



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

**Resolvina E1 previene la senescencia inducida por
doxorubicina en células endoteliales y fibroblastos cardiacos**

Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado académico de Doctor en Farmacología y
a la Universidad Autónoma de Madrid
para optar al grado académico de Doctor en Farmacología y Fisiología por:

JENARO ANTONIO ESPITIA CORREDOR

DIRECTORES:

Dr. Guillermo Díaz-Araya
Profesor Titular de la Universidad de Chile

Dra. Concepción Peiró Vallejo
Catedrática de la Universidad Autónoma de Madrid

Chile, España
2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

Jenaro Antonio Espitia Corredor

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen público rendido el día _____.

Directores de Tesis:

Dr. Guillermo Díaz Araya _____

Dra. Concepción Peiró Vallejo _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Juan Diego Maya (presidente) _____

Dra. Carolina Campos Estrada _____

Dr. Julio Tapia _____

La presente tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Farmacología Molecular (FARMOLAB), Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias y Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, bajo la Dirección del Dr. Guillermo Díaz Araya y en el Grupo de Investigación en Farmacología Vascular y del Metabolismo (FARMAVASM), Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, bajo la Dirección de la Dra. Concepción Peiró Vallejo.

FINANCIAMIENTO

- Proyectos FONDECYT No. 1170425 y 1210627 (Guillermo Díaz Araya, investigador principal).
- Proyectos de I+D+i Agencia Estatal de Investigación, España PID2020-115590RB-100 AEI/10.13039/501100011033 (Concepción Peiró Vallejo, investigadora principal).
- Beca de Doctorado Nacional Año 2017 ANID 21170233 (Jenaro Antonio Espitia Corredor).

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

Participación en congresos

Espitia-Corredor J.A. “*Resolvin E1, a pharmacological approach to attenuate endothelial senescence*”. XLII CONGRESO ANUAL de la Sociedad de Farmacología de Chile, SOFARCHI, 2021. Virtual, presentación oral, Simposio de estudiantes de doctorado.

Espitia-Corredor J.A. “*IL1-beta and doxorubicin induces cellular senescence in primary adult mouse cardiac fibroblasts*”. 8TH EUROPEAN VIRTUAL CONGRESS OF PHARMACOLOGY, EPHAR 2021. Virtual, exposición oral.

Espitia-Corredor J.A. “*Resolvin E1 attenuates doxorubicin- and interleukin-1beta-induced cardiac fibroblast senescence*”. 24th ANNUAL (VIRTUAL) MEETING OF THE EUROPEAN COUNCIL FOR CARDIOVASCULAR RESEARCH (ECCR), ECCR Meeting 2021. Virtual, exposición de póster.

Espitia-Corredor J.A. “*Doxorubicin and interleukin-1beta induce cellular senescence in primary adult mouse cardiac fibroblasts and human umbilical vein endothelial cells*”. 23rd ANNUAL (VIRTUAL) MEETING OF THE EUROPEAN COUNCIL FOR CARDIOVASCULAR RESEARCH (ECCR), ECCR Meeting 2020. Virtual, presentación oral corta.

Espitia-Corredor J.A. “*Induction of cellular senescence in primary adult mouse cardiac fibroblasts*”. XLI CONGRESO ANUAL de la Sociedad de Farmacología de Chile, SOFARCHI, 2019, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. Presentación póster.

Espitia-Corredor J.A. “*Induction of senescence associated β -galactosidase activity in mouse adult cardiac fibroblast*”. XL CONGRESO ANUAL de la Sociedad de Farmacología de Chile, SOFARCHI, 2018, Santa Cruz, Chile. Presentación póster.

Publicaciones derivadas de la tesis

Shamoon, L.*, **Espitia-Corredor, J.A.***, Dongil, P., Menéndez-Ribes, M., Romero, A., Valencia, I., Díaz-Araya, G., Sánchez-Ferrer, C.F., Peiró, C. RESOLVIN E1 ATTENUATES DOXORUBICIN-INDUCED ENDOTHELIAL SENESENCE BY MODULATING NLRP3 INFLAMMASOME ACTIVATION. *Biochemical pharmacology*, 201, 115078. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115078>

Espitia-Corredor, J.A.*, Shamoon, L.*, Olivares-Silva, F., Rimassa-Taré, C., Muñoz-Rodríguez, C., Sánchez-Ferrer, C.F. Peiró, C., Díaz-Araya, G. Resolvin E1 attenuates doxorubicin-induced cardiac fibroblast senescence: A key role of IL-1 β . *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Diseases*. 2022. (En revisión)

* Autores principales de la publicación.

Otras publicaciones

Olivares-Silva, F.*, De Gregorio, N., **Espitia-Corredor, J.A.**, Espinoza, C., Vivar, R., Silva, D., Osorio, J. M., Lavandero, S., Peiró, C., Sánchez-Ferrer, C., & Díaz-Araya, G. (2021). Resolvin-D1 attenuation of angiotensin II-induced cardiac inflammation in mice is associated with prevention of cardiac remodeling and hypertension. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1867(12), 166241. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166241>

Salas-Hernández, A.*, Ruz-Cortés, F., Bruggendieck, F., Espinoza-Perez, C., **Espitia-Corredor, J.A.**, Varela, N. M., Quiñones, L. A., Sánchez-Ferrer, C., Peiró, C., & Díaz-Araya, G. (2021). Resolvin D1 reduces expression and secretion of cytokines and monocyte adhesion triggered by Angiotensin II, in rat cardiac fibroblasts. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 141, 111947. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111947>

Parra-Flores, P.*, **Espitia-Corredor, J.A.***, Espinoza-Pérez, C., Queirolo, C., Ayala, P., Brüggendieck, F., Salas-Hernández, A., Pardo-Jiménez, V., & Díaz-Araya, G. (2021). Toll-Like

Receptor 4 Activation Prevents Rat Cardiac Fibroblast Death Induced by Simulated Ischemia/Reperfusion. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 8, 660197. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.660197>

Salas-Hernández, A.*, Espinoza-Pérez, C., Vivar, R., **Espitia-Corredor, J.A.**, Lillo, J., Parra-Flores, P., Sánchez-Ferrer, C. F., Peiró, C., & Díaz-Araya, G. (2021). Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in rat cardiac fibroblast in vitro. *Molecular biology reports*, 48(1), 57–66. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06133-8>

Bolivar, S.*, **Espitia-Corredor, J. A.**, Olivares-Silva, F., Valenzuela, P., Humeres, C., Anfossi, R., Castro, E., Vivar, R., Salas-Hernández, A., Pardo-Jiménez, V., & Díaz-Araya, G. (2021). In cardiac fibroblasts, interferon-beta attenuates differentiation, collagen synthesis, and TGF-β1-induced collagen gel contraction. *Cytokine*, 138, 155359. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155359>

Olivares-Silva, F.*, **Espitia-Corredor, J.A.**, Letelier, A., Vivar, R., Parra-Flores, P., Olmedo, I., Montenegro, J., Pardo-Jiménez, V., & Díaz-Araya, G. (2021). TGF-β1 decreases CHOP expression and prevents cardiac fibroblast apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 70, 105041. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.105041>

Díaz-Araya, G*., & **Espitia-Corredor, J. A.** (2018). Silencing or not silencing *p63* in cardiac fibroblast, risks and benefits. *Journal of thoracic disease*, 10(10), 5648–5651. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.09.13>

* Autores principales de la publicación.

DEDICATORIA

A mis familias colombiana, chilena y española que me han acompañado en este viaje de aprendizaje; pero especialmente a mis dos madres Amelia y Victoria y a mi abuelo y padre José Argemiro por su amor incondicional, ejemplo de responsabilidad, integralidad y fortaleza humana. Por su apoyo constante a través del tiempo les estaré eternamente agradecido.

“Los obstáculos son sólo oportunidades que la vida te da para que te demuestres a ti mismo de cuanto eres capaz.”

Padre Jenaro Antonio Espitia Ordóñez
Ordo Clericorum Regularium a Somascha

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la enorme oportunidad de crecimiento y enriquecimiento personal en el proceso formativo de aprendizaje que ha sido el viaje doctoral.

A mis directores de tesis, la Doctora Concepción Peiró Vallejo y el Doctor Guillermo Díaz Araya por su amistad, guía, paciencia, dedicación y confianza en la realización de esta tesis, siempre serán mi mamá y papá académicos.

A los miembros del tribunal y comisión evaluadora de tesis el Doctor Juan Diego Maya, Doctora Carolina Campos Estrada, Doctor Julio Tapia y al Doctor Giancarlo De Ferrari Valentini (que en paz descanse) por sus palabras y orientación durante el presente trabajo.

Al Grupo de Investigaciones en Farmacología Vascul y del Metabolismo (FARMAVASM) por recibirme como uno de ellos y permitirme crecer como investigador y ser humano. Al Doctor Carlos Félix Sánchez Ferrer por esa energía y conocimiento compartido, por acogerme dentro de esta familia que es FARMAVASM; y que sin duda seguirá creciendo y teniendo mucho éxito. *I particularly thank Feli Shamoan (Pandi) for her friendship, company, and support in good and bad moments. Without you, this trip would not have been the same, and I will be eternally grateful for the opportunity to know you. I'll hope that the future brings you many beautiful things, professionally and personally.* A Alejandra Romero (Ale) por recibirme como amiga, guía y colega, me compartiste a través de tus acciones esa energía incomparable que traes, eres un Doctora y amiga genial; no tengo dudas que tu futuro será brillante estés donde estés. A Pilar Dongil eres una grandiosa amiga, colega y la mejor *Data Scientist*. Siempre te agradeceré por tu linda amistad y conocimiento, no puedo decir más que infinitas gracias a ti y que me queda pendiente la visita a Guadalajara. A Inés Valencia (Baby) por su amistad, guía y palabras de apoyo en duros momentos, Doctora Valencia la magia corre en ti y no cabe duda que alcanzarás las estrellas. Te agradezco la paella y zanahorias moradas más deliciosas que he comido. A Marta Menéndez Ribés (Martuchis) por tu amistad y apoyo, tú alegría es contagiosa y a donde sea que vayas no dejes que tu chispa se apague. A Elena Cercas Alonso por su bondad y cariño y apoyo en el laboratorio, aunque fue cortito lo que compartimos como dirían en mi país fue sustancioso. A Álvaro San Hipólito Luengo y Fernando de la Cuesta Marina, aunque el periodo que compartimos juntos fue breve no tengo duda de su calidad humana y lo excelente investigadores que son, espero que la vida traiga muchas alegrías venideras para vosotros.

Al Grupo de Investigaciones en Farmacología Molecular (FARMOLAB) en donde mi formación doctoral da inicio y conozco tantas historias como personas fascinantes y de excelente talante investigador y humano. A Paula Valenzuela (Princess), te agradezco por dejarme conocerte, pocas son las personas con esos valores morales envidiables que tú posees y que hablan del hermoso ser humano que eres; que la vida nos dé más chelas por compartir. A Francisco Javier Olivares Silva (Pancho Malo), parece a ti más que a nadie por demostrarme día a día y paso a paso lo que la serenidad puede lograr en momentos de angustia. A Ninoska Ramírez (Nino) por recibirme con los brazos abiertos y ser mi primera amiga dentro del *Team Fibros*, estés donde estés te deseo el mayor éxito. A Claudia Muñoz Rodríguez (Clodein), por ser una amiga verdadera y una guía en la vida académica, que la vida nos dé más tiempo y chance de muchas más charlas y momentos juntos. A Viviana Pardo (Vivi), por tu amistad, conocimiento y palabras de guía, siempre energéticas contigo en las que sea y para las que sea. A Pablo Parra (Parrita), caballerito no dejes de avanzar y pese a que todo se vea oscuro continúa, te agradeceré por siempre dejarme esa valiosa enseñanza para la vida, así como tu amistad. A Jossete Cayupi (Cayupito), por ese amor energético que entregas como amiga, que ilumina y sana en momentos de tristeza, te agradezco por estar cuando hay que estar. A Claudio Espinoza (Wey), por tu amistad y por compartirme un pedacito pequeño de tu vida parece no dudes de ti y crece que el potencial que tienes es increíble. A Natalia Muñoz Silva (Ratalia), por tu energía, amistad y alegría contagiosas, espero haber sido un buen heredero de tu puesto. A Felipe Ruz, por demostrarme que con constancia en tu día a día puedes alcanzar el éxito sin importar

nada. A Esteban Castro (Bandido), por tu humildad y calma ante la adversidad que muchas veces y en silencio ayudaron en difíciles momentos. A José Miguel Lillo por compartirme esa pasión que llevas dentro por el conocimiento, es demasiado genial y te pido continúa compartiéndola con el mundo. A Samir Bolívar, sé que compartimos poco, pero la energía que ofreces a otros hace justamente eso que con ese poco se contagie tu alegría y ganas de crecer y avanzar. A los nuevos *fibros* en formación y aquellos que se me pasara mencionar, a Evelyn y don José por dejarme hacer parte de un poquito de su historia, espero mucho éxito venga a ustedes en un futuro cercano.

A mi familia colombiana: mis madres, Amelia y Victoria porque es gracias a ellas que puedo soñar con crecer, por el amor que me han dado y que continúan entregándome; jamás me alcanzará esta vida o la otra para agradecerles y demostrarles ni el uno por ciento de lo que me brindan día a día. A mi abuelo, José Argemiro Corredor, por enseñarme que lo primero es la educación y el valor de la palabra y promesa dicha. Espero que desde allá como te dije hace algunos años sepas de cada paso que he dado y daré porque todos mis logros estarán siempre dedicados a ti. A mis tíos y tías Jenaro, Julio, Jorge, Fernando, Chiqui, Catulo, Manolo, Andreita, Idalith, Olguita, Manuelito, Manuel y a quien se me pase no incluir por ser ejemplos de esfuerzo y perseverancia den el trabajo honesto y justo. A mis primos Memo, Nana, Paula, Mafe, Cesarín, Pao, Andrés, Diego, Nico, Carlangas y muchos otros que no menciono aquí por estar pendientes de mí y ser mis hermanos y amigos. A mis sobrinitos María José, María Elisa y Samuel por brindarme esperanza en el futuro.

A mi mejor amigo Daniel Alejandro Bonilla Moreno, porque este viaje ha sido duro y sumercé más que nadie me ha acompañado a través de esto. Sé que el futuro es incierto, pero no dudo de que cuento con su amistad sincera día a día.

A *Les P*, especialmente a Constanza Alanis (Pitu) por tu amistad, cariño y palabras honestas en momentos de adversidad, eres una de las mejores personas que he conocido y espero no haber sido una carga para ti en este periodo de tiempo. A Fernanda Cuevas (Papita) por tu cariño sincero estoy seguro que tu futuro es brillante no te detengas ante nada. Y la otra pata de esta familia disfuncional Sara Peña (Panis), en este punto muchas veces las palabras sobran, pero sabes de corazón que cuentas conmigo.

A mis amigos del Doctorado en Farmacología, Karencilla, Carolein, Ileana, Aníbal, Fabi y Renato por tantos momentos y experiencias. Por enseñarme que hermanito pequeño pesado o no, su amistad es real en buenos y malos momentos. A María Fernanda Arias (Fefa) por tu amistad honesta y palabras de apoyo. Parece te agradezco demasiado dejarme ser parte de tu historia y compartir la mía en este espacio de tiempo. Quedan pendientes muchos *#Fefachallenge*. A Rubén Elías Albornoz, por tu amistad y demostrarme con tu buena onda que la grandeza viene de adentro. A Wai, por una de las amistades más bacanes que tengo, tu alegría es contagiosa y por favor no dejes de brindarla al mundo. A Helena Quiper, por brindarme tu amistad y compañía con esa energía tan bonita.

Thanks, Jan Eduardo Meneguello (my PhD brother) for your friendship and all your advice with the wisdom of a monk. A Leo y Federico por su amistad sincera en el piso español más intercultural en pandemia.

A mis amigos de Colombia por su amistad sincera: Jeidy (Hada) sabes que siempre te deseo lo mejor y el mayor éxito en todos tus proyectos, no dejes de compartir esa energía y amor por la vida que tienes con el mundo. Pao parece hace años cuando nos conocimos prometimos estar en buenas y malas y así ha sido, enserio gracias. Lore (loquita), tu amor por la vida se contagia y espero que ese mismo amor retorne a ti día a día. Vane y Saskia (mis costañitas favoritas), agradezco mucho su apoyo en varios momentos de este viaje, espero que la vida les brinde demasiadas cosas bellas.

Y a todas y cada una de las personas que no he podido nombrar pero que perfectamente saben que siempre estarán en mis oraciones. A quienes mencioné y a quienes no de todo corazón gracias por tanto en este viaje, siempre cuentan conmigo, les doy mi palabra y siempre mucha *Genki* para todos sus proyectos.

ÍNDICE

CONTENIDO

DEDICATORIA	6
AGRADECIMIENTOS	7
RESUMEN.....	19
ABSTRACT	20
1 INTRODUCCIÓN	22
1.1 Envejecimiento cardiovascular y enfermedad cardiovascular.....	22
1.2 Senescencia y envejecimiento.....	23
1.2.1 Tipos de senescencia celular.....	24
1.2.2 Biomarcadores de senescencia celular	26
1.3 Senescencia cardiovascular.....	29
1.3.1 Senescencia endotelial y disfunción del endotelio.....	29
1.3.2 Senescencia del fibroblasto cardiaco	30
1.4 Doxorubicina y daño cardiovascular	31
1.4.1 Doxo y senescencia celular	32
1.4.2 Doxo, estrés oxidativo e inflamación.....	33
1.4.3 Doxo e inflammasoma NLRP3.....	33
1.5 Inflammasoma NLRP3	34
1.5.1 Componentes y activación del inflammasoma NLRP3.....	34
1.5.2 Interleuquina-1 β	36
1.6 Mediadores lipídicos especializados pro-resolutivos para atenuar la senescencia celular 37	
1.6.1 Resolvina E1.....	38
1.6.2 SPM y senescencia celular	38
2 HIPÓTESIS	41
3 OBJETIVOS	41
3.1 GENERAL.....	41
3.2 ESPECÍFICOS	41

3.2.1	Evaluar la senescencia celular inducida por Doxo en HUVEC y FCrA.....	41
3.2.2	Evaluar el papel de la IL-1 β en la senescencia celular inducida por Doxo en HUVEC y FCrA. 41	41
3.2.3	Evaluar el efecto de la RvE1 sobre la senescencia celular inducida por Doxo en HUVEC y FCrA.....	41
4	METODOLOGÍA	43
4.1	Declaración ética	43
4.2	Obtención y cultivo primario de células HUVEC	43
4.3	Obtención y cultivo primario de FCrA	44
4.4	Caracterización de células HUVEC.....	45
4.5	Tratamiento de los cultivos celulares.....	46
4.6	Detección de <i>specks</i> por inmunofluorescencia indirecta	47
4.7	Determinación de viabilidad celular por reducción del MTT	48
4.8	Determinación de SA- β -gal.....	48
4.9	Extracción y cuantificación de proteínas para <i>Western-blot</i>	49
4.10	Separación y detección de proteínas de interés por <i>Western-blot</i>	50
4.11	Cuantificación de citoquinas por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.....	53
4.12	Análisis de la expresión génica de marcadores de senescencia e inflamación.....	53
4.12.1	Extracción de ARN mensajero	53
4.12.2	Reacción de transcripción inversa	53
4.12.3	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real	54
4.13	Análisis estadístico	55
5	RESULTADOS.....	57
5.1	Caracterización de las células HUVEC	57
5.2	Doxo induce la senescencia en células HUVEC	57
5.3	Doxo induce la activación del inflammasoma NLRP3 en células HUVEC.....	59
5.4	La senescencia endotelial inducida por Doxo es mediada por la activación del inflammasoma NLRP3.....	61

5.5	RvE1 atenúa la senescencia endotelial inducida por Doxo	63
5.6	RvE1 modula la activación del inflammasoma NLRP3 inducida por Doxo en células HUVEC 64	
5.7	Doxo induce senescencia en FCrA.....	65
5.8	Doxorrubicina induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en fibroblastos cardiacos de ratón adulto	67
5.9	La SA- β -gal inducida por Doxo en FCrA es mediada por el ensamblaje del inflammasoma NLRP3 y el receptor IL1	68
5.10	IL-1 β induce senescencia en FCrA.....	69
5.11	IL-1 β induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en FCrA.....	70
5.12	RvE1 atenúa la senescencia de FCrA inducida por Doxo.....	71
5.13	RvE1 atenúa la senescencia de FCrA inducida IL-1 β	73
6	DISCUSIÓN.....	77
6.1	Doxo induce senescencia celular en células HUVEC y FCrA	77
6.2	Los efectos prosenescentes de Doxo son mediados por activación del inflammasoma NLRP3, la secreción de IL-1 β y activación del receptor de IL-1 en células endoteliales y fibroblastos cardiacos.....	80
6.3	IL-1 β induce senescencia celular en FCrA	81
6.4	Efecto de Doxo e IL-1 β sobre el SASP en FCrA	82
6.5	RvE1 atenúa la senescencia celular en células endoteliales y fibroblastos cardiacos.....	84
6.6	Efecto de RvE1 sobre la activación del inflammasoma NLRP3 inducido por Doxo en células endoteliales	85
6.7	Efecto de RvE1 sobre el SASP inducido por Doxo e IL-1 β en fibroblastos cardiacos	86
7	CONCLUSIONES	90
8	BIBLIOGRAFÍA	91
	ANEXO I - Primera publicación de la tesis ya aceptada.....	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características principales del envejecimiento	23
Figura 2. Tipos de senescencia celular y vías de señalización involucradas.....	25
Figura 3. Biomarcadores generales de la senescencia celular.....	27
Figura 4. Farmacoterapia del cáncer e inducción de senescencia cardiaca como mecanismo de riesgo cardiovascular.....	32
Figura 5. Fases de activación clásica del inflammasoma NLRP3.....	35
Figura 6. Familias, biosíntesis y estructuras de los mediadores lipídicos especializados pro-resolutivos.....	37
Figura 7. Caracterización de las células HUVEC.....	57
Figura 8. Doxo induce aumento de SA-β-gal en HUVEC sin comprometer la viabilidad celular. ..	58
Figura 9. Doxo induce aumento de biomarcadores de senescencia de respuesta al daño al ADN y arresto de ciclo celular en HUVEC.....	59
Figura 10. Doxo induce el cebado del inflammasoma NLRP3 en células HUVEC.....	60
Figura 11. Doxo induce la activación del inflammasoma NLRP3 en células HUVEC.....	61
Figura 12. Aumento SA-β-gal inducido por Doxo en células HUVEC es mediado por activación del inflammasoma NLRP3.....	62
Figura 13. Aumento de γH2A.X y p53 inducido por Doxo en células HUVEC es mediado por activación del inflammasoma NLRP3.....	62
Figura 14. RvE1 atenúa el aumento inducido por Doxo de SA-β-gal en células HUVEC.....	63
Figura 15. RvE1 atenúa el aumento inducido por Doxo de biomarcadores de senescencia de respuesta al daño al ADN y arresto de ciclo celular en células HUVEC.....	63
Figura 16. RvE1 previene el cebado del inflammasoma NLRP3 inducido por Doxo en células HUVEC.....	64
Figura 17. RvE1 previene la activación del inflammasoma NLRP3 inducido por Doxo en células HUVEC.....	65
Figura 18. Doxo induce aumento de SA-β-gal en FCrA sin comprometer la viabilidad celular.....	66
Figura 19. Doxo induce aumento de biomarcadores de senescencia de respuesta al daño al ADN y arresto de ciclo celular en FCrA.....	67
Figura 20. Doxo induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en FCrA.....	68
Figura 21. Aumento de SA-β-gal inducido por Doxo en FCrA es mediado por activación del inflammasoma NLRP3.....	69
Figura 22. IL-1β induce aumento de SA-β-gal en FCrA.....	69

Figura 23. IL-1 β induce aumento de biomarcadores de senescencia de respuesta al daño al ADN y arresto de ciclo celular en FCrA.	70
Figura 24. IL-1 β induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en FCrA.....	71
Figura 25. RvE1 atenúa el aumento inducido por Doxo de SA- β -gal en FCrA.	72
Figura 26. RvE1 atenúa el aumento inducido por Doxo de biomarcadores de senescencia de respuesta al daño al ADN y arresto de ciclo celular en FCrA.	72
Figura 27. RvE1 atenúa la secreción de citoquinas pro-inflamatorias inducida por Doxo en FCrA.	73
Figura 28. RvE1 atenúa el aumento inducido por IL-1 β de SA- β -gal en FCrA.	74
Figura 29. RvE1 atenúa el aumento inducido por IL-1 β de biomarcadores de senescencia de respuesta al daño al ADN y arresto de ciclo celular en FCrA.	74
Figura 30. RvE1 atenúa la secreción de citoquinas pro-inflamatorias inducida por IL-1 β en FCrA.	75
Figura 31. Efecto anti-senescente de RvE1 frente a la senescencia inducida por Doxo e IL-1 β en HUVEC y FCrA a través de la disminución de la activación del eje inflammasoma NLRP3 / IL-1R.	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos y solventes utilizados para los tratamientos realizados.....	47
Tabla 2. Anticuerpos primarios y condiciones utilizadas para la detección de proteínas por <i>Western-blot</i>	51
Tabla 3. Anticuerpos secundarios y condiciones utilizadas para la detección de los anticuerpos primarios en <i>Western-blot</i>	52
Tabla 4. Cebadores utilizados para el análisis de la expresión genética en HUVEC.....	55

ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µM	Micromolar
53BP1	Proteína 1 de unión a p53
5-LO	5-lipooxigenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AK	Anakinra
Akt	Proteína quinasa B
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein</i>
ATM	Proteína ataxia telangiectasia mutada
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	Proteína relacionada con ataxia telangiectasia y Rad3
BCA	Ácido bicinconínico
BLT1	Receptor de leucotrieno B4
BSA	Albúmina sérica bovina
CANTOS	<i>Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcome Study</i>
CCN1 o CYR61	Proteína 61 rica en cisteína
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
CDKI	Inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas
ChemR23	Receptor de alta afinidad de quemerina
Chk1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
Chk2	Checkpoint kinase 2
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DAMPS	Patrones moleculares asociados a daño
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DDR	<i>DNA Damage Response</i>
DHA	Ácido docosahexanóico
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DNA-PK	Proteína quinasa no específica nuclear dependiente de ADN
DNA-SCARS	Segmentos de ADN con alteraciones de heterocromatina reforzantes de senescencia
Doxo	Doxorrubicina
DPA	Ácido docosapentanóico
E.E.M	Error medio estándar
E2F	Factor de transcripción E2
ECGS	Factor de crecimiento endotelial
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EPA	Ácido eicosapentanóico
ERK 1/2	Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno

FC	Fibroblastos cardiacos
FCrA	Fibroblastos cardiacos de ratón adulto
FOXO	<i>Mammalian forkhead members of the class O</i>
H2O2	Peróxido de hidrógeno
HUVEC	Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IL-10	Interleuquina 10
IL-18	Interleuquina 18
IL-1R	Receptor de interleuquina 1
IL-1 α	Interleuquina 1 alfa
IL-1 β	Interleuquina 1 beta
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
INK4a/ARF	Locus INK4a/ARF
IR1A	Antagonista recombinante humano del receptor IL-1
JNK	Quinasa N-terminal c-Jun
KC	Quimioquina derivada de queratinocitos
LEMD2	<i>LEM Domain Nuclear Envelope Protein 2</i>
LPS	Lipopolisacárido
LX	Lipoxinas
MaR	Maresinas
MCC950	Inhibidor de la oligomerización de NLRP3
MCD1/NFBD1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramo
mL	Mililitro
Mmp14	Metaloproteinasa de matriz 14
MSU	Monourato de sodio
NBS1	Nibrina
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas
NLRP3	<i>Nucleotide-Binding Domain-Like Receptor Protein 3</i>
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
p16INK4a	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
p19ARF	Proteína supresora de tumores ARF
p21CIP1	Inhibidor 1 de quinasa dependiente de ciclina
p38MAPK	Proteínas quinasas p38 activadas por mitógenos
p53	Proteína supresora de tumores p53
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución de tampón fosfato salino

PD	Protectinas
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PMNs	Polimorfonucleares
pRb	Proteína del retinoblastoma
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
RT	Retrotranscripción o transcripción inversa
Rv	Resolvinas
RvD	Resolvinas de la serie D
RvD1	Resolvina D1
RvD2	Resolvina D2
RvE	Resolvinas de la serie E
RvE1	Resolvina E1
RvT	Resolvinas de la serie 13
SAHF _s	Focos heterocromáticos asociados a senescencia
SASP	Fenotipo secretor asociado a senescencia
SA- β -gal	Actividad β -galactosidasa asociada a senescencia
SDF	Foci de daño al ADN
SDS	Dodecilsulfonato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SFB	Suero fetal bovino
SMAD	<i>Suppressor of Mothers against Decapentaplegic</i>
SOD	Superóxido dismutasa
SPM	Mediadores lipídicos especializados pro-resolutivos
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TTBS	Solución de tampón salino de Tris y Tween 20
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular celular 1
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

El envejecimiento se caracteriza por deterioro de las funciones del organismo y se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (ECV). Una de las características principales del envejecimiento es la senescencia celular (SC), definida como el arresto irreversible del ciclo celular y la adquisición de cambios fenotípicos característicos en las células, entre ellos un secretoma conocido como SASP mediante el cual se promueve un microambiente proinflamatorio y se propaga la SC. Doxorubicina (Doxo) es un antineoplásico con efectos adversos a nivel cardiovascular que han limitado su uso; dentro de los mecanismos que explican estos efectos se describen el aumento de estrés oxidativo, inflamación y la inducción de SC. La interleuquina (IL)-1 β y el complejo responsable de su producción, el inflamasoma NLRP3, han sido directamente relacionados tanto con el uso de Doxo como con un mayor riesgo de ECV. Células endoteliales (CE) y fibroblastos cardíacos (FC) son los principales tipos celulares no musculares del sistema cardiovascular; la SC de estas células está relacionada con una mayor incidencia de disfunción endotelial y fibrosis cardíaca, principales factores de riesgo en el desarrollo de ECV. Sin embargo, los mecanismos por los cuales Doxo podría estar induciendo la SC de CE y de FC no están completamente esclarecidos y se desconoce si la secreción de IL-1 β mediante la activación del inflamasoma NLRP3 podría estar involucrada. Se han planteado diversas estrategias farmacológicas para disminuir la presencia de células senescentes; sin embargo, la resolvína E1 (RvE1), un mediador lipídico con potentes efectos pro-resolutivos y antiinflamatorios no ha sido estudiada en la prevención de la SC de CE y de FC inducida por Doxo. El objetivo de este trabajo fue estudiar si Doxo induce la SC en CE y FC a través de la secreción de IL-1 β y, además, si la RvE1 atenúa la SC inducida por Doxo a través de la disminución dicha secreción. CE fueron aisladas de venas de cordón umbilical humano y FC de ratones adultos, posteriormente fueron estimuladas con Doxo en presencia o ausencia de la RvE1, del MCC950 (inhibidor de la activación del inflamasoma NLRP3) y de anakinra (antagonista del receptor de IL-1) en CE o de IR1A (antagonista endógeno del receptor de IL-1) en FC. Se evaluó SC mediante la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal), γ H2A.X, p53, p21 y el SASP. Los resultados más relevantes fueron: 1) Doxo induce senescencia de CE y FC mediante la activación del eje inflamasoma NLRP3/receptor IL-1. 2) IL-1 β induce la senescencia en FC y a su vez un fuerte aumento del SASP en comparación con Doxo. 3) RvE1 atenuó la senescencia de CE y FC inducida por Doxo y de FC inducida por IL-1 β disminuyendo la secreción de IL-1 β . En conclusión, podemos señalar que RvE1 mostró ser capaz de contrarrestar la senescencia de CE y FC inducida por Doxo disminuyendo la secreción de IL-1 β . Lo cual plantea a la RvE1 como una potencial herramienta farmacoterapéutica en la protección cardiovascular frente al daño inducido por Doxo, así como en ECV con un rol importante de la IL-1 β .

ABSTRACT

Aging is featured by the deterioration of body functions and has been related to an increased risk of developing cardiovascular diseases (CVD). One of the main characteristics of aging is cellular senescence (CS), defined as the irreversible cell cycle arrest and the acquisition of characteristic phenotype in cells, including a secretome known as SASP through which a proinflammatory microenvironment is promoted and CS propagates. Doxorubicin (Doxo) is an antineoplastic with adverse cardiovascular effects that have limited its use. The mechanisms described that explain these effects are the increase in oxidative stress, inflammation, and the induction of CS. Interleukin (IL)-1 β and the complex responsible for its production, the NLRP3 inflammasome, have been directly related both to the use of Doxo and to an increased risk of developing CVD. Endothelial cells (EC) and cardiac fibroblasts (CF) are the main non-muscle cell types of the cardiovascular system; the CS of these cells is related to a higher incidence of endothelial dysfunction and cardiac fibrosis, the main risk factors in the development of CVD. However, the mechanisms by which Doxo could be inducing CS of EC and CF are not fully understood and it is unknown whether IL-1 β secretion through activation of the NLRP3 inflammasome could be involved. Various pharmacological strategies have been proposed to reduce the presence of senescent cells; however, resolvin E1 (RvE1), a lipid mediator with potent pro-resolution and anti-inflammatory effects, has not been studied in the prevention of Doxo-induced CS of EC and CF. The objective of this work was to study whether Doxo induces CS in EC and CF through IL-1 β secretion and if RvE1 attenuates Doxo-induced CS by decreasing cytokine secretion. EC were isolated from human umbilical cord veins and CF from adult mice. Subsequently, the cells were stimulated with Doxo in the presence or absence of RvE1, MCC950 (inflammasome activation inhibitor NLRP3), and anakinra (IL-1 receptor antagonist) in EC or IR1A (endogenous IL-1 receptor antagonist) in CF. CS was evaluated by senescence-associated β -galactosidase activity (SA- β -gal), γ H2A.X, p53, p21, and SASP. The most relevant results were: 1) Doxo induces CS of EC and CF by activating the NLRP3/IL-1 receptor inflammasome axis. 2) IL-1 β in CF in turn induces CS and a strong increase in SASP in comparison with Doxo. 3) RvE1 attenuated Doxo-induced EC and CF senescence and IL-1 β -induced CF senescence by decreasing IL-1 β secretion. In conclusion, we can point out that RvE1 was able to counteract Doxo-induced senescence by decreasing IL-1 β secretion. This raises RvE1 as a potential pharmacotherapeutic tool in cardiovascular protection against damage induced by Doxo, as well as in CVD with an important role of IL-1 β .

INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

1.1 Envejecimiento cardiovascular y enfermedad cardiovascular

El envejecimiento es un fenómeno multifactorial entendido como la pérdida progresiva de la integridad fisiológica que conduce al deterioro funcional de organismo [1]. Así pues, se caracteriza por la acumulación de una variedad de procesos degenerativos acompañados de alteraciones a nivel tisular, celular, molecular y metabólico, que conducen a una mayor incidencia y prevalencia de patologías asociadas con la edad [2].

En los últimos años la población mundial mayor de 60 años de edad (adulto mayor) ha ido en aumento, en gran medida por la implementación de mejoras en las políticas de salud pública acompañado con el desarrollo farmacológico. De acuerdo a la Organización Mundial de Salud (OMS) en 2019 el número de adultos mayores fue de mil millones, y se espera que para el 2030 este valor aumente a 1,4 mil millones y 2,1 mil millones para el 2050; lo anterior a una velocidad sin precedentes que será aún mayor en las décadas por venir y particularmente en países desarrollados [3-5].

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la primera causa de muerte a nivel mundial y según las estadísticas sanitarias mundiales 2020 de la OMS, dan cuenta de 17,9 millones de muertes cada año [6]. Actualmente, el envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo independientes en el aumento de la morbimortalidad y desarrollo de la fragilidad en adulto mayor por ECV [7-9]; aún más, se ha observado que envejecimiento y ECV se encuentran estrechamente vinculados en una relación causal recíproca [5], en la cual el primero conduce a un deterioro de la estructura y función cardiovascular en adultos sanos a nivel celular y molecular, como lo son, por ejemplo, el incremento del grosor de la pared ventricular izquierda y de los vasos sanguíneos, alteraciones en el patrón de llenado diastólico, fracción de eyección y frecuencia cardíaca. Este deterioro viene dado como consecuencia de un desequilibrio en términos de estrés oxidativo e inflamatorio que promueve el daño de la estructura cardíaca y vascular mediante procesos fisiopatológicos tales como senescencia endotelial y cardíaca prematura, disfunción endotelial, fibrosis cardíaca y calcificación vascular, entre otros [9-13].

No obstante, pese a la estrecha relación las implicaciones de dichos cambios, son menospreciados en la práctica clínica y es así como un mayor entendimiento de las alteraciones en la estructura del corazón y los vasos relacionadas con la edad a nivel celular y molecular proporciona un campo de investigación idóneo para el desarrollo de aproximaciones farmacoterapéuticas para la prevención, retraso o atenuación de los cambios cardiovasculares asociados con la edad [14, 15].

1.2 Senescencia y envejecimiento

El envejecimiento se caracteriza por el deterioro funcional gradual en el tiempo que ocurre de forma heterogénea en múltiples órganos; sin embargo, el entendimiento del proceso de envejecimiento aún permanece en gran medida desconocido, pese al vínculo encontrado entre dicho proceso y el riesgo



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

ECV [16-19]. Es así, como en la pasada década diversos estudios han permitido identificar diferentes rasgos comunes asociados al envejecimiento a nivel celular y molecular. La identificación de los desde entonces llamados “*hallmarks*” o características principales del envejecimiento (**Figura 1**) ha contribuido a conceptualizar la investigación en dicha área y de esta manera enfatizar perspectivas tentadoras para retrasar o atenuar patologías relacionadas con la edad desde un enfoque asociado al uso de dichas características como dianas farmacológicas [20].

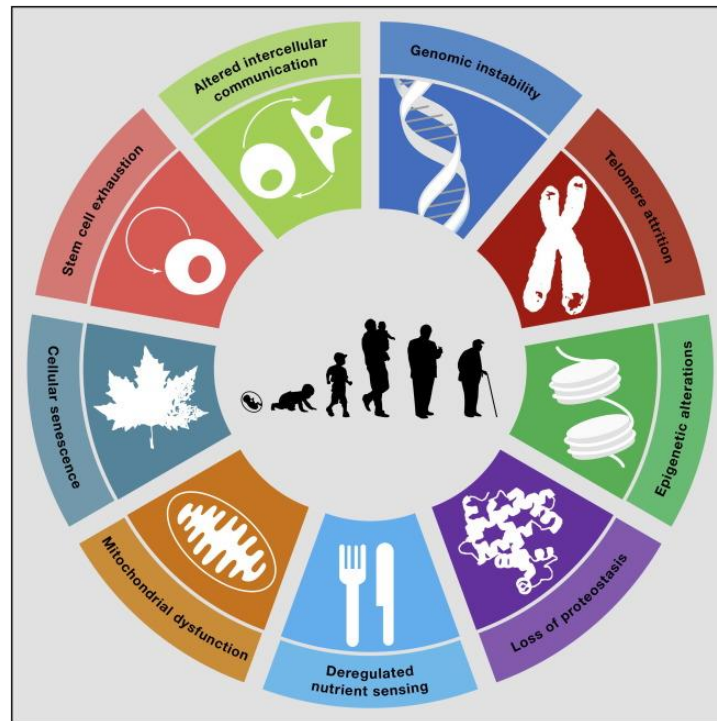


Figura 1. Características principales del envejecimiento

El esquema muestra los nueve *hallmarks* o características principales del envejecimiento: inestabilidad genómica, deterioro telomérico, alteraciones epigenéticas, pérdida de la proteostásis, senescencia celular, disfunción mitocondrial, detección desregulada de nutrientes, agotamiento de células madre y alteraciones en la comunicación intercelular. Tomado de [20].

Estos “*hallmarks*” son nueve y se clasifican en tres categorías: 1) primarios en donde están la inestabilidad genómica, deterioro telomérico, alteraciones epigenéticas y pérdida de la proteostásis considerados como causas de daño celular; 2) antagonistas en donde están la senescencia celular, disfunción mitocondrial y detección desregulada de nutrientes considerados como mitigadores del daño de forma aguda y de ser crónicos o exacerbados por sí mismos deletéreos; por último 3) integrativos en donde están el agotamiento de células madre y alteraciones en la comunicación intercelular como resultado de las dos categorías previas y responsables finales de la disminución funcional asociada al envejecimiento [20]. Este proceso de envejecimiento viene entonces dado por un balance entre los procesos de daño, reparación, muerte y reemplazo de las células en los tejidos;



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

la edad de ECV, entre ellas la acumulación en los tejidos de células senescentes [21, 22].

La senescencia celular se define como la detención estable y permanente del ciclo celular conjunto a la adquisición de una variedad de cambios fenotípicos [23]. Este proceso ha sido catalogado como parte de procesos fisiológicos tales como el envejecimiento saludable, el desarrollo embriogénico y la reparación tisular; pero también se ha observado que juega un papel importante en escenarios patológicos como el envejecimiento acelerado por enfermedad, el remodelado cardiovascular, la tumorigénesis y otras enfermedades asociadas con la edad [24, 25]. En la actualidad se ha establecido que la senescencia celular puede surgir como consecuencia de la aparición de un daño en el ADN (telomérico o no telomérico) que resulta en la activación de la respuesta del daño al ADN o DDR por sus siglas en inglés (“*DNA Damage Response*”). La activación de DDR, finalmente promoverá la detención del ciclo celular con la activación en paralelo de los sistemas de reparación del daño buscando la corrección de los daños en la doble hebra. No obstante, en caso de que no se pueda dar la reparación exitosa del daño para evitar la replicación de células potencialmente aberrantes la detención de ciclo celular se hace permanente y así las células entran en un estado de senescencia celular [25].

1.2.1 Tipos de senescencia celular

En términos generales hay 3 tipos de senescencia celular: replicativa, inducida por estrés o prematura y programada (**Figura 2**).

1.2.1.1 Senescencia replicativa

Este fenómeno fue originalmente descrito por Hayflick en fibroblastos humanos en cultivo sometidos continuamente a pasaje celular [26]. De hecho, se sabe que la senescencia celular observada por Hayflick es causada por el acortamiento telomérico dado por los ciclos continuos de duplicación celular en donde se reconocen los sitios de daño al ADN telomérico activando la DDR y esto se ha definido como “senescencia replicativa” [27].

1.2.1.2 Senescencia inducida por estrés o prematura

La senescencia inducida por estrés o senescencia prematura se da tras la exposición a los factores estresores endógenos o exógenos y es de aparición temprana por lo que resulta evidente tras algunos días; mientras que en comparación la senescencia replicativa puede llegar a darse tras semanas o meses de ciclos replicativos. La senescencia prematura puede igualmente ser inducida en ausencia detectable de acortamiento telomérico o en casos de activación de la DDR sin daño detectable a la doble hebra por procesos que involucran modificación del estado de condensación de la cromatina [27].



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

Figura 2. Tipos de senescencia celular y vías de señalización involucradas.

Senescencia replicativa (panel izquierdo, naranja) dependiente de la activación de la respuesta de daño al ADN (DDR) por daño al ADN causado por el acortamiento u erosión de los telómeros; senescencia prematura o inducida por estrés (panel del medio, verde) desencadenada por remodelamiento de la cromatina o compuestos como butirato de sodio o curcumina que inducen la DDR sin dañar al ADN, y aquellos que inducen daño al ADN y la activación de la DDR como radiación, quimioterapia, estrés oxidativo, mutaciones de oncogenes o de proteínas supresores de tumores, este último inducir igualmente senescencia independiente del daño al ADN y la DDR; y finalmente la senescencia programada (panel derecha, azul) que no depende en lo absoluto de daño al ADN y de la DDR regulada por las vías de señalización TGF- β /SMAD y PI3K/FOXO. En todos los tipos de senescencia se converge en la expresión de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas necesarios para conducir a la detención permanente del ciclo celular. Tomado de [27].

1.2.1.3 Senescencia programada

El desarrollo embrionario es un proceso que es alcanzado por la estrecha coordinación de mecanismos relacionados con la migración, proliferación, diferenciación y muerte celular programada. En los últimos años un mecanismo adicional propuesto en dicho proceso se ha denominado como senescencia celular programada [28, 29].

La senescencia que tiene lugar en el desarrollo embrionario de mamíferos comparte características con otros tipos de senescencia como: a) la independencia de daño al ADN para su activación, b) el aumento y activación de p53 u otros inhibidores del ciclo celular y c) adicionalmente se encuentra regulada por las vías de señalización TGF- β /SMAD y PI3K/FOXO. Se ha propuesto que el propósito de este tipo de senescencia celular es promover el remodelado tisular contribuyendo así a la organogénesis como un proceso evolutivamente conservado [28, 29].

1.2.2 Biomarcadores de senescencia celular

Hoy en día la senescencia celular no puede ser establecida por la presencia de un único marcador celular o molecular; de hecho, se necesita de la validación simultánea de múltiples características o biomarcadores que permitan la confirmación del fenotipo senescente *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Los biomarcadores aceptados en la actualidad incluyen una variedad de alteraciones a nivel estructural,



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

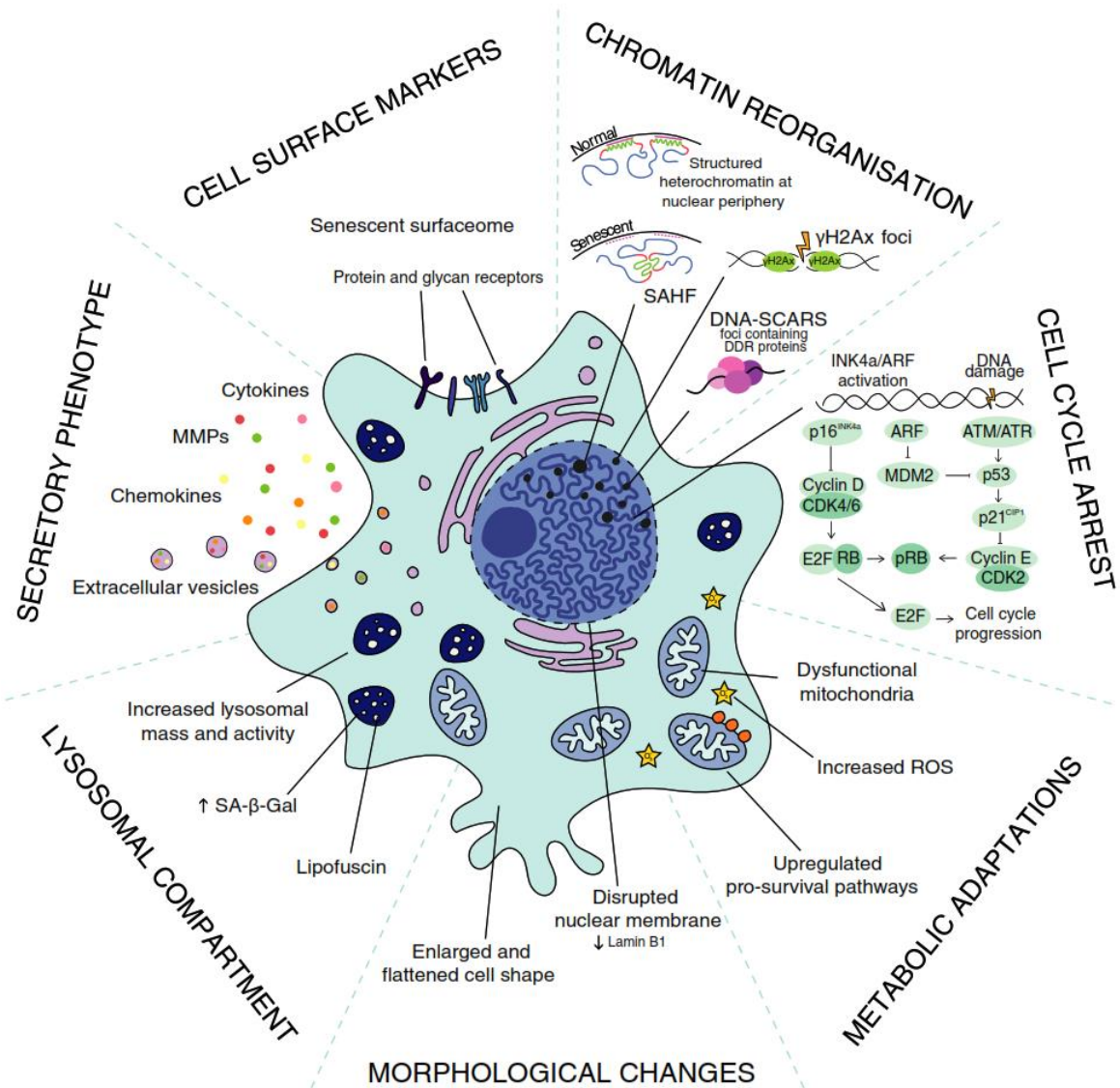


Figura 3). En general, se ha propuesto la verificación de al menos 2 a 3 de estos biomarcadores que estén relacionados con la detención de la progresión del ciclo celular, cambios estructurales relevantes (tales como incremento de la masa lisosomal, multinucleación, focos heterocromáticos asociados a senescencia o SAHFs por su sigla en inglés, incremento en el número de vacuolas, pérdida de laminina B1 y una forma aplanada y agrandada) o la presencia de marcadores de subtipo de senescencia específicos relacionados con el daño al ADN, incremento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) o de componentes del fenotipo secretor asociado a senescencia, entre otros [30].



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

Uno de los biomarcadores de senescencia mayormente empleados es el incremento en los niveles de actividad de la enzima lisosomal β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal); utilizando este ensayo podremos monitorear el incremento en la expresión y actividad de esta enzima en las células, así como un indicio del incremento de la masa lisosomal característico de las células senescentes (

Figura 3). SA- β -gal es una hidrolasa que cataliza la hidrólisis de β -galactósidos en monosacáridos. Por ejemplo, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal, el sustrato más común de la enzima) es transformado en galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol-1, que al dimerizar producirá un precipitado índigo de coloración azul-verde. La mayoría de tipos celulares expresa β -galactosidasa enzimáticamente activa a pH 4,0; sin embargo, se ha sugerido que tras la acumulación de masa lisosomal las células senescentes aumentan los niveles de la enzima, así como la adquisición de cambios estructurales en la hidrolasa que permite su funcionalidad a un pH no óptimo de 6,0 (condición a la que se realiza la tinción) permitiendo así diferenciar células no senescentes de células senescentes [31].



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

Figura 3. Biomarcadores generales de la senescencia celular.

Se incluyen (1) la detención estable del ciclo celular, mediada finalmente por la activación de vías comunes p16^{INK4a}/pRb y p53/p21^{CIP1}. (2) Alteración y reorganización de la cromatina, que incluye marcas asociadas a senescencia de foci de heterocromatina (SAHFs) y segmentos de ADN con alteraciones de heterocromatina reforzantes de senescencia (DNA-SCARS) que comprometen la envoltura nuclear. (3) Adaptaciones metabólicas y de daño macromolecular que incluyen aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO), disfunción mitocondrial y resistencia a la apoptosis por aumento de vías de supervivencia. (4) Cambios morfológicos de la célula en donde adoptan una apariencia más alargada, afilada y aplanada con disrupción de la membrana nuclear y en algunos casos multinucleación. (5) Incremento de lisosomas evidente en masa y actividad por marcadores como lipofuscina y la SA-β-gal. (6) Fenotipo secretor asociado a senescencia o SASP, con aumento en la expresión de citoquinas, quimioquinas, vesículas extracelulares y metaloproteasas y finalmente de reciente surgimiento (7) marcadores de superficie celular asociados a senescencia. Tomado de [30].

1.2.2.2 Respuesta de daño al ADN

En años recientes los eventos iniciales de la vía de señalización inducida por el daño al ADN o también conocida como DDR han sido bien caracterizadas (

Figura 2 y Figura 3). Las quinasas ATM, ATR y posiblemente DNA-PK son reclutadas a la zona de daño al ADN y tras su activación promueven la fosforilación de la serina 139 de moléculas adyacentes a la zona de la variante de la histona H2A.X (γH2A.X). Se cree que la fosforilación de la histona H2A.X facilita el ensamblaje focalizado de proteínas puntos de control y factores de reparación del ADN como 53BP1, MDC1/NFBD1 y NBS1, así como la activación por fosforilación de las quinasas transductoras Chk1 y Chk2 que convergerán en la activación de la proteína supresora de tumores p53 [32].

De hecho, se sabe que la disfunción telomérica induce el arresto de ciclo celular mediante la activación de ATM/ATR y finalmente p53 y p16 (este último en humanos, pero no en fibroblastos de ratón). Por lo tanto, se ha planteado que telómeros sin protección podrían desencadenar senescencia mediante la formación de daño focalizado al ADN o foci de daño al ADN (*Senescence DNA Damage Foci*, SDF por sus siglas en inglés) [33, 34].

1.2.2.3 Activación de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas

La detención del ciclo celular es uno de los biomarcadores definitorios de la senescencia celular y se caracteriza por el aumento y activación de las proteínas p16, p21, p53 y la disminución de la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (pRb) (

Figura 2 y Figura 3). Las vías de señalización activadas por inductores comunes de senescencia celular (erosión telomérica, daño al ADN, estrés oxidativo, activación de oncogenes y señalización mitogénica crónica) convergen finalmente en la activación de dos de las mayores vías de señalización que controlan la detención del ciclo celular, que son p16^{INK4a}/pRb y p53/p21^{CIP1}. En las dos vías el



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

dependientes de ciclinas (CDK por sus siglas en inglés); de esta manera se reprime físicamente la unión a los promotores de genes clave en la replicación celular del factor de transcripción E2F quien es responsable de promover la progresión del ciclo celular y transición en la fase S, con lo anterior se da la detención del ciclo [35].

En la vía p16^{INK4a}/pRb, tras la activación del locus INK4a/ARF se promueve la expresión conjunta de p19^{ARF} en ratón o p14^{ARF} en humano y de p16^{INK4a} (inhibidor de CDK o CDKI por sus siglas en inglés); este último directamente inhibe el complejo CDK4-ciclina D permitiendo la desfosforilación y estabilización del complejo pRb-E2F y por ende inhibiendo el ciclo celular. Por otro lado, p19^{ARF} antagoniza la actividad ubiquitina E3 ligasa de MDM2 impidiendo la degradación de p53 y estabilizándolo y activando por consiguiente el programa transcripcional asociado [35].

En la vía p53/p21^{CIP1}, p53 es activado por fosforilación (p-p53) tras la activación de la DDR y posteriormente como factor de transcripción promueve el aumento en los niveles del CDKI p21^{CIP1} quien directamente inhibirá el complejo CDK2-ciclina E promoviendo así la desfosforilación de pRb y la detención del ciclo celular [35].

1.2.2.4 Fenotipo secretor asociado a senescencia

El fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP por sus siglas en inglés) es otro biomarcador típico y característico de las células senescentes (

Figura 3). Las células senescentes son capaces de secretar una variedad de factores solubles que incluyen citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, factores de crecimiento y proteasas, así como vesículas extracelulares que en condiciones fisiológicas contribuyen al mantenimiento de la homeostasis del tejido; sin embargo, a medida que la acumulación de células senescentes ocurre con la edad o bien debido a la incorrecta eliminación de las mismas, se provoca la presencia crónica de dichos factores proinflamatorios derivados del SASP. Es así como este SASP crónico se asocia con un proceso de inflamación “estéril” que promueve cambios auto- y paracrinós de tipo degenerativo en las células vecinas (conocido como efecto espectador), incrementando el riesgo de desarrollar disfunciones tisulares y patologías relacionadas con la edad mediante un posible escenario de envejecimiento inducido por inflamación [25, 36-38].

1.3 Senescencia cardiovascular

Es importante considerar que la senescencia celular puede afectar de forma diferencial a las células dependiendo de su tipo, el tejido en el que se encuentren y así mismo el órgano que constituyen [39]. El sistema cardiovascular contiene una amplia variedad de tipos celulares, entre los cuales están los cardiomiocitos, células musculares lisas vasculares, células epiteliales, células progenitoras, células del sistema inmune, adipocitos, células endoteliales y fibroblastos cardiacos; siendo estos dos últimos



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que todos los tipos de células a nivel cardiovascular pueden volverse senescentes con el envejecimiento, así como en ECV; la senescencia de las células endoteliales y fibroblastos cardiacos es de particular importancia dado el rol que cumplen estas células en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular; más aún se ha relacionado la senescencia celular y el SASP a múltiples patologías de carácter degenerativo que han sido asociadas con la edad; de esta manera, se observa acumulación de este tipo de células senescentes en aterosclerosis, fibrosis cardiaca, pulmonar y hepática, desórdenes metabólicos, ECV y renales [41, 42].

1.3.1 Senescencia endotelial y disfunción del endotelio

Las células endoteliales son el tipo celular mayoritario en el corazón y corresponden a aproximadamente el 60% de las células no musculares en el tejido cardiaco. Estas células son indispensables para la regulación del tono y la homeostasis vascular [43]. Esto se debe a que participan activamente en el mantenimiento que realiza el endotelio del flujo sanguíneo mediante el control de la agregación plaquetaria y el tono vascular, además participan de la regulación de la respuesta inmunológica, el proceso inflamatorio y la angiogénesis [13, 44].

Las células endoteliales normales en general son capaces de responder a una amplia variedad de señales físicas y químicas producidas por diversos factores lo que permite mantener el balance entre moléculas proinflamatorias, antiinflamatorias, protrombóticas, antitrombóticas, prooxidantes, antioxidantes y finalmente entre agentes vasodilatadores y vasoconstrictores según sea necesario [45, 46]. Sin embargo, dicho balance puede verse afectado por diversos factores de riesgo fisiopatológicos como por ejemplo el envejecimiento prematuro, diabetes mellitus tipo II, obesidad, aterosclerosis, insuficiencia cardiaca y fibrilación atrial, en los cuales la balanza se inclinaría en favor de incrementar un microambiente proinflamatorio, protrombótico, prooxidante y prosenescente que finalmente conduciría a disfunción endotelial [9, 44].

Ahora bien, dentro de las principales causas de la disfunción endotelial tenemos al estrés oxidativo y la inflamación que a su vez se relacionan con la senescencia endotelial. Estos procesos ocurren bajo condiciones fisiológicas; sin embargo, un aumento o exceso en los mismos les convierte en una fuente de alteración de la homeostasis del organismo. En términos de la vasculatura, un bajo grado de estrés oxidativo es necesario para el correcto funcionamiento de las células endoteliales en cuanto a procesos como crecimiento y respuesta al daño permitiendo un aumento en la permeabilidad endotelial, la quimiotaxis y adhesión de células del sistema inmune cuando fuese necesario [43, 47]. No obstante, altos niveles de estrés oxidativo alteran las funciones del endotelio; de hecho, se ha comprobado que un SASP crónico producido por una senescencia inducida por estrés, es capaz de afectar la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO por sus siglas en inglés) mediante la promoción de inflamación crónica de bajo grado y aumento del estrés oxidativo [9, 48]. Además, el estrés oxidativo



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

involucran la activación del factor de transcripción NF- κ B. Una vez activas estas vías, se induce la expresión y liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β y quimioquinas como la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1 por sus siglas en inglés), que promueven la activación del endotelio, expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) y finalmente la quimiotaxis y adhesión de células del sistema inmune gracias al microambiente proinflamatorio. Este tipo de inflamación de bajo grado es uno de los principales mecanismos involucrados en el envejecimiento prematuro de la vasculatura, la generación de la placa ateromatosa, así como en la activación de monocitos que igualmente promueven la aterogénesis [49, 50].

1.3.2 Senescencia del fibroblasto cardiaco

Los fibroblastos cardíacos (FC) dan cuenta de aproximadamente el 20% de las células no musculares del corazón poseen un rol clave en el remodelado cardiovascular mediante la regulación de las propiedades estructurales, bioquímicas, mecánicas y eléctricas del corazón [51]. Previamente, considerados como células de sostén, se creía regulaban únicamente la integridad de la matriz extracelular (MEC), mediante síntesis y degradación de sus componentes [52]; sin embargo, hoy se consideran como células centinelas capaces de responder a una amplia variedad de estímulos químicos y mecánicos generando señales de alerta en el tejido cardiaco [51]. El papel de la senescencia de fibroblastos cardíacos es complejo y aún tema de discusión. Por un lado, varios estudios han demostrado una asociación entre la acumulación de fibroblastos senescentes y fibrosis [53-55]; por ejemplo, fibroblastos disfuncionales aislados de un modelo de ratón *knockout* para *Mmp14* (colagenasa necesaria para la funcionalidad de los fibroblastos) presentaron un incremento en los niveles de biomarcadores de senescencia celular, acompañado de la acumulación de colágeno a nivel del corazón [54]. De forma similar, se observó fibrosis cardiaca e incremento de biomarcadores asociados a senescencia en los fibroblastos de pacientes con una variante en *LEMD2* que codifica para una proteína de la membrana interna nuclear [55]. Sin embargo, no se ha establecido el rol causal de la senescencia celular en la fibrosis cardiaca o si se trata de un simple epifenómeno.

1.4 Doxorrubicina y daño cardiovascular

Perteneciente a la familia de fármacos antraciclinas la doxorrubicina (Doxo) es un derivado hidroxilado de la daunorubicina con mayor efectividad antineoplásica y que desde las investigaciones iniciales, se ha empleado en el tratamiento de una gran variedad de tumores sólidos y cánceres hematológicos que incluyen leucemia, linfoma, cáncer de mama, de pulmón, mieloma múltiple y sarcoma [56, 57].

Si bien la Doxo se ha convertido en uno de los agentes antineoplásicos más efectivos, su utilización en clínica ha sido limitada debido a las complicaciones a nivel cardiovascular asociadas con su uso;



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

previamente tratados con el fármaco. De hecho, la así denominada toxicidad cardiovascular inducida por antraciclinas como la Doxo puede ser de carácter agudo cuando típicamente ocurre durante la primera semana de tratamiento, de aparición temprana si se da durante el primer año tras haber concluido la farmacoterapia; y es de aparición tardía cuando los pacientes desarrollan eventos cardiovasculares agudos o crónicos tras un periodo de latencia en el que la función cardiovascular parece normal. Esta última forma de toxicidad es especialmente importante en pacientes con exposición al fármaco a edades tempranas, pues el riesgo de presentar este tipo de eventos compromete significativamente su calidad de vida en etapas adultas [56, 58, 59].

Se han propuesto múltiples mecanismos para explicar la toxicidad cardiovascular inducida por antraciclinas y particularmente por la Doxo, como estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, metabolismo energético miocárdico alterado, apoptosis celular, inflamación y recientemente la senescencia celular [60, 61]. De hecho, la disfunción cardíaca desencadenada por Doxo se ha caracterizado por una acumulación masiva de ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN) promoviendo así un ambiente prooxidante, proinflamatorio, prosenescente y con elevada muerte celular [61, 62].

Sin embargo, los mecanismos exactos involucrados en dicha toxicidad y deterioro cardiovascular inducidos por Doxo no están completamente esclarecidos; por lo anterior resulta relevante en la actualidad el estudio y comprensión de dichos mecanismos, más aún con el propósito desarrollar nuevas estrategias para atenuar las complicaciones cardiovasculares asociadas al uso del antineoplásico.

1.4.1 Doxo y senescencia celular

En la actualidad se ha incrementado la evidencia que señala la inducción de senescencia celular como uno de los mecanismos que median los efectos tóxicos a nivel cardiovascular asociados al uso de la Doxo, que finalmente afecta la actividad funcional de células cardíacas (**Figura 4**). Se ha demostrado entonces que Doxo es capaz de inducir senescencia de diferentes tipos celulares, entre ellos las células endoteliales, fibroblastos cardíacos, células musculares lisas vasculares y cardiomiocitos [61, 63].



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

Figura 4. Farmacoterapia del cáncer e inducción de senescencia cardíaca como mecanismo de riesgo cardiovascular.

Farmacoterapia del cáncer es capaz de inducir senescencia en diversos tipos celulares a nivel cardiovascular mediante diversos mecanismos moleculares. La acumulación de células senescentes contribuye al desarrollo de ECV y riesgo cardiovascular en pacientes tratados sobrevivientes de cáncer. Adaptado de [61].

Adicionalmente, hay estudios que demuestran la habilidad de fármacos entre ellos la Doxo, como inductores de senescencia en células cancerígenas; varios de ellos indicando aumento en biomarcadores de senescencia e incremento en la expresión de componentes del SASP dando cuenta de efectos para- y autocrinos de células senescentes cancerígenas [64-68].

1.4.2 Doxo, estrés oxidativo e inflamación

Se ha aceptado que uno de los principales mecanismos causantes de la toxicidad a nivel cardiovascular inducida por Doxo es la promoción de un desequilibrio entre la producción de ERO y el sistema de defensa antioxidante. De hecho, en la mitocondria la porción quinona del anillo C del fármaco es transformada en semiquinona; esta forma de Doxo, reacciona fácilmente con las moléculas de oxígeno (O_2) presentes dando lugar al anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que a su vez será neutralizado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este último en presencia de Fe^{2+} por reacción de Fenton conduce a la producción del radical altamente reactivo hidroxilo (OH^{\cdot}); este a su vez reaccionará con bases nitrogenadas del ADN, aminoácidos de las proteínas y con las cadenas carbonadas de lípidos en donde finalmente promoverá el daño al ADN, así como la peroxidación lipídica [69, 70].

Adicionalmente, estudios previos demostraron que el tratamiento con Doxo induce efectos inflamatorios en el miocardio por activación de NF- κ B, conduciendo a la posterior liberación de varias citoquinas proinflamatorias y a la activación de las vías involucradas en la apoptosis y patogénesis cardiovascular tales como p38MAPK, dando cuenta de una relación compleja entre inflamación e insuficiencia cardíaca inducida por el antineoplásico [71-73].

1.4.3 Doxo e inflammasoma NLRP3

Pese a los numerosos mecanismos moleculares implicados como mediadores de los efectos tóxicos cardiovasculares de la Doxo, entre ellos la formación de radicales libres, estabilización de la topoisomerasa-II β , apoptosis y daño mitocondrial; la utilización de estas vías como dianas farmacológicas no ha sido suficiente para mitigar los efectos deletéreos asociados al uso del antineoplásico, y en algunos escenarios incluso se ha observado pueden debilitarse los efectos anticancerígenos del fármaco [74-76]. De hecho, se ha reportado que el dexrazoxano, único tratamiento aprobado en clínica como agente citoprotector frente al daño inducido por Doxo, reduce la actividad antineoplásica del fármaco por su capacidad supresora de los efectos del mismo sobre la topoisomerasa II β y el complejo con hierro que resulta en aumento de ERO [74, 77]. Así pues, sigue



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

efectos cardiovasculares tóxicos de la Doxo sin mitigar sus efectos antineoplásicos.

Estudios recientes han sugerido que el complejo inflammasoma NLRP3 (*Nucleotide-Binding Domain-Like Receptor Protein 3* en inglés), podría estar vinculado con los potenciales efectos tóxicos cardiovasculares de la Doxo y lo que resulta aún más interesante es que a su vez la señalización del inflammasoma NLRP3 se ha relacionado con la progresión y desarrollo de ECV, progresión de tumores de mama y metástasis, así como la resistencia al fármaco antineoplásico a largo plazo [78].

1.5 Inflammasoma NLRP3

Los inflammasomas son un grupo de complejos multiproteicos citosólicos que se ensamblan para activar la respuesta inmune innata mediante el procesamiento y maduración de citoquinas proinflamatorias [79]. En la actualidad, uno de los más estudiados es el inflammasoma NLRP3, principal responsable de la producción de las citoquinas interleuquina (IL)-1 β e IL-18, frecuentemente asociadas a un mayor riesgo de desarrollar ECV [80, 81].

1.5.1 Componentes y activación del inflammasoma NLRP3

El inflammasoma NLRP3 consiste de una proteína sensor (NLRP3), una adaptadora (ASC, *apoptosis-associated speck-like protein*) y una efectora (caspasa-1). NLRP3 posee 3 dominios, el amino terminal PYD (dominio efector de pirina), el central NACHT y el carboxilo terminal LRR. El dominio NACHT posee actividad ATPasa que resulta crucial para la oligomerización y función de NLRP3; mientras que el dominio LRR se cree promueve un plegamiento auto inhibitorio sobre el dominio NACHT [82].

La activación clásica del inflammasoma NLRP3 es altamente regulada y salvo con algunas excepciones es un proceso de 2 fases o señales (**Figura 5**). La primera de cebado o “*priming*” y la segunda de activación. El propósito principal de la fase de cebado es el aumento en la expresión de los componentes del inflammasoma, NLRP3, caspasa-1 y pro-IL-1 β . El cebado puede ser desencadenado mediante el reconocimiento de varios patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o asociados a daño (DAMPs) que son capaces de activar receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como los TLR (*Toll-like receptors*) o mediante NOD-2 o a través de citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α e IL-1 β que finalmente activarán el factor de transcripción NF- κ B y con ello aumentarán la transcripción de los componentes del inflammasoma [82].

La segunda fase o de activación se da tras el reconocimiento de una segunda señal que es activadora de NLRP3 permitiendo finalmente la activación completa y ensamblaje del complejo inflammasoma. NLRP3 es activado por una variedad de estímulos entre los que se han descrito múltiples PAMPs o DAMPs como partículas y cristales (sílica y β -amiloides), adenosina trifosfato (ATP), colesterol, monourato de sodio (MSU) y asbesto, entre otros. Estos activadores convergen en la inducción de estrés a nivel celular que podrá ser detectado por NLRP3 permitiendo que su dominio NACHT sea

a ASC dando lugar a la formación de filamentos helicoidales de ASC que al unirse en un foco macromolecular producen estructuras conocidas como *specks* de ASC. Estos *specks* de ASC interactúan con pro-caspasa-1 promoviendo la auto activación de la enzima por proximidad de la caspasa-1; esta a su vez será capaz de escindir y madurar las pro-citoquinas inflamatorias produciendo finalmente IL-1 β e IL-18 [82].

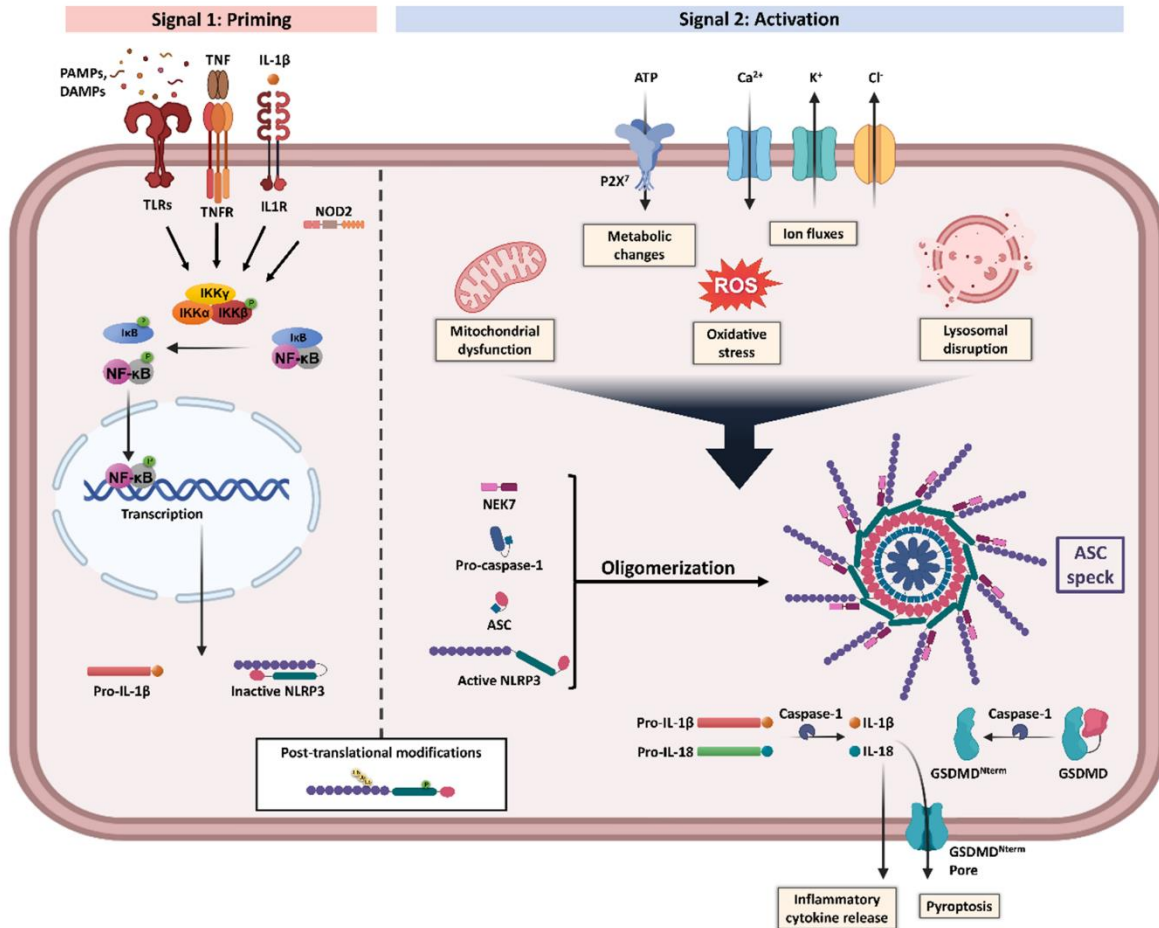


Figura 5. Fases de activación clásica del inflamasoma NLRP3.

La activación clásica requiere de 2 señales. La señal 1 de cebado (a la izquierda) y la señal 2 de ensamblaje y activación (a la derecha). El cebado se inicia por la detección de la señal 1 por los receptores de reconocimiento de patrones (TLR, NOD2) o por receptores de citoquinas de IL-1 β o del factor de necrosis tumoral (TNF), lo que lleva al aumento de la expresión de pro-IL-1 β y NLRP3 mediado por activación de la vía NF- κ B. Varias modificaciones postraduccionales son claves para permitir la activación de la proteína NLRP3. La señal 2 induce, indirectamente, la activación y oligomerización del receptor NLRP3, se recluta a ASC y pro-caspasa-1, lo que lleva a su activación como caspasa-1. Este último promueve la ruptura de pro-IL-1 β y pro-IL-18 para producir sus formas maduras IL-1 β e IL-18, las cuales serán secretadas por mecanismos no clásicos. Tomado de [82].

Debido a que la activación del inflamasoma NLRP3 promueve una respuesta amplificada de carácter proinflamatorio potencialmente deletérea para la célula, existen varios puntos de control entre las que tenemos control de la expresión génica, modificaciones postraduccionales activadoras y reguladoras negativas que finalmente afectan la interacción de los componentes del complejo [82].



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

respuestas locales y sistémicas que contribuyen a un escenario de inflamación sistémica [82]. De hecho, se ha postulado que la activación cardiaca del inflamasoma NLRP3 promueve el desarrollo de insuficiencia cardiaca, aterosclerosis, fibrosis pulmonar y daño miocárdico isquémico (infarto agudo de miocardio) y no isquémico (miocarditis); mientras que en contraposición la inhibición del complejo podría ser considerada como una aproximación en el tratamiento de la progresión de estas ECV [83-85]. Particularmente, los efectores finales de la activación este complejo multiprotéico son las citoquinas maduras IL-1 β e IL-18; las que mediante señalización por activación del receptor tipo I de IL-1 (IL-1R1) conducen a un aumento del daño a nivel cardiaco [86].

1.5.2 Interleuquina-1 β

La Interleuquina-1 (IL-1) es la familia principal de citoquinas asociada con el proceso inflamatorio agudo y crónico. Entre sus múltiples miembros, la IL-1 β ha probado estar implicada activamente en los procesos inflamatorios y de inmunidad innata; se le considera multifuncional y con la capacidad de afectar en combinación con otras citoquinas circundantes la mayoría de tipos celulares del organismo [87, 88]. En algunas circunstancias los efectos producidos por IL-1 β pueden ser deletéreos como en los mencionados escenarios de patologías que cursan con procesos inflamatorios crónicos; sin embargo, sus efectos, igualmente son esenciales para el control y resolución de procesos infecciosos [89]. De hecho, se ha estudiado ampliamente la producción de IL-1 β por monocitos en respuesta a estos procesos infecciosos o de activación inmune que finalmente conducen a hipertermia, edema y la producción de otras citoquinas y quimioquinas tales como la IL-6 y MCP-1 [87, 90]. Así pues, IL-1 β finalmente promoverá el reclutamiento de las células del sistema inmune innato al sitio de la inflamación. Pese a que actúa principalmente sobre células del sistema inmune, la IL-1 β es capaz de actuar sobre otros tipos celulares de origen cardiaco como las células endoteliales, en donde promueve la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria, de factores tisulares procoagulantes y el aumento en la expresión de metaloproteasas, o en fibroblastos donde inhibe la proliferación, promueve la migración celular y afecta el depósito y degradación de proteínas de la MEC regulando la síntesis de colágeno y expresión de metaloproteasas [91-95].

Como se mencionó previamente, la IL-1 β se sintetiza como el precursor inactivo pro-IL-1 β (35 kDa) que tras la activación y ensamblaje del inflamasoma NLRP3 es escindida por la caspasa-1 en su forma activa y más pequeña (17 kDa). Dado el rol de la IL-1 β en escenarios patológicos y particularmente, en base de estudios preclínicos, clínicos y epidemiológicos se ha demostrado que el bloqueo o inhibición de la señalización mediada por IL-1 β es capaz de prevenir y/o proteger frente a diversas enfermedades cardiometabólicas [87, 96].

Particularmente, uno de los principales estudios en pacientes respecto al bloqueo de los efectos mediados por IL-1 β , el ensayo clínico CANTOS (*Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis*



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

efectos mediados por IL-1 β , mejora significativamente los parámetros y proyecciones de supervivencia en pacientes con insuficiencia cardíaca sistólica, demostrando así la importancia de la señalización NLRP3/IL-1R como una diana farmacológica en el tratamiento de ciertas ECV como la insuficiencia cardíaca [96-98].

1.6 Mediadores lipídicos especializados pro-resolutivos para atenuar la senescencia celular

La respuesta inflamatoria aguda es un proceso fisiológico en donde los mediadores lipídicos como prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos en conjunto con una variedad de citoquinas y quimioquinas cumplen una función clave en el progreso de la respuesta. Previamente se creía que la resolución de la inflamación y retorno a la homeostasis era un proceso pasivo que venía dado por la desaparición de las señales iniciales proinflamatorias de daño; no obstante, hoy en día se ha establecido que la resolución del proceso inflamatorio agudo es dinámica y controlada por mecanismos de señalización desencadenados por receptores, además de por el cambio en el tipo de mediadores lipídicos presentes; es aquí donde aparecen los denominados mediadores lipídicos especializados pro-resolutivos (SPM, por sus siglas en inglés), que son moléculas inicialmente identificadas en los exudados cuyo propósito es limitar y resolver el proceso inflamatorio conduciendo a restaurar la homeostasis. Estos mediadores se sintetizan de forma local, por macrófagos de fenotipo antiinflamatorio o por interacción transcelular de polimorfonucleares y células endoteliales; a la fecha se clasifican entre 4 grandes diferentes familias, lipoxinas (LX), protectinas (PD), resolvinas (Rv) y maresinas (MaR) que presentan efectos antiinflamatorios y pro-resolutivos (Figura 6) [99].

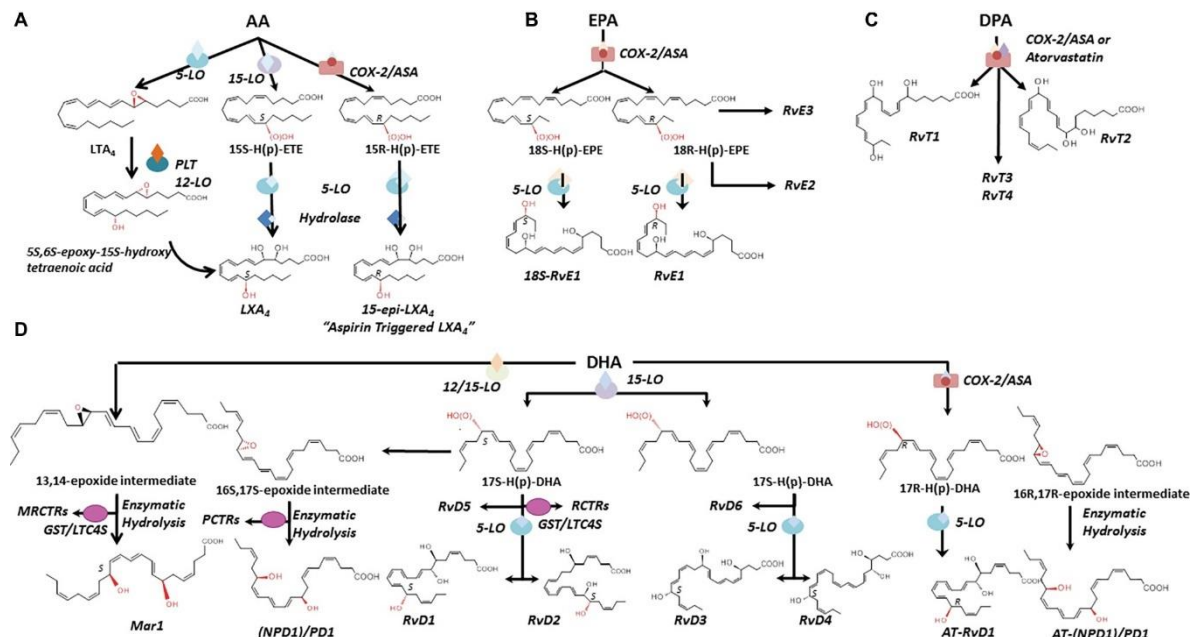


Figura 6. Familias, biosíntesis y estructuras de los mediadores lipídicos especializados pro-resolutivos.

de la serie D, maresinas y protectinas derivadas del DHA. Se muestran las estructuras y estereoquímicas de algunos miembros de cada familia. Tomado de [100].

1.6.1 Resolvina E1

La familia de las resolvinas (Rv) son un tipo de SPM derivados de ácidos poliinsaturados ω -3 presentes durante la fase de resolución de la inflamación. A la fecha se han descrito 3 grupos, la serie D (RvD), la serie E (RvE) y la serie 13 o T (RvT) derivadas respectivamente del ácido docosahexanóico (DHA), eicosapentanóico (EPA) y docosapentanóico (DPA) (**Figura 6**). Particularmente, la resolvina E1 (RvE1 o 5S,12R,18R-trihidroxi-6Z,8E,10E,14Z,16E-EPA) es producida mediante síntesis entre dos tipos celulares; en primer lugar, en las células endoteliales mediante la ciclooxigenasa-2 (COX-2) acetilada por aspirina o mediante oxidación por el citocromo P450 se da lugar a la conversión del EPA en ácido 18R-hidro(peroxi)-eicosapentaenoico (18R-HEPE). El 18R-HEPE rápidamente será biotransformado por polimorfonucleares (PMNs) con la enzima 5-lipooxigenasa (5-LO) dando lugar a la RvE1 [100].

Se ha descrito que la RvE1 se une a dos receptores acoplados a proteína G, el BLT1 (receptor de leucotrieno B4) como agonista parcial siendo capaz de disminuir el estímulo de leucotrieno B4 de PMNs, la movilización intracelular de calcio y activación de NF- κ B; y el ChemR23 (receptor de alta afinidad de quemerina) como agonista mediante el cual atenúa la activación de NF- κ B inducida por TNF- α e incrementa la fagocitosis de macrófagos. Adicionalmente, los dos receptores se expresan en células endoteliales humanas y el último en fibroblastos cardiacos de origen murino [101-105].

A la fecha hay gran cantidad de reportes en los que se señala el potencial que poseen las resolvinas mediante sus efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores, a través de los cuales son capaces de detener la infiltración y trans migración de polimorfonucleares con disminución de los niveles de las citoquinas y quimioquinas involucradas en la respuesta inflamatoria. De hecho, se ha demostrado que este tipo de SPM no solo son más potentes que los tratamientos antiinflamatorios actuales; sino que serían útiles a nivel de diversos tejidos y procesos patológicos [106, 107]. Así pues, hoy en día se consideran las resolvinas como potenciales herramientas farmacológicas en el tratamiento de escenarios que cursen con procesos inflamatorios crónicos. Sin embargo, no se ha evaluado el efecto de la RvE1 sobre la posible senescencia celular inducida por la Doxo, más aún se desconocen los posibles efectos que pudiera tener el mediador lipídico sobre mecanismos proinflamatorios moduladores que pudieran estar implicados.

1.6.2 SPM y senescencia celular

Considerando lo anterior, los SPM resultan ser potenciales agentes terapéuticos novedosos en el tratamiento de escenarios patológicos que cursen con procesos de inflamación no resuelta o de carácter crónico que a su vez estarían relacionados con el envejecimiento e inducción de senescencia



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

de detener las señales proinflamatorias de daño, sino que promueven la resolución del proceso inflamatorio propiamente dicho sin efectos supresores de la respuesta inmune por lo que no debieran afectar la capacidad funcional de células inmunes que en escenarios de envejecimiento puede llegar a verse comprometida [108].

En la actualidad son pocos los trabajos que han estudiado el potencial para atenuar la senescencia celular de los SPM. Específicamente se ha reportado que la RvD1 es capaz de atenuar la senescencia de fibroblastos de piel humana inducida por H_2O_2 promoviendo la autofagia modulando negativamente la hidrolasa AGR2 y activando el receptor ARL1 [109]. Igualmente, la RvD1 ha sido capaz de atenuar la senescencia de macrófagos peritoneales de ratón C57BL/6J inducida por dosis subletales de radiación ionizante, así como disminuir la eferocitosis de macrófagos murinos expuestos a medio condicionado de fibroblastos senescentes [110, 111]. Sin embargo, no se había evaluado a la fecha el potencial para atenuar la senescencia celular a nivel cardiovascular de los SPM y particularmente de la RvE1.

En resumen, se ha planteado que la Doxo es capaz de ejercer sus efectos tóxicos a nivel cardiovascular a través de diversos mecanismos entre los cuales se ha propuesto la inducción de la senescencia celular. Así mismo, la senescencia prematura a nivel cardiaco es capaz de afectar la función cardiovascular mediante la promoción de un microambiente altamente proinflamatorio (SASP), más aún si se considera a los 2 tipos celulares cardiacos no musculares mayoritarios (células endoteliales y fibroblastos cardiacos) como posibles blancos de la senescencia celular, se incrementa el riesgo de desarrollar eventualmente disfunción endotelial y fibrosis cardiaca. Estos últimos, a su vez son factores de riesgo principales en la progresión de escenarios patológicos a nivel cardiovascular. Adicionalmente, uno de los principales componentes del SASP la IL-1 β y la maquinaria proteica responsable de su producción el inflamasoma NLRP3 han sido particularmente vinculados con escenarios patológicos cardiovasculares que cursan con procesos inflamatorios.

Es así como surge en primer lugar la pregunta de si Doxo sería capaz de inducir la senescencia de células endoteliales y de fibroblastos cardiacos mediante la secreción de la IL-1 β y de esta manera se contribuya al riesgo de disfunción endotelial y fibrosis cardiaca. Por último, resulta de interés evaluar si la RvE1 por sus acciones antiinflamatorias y pro-resolutivas de la inflamación es capaz de disminuir la secreción de la IL-1 β y de esta manera atenuar la senescencia inducida por doxorubicina en células endoteliales y fibroblastos cardiacos, proporcionando así una posible nueva herramienta farmacoterapéutica para atenuar los efectos deletéreos asociados al uso del antineoplásico.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2 HIPÓTESIS

Doxo induce la senescencia celular en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) y fibroblastos cardiacos de ratón adulto (FCrA) a través de la secreción de IL-1 β como resultado de la actividad del inflammasoma NLRP3. Además, la RvE1 atenúa la senescencia celular inducida por el antineoplásico en los dos modelos celulares mediante la disminución de la secreción de IL-1 β .

3 OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Estudiar si la RvE1 atenúa la senescencia celular inducida por Doxo a través de la disminución en la secreción de IL-1 β en HUVEC y FCrA.

3.2 ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Evaluar la senescencia celular inducida por Doxo en HUVEC y FCrA.
- 3.2.2 Evaluar el papel de la IL-1 β en la senescencia celular inducida por Doxo en HUVEC y FCrA.
- 3.2.3 Evaluar el efecto de la RvE1 sobre la senescencia celular inducida por Doxo en HUVEC y FCrA.

METODOLOGÍA

4 METODOLOGÍA

4.1 Declaración ética

En este estudio se realizaron procesos experimentales en cultivos primarios de HUVEC y en cultivos primarios de FCrA macho C57BL/6J de acuerdo a la presente legislación española, europea y chilena. Este proyecto se presentó y aprobó por parte del Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Madrid, el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario de La Paz y por los órganos correspondientes de la Comunidad Autónoma de Madrid, así como el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile. Para la obtención de las células humanas se pidió consentimiento informado a las madres donantes previamente a su intervención en el Hospital Universitario La Paz, Madrid, España. Los experimentos con células HUVEC se desarrollaron en las instalaciones de la Universidad Autónoma de Madrid; mientras que los experimentos cultivo primario de FCrA se desarrollaron en las instalaciones de la Universidad de Chile.

4.2 Obtención y cultivo primario de células HUVEC

Las células HUVEC fueron obtenidas de la vena de cordones umbilicales procedentes de donantes en el servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario La Paz. Se excluyeron los cordones umbilicales de madres donantes que presentaban diabetes mellitus, obesidad, hipertensión u otras ECV.

Los cordones se recogieron y mantuvieron hasta su procesamiento en frascos estériles con medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Biological Industries, Israel) suplementado con 0.1 % de albúmina sérica bovina (BSA), 0.005 % de heparina sódica, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 2.5 µg/mL de anfotericina B, todos ellos procedentes de Sigma-Aldrich (USA). Todo el material de plástico necesario para la obtención y cultivo de las células era de TPP (Sigma-Aldrich, USA).

En primer lugar, se lavó el cordón umbilical con una solución estéril de tampón de fosfato salino (PBS 1X) compuesta de 0.2 g de KCl, 0.2 g de KH₂PO₄, 8 g de NaCl y 1.144 g de Na₂HPO₄, procedentes de Panreac Química (España), con el fin de eliminar los restos de sangre y coágulos. Tras limpiar el cordón, se localizó la vena y perfundió, con ayuda de una jeringa, con PBS 1X para limpiar cualquier resto de sangre. Posteriormente, se clampó uno de los extremos del cordón para luego introducir con ayuda de una jeringa la solución estéril de digestión de colagenasa tipo II (2 mg/mL) (Sigma-Aldrich, USA) previo a clampar el extremo restante.

El cordón se dejó en contacto con la solución de digestión por 20 minutos a temperatura ambiente con el movimiento ocasional moderado para permitir la separación de las células endoteliales.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

solución de colagenasa, en la cual se encontraban las HUVEC disgregadas, tras lo cual se lavó de nuevo la vena con PBS 1X para recoger posibles células residuales en la misma placa Petri. Se recolectó el contenido de la placa en un tubo cónico de 50 mL con medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB; Biological Industries, Israel) al 10% para neutralizar la acción de la colagenasa tipo II. El tubo de 50 mL se centrifugó a 1.800 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en el precipitado con DMEM SFB 10% para someter nuevamente a centrifugación a 1.000 r.p.m. durante 10 minutos. Se descartó nuevamente el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio de crecimiento M199 con sales de Earl (M199; Biological Industries, Israel) suplementado con 20 % SFB, 25 µg/mL de factor de crecimiento endotelial (ECGS), 100 µg/mL de heparina y antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 2.5 µg/mL de anfotericina B) procedentes todos de Sigma-Aldrich (USA). Las HUVEC se sembraron en una botella de cultivo celular T75 que para incrementar la adhesión celular fue recubierta durante 1 hora a 37°C con una película de colágeno tipo I (Sigma-Aldrich, USA) al 0.03 % (p/v) en una solución estéril de ácido acético 0.1 M (Panreac Química, España). Las células se dejaron crecer en la botella de cultivo en el incubador a 37°C con una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. El medio de cultivo se cambió al día siguiente para eliminar células muertas, no adheridas a la superficie y eritrocitos presentes, después se cambió medio cada 2 días hasta que se alcanzara el punto de confluencia celular previo a inhibición de crecimiento por contacto. Una vez alcanzada la confluencia, las HUVEC se lavaron 2 veces con PBS 1X y luego se adicionó 1 mL de tripsina 0.05% por 2 minutos tras lo cual se neutralizó la actividad enzimática con medio de cultivo M199 SFB 20% cuando las células se encontraban desancladas de la superficie. Para los distintos experimentos las HUVEC se sembraron según los requerimientos en placas de 6 pocillos para la determinación de SA-β-gal, en placas de 24 pocillos para inmunofluorescencia indirecta y ensayo de viabilidad celular con MTT o en placas de 60 mm para *Western-blot*. Para los diversos experimentos, previo a la adición de los diversos estímulos se cambió el medio de cultivo por M199 SFB 10% y las HUVEC fueron tratadas con diversas condiciones por tiempos determinados según correspondiera el ensayo. Para los ensayos de este trabajo se utilizaron células entre los pasajes 1-3.

4.3 Obtención y cultivo primario de FCrA

Se utilizó el protocolo previamente descrito por [112]. Se aislaron los FCrA macho C57BL/6 de 8-10 semanas de edad procedentes del bioterio de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile previa aprobación del comité de ética respectivo.

Brevemente los ratones fueron anestesiados con ketamina/xilazina (160/16 mg/kg peso por vía intraperitoneal) de acuerdo a lo establecido en las guías para la anestesia del IACUC de la Universidad de Iowa. Luego de 15 minutos aproximadamente, se confirmó la anestesia profunda. Después, se



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

quirúrgicas para seccionarlo de su unión a los grandes vasos venosos y arteriales (en este procedimiento el animal muere y sus restos son embolsados y almacenados a -20°C hasta su eliminación). Se extrajeron los corazones de 3 ratones, se trozaron conjuntamente y sometieron a un proceso de digestión con un 1,5 mL de solución 1 mg/mL de colagenasa tipo II (GIBCO™, Thermo-Fisher, USA) en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco con F12 (DMEM-F12; GIBCO™, Thermo-Fisher, USA) suplementado con 0,1% de BSA. Tras 90 minutos de digestión con agitación cada 10 minutos en tubos cónicos de 15 mL, se recolectaron las células en el sobrenadante para luego ser traspasadas a un nuevo tubo cónico de 15 mL y se inactivó la actividad enzimática adicionando 5 mL de DMEM-F12 con 0,1% BSA. Posteriormente, se sometió a centrifugación a 600g por 6 minutos a 4°C . Una vez finalizada, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en el precipitado previa disgregación mecánica del mismo con DMEM-F12 suplementado con 0,1% BSA. Se volvió a centrifugar por 6 minutos a 600g a 4°C y una vez terminado se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con SFB 20% y dejaron adherir en placas de cultivo P100 (Falcon®, Corning, USA) durante 40 minutos. Pasado este tiempo se cambió el medio y se suplementó con medio de cultivo fresco DMEM-F12 SFB20%.

Al día siguiente se lavaron las placas 3 veces con PBS 1X para eliminar restos celulares, así como eritrocitos presentes, dejando a los fibroblastos adheridos proliferar hasta que se alcanzara el punto de confluencia celular previo a inhibición de crecimiento por contacto con cambio de medio cada 2 días.

Una vez alcanzada la confluencia, los FCrA se lavaron 2 veces con PBS 1X y luego se adicionó 1 mL de tripsina 0.05% por 5 minutos tras lo cual se neutralizó la actividad enzimática con medio de cultivo DMEM-F12 SFB 10% cuando las células se encontraban desancladas de la superficie. Para los distintos experimentos los FCrA se sembraron según los requerimientos en placas de 6 pocillos para la determinación de actividad β -galactosidasa asociada a senescencia, en placas de 24 pocillos para ensayo de viabilidad celular con MTT o en placas de 60 mm para *Western-blot*. Para los diversos experimentos, previo a la adición de los diversos estímulos se cambió el medio de cultivo por DMEM-F12 y las células fueron tratadas con diversas condiciones por tiempos determinados según correspondiera el ensayo. Para los ensayos de este trabajo se utilizaron células entre pasaje 1-2.

4.4 Caracterización de células HUVEC

La identificación y caracterización de células endoteliales se estableció utilizando inmunofluorescencia indirecta para el factor VIII de coagulación o factor Von Willebrand como biomarcador únicamente presente por células endoteliales [113].

Las células HUVEC se sembraron en placas de 24 pocillos que contenían cubreobjetos de vidrio recubiertos con la matriz de colágeno tipo I. Después de 24 horas, el medio de cultivo fue removido



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

paraformaldehído 4% (Panreac Quimica; España) a temperatura ambiente.

Luego, las células se lavaron lentamente 3 veces con PBS 1X para retirar restos de la solución de fijado; tras lo cual, se realizó un bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente con una solución de BSA 1% y tritón 100X 0,1% (solución de bloqueo; Sigma-Aldrich; USA) en PBS 1X. Se adicionó el anticuerpo primario contra el factor VIII (dilución 1:100 en solución de bloqueo) (DAKO Corporation; USA) y se agitó la placa por 5 minutos para finalmente dejar incubando a 37°C durante toda la noche. Se utilizó como control de técnica un pocillo con HUVEC sin anticuerpo primario y control negativo del marcador células musculares lisas vasculares humanas obtenidas de aortas de donantes procedentes del Hospital Universitario de Getafe, España.

Al día siguiente, se lavaron las células 3 veces con PBS 1X y se adicionó el anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 647 (dilución 1:250; Molecular Probes-Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). La placa se incubó 1 hora a temperatura ambiente protegida de la luz. La contratinción nuclear, se expusieron las células por 5 minutos, temperatura ambiente y bajo agitación moderada a una solución acuosa 150 mM de la sonda nuclear 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Molecular Probes-Invitrogen Corporation; USA). Después, se lavaron las células una vez con PBS 1X y una última vez con agua ultrapura (H₂O Milli-Q®) para remover los remanentes de sales de la solución tampón.

Por último, se realizó el montaje de los cubre objetos de vidrio en un portaobjetos de vidrio utilizando el reactivo Prolong Gold Antifade (Life Technologies, Darmstadt, Alemania). Los portaobjetos con las células fueron almacenados en oscuridad a 4°C hasta su visualización mediante el microscopio confocal espectral Leica TCS SP5, AOBS (Leica Microsystems; Wetzlar, Alemania), acoplado a un microscopio invertido con fuentes láser diodo azul (405 nm), DPSS (561 nm), argón (488 nm) y helio-neón (594 nm, 633 nm); se utilizó el plan-apocromático X63 que registró las secciones en el plano Z cada 0.1 µm con aceite de inmersión (Merck Chemicals; Alemania) con la cámara de video digital Leica DFC 350FX. Las imágenes se almacenaron para su posterior visualización y análisis mediante el programa Image J versión 1.52a (National Institutes of Health; USA).

4.5 Tratamiento de los cultivos celulares

Para llevar a cabo los diferentes experimentos en las HUVEC y en los FCrA, éstas se mantuvieron en cultivo hasta llegar a un 75-80 % de confluencia. En este punto, se cambió el medio de crecimiento de las HUVEC reduciéndose el SFB de un 20 % a un 10 % y de 10 % a 0% respectivamente por un periodo de 24 horas antes del tratamiento, junto con los factores de crecimiento y antibióticos mencionados anteriormente. La reducción del porcentaje de suero se realizó con la finalidad de evitar posibles interacciones entre los fármacos y las sustancias presentes en el suero como por ejemplo proteasas, factores de crecimiento, entre otras, así como sincronización de las células en el mismo



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

recogen en la siguiente tabla (**Tabla 1**).

Tabla 1. Fármacos y solventes utilizados para los tratamientos realizados

Tipo celular tratado	Tratamiento	Solvente	Casa comercial
HUVEC / FCrA	Doxo	H2O Milli-Q®	Sigma-Aldrich, USA (D1515)
HUVEC	IL-1 β	H2O Milli-Q®	Preprotech, RU (200-01B)
FCrA	IL-1 β	H2O Milli-Q®	Cell Signaling TECHNOLOGY®, USA (5204SC)
HUVEC/ FCrA	RvE1	Etanol absoluto	Cayman Chemical Company, USA (10007848)
HUVEC	MCC950	H2O Milli-Q®	Sigma-Aldrich, USA (Cp-456773)
FCrA	MCC950	H2O Milli-Q®	Calbiochem®, Merck, USA (5.38120)
HUVEC	Anakinra	H2O Milli-Q®	Swedish Orphan Biovitrum AB, Suecia (Kineret®)
FCrA	Antagonista recombinante humano del receptor IL-1	H2O Milli-Q®	Sigma-Aldrich, USA (SRP3327)

4.6 Detección de *specks* por inmunofluorescencia indirecta

La activación del inflammasoma NLRP3 se determinó mediante la detección y visualización de la formación de *specks* de ASC. Se empleó inmunofluorescencia indirecta para esto por su tamaño relativamente grande como una estructura toroidal y perinuclear. La tinción siguió el mismo protocolo descrito en la subsección 4.4 pero utilizando como anticuerpo primario anti-ASC (dilución 1:150; Enzo Life, Science, USA) y el anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 647 (dilución 1:250; Molecular Probes-Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Finalmente, se realizó contratinción nuclear con DAPI (Molecular Probes-Invitrogen Corporation; USA).



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

fue realizada por el conteo manual directo de 17 campos radiales en cada muestra con el objetivo 100X del microscopio invertido de epifluorescencia Eclipse TE300 (Nikon; Tokyo, Japón). Las imágenes representativas se registraron en el microscopio confocal espectral Leica TCS SP5, AOBs previamente descrito.

4.7 Determinación de viabilidad celular por reducción del MTT

Las células HUVEC o FCRA se sembraron en placas de 24 pocillos en una densidad de 10.000 células por pocillo y una vez finalizado el tiempo de estímulo se cambió el contenido de cada pocillo 500 μ L de medio por M199 suplementado con SFB 1% o DMEM-F12 respectivamente con una solución de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT; Sigma-Aldrich, USA) 1 mg/mL para una concentración final en el pocillo de 0,1 mg/mL.

Se incubaron las placas protegidas de la luz por un periodo de 4 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ para permitir que las células metabólicamente viables reduzcan el MTT dando lugar a la formación de cristales insolubles de formazán. Finalmente, se retiró el medio y se disolvieron los cristales con 300 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO). Por cada pocillo se tomaron al menos 2 réplicas de 100 μ L en una placa de 96 pocillos para la lectura en el lector de microplacas multimodo ELISA reader (ELx800 reader, Biotek, Winooski, VT, USA) en España y BioTek™ Synergy™ 2 (BioTek Instruments, Inc, Winooski, Vermont, USA) en Chile a 540 nm de acuerdo a las indicaciones del proveedor del MTT. Se utilizaron pocillos con DMSO como blanco. Y se determinó el porcentaje de viabilidad celular respecto a la condición sin tratamiento considerada como 100% una vez substraído el blanco a todos los valores de absorbancia.

4.8 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*” (CS0030; Sigma-Aldrich, 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 30.000 células por pocillo para las HUVEC y 100.000 células por pocillo para FCRA en medio M199 suplementado con 20 % SFB o DMEM-F12 suplementado con 10% SFB respectivamente además de los factores de crecimiento y antibióticos necesarios. Una vez llegaron las células a un 70 % de confluencia se realizaron los tratamientos de interés detallados en la Tabla 1. Tras 24 horas 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 Na₂HPO₄; 14,7 mM de KH₂PO₄; 1,37 M de NaCl y 26,8 mM de KCl, diluida 1:10 en H₂O Milli-Q®.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

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 CO₂ para evitar variaciones en el pH de la solución por acidificación del medio. Transcurrido este tiempo se comprobó en el microscopio óptico a 20X 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 20X. Se contaron al menos 1.000 células en 8-12 campos diferentes aleatoriamente distribuidos en el pocillo por cada condición experimental, determinándose la relación entre la cantidad de células positivas y el número total de células presentes.

4.9 Extracción y cuantificación de proteínas para *Western-blot*

Para el análisis de proteínas por *Western-blot*, las células HUVEC y los FCrA fueron sembrados en placas de 60 mm a una densidad de 100.000 y 200.000 células respectivamente en los medios M199 suplementado con SFB al 20% y DMEM-F12 suplementado con SFB 10% según correspondiera. Cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia se trataron con los diferentes estímulos por un periodo de 24 horas a 37 °C en un ambiente con 5% de CO₂. Tras las 24 horas se recolectó el medio de las placas y se preservó para futuras mediciones de citoquinas secretadas; las placas se lavaron 2 veces con PBS 1X y se adicionaron 70 μ L de tampón de lisis frío por un periodo de 3 minutos. Para las HUVEC se empleó un tampón de lisis compuesto por 25 mM de Tris pH 7,9; 0,5 mM de EDTA; 0,5 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF); 12,5 μ g/mL de aprotinina y 10 mM de ortovanadato, todos procedentes de Sigma-Aldrich (USA); mientras que para los FCrA se empleó un tampón de lisis RIPA con una mezcla cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa todos procedentes de Sigma-Aldrich (USA).

Después, con ayuda de un raspador de plástico o *scraper*, se levantaron las células mecánicamente y se recogió el contenido de las placas en tubos eppendorf que se incubaron durante al menos 15 minutos en hielo con agitación con vórtex cada 3-5 minutos para facilitar la disgregación de



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

durante 1 minuto a 4°C y 15.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se recogió en nuevos tubos eppendorf, mientras que el precipitado se descartó al presentar los restos celulares y de membranas no deseados. Se determinó la concentración de proteínas por cuantificación colorimétrica mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) con el kit comercial (Pierce™ BCA™; Thermo Fisher, USA) y por el método de Bradford (Sigma-Aldrich, USA) respectivamente para HUVEC y FCrA.

4.10 Separación y detección de proteínas de interés por *Western-blot*

Una vez conocida la concentración de proteínas presente en cada muestra, se diluyeron una de ellas en tampón de carga 4X (1:3) compuesto por 125 mM de Tris, 2 % de dodecilsulfonato sódico (SDS), 5 % de glicerol, 1 % de β-mercaptoetanol y 0,025 % de azul de bromofenol procedentes de Sigma-Aldrich (USA). Las muestras con tampón de carga fueron hervidas por 5 minutos a 100°C, para la desnaturalización térmica de las proteínas y una vez frías a temperatura ambiente se almacenaron hasta su uso a -20°C.

Las muestras de proteínas de lisados celulares se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se cargaron 20 µg de proteína por muestra en cada carril del gel, sometiéndose a las muestras a una corriente constante de 90-120 V durante aproximadamente 1-2 horas. Una vez separadas las proteínas se realizó la transferencia de éstas a una membrana de 0,45 µm de diámetro de poro de fluoruro de polivinilideno (PVDF; Immobilon-P, Merck, Alemania), durante 2-3 horas a 350 mA constantes. Una vez finalizada la transferencia de las proteínas separadas a la membrana de PVDF, dependiendo de la proteína de interés se bloquearon por 1 hora a temperatura ambiente en agitación posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos primarios en las membranas con una solución de 5% p/v BSA o 5% p/v de leche descremada en solución de tampón salino de Tris y Tween 20 (TTBS) compuesto por 0,1 M de NaCl; 0,01 M de Tris pH 7,5 y Tween 20 al 0,01% v/v, procedentes de Sigma-Aldrich (USA).

Tras retirar la solución de bloqueo y realizar 3 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con TTBS, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario de interés tal y como se recogen en la Tabla 2, y se dejaron en incubación a 4°C durante toda la noche. Una vez transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con TTBS para eliminar los restos de anticuerpo y se añadieron los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) (Tabla 3) por 1-2 horas a temperatura ambiente.

Finalmente, pasado el tiempo de incubación del anticuerpo secundario, las membranas se lavaron 3 veces por 5 minutos a temperatura ambiente con TTBS y se procedió a la visualización de las proteínas mediante una reacción de bioluminiscencia. Las membranas se incubaron con una mezcla

Rad; USA) que al reaccionar con el HRP del anticuerpo secundario permitió la liberación de luz. Esta luz se detectó con ayuda de un analizador de imagen (Chemidoc™ XRS System, Bio-Rad; USA y Syngene G: BOX Chemi XT4; Reino Unido, en España y Chile respectivamente) acoplado a un computador. Las bandas inmunorreactivas obtenidas se analizaron y cuantificaron mediante el programa Image J versión 1.52a (National Institutes of Health; USA). La proteína β -actina se utilizó como control de carga en cada muestra de HUVEC, mientras que GAPDH fue utilizado como control de carga para las muestras de FCrA, normalizándose la densidad de las bandas problema en relación a dicha banda control de carga.

Tabla 2. Anticuerpos primarios y condiciones utilizadas para la detección de proteínas por *Western-blot*

Anticuerpo primario	Dilución	Especie	Condiciones de incubación	Condiciones de bloqueo	Casa comercial
Anti- γ H2A.X	1:1.000	Conejo	Toda la noche a 4°C	1 hora en 5% BSA	Cell Signaling TECHNOLOGY®, USA (2577S)
Anti-p21	1:500	Ratón	Toda la noche a 4°C	1 hora en 5% BSA	Santacruz, USA (sc-6246)
Anti-p53	1:1.000	Ratón	Toda la noche a 4°C	30 minutos en 5% BSA	Santacruz, USA (sc-126)
Anti-p53	1:1.000	Ratón	Toda la noche a 4°C	1 hora en 5% BSA	Cell Signaling TECHNOLOGY®, USA (2524S)
Anti-fosfo-P65	1:1.000	Conejo	Toda la noche a 4°C	1 hora en 5% BSA	Cell Signaling TECHNOLOGY®, USA (3033S)
Anti-NLRP3	1:1.000	Ratón	Toda la noche a 4°C	1 hora en 5% BSA	AdipoGen, Suiza (AG-20B-0014)
Anti-NLRP3	1:1.000	Conejo	Toda la noche a 4°C	1 hora en 5% BSA	Cell Signaling TECHNOLOGY®, USA (15101S)



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

			a 4°C	BSA	(AF-401-NA)
Anti- β -actina acoplado a peroxidasa	1:10.000	Anticuerpo monoclonal conjugado a HRP	1 hora a temperatura ambiente	1 hora en 5% leche descremada	Sigma-Aldrich, USA (A3854)
Anti-GAPDH	1:1.000	Conejo	Toda la noche a 4°C	1 hora en 5% leche descremada	Cell Signaling TECHNOLOGY®, USA (2118)

Tabla 3. Anticuerpos secundarios y condiciones utilizadas para la detección de los anticuerpos primarios en *Western-blot*

Anticuerpo secundario	Dilución	Condiciones de incubación	Casa comercial
Anti-ratón	1/10.000	1 hora a temperatura ambiente	Merck Millipore Corporation, USA (AP127P)
Anti-conejo	1/10.000	1 hora a temperatura ambiente	Bio-Rad, USA (170-6515)
Anti-cabra	1/1.000	1 hora a temperatura ambiente	Benthyll Laboratories, USA (A50-201P)
Anti-conejo	1/5.000	2 horas a temperatura ambiente	Cell Signaling TECHNOLOGY®, USA (7074)
Anti-ratón	1/5.000	2 horas a temperatura ambiente	Cell Signaling TECHNOLOGY®, USA (7076)

4.11 Cuantificación de citoquinas por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

Para el estudio y determinación de las citoquinas producidas y liberadas por las HUVEC y FCrA se utilizó la técnica de cuantificación de citoquinas por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Las citoquinas cuantificadas fueron la IL-1 β para las HUVEC y la IL-1 β , IL-6, IL-10, la quimioquina derivada de queratinocitos (KC por sus siglas en inglés), MCP-1 y TNF- α para los FCrA, mediante los kits de ELISA RayBio Human IL-1 β (ELH-IL-1 β ; Raybiotech, USA) y MILLIPLEX® MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (MCYTOMAG-70K; Merck Millipore, USA),



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

en pg/mL para cada citoquina que después se normalizó respecto a la cantidad total de proteína obtenida previamente durante el raspado celular.

4.12 Análisis de la expresión génica de marcadores de senescencia e inflamación

4.12.1 Extracción de ARN mensajero

HUVEC se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de similar a la empleada en ensayos de *Western-blot*. Una vez finalizado el tiempo de estímulo se extrajo el ARN mensajero (ARNm) utilizando Trizol (NZYol; NZYTech Genes & Enzymes, Portugal).

Una vez aislado el ARN presente en las muestras, se cuantificó la concentración de ARNm presente en cada muestra, además de estudiar el rendimiento y la pureza del proceso. Para ello, se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop ND1000 (Nanodrop Technologies; Thermo Scientific, USA). Para cuantificar la cantidad de ARNm se realizaron 2 mediciones de la absorbancia de la muestra a 260 nm, que permitió la detección de ácidos nucleicos. Así mismo, la pureza se determinó por la proporción entre la medida de absorbancia a 260 nm y a 280 nm, siendo esta última la longitud de onda de absorción de las proteínas. Se consideró que un valor de relación 260/280 entre 1,8 y 2,0 aceptable en términos de pureza de la muestra.

4.12.2 Reacción de transcripción inversa

Para el estudio de la expresión de los genes asociados a senescencia o inflamación se necesitó la obtención de cadenas de ADN complementarias (ADNc) a partir del ARNm aislado previamente. Para ello, se llevó a cabo un protocolo de transcripción inversa o retrotranscripción (RT) que permitió la obtención de ADNc a partir de nuestra muestra por complementariedad de bases.

Para la reacción de transcripción inversa se utilizó un kit comercial “NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit, (NZYTech Genes & Enzymes, Portugal). El kit contenía los cebadores (NZYRT 2x Master mix) necesarios para la unión de la enzima transcriptasa a la hebra de ARNm, una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), MgCl₂, y un buffer de optimización para la retrotranscripción. Adicionalmente, se necesitó la mezcla de enzima (NZYRT) que contenía la enzima transcriptasa inversa RNasa H minus procedente de *Escherichia coli* y un inhibidor de nucleasas para proteger al ARN de la degradación provocada por la contaminación con ribonucleasas. Para llevar a cabo dicha reacción, se partió de 0,5-1,0 µg de ARNm que se mezcló con los componentes del kit. Para la reacción de transcripción inversa se preparó una mezcla constituida por los NZYRT 2X Master mix, las enzimas NZYRT, el ARNm de nuestra muestra y agua libre de ARNasas. Esta mezcla se sometió a una serie de ciclos de incubación determinados por el fabricante que permitieron la hibridación y el desarrollo de la reacción. La incubación se llevó a cabo en un termociclador (ATC 401 versión 5.3.9; Nyx Technik, USA) realizándose los siguientes ciclos:



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

- 30 min a 50 °C (Fase de transcripción inversa).
- 5 min a 85 °C (Fase de inactivación).
- Fase de refrigeración a 4 °C.

Las muestras de ADNc se congelaron a -20 °C para su posterior utilización en la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (q-PCR).

4.12.3 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

Con el fin de estudiar la expresión de determinados genes de interés en las muestras de HUVEC, se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (q-PCR).

Para llevar a cabo la técnica de q-PCR, se utilizó el iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA), compuesto de iTaq DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂, el colorante SYBR Green I Dye, además de estabilizadores y potenciadores. La reacción se realizó en un sistema de PCR 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA) con los cebadores específicos de los genes que queríamos estudiar descritos en la Tabla 4. Para realizar la q-PCR utilizamos 2 µg (1 µL) de ADNc en un volumen final de 10 µL de solución formada por el SYBR Green, los cebadores directo y reverso además de agua bidestilada estéril. Como control constitutivo se estudió el gen que codifica para el ARN ribosomal 18S presente en todas las células.

Las condiciones para llevar a cabo la q-PCR fueron las siguientes:

- 20 segundos a 95°C (Fase de desnaturalización).
- 40 ciclos de 3 segundos a 95°C (Fase de hibridación).
- 30 segundos a 60°C (Fase de elongación).

Una vez amplificados los genes se relativizó su expresión en relación al gen constitutivo 18S. Para esto, se usó el método de cuantificación relativa, mediante la comparación del valor de ciclo umbral (Ct), comparando la Ct obtenida por cada cebador con la Ct obtenida por el constitutivo 18S. Dicha comparación se expresó como la variación de Ct (2- $\Delta\Delta$ Ct, comparative Ct method, User Bulletin #2, ABI Prism 7700 SDS; Applied Biosystems, USA).

Tabla 4. Cebadores utilizados para el análisis de la expresión genética en HUVEC

Gen	Cebador directo	Cebador reverso
p53	5' CCAGCCAAAGAAGAAACCAC 3'	5' CCTCATTCAGCTCTCGGAAC 3'
p21	5' GTCACTGTCTTGTACCCTTGTG 3'	5' CGGCGTTTGGAGTGGTAGAAA 3'
NLRP3	5' GATCTTCGCTGCGATCAACA 3'	5' GGGATTCGAAACACGTGCATTA 3'
IL-1 β	5' TGACCTGAGCACCTTCTTTC 3'	5' CCACTTGTTGCTCCATATCC 3'



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y
TOXICOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA

Resolvina E1 previene la senescencia inducida por

4.13 Análisis estadístico

Todos los resultados se presentan como el promedio \pm error estándar de la media para el número indicado de experimentos. En primer lugar, se evaluaron los supuestos de parametricidad con la normalidad y la homocedasticidad para cada variable respectivamente mediante el test de Shapiro-Wilk y Brown-Forsythe. Se utilizó un test t de student no pareado de dos colas (variables paramétricas) o un test Mann Whitney (variables no paramétricas) para determinar diferencias entre dos grupos. Se utilizó un Análisis de Varianza (ANOVA) seguido de un test post hoc de Dunnett T3 (variables paramétricas) o un test de Kruskal-Wallis seguido de un test post hoc de comparaciones múltiples de Dunn (variables no paramétricas) para determinar diferencias entre más de 2 grupos. Se definió diferencia estadísticamente significativa como un $p \leq 0,05$. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 9.0.2 (California, USA).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Caracterización de las células HUVEC

Las células HUVEC fueron caracterizadas mediante la observación de su aspecto morfológico bajo el microscopio de contraste de fase, comprobando su morfología poligonal, especialmente en confluencia, y su disposición en monocapa. Adicionalmente, se realizó la detección complementaria por inmunofluorescencia indirecta del factor von-Willebrand, presente de forma específica en células de tipo endotelial y macrófagos. Como se puede observar las células obtenidas resultaron positivas a la tinción (

Figura 7A) y además se utilizó un control negativo de tipo celular con células musculares lisas vasculares y un control negativo de la técnica sin anticuerpo primario para descartar tinción inespecífica por el anticuerpo secundario (

Figura 7B, 7C).

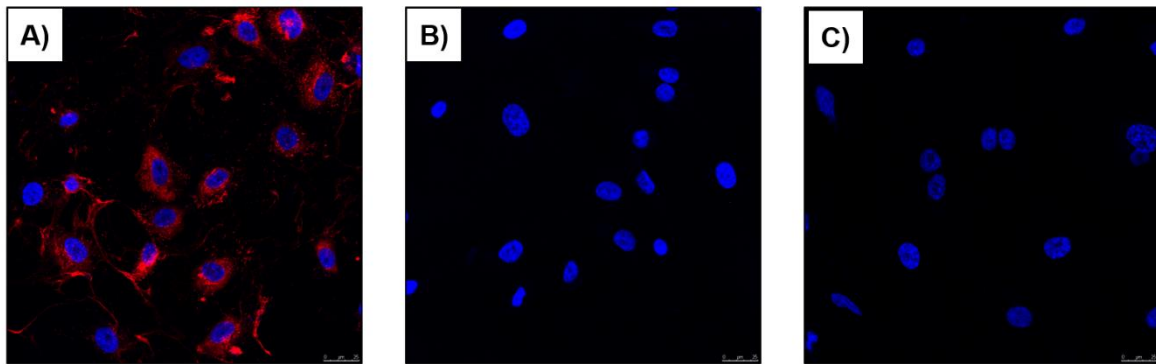


Figura 7. Caracterización de las células HUVEC.

(A) Caracterización de las HUVEC mediante tinción por inmunofluorescencia indirecta del factor endotelial von-Willebrand (rojo) (100X). (B) Control negativo del tipo celular con células musculares lisas vasculares. C) Control negativo de la técnica de inmunofluorescencia indirecta con ausencia de tinción al omitir el anticuerpo primario contra el factor endotelial von-Willebrand. Presencia de tinción nuclear de las células con DAPI (azul) (100X).

RESULTADOS

5.2 Doxo induce la senescencia en células HUVEC

Inicialmente, se determinó la viabilidad celular del cultivo de HUVEC por exposición a concentraciones crecientes de Doxo. Como se muestra en

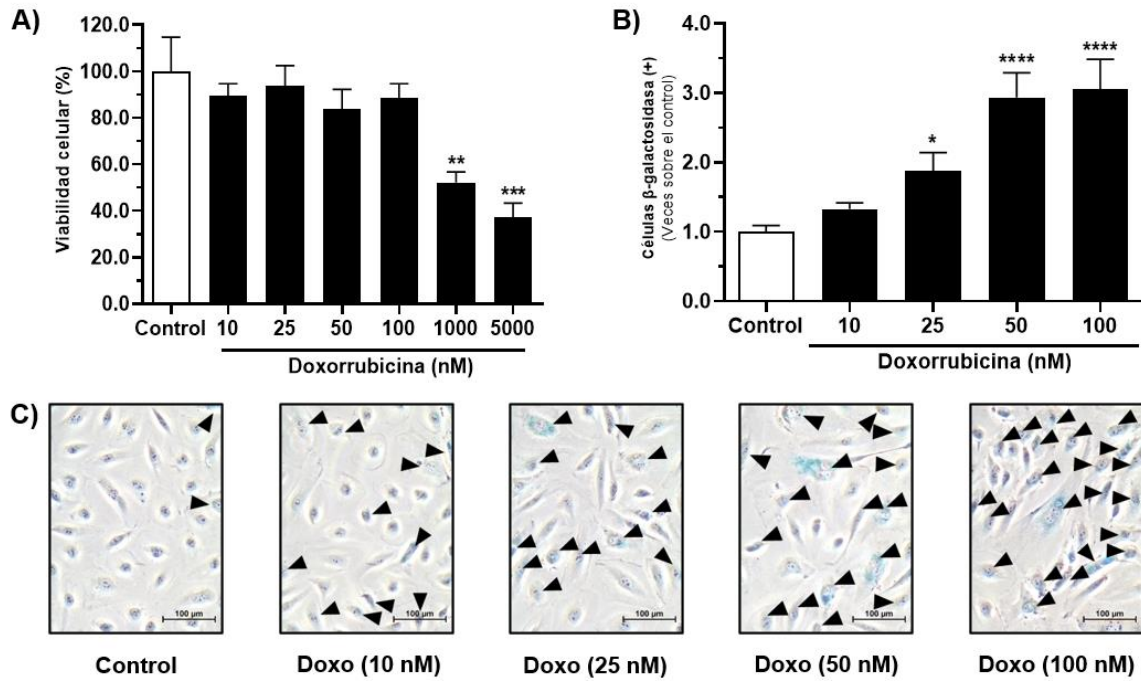


Figura 8A el tratamiento con Doxo por 24 horas en concentraciones de 10-100 nM no comprometió la viabilidad de las células; sin embargo, concentraciones de 1 y 5 μ M significativamente

disminuyeron la viabilidad celular en más de un 50% (

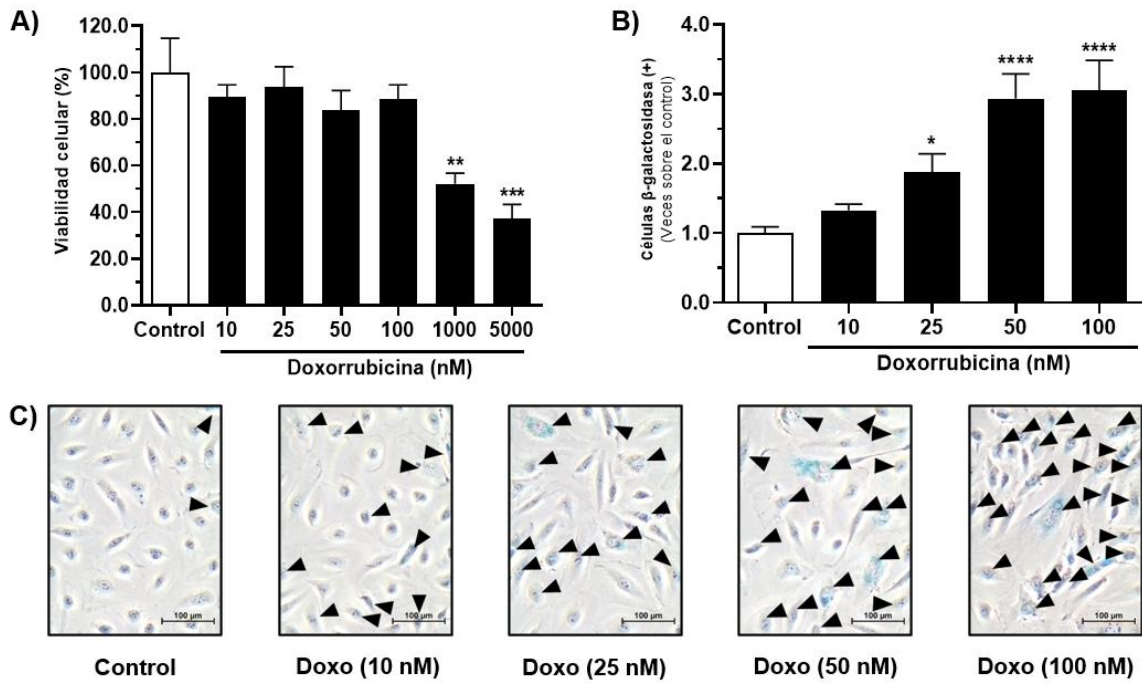


Figura 8A).

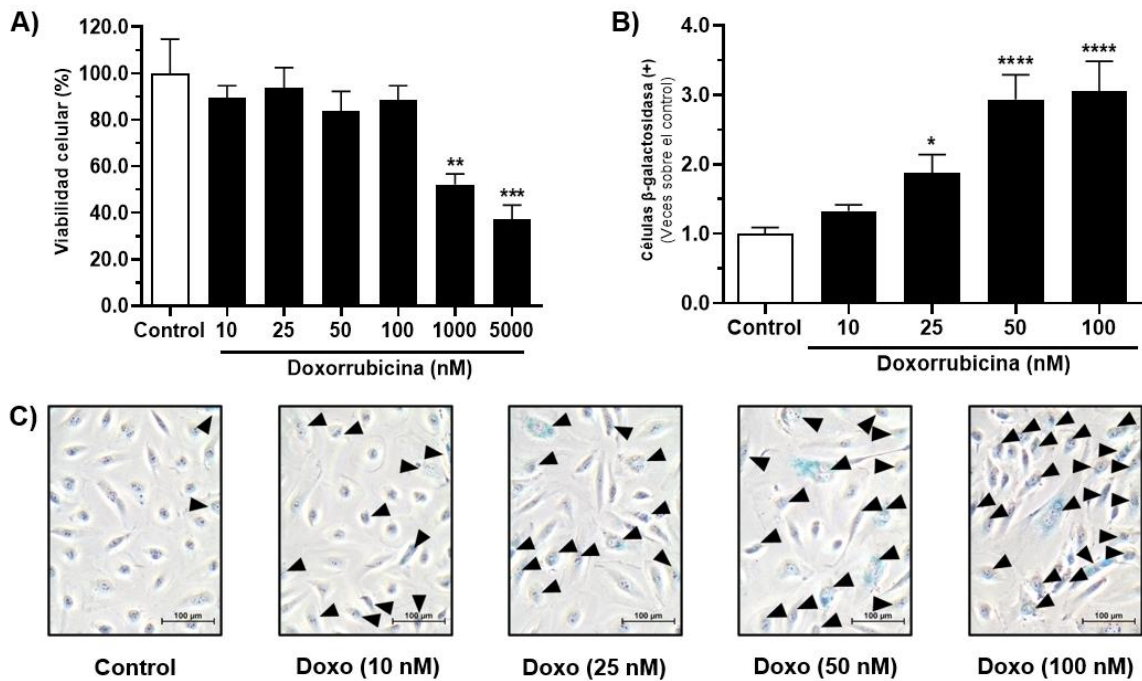


Figura 8. Doxo induce aumento de SA-β-gal en HUVEC sin comprometer la viabilidad celular.

RESULTADOS

(A) Viabilidad celular de HUVEC tratadas con Doxo (10, 25, 50, 100, 1000 y 5000 nM) por 24 horas, los resultados son expresados como porcentaje de viabilidad y como el promedio \pm E.E.M de 7 experimentos independientes. (B) Células positivas SA- β -gal cuantificadas por puntaje manual en HUVEC estimuladas por 24 horas con Doxo (10, 25, 50 y 100 nM), los resultados se expresan respecto al grupo control como el promedio \pm E.E.M de 6 experimentos independientes. (C) Imágenes representativas de contraste de fase de células positivas SA- β -gal (coloración azul-verde) indicadas con triángulos negros (20X, barra = 100 μ m). *p < 0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 vs. células control.

Posteriormente, el estímulo con concentraciones de Doxo (25-100 nM) que no comprometían la viabilidad de HUVEC produjo un incremento en las células positivas SA- β -gal, máximo a concentraciones de 50 y 100 nM (

Figura 8B, 8C).

A partir de este punto, se escogió la concentración de 25 nM de Doxo pues fue una concentración submáxima que no comprometía la viabilidad celular, a la que se observó aumento del marcador SA- β -gal, el *gold standard* de la senescencia celular. Doxo (25 nM) fue también capaz de incrementar significativamente la expresión de otros biomarcadores de senescencia. Así pues, la respuesta del daño al ADN fue evaluada mediante los niveles de proteína de la histona H2A.X fosforilada (γ H2A.X), la que aumentó $1,70 \pm 0,234$ veces sobre el control (

Figura 9A). Además, los niveles de ARNm del mediador de detención del ciclo celular, p53 y particularmente del inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas, p21 fueron incrementados respectivamente $6,97 \pm 2,10$ y $1,55 \pm 0,220$ veces sobre el control (

Figura 9D, 9E). De la misma forma los niveles de proteína aumentaron para p53, $1,51 \pm 0,253$ y para p21, $1,77 \pm 0,220$ veces sobre el control (

Figura 9B, 9C).

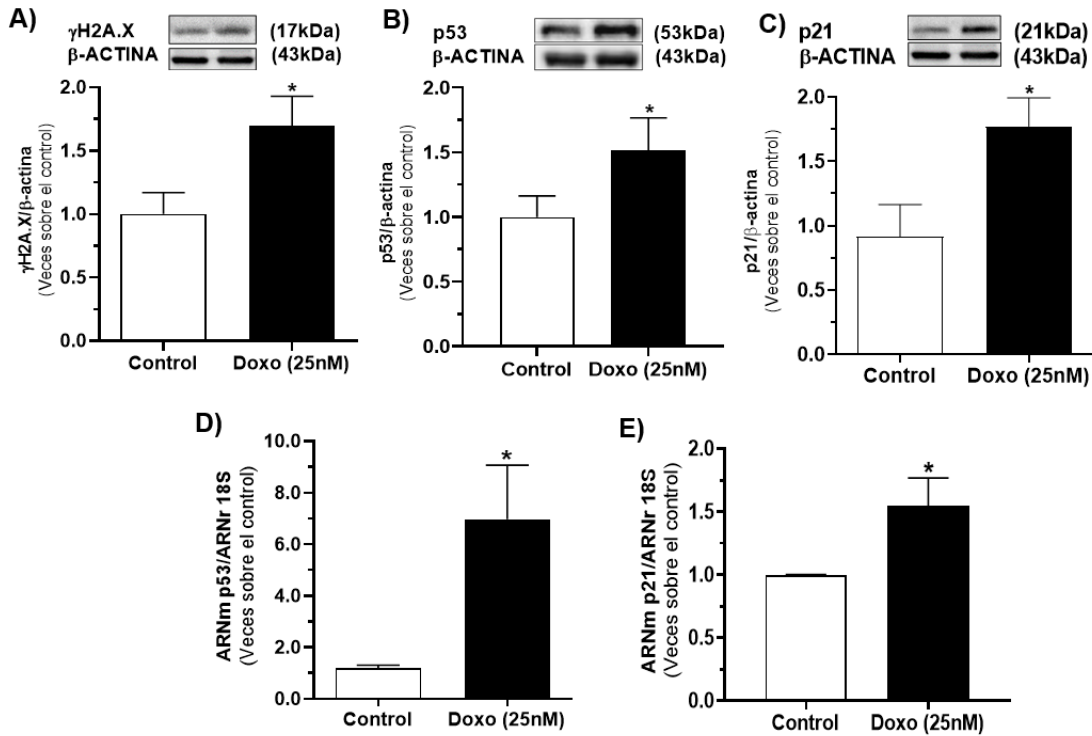


Figura 9. Doxo induce aumento de biomarcadores de senescencia de respuesta al daño al ADN y arresto de ciclo celular en HUVEC. Se analizaron los niveles proteicos de (A) γ H2A.X, (B) p53 y (C) p21 en las células HUVEC estimuladas por 24 horas con Doxo (25 nM). El panel superior muestra la imagen representativa de la proteína de interés y la constitutiva (β -actina); mientras que el inferior muestra el análisis gráfico de los resultados expresados respecto al grupo control como el promedio \pm E.E.M de 4-6 experimentos independientes. Se analizaron los niveles de ARNm de (D) p53 y (E) p21 en las células HUVEC estimuladas por 24 horas con Doxo (25 nM). Los resultados se expresan respecto al grupo control como el promedio \pm E.E.M de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs. células control.

5.3 Doxo induce la activación del inflammasoma NLRP3 en células HUVEC

A continuación, se analizó la capacidad de Doxo para inducir y activar en células endoteliales el complejo del inflammasoma NLRP3 asociado a las respuestas inmunes innatas. Las células HUVEC expuestas a Doxo 25 nM mostraron altos niveles de ARNm y proteínas involucradas en la fase de cebado del inflammasoma. Específicamente NLRP3 fue incrementado $3,30 \pm 0,599$ veces sobre el

RESULTADOS

control en mensajero y $1,49 \pm 0,048$ veces sobre el control en proteína (

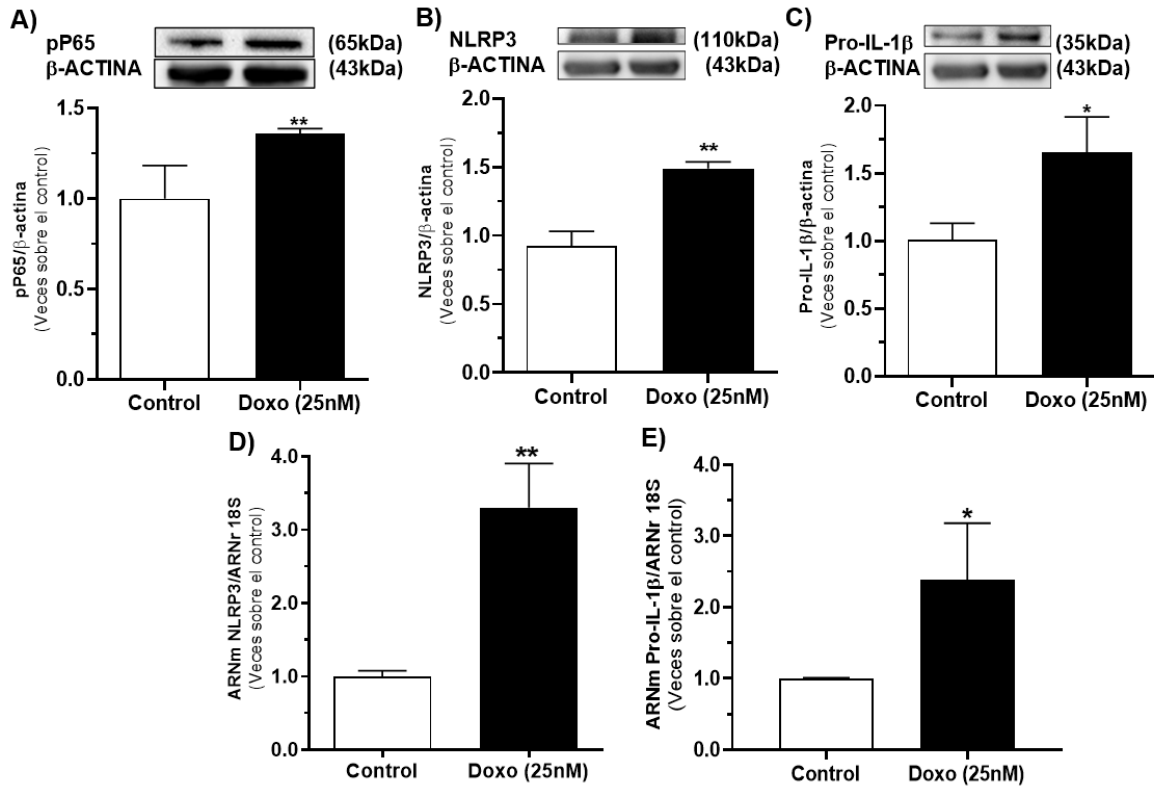


Figura 10B, 10D); de la misma manera, pro-IL-1 β fue aumentada $2,39 \pm 0,794$ veces sobre el control en mensajero y $1,66 \pm 0,261$ veces sobre el control en proteína (

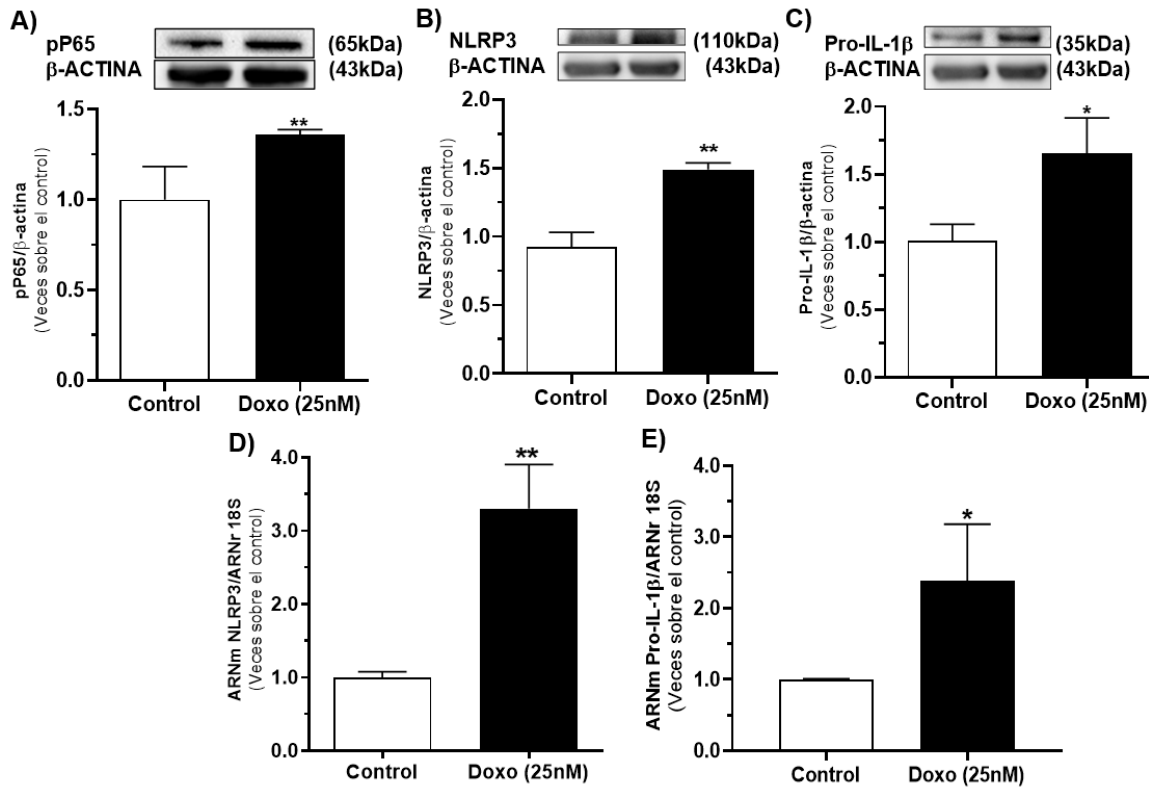


Figura 10C, 10E). Lo anterior se dio paralelo a la activación de la vía NF- κ B, un factor de transcripción central en respuestas inflamatorias que conduce a la expresión de ambas moléculas de la fase de cebado. Esto se hizo evidente mediante un aumento de los niveles de proteína fosforilada P65 (pP65) $1,54 \pm 0,185$ veces sobre el control (

Figura 10A).

Adicionalmente, se evaluó el ensamblaje del inflammasoma NLRP3 por inmunofluorescencia indirecta cuantificando la formación de *specks* de ASC. Doxo 25 nM fue capaz de duplicar el número de *specks* de ASC respecto a las células sin tratar a las 24 horas (**Figura 11A, 11B**). Consistentemente, la activación del inflammasoma NLRP3 se caracterizó mediante la formación y secreción de la citoquina madura IL-1 β como uno de sus productos principales. De hecho, Doxo 25 nM aumentó los niveles más de 50 veces respecto a los observado para el grupo control de HUVEC sin tratar (**Figura 11C**).

RESULTADOS

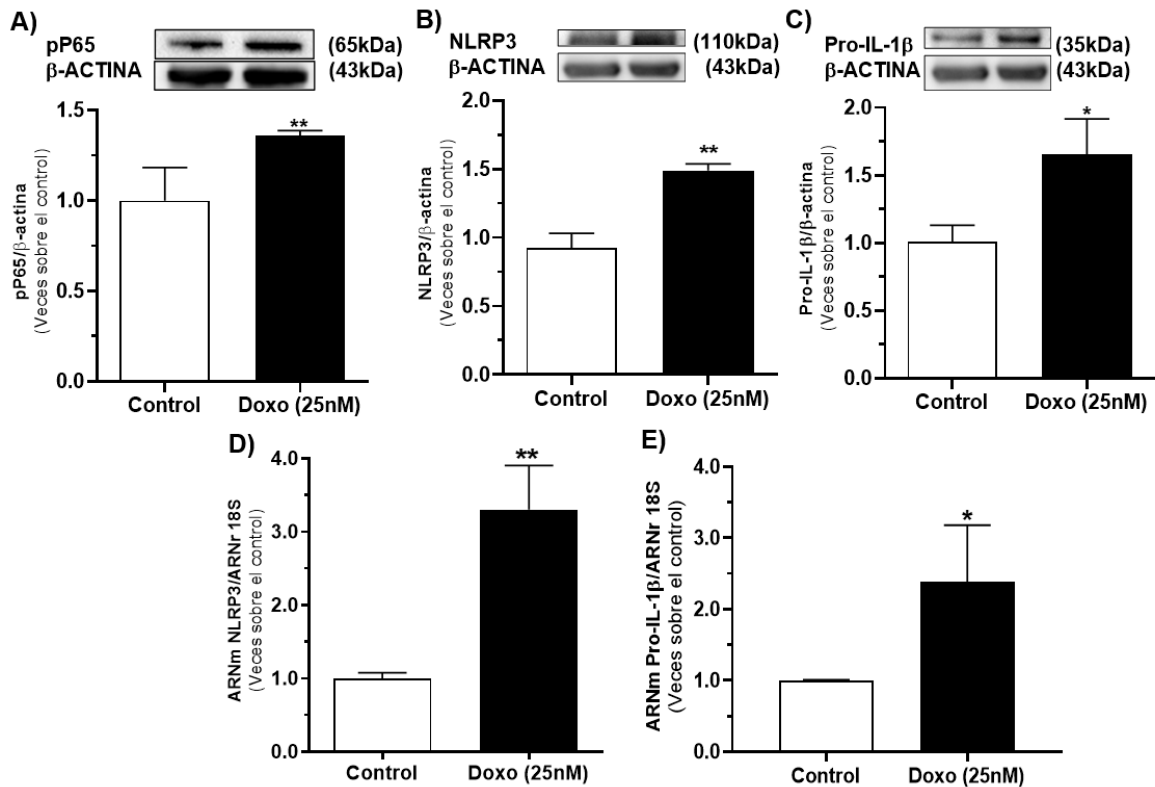


Figura 10. Doxo induce el cebado del inflammasoma NLRP3 en células HUVEC.

Se analizaron los niveles proteicos de (A) pP65, (B) NLRP3 y (C) pro-IL-1β en las células HUVEC estimuladas por 24 horas con Doxo (25 nM). El panel superior muestra la imagen representativa de la proteína de interés y la constitutiva (β-actina); mientras que el inferior muestra el análisis gráfico de los resultados expresados respecto al grupo control como el promedio ± E.E.M de 4-5 experimentos independientes. Se analizaron los niveles de ARNm de (D) NLRP3 y (E) pro-IL-1β en las células HUVEC estimuladas por 24 horas con Doxo (25 nM). Los resultados se expresan respecto al grupo control como el promedio ± E.E.M de 4 experimentos independientes. *p < 0,05; **p<0,01 vs. células control.

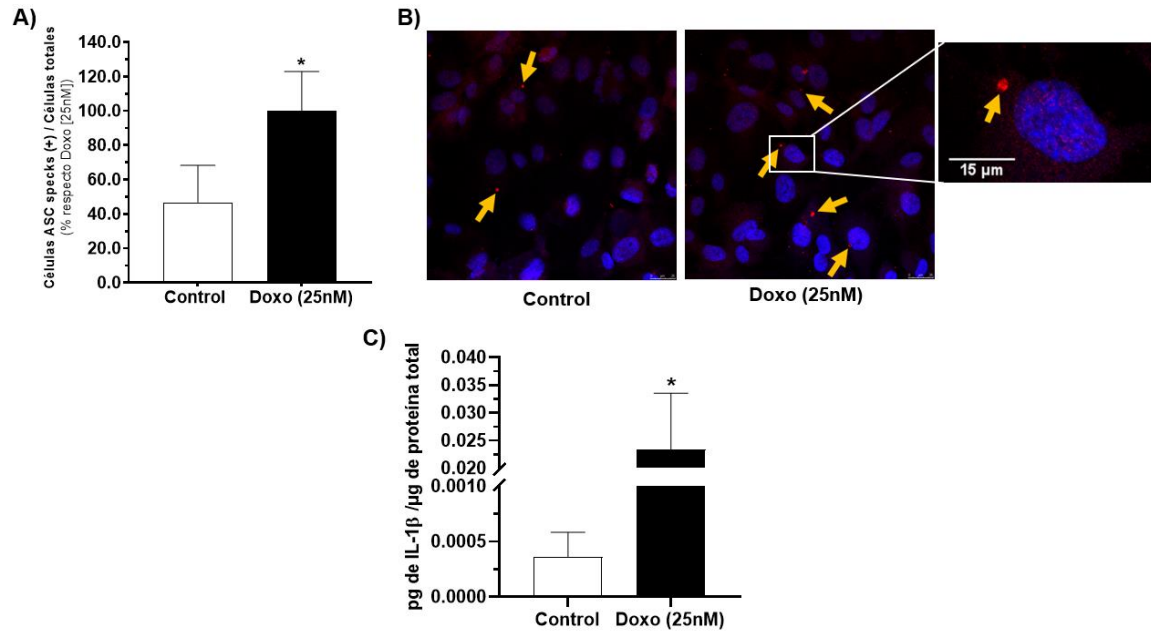
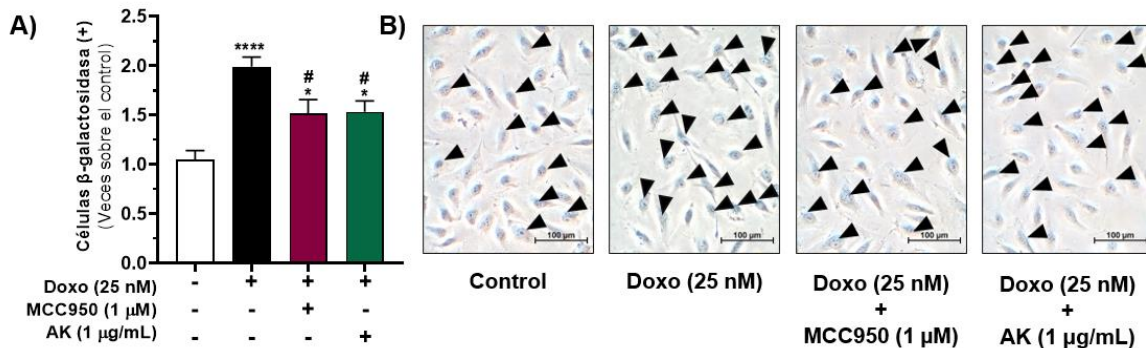


Figura 11. Doxo induce la activación del inflammasoma NLRP3 en células HUVEC.

Las células HUVEC se estimularon por 24 horas con Doxo (25 nM) y se tiñeron mediante inmunofluorescencia indirecta contra ASC. (A) Cuantificación de células positivas a “specks” de ASC respecto al total presentes en el campo. Los datos se presentan como porcentaje respecto a la respuesta inducida por Doxo 25 nM a las 24 horas como promedio \pm E.E.M de 4 experimentos independientes. (B) Imágenes representativas de la tinción por inmunofluorescencia indirecta contra ASC (rojo) observadas en el microscopio confocal (100X). Las flechas amarillas indican los “specks” de ASC. Presencia de tinción nuclear de las células con DAPI (azul). (C) Niveles de IL-1 β secretada en el sobrenadante celular de células HUVEC tratadas con Doxo (25 nM) por 24 horas. Los resultados se expresan como pg de citoquina secretada/ μ g de proteína total como promedio \pm E.E.M de 6 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs. células control no tratadas.

5.4 La senescencia endotelial inducida por Doxo es mediada por la activación del inflammasoma NLRP3

Posteriormente se evaluó si el inflammasoma NLRP3 y la liberación de IL-1 β estaban involucrados en la senescencia inducida por Doxo en HUVEC. El pretratamiento de las células con el inhibidor de la oligomerización de NLRP3, MCC950 (1 μ M) o con el fármaco antagonista del receptor de IL-1, Anakinra (AK; 1 μ g/mL) atenuó significativamente la tinción SA- β -gal provocada por Doxo 25 nM en HUVEC por un 28,2% \pm 4,43 y 28,8% \pm 2,53, respectivamente (



RESULTADOS

Figura 12A, 12B).

Adicionalmente, se estudió la respuesta de daño al ADN y los niveles del mediador de parada del ciclo celular en presencia de MCC950 y AK. Los resultados mostraron que ambos fármacos previnieron totalmente el aumento en los niveles de proteína γ H2A.X y p53 inducidos por Doxo 25nM en HUVEC a las 24 horas (Figura 13A, 13B).

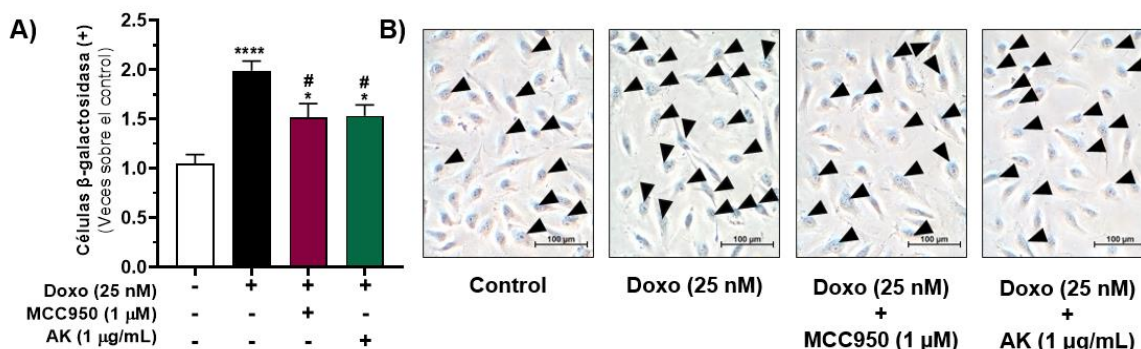


Figura 12. Aumento SA-β-gal inducido por Doxo en células HUVEC es mediado por activación del inflammasoma NLRP3.

(A) Células positivas SA-β-gal cuantificadas por puntaje manual en HUVEC estimuladas por 24 horas con Doxo (25 nM) en ausencia o presencia del inhibidor de la oligomerización de NLRP3, MCC950 (1 μM) o el antagonista del receptor de IL-1, anakinra (AK) (1 μg/mL), los resultados se expresan respecto al grupo control como el promedio ± E.E.M de 5 experimentos independientes. (B) Imágenes representativas de contraste de fase de células positivas SA-β-gal (coloración azul-verde) indicadas con triángulos negros (20X, barra = 100 μm). *p < 0,05; ****p < 0,0001 vs. células control; #p < 0,05 vs. células tratadas solamente con Doxo.

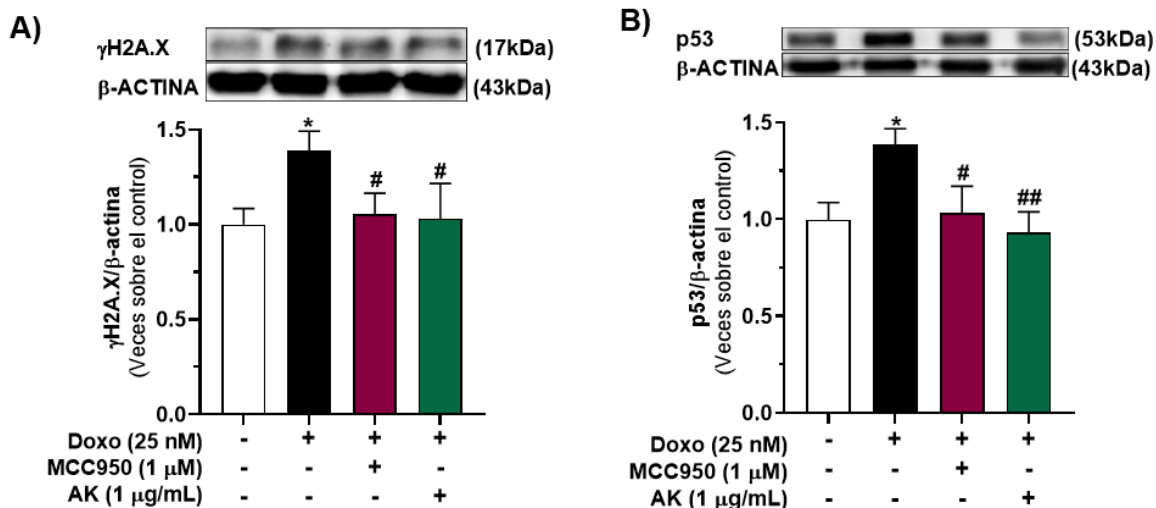


Figura 13. Aumento de γ H2A.X y p53 inducido por Doxo en células HUVEC es mediado por activación del inflammasoma NLRP3. Se analizaron los niveles proteicos de (A) γ H2A.X y (B) p53 en las células HUVEC estimuladas por 24 horas con Doxo (25 nM) en ausencia o presencia del inhibidor de la oligomerización de NLRP3, MCC950 (1 μ M) o el antagonista del receptor de IL-1, anakinra (AK) (1 μ g/mL). El panel superior muestra la imagen representativa de la proteína de interés y la constitutiva (β -actina); mientras que el inferior muestra el análisis gráfico de los resultados expresados respecto al grupo control como el promedio \pm E.E.M de 6 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs. células control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ vs. células tratadas solamente con Doxo.

5.5 RvE1 atenúa la senescencia endotelial inducida por Doxo

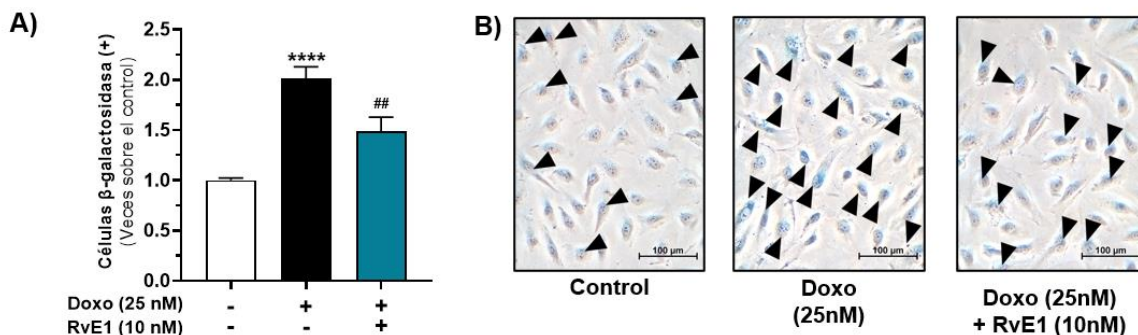


Figura 14. RvE1 atenúa el aumento inducido por Doxo de SA- β -gal en células HUVEC.

(A) Células positivas SA- β -gal cuantificadas por puntaje manual en HUVEC estimuladas por 24 horas con Doxo (25 nM) en ausencia o presencia del RvE1 (10 nM), los resultados se expresan respecto al grupo control como el promedio \pm E.E.M de 5 experimentos independientes. (B) Imágenes representativas de contraste de fase de células positivas SA- β -gal (coloración azul-verde) indicadas con triángulos negros (20X, barra = 100 μ m). **** $p < 0,0001$ vs. células control; ## $p < 0,01$ vs. células tratadas solamente con Doxo.

Considerando que los mecanismos pro-inflamatorios resultan, al menos en parte, ser mediadores de la senescencia endotelial inducida por Doxo, se estudió la capacidad del mediador lipídico pro-resolutivo, RvE1, para prevenir los efectos deletéreos del fármaco antineoplásico en HUVEC. Los resultados mostraron que RvE1 a una concentración de 10 nM que previamente fue establecida dentro

RESULTADOS

del grupo FARMAVASM como resolutora de frente a estímulos pro-inflamatorios [114], inhibió significativamente el aumento de SA- β -gal producido por Doxo en un $29,2\% \pm 4,99$ (**Figura 14A, 13B**).

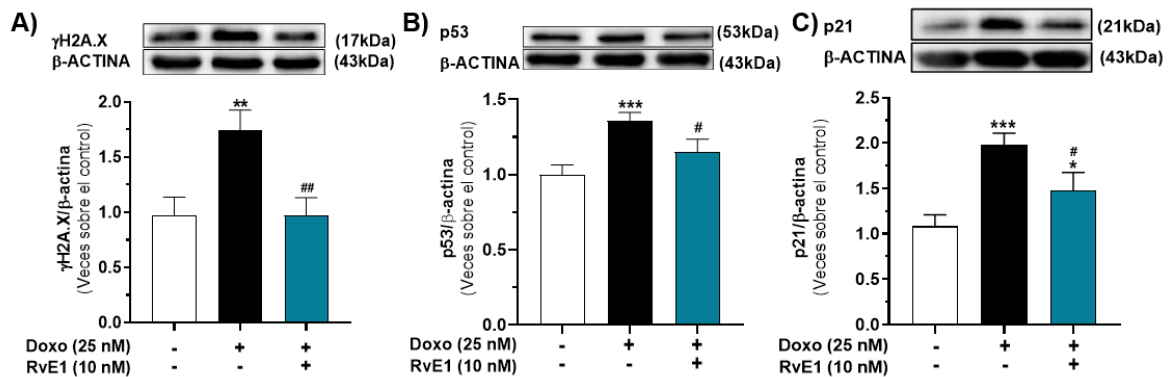


Figura 15. RvE1 atenúa el aumento inducido por Doxo de biomarcadores de senescencia de respuesta al daño al ADN y arresto de ciclo celular en células HUVEC.

Se analizaron los niveles proteicos de (A) γ H2A.X, (B) p53 y (C) p21 en HUVEC tratadas por 24 horas con Doxo (25 nM) en ausencia o presencia de RvE1 (10 nM). El panel superior muestra la imagen representativa de la proteína de interés y la constitutiva (β -actina); mientras que el inferior muestra el análisis gráfico de los resultados expresados respecto al grupo control como el promedio \pm E.E.M de 5-9 experimentos independientes. ** $p < 0,01$ vs. células control no tratadas; *** $p < 0,001$ vs. células control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ vs. células tratadas solamente con Doxo.

Adicionalmente, RvE1 también disminuyó significativamente la expresión proteica de γ H2A.X y p53 en HUVEC estimuladas con Doxo (**Figura 15A, 15B**); y de igual manera parcialmente atenuó los niveles de proteína p21 en estas células (**Figura 15C**).

5.6 RvE1 modula la activación del inflammasoma NLRP3 inducida por Doxo en células HUVEC

Para obtener información respecto a los posibles mecanismos moleculares por los cuales RvE1 es capaz de atenuar la senescencia endotelial inducida por Doxo, se evaluó el efecto de RvE1 en las vías de señalización NF- κ B y activación del inflammasoma NLRP3.

Los resultados mostraron que RvE1 fue capaz de atenuar el cebado del inflammasoma NLRP3 en HUVEC expuestas a Doxo 25nM por 24 horas. De hecho, suprimió significativamente el aumento inducido por Doxo de los niveles de proteína pP65, NLRP3 y pro-IL-1 β (**Figura 16A - 16C**).

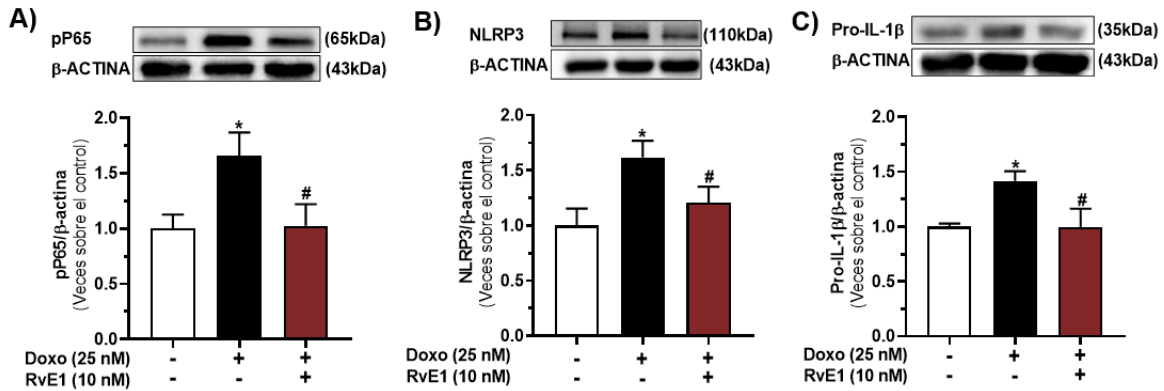


Figura 16. RvE1 previene el cebado del inflammasoma NLRP3 inducido por Doxo en células HUVEC.

Se analizaron los niveles proteicos de (A) pP65, (B) NLRP3 y (C) pro-IL1β en HUVEC tratadas por 24 horas con Doxo (25 nM) en ausencia o presencia de RvE1 (10 nM). El panel superior muestra la imagen representativa de la proteína de interés y la constitutiva (β-actina); mientras que el inferior muestra el análisis gráfico de los resultados expresados respecto al grupo control como el promedio ± E.E.M de 5-9 experimentos independientes. *p<0,05 vs. células control sin tratamiento; #p<0,05 vs. células tratadas solamente con Doxo.

En lo que respecta a la señal de ensamblaje y activación del inflammasoma NLRP3, RvE1 disminuyó significativamente el porcentaje de *specks* de ASC inducidos por Doxo en un $56,7\% \pm 15,3$; de igual manera, el inhibidor de la oligomerización de NLRP3, MCC950 redujo el porcentaje de *specks* de ASC en un $47,7\% \pm 18,9$ (Figura 17A, 16B). Finalmente, RvE1 fue capaz de reducir completamente el incremento en los niveles de la IL-1β madura a nivel intracelular (Figura 17C).

RESULTADOS

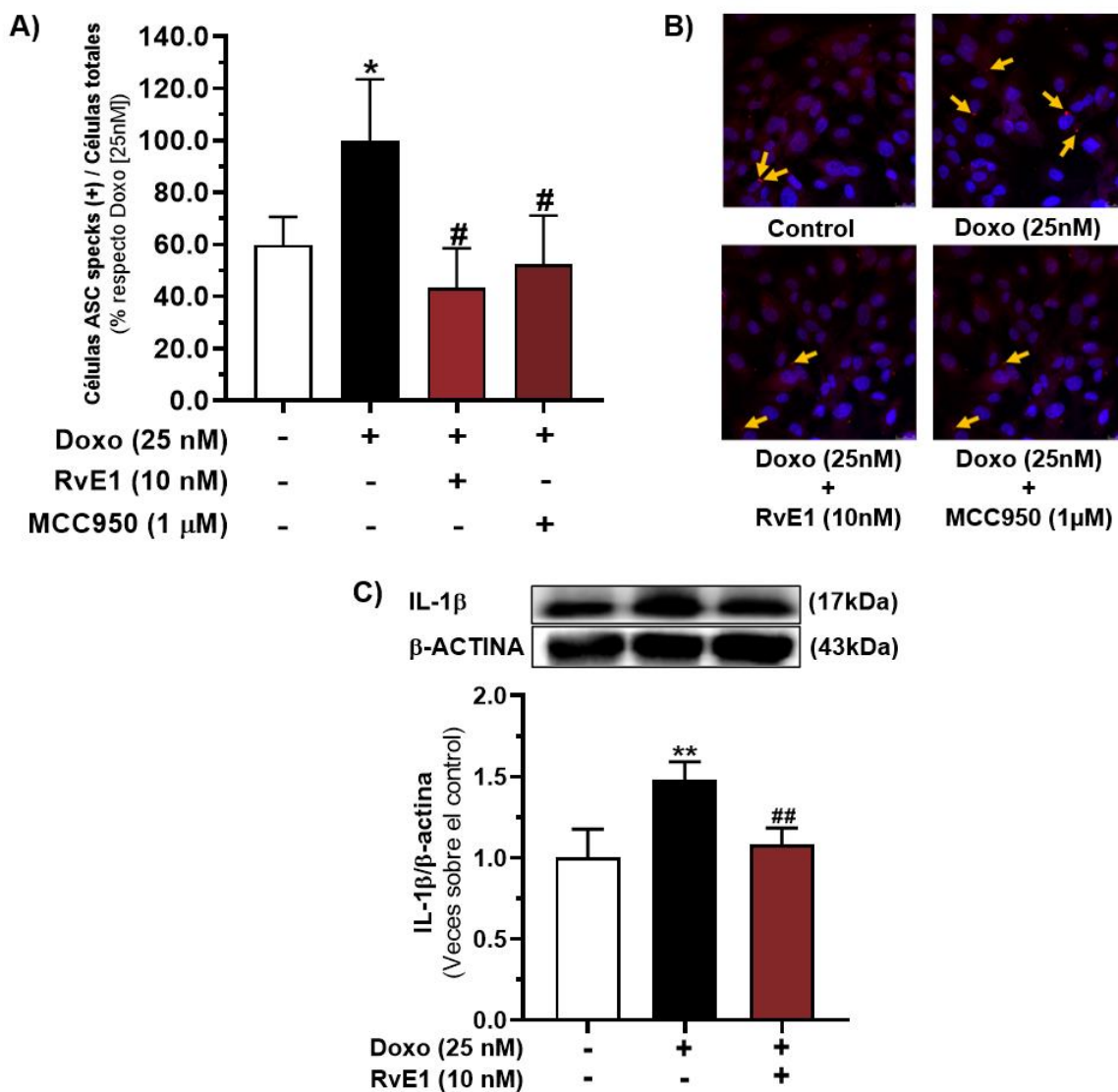


Figura 17. RvE1 previene la activación del inflammasoma NLRP3 inducido por Doxo en células HUVEC.

Las células HUVEC se estimularon por 24 horas con Doxo (25 nM) y se tiñeron mediante inmunofluorescencia indirecta contra ASC. (A) Cuantificación de células positivas a “specks” de ASC respecto al total presentes en el campo. Los datos se presentan como porcentaje respecto a la respuesta inducida por Doxo 25 nM por 24 horas en ausencia o presencia de RvE1 (10 nM) o MCC950 (1 μ M) como promedio \pm E.E.M de 4 experimentos independientes. (B) Imágenes representativas de la tinción por inmunofluorescencia indirecta contra ASC (rojo) observadas en el microscopio confocal (100X). Las flechas amarillas indican los “specks” de ASC. Presencia de tinción nuclear de las células con DAPI (azul). (C) Niveles de proteína intracelular de IL-1 β en células HUVEC tratadas con Doxo (25 nM) por 24 horas en ausencia o presencia de RvE1 (10 nM) o MCC950 (1 μ M). El panel superior muestra la imagen representativa de la proteína de interés y la constitutiva (β -actina); mientras que el inferior muestra el análisis gráfico de los resultados expresados respecto al control sin tratamiento como promedio \pm E.E.M de 5 experimentos independientes. * p <0,05; ** p <0,01 vs. células control sin tratamiento; # p <0,05; ## p <0,01 vs. células tratadas solamente con Doxo.

5.7 Doxo induce senescencia en FCrA

En un segundo abordaje se planteó la realización de experimentos en línea con los descritos hasta ahora, utilizando el otro tipo celular no muscular más abundante en el corazón, el fibroblasto cardiaco,

ampliamente reconocido por su capacidad secretora de MEC y en años recientes en su rol como célula centinela [115].

De la misma manera que en las células HUVEC, inicialmente se determinó la viabilidad celular del cultivo primario de FCrA en exposición a concentración de Doxo de 10 -1000 nM. Como se muestra en la Figura 18A Doxo 10 nM fue la única concentración que no comprometió significativamente la viabilidad de los fibroblastos; mientras que las concentraciones de 100 y 1000 nM redujeron la viabilidad celular en un 30 y 40% respectivamente (**Figura 18A**). Por lo anterior, se decidió escoger 10 nM como la concentración a utilizar en los siguientes experimentos.

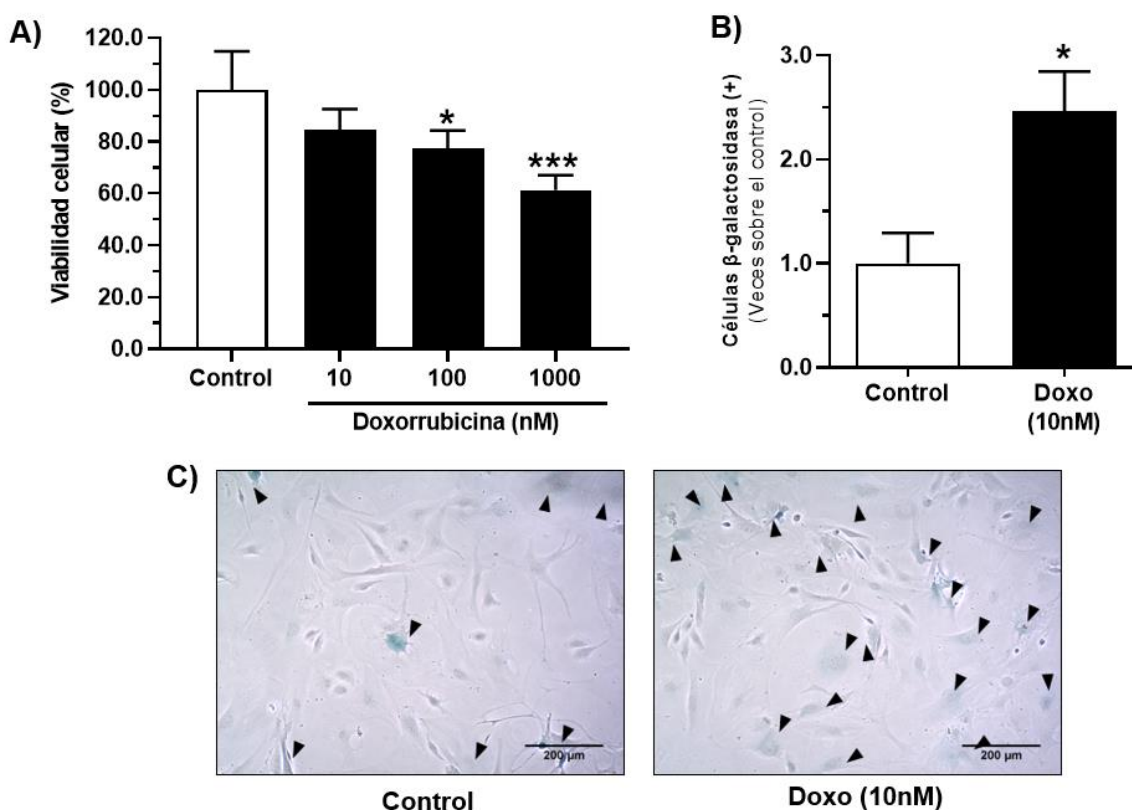


Figura 18. Doxo induce aumento de SA-β-gal en FCrA sin comprometer la viabilidad celular.

(A) Viabilidad celular de FCrA tratados con Doxo (10, 100 y 1000 nM) por 24 horas, los resultados son expresados como porcentaje de viabilidad y como el promedio \pm E.E.M de 9 experimentos independientes. (B) Células positivas β-galactosidasa asociada a senescencia cuantificadas por puntaje manual en FCrA estimulados por 24 horas con Doxo (10 nM), los resultados se expresan respecto al grupo control como el promedio \pm E.E.M de 3 experimentos independientes. (C) Imágenes representativas de contraste de fase de células positivas SA-β-gal (coloración azul-verde) indicadas con triángulos negros (20X, barra = 200 μm). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. células control.

Posteriormente, con el estímulo con Doxo (10 nM), concentración a la que no se compromete la viabilidad de FCrA, se observó un incremento del doble en las células positivas SA-β-gal (**Figura 18B, 18C**). Igualmente se aumentaron los niveles de proteína de γH2A.X, p53 y p21 de forma significativa respecto del control (**Figura 19A-19C**), indicando estos datos en su conjunto la inducción de senescencia por Doxo también en FCrA.

RESULTADOS

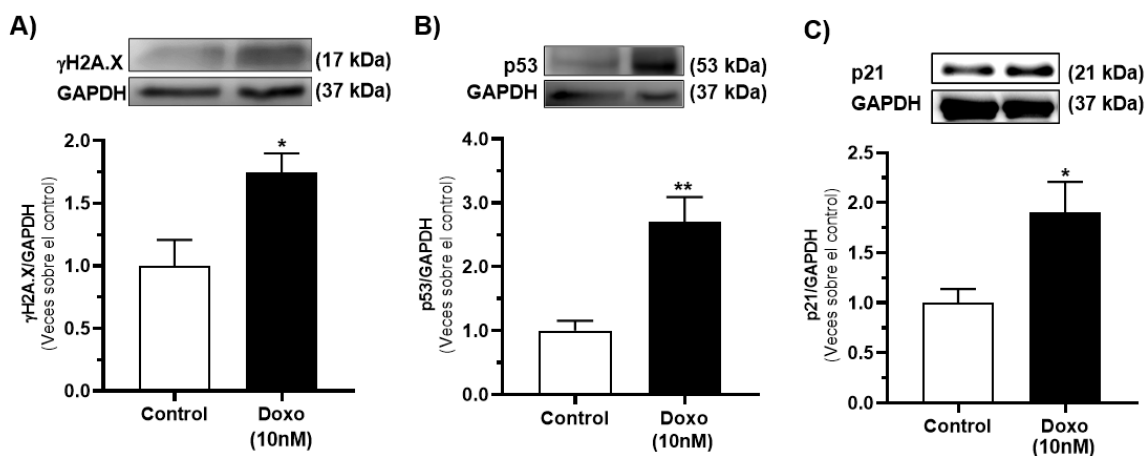


Figura 19. Doxo induce aumento de biomarcadores de senescencia de respuesta al daño al ADN y arresto de ciclo celular en FCrA. Se analizaron los niveles proteicos de (A) γ H2A.X, (B) p53 y (C) p21 en FCrA tratadas por 24 horas con Doxo (10 nM). El panel superior muestra la imagen representativa de la proteína de interés y la constitutiva; mientras que el inferior muestra el análisis gráfico de los resultados expresados respecto al grupo control como el promedio \pm E.E.M de 3-6 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. células control.

5.8 Doxorubicina induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en fibroblastos cardiacos de ratón adulto

Considerando la capacidad de Doxo para inducir la secreción de una citoquina pro-inflamatoria como IL-1 β observada en endotelio, se evaluó a continuación la secreción de un panel secretor de citoquinas y quimioquinas en FCrA inducida por Doxo (10 nM) a las 24 horas. Los resultados mostraron que el

antineoplásico indujo un aumento significativo de la secreción de IL-1 β , KC y MCP-1 (

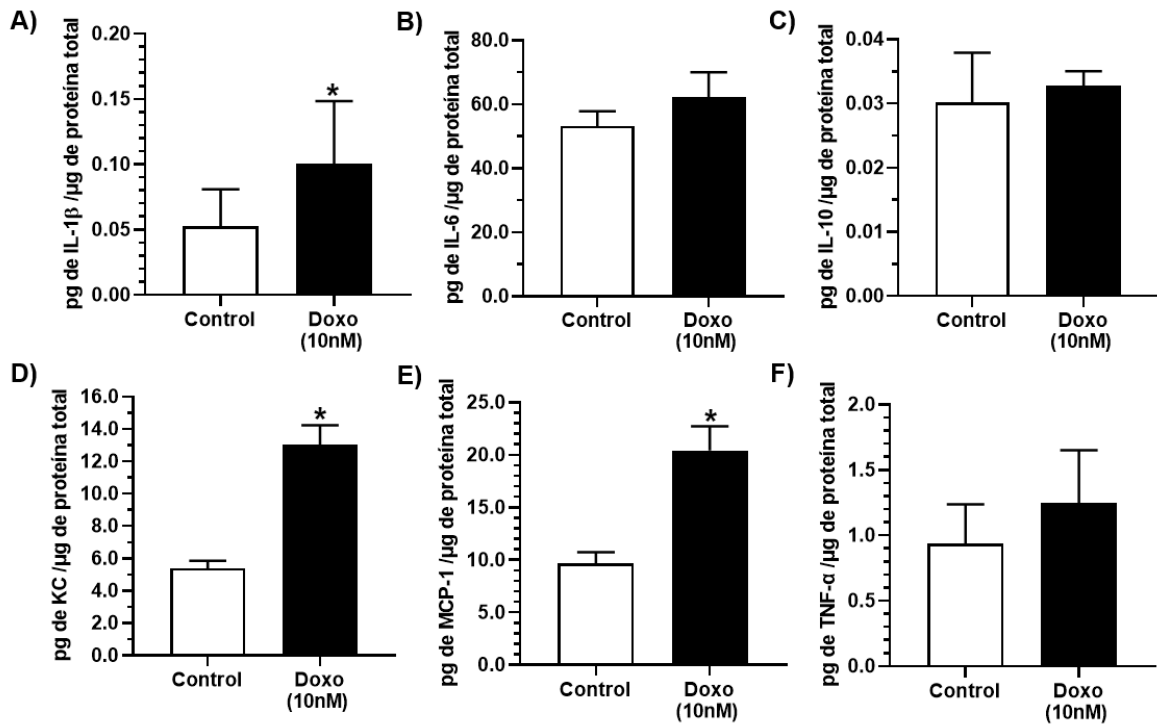


Figura 20A, 20D, 20E); sin embargo, Doxo no fue capaz de promover cambios en la secreción de IL-6, IL-10 o TNF- α (

Figura 20B, 20C, 20F).

RESULTADOS

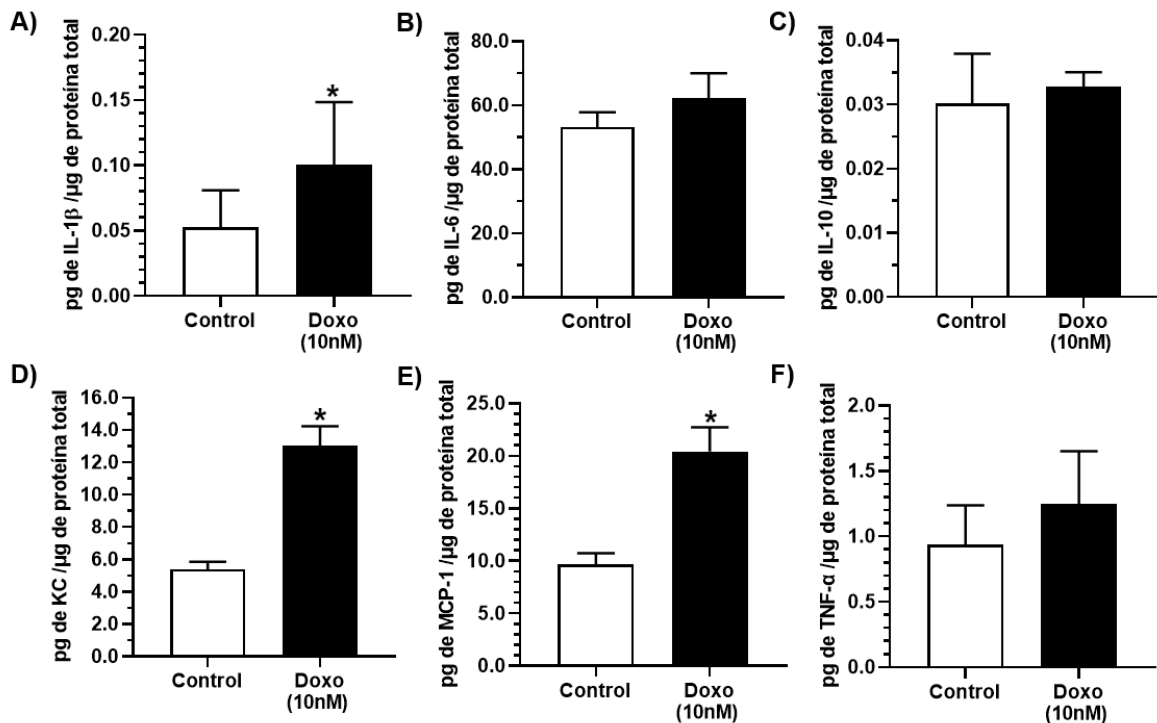


Figura 20. Doxo induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en FCrA.

Niveles de secreción de (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) IL-10, (D) KC, (E) MCP-1 y (F) TNF- α en el sobrenadante celular de FCrA de tratados con Doxo (10 nM) por 24 horas. Los resultados se expresan como pg de citoquina secretada/ μ g de proteína total como promedio \pm E.E.M de 4-5 experimentos independientes. *p < 0,05 vs. células control.

5.9 La SA- β -gal inducida por Doxo en FCrA es mediada por el ensamblaje del inflammasoma NLRP3 y el receptor IL1

Considerando el rol observado de la activación del inflammasoma NLRP3 como mediador de la senescencia inducida por Doxo en endotelio (

Figura 12, Figura 13) y considerando que en FCrA la Doxo (10 nM) fue capaz de inducir un aumento en la secreción de IL-1 β (

Figura 20A), se estudió si el sistema del inflammasoma NLRP3 podría modular el aumento de SA- β -gal observado con Doxo 10 nM.

Los resultados mostraron que, en el caso de los FCrA, el pretratamiento de las células tanto con el MCC950 (10 μ M) o con el antagonista endógeno del receptor de IL-1, IR1A (10ng/mL) atenuó

significativamente la tinción SA- β -gal provocada por Doxo (10 nM) (

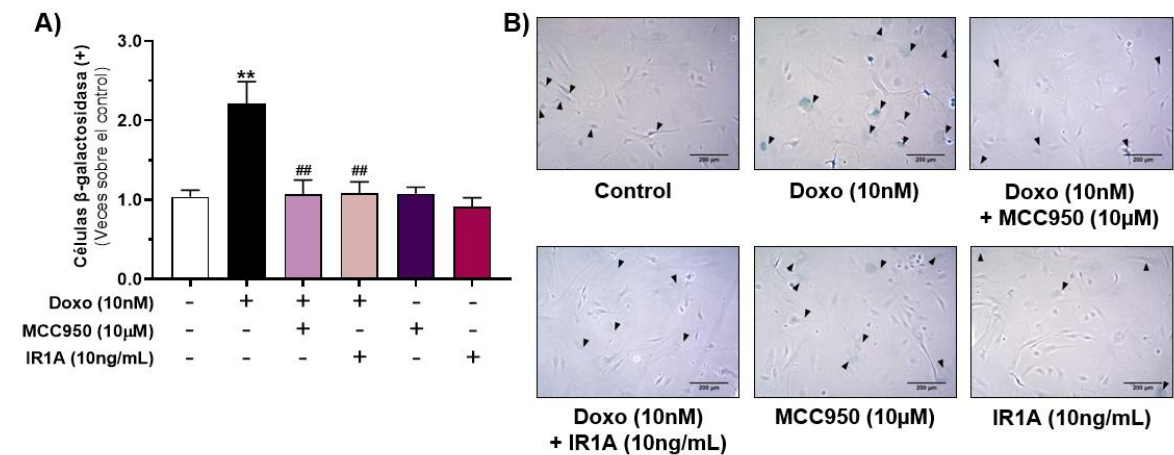


Figura 21).

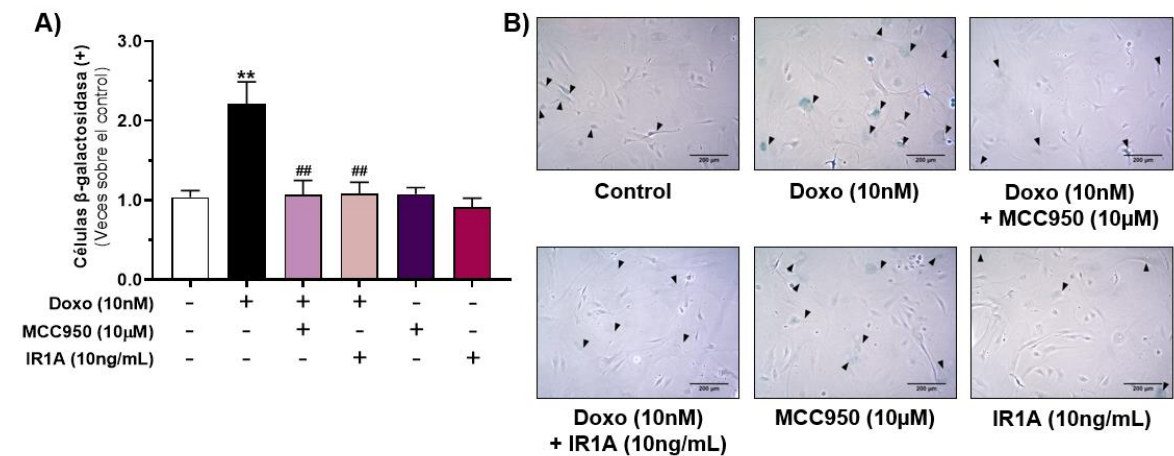


Figura 21. Aumento de SA- β -gal inducido por Doxo en FCrA es mediado por activación del inflammasoma NLRP3.

(A) Células positivas SA- β -gal cuantificadas por puntaje manual en FCrA estimulados por 24 horas con Doxo (10 nM) en ausencia o presencia del inhibidor de la oligomerización de NLRP3, MCC950 (10 μ M) el antagonista endógeno del receptor de IL-1, IR1A (10 ng/mL), los resultados se expresan respecto al grupo control como el promedio \pm E.E.M de 3 experimentos independientes. (B) Imágenes representativas de contraste de fase de células positivas SA- β -gal (coloración azul-verde) indicadas con triángulos negros (20X, barra = 200 μ m). ** p <0,01 vs. células control sin tratamiento; ## p <0,01 vs. células tratadas solamente con Doxo.

5.10 IL-1 β induce senescencia en FCrA

Dado que la senescencia en FCrA inducida por Doxo fue atenuada completamente con el IR1A, quisimos estudiar si la citoquina secretada, IL-1 β , por sí misma, podría desencadenar la senescencia celular en FCrA.

RESULTADOS

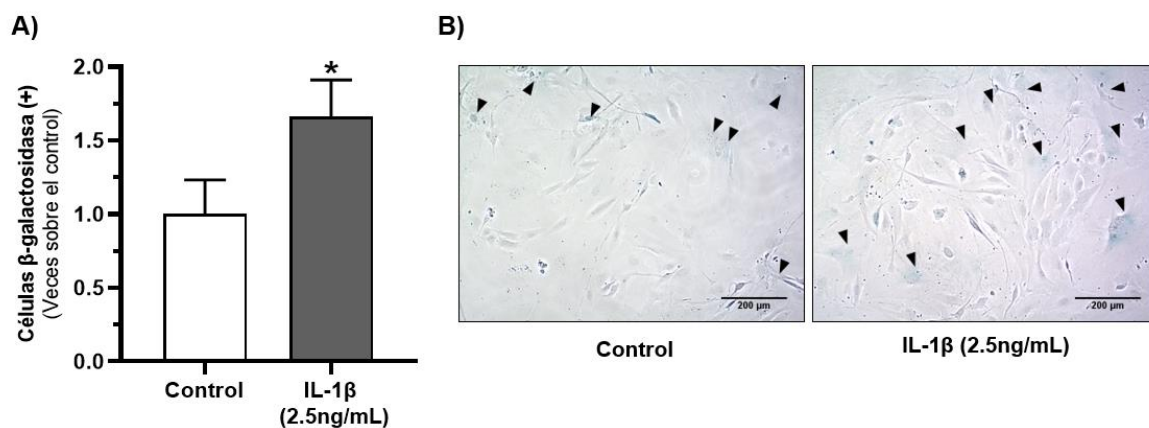


Figura 22. IL-1 β induce aumento de SA- β -gal en FCrA.

(A) Células positivas SA- β -gal cuantificadas por puntaje manual en FCrA estimulados por 24 horas con IL-1 β (2,5 ng/mL), los resultados se expresan respecto al grupo control como el promedio \pm E.E.M de 3 experimentos independientes. (B) Imágenes representativas de contraste de fase de células positivas SA- β -gal (coloración azul-verde) indicadas con triángulos negros (20X, barra = 200 μ m). * $p < 0,05$ vs. células control.

Para cumplir este objetivo, se utilizó IL-1 β exógena en los cultivos de FCrA. Los resultados mostraron que fue posible reproducir el efecto pro-senescente observado con Doxo (10 nM). De hecho, IL-1 β (2,5 ng/mL) por 24 horas incrementó 1,7 veces las células positivas SA- β -gal (**Figura 22A, 22B**) y se aumentaron significativamente los niveles de proteína de γ H2A.X, p53 y p21 (**Figura 23A-23C**).

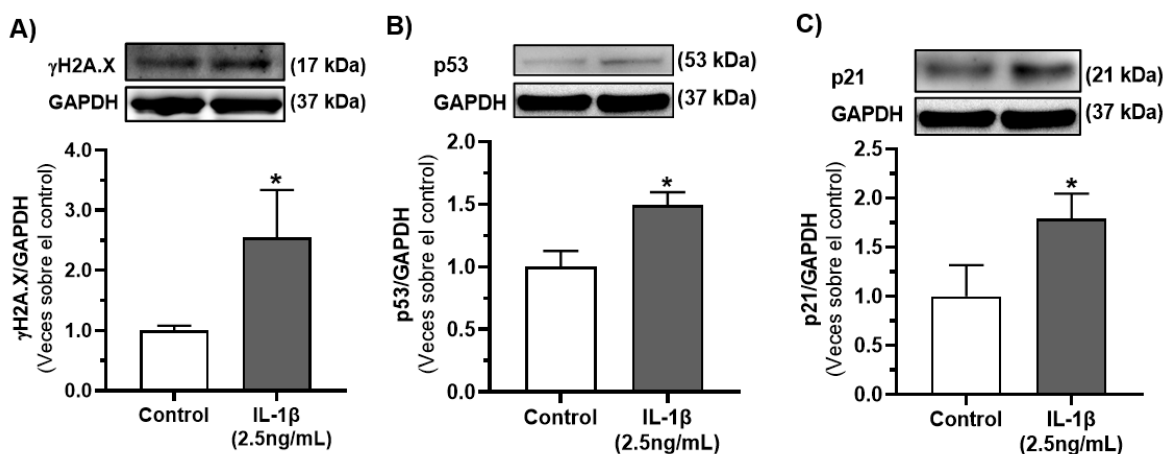


Figura 23. IL-1 β induce aumento de biomarcadores de senescencia de respuesta al daño al ADN y arresto de ciclo celular en FCrA.

Se analizaron los niveles proteicos de (A) γ H2A.X, (B) p53 y (C) p21 en FCrA tratadas por 24 horas con IL-1 β (2,5 ng/mL). El panel superior muestra la imagen representativa de la proteína de interés y la constitutiva (GAPDH); mientras que el inferior muestra el análisis gráfico de los resultados expresados respecto al grupo control como el promedio \pm E.E.M de 3-6 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs. células control.

5.11 IL-1 β induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en FCrA

Debido a que la IL-1 β secretada tras el estímulo con Doxo estaría induciendo la respuesta senescente en FCrA, se estudió también el panel secretor de citoquinas inducido por el estímulo con la IL-1 β 2,5 ng/mL por 24 horas. Así, se observó que la citoquina fue capaz de inducir la secreción de IL-1 β , IL-6, IL-10, KC, MCP-1 y TNF- α (Figura 24A-24F), incluso a niveles fueron mayores a los observados tras el estímulo con el antineoplásico.

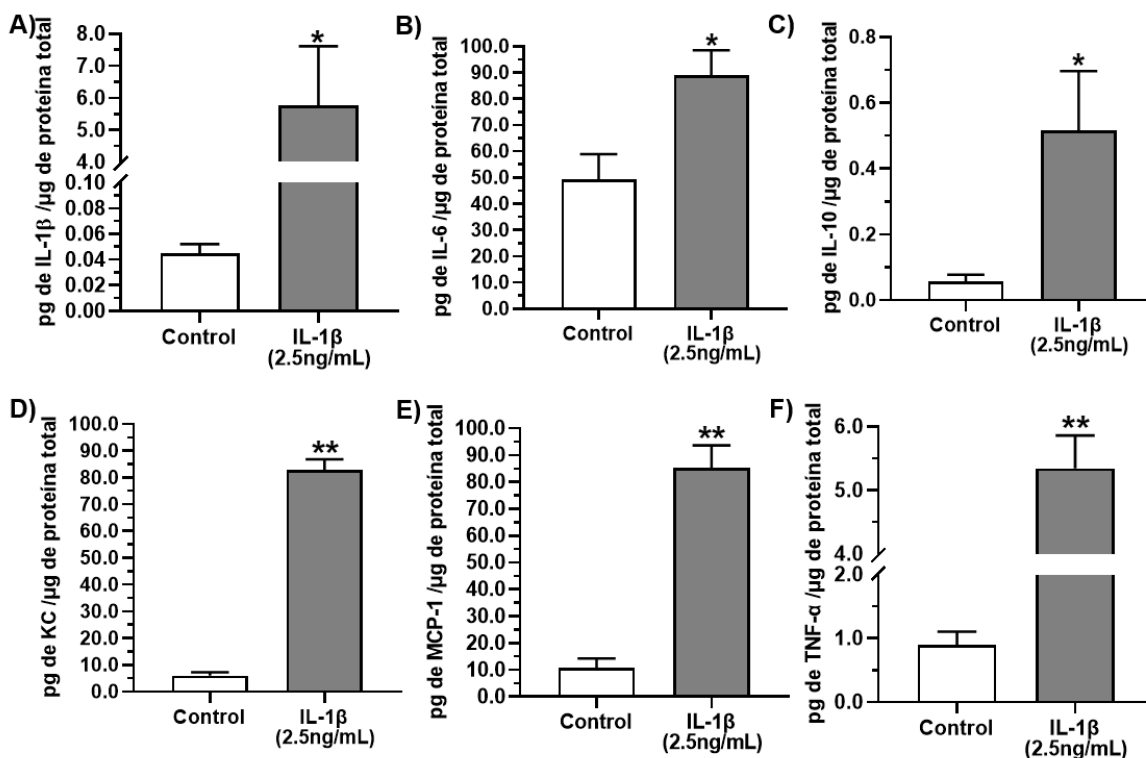


Figura 24. IL-1 β induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en FCrA.

Niveles de secreción de (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) IL-10, (D) KC, (E) MCP-1 y (F) TNF- α en el sobrenadante celular de FCrA de tratadas con IL-1 β (2,5 ng/mL) por 24 horas. Los resultados se expresan como pg de citoquina secretada/ μ g de proteína total como promedio \pm E.E.M de 3-5 experimentos independientes. **p < 0,01 vs. células control.

5.12 RvE1 atenúa la senescencia de FCrA inducida por Doxo

Una vez establecido que en los FCrA los mecanismos pro-inflamatorios como el ensamblaje del inflammasoma NLRP3 y la activación del receptor de IL-1 están involucrados en el aumento de SA- β -gal inducido por Doxo, se evaluó al igual que en las células HUVEC la capacidad de la RvE1 para atenuar los efectos pro-senescentes inducidos por Doxo en FCrA. Los resultados mostraron que RvE1 a una concentración previamente evaluada en el grupo FARMOLAB como resolutoria frente a estímulos proinflamatorios de 100 nM [105], inhibió por completo de forma estadísticamente significativa el aumento de SA- β -gal inducido por Doxo (10 nM) en FCrA (Figura 25A, 25B).

Adicionalmente, RvE1 también disminuyó de manera estadísticamente significativa la expresión proteica de γ H2A.X, p53 y p21 en FCrA estimulados con Doxo (Figura 26A-26C).

RESULTADOS

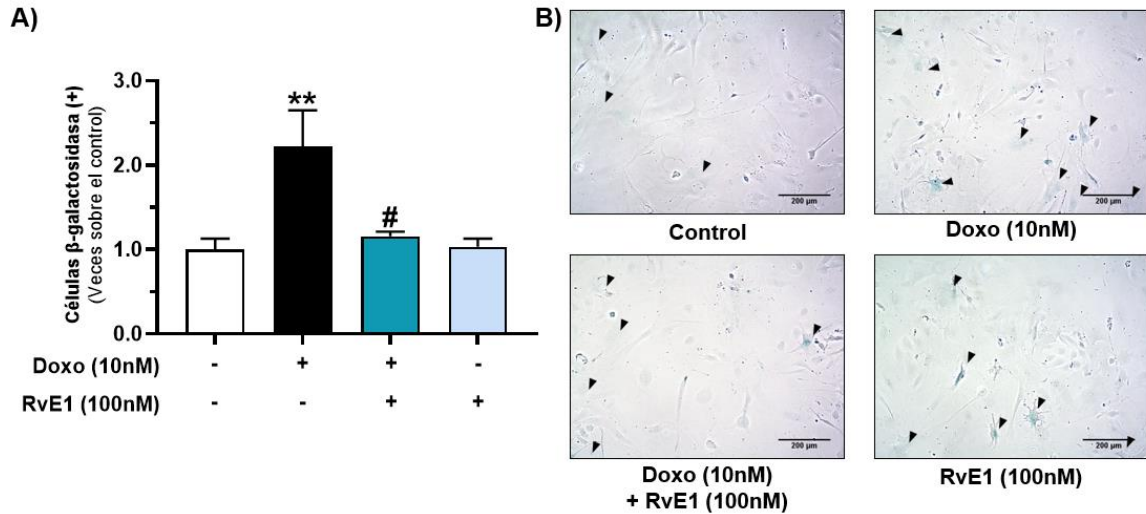


Figura 25. RvE1 atenúa el aumento inducido por Doxo de SA-β-gal en FCrA.

(A) Células positivas SA-β-gal cuantificadas por puntaje manual en FCrA estimuladas por 24 horas con Doxo (10 nM) en ausencia o presencia de RvE1 (100 nM), los resultados se expresan respecto al grupo control como el promedio ± E.E.M de 5 experimentos independientes. (B) Imágenes representativas de contraste de fase de células positivas SA-β-gal (coloración azul-verde) indicadas con triángulos negros (20X, barra = 200 μm). **p<0,01 vs. células control sin tratamiento; #p<0,05 vs. células tratadas solamente con Doxo.

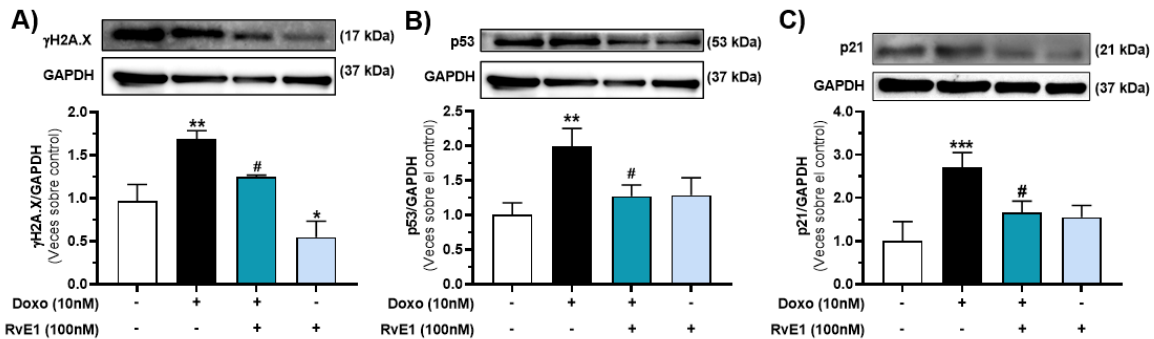


Figura 26. RvE1 atenúa el aumento inducido por Doxo de biomarcadores de senescencia de respuesta al daño al ADN y arresto de ciclo celular en FCrA.

Se analizaron los niveles proteicos de (A) γH2A.X, (B) p53 y (C) p21 en FCrA tratadas por 24 horas con Doxo (10 nM) en ausencia o presencia de RvE1 (100 nM). El panel superior muestra la imagen representativa de la proteína de interés y la constitutiva (GAPDH); mientras que el inferior muestra el análisis gráfico de los resultados expresados respecto al grupo control como el promedio ± E.E.M de 3-6 experimentos independientes. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. células control sin tratamiento; #p<0,05 vs. células tratadas solamente con Doxo.

Finalmente, se evaluó la capacidad de la RvE1 para modular el panel secretor de citoquinas inducido por Doxo en FCrA. El mediador lipídico fue capaz de atenuar de manera estadísticamente significativa el aumento de la secreción de IL-1β inducido por Doxo (10 nM) a las 24 horas (**Figura 27A**); sin embargo, no modificó el aumento de KC o MCP-1 (**Figura 27D, 27E**). La RvE1 tampoco

pudo reducir los niveles de las otras citoquinas no modificadas por Doxo como IL-6, IL-10 o TNF- α (Figura 27B, 27C, 27F).

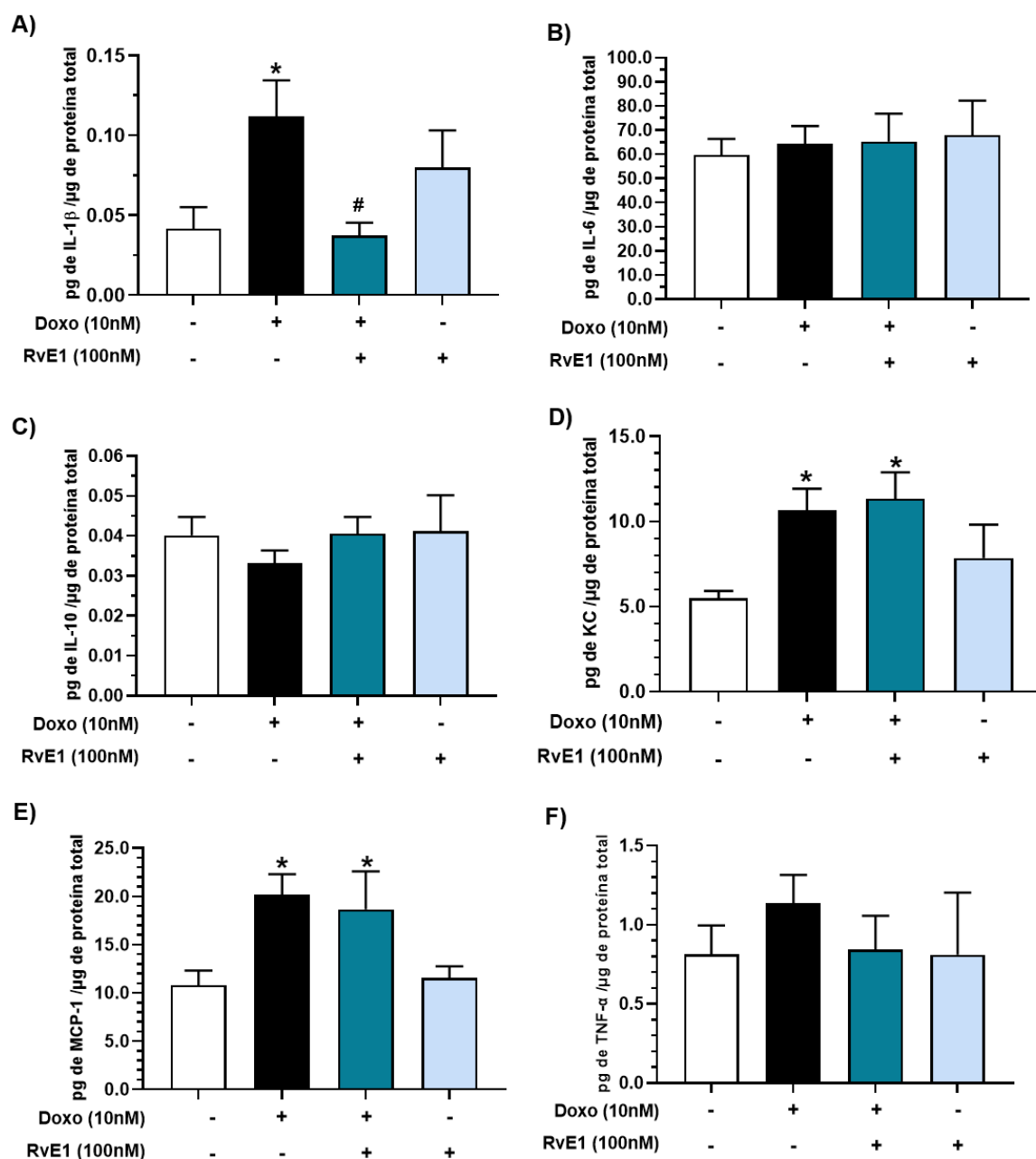


Figura 27. RvE1 atenúa la secreción de citoquinas pro-inflamatorias inducida por Doxo en FCrA.

Niveles de secreción de (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) IL-10, (D) KC, (E) MCP-1 y (F) TNF- α en el sobrenadante celular de FCrA de tratados con Doxo (10 nM) en ausencia o presencia de RvE1 (100nM) por 24 horas. Los resultados se expresan como pg de citoquina secretada/ μ g de proteína total como promedio \pm E.E.M de 3-5 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs. células control sin tratamiento; # $p < 0,05$ vs. células tratadas solamente con Doxo.

5.13 RvE1 atenúa la senescencia de FCrA inducida IL-1 β

Posteriormente, nos cuestionamos si la RvE1 sería capaz de prevenir la senescencia en FCrA inducida por IL-1 β tal y como se ha reportado previamente en HUVEC [114]. De esta manera utilizando IL-

RESULTADOS

1 β en los cultivos de FCrA se estudió el efecto de la RvE1 para atenuar los efectos pro-senescentes de la citoquina pro-inflamatoria. Los resultados mostraron que la RvE1 (100 nM) mitigó por completo y de manera estadísticamente significativa el aumento de SA- β -gal inducido por IL-1 β (2,5 ng/mL) en FCrA (**Figura 28A, 28B**). Además, RvE1 fue capaz también de disminuir de manera estadísticamente significativa el aumento en la expresión proteica de γ H2A.X, p53 y p21 en FCrA estimulado con IL-1 β (**Figura 29A-29C**).

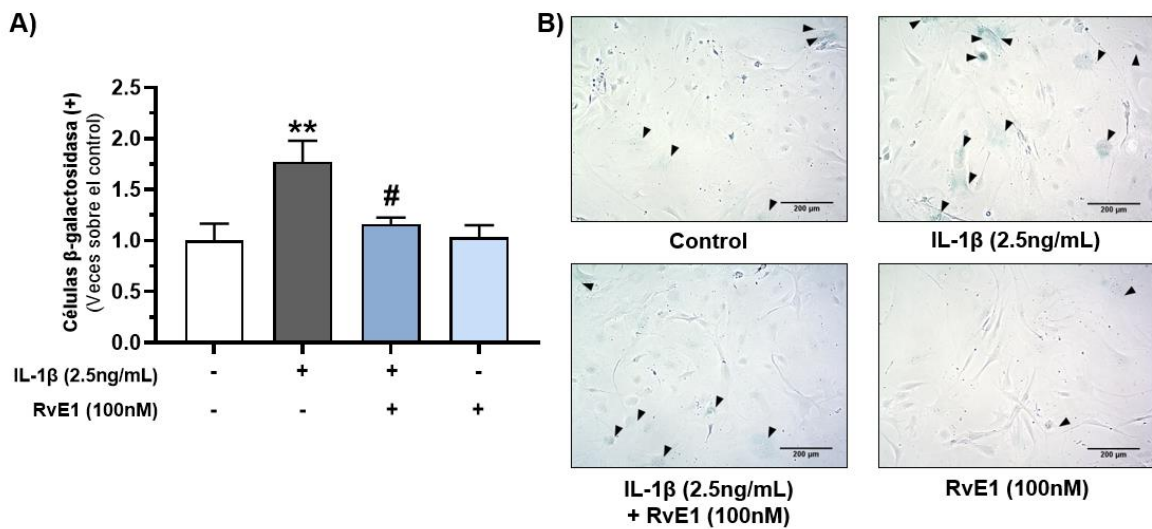


Figura 28. RvE1 atenúa el aumento inducido por IL-1 β de SA- β -gal en FCrA.

(A) Células positivas SA- β -gal cuantificadas por puntaje manual en FCrA estimulados por 24 horas con IL-1 β (2,5 ng/mL) en ausencia o presencia de RvE1 (100 nM), los resultados se expresan respecto al grupo control como el promedio \pm E.E.M de 5 experimentos independientes. (B) Imágenes representativas de contraste de fase de células positivas SA- β -gal (coloración azul-verde) indicadas con triángulos negros (20X, barra = 200 μ m). ** $p < 0,01$ vs. células control sin tratamiento; # $p < 0,05$ vs. células tratadas solamente con IL-1 β .

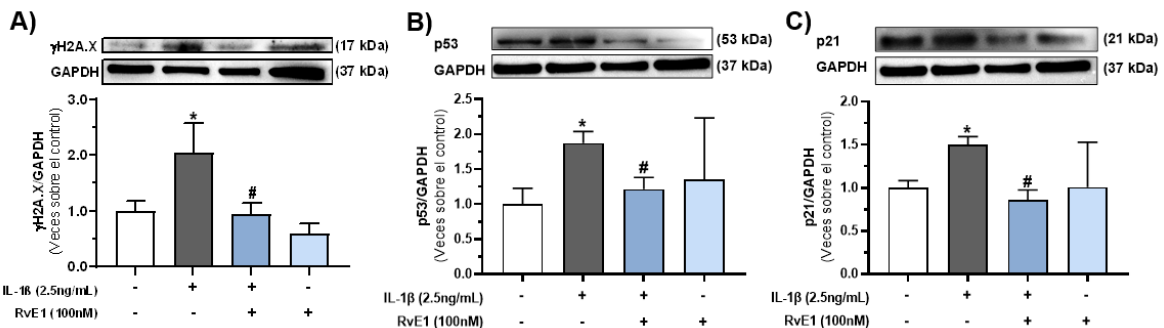


Figura 29. RvE1 atenúa el aumento inducido por IL-1 β de biomarcadores de senescencia de respuesta al daño al ADN y arresto de ciclo celular en FCrA.

Se analizaron los niveles proteicos de (A) γ H2A.X, (B) p53 y (C) p21 en FCrA tratadas por 24 horas con IL-1 β (2,5 ng/mL) en ausencia o presencia de RvE1 (100 nM). El panel superior muestra la imagen representativa de la proteína de interés y la constitutiva (GAPDH);

mientras que el inferior muestra el análisis gráfico de los resultados expresados respecto al grupo control como el promedio \pm E.E.M de 3-6 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs. células control sin tratamiento; # $p < 0,05$ vs. células tratadas solamente con IL-1 β .

Por último, frente al panel secretor inducido por la IL-1 β en FCrA, se demostró que la RvE1 fue capaz de atenuar de forma estadísticamente significativa la secreción de la IL-1 β , IL-10 y MCP-1 (**Figura 30A, 30C, 30E**), y disminuir parcialmente el aumento inducido en KC y TNF- α (**Figura 30D, 30F**); no obstante no afectó el aumento de IL-6 inducido por IL-1 β (**Figura 30B**).

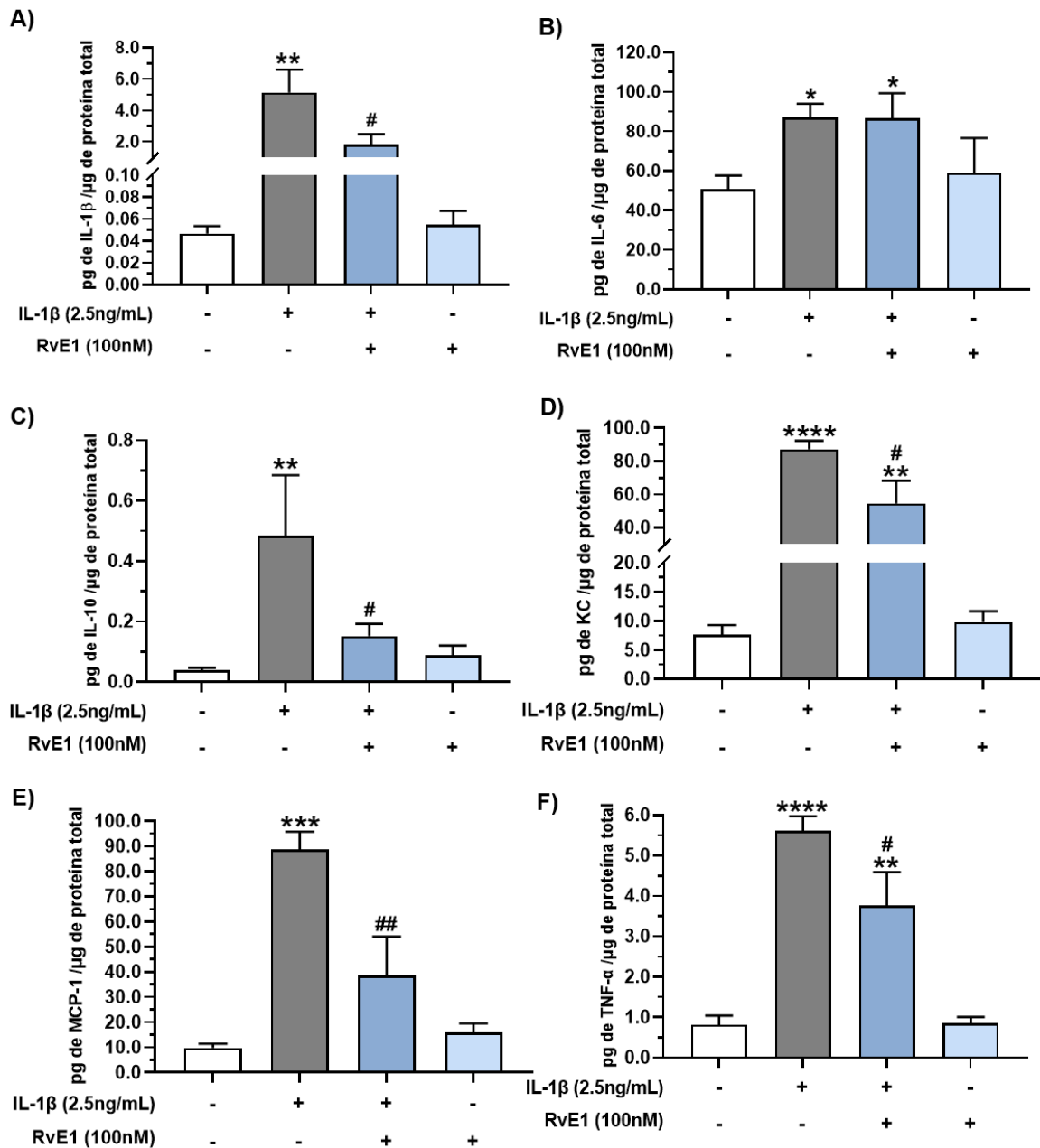


Figura 30. RvE1 atenúa la secreción de citoquinas pro-inflamatorias inducida por IL-1 β en FCrA.

Niveles de secreción de (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) IL-10, (D) KC, (E) MCP-1 y (F) TNF- α en el sobrenadante celular de FCrA de tratados con IL-1 β (2,5 ng/mL) en ausencia o presencia de RvE1 (100nM) por 24 horas. Los resultados se expresan como pg de citoquina secretada/

RESULTADOS

μg de proteína total como promedio ± E.E.M de 4-5 experimentos independientes. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 vs. células control sin tratamiento; #p<0,05; ##p<0,01 vs. células tratadas solamente con IL-1β.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

6 DISCUSIÓN

Hoy en día, las complicaciones cardiovasculares asociadas al tratamiento con agentes antineoplásicos es un factor limitante en dicho tratamiento y, además, acarrea secuelas importantes en los pacientes expuestos a la farmacoterapia. Es por ello que resulta de gran relevancia comprender los mecanismos subyacentes a dicha toxicidad cardiovascular.

Los principales resultados de esta tesis mostraron que 1) Doxo induce senescencia en las células endoteliales y en los fibroblastos cardiacos mediante la activación del eje inflamatorio NLRP3/IL-1R; más aún, 2) la citoquina IL-1 β por sí misma en fibroblastos cardiacos fue capaz de inducir la senescencia celular evidenciado por un aumento en la actividad SA- β -gal, y un aumento en la expresión de las proteínas γ H2A.X, p53 y p21; además, 3) un fuerte aumento en el SASP fue desencadenado por IL-1 β , en comparación con el secretoma inducido por Doxo en fibroblastos cardiacos. Finalmente, 4) la RvE1 se reveló como un compuesto lipídico capaz de atenuar la senescencia de las células endoteliales y de los fibroblastos cardiacos inducida por Doxo mediante una disminución de la secreción de la IL-1 β .

6.1 Doxo induce senescencia celular en células HUVEC y FCrA

La senescencia endotelial puede originar procesos inflamatorios que comprometen la integridad y función de la vasculatura originando disfunción endotelial; por otro lado, la senescencia de los fibroblastos cardiacos puede originar procesos inflamatorios los cuales pueden conducir a la pérdida de la homeostasis de la MEC promoviendo así el desarrollo de fibrosis cardiaca [53, 55, 116, 117]. Ambos procesos se encuentran dentro de los principales factores que incrementan el riesgo de desarrollar ECV [9, 48].

La senescencia de las células endoteliales se ha relacionado íntimamente con la aparición de ECV y una de las principales consecuencias de la senescencia endotelial es la disfunción endotelial, uno de los principales marcadores de alteraciones vasculares. Esta disfunción endotelial supone una ruptura de la homeostasis del vaso en términos de reactividad vascular, inflamación, coagulación o proliferación celular. En relación a ello, la disfunción endotelial está estrechamente ligada a la fragilidad vascular y al consiguiente riesgo de desarrollar ECV [9, 46, 118]. De hecho, se han reportado modelos animales en los cuales la eliminación por manipulación genética de células senescentes en órganos como corazón y riñón fue capaz de inhibir los cambios degenerativos relacionados o no con la edad y esto se tradujo en una mejora significativa en la función sistólica cardiaca, así como en la reducción de la calcificación vascular, uno de los principales marcadores de

envejecimiento en vasos [119]. Otros trabajos han descrito efectos similares tras la administración de tratamientos que eliminan las células senescentes (senolíticos) en ratones envejecidos o ateroscleróticos, en los cuales se observó una menor calcificación vascular y una mejora en las respuestas mediadas por NO [120]. Es así como la senescencia de las células endoteliales se postula como uno de los principales procesos relacionados con el desarrollo de alteraciones en la vasculatura como la disfunción endotelial que conjunto con el aumento de la rigidez del vaso son capaces de promover la fragilidad vascular y por consiguiente incrementar el riesgo de desarrollar aterosclerosis y otras ECV [9, 46, 118].

Ahora bien, la senescencia prematura puede ser inducida por una amplia variedad de estresores endógenos y exógenos tales como citoquinas, péptidos y fármacos [46]. A este respecto, en años recientes se ha sugerido que la inducción de senescencia celular podría ser un mecanismo adicional que contribuye a los efectos tóxicos a nivel cardiovascular de fármacos como la Doxo [46, 121-123]. Si bien se ha reportado que el antineoplásico ejerce sus efectos tóxicos promoviendo aumento en el estrés oxidativo, inflamación y muerte celular por apoptosis [58, 62, 124]; en el presente trabajo se demostró que Doxo es capaz de inducir senescencia prematura a concentraciones que no comprometen la viabilidad en células HUVEC (25 nM) ni FCrA (10 nM). Es relevante resaltar que estas concentraciones son similares a las concentraciones plasmáticas encontradas en pacientes durante la fase de eliminación lenta del fármaco que corresponden al periodo de tiempo de mayor exposición tras su administración endovenosa [125].

Los potenciales mecanismos por los cuales Doxo sería capaz de inducir senescencia celular han sido previamente discutidos, planteándose así la producción de ERO y el daño al ADN como factores claves para lograr esta respuesta [126, 127]. De hecho, la generación de ERO juega un rol crucial en la iniciación de la respuesta senescente prematura de las células frente al antineoplásico [128]; más aún el estrés oxidativo tiene un papel importante en la activación de p53 induciendo la fosforilación de Ser15 de p53 como un marcador de senescencia [129]. Adicionalmente, los efectos farmacológicos de la Doxo se observan tras su ingreso a las células por difusión o mediante transportadores de aniones orgánicos como el OCT1, que de hecho es expresado y está presente en células endoteliales [130-132], para posteriormente, afectar la función mitocondrial conduciendo en últimas a un aumento del estrés oxidativo que a su vez induciría daño extensivo del ADN genómico y mitocondrial; sin embargo, también hay evidencia que sugiere que la toxicidad a nivel cardiovascular inducida por antraciclinas podría estar ligada a la interacción directa del fármaco a nivel nuclear con la doble hebra del ADN desencadenando así la ruptura y posterior activación de la DDR [25, 121, 122, 127, 133]. Apoyando los resultados obtenidos en esta tesis, se han reportado efectos similares de Doxo en células endoteliales de microvasos pulmonares humanos, células endoteliales progenitoras humanas y

DISCUSIÓN

murinas, y líneas celulares de HUVEC y de células endoteliales humanas EA.hy926 en donde la exposición a concentraciones entre 225 y 1000 nM del fármaco condujeron a un aumento de biomarcadores asociados a senescencia como SA- β -gal, p53 y p21 [61, 63]; además, se ha reportado la inducción de senescencia en fibroblastos cardiacos de ratones neonatos y embrionarios de ratón por estímulo con una concentración de 40 nM de Doxo por 4 días [63, 134].

De acuerdo a nuestra búsqueda en la literatura científica, este sería el primer reporte de inducción de senescencia celular con Doxo en FCrA; más aún sería la primera vez que se relaciona la respuesta prosenesciente del fármaco en células endoteliales y fibroblastos cardiacos con aumento en marcadores de activación de la DDR (γ H2A.X).

Como se comentó anteriormente, se ha asociado la presencia de fibroblastos cardiacos senescentes con el desarrollo patológico de fibrosis cardiaca. De hecho, también se ha observado que la eliminación global de células senescentes mediante el uso de farmacoterapia senolítica en ratones envejecidos o sometidos a daño por isquemia/reperfusión, reduce la fibrosis en el corazón lo que sugeriría una posible relación causal entre senescencia y fibrosis cardiaca; no obstante, se desconoce si el resultado benéfico se debe a la eliminación de fibroblastos cardiacos senescentes u otro tipo de células senescentes cardiacas que promueven la fibrosis por activación de fibroblastos vía SASP [53, 117].

Sin embargo, la senescencia de los fibroblastos cardiacos podría tener un papel más complejo. Así, varios estudios sugieren que la senescencia de fibroblastos cardiacos de hecho posee un rol benéfico limitando la fibrosis por disminución de la proliferación de los fibroblastos mediante el arresto de su ciclo celular o mediante algunos componentes antifibróticos secretados como parte del SASP [135-139]. Por ejemplo, se ha visto en ratones que el tejido adiposo visceral es capaz de contribuir al desarrollo de fibrosis cardiaca relacionado con la edad mediante la producción de factores profibróticos como la osteopontina; más aún la inhibición de este último, reduce significativamente la fibrosis cardiaca e incrementa los niveles de biomarcadores de senescencia celular como p16, p21 y SA- β -gal en áreas fibróticas, sugiriendo así que la senescencia podría ser de carácter antifibrótica [140]. De igual modo se ha reportado que la inactivación general de p16, p53 o la haplodeficiencia de ATM condujo a un incremento de la fibrosis cardiaca de ratones con infarto agudo de miocardio e hipertrofia ventricular, así como reducción en la fracción de eyección ventricular izquierda; mientras que la sobreexpresión de CCN1 (reconocido inductor de la senescencia celular) condujo a un efecto antifibrótico y una mejora de la función cardiaca en las dos primeras condiciones [135-138].

Todo esto, sugiere que el rol de la senescencia de fibroblastos cardiacos puede ser benéfico en el contexto de reparación de lesiones tisulares tras un infarto agudo de miocardio o perjudicial en un contexto general de fibrosis cardiaca de carácter crónico asociada con el envejecimiento donde la reducción de células senescentes en el corazón conduce a una menor fibrosis y una mejora en la función cardiovascular.

Estos resultados en su conjunto, tanto en células endoteliales como en fibroblastos cardiacos, evidencian el amplio efecto de Doxo a nivel de distintas células del sistema cardiovascular, siendo la senescencia celular un importante efecto de este fármaco. Se reafirma así el concepto de que la senescencia celular es un promisorio blanco farmacológico a tener en cuenta para prevenir los efectos dañinos a nivel cardiovascular inducidos por Doxo.

6.2 Los efectos prosenescentes de Doxo son mediados por activación del inflammasoma NLRP3, la secreción de IL-1 β y activación del receptor de IL-1 en células endoteliales y fibroblastos cardiacos

Se ha planteado que los procesos inflamatorios locales y sistémicos, entre ellos, particularmente la activación del inflammasoma NLRP3 y liberación de IL-1 β , juegan un rol fundamental en los efectos cardiovasculares tóxicos asociados al uso de Doxo. En este sentido, el inflammasoma NLRP3 ha sido relacionado con la progresión del envejecimiento de origen inflamatorio y la inducción de senescencia tanto de origen endotelial, conduciendo a disfunción endotelial, como del fibroblasto cardiaco, promoviendo la fibrosis cardiaca [53-55, 141-143].

Efectivamente, en el presente trabajo se demostró que Doxo fue capaz de inducir la fase de cebado y activación del inflammasoma NLRP3 en HUVEC, incrementando en primer lugar la expresión de NLRP3 y pro-IL-1 β ; y en segundo lugar por aumento de la formación de *specks* de ASC y posterior secreción de IL-1 β . Todo lo anterior, acompañado de la activación del factor de transcripción NF- κ B, que es el mediador clave en la respuesta inflamatoria e inducción de senescencia en diferentes tipos celulares y modelos animales [144-146]. De acuerdo a los datos publicados, este sería el primer reporte del efecto de Doxo sobre las 2 fases de activación del inflammasoma NLRP3 en endotelio. En este mismo sentido, y al igual que en células HUVEC, en FCrA se observó que el fármaco fue capaz de inducir aumento en la secreción de IL-1 β , lo que iría en línea con lo reportado en literatura para los niveles de ARNm de pro-IL-1 β a las 6, 12 y 24 horas y de secreción de la citoquina a las 24 horas en fibroblastos cardiacos humanos tras el estímulo con Doxo (100 nM) [147].

Si bien, el presente trabajo no estudió los mecanismos por los cuales Doxo podría estar activando el inflammasoma NLRP3 se ha descrito que podría deberse al aumento de ERO que desencadenarían el ensamblaje y la activación del complejo proteico. Doxo podría también ser capaz de atenuar la respuesta antioxidante mediante disminución de los niveles de sirtuina-1, que a su vez se ha visto es

DISCUSIÓN

capaz de atenuar al menos en parte la activación del inflamasoma NLRP3 en modelos de daño cerebral [148]. De hecho, trabajos de nuestro grupo de investigación FARMOLAB han demostrado que en FCrA los efectos prosenescentes del antineoplásico a las 24 horas se ven atenuados en presencia de N-acetil cisteína (NAC) por lo que serían dependientes de un aumento en el estrés oxidativo [149].

Por otra parte, estudios recientes han sugerido que inhibir el inflamasoma NLRP3 podría reducir los efectos deletéreos cardiovasculares de la Doxo [78, 128, 148, 150]; más aún, el efector final la citoquina proinflamatoria IL-1 β , ha sido ampliamente vinculada con el progreso de ECV y a su vez se ha reportado que bloquear sus efectos mejora significativamente la función cardiovascular en estos escenarios [96]. Gracias al ensayo clínico CANTOS, se demostró por primera vez en humanos que las citoquinas inflamatorias están realmente implicadas en la enfermedad vascular humana [151]. Además, se ha demostrado que la propia IL-1 β es capaz de inducir senescencia en células HUVEC mediante la activación del inflamasoma NLRP3 en un bucle de refuerzo positivo [143]. Esto se mantiene en relación con lo observado en este trabajo en donde la senescencia de células HUVEC y de FCrA inducida por Doxo fue prevenida con el uso del inhibidor de la oligomerización de NLRP3, el MCC950, pero también antagonizando directamente a la IL-1 β bien con el fármaco anakinra en células endoteliales o con el antagonista endógeno de la citoquina en fibroblastos cardiacos.

Lo anterior da cuenta de la importancia del inflamasoma NLRP3, en la senescencia endotelial y de fibroblastos cardiacos como potencial mediador principal de los efectos tóxicos cardiovasculares asociados al uso de antraciclinas como Doxo. En este orden de ideas, se reporta por primera vez la activación del inflamasoma NLRP3 y del receptor de IL-1 como posible mecanismo prosenescente de Doxo en células endoteliales y fibroblastos cardiacos, mediando al menos en parte en el primer tipo celular y completamente en el segundo la respuesta de senescencia observada tras el estímulo con el antineoplásico.

6.3 IL-1 β induce senescencia celular en FCrA

Considerando que la activación del inflamasoma NLRP3 y del receptor IL-1 median al menos en parte la senescencia endotelial, y por completo la senescencia de fibroblastos cardiacos inducida por Doxo, se decidió evaluar si la IL-1 β por si sola sería capaz de inducir la respuesta prosenescente en FCrA, especialmente teniendo que en este tipo de células Doxo fue capaz de inducir la secreción de la citoquina. Apoyando esta hipótesis, en trabajos previos de nuestro grupo FARMAVASM se ha demostrado la capacidad inductora de senescencia en células HUVEC de la IL-1 β a través de la activación del inflamasoma NLRP3 y de la propia secreción de la citoquina [114, 152].

Al respecto se observó que IL-1 β es capaz por si sola de inducir senescencia en FCrA dado por un aumento de SA- β -gal, γ H2A.X, p53 y p21. En línea con nuestros resultados se ha reportado aumento de p53, p21, p27 e hipofosforilación de la pRb, con detención de la proliferación de fibroblastos cardiacos de rata neonata tras el estímulo con la citoquina por 24 horas en una concentración de 1 ng/mL, similar a la utilizada por nosotros de 2,5 ng/mL [94]. Sin embargo, este trabajo no describe la respuesta observada como inducción de senescencia celular, más aún nuestro trabajo sería el primer reporte en donde se relaciona la activación de DDR como parte de la senescencia inducida por la IL-1 β en fibroblastos cardiacos y sería la primera vez que se demuestra el rol fundamental de la citoquina en la senescencia inducida por Doxo en los dos principales tipos de células no musculares a nivel cardiovascular.

En su conjunto estos resultados indican que la IL-1 β puede ser un mediador importante de la respuesta inflamatoria asociada a Doxo, a través de la cual el antineoplásico induciría senescencia de células HUVEC y de FCrA. Más aún, abre la posibilidad de considerar al inflammasoma NLRP3 y el bloqueo de los receptores de IL-1 como potenciales dianas farmacológicas a través de las cuales se podría disminuir la senescencia celular endotelial y de fibroblastos cardiacos, y con ello la disfunción endotelial y fibrosis cardiaca; de hecho, como se indicó anteriormente se ha considerado y demostrado la importancia de la IL-1 β dentro de estudios clínicos como una potencial diana farmacoterapéutica para atenuar las complicaciones asociadas a la enfermedad vascular humana [151].

6.4 Efecto de Doxo e IL-1 β sobre el SASP en FCrA

Recientemente se ha introducido el denominado “Atlas SASP” en donde se han establecido perfiles SASP para diversas células caracterizando diferencias según el tipo celular y proyectando a posibles discrepancias en el perfil de secreción según sea el origen tisular de las células; sin embargo, se ha planteado que en términos generales el SASP compromete una variedad de factores que promueven un ambiente proinflamatorio que juega múltiples roles en la señalización inmunitaria, comunicación célula-célula y la creación de ambientes protumorigénicos [36, 37, 153]. En individuos jóvenes saludables el SASP es capaz de contribuir al mantenimiento de la homeostasis del tejido durante el desarrollo embriogénico y en procesos de remodelado y reparación tisular promoviendo diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos [25, 38, 154]. Sin embargo, a medida que la acumulación de células senescentes ocurre con la edad o bien debido a la incorrecta eliminación de las mismas, se provoca la presencia crónica de factores proinflamatorios, profibróticos e inductores del remodelado cardiovascular derivados del SASP. Este SASP se ha asociado con efectos auto- y paracrinós en las células vecinas mediante el cual de hecho se propaga el fenotipo senescente en el tejido circundante y empeora la función tisular [129]. Dado el rol planteado de IL-1 β como mediador

DISCUSIÓN

de la senescencia inducida por el Doxo en HUVEC y FCrA, se evaluaron los efectos tanto de Doxo como de IL-1 β sobre la secreción de un panel de citoquinas y quimioquinas en FCrA.

En cuanto al efecto inductor observado sobre la secreción de KC y MCP-1, si bien no se encontró información previa en fibroblastos cardíacos por lo que a nuestro conocimiento sería el primer reporte al respecto de dicho efecto promovido por Doxo; si se encontraron antecedentes de fibroblastos dérmicos de ratón en donde una concentración de 250 nM del antineoplásico a las 24 horas, indujo un aumento significativo de los niveles de ARNm de KC sin comprometer la viabilidad celular [123]. Un resultado similar fue observado en macrófagos murinos expuestos por 12 horas a altas concentraciones de Doxo (5 μ M) observándose aumento de los niveles de ARNm y de la secreción de KC [155].

Por otro lado, con respecto a la quimioquina MCP-1, se ha reportado un aumento en los niveles de ARNm y de la secreción de MCP-1 a tiempos de 8 y 24 horas tras la exposición a altas concentraciones de Doxo (1 μ M) en otros tipos celulares cardíacos como la línea celular de cardiomiocitos H9c2 [156, 157].

Con respecto a IL-6 y TNF- α ; si bien hay reportes de aumento de la secreción de los mismos tras la exposición a Doxo en fibroblastos de otro origen diferente al cardíaco, así como en otros tipos celulares cardíacos, la mayoría de ellos emplean concentraciones altas del fármaco ($\geq 1\mu$ M). Estas concentraciones no sólo comprometen la viabilidad de estas células, sino que en estos trabajos únicamente miden niveles de ARNm y no de la citoquina secretada. Por lo anterior, estos resultados podrían de hecho reflejar respuestas celulares diferentes a la senescencia celular [156, 158, 159].

Con respecto al secretoma inducido por la IL-1 β en FCrA, no se encontraron antecedentes previos en fibroblastos cardíacos por lo que igualmente estos resultados serían el primer reporte en este tipo celular. Sin embargo, se observan similitudes sobre la secreción de estas citoquinas en otros modelos celulares. Por ejemplo, se ha reportado aumento en la secreción de IL-10, IL-6, IL-8, TNF- α y MCP-4 en preadipocitos fibroblásticos humanos expuestos a IL-1 β (2 ng/mL) por 24 horas [160]. Del mismo modo, se ha descrito aumento en la secreción de MCP-1 e IL-6 tras 12 y 24 horas de exposición a IL-1 β (5 ng/mL) en células musculares de aorta y epitelio de retina humano [161, 162]. Por último, se ha reportado que otros ligandos del receptor IL-1, como la IL-1 α (10 ng/mL) a las 24 horas es capaz de inducir la secreción de citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α en miofibroblastos cardíacos humanos por modulación de la activación de vías de señalización NF- κ B, Akt, p38MAPK, ERK 1/2 y JNK [163].

Finalmente, haciendo un análisis comparativo entre el secretoma SASP inducido por Doxo e IL-1 β en FCrA a las 24 horas, podemos resaltar que se observaron notorias diferencias en cuanto a la composición y magnitud de la secreción del SASP desencadenado por la citoquina respecto al del antineoplásico. De hecho, se encontró que Doxo fue capaz de inducir únicamente el aumento de IL-1 β y de dos quimioquinas (KC y MCP-1), contrastado con un marcado incremento de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , KC y MCP-1 tras el estímulo con IL-1 β . Además, este potente efecto proinflamatorio desencadenado por la citoquina en comparación con el antineoplásico podría dar cuenta y ser un reflejo de un posible efecto de tiempos prolongados de exposición a la Doxo superiores a 24 horas; más aún, si consideramos que los niveles de IL-1 β inducidos por la Doxo fueron un orden de magnitud menor a la concentración utilizada como estímulo de la citoquina y que la IL-1 β de forma auto- y paracrina sería capaz de promover senescencia celular, además de un complejo ambiente proinflamatorio con efecto en células vecinas y con la capacidad de reclutar células del sistema inmune que amplifiquen el microambiente proinflamatorio.

De hecho, se ha descrito que el control de la expresión de los componentes del SASP puede darse a diferentes niveles, siendo la principal señal reguladora la DDR y un control de tipo autocrino a nivel postranscripcional. Específicamente el SASP a su vez es capaz de mediar la liberación de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 β , IL-6 o IL-8 quienes a su vez de forma autocrina aumentarán la activación de vías de señalización proinflamatorias como NF- κ B. Estas vías proinflamatorias se encuentran directamente relacionadas con el SASP en un proceso de retroalimentación positiva que permite un incremento continuado de la liberación de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y factores de crecimiento. La inhibición entonces de la activación de vías involucradas en la producción e incremento del SASP, así como la depleción de los componentes del mismo se han convertido en dianas moleculares de las farmacoterapias senostáticas. En conjunto, estas aproximaciones moduladoras de los efectos del SASP y la eliminación de las células senescentes por fármacos senolíticos han sido consideradas en la prevención de las complicaciones asociadas con la senescencia celular y activación del SASP como el desarrollo de inflamación crónica, fibrosis cardiaca y disfunción endotelial así como el riesgo de desarrollar ECV asociadas con la edad; sin embargo, este tipo de estrategias farmacoterapéuticas aún están se encuentran en fase de desarrollo e investigación [164-166].

De esta manera, nuestros resultados en su conjunto plantean un rol clave para la IL-1 β dentro de los efectos inducidos por Doxo debido a que por sí sola sería capaz de promover senescencia celular y la generación de una inflamación estéril vía SASP, que a largo plazo tras la exposición continua al fármaco, a su vez puede conducir al daño del tejido y reclutamiento de células del sistema inmune que amplifiquen la inflamación y disfunción a nivel del tejido cardiovascular [105, 167].

DISCUSIÓN

6.5 RvE1 atenúa la senescencia celular en células endoteliales y fibroblastos cardiacos

Considerando la participación de la respuesta inflamatoria como elemento clave en la inducción de la senescencia de células endoteliales y fibroblastos cardiacos, en la cual la activación del inflamasoma NLRP3 y secreción de IL-1 β juegan un papel central, es que se utilizó RvE1, un mediador lipídico con marcados efectos antiinflamatorios, para atenuar la respuesta senescente inducida tanto por la Doxo como por la IL-1 β . Además, previamente en nuestro grupo de investigación FARMAVASM se demostró que la RvE1 es capaz de atenuar la senescencia inducida por IL-1 β en HUVEC [114]. Sumado a nuestros resultados, esto indicaría que la RvE1 es un factor atenuador de la senescencia inducida por Doxo e IL-1 β en los dos modelos celulares. Para nuestro conocimiento este sería el primer reporte de efecto anti-senescente de la RvE1 en fibroblastos cardiacos y de la RvE1 respecto a senescencia inducida por Doxo en endotelio. No obstante, se ha descrito el posible efecto anti-senescente para otros mediadores pro-resolutivos como la RvD1 en modelos de fibroblastos de piel humana y macrófagos murinos en casos de senescencia inducida por estrés oxidativo con H₂O₂ y radiación ionizante, pero en ningún caso desencadenada por un fármaco tipo antraciclina o la IL-1 β [109-111].

Todo lo anterior resulta crucial al considerar a la RvE1, así como otros SPM y análogos conjugados, como posibles futuras herramientas farmacológicas no solamente como resolutoras de respuestas inflamatorias; sino también como alternativas farmacoterapéuticas en la prevención de la senescencia celular en escenarios donde contribuyen al daño y disfunción del organismo.

6.6 Efecto de RvE1 sobre la activación del inflamasoma NLRP3 inducido por Doxo en células endoteliales

De igual forma como se observó con la senescencia inducida por Doxo en células HUVEC se estudió como posible mecanismo molecular la capacidad de la RvE1 de regular vías proinflamatorias tales como la activación de NF- κ B/inflamasoma NLRP3 que el antineoplásico promueve en dichas células y que se ha descrito median sus efectos tóxicos a nivel cardiovascular [78, 128, 148, 150].

Al respecto, en este trabajo se encontró que la RvE1 fue capaz de disminuir a niveles basales la activación de NF- κ B, el cebado y la activación del inflamasoma NLRP3 inducida por Doxo en HUVEC a las 24 horas. Esto concuerda con resultados previos de nuestro grupo FARMAVASM en los que se demostró que la RvE1 es capaz de atenuar la activación del inflamasoma NLRP3 inducida por IL-1 β en HUVEC [114]. Más aún, en línea con nuestros resultados, recientemente se describió que en fibroblastos de pulpa dental humana preconditionados con LPS y en un modelo *in vivo* de

pulpitis de rata, por si sola la RvE1 o en asociación con LXA4 resuelve el proceso inflamatorio por inhibición de la vía NF- κ B/inflamasoma NLRP3 mediante el aumento en la expresión de sirtuina 7, molécula con efectos anti-senescentes [168]. También, se han reportado hallazgos similares en los modelos de rata diabética inducido por estreptozotocina, de daño renal por hiperhomocisteinemia y de daño cerebral por isquemia/reperfusión en los cuales el pretratamiento con otro SPM, la RvD1, previno las complicaciones asociadas y disminuyó el aumento de NLRP3, ASC, caspasa-1, IL-1 β e IL-18 mediante la inhibición de la activación de NF- κ B y/o por reducción de los niveles de estrés oxidativo [146, 169, 170]. Por último, se ha descrito que otro SPM, la RvD2 es capaz de suprimir la activación del inflamasoma NLRP3 en macrófagos murinos precondicionados con LPS promoviendo su autofagia [171]. Lo anterior pone en plano el rol de la inhibición de la vía NF- κ B/inflamasoma NLRP3 como posible mecanismo de los efectos anti-senescentes de la RvE1 en células HUVEC.

Por otro lado, el dexrazoxano, único tratamiento específico aprobado como terapia cardioprotectora frente a la toxicidad cardiovascular de las antraciclinas ha demostrado ser capaz de inhibir las vías de señalización MAPK/NF- κ B contribuyendo así a la disminución del estrés oxidativo y de la respuesta proinflamatoria de la Doxo [74, 77, 172, 173].

Sin embargo, también es capaz de promover la depleción de la topoisomerasa II β , uno de los blancos farmacológicos por los cuales el antineoplásico sería capaz de ejercer sus efectos antitumorales; siendo así que eventualmente se ha asociado la utilización del dexrazoxano con una reducción de la actividad antitumoral del fármaco [74, 77, 172, 173].

Además, el inflamasoma NLRP3 ha sido relacionado con el crecimiento tumoral, la metástasis y el desarrollo de resistencia por parte de células cancerígenas a la Doxo [128]. Es debido a lo anteriormente expuesto, que estrategias terapéuticas que pudiesen intervenir y reducir la señalización del inflamasoma NLRP3 pudiesen ser consideradas para atenuar los efectos tóxicos cardiovasculares del antineoplásico sin comprometer su actividad antitumoral.

6.7 Efecto de RvE1 sobre el SASP inducido por Doxo e IL-1 β en fibroblastos cardiacos

De forma particular se estudió también sí, dado el potencial efecto anti-senescente observado para la RvE1 en FCrA, este estaría asociado a una modificación parcial o total del fenotipo secretor producido tras el estímulo con Doxo o IL-1 β . Así pues, la RvE1 fue capaz de disminuir la secreción de IL-1 β inducida bien por la misma citoquina o por el antineoplásico en FCrA; no obstante, solo fue capaz de prevenir el aumento de KC y MCP-1 cuando el estímulo era la IL-1 β y no la Doxo; más aún, exceptuando a la IL-6, el pretratamiento con la RvE1 atenuó el aumento de todos los otros componentes evaluados tras el estímulo con IL-1 β en FCrA.

Al respecto, este sería a nuestro conocimiento el primer reporte de la RvE1 disminuyendo la secreción de IL-1 β desencadenada bien por Doxo o por IL-1 β en fibroblastos cardiacos. En línea con los

DISCUSIÓN

resultados descritos, previamente en el grupo FARMOLAB hemos publicado trabajos en fibroblastos cardiacos de rata adulta preconditionados con LPS por 8 horas y pretratados bien con RvD1 o RvE1; en este caso ninguno de los SPM evaluados modificó el aumento en los niveles de pro-IL-1 β observado tras el estímulo proinflamatorio [105]. Esto, conjunto con los resultados de esta tesis, estaría indicando que a diferencia de lo observado en células HUVEC, en fibroblastos cardiacos, la RvE1 posiblemente más que actuar sobre la fase de cebado deba su efecto a la modulación de la fase de ensamblaje y activación del inflamasoma NLRP3, disminuyendo así la secreción de IL-1 β . Esto da cuenta de la importancia de la secreción de la IL-1 β como mediador clave en la senescencia inducida por Doxo y a su vez plantea que los efectos observados con la RvE1 sobre marcadores de senescencia en FCrA puedan ser explicados por el efecto conservado en la disminución de la secreción de esta citoquina en particular en endotelio y fibroblastos cardiacos.

Por otro lado, el mismo trabajo previo de FARMOLAB también señalaba que la RvE1 no era capaz de modificar la secreción de IL-6, MCP-1, TNF- α o IL-10 inducida por LPS [105]. Lo anterior, posiblemente se deba a las diferencias en la activación de vías de señalización frente a los diferentes estímulos inductores; y que serían responsables de controlar la secreción de estas citoquinas y quimioquinas; de hecho, trabajos actuales de nuestro grupo de investigación FARMOLAB han demostrado que en FCrA estimulados con IL-1 β o Doxo, existen diferencias en cuanto a la activación temprana de vías de señalización NF- κ B, Akt, ERK 1/2 y JNK [149]. Más aún, previamente hemos demostrado que el LPS por sí solo únicamente es capaz de inducir el cebado del inflamasoma NLRP3 en fibroblastos cardiacos, pero que requiere de un estímulo complementario de la fase de ensamblaje y activación del inflamasoma con ATP para inducir un aumento en la secreción de IL-1 β [174]. Por lo anterior, tendríamos que el efecto de RvE1 sobre la secreción inducida por IL-1 β de KC, MCP-1, TNF- α o IL-10 sería dependiente o estaría sujeto a vías de señalización específicas como NF- κ B o Akt capaces de ser moduladas por la RvE1 en fibroblastos cardiacos; más aún, también hemos visto en trabajos previos que RvE1 y RvD1 son capaces de prevenir la activación de las vías de señalización ERK1/2, Akt y NF- κ B en fibroblastos cardiacos [175].

Finalmente, hay evidencia en otros modelos celulares como el de fibroblastos de pulpa dental humana preconditionados con LPS en donde a las 24 horas la RvE1 fue capaz de disminuir los niveles de ARNm para IL-1 β , IL-6 y TNF- α dependiente del receptor ChemR23 [176]; o en la línea celular de mioblastos murinos C2C12 preconditionados con LPS en donde la RvE1 redujo los niveles de ARNm para IL-6 o MCP-1 pero no para IL-1 β o TNF- α a las 6 horas [177]. Considerando esto también existe

la posibilidad que el efecto de la RvE1 en nuestro modelo al tiempo observado fuera evidente a nivel de mensajero y no de proteína secretada.

Por ello se haría necesario en futuras investigaciones estudiar el potencial efecto que podría tener la RvE1 a niveles de mensajero para estas citoquinas, así como su efecto sobre la fase de activación del inflammasoma NLRP3 inducida bien por Doxo o por IL-1 β en fibroblastos cardiacos como posibles mecanismos mediadores de la senescencia celular, más aún sería importante observar la modulación de vías de señalización específicas inducidas por estos dos estímulos a tiempos tempranos en fibroblastos cardiacos que podrían igualmente estar implicadas en la promoción de la senescencia celular a través del SASP.

En resumen, como podemos observar en **Figura 31** a partir de este trabajo y algunos resultados previos dentro de la investigación de FARMAVASM [114] y FARMOLAB [149] tenemos que Doxo es capaz de inducir la senescencia de células HUVEC y de FCrA sin comprometer la viabilidad celular, lo anterior determinado por aumento de los niveles de SA- β -gal, γ H2A.X, p53 y p21; más aún, el antineoplásico logra esta respuesta mediante un aumento en la secreción de IL-1 β en células HUVEC y FCrA con lo cual tenemos que la respuesta prosenescente del fármaco es dependiente de la vía inflammasoma NLRP3 / IL-1R. Además, Doxo indujo la secreción de KC y MCP-1 en FCrA. A su vez, IL-1 β es capaz de inducir la senescencia en los dos modelos celulares mediante un bucle de refuerzo positivo que en HUVEC involucra el cebado, ensamblaje y activación del inflammasoma NLRP3, adicionalmente IL-1 β induce un secretoma principalmente proinflamatorio compuesto al menos por IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1, KC y TNF- α a las 24 horas en FCrA. Finalmente, la RvE1 es capaz de prevenir el aumento de la senescencia en células HUVEC y FCrA inducida por Doxo o por IL-1 β a través de la modulación de la vía inflammasoma NLRP3 / IL-1R por una disminución de la secreción de la citoquina proinflamatoria.

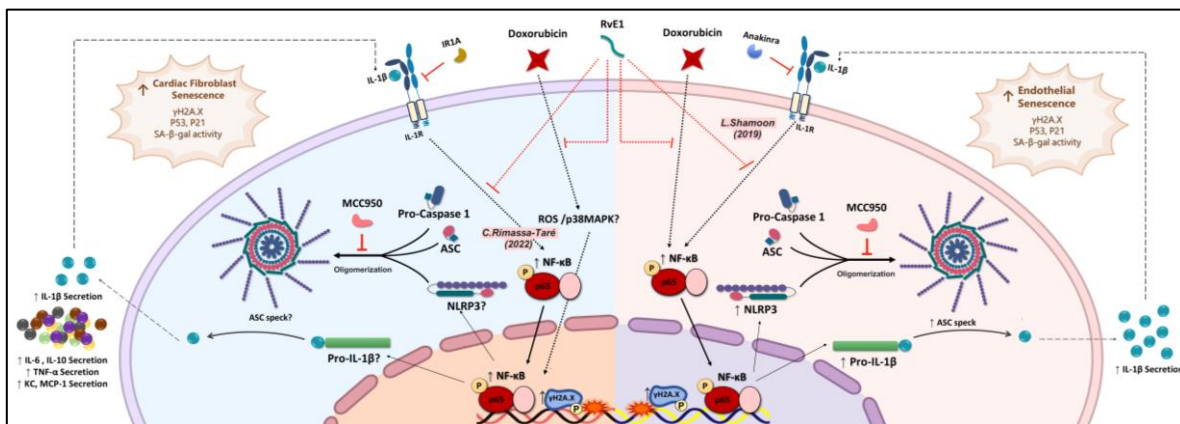


Figura 31. Efecto anti-senescente de RvE1 frente a la senescencia inducida por Doxo e IL-1 β en HUVEC y FCrA a través de la disminución de la activación del eje inflammasoma NLRP3 / IL-1R.

Doxo e IL-1 β en HUVEC y FCrA inducen senescencia celular dependiente de un aumento en la secreción de IL-1 β como resultado de la actividad inflammasoma NLRP3. Doxo e IL-1 β posiblemente inducen el ensamblaje y activación del inflammasoma NLRP3 mediante

DISCUSIÓN

activación respectiva de vías dependientes como ERO/p38MAPK y NF- κ B en FCrA, a través de las cuales finalmente se aumenta la secreción de IL-1 β , una vez secretada forma auto- y paracrina activa el IL-1R en un loop positivo promueve la senescencia de FCrA caracterizado por un aumento de SA- β -gal, γ H2A.X, p53 y p21; más aún, se induce la secreción de otras citoquinas y quimioquinas tales como IL-6, IL-10, TNF- α , KC y MCP-1. En HUVEC Doxo e IL-1 β promueven el cebado, ensamblaje y activación del inflamasoma NLRP3 que desencadena un aumento en la secreción de IL-1 β que de forma auto- y paracrina a través de IL-1R conduce a senescencia endotelial caracterizada por aumento de SA- β -gal, γ H2A.X, p53 y p21. La RvE1 es capaz de atenuar la secreción de IL-1 β inducida por Doxo e IL-1 β en los dos modelos celulares y de esta manera disminuir los biomarcadores de senescencia celular.

CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

En conclusión, el presente trabajo sustenta el potencial efecto benéfico de la RvE1 para mediar los posibles efectos adversos a nivel cardiovascular de las antraciclinas como Doxo que estén siendo mediados por la inducción de senescencia y del fenotipo secretor proinflamatorio de células endoteliales y de fibroblastos cardiacos. Este efecto protector se pudiera deber, al menos en parte a la capacidad reportada para el mediador lipídico de reducir el estrés oxidativo y la consiguiente activación del complejo de la inmunidad innata inflamasoma NLRP3. Más aun, considerando el potencial de la RvE1 para disminuir la senescencia inducida directamente por la citoquina IL-1 β en los dos modelos celulares utilizados, los resultados del presente trabajo sugieren que la RvE1 podría considerarse una potencial herramienta farmacológica que provoque la disrupción del bucle inflamatorio mediado por el inflamasoma NLRP3 no sólo en escenarios de toxicidad cardiovascular inducida por Doxo, sino también en escenarios patológicos a nivel cardiovascular donde dicho inflamasoma o su principal producto final, la IL-1 β sean mediadores claves.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Franceschi, C., et al., *Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. **908**(1): p. 244-254.
2. Wagner, K.-H., et al., *Biomarkers of Aging: From Function to Molecular Biology*. Nutrients, 2016. **8**(6).
3. Organization, W.H. *Ageing*. 2022 [cited 2022; Available from: https://www.who.int/health-topics/ageing#tab=tab_1].
4. Vasto, S., et al., *Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity*. Mechanisms of Ageing and Development, 2007. **128**(1): p. 83-91.
5. Costantino, S., F. Paneni, and F. Cosentino, *Ageing, metabolism and cardiovascular disease*. The Journal of Physiology, 2016. **594**(8): p. 2061-2073.
6. Organization, W.H., *Estadísticas Sanitarias Mundiales 2020: monitoreando la salud para los ODS, objetivo de desarrollo sostenible*. 2020, Ginebra: World Health Organization.
7. Dillin, A., D.E. Gottschling, and T. Nyström, *The good and the bad of being connected: the integrons of aging*. Current Opinion in Cell Biology, 2014. **26**: p. 107-112.
8. de Grey, A.D.N.J., *Life Span Extension Research and Public Debate: Societal Considerations*. Studies in Ethics, Law, and Technology, 2007. **1**(1).
9. El Assar, M., et al., *Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction*. Frontiers in physiology, 2012. **3**: p. 132-132.
10. Tsuji, H., et al., *Impact of Reduced Heart Rate Variability on Risk for Cardiac Events*. Circulation, 1996. **94**(11): p. 2850-2855.
11. Nilsson, P., *Early Vascular Ageing - A Concept in Development*. European endocrinology, 2015. **11**(1): p. 26-31.
12. Fleg, J.L. and H.L. Kennedy, *Long-term prognostic significance of ambulatory electrocardiographic findings in apparently healthy subjects ≥ 60 years of age*. The American Journal of Cardiology, 1992. **70**(7): p. 748-751.
13. Donato, A.J., D.R. Machin, and L.A. Lesniewski, *Mechanisms of Dysfunction in the Aging Vasculature and Role in Age-Related Disease*. Circulation Research, 2018. **123**(7): p. 825-848.
14. Feridooni, H.A., K.M. Dibb, and S.E. Howlett, *How cardiomyocyte excitation, calcium release and contraction become altered with age*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2015. **83**: p. 62-72.
15. Wang, M., et al., *Proinflammation: the key to arterial aging*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2014. **25**(2): p. 72-79.
16. Niccoli, T. and L. Partridge, *Ageing as a Risk Factor for Disease*. Current Biology, 2012. **22**(17): p. R741-R752.
17. North, B.J. and D.A. Sinclair, *The intersection between aging and cardiovascular disease*. Circulation research, 2012. **110**(8): p. 1097-1108.
18. Raisz, L.G., *Local and Systemic Factors in the Pathogenesis of Osteoporosis*. New England Journal of Medicine, 1988. **318**(13): p. 818-828.
19. Gunasekaran, U. and M. Gannon, *Type 2 Diabetes and the Aging Pancreatic Beta Cell*. Aging, 2011. **3**(6): p. 565-575.
20. López-Otín, C., et al., *The hallmarks of aging*. Cell, 2013. **153**(6): p. 1194-1217.
21. MacNee, W., R.A. Rabinovich, and G. Choudhury, *Ageing and the border between health and disease*. European Respiratory Journal, 2014. **44**(5): p. 1332.
22. Strandberg, T.E., *Cardiovascular, Cerebrovascular, and Renovascular Consequences of Ageing May Be Challenged*, in *Prevention of Chronic Diseases and Age-Related Disability*, J.-P. Michel, Editor. 2019, Springer International Publishing: Cham. p. 61-70.
23. 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.

CONCLUSIONES

24. van Deursen, J.M., *The role of senescent cells in ageing*. Nature, 2014. **509**(7501): p. 439-446.
25. Hernandez-Segura, A., J. Nehme, and M. Demaria, *Hallmarks of Cellular Senescence*. Trends in Cell Biology, 2018. **28**(6): p. 436-453.
26. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
27. Bielak-Zmijewska, A., G. Mosieniak, and E. Sikora, *Is DNA damage indispensable for stress-induced senescence?* Mechanisms of Ageing and Development, 2018. **170**: p. 13-21.
28. Muñoz-Espín, D., et al., *Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development*. Cell, 2013. **155**(5): p. 1104-1118.
29. Storer, M., et al., *Senescence Is a Developmental Mechanism that Contributes to Embryonic Growth and Patterning*. Cell, 2013. **155**(5): p. 1119-1130.
30. 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.
31. 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.
32. Shiloh, Y., *ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity*. Nature Reviews Cancer, 2003. **3**(3): p. 155-168.
33. Karlseder, J., et al., *p53- and ATM-Dependent Apoptosis Induced by Telomeres Lacking TRF2*. Science, 1999. **283**(5406): p. 1321-1325.
34. Smogorzewska, A. and T. de Lange, *Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells*. The EMBO journal, 2002. **21**(16): p. 4338-4348.
35. Ben-Porath, I. and R.A. Weinberg, *The signals and pathways activating cellular senescence*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005. **37**(5): p. 961-976.
36. 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.
37. Jakhar, R. and K. Crasta, *Exosomes as Emerging Pro-Tumorigenic Mediators of the Senescence-Associated Secretory Phenotype*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(10): p. 2547.
38. Gonzalez-Meljem, J.M., et al., *Paracrine roles of cellular senescence in promoting tumourigenesis*. British journal of cancer, 2018. **118**(10): p. 1283-1288.
39. Childs, B.G., et al., *Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy*. Nature Medicine, 2015. **21**(12): p. 1424-1435.
40. Porrello, E.R., et al., *Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart*. Science (New York, N.Y.), 2011. **331**(6020): p. 1078-1080.
41. Siddiqi, S. and M.A. Sussman, *Cardiac Hegemony of Senescence*. Current translational geriatrics and experimental gerontology reports, 2013. **2**(4): p. 10.1007/s13670-013-0064-3.
42. Minamino, T., et al., *Endothelial Cell Senescence in Human Atherosclerosis*. Circulation, 2002. **105**(13): p. 1541-1544.
43. Hadi, H.A.R., C.S. Carr, and J. Al Suwaidi, *Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome*. Vascular health and risk management, 2005. **1**(3): p. 183-198.
44. Jia, G., et al., *Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2019. **1865**(7): p. 1802-1809.
45. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial Function and Dysfunction*. Circulation, 2007. **115**(10): p. 1285-1295.
46. Erusalimsky, J.D., *Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology*. Journal of Applied Physiology, 2009. **106**(1): p. 326-332.
47. Lum, H. and K.A. Roebuck, *Oxidant stress and endothelial cell dysfunction*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2001. **280**(4): p. C719-C741.

48. Ungvari, Z., et al., *Mechanisms of Vascular Aging*. Circulation Research, 2018. **123**(7): p. 849-867.
49. Park, K.-H. and W.J. Park, *Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches*. Journal of Korean medical science, 2015. **30**(9): p. 1213-1225.
50. Rajendran, P., et al., *The vascular endothelium and human diseases*. International journal of biological sciences, 2013. **9**(10): p. 1057-1069.
51. Diaz-Araya, G., et al., *Cardiac fibroblasts as sentinel cells in cardiac tissue: Receptors, signaling pathways and cellular functions*. Pharmacological research, 2015. **101**: p. 30-40.
52. Shinde, A.V. and N.G. Frangogiannis, *Fibroblasts in myocardial infarction: A role in inflammation and repair*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2017. **70**: p. 74-82.
53. Anderson, R., et al., *Length-independent telomere damage drives post-mitotic cardiomyocyte senescence*. The EMBO journal, 2019. **38**(5): p. e100492.
54. Gutiérrez-Fernández, A., et al., *Loss of MT1-MMP causes cell senescence and nuclear defects which can be reversed by retinoic acid*. Embo j, 2015. **34**(14): p. 1875-88.
55. Abdelfatah, N., et al., *Characterization of a Unique Form of Arrhythmic Cardiomyopathy Caused by Recessive Mutation in LEMD2*. JACC Basic Transl Sci, 2019. **4**(2): p. 204-221.
56. Carlson, B.W., et al., *Accelerated vascular aging and persistent cognitive impairment in older female breast cancer survivors*. GeroScience, 2018. **40**(3): p. 325-336.
57. Bonadonna, G., et al., *Clinical evaluation of adriamycin, a new antitumour antibiotic*. Br Med J, 1969. **3**(5669): p. 503-6.
58. Chatterjee, K., et al., *Doxorubicin cardiomyopathy*. Cardiology, 2010. **115**(2): p. 155-62.
59. Clayton, Z.S., et al., *Anthracycline chemotherapy-mediated vascular dysfunction as a model of accelerated vascular aging*. Aging Cancer, 2021. **2**(1-2): p. 45-69.
60. Takemura, G. and H. Fujiwara, *Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: From the Cardiotoxic Mechanisms to Management*. Progress in Cardiovascular Diseases, 2007. **49**(5): p. 330-352.
61. Abdelgawad, I.Y., et al., *Molecular mechanisms and cardiovascular implications of cancer therapy-induced senescence*. Pharmacology & Therapeutics, 2021. **221**: p. 107751.
62. He, H., et al., *Doxorubicin Induces Endotheliotoxicity and Mitochondrial Dysfunction via ROS/eNOS/NO Pathway*. Frontiers in Pharmacology, 2020. **10**.
63. Ghosh, A.K., et al., *A small molecule inhibitor of PAI-1 protects against doxorubicin-induced cellular senescence*. Oncotarget, 2016. **7**(45): p. 72443-72457.
64. Wang, X., et al., *Evidence of Cisplatin-induced Senescent-like Growth Arrest in Nasopharyngeal Carcinoma Cells1*. Cancer Research, 1998. **58**(22): p. 5019-5022.
65. Yang, M.-Y., et al., *Induction of Cellular Senescence by Doxorubicin Is Associated with Upregulated miR-375 and Induction of Autophagy in K562 Cells*. PLOS ONE, 2012. **7**(5): p. e37205.
66. Roberson, R.S., et al., *Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers*. Cancer Research, 2005. **65**(7): p. 2795-2803.
67. Ota, H., et al., *Sirolimus and Everolimus Induce Endothelial Cellular Senescence Via Sirtuin 1 Down-Regulation: Therapeutic Implication of Cilostazol After Drug-Eluting Stent Implantation*. Journal of the American College of Cardiology, 2009. **53**(24): p. 2298-2305.
68. Jaiswal, A.S., et al., *NSC666715 and Its Analogs Inhibit Strand-Displacement Activity of DNA Polymerase β and Potentiate Temozolomide-Induced DNA Damage, Senescence and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells*. PLOS ONE, 2015. **10**(5): p. e0123808.
69. Davies, K.J. and J.H. Doroshov, *Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase*. J Biol Chem, 1986. **261**(7): p. 3060-7.

CONCLUSIONES

70. Cappetta, D., et al., *Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. **2017**: p. 1521020.
71. Zhu, J., et al., *Interleukin-1 signaling mediates acute doxorubicin-induced cardiotoxicity*. *Biomed Pharmacother*, 2011. **65**(7): p. 481-5.
72. Prathumsap, N., et al., *Effects of doxorubicin on the heart: From molecular mechanisms to intervention strategies*. *European Journal of Pharmacology*, 2020. **866**: p. 172818.
73. Guo, R.M., et al., *Activation of the p38 MAPK/NF- κ B pathway contributes to doxorubicin-induced inflammation and cytotoxicity in H9c2 cardiac cells*. *Mol Med Rep*, 2013. **8**(2): p. 603-8.
74. Deng, S., et al., *Dexrazoxane may prevent doxorubicin-induced DNA damage via depleting both Topoisomerase II isoforms*. *BMC Cancer*, 2014. **14**(1): p. 842.
75. Minotti, G., et al., *Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity*. *Pharmacological Reviews*, 2004. **56**(2): p. 185.
76. Héon, S., et al., *Dexrazoxane does not protect against doxorubicin-induced damage in young rats*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2003. **285**(2): p. H499-H506.
77. Tebbi, C.K., et al., *Dexrazoxane-Associated Risk for Acute Myeloid Leukemia/Myelodysplastic Syndrome and Other Secondary Malignancies in Pediatric Hodgkin's Disease*. *Journal of Clinical Oncology*, 2007. **25**(5): p. 493-500.
78. Li, X., et al., *Trimethylamine N-Oxide Exacerbates Cardiac Fibrosis via Activating the NLRP3 Inflammasome*. *Frontiers in Physiology*, 2019. **10**.
79. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. *Mol Cell*, 2002. **10**(2): p. 417-26.
80. Youm, Y.H., et al., *Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging*. *Cell Metab*, 2013. **18**(4): p. 519-32.
81. Franceschi, C. and J. Campisi, *Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2014. **69 Suppl 1**: p. S4-9.
82. González-Moro, A., et al., *NLRP3 Inflammasome in Vascular Disease: A Recurrent Villain to Combat Pharmacologically*. *Antioxidants*, 2022. **11**(2).
83. Butts, B., et al., *The Importance of NLRP3 Inflammasome in Heart Failure*. *Journal of Cardiac Failure*, 2015. **21**(7): p. 586-593.
84. Zahid, A., et al., *Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 2538.
85. van Hout, G.P.J. and L. Bosch, *The Inflammasomes in Cardiovascular Disease, in Inflammasomes: Clinical and Therapeutic Implications*, M.D. Cordero and E. Alcocer-Gómez, Editors. 2018, Springer International Publishing: Cham. p. 9-40.
86. Mann, D.L., *Inflammatory Mediators and the Failing Heart*. *Circulation Research*, 2002. **91**(11): p. 988-998.
87. Dinarello, C.A., *Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases*. *Blood*, 2011. **117**(14): p. 3720-3732.
88. Bent, R., et al., *Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies?* *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(8).
89. Gabay, C., C. Lamacchia, and G. Palmer, *IL-1 pathways in inflammation and human diseases*. *Nat Rev Rheumatol*, 2010. **6**(4): p. 232-41.
90. Pulugulla, S.H., et al., *Distinct mechanisms regulate IL1B gene transcription in lymphoid CD4 T cells and monocytes*. *Cytokine*, 2018. **111**: p. 373-381.
91. Church, L.D., G.P. Cook, and M.F. McDermott, *Primer: inflammasomes and interleukin 1 β in inflammatory disorders*. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2008. **4**(1): p. 34-42.

92. Palomo, J., et al., *The interleukin (IL)-1 cytokine family--Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases*. Cytokine, 2015. **76**(1): p. 25-37.
93. Dostal, D., S. Glaser, and T.A. Baudino, *Cardiac Fibroblast Physiology and Pathology*. Comprehensive Physiology, 2015: p. 887-909.
94. Koudssi, F., et al., *Cardiac fibroblasts arrest at the G1/S restriction point in response to interleukin (IL)-1beta. Evidence for IL-1beta-induced hypophosphorylation of the retinoblastoma protein*. J Biol Chem, 1998. **273**.
95. Long, C.S., *The role of interleukin-1 in the failing heart*. Heart Fail Rev, 2001. **6**(2): p. 81-94.
96. Ridker, P.M., et al., *Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease*. New England Journal of Medicine, 2017. **377**(12): p. 1119-1131.
97. Trankle, C.R., et al., *Usefulness of Canakinumab to Improve Exercise Capacity in Patients With Long-Term Systolic Heart Failure and Elevated C-Reactive Protein*. American Journal of Cardiology, 2018. **122**(8): p. 1366-1370.
98. Byrne, N.J., et al., *Empagliflozin Blunts Worsening Cardiac Dysfunction Associated With Reduced NLRP3 (Nucleotide-Binding Domain-Like Receptor Protein 3) Inflammasome Activation in Heart Failure*. Circulation: Heart Failure, 2020. **13**(1): p. e006277.
99. Serhan, C.N., *Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology*. Nature, 2014. **510**(7503): p. 92-101.
100. Recchiuti, A., D. Mattoscio, and E. Isopi, *Roles, Actions, and Therapeutic Potential of Specialized Pro-resolving Lipid Mediators for the Treatment of Inflammation in Cystic Fibrosis*. Frontiers in Pharmacology, 2019. **10**.
101. Arita, M., et al., *Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation*. J Immunol, 2007. **178**(6): p. 3912-7.
102. Ohira, T., et al., *Resolvin E1 Receptor Activation Signals Phosphorylation and Phagocytosis**. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(5): p. 3451-3461.
103. Kaur, J., et al., *Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **391**(4): p. 1762-8.
104. Qiu, H., et al., *Differential induction of BLT receptor expression on human endothelial cells by lipopolysaccharide, cytokines, and leukotriene B4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 6913-8.
105. Salas-Hernández, A., et al., *Resolvin D1 and E1 promote resolution of inflammation in rat cardiac fibroblast in vitro*. Molecular Biology Reports, 2021. **48**(1): p. 57-66.
106. Valenzuela B, R., et al., *ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 (EPA Y DHA) Y SU APLICACIÓN EN DIVERSAS SITUACIONES CLÍNICAS*. Revista chilena de nutrición, 2011. **38**: p. 356-367.
107. Serhan, C.N., et al., *Novel anti-inflammatory--pro-resolving mediators and their receptors*. Current topics in medicinal chemistry, 2011. **11**(6): p. 629-647.
108. Fullerton, J.N. and D.W. Gilroy, *Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier*. Nature Reviews Drug Discovery, 2016. **15**(8): p. 551-567.
109. Kim, H.J., et al., *Resolvin D1 Suppresses H2O2-Induced Senescence in Fibroblasts by Inducing Autophagy through the miR-1299/ARG2/ARL1 Axis*. Antioxidants, 2021. **10**(12).
110. Sadhu, S., et al., *Sub-lethal radiation-induced senescence impairs resolution programs and drives cardiovascular inflammation*. bioRxiv, 2021: p. 2021.05.19.444879.
111. Rymut, N., et al., *Resolvin D1 promotes efferocytosis in aging by limiting senescent cell-induced MerTK cleavage*. The FASEB Journal, 2020. **34**(1): p. 597-609.
112. Muñoz-Rodríguez, C., et al., *Expression and function of TLR4- induced B1R bradykinin receptor on cardiac fibroblasts*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2018. **351**: p. 46-56.

CONCLUSIONES

113. Zanetta, L., et al., *Expression of von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: A potential method for objective assessment of tumor angiogenesis*. International Journal of Cancer, 2000. **85**(2): p. 281-288.
114. Shamoon, L., *Resolvin E1 attenuates stress-induced endothelial senescence by modulating NLRP3 inflammasome activation*, in *Department of Pharmacology and Therapeutics*. 2019, Universidad Autónoma de Madrid: Madrid, España. p. 41.
115. Díaz-Araya, G., et al., *Cardiac fibroblasts as sentinel cells in cardiac tissue: Receptors, signaling pathways and cellular functions*. Pharmacological Research, 2015. **101**: p. 30-40.
116. Wang, J.C. and M. Bennett, *Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence*. Circ Res, 2012. **111**(2): p. 245-59.
117. Dookun, E., et al., *Clearance of senescent cells during cardiac ischemia-reperfusion injury improves recovery*. Aging Cell, 2020. **19**(10): p. e13249.
118. Donato, A.J., et al., *Cellular and molecular biology of aging endothelial cells*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2015. **89**(Pt B): p. 122-135.
119. Katsuumi, G., et al., *Vascular Senescence in Cardiovascular and Metabolic Diseases*. Frontiers in cardiovascular medicine, 2018. **5**: p. 18-18.
120. Roos, C.M., et al., *Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice*. Aging Cell, 2016. **15**(5): p. 973-977.
121. Maejima, Y., et al., *Induction of premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage*. Aging Cell, 2008. **7**(2): p. 125-36.
122. Spallarossa, P., et al., *p38 MAPK and JNK antagonistically control senescence and cytoplasmic p16INK4A expression in doxorubicin-treated endothelial progenitor cells*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15583.
123. Demaria, M., et al., *Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse*. Cancer Discov, 2017. **7**(2): p. 165-176.
124. Soutati, A., et al., *Endothelial vascular toxicity from chemotherapeutic agents: preclinical evidence and clinical implications*. Cancer Treat Rev, 2012. **38**(5): p. 473-83.
125. Greene, R.F., et al., *Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols*. Cancer Res, 1983. **43**(7): p. 3417-21.
126. Cappetta, D., et al., *Doxorubicin targets multiple players: A new view of an old problem*. Pharmacol Res, 2018. **127**: p. 4-14.
127. Russo, M., E. Bono, and A. Ghigo, *The Interplay Between Autophagy and Senescence in Anthracycline Cardiotoxicity*. Curr Heart Fail Rep, 2021. **18**(4): p. 180-190.
128. Wei, S., et al., *Involvement of ROS/NLRP3 Inflammasome Signaling Pathway in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity*. Cardiovasc Toxicol, 2020. **20**(5): p. 507-519.
129. Pantsulaia, I., W.M. Ciszewski, and J. Niewiarowska, *Senescent endothelial cells: Potential modulators of immunosenescence and ageing*. Ageing Res Rev, 2016. **29**: p. 13-25.
130. Brosseau, N., E. Andreev, and D. Ramotar, *Complementation of the Yeast Model System Reveals that Caenorhabditis elegans OCT-1 Is a Functional Transporter of Anthracyclines*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0133182.
131. Andreev, E., et al., *The human organic cation transporter OCT1 mediates high affinity uptake of the anticancer drug daunorubicin*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 20508.
132. Dickens, D., et al., *Lamotrigine is a substrate for OCT1 in brain endothelial cells*. Biochem Pharmacol, 2012. **83**(6): p. 805-14.
133. Clayton, Z.S., et al., *Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Conduit Arteries Is Prevented by Mitochondrial-Specific Antioxidant Treatment*. JACC CardioOncol, 2020. **2**(3): p. 475-488.
134. Fourie, C., et al., *The paracrine effects of fibroblasts on Doxorubicin-treated breast cancer cells*. Exp Cell Res, 2019. **381**(2): p. 280-287.

135. Feng, T., et al., *CCN1-Induced Cellular Senescence Promotes Heart Regeneration*. *Circulation*, 2019. **139**(21): p. 2495-2498.
136. Meyer, K., et al., *Essential Role for Premature Senescence of Myofibroblasts in Myocardial Fibrosis*. *J Am Coll Cardiol*, 2016. **67**(17): p. 2018-28.
137. Zhu, F., et al., *Senescent Cardiac Fibroblast Is Critical for Cardiac Fibrosis after Myocardial Infarction*. *PLOS ONE*, 2013. **8**(9): p. e74535-e74535.
138. Jia, L., et al., *Haplodeficiency of Ataxia Telangiectasia Mutated Accelerates Heart Failure After Myocardial Infarction*. *J Am Heart Assoc*, 2017. **6**(7).
139. Xie, J., et al., *Premature senescence of cardiac fibroblasts and atrial fibrosis in patients with atrial fibrillation*. *Oncotarget*, 2017. **8**(35): p. 57981-57990.
140. Sawaki, D., et al., *Visceral Adipose Tissue Drives Cardiac Aging Through Modulation of Fibroblast Senescence by Osteopontin Production*. *Circulation*, 2018. **138**(8): p. 809-822.
141. Sauter, K.A., et al., *Doxorubicin and daunorubicin induce processing and release of interleukin-1 β through activation of the NLRP3 inflammasome*. *Cancer Biol Ther*, 2011. **11**(12): p. 1008-16.
142. Wang, L., et al., *Doxorubicin-Induced Systemic Inflammation Is Driven by Upregulation of Toll-Like Receptor TLR4 and Endotoxin Leakage*. *Cancer Res*, 2016. **76**(22): p. 6631-6642.
143. Romero, A., et al., *Pharmacological Blockade of NLRP3 Inflammasome/IL-1 β -Positive Loop Mitigates Endothelial Cell Senescence and Dysfunction*. *Aging Dis*, 2022. **13**(1): p. 284-297.
144. He, Y., H. Hara, and G. Núñez, *Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation*. *Trends Biochem Sci*, 2016. **41**(12): p. 1012-1021.
145. Salminen, A., A. Kauppinen, and K. Kaarniranta, *Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP)*. *Cell Signal*, 2012. **24**(4): p. 835-45.
146. Bernal, G.M., et al., *Loss of Nfkb1 leads to early onset aging*. *Aging (Albany NY)*, 2014. **6**(11): p. 931-43.
147. Tanaka, R., et al., *Reactive fibrosis precedes doxorubicin-induced heart failure through sterile inflammation*. *ESC Heart Failure*, 2020. **7**(2): p. 588-603.
148. Sun, Z., et al., *Dihydromyricetin alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting NLRP3 inflammasome through activation of SIRT1*. *Biochemical Pharmacology*, 2020. **175**: p. 113888.
149. Rimassa-Taré, C., *Senescencia inducida por doxorubicina e interleuquina-1beta en fibroblastos cardiacos de ratón adulto*, in *Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica*. 2022, Universidad de Chile.
150. Marchetti, C., et al., *Pharmacologic Inhibition of the NLRP3 Inflammasome Preserves Cardiac Function After Ischemic and Nonischemic Injury in the Mouse*. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2015. **66**(1).
151. Libby, P., *Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy: Biological Basis of CANTOS and Beyond*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2017. **70**(18): p. 2278-2289.
152. Romero, A., et al., *The angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis protects from endothelial cell senescence via klotho and Nrf2 activation*. *Aging cell*, 2019. **18**(3): p. e12913-e12913.
153. Basisty, N., et al., *A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development*. *PLoS Biol*, 2020. **18**(1): p. e3000599.
154. de Magalhães, J.P. and J.F. Passos, *Stress, cell senescence and organismal ageing*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2018. **170**: p. 2-9.
155. Wong, J., et al., *Production of IL-1 β by bone marrow-derived macrophages in response to chemotherapeutic drugs: synergistic effects of doxorubicin and vincristine*. *Cancer Biol Ther*, 2014. **15**(10): p. 1395-403.

CONCLUSIONES

156. Ye, S., et al., *LCZ696 Attenuated Doxorubicin-Induced Chronic Cardiomyopathy Through the TLR2-MyD88 Complex Formation*. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2021. **9**: p. 654051-654051.
157. Peng, W., et al., *Teneligliptin prevents doxorubicin-induced inflammation and apoptosis in H9c2 cells*. *Arch Biochem Biophys*, 2020. **683**: p. 108238.
158. Park, E.J., et al., *Doxorubicin induces cytotoxicity through upregulation of pERK-dependent ATF3*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e44990.
159. Guo, R., et al., *Exogenous hydrogen sulfide protects against doxorubicin-induced inflammation and cytotoxicity by inhibiting p38MAPK/NF κ B pathway in H9c2 cardiac cells*. *Cell Physiol Biochem*, 2013. **32**(6): p. 1668-80.
160. Alomar, S.Y., et al., *IL-1 β (interleukin-1 β) stimulates the production and release of multiple cytokines and chemokines by human preadipocytes*. *Arch Physiol Biochem*, 2016. **122**(3): p. 117-22.
161. Lim, J.H., et al., *Interleukin-1 β promotes the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human aorta smooth muscle cells via multiple signaling pathways*. *Experimental & Molecular Medicine*, 2009. **41**(10): p. 757-764.
162. Bian, Z.M., et al., *IL-4 potentiates IL-1beta- and TNF-alpha-stimulated IL-8 and MCP-1 protein production in human retinal pigment epithelial cells*. *Curr Eye Res*, 1999. **18**(5): p. 349-57.
163. Turner, N.A., et al., *Interleukin-1alpha stimulates proinflammatory cytokine expression in human cardiac myofibroblasts*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **297**(3): p. H1117-27.
164. Muñoz-Espín, D. and M. Serrano, *Cellular senescence: from physiology to pathology*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014. **15**(7): p. 482-496.
165. Byun, H.-O., et al., *From cell senescence to age-related diseases: differential mechanisms of action of senescence-associated secretory phenotypes*. *BMB reports*, 2015. **48**(10): p. 549-558.
166. Yin, H. and J.G. Pickering, *Cellular Senescence and Vascular Disease: Novel Routes to Better Understanding and Therapy*. *Canadian Journal of Cardiology*, 2016. **32**(5): p. 612-623.
167. Humeres, C., et al., *Cardiac fibroblast cytokine profiles induced by proinflammatory or profibrotic stimuli promote monocyte recruitment and modulate macrophage M1/M2 balance in vitro*. *J Mol Cell Cardiol*, 2016.
168. Liu, X., et al., *Combination of resolvin E1 and lipoxin A4 promotes the resolution of pulpitis by inhibiting NF- κ B activation through upregulating sirtuin 7 in dental pulp fibroblasts*. *Cell Proliferation*, 2022. **n/a**(n/a): p. e13227.
169. Li, G., et al., *NLRP3 inflammasome as a novel target for docosahexaenoic acid metabolites to abrogate glomerular injury[S]*. *Journal of Lipid Research*, 2017. **58**(6): p. 1080-1090.
170. Chen, J.J., et al., *Resolvin D1 alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting NLRP3 signaling pathway*. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2020. **34**(5).
171. Cao, L., et al., *Resolvin D2 suppresses NLRP3 inflammasome by promoting autophagy in macrophages*. *Experimental and therapeutic medicine*, 2021. **22**(5): p. 1222-1222.
172. Lebrecht, D., et al., *Dexrazoxane prevents doxorubicin-induced long-term cardiotoxicity and protects myocardial mitochondria from genetic and functional lesions in rats*. *British Journal of Pharmacology*, 2007. **151**(6): p. 771-778.
173. Lipshultz, S.E., et al., *The Effect of Dexrazoxane on Myocardial Injury in Doxorubicin-Treated Children with Acute Lymphoblastic Leukemia*. *New England Journal of Medicine*, 2004. **351**(2): p. 145-153.
174. Boza, P., et al., *Expression and function of toll-like receptor 4 and inflammasomes in cardiac fibroblasts and myofibroblasts: IL-1 β synthesis, secretion, and degradation*. *Molecular Immunology*, 2016. **74**: p. 96-105.

175. Sepúlveda Mayorga, P.A., *Resolvina D1 y Resolvina E1 inhiben la activación de AKT, ERK1/2 y NF-kB dependiente de LPS y previenen la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en fibroblastos cardíacos*, in *Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica*. 2018, Universidad de Chile. p. 65.
176. Xu, H., et al., *Resolvin E1 Ameliorates Pulpitis by Suppressing Dental Pulp Fibroblast Activation in a Chemerin Receptor 23-dependent Manner*. *J Endod*, 2019. **45**(9): p. 1126-1134.e1.
177. Baker, L.A., et al., *Resolvin E1 (R(v) E(1)) attenuates LPS induced inflammation and subsequent atrophy in C2C12 myotubes*. *J Cell Biochem*, 2018. **119**(7): p. 6094-6103.

ANEXO I - Primera publicación de la tesis ya aceptada

Biochemical Pharmacology 201 (2022) 115078



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm



Resolvin E1 attenuates doxorubicin-induced endothelial senescence by modulating NLRP3 inflammasome activation

Licia Shamoon^{a,b,c,1}, Jenaro A. Espitia-Corredor^{a,b,d,1}, Pilar Dongil^{a,c},
Marta Menéndez-Ribes^{a,c}, Alejandra Romero^{a,c}, Inés Valencia^{a,b,c}, Guillermo Díaz-Araya^{d,e,*},
Carlos F. Sánchez-Ferrer^{a,c,*}, Concepción Peiró^{a,c,*}

^a Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

^b PhD Programme in Pharmacology and Physiology, Doctoral School, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

^c Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Madrid, Spain

^d Laboratorio de Farmacología Molecular (FARMOLAB), Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Faculty of Chemical Sciences and Pharmacy, Universidad de Chile, Santiago, Chile

^e Advanced Center for Chronic Diseases ACCDIS, Universidad de Chile, Santiago, Chile

ARTICLE INFO

Keywords:
Resolvin E1
Endothelial senescence
NLRP3 inflammasome
Doxorubicin
Interleukin 1 β
Vascular aging

ABSTRACT

Endothelial cell senescence contributes to chronic inflammation and endothelial dysfunction, while favoring cardiovascular disorders and frailty. Senescent cells acquire a pro-inflammatory secretory phenotype that further propagates inflammation and senescence to neighboring cells. Cell senescence can be provoked by plethora of stressors, including inflammatory molecules and chemotherapeutic drugs. Doxorubicin (Doxo) is a powerful anthracycline anticancer drug whose clinical application is constrained by a dose-limiting cardiovascular toxicity. We here investigated whether cell senescence can contribute to the vascular damage elicited by Doxo. In human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cultures, Doxo (10–100 nM) increased the number of SA- β -gal positive cells and the levels of γ H2AX, p21 and p53, used as markers of senescence. Moreover, we identified Doxo-induced senescence to be mediated by the nucleotide-binding domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome, a key player of the immune innate system capable of releasing interleukin (IL)-1 β . In fact, IL-1 β itself mimicked the stimulatory action of Doxo on both NLRP3 activation and cellular senescence, while the pharmacological blockade of IL-1 receptors markedly attenuated the pro-senescence effects of Doxo. In search of additional pharmacological strategies to attenuate Doxo-induced endothelial senescence, we identified resolvin E1 (RvE1), an endogenous pro-resolving mediator, as capable of reducing cell senescence induced by both Doxo and IL-1 β by interfering with the increased expression of pP65, NLRP3, and pro-IL-1 β proteins and with the formation of active NLRP3 inflammasome complexes. Overall, RvE1 and the blockade of the NLRP3 inflammasome-IL-1 β axis may offer a novel therapeutic approach against Doxo-induced cardiovascular toxicity and subsequent sequelae.

Abbreviations: AK, Anakinra; ASC, Apoptosis-associated speck-like protein containing carboxy-terminal CARD; CDKs, Cyclin-dependent kinase inhibitors; CVD, Cardiovascular disorders; Doxo, Doxorubicin; ECGS, Endothelial cell growth supplement; EPA, Eicosapentaenoic acid; FCS, Fetal calf serum; HUVEC, Human umbilical vein endothelial cells; IL-1 β , Interleukin-1 β ; NF- κ B, Nuclear factor kappa B; NLRP3, Nucleotide-binding domain-like receptor protein 3; pP65, phosphorylated p65; RvE1, Resolvin E1; SASP, Senescence-associated secretory phenotype; SA- β -gal, Senescence associated- β -galactosidase; γ H2AX, Phosphorylated histone H2AX.

* Corresponding authors at: Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, Calle Arzobispo Morcillo 4, C.P. 28029, Madrid, Spain (C. Peiró). Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, Calle Arzobispo Morcillo 4, C.P. 28029, Madrid, Spain. (C.F. Sánchez-Ferrer). Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Faculty of Chemical Sciences and Pharmacy, Universidad de Chile, Sergio Livingstone 1007, Santiago 8380492, Chile (G. Díaz-Araya).

E-mail addresses: gadiaz@ciq.uchile.cl (G. Díaz-Araya), carlosf.sanchezferrer@uam.es (C.F. Sánchez-Ferrer), concha.peiro@uam.es (C. Peiró).

¹ Both authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115078>

Received 9 December 2021; Received in revised form 14 April 2022; Accepted 2 May 2022

Available online 10 May 2022

0006-2952/© 2022 Published by Elsevier Inc.