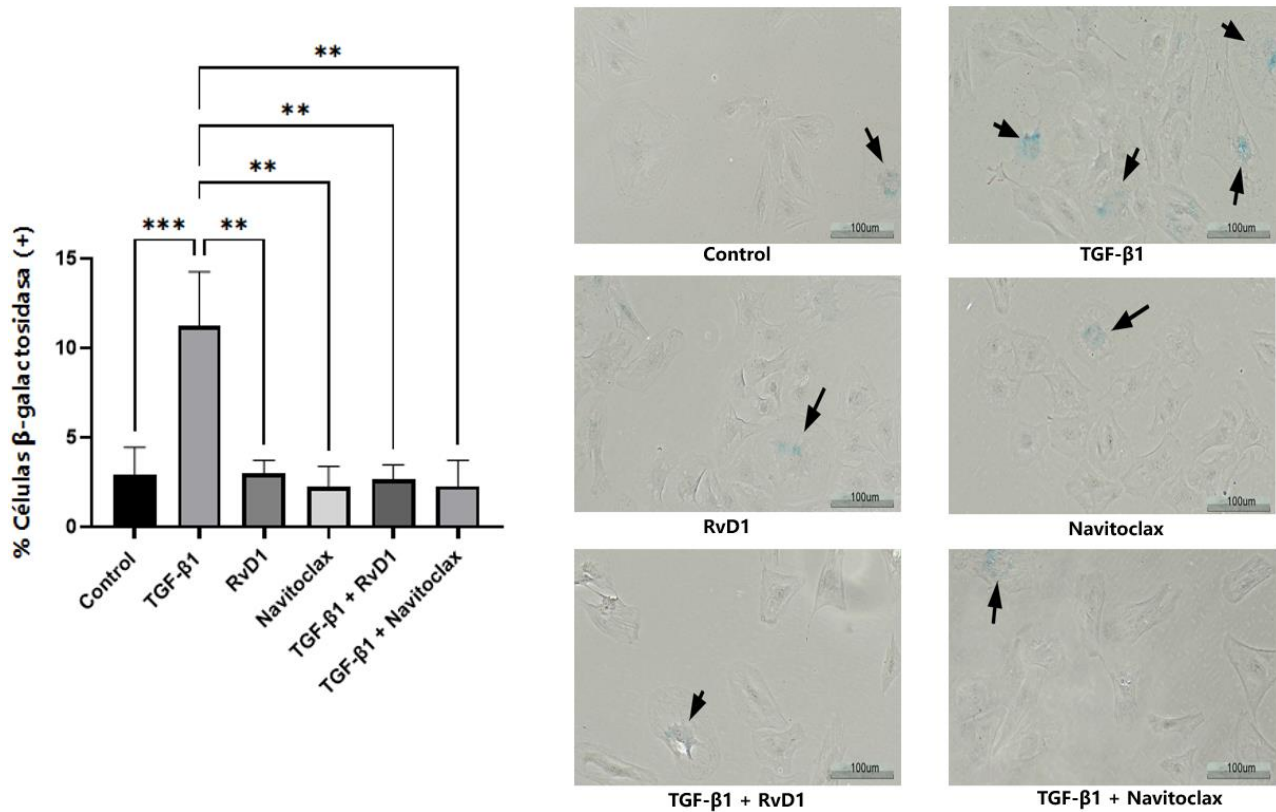


Figura 13. Efecto de Resolvina D1 y navitoclax sobre la actividad SA-β-gal en MFCs de rata neonata inducidos por TGF-β1. Fibroblastos cardiacos de rata neonata con 1% SFB en dos condiciones distintas, estas son: FC con previo tratamiento con TGF-β1 10 ng/mL durante 96 h y FC sin tratamiento alguno. Tratamiento con RvD1 100 nM y navitoclax 1 μM. Imágenes representativas de la tinción SA-β-galactosidasa (panel derecho) y sus respectivas cuantificaciones (panel izquierdo). Flechas negras indican células senescentes. Número de experimentos N=6. Expresado como porcentaje de células positivas a SA-β-galactosidasa. ***p<0,001 vs control (TGF-β1), **p<0,01 vs TGF-β1

6.5 Efecto del Navitoclax y Resolvina D1 en miofibroblastos cardiacos sobre los niveles de las proteínas p21 y pRb.

En la **Figura 14-A**. Se observan los niveles de la proteína p21. Los resultados muestran que los MFC senescentes presentan un aumento en los niveles de p21 estadísticamente significativo respecto al control. En los FC tratados con RvD1 100 nM y navitoclax 1 μM sin previo tratamiento con TGF-β1 10 ng/mL, no hay cambios en los niveles

de p21 respecto al control. Mientras que en los MFC senescentes se observa que luego del tratamiento con RvD1 (TGF- β 1+ RvD1) y navitoclax (TGF- β 1+navitoclax) hay una disminución estadísticamente significativa respecto a los MFC senescentes. No se observaron diferencias entre el efecto del navitoclax y RvD1 en esta condición.

En la **Figura 14-B**, se observan los niveles de la proteína pRb. Los resultados muestran que los MFC senescentes presentan una disminución estadísticamente significativa en los niveles de pRb respecto al control. En los FC tratados con RvD1 100 nM y navitoclax 1 μ M sin previo tratamiento con TGF- β 1 10 ng/mL, hay disminución estadísticamente significativa en los niveles de pRb respecto al control. De igual forma, en los MFC senescentes luego del tratamiento con RvD1 (TGF- β 1+ RvD1) y navitoclax (TGF- β 1+navitoclax) hay una disminución estadísticamente significativa respecto a los MFC senescentes. Adicionalmente, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los MFC senescentes tratados con navitoclax y los tratados con RvD1.

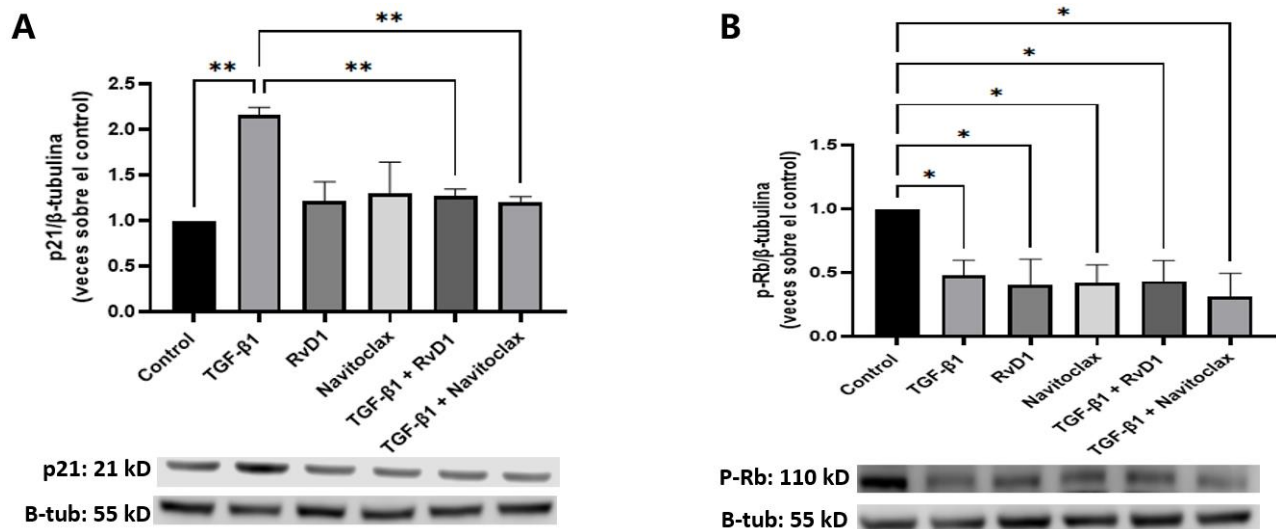


Figura 14. Efecto de Resolvina D1 y navitoclax sobre perfil de p21 y pRb en MFCs de rata neonata inducidos por TGF- β 1. Fibroblastos cardiacos de rata neonata con 1% SFB en dos condiciones distintas, estas son: FC con previo tratamiento con TGF- β 1 10 ng/mL durante 96 h y FC sin tratamiento alguno. Tratamiento con RvD1 100 nM y navitoclax 1 μ M. **A**, perfil de p21. Se utilizó como control de carga β -tubulina. Expresado como veces sobre

el control. N=3. **p<0,01 vs TGF- β 1. **B**, perfil de pRb. Se utilizo como control de carga β -tubulina. Expresado como veces sobre el control. N=3. *p<0,05 vs control.

6.6 Efecto del Navitoclax y Resolvina D1 en miofibroblastos cardiacos sobre los niveles las proteínas pro y anti apoptóticas: Bcl-XL, Bax y procaspasa 3.

Una vez determinado el efecto de los fármacos sobre los niveles de actividad SA- β -gal y perfil de proteínas de senescencia en MFC senescentes, se procedió a medir los niveles de las proteínas pro y anti apoptóticas Bax y Bcl-XL respectivamente. En la **Figura 15-A**. Se observan los niveles de la proteína pro apoptótica Bax. Los resultados muestran que los MFC senescentes presentan una disminución estadísticamente significativa respecto al control en los niveles de Bax. En los FC tratados con RvD1 100 nM y navitoclax 1 μ M sin previo tratamiento con TGF- β 1 10 ng/mL no hay cambios estadísticamente significativos en los niveles de Bax respecto al estímulo con TGF- β 1. A su vez, se observa que luego del tratamiento con RvD1 (TGF- β 1+ RvD1) hay un aumento estadísticamente significativo respecto a los MFC senescentes control. No así en los MFC senescentes tratados con navitoclax (TGF- β 1+navitoclax), en donde no hay una diferencia estadísticamente significativa respecto a los MFC senescentes sin tratamiento.

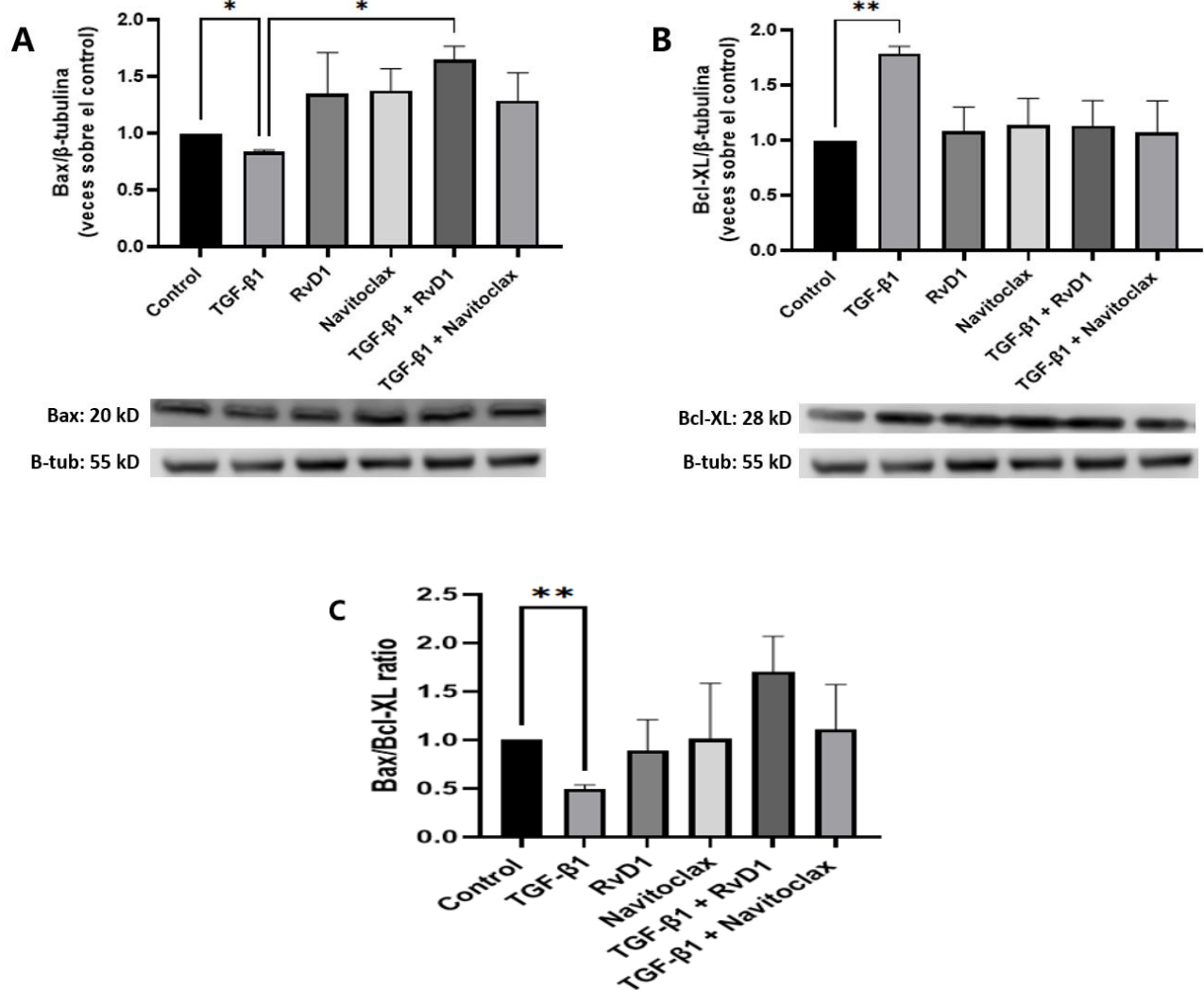


Figura 15. Efecto de Resolvin D1 y Navitoclax sobre perfil de proteínas anti y pro apoptóticas en MFCS de rata neonata inducidos por TGF- β 1. Fibroblastos cardiacos de rata neonata con 1% SFB en dos condiciones distintas, estas son: FC con previo tratamiento de TGF- β 1 10 ng/mL durante 96 h y FC sin tratamiento alguno. Tratamiento con RvD1 100 nM y navitoclax 1 μ M. **A**, perfil de Bax. Se utilizó como control de carga β -tubulina. Expresado como veces sobre el control. N=3. * p <0,05 TGF- β 1. **B**, perfil de Bcl-XL. Se utilizó como control de carga β -tubulina. Expresado como veces sobre el control. N=3. ** p <0,01 vs TGF- β 1. **C**, ratio de Bax sobre Bcl-XL. ** p <0,01 vs TGF- β 1.

En la **Figura 15-B**. Se observan los niveles de la proteína anti apoptótica Bcl-XL. Los resultados muestran que los MFC senescentes presentan un aumento en los niveles de Bcl-XL que es estadísticamente significativo respecto a los FC control. En los FC tratados con

RvD1 100 nM y navitoclax 1 μ M sin previo tratamiento con TGF- β 1 10 ng/mL hay disminución en los niveles de Bcl-XL respecto a MFC senescentes, estos sin ser estadísticamente significativos. En los MFC senescentes tratados con RvD1 (TGF- β 1+ RvD1) y navitoclax (TGF- β 1+navitoclax) hay disminución sin ser estadísticamente significativa respecto de los MFC senescentes.

En la **Figura 15-C**, se observan la razón entre los niveles de las proteínas Bax/Bcl-XL (expresado como ratio). Los resultados muestran que los MFC senescentes presentan una disminución estadísticamente significativa en la razón Bxa/Bcl-XL respecto al control. En los FC tratados con RvD1 100 nM y navitoclax 1 μ M sin previo tratamiento con TGF- β 10 ng/ mL hay aumento en los niveles de la razón Bax/Bcl-XL respecto a los MFC senescentes, este sin ser estadísticamente significativo. En los MFC senescentes tratados con RvD1 (TGF- β 1+ RvD1) y navitoclax (TGF- β 1+navitoclax) hay aumento de la razón, sin ser estadísticamente significativo con respecto a los MFC senescentes control.

En la **Figura 16**. Se observan los niveles de la proteína procaspasa 3. Los resultados muestran que los MFC senescentes presentan un aumento estadísticamente significativo de procaspasa 3 respecto a los FC control. En los FC tratados con RvD1 100 nM y navitoclax 1 μ M sin previo tratamiento con TGF- β 1 10 ng/mL hay aumento sin ser estadísticamente significativo en los niveles de procaspasa 3 respecto a los MFC senescentes. En los MFC senescentes tratados con RvD1 (TGF- β 1+ RvD1) y navitoclax (TGF- β 1+navitoclax) hay disminución estadísticamente significativa respecto a los MFC senescentes no tratados.

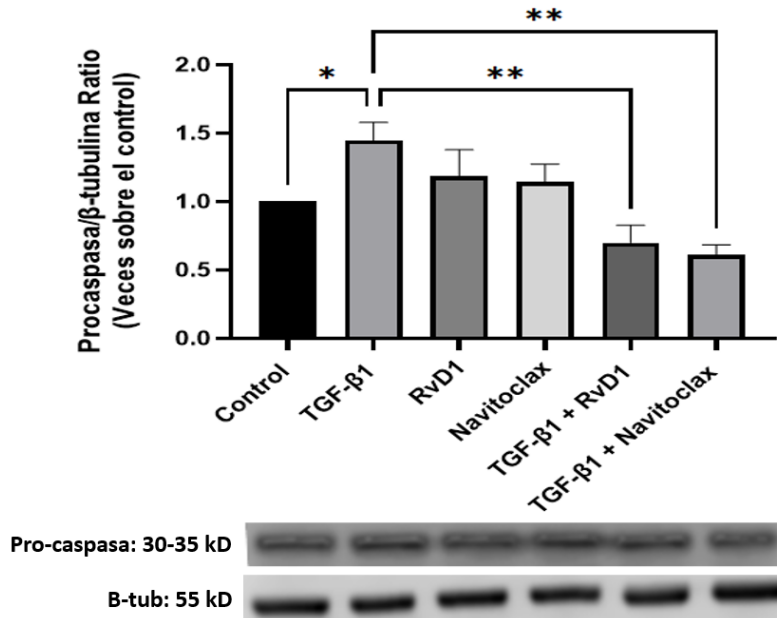


Figura 16. Efecto de RvD1 y navitoclax sobre perfil de la proteína procaspasa 3 en MFC senescentes de rata neonata inducidos por TGF-β1. Fibroblastos cardiacos de rata neonata con 1% SFB en dos condiciones distintas, estas son: FC con previo tratamiento con TGF-β1 10 ng/mL durante 96 h y FC sin tratamiento alguno. Tratamiento con RvD1 100 nM y navitoclax 1μM. Se utilizó como control de carga β-tubulina. Expresado como veces sobre el control. N=3. *p<0,05 vs control (TGF-β1), **p<0,01 vs TGF-β1.

6.7 Efecto del Navitoclax y Resolvina D1 en miofibroblastos cardiacos sobre los niveles de α-SMA.

En la **Figura 17**. Se observan los niveles de la proteína α-SMA. Los resultados muestran que los MFC senescentes presentan un aumento estadísticamente significativo de α-SMA respecto al control. Mientras que en los MFC senescentes tratados con RvD1 100nM/mL (TGF-β1+RvD1) y navitoclax 1μM/ mL (TGF-β1+navitoclax) hay una leve disminución de α-SMA respecto a los MFC no tratados que no alcanza a ser significativa.

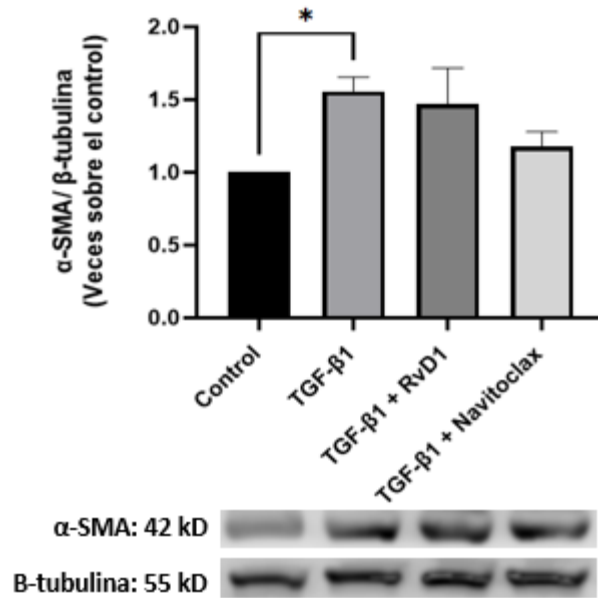


Figura 17. Efecto de Resolvin D1 y Navitoclax sobre perfil de α -MSA en MFCS de rata neonata inducidos por TGF- β 1. Fibroblastos cardiacos de rata neonata con 1% SFB en previo tratamiento con TGF- β 1 durante 96 h más condición control sin estímulo alguno. Tratamiento con RvD1 100 nM y navitoclax 1 μ M. Perfil de α -SMA. Se utilizó como control de carga β -tubulina. Expresado como veces sobre el control. N=3. *p<0,05 vs control.

7.- Discusión

Los principales resultados del presente trabajo mostraron que las células senescentes disminuyeron al tratar los MFC senescentes con RvD1 y Navitoclax por un mecanismo asociado a apoptosis. A su vez, TGF- β 1 indujo la diferenciación de FC a MFC, y de manera paralela indujo senescencia de los MFC. Esta senescencia se caracterizó por un aumento de la actividad SA- β -gal, p21 y en la disminución de pRb

7.1 Senescencia inducida por TGF- β 1

Cuando las células se ven privadas de los factores de crecimiento presentes en el suero, dejan de proliferar entrando en un estado reversible conocido como quiescencia. Por el contrario, las células experimentan senescencia cuando a pesar de verse expuestas a estimulación con factores de crecimiento (factores mitogénicos), no hay proliferación, debido a un arresto permanente del ciclo celular [39]. Respecto a los MFC, son pocos los estudios que han evaluado la senescencia en este tipo celular. Meyer *et al.*, (2016), describieron la senescencia en tejido de miocardio fibrótico inducida por sobrecarga de presión aórtica en murinos [18]. De igual forma, Wen-Qun Li *et al.*, (2019) estudiaron la senescencia en tejido cardiaco ventricular inducida por hipoxia en ratas, en donde se evaluó el efecto cardioprotector del neuropéptido CGPR [40]. Sin embargo, los modelos de experimentación utilizados son diferentes al del presente trabajo y en ellos se identificó la presencia de MFC senescentes, aunque no el mecanismo de inducción de la senescencia de los MFC.

El TGF- β 1 es un reconocido factor de crecimiento que induce la diferenciación de FC a MFC, proceso que se logra al cabo de las 96 h [36, 37, 38], Nuestros resultados en FC de rata adulta cultivados en DMEM-F12 mostraron que TGF- β 1 indujo senescencia en el FC, el cual fue enmascarado por la elevada actividad SA- β -gal encontrada en los FC en condiciones control. A este respecto, se ha descrito en la literatura que el tiempo de cultivo y el grado de confluencia en los cultivos origina aumento en la actividad SA- β -gal, dando lugar a falsos positivos [41]. Es bien conocido que los FC cultivados por largo tiempo en medio de cultivo pobre de glucosa, aminoácidos y factores de crecimiento presentan autofagia, la cual se define como un mecanismo de auto degradación de proteínas y organelos ante el estrés nutricional [42]. A su vez se ha descrito que la autofagia es un inductor de senescencia [43]. Esto último se vio reflejado en los altos niveles de SA- β -gal obtenidos en FC de rata adulta en medio de cultivo DMEM-F12, los cuales oscilaban en un 17% de actividad SA- β -gal en los FC control, lo cual no permite ver el efecto del TGF- β 1 exógeno. Estos resultados en su conjunto indicarían que para estudiar senescencia se debe trabajar en bajo grado de confluencia, por cortos periodos de cultivo y por sobre todo en presencia de suero para reducir la autofagia. Es por esta razón que se trabajó posteriormente sobre FC de rata adulta en medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con 1% de SFB. Si bien es cierto, a esta concentración de SFB no se inhibe la autofagia, la presencia de una mayor concentración de suero estimularía la proliferación, la que va en contra del efecto que se quiere observar, esto es detención total del ciclo celular. Los resultados obtenidos se condicen por lo descrito en el trabajo de Aránguiz., *et al* (2011), realizado con anterioridad en el laboratorio, en el cual se demostró que en los FC cultivados en DMEM-F12 con una concentración de SFB menor al 5% se induce la autofagia evidenciada por la fragmentación de la proteína LCIII y LCII [44]. En los ensayos realizados

en FC suplementados con 1% SFB los resultados mostraron nuevamente un alto nivel de actividad SA- β -gal en los FC control. Esto impide evidenciar el efecto que tiene el TGF- β 1 exógeno en los FC, por lo tanto, se piensa que el estrés basal enmascara los estímulos exógenos utilizados en los FC. La literatura indica la secreción autocrina de TGF- β 1 como responsable de este estrés basal dado por los largos periodos de cultivo. Datos publicados de Bolivar *et al.*, (2021), demostraron que los FC secretan basalmente TGF- β 1 [45], por lo tanto, existe la posibilidad de que el TGF- β 1 secretado por el mismo FC y actuando de manera autocrina, sería el responsable de la alta actividad SA- β -gal observada en los controles. A este respecto, Gilles *et al.*, (2020), demostraron que con el solo hecho de que los FC estén sobre una superficie rígida hay un aumento de ensamblaje de α -SMA y secreción de colágenos dado el estrés mecánico producto de la permanencia en placa, en donde el punto máximo de estrés se evidenció a los 9 días en placa [46]. En consideración a este antecedente, en nuestras condiciones de trabajo existe un prolongado tiempo en el que los FC deben permanecer en placa desde que son aislados del corazón, para que alcancen confluencia necesaria y hasta la recolección proteica suman un total aproximado de 15 días. En base a lo expuesto por los autores antes mencionados es que se decidió utilizar el inhibidor SB-431542 (SB). Una vez realizados los ensayos los resultados mostraron que a las 72 y 96 h hubo una actividad SA- β -gal en los FC control menor a la encontrada en los FC control cultivados solo en DMEM-F12 y DMEM-F12/SFB 1%. No obstante, el efecto del TGF- β 1 exógeno disminuyó de forma estadísticamente significativa respecto al control. Más aún, cabe destacar que los FC cultivados en presencia del inhibidor del receptor de TGF tuvieron un menor tamaño celular, lo que indica que el bloqueo del TGF β RI, el cual tiene actividad quinasa en el medio intracelular lleva a una menor autodiferenciación de FC a MFC. Por lo tanto, a pesar de los lavados realizados al cultivo celular, éste no fue suficiente

para desplazar el inhibidor remanente en el citosol. Proponemos que el largo tiempo de cultivo en presencia del inhibidor disminuyó el efecto del TGF- β 1 más de lo esperado. En consecuencia, se desechó este protocolo de trabajo.

A pesar de lograr mejores resultados, como se mencionó anteriormente, el tiempo de permanencia de los FC en placa desde que los FC se aíslan hasta finalizar los tiempos de estímulo son aproximadamente 15 días. Una de las formas para reducir este tiempo de plaqueo es que se pensó en trabajar con FC aislados de rata neonata. Es sabido que los FC de rata poseen una mayor tasa de proliferación, y además cuentan con una mayor capacidad de respuesta frente a estímulos exógenos. Díaz et al., (2003), demostraron que los FC aislados de rata neonata tuvieron una mayor respuesta al polipéptido IGF-1 que FC aislados de rata adulta [47]. Al utilizar FC aislados de rata neonata se busca disminuir los tiempos de permanencia de los FC en placa y como consecuencia reducir el estrés mecánico y el efecto autocrino del TGF- β 1.

Bajo esta nueva condición de trabajo, es decir, FC de rata neonata en presencia de 1% de SFB se demostró que TGF- β 1 induce senescencia, medida por medio de actividad SA- β -gal. En esta condición de trabajo el control muestra 5% de actividad SA- β -gal y un 15% en FC tratados con TGF- β 1 10 ng/mL. Cabe mencionar que el tiempo total de plaqueo bajo de 15 días a 6 días. Este modelo celular es óptimo para poder evidenciar el impacto que tendrán los fármacos senoterapéuticos sobre MFC.

7.2 TGF- β 1 induce diferenciación de FC a MFC de ratas neonatas

En nuestro laboratorio se ha ampliamente descrito que TGF- β 1 induce la diferenciación de FC a MFC [38]. Nuestros resultados mostraron que, en FC de rata neonata,

el TGF- β 1 a partir de las 72 h indujo un aumento estadísticamente significativo en la expresión de α -SMA, así como también en su ensamblaje en las fibras de estrés. En los resultados con CV se observa una célula de mayor tamaño (consistente con el proceso de diferenciación), y de manera similar a lo observado por inmunocitoquímica de α -SMA, donde también se observa una célula de mayor tamaño, con mayor expresión de α -SMA, la que se encuentra ensamblada en las características fibras de estrés propias de los MFC.

La utilización de cultivos primarios de fibroblastos de ratas neonatas tiene ventajas experimentales por sobre la fibroblastos de rata adulta, tanto desde el punto de vista de la extracción (los de origen neonato son aislados por las enzimas de digestión con mayor facilidad debido a que estas células están rodeadas por una MEC que presenta menos rigidez, comparada con las de origen adulto), cómo en la velocidad de proliferación (los FC neonatos posee una mayor tasa de proliferación que los FC adultos). Además, se ha establecido en la bibliografía, que dependiendo del origen etario de las células (edad del animal del cual provienen), éstas presentan cambios en su funcionamiento [47]. Los FC neonatos secretan mayor cantidad de colágeno y expresan en forma diferencial distintas integrinas que los FC adultos. Además, se ha observado que los FC adultos tendrían potenciados sus efectos en la adhesión celular bajo distintos estímulos comparados con los neonatos. Asimismo, se ha descrito que los FC neonatos tienen mayor expresión de α -SMA y de integrinas, además de presentar mayor capacidad contráctil, comparado con FC adultos [47]. Finalmente, para los fines de esta tesis, los resultados mostraron que la mayor actividad SA- β -gal se logró en FC neonatos. Trabajos previos del laboratorio han demostrado que la mejor diferenciación de FC a MFC se logra con FC de ratas neonatas, puesto que debido al menor tiempo de proliferación y de cultivo, se puede trabajar en menores pasajes celulares respecto de los FC de ratas adultas. Por otro lado, se ve disminuida la diferenciación

espontánea de FC a MFC debido a que, aunque estas células secretan TGF- β 1, el menor tiempo de cultivo en placa reduce la autodiferenciación; mientras que en FC de ratas adultas la autodiferenciación a MFC de rata adulta, se ve favorecida por largos períodos de tiempo de incubación, como se ha demostrado en los FC de ratas adultas [48]. Aun así, los FC de ratas adultas se utilizan ampliamente, representando un modelo más fidedigno desde el punto de vista de la edad del animal del cual provienen, ya que en la adultez es donde se presentan principalmente las diversas patologías cardiovasculares.

7.3 RvD1 y Navitoclax inducen apoptosis de MFC senescentes

Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con TGF- β 1 aumentó los niveles de expresión de la proteína p21, junto a una hipofosforilación de pRb. Estos resultados en su conjunto nos indican que TGF- β 1 induce senescencia de los MFC. A nivel celular, varios autores han descrito los mecanismos y vías transcripcionales de diferentes estresores que pueden promover la inducción prematura de la senescencia celular. Dado que la senescencia se ha relacionado fuertemente con la fibrosis, la relación entre senescencia inducida por TGF- β 1 y el hecho de que TGF- β 1 aumente la secreción de colágeno refuerza más aún la relación directa entre senescencia y fibrosis cardiaca. En relación a ello, se ha demostrado que TGF- β 1 induce senescencia de otros tipos de fibroblastos [35,49]. Se ha demostrado que en el FC el TGF- β 1 induce la senescencia a través de la vía p53/p21 junto con una disminución en los niveles de proteína klotho [50]. Además, los MFC senescentes secretan niveles más altos de componentes SASP como IL-6, IL-1 β y FGF2 [51]. Por otro lado, Petrov *et al.*, (2008) demostraron que el TGF- β 1 promueve en MFC la detención del ciclo celular, que es la principal característica de las células senescentes [9].

Aunque el TGF- β 1 induce la senescencia, se ha informado que las células senescentes tienen una respuesta atenuada a esta citocina. A este respecto, los FC senescentes inducidos por palmitato tuvieron una respuesta reducida al tratamiento con TGF- β 1, evidenciada por niveles más bajos de ARNm de colágeno I y III, MMP-2 y α -SMA, y una menor contracción del gel de colágeno, lo que indica que su diferenciación fue inhibida por la senescencia [52]. Por otro lado, en un modelo de senescencia replicativa de FC (fibroblastos auriculares humanos cultivados hasta el paso 11 (P11)), Gao et al., (2022), mostraron una mayor expresión de marcadores senescentes como p53, p21 y tinción de SA- β -gal en paralelo con un aumento en marcadores fibróticos, estos fueron: colágeno I y III, MMP-2 y MMP-9 [53]. En este modelo, los niveles de TGF- β 1 se mantienen en el tiempo, lo que confirma que la fibrosis se debe principalmente a un desequilibrio entre las vías de síntesis y de degradación de la MEC [54]. Lo relevante de estos resultados es que la senescencia tiene una correlación positiva con la fibrosis. Estos antecedentes nos permiten plantear la hipótesis de que la senescencia inducida por TGF- β 1, así como la disminución de la respuesta a ella en las células senescentes, podría ser un mecanismo de autorregulación para prevenir una señalización pro-fibrótica excesiva en un escenario de daño agudo. Sin embargo, la acumulación de células senescentes y su fenotipo secretor podrían promover la inflamación y la remodelación de tejidos a largo plazo.

En relación con los efectos de RvD1 y de navitoclax, nuestros resultados mostraron que RvD1 y navitoclax disminuyen la senescencia de los MFC senescentes, evidenciada por una disminución de la actividad SA- β -gal y disminución de los niveles de p21 y una disminución en los niveles de la proteína pRb. En relación a las resolvinas, en la literatura se ha demostrado que RvE1 previene la senescencia inducida por doxorubicina y por IL-1 β [55]. Aunque en estos ensayos no se utilizó RvE1 frente a FC senescentes, si no que se

estimuló con RvE1 antes de inducir la senescencia, por lo tanto, no podemos hablar de disminución de la senescencia, sino más bien de prevención de la senescencia y en este caso se habla de FC y no de MFC. También se ha demostrado que RvD1 disminuye la senescencia de fibroblastos de piel inducida por H₂O₂ [56].

Con respecto a navitoclax, en la literatura se ha descrito que navitoclax disminuye el número de FC senescentes con actividad SA-β-gal positivas inducidas por Ang II [57]. También se ha descrito en un modelo de resección cardiaca en corazones de ratas neonatas que navitoclax disminuye el número de FC senescentes a induce la proliferación de FC no-senescentes, favoreciendo la reparación tisular [58]. Sin embargo, hasta la fecha no hay estudios acerca de navitoclax o RvD1 en MFC, por lo que ha nuestro conocimiento este es el primer trabajo en el que se demuestra la disminución del número de células senescentes como efecto de RvD1 y Navitoclax sobre MFC.

Con respecto al mecanismo de acción por el cual Navitoclax y RvD1 muestran sus efectos en MFC, los resultados mostraron que TGF-β1 aumentó las proteínas antiapoptóticas Bcl-xL y disminuyó la expresión de Bax. La razón Bax/Bcl-xL muestra con mayor énfasis el efecto antiapoptótico de TGF-β1 al inducir senescencia de los MFC, lo que quedó evidenciado por los altos niveles de la proteína procaspasa 3, indicando con ello que los MFC senescentes son resistentes a la apoptosis. No obstante, tanto RvD1 como Navitoclax revirtieron los efectos de TGF-β1, reduciendo los niveles de Bcl-XL, aumentando los niveles de Bax y reduciendo los cambios observados en la razón Bax/Bcl-xL. Estos resultados en su conjunto destacan el efecto proapoptótico de navitoclax, un hecho ya ampliamente descrito en la literatura [57,59]. Sin embargo, la verificación de la apoptosis debe ser corroborada a través de otro método, por ejemplo: citometría de flujo evaluando

la incorporación de yoduro de propidio y la localización de anexina v. Finalmente cabe destacar que esta es la primera vez que se describe un efecto proapoptótico para la RvD1.

En relación a los efectos del navitoclax y RvD1 sobre el perfil de α -SMA, los resultados mostraron que hubo aumento de α -SMA en los MFC senescentes en comparación al control, validando el efecto profibrótico del TGF- β 1. En la literatura se ha visto que el navitoclax induce una selectiva apoptosis en fibroblastos asociados a cáncer [60]. Este resultado se condice con los resultados hallados en el presente trabajo. Cabe mencionar que en el trabajo mencionado se utilizaron fibroblastos hepáticos humanos en distintas condiciones de experimentación.

En relación con efecto de la RvD1 y navitoclax sobre la expresión de α -SMA en MFC, a nuestro conocimiento no hay antecedentes previos publicados a este respecto. Estos resultados sugerirían que la RvD1 y navitoclax no tienen efecto en la expresión de esta proteína. Sin embargo, debido al efecto apoptótico nosotros debíamos esperar una disminución de los niveles de expresión debido a la apoptosis selectiva de los MFC. Sin embargo, es bien conocido que la senescencia no es irreversible, es decir, cuando una célula llega a ser senescente no puede volver a ser no senescente. En este sentido, creemos que la gran mayoría de los MFC tienen una detención permanente del ciclo celular y en consecuencia son senescentes, aunque a esta temporalidad sólo un bajo número de ellas tiene actividad SA- β -gal positiva. Un análisis más profundo de este estudio debería realizarse para clarificar este punto. Por otro lado, Zeng *et al.*, (2022) demostraron que la RvD1, en un modelo de fibrosis intestinal inducida con lauril-sulfato de sodio, disminuyó deposición de MEC y α -SMA, indicando con ello un efecto antifibrótico [61].

8.- Conclusiones

- Navitoclax y RvD1, disminuyeron el número de MFC senescentes por un mecanismo asociado a apoptosis, evidenciado por aumento de los niveles de Bax y disminución de los niveles de Bcl-XL y disminución de procaspasa 3
- TGF- β 1 indujo senescencia de los MFC evidenciado por aumento en la actividad de SA- β -gal, aumento en la expresión de p21 y disminución de la pRb hipofosforilada
- TGF- β 1 indujo la diferenciación de FC a MFC caracterizado por un aumento en el tamaño celular, la expresión de α -SMA y el ensamblaje en las fibras de estrés.

9.- Limitaciones

- Haber realizado más ensayos (repeticiones), para tener resultados más consistentes (en aquellos casos en que los resultados estuvieron en el límite de lo significativo)
- Haber complementado los resultados obtenidos con otros tipos de ensayos, p.ej. SASP, colocalización de α -SMA con proteínas senescentes (p21, p53).
- Analizar el efecto de RvD1 y navitoclax sobre la secreción de proteínas de la MEC.
Haber evaluado apoptosis con citometría de flujo evaluando la incorporación de yoduro de propidio y la localización de anexina V.

10.- Bibliografía

[1] Envejecimiento y salud, Organización Mundial de la Salud <En Línea> <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>> (Fecha Consulta: 07 Octubre, 2022)

[2] Kushkestani, M., Parvani, M., Ghafari, M., & Avazpoor, Z. (2022). The role of exercise and physical activity on aging-related diseases and geriatric syndromes. *SPORT TK-Revista EuroAmericana de Ciencias del Deporte*, 11, 6-6.

[3] Enfermedades Cardiovasculares, Organización Mundial de la Salud <En Línea> <https://www.who.int/es/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1> (Fecha Consulta: 07 Octubre, 2022)

[4] Martínez-Sanguinetti, María Adela, Leiva-Ordoñez, Ana María, Petermann-Rocha, Fanny, & Celis-Morales, Carlos. (2021). ¿Cómo ha cambiado el perfil epidemiológico en Chile en los últimos 10 años?. *Revista médica de Chile*, 149(1), 149-152. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872021000100149>

[5] Dostal D, Glaser S, Baudino TA. Cardiac fibroblast physiology and pathology. *Compr Physiol*. 2015 Apr;5(2):887-909. doi: 10.1002/cphy.c140053. PMID: 25880517.

[6] Ivey MJ, Tallquist MD. Defining the Cardiac Fibroblast. *Circ J*. 2016 Oct 25;80(11):2269-2276. doi: 10.1253/circj.CJ-16-1003. Epub 2016 Oct 14. PMID: 27746422; PMCID: PMC5588900.

- [7] Díaz-Araya G, Vivar R, Humeres C, Boza P, Bolivar S, Muñoz C. Cardiac fibroblasts as sentinel cells in cardiac tissue: Receptors, signaling pathways and cellular functions. *Pharmacol Res.* 2015 Nov;101:30-40. doi: 10.1016/j.phrs.2015.07.001. Epub 2015 Jul 4. PMID: 26151416.
- [8] Tarbit E, Singh I, Peart JN, Rose-Meyer RB. Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells. *Heart Failure Reviews.* 2019 Jan;24(1):1-15. DOI: 10.1007/s10741-018-9720-1. PMID: 29987445.
- [9] V.V. Petrov, J.F. van Pelt, J.R. Vermeesch, V.J. Van Duppen, K. Vekemans, R.H. Fagard, P.J. Lijnen, TGF-beta1-induced cardiac myofibroblasts are nonproliferating functional cells carrying DNA damages, *Exp Cell Res.* 314 (7) (2008) 1480-1494. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.01.014>
- [10] Meng, X., Nikolic-Paterson, D., & Lan, H. (2016). TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*, 12(6), 325-338. doi: 10.1038/nrneph.2016.48
- [11] Muthusamy, B., Budi, E., Katsuno, Y., Lee, M., Smith, S., & Mirza, A. et al. (2015). ShcA Protects against Epithelial–Mesenchymal Transition through Compartmentalized Inhibition of TGF- β -Induced Smad Activation. *PLOS Biology*, 13(12), e1002325. doi: 10.1371/journal.pbio.1002325
- [12] Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells.* *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007. 8(9): p. 729-740.
- [13] van Deursen, J.M., *The role of senescent cells in ageing.* *Nature*, 2014. 509(7501): p. 439-446.

- [14] Hernandez-Segura, A., J. Nehme, and M. Demaria, *Hallmarks of Cellular Senescence*. Trends in Cell Biology, 2018. 28(6): p. 436-453.
- [15] González-Gualda, E., et al., *A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo*. The FEBS Journal, 2021. 288(1): p. 56-80.
- [16] Debacq-Chainiaux, F., et al., *Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo*. Nature Protocols, 2009. 4(12): p. 1798-1806.
- [17] Coppé, J.-P., et al., *The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression*. Annual review of pathology, 2010. 5: p. 99-118.
- [18] Meyer, K., Hodwin, B., Ramanujam, D., Engelhardt, S., & Sarikas, A. (2016). Essential role for premature senescence of myofibroblasts in myocardial fibrosis. *Journal of the American college of cardiology*, 67(17), 2018-2028.
- [19] 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>
- [20] Zhang L, Pitcher LE, Prahalad V, Niedernhofer LJ, Robbins PD. Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics. FEBS J. 2022 Jan 11. doi: 10.1111/febs.16350. Epub ahead of print. PMID: 35015337.
- [21] A. Walaszczyk, E. Dookun, R. Redgrave, S. Tual-Chalot, S. Victorelli, I. Spyridopoulos, A. Owens, H.M. Arthur, J.F. Passos, G.D. Richardson, Pharmacological clearance of senescent cells improves survival and recovery in aged mice following acute myocardial infarction, *Aging Cell* 18(3) (2019) e12945. <https://doi.org/10.1111/acel.12945>.

- [22] Y. Zhu, T. Tchkonina, H. Fuhrmann-Stroissnigg, H.M. Dai, Y.Y. Ling, M.B. Stout, T. Pirtskhalava, N. Giorgadze, K.O. Johnson, C.B. Giles, J.D. Wren, L.J. Niedernhofer, P.D. Robbins, J.L. Kirkland, Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of antiapoptotic factors, *Aging Cell*. 15(3) (2016) 428-435. <https://doi.org/10.1111/accel.12445>.
- [23] E.P. Daskalopoulos, C. Dufeys, L. Bertrand, C. Beauloye, S. Horman, AMPK in cardiac fibrosis and repair: Actions beyond metabolic regulation, *J Mol Cell Cardiol*. 91 (2016) 188-200. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.01.001>.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Serhan, C. (2009). Systems approach to inflammation resolution: identification of novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *Journal Of Thrombosis And Haemostasis*, 7, 44-48.

[28] Chiang N, Serhan C. (2017) Structural elucidation and physiologic functions of specialized pro-resolving mediators and their receptors. *Molecular Aspects of Medicine*. 1-16

[29] 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

[30] 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.

[31] 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.

[32] 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.

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

[34] 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.

[35] Dewidar B, Meyer C, Dooley S, Meindl-Beinker AN. TGF- β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis-Updated 2019. *Cells.* 2019 Nov 11;8(11):1419. doi: 10.3390/cells8111419. PMID: 31718044; PMCID: PMC6912224.

[36] Vivar R, Humeres C, Ayala P, Olmedo I, Catalán M, García L, Lavandero S, Díaz-Araya G. TGF- β 1 prevents simulated ischemia/reperfusion-induced cardiac fibroblast apoptosis by activation of both canonical and non-canonical signaling pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jun;1832(6):754-62. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.02.004. Epub 2013 Feb 15. PMID: 23416528.

[37] Castro Carrasco, E. (2019).Resolvina-D1 a través del receptor ALX/FPR2 aumenta la síntesis de colágeno en miofibroblastos cardiacos de rata adulta. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/173886>

[38] Olmedo, I., Muñoz, C., Guzmán, N., Catalán, M., Vivar, R., Ayala, P., Humeres Martínez, C., Aránguiz, P., García Nannig, L., Velarde, V. y Díaz Araya, G. (2013).EPAC expression and function in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/121723>

[39] Blagosklonny MV. Cell senescence and hypermitogenic arrest. *EMBO Rep.* 2003 Apr;4(4):358-62. doi: 10.1038/sj.embor.embor806. PMID: 12671679; PMCID: PMC1319162.

[40] Li WQ, Tan SL, Li XH, Sun TL, Li D, Du J, Wei SS, Li YJ, Zhang BK. Calcitonin gene-related peptide inhibits the cardiac fibroblasts senescence in cardiac fibrosis via up-regulating klotho expression. *Eur J Pharmacol.* 2019 Jan 15;843:96-103. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.10.023. Epub 2018 Oct 21. PMID: 30352200.

[41] Yang NC, Hu ML. The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Exp Gerontol.* 2005 Oct;40(10):813-9. doi: 10.1016/j.exger.2005.07.011. Epub 2005 Sep 8. PMID: 16154306

[42] Ramírez-Sagredo, Andrea, Aleman, Larissa, Villa, Mónica, Chávez, Myra N, García, Lorena, & Lavandero, Sergio. (2016). Autofagia en el sistema cardiovascular: pasado, presente y futuro. *Revista chilena de cardiología, 35(3), 228-241.* <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-85602016000300004>

[43] Rajendran P, Alzahrani AM, Hanieh HN, Kumar SA, Ben Ammar R, Rengarajan T, Alhoot MA. Autophagy and senescence: A new insight in selected human diseases. *J Cell Physiol.* 2019 Dec;234(12):21485-21492. doi: 10.1002/jcp.28895. Epub 2019 May 29. PMID: 31144309.

[44] Aránguiz-Urroz P, Canales J, Copaja M, Troncoso R, Vicencio JM, Carrillo C, Lara H, Lavandero S, Díaz-Araya G. Beta(2)-adrenergic receptor regulates cardiac fibroblast autophagy and collagen degradation. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Jan;1812(1):23-31. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.07.003. Epub 2010 Jul 15. PMID: 20637865.

[45] Bolivar S, Espitia-Corredor JA, Olivares-Silva F, Valenzuela P, Humeres C, Anfossi R, Castro E, Vivar R, Salas-Hernández A, Pardo-Jiménez V, Díaz-Araya G. In cardiac fibroblasts, interferon-beta attenuates differentiation, collagen synthesis, and TGF- β 1-induced collagen gel contraction. *Cytokine*. 2021 Feb;138:155359. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155359. Epub 2020 Nov 5. PMID: 33160814.

[46] Gilles G, McCulloch AD, Brakebusch CH, Herum KM. Maintaining resting cardiac fibroblasts in vitro by disrupting mechanotransduction. *PLoS One*. 2020 Oct 26;15(10):e0241390. doi: 10.1371/journal.pone.0241390. PMID: 33104742; PMCID: PMC7588109

[47] Diaz-Araya G, Borg TK, Lavandero S, Loftis MJ, Carver W. IGF-1 modulation of rat cardiac fibroblast behavior and gene expression is age-dependent. *Cell Commun Adhes*. 2003 May-Jun;10(3):155-65. PMID: 14668062.

[48] Wilson CG, Stone JW, Fowlkes V, Morales MO, Murphy CJ, Baxter SC, Goldsmith EC. Age-dependent expression of collagen receptors and deformation of type I collagen substrates by rat cardiac fibroblasts. *Microsc Microanal*. 2011 Aug;17(4):555-62. doi: 10.1017/S1431927611000390. Epub 2011 Jul 11. PMID: 21740617; PMCID: PMC4045481.

[49] Chen H, Chen H, Liang J, Gu X, Zhou J, Xie C, Lv X, Wang R, Li Q, Mao Z, Sun H, Zuo G, Miao D, Jin J. TGF- β 1/IL-11/MEK/ERK signaling mediates senescence-associated pulmonary fibrosis in a stress-induced premature senescence model of Bmi-1 deficiency. *Exp Mol Med*. 2020 Jan;52(1):130-151. doi: 10.1038/s12276-019-0371-7. Epub 2020 Jan 21. PMID: 31959867; PMCID: PMC7000795.

[50] Li WQ, Tan SL, Li XH, Sun TL, Li D, Du J, Wei SS, Li YJ, Zhang BK. Calcitonin gene-related peptide inhibits the cardiac fibroblasts senescence in cardiac fibrosis via up-regulating

klotho expression. *Eur J Pharmacol.* 2019 Jan 15;843:96-103. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.10.023. Epub 2018 Oct 21. PMID: 30352200.

[51] Schafer MJ, Miller JD, LeBrasseur NK. Cellular senescence: Implications for metabolic disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2017 Nov 5;455:93-102. doi: 10.1016/j.mce.2016.08.047. Epub 2016 Aug 31. PMID: 27591120; PMCID: PMC5857952.

[52] Palmitate promotes inflammatory responses and cellular senescence in cardiac fibroblasts. Sokolova M, Vinge LE, Alfsnes K, Olsen MB, Eide L, Kaasbøll OJ, Attramadal H, Torp MK, Fosshaug LE, Rashidi A, Lien E, Finsen AV, Sandanger Ø, Aukrust P, Ranheim T, Yndestad A. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2017 Feb;1862(2):234-245. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.11.003. Epub 2016 Nov 12.

[53] X-Y, Gao, Y-Y. Lai, X-S. Luo, D-W. Peng, Q-Q. Li, H-S. Zhou, Y-M. Xue, H-M. Guo, J-F. Zhao, H. Yang, S-J. Kuang, Z-Y. Wang, M-Z. Zhang, C-Y. Deng, S-L. Wu, F. Rao, Acetyltransferase p300 regulates atrial fibroblast senescence and age-related atrial fibrosis through p53/Smad2 axis, *Aging Cell*, (2022)e13743. <https://doi.org/10.1111/accel.13743>.

[54] Y. Zhu, T. Tchkonja, T. Pirtskhalava, A.C. Gower, H. Ding, N. Giorgadze, A-K. Palmer, Y. Ikeno, G.B. Hubbard, M. Lenburg, S.P. O'Hara, N.F. LaRusso, J.D. Miller, C.M. Ross, G.C. Verzosca, N.K. LeBrasseur, J.D. Wren, J.N. Farr, S. Khosla, M.B. Stout, S.J. McGowan, H. Fuhrmann-Stroissnigg, A.U. Gurkar, J. Zhao, D. Colangelo, A. Dorronsoro, Y.Y. Ling, A.S. Barghouthy, D.C. Navarro, T. Sano, P.D. Robbins, L.J. Niedernhofer, J.L. Kirkland, The Achilles' heel of senescent cells: From transcriptome to senolytic drugs, *Aging Cell* 14(4) (2015) 644–658. <https://doi.org/10.1111/accel.12344>

- [55] J.A Espitia-Corredor, L. Shamoan, F. Olivares-Silva, C. Rimassa-Taré, C. Muñoz-Rodríguez, C. Espinoza-Pérez, C.F. Sánchez-Ferrer, C. Peiró, G. Díaz-Araya, Resolvin E1 attenuates doxorubicin-induced cardiac fibroblast senescence: A key role for IL-1 β , *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* (2022) 166525. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166525>.
- [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.
- [57] 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.
- [58] Feng T, Meng J, Kou S, Jiang Z, Huang X, Lu Z, Zhao H, Lau LF, Zhou B, Zhang H. CCN1-Induced Cellular Senescence Promotes Heart Regeneration. *Circulation.* 2019 May 21;139(21):2495-2498. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.039530. PMID: 31107624.
- [59] Kirkland JL, Tchkonian T. Senolytic drugs: from discovery to translation. *J Intern Med.* 2020 Nov;288(5):518-536. doi: 10.1111/joim.13141. Epub 2020 Aug 4. PMID: 32686219; PMCID: PMC7405395.
- [60] Mertens JC, Fingas CD, Christensen JD, Smoot RL, Bronk SF, Werneburg NW, Gustafson MP, Dietz AB, Roberts LR, Sirica AE, Gores GJ. Therapeutic effects of deleting cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma. *Cancer Res.* 2013 Jan 15;73(2):897-907. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2130. Epub 2012 Dec 5. PMID: 23221385; PMCID: PMC3549008.

[61] Zeng C, Liu X, Xiong D, Zou K, Bai T. Resolvin D1 Prevents Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Reduces Collagen Deposition by Stimulating Autophagy in Intestinal Fibrosis. *Dig Dis Sci*. 2022 Oct;67(10):4749-4759. doi: 10.1007/s10620-021-07356-w. Epub 2022 Jan 10. PMID: 35013877.