



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Efecto de la resolvina D1 sobre fibroblastos cardiacos senescentes inducidos por angiotensina II

Memoria para optar al Título Profesional de Químico
Farmacéutico

Estudiante:

Sebastián Isaac Farias Martínez

Director: **Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya**

Patrocinante: **Dr. Guillermo Antonio Díaz Araya**

Santiago de Chile, 2023

Financiamiento

El desarrollo de esta memoria de título se realizó en el Laboratorio de Farmacología Molecular, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Este trabajo contó con el apoyo y financiamiento del proyecto FONDECYT N° 1210627.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente agradezco a Dios por capacitarme para desarrollar esta memoria de tesis, y por otorgarme la fortaleza para no rendirme pese a las dificultades y lo interminable que se sintió, también quiero agradecer al equipo farmolab principalmente al apoyo y disposición de José Miguel Osorio y Claudio Espinoza Pérez a enseñarme e instruirme, también al profesor Guillermo Díaz Araya por la oportunidad y la confianza que depositó en mí para desarrollar este trabajo; así mismo, agradezco a mis compañeros de laboratorio, Mauricio Román y Rubén Vélez por su presencia y alegría que dieron a todo este proceso.

Quiero mostrar mi gratitud a cada persona que se vio involucrada en esta memoria de tesis, a Constanza Rimassa Taré y Víctor Machuca por hacerme sentir parte del equipo, a los chicos del laboratorio de Farmacología Experimental por alegrar mis días con su presencia, a los chicos del ACCDIS por su disposición para ayudarnos en momentos de escasez y a muchos otros que no nombraré por temas de que no me caerían en esta página.

Finalmente quiero dar las gracias a la vida de todos y cada uno de los animales que fueron sacrificados por hacer posible este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

FINANCIAMIENTO.....	2
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	11
1.- INTRODUCCIÓN	13
1.1.- Generalidades	13
1.2.- Senescencia celular	14
1.3.- Fibroblasto cardiaco.....	18
1.4.- Inductores de senescencia celular	19
1.4.1.- Angiotensina II	19
1.5.- Fármaco Senostático y Senolítico	21
1.5.1.- Resolvina D1	21
2.- HIPÓTESIS.....	24
3.- OBJETIVO GENERAL	24
4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5.- MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1.- Reactivos.....	25
5.2.- Modelo animal	25
5.3.- Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos.....	25
5.4.- Pasaje celular	26
5.5.- Western Blot	27
5.6.- Ensayo de SA-β-Gal	28
5.7.- Medición de SASP.....	29
5.8.- Análisis estadístico.....	29
6.- RESULTADOS.....	30
6.1.- Efecto senescente de la Ang II	30

6.2.- Efecto de la Ang II sobre la inducción de un SASP proinflamatorio.....	35
6.3.- Efecto de la Resolvina D1 sobre senescencia inducida por Ang II	36
6.4.- Efecto de Resolvina D1 sobre la modulación del SASP.....	38
7.- DISCUSIÓN.....	40
7.1.- Efecto de la Ang II sobre fibroblasto cardiacos de rata.....	41
7.2.- Efecto de resolvina D1 en fibroblastos cardiacos de rata senescente..	43
7.3.- Efecto de resolvina D1 sobre la regulación del SASP.....	45
8.- CONCLUSIONES.....	47
9.- LIMITACIONES	47
10.- PROYECCIONES	47
11.- BIBLIOGRAFÍA.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción general de los mecanismos moleculares que conducen a la senescencia celular.

Figura 2. Senescencia como “hallmark” central del envejecimiento.

Figura 3. Desencadenantes de la senescencia y vías efectoras.

Figura 4. Mecanismos potenciales de activación de NADPH oxidasa y generación de ROS inducidos por Ang II en células fagocíticas y no fagocíticas.

Figura 5. Efecto de la RvD1 al unirse a los receptores FPR2.

Figura 6A. Efecto de la Ang II sobre la expresión de p-p38.

Figura 6B. Efecto de la Ang II sobre la expresión de p-p38.

Figura 7. Efecto de la Ang II sobre la expresión de p53.

Figura 8. Efecto de la Ang II sobre la expresión de p21.

Figura 9. Efecto de la Ang II sobre la expresión de pRb.

Figura 10. Efecto de la Ang II sobre la actividad SA-β-Gal.

Figura 11. Efecto de la Ang II en la inducción de un SASP proinflamatorio.

Figura 12. Efecto de la RvD1 sobre la actividad SA-β-Gal inducida por Ang II.

Figura 13. Efecto de la RvD1 sobre sobre la expresión de pRb en FC senescentes inducidos por Ang II.

Figura 14. Efecto de la RvD1 sobre la secreción de citoquinas proinflamatorias de un SASP inducido por Ang II.

ABREVIATURAS

ECV	Enfermedades cardiovasculares.
OMS	Organización mundial de la salud
pRB	Proteína del retinoblastoma.
γ H2A.X	Histona gamma H2AX.
53BP1	p53-binding protein 1.
SASP	Fenotipo secretor asociado a senescencia.
CDK4/6	Kinasas dependientes de ciclinas 4/6.
SA-B-Gal	Actividad β -galactosidasa.
FC	Fibroblasto cardiaco.
MEC	Matriz extracelular.
Ang II	Angiotensina II.
TLR4	Toll-like receptor 4.
MFC	Miofibroblasto cardiaco.
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta type 1.
α -SMA	Alpha Smooth Muscle Actin.
NF- κ B	Nuclear factor kappa B.
ERK1/2	extracellular signal-regulated protein kinase 1/2.
AKT	Proteína kinasa B.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
RAAS	Sistema renina angiotensina aldosterona.
AT1R	Receptor de angiotensina II tipo 1.
SMP	Mediadores especializados pro-resolutivos.
EPA	Ácido eicosapentaenoico.
DHA	Ácido docosahexaenoico.
RvD	Resolvinas de la serie D.
WB	Western Blot.

DMEM-F2	Dulbecco's Modified Essential Medium - Formula 12.
B-Tub	Beta tubulina.
FBS	Suero fetal bovino.
TBS	Tris-buffered saline.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ANOVA	Análisis de varianza.
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3.
IL-1 β	Interleuquina 1 beta.
AKT	Proteína kinasa B.
PLC	Fosfolipasa C.
IP3R	Receptor de inositol trifosfato.
MAPK	Proteína kinasa activada por mitógenos.

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), son variadas y muy complejas, las que, son definidas como trastornos del corazón y vasos sanguíneos, y generalmente están asociados a procesos inflamatorios. Los fibroblastos cardiacos son una población celular que controla la homeostasis de la matriz extracelular actuando como célula centinela y secretora de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias, teniendo así un rol central en la respuesta inflamatoria cardiaca frente al daño celular. La senescencia celular es un proceso multifactorial asociado a respuesta inflamatorias y se las ha asociado el desarrollo de lesiones fibróticas, la que se ha definido como un arresto del ciclo celular caracterizado por un fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP). La senescencia celular transitoria suele ser beneficiosa para la célula, ya que se promueve la reparación tisular, pero una senescencia persistente se relaciona con el desarrollo y progreso de enfermedades cardiacas al presentarse una acumulación abyecta de fibroblastos cardiacos senescentes.

La senescencia de fibroblastos cardiacos es una intensa área de investigación. Actualmente se han identificado diversos métodos de estudio y marcadores; así como también diversos estímulos capaces de activar este estado de senescencia. Uno de los estímulos más interesantes es la angiotensina II, que corresponde a un péptido bioactivo proinflamatorio y profibróticos del eje renina-angiotensina-aldosterona. La Angiotensina II es capaz de producir inflamación en el tejido cardiaco y se ha descrito su capacidad para inducir la senescencia sobre fibroblastos cardiacos.

La senescencia de los fibroblastos cardiacos bajo contexto de fibrosis cardiaca toma una principal relevancia considerando el efecto inflamatorio de estas células, por lo cual se ha vuelto imperativa la búsqueda de herramientas que permitan contrarrestar esta situación, ya sea eliminando células senescentes o evitando que se produzcan más de estas células. Un enfoque que se continúa estudiando para lograr este objetivo es intervenir en el proceso inflamatorio que está ligado al desarrollo de la senescencia, para esto una potencial alternativa es el uso de Resolvina D1 el cual es un mediador lipídico pro-resolutivo especializado, con el potencial de suprimir las citoquinas inflamatorias liberan los fibroblastos cardiacos.

La hipótesis plantea que la Resolvina D1 modula el SASP y disminuye el número de células senescentes inducidas por Ang II a través de un mecanismo asociado a apoptosis. Se planteó como objetivo evaluar la inducción de senescencia sobre los fibroblastos cardiacos utilizando la angiotensina II como estímulo estresor. Como segundo objetivo, demostrar que

el uso de resolvina D1 es capaz de detener y/o eliminar la senescencia inducida de los fibroblastos cardiacos.

Para demostrar la inducción de senescencia, los fibroblastos cardiacos en placa fueron estimulados con Angiotensina II por 72 horas, luego se procedió a medir la expresión de proteínas marcadoras asociadas a la senescencia, p38, p53, p21 y pRb, además de esto los medios de las placas fueron centrifugados y alicuotados para ser sometidos a un ensayo multiplex luminex para medir citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-5, MCP-1 y TNF- α y se midió la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -galactosidasa). Para observar el efecto de la Resolvina D1, los fibroblastos cardiacos fueron tratados con Ang II por 72 horas, transcurrido este tiempo se trataron con Resolvina D1 por 48 horas hasta alcanzar un tiempo experimental de 120 horas, seguidamente se midieron citoquinas proinflamatorias que fueron extraídas de los medios de las células previamente centrifugadas y alicuotadas para ser sometidos a un ensayo Multiplex Luminex para determinar el nivel de secreción de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-5, MCP-1 y TNF- α , seguido a esto se midió la actividad SA- β -galactosidasa y la proteína marcadora pRb.

Se evidenció que la Angiotensina II es capaz de inducir senescencia en fibroblastos cardiacos y además que la Resolvina D1 es capaz de detener el proceso senescente inducido por la Angiotensina II. Esto demuestra que la Resolvina D1 es un mediador pro-resolutivo de la inflamación especializado, con un perfil senostático el cual puede ser una potencial alternativa terapéutica para intervenir en la senescencia de fibroblastos cardiacos los cuales tienen una estrecha relación en el desarrollo de la fibrosis cardiaca.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVD), which are varied and very complex, defined as disorders of the heart and blood vessels, are associated with inflammatory processes. Cardiac fibroblasts are a cell population that controls the homeostasis of the extracellular matrix acting as a sentinel cell and secreting chemokines and proinflammatory cytokines, thus having a central role in the cardiac inflammatory response to cell damage. Cellular senescence is a multifactorial process associated with inflammatory and fibrotic responses, defined as a cell cycle arrest characterized by a senescence-associated secretory phenotype (SASP), transient cellular senescence is usually beneficial to the cell, as tissue repair is promoted, but persistent senescence is associated with the development and progression of cardiac disease as there is an abject accumulation of senescent cardiac fibroblasts.

The senescence of cardiac fibroblasts is a subject of study in which several methods capable of inducing this state have been identified, such as angiotensin II, which is a bioactive peptide and a proinflammatory and profibrotic agent of the renin-angiotensin-aldosterone axis. It is capable of producing inflammation in cardiac tissue and has been described to induce senescence in cardiac fibroblasts.

The senescence of cardiac fibroblasts in the context of cardiac fibrosis takes on a major relevance considering the inflammatory effect of these cells, so it has become imperative to search for tools to counteract this situation, either by eliminating senescent cells or by preventing the production of more of these cells. One approach that continues to be studied to achieve this objective is to intervene in the inflammatory process that is linked to the development of senescence, for which a potential alternative is the use of resolvin D1, which is a specialized pro-resolving mediator with the potential to suppress inflammatory cytokines that have demonstrated its anti-inflammatory effect on cardiac fibroblasts.

We aimed to evaluate the induction of senescence on cardiac fibroblasts using angiotensin II as a stressor stimulus. A second objective is to demonstrate that the use of resolvin D1 can stop and/or eliminate the induced senescence of cardiac fibroblasts.

To demonstrate the induction of senescence, cardiac fibroblasts in place were stimulated with angiotensin II for 72 hours, then we proceeded to measure the expression of senescence-associated marker proteins, p38, p53, p21, and pRb, in addition to this the media of the plates were centrifuged and aliquoted to be subjected to a multiplex Luminex assay to measure proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-5, MCP-1 and TNF- α and senescence-associated β -galactosidase activity was measured. To observe the effect of resolvin D1. Cardiac fibroblasts were treated with Ang II for 72 hours, after which time

they were incubated with resolvin D1 for 48 hours until reaching an experimental time of 120 hours, Proinflammatory cytokines were then measured and extracted from the media of the previously centrifuged and aliquoted cells to be subjected to a Multiplex Luminex assay to determine the level of secretion of IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-5, MCP-1 and TNF- α , followed by the measurement of β -galactosidase activity and the pRb marker protein.

It was evidenced that angiotensin II can induce senescence in cardiac fibroblasts and a proinflammatory state in the cells, it was also evidenced that resolvin D1 can stop the senescent process induced by angiotensin II. This demonstrates that resolvin D1 is a specialized pro-resolving mediator of inflammation, which may be a potential therapeutic alternative to intervene in the senescence of cardiac fibroblasts which are closely related to the development of cardiac fibrosis.

1.- INTRODUCCIÓN:

1.1.- Generalidades

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un grupo de desórdenes del corazón, vasos sanguíneos y riñón, e incluye enfermedades coronarias, cerebrovasculares, cardiaca reumática y otras condiciones. Se estima que las enfermedades cardíacas son las responsables de 17.9 millones de muertes globales cada año donde más de cuatro de cada cinco muertes se deben a infartos al miocardio y accidente cerebrovasculares, donde un tercio de estas muertes se producen de manera prematura en personas menores a 70 años. Existen numerosos factores de riesgo que aportan en la aparición de estas condiciones siendo una de las más importantes los riesgos conductuales como una dieta poco saludable, el sedentarismo, el consumo excesivo de tabaco y alcohol. Todos estos factores pueden manifestarse en un aumento de la presión arterial, un aumento de la glucosa y lípidos en sangre además de sobrepeso y obesidad; por lo tanto, la detección oportuna de estas señales se ha visto como algo fundamental para el tratamiento temprano de los pacientes ya sea con orientación preventiva o ya con la administración de tratamiento farmacológico [1].

En Chile cerca de 30.000 personas mueren anualmente, esto debido a las enfermedades cardiovasculares más que cualquier otra causa [2]. En la última década Chile experimentó un gran cambio en sus hábitos alimenticios, así como también, un aumento de los niveles de inactividad física, lo que, asociado al alto grado de obesidad y enfermedades crónicas en el país, exacerban la prevalencia de estas enfermedades en la población chilena [3]. Debido a esto se ha vuelto imperativa, la búsqueda de opciones para evitar la aparición de estas enfermedades o en su defecto otorgar tratamientos oportunos frente a la presencia de estas. Para esto es necesario una investigación detallada del desarrollo de estas enfermedades, y a la par se buscan nuevas alternativas de tratamiento, lo que es importante para reducir las altas tasas de mortalidad en el país

Una línea de investigación de las ECV se relaciona con la senescencia celular, proceso que afecta a varios tipos de células cardíacas que se relacionan con el desarrollo de diversas ECV como infarto agudo al miocardio, fibrosis cardíaca,

ateroesclerosis. Aunque la senescencia es un proceso estudiado en los últimos años aún se desconoce y falta entender cómo se realiza este proceso en las células cardiacas. Debido a esto, el entender como la senescencia celular se involucra en el desarrollo de estas EVC, entre ellas la fibrosis cardiaca es un enfoque prometedor para obtener alternativas que ayuden a impedir y/o reducir el progreso de estas enfermedades.

1.2.- Senescencia celular

La senescencia es un proceso celular, producto de estrés que conduce al arresto irreversible del ciclo celular, y este estado tiene un gran nexo con el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad, ya que las células senescentes se acumulan en la vejez [5].

La senescencia tiene dos vertientes, una de ellas es la senescencia programada, que está implicada en la organogénesis en etapas tempranas, la curación de heridas, la reparación de tejidos y protección contra tumorigénesis. La segunda es la senescencia celular no programada que normalmente ocurre como consecuencia de la disfunción de los telómeros, estrés tóxico o daño al DNA; y en la vejez se ha asociado a la acumulación exponencial de células senescentes que terminan por superar al sistema inmunológico [6].

Como ya se mencionó, la senescencia posee dos vertientes de las cuales la senescencia inducida es la más relevante desde el punto de vista investigativo. Posee diversas vías de activación, donde las vías de p16/Rb y p53/p21 son las más relevantes para la detención irreversible del crecimiento celular [5]. Estas vías reprimen la quinasa dependiente de ciclina CDK1, CDK2, CDK4 y CDK6, evitando la fosforilación del Rb, y esta fosforilación es necesaria para que la actividad de los factores de transcripción E2F inicien la expresión de la fase G1 a S3 o 11. Otras vías involucradas son las que se relacionan con la activación de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) mediante ROS y el sistema del factor de crecimiento transformante beta (TFG- β) [6, 7]. En la figura 1, se describen las principales vías involucradas en la inducción de la senescencia.

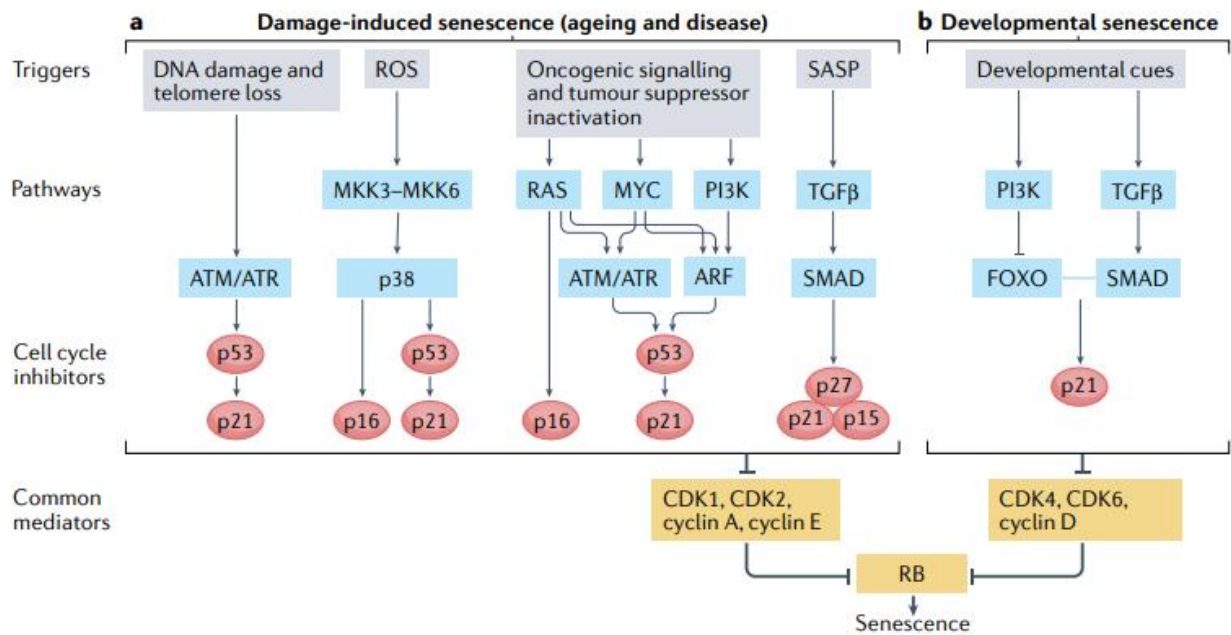


Figura 1. Descripción general de los mecanismos moleculares que conducen a la senescencia celular. Las vías subyacentes que conducen a la senescencia celular pueden variar según el estímulo desencadenante, el contexto o el tipo de célula involucrada. (Mehdizadeh M, et al 2022) [6].

Cabe destacar que se ha observado una estrecha relación entre la disfunción mitocondrial y la senescencia celular, y varios estudios muestran que el papel de las mitocondrias disfuncionales en la inducción de la senescencia va más allá de la simple producción de ROS [6, 8, 9]. Por ejemplo, la acumulación de mitocondrias dañadas debido a una mitofagia deteriorada es un importante contribuyente al desarrollo de la senescencia.

Las células senescentes de por sí liberan una gran variedad de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas, lípidos y proteasas conocido como secretoma asociado a senescencia (SASP: del inglés senescence associated secretome profile). El SASP promueve la restructuración de la matriz extracelular para su remodelación y reparación mediante linfocitos atraídos desde el sistema inmune para eliminar las células senescentes; sin embargo, en el contexto de envejecimiento, la senescencia celular no programada conduce a la acumulación de células senescentes, consecuentemente la carga de productos derivados del SASP aumenta y afecta a las células vecinas a través de efectos paracrinos, conocido como senescencia inducida por senescencia [6]. El control del secretoma de las células senescentes se produce

a múltiples niveles, desde la remodelación de la cromatina, la activación de factores de transcripción específicos como C/EBP y NF- κ B y el control de la traducción del ARNm; sin embargo, estudios demuestran que aparentemente la persistencia del daño al DNA (DDR, del inglés DNA Damage Response), es el factor crítico para la regulación del SASP, esto converge en la inducción de un programa transcripcional necesario para que se dé inicio el mecanismo del SASP [10, 11]. En la figura 2, se observa el mecanismo que lleva a la generación del SASP, y los diferentes mecanismos que llevan a la generación de la senescencia.

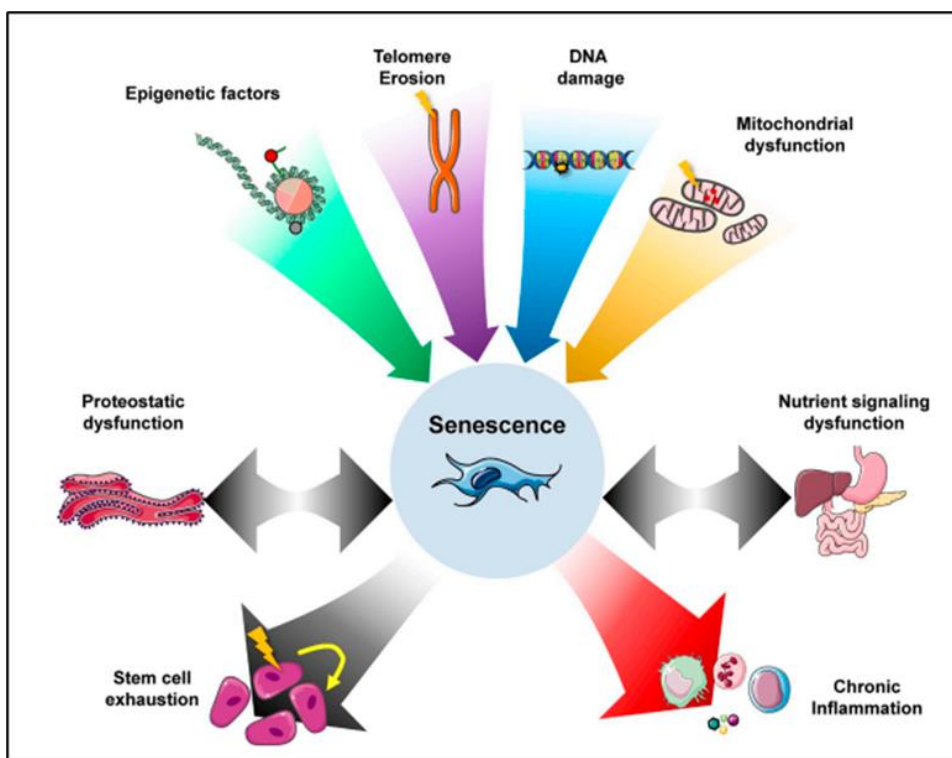


Figura 2. Senescencia como hallmark central del envejecimiento. El daño de los telómeros, la desregulación epigenética, el daño del ADN y la disfunción mitocondrial son los principales impulsores del daño en el envejecimiento. Varios de estos impulsores pueden inducir senescencia. La senescencia, a su vez, puede impulsar las características del envejecimiento consecuentes en respuesta al daño: el agotamiento de las células madre y la inflamación crónica. (Adaptado de López-Otín et al. 2013)[12].

La identificación de senescencia no es una tarea sencilla; sin embargo, las células senescentes son caracterizadas por diversos marcadores citológicos y moleculares los cuales permiten su identificación, entre estos se incluye:

- a) Morfología aplanada de gran tamaño,
- b) Activación del daño al DNA (DDR) y consecuentemente el reclutamiento de la ataxia telangiectasia mutada (ATM), la cual es capaz de activar la proteína p53 y YH2AX [13], la persistencia del DDR induce la fosforilación de la p53 en múltiples residuos de serina, esto mejora la capacidad de la p53 para inducir variedad de genes transcripcionales que promueven el arresto del ciclo celular [14].
- c) La actividad SA-beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA-B-Gal), la cual se ve aumentada en células senescentes, se detecta mediante una tinción histoquímica de células usando el sustrato artificial X-Gal [15, 16],
- d) También hay un incremento en la expresión de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDK), p16, p21 y la hipo fosforilación de la proteína retinoblastoma [13]. En la figura 3, se observan estos marcadores de senescencia.

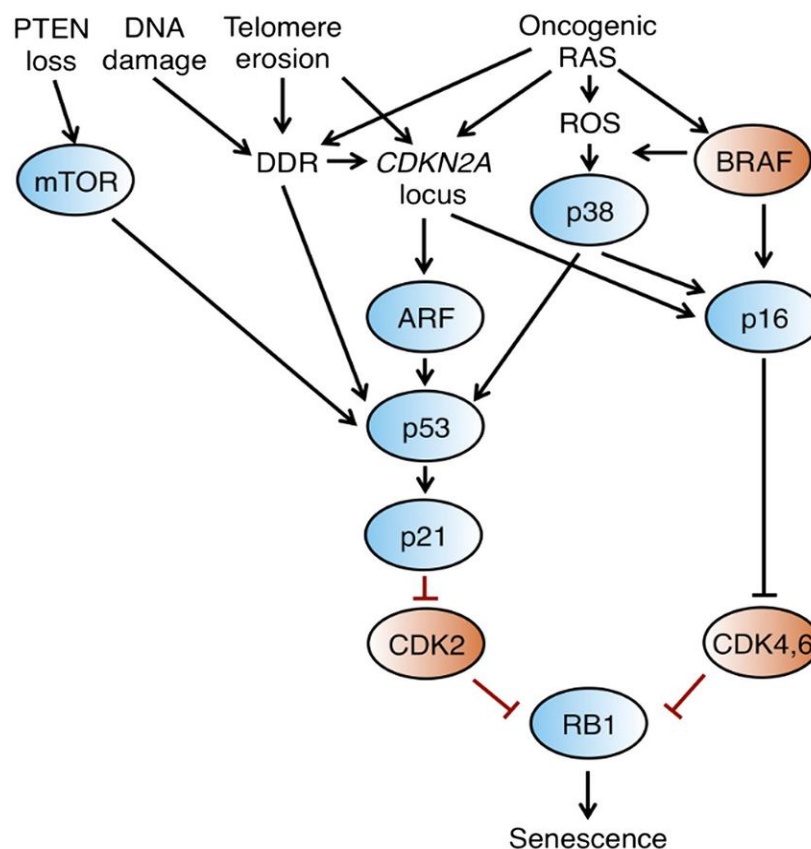


Figura 3. Desencadenantes de la senescencia y vías efectoras. Variedad de tensiones pueden desencadenar la activación de vías efectoras de senescencia, muchas de ellas independientes del DDR, pero todas convergen en las vías p53, p16INK4A (Lujambio A, et al. 2016) [17].

1.3.- Fibroblastos cardiacos

Los fibroblastos cardiacos (FC), son células que cumplen un importante rol en el desarrollo del corazón durante la fase embrionaria, y aunque no son células muy numerosas conformando 1/6 de la población celular cardiaca, estas tienen una función clave en la mantención de la homeostasis tisular y también de la respuesta inflamatoria [18]. Los FC son reconocidos morfológicamente por su forma de huso plana y su rol estructural en la síntesis de la matriz extracelular (MEC) [19]. Diversos reportes describen que los FC expresan una gran variedad de receptores que dan cuenta de la respuesta de estas células cuando enfrentan respuestas proinflamatorias, los más importantes son: Receptores de cininas B1 y B2 cuya estimulación activa vías de señalización que disminuyen la síntesis y secreción de colágeno; los receptores B2 adrenérgicos cuya estimulación activa la PKA y proteínas de intercambio activadas por cAMP, lo que promueve efectos diferenciales en relación con la disminución de la secreción de colágeno, proliferación y autofagia; los receptores de angiotensina II (AT1R y AT2R), cuya activación promueve la síntesis de colágeno y estimula la proliferación celular; sin embargo, la sobreexpresión de este receptor promueve la apoptosis. También se expresan los receptores asociados a células inmunes como Toll Like Receptor 4 (TLR4), NLRP3 y el receptor de interferón, y la estimulación de estos receptores permiten a los FC su participación en respuestas inflamatorias de la reparación cardiaca [20].

Los FC, han sido denominados células centinelas debido a su eficiente capacidad de respuesta eficiente a los PAMPS y a los DAMPS en un contexto de daño cardiaco. Desempeñan un importante papel en el proceso de cicatrización y remodelamiento del tejido cardiaco a través de la secreción de citoquinas, factores de crecimiento, metaloproteasas y moléculas de adhesión [21, 22].

Los FC, experimentan una senescencia con un predominio en la detención del ciclo celular, desarrollo de un SASP de carácter proinflamatorio y una disminución en la secreción de proteínas de la MEC como por ejemplo colágeno y elastina. La activación rápida y coordinada de los FC es crucial tras un infarto agudo al miocardio (IAM) para sustituir y reforzar el tejido necrótico por fibrótico con la finalidad de proporcionar un soporte estructural y evitar la ruptura de la pared ventricular, a esto se le conoce como una senescencia de fase aguda la cual como mencionamos

trae beneficios a corto plazo [23]. Sin embargo, a pesar de que la senescencia de fase aguda limita la síntesis de colágeno, se desarrolla un SASP proinflamatorio persistente y con el tiempo el estado inflamatorio de las células termina contribuyendo al daño tisular [24].

1.4.- Inductores de la senescencia celular

Como se mencionó anteriormente la senescencia celular es un proceso que normalmente se asocia con el envejecimiento y es frecuente en las patologías que se relacionan con la edad. Sin embargo, la senescencia celular tiene la particularidad de poder ser inducida de manera prematura por diversos estresores, un hecho que tiene estrecha relación con la progresión de diversas enfermedades que no necesariamente están relacionadas con la edad. Teniendo esto en cuenta, es importante el identificar que compuestos son capaces de inducir este estado en las células con el fin de lograr combatir o mejor dicho prevenir la aparición de dichas enfermedades relacionadas con la senescencia.

Se han descrito diversos estímulos que son capaces de inducir la senescencia tales como drogas genotóxicas, estrés oxidativo, agentes desmetilantes y acetilantes [25]; además de moléculas capaces inducir la senescencia como tocotrienoles, curcumina o quercetina entre otros [26]. En este trabajo se estudiará el efecto de la angiotensina II como una molécula capaz de producir la inducción de la senescencia celular.

1.4.1.- Angiotensina II

La angiotensina II (Ang II), es un agente peptídico bioactivo que regula los niveles de presión arterial, siendo este el producto principal del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) [27]. El RAAS es un sistema que inicialmente se conocía como una cascada enzimática de dos pasos, catalizada por la renina y la enzima convertidora de angiotensina (ECA), mas ahora se sabe que el RAAS contiene múltiples péptidos generados a partir de varias reacciones enzimáticas [28]. Se sabe que la Ang II produce varios estímulos a nivel fisiológico incluyendo la generación de

estrés oxidativo, estimulación del sistema nervioso y activación de sistema inmune. Para lograr estos y más efectos, al Ang II se une a dos tipos de receptores acoplados a proteínas G conocidos como AT1R y AT2R [29]. La unión específica de Ang II al AT1R activa muchas vías de señalización intracelular, donde la vía de la proteína Gq alfa activa la fosfolipasa C (PLC) y por consecuencia se activa la proteína quinasa C (PKC) la cual aumenta los niveles de calcio intracelular. Además de esto la activación del AT1R promueve la activación de la vía de señalización MAPK, induciendo la proliferación de FC y la expresión de factores profibróticos. Además de esto, se incrementa la producción de TGF- β 1 el cual está asociado a la fibrosis cardiaca, donde el efecto proinflamatorio de la Ang II ligado a la activación de AT1R se debe principalmente a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la activación del factor NF- κ B [30]. En la figura 3, se observa la activación de AT1R por Ang II y las vías de señalización implicadas.

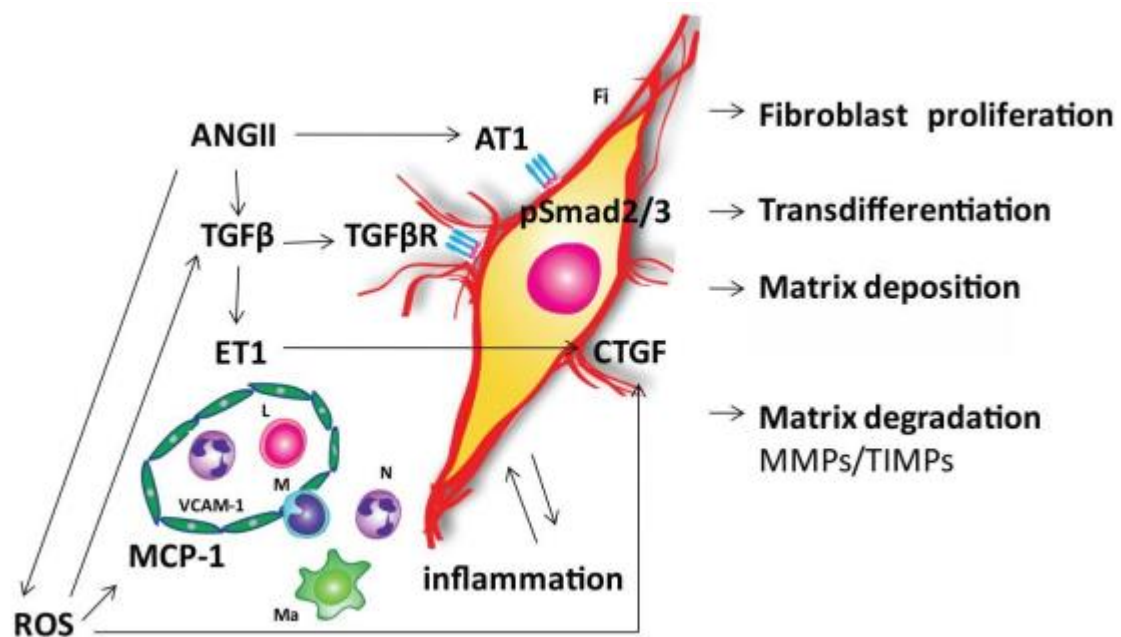


Figura 4. Rutas involucradas en la patogénesis de fibrosis cardiaca en un corazón senescente. (Biernacka A, et al. 2011) [31].

1.5.- Fármacos Senostáticos y Senolíticos

Al comprender el importante rol que cumple la senescencia celular en la progresión de múltiples patologías asociadas a la vejez, cada vez se centran más estudios con la finalidad de hallar diferentes estrategias de tratamiento farmacológico que ayuden a contrarrestar este proceso senescente ya sea eliminando las células senescentes o deteniendo el proceso sobre las células que aún no se vuelven senescentes. Actualmente existen una gama de moléculas que pueden actuar deteniendo el desarrollo de la senescencia celular conocidos como senostáticos, estas son moléculas que, si bien no matan a las células senescentes, se encargan de inhibir la ruta paracrina evitando que aumente el número de células senescentes existentes [32]. Esto se consigue debido a que los senostáticos modulan el SASP interfiriendo con los reguladores de este, como los inhibidores de las vías NF-kB, p38 MAPK, JAK/STAT y mTOR [33]. Otro grupo de fármacos son los senolíticos, estos son una clase de fármacos que puede diferenciar entre células no senescentes de células senescentes para inducir selectivamente la apoptosis de estas últimas, por lo tanto, los fármacos conocidos como senolíticos son capaces de eliminar las células senescentes mejorando la función de múltiples órganos y la vida útil de los organismos. Los senolíticos presentan ventajas por ejemplo una menor probabilidad de efectos secundarios debido a la administración intermitente y a la alta selectividad contra células senescentes, la desventaja con esto mismo es que no solo eliminan las células senescentes y sus efector perjudiciales, sino que también sus efectos beneficiosos de una senescencia aguda por ejemplo la morfogénesis en el desarrollo embrionario y la regeneración y cicatrización de heridas [13, 34].

1.5.1.- Resolvina D1

La Resolvina D1 (RvD1) es un lípido especializado pro-resolutivo (SMP), que deriva del ácido docosahexaenoico (DHA). Este actúa como un potente antiinflamatorio cuya acción sobre el sistema, promueve la protección de órganos y la reparación tisular. Los SPM tienen la característica de reducir agentes proinflamatorios como leucotrienos, prostaglandinas y citoquinas proinflamatorias, entre otros. La RvD1, es capaz de unirse a los receptores ALX/FPR2, los cuales están

asociados a proteínas Gi, estos tienen como función la inhibición de las enzimas adenilato ciclasa, fosfolipasa C, A2 y D. La inhibición de la fosfolipasa C interfiere en toda la ruta de síntesis de factores transcripcionales pro- inflamatorios, por ejemplo, la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 y la inhibición del factor NF- κ B [35]. Recientemente, un estudio demostró que la RvD1 vía ALX/FPR2 disminuye la expresión de citoquinas IL6, MCP-1 y TNF- α , en procesos proinflamatorios gatillados por Ang II y/o LPS en FC de rata adulta y disminuye la adhesión de células mononucleares de bazo (Linfocitos y monocitos) a FC inducidos por Ang II [18]. La figura 6, muestra el efecto de la RvD1 al unirse a su receptor principal ALX/FPR2.

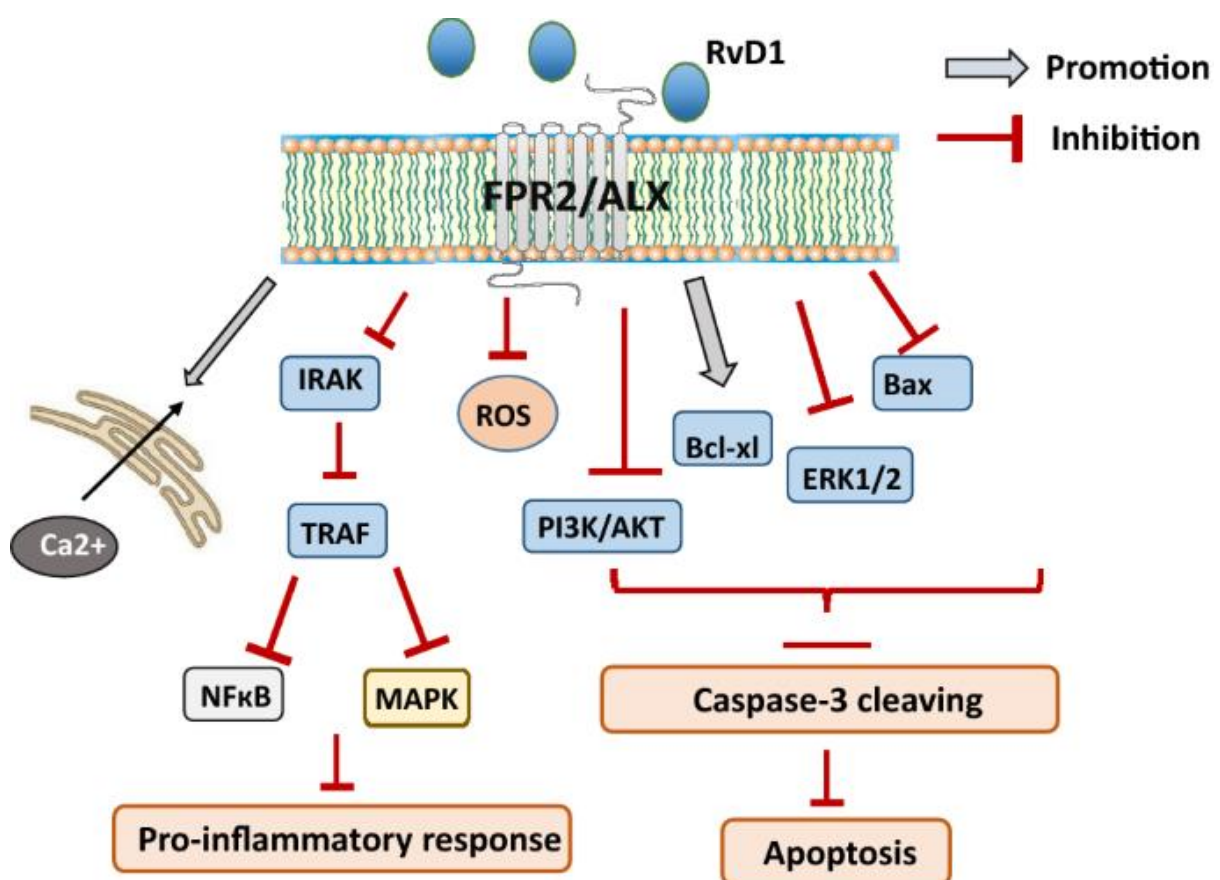


Figura 5. Efecto de la RvD1 al unirse a los receptores FPR2, promoviendo a supervivencia celular mediante la liberación de Ca^{2+} , activación de ERK1/2 y PI3K o bloqueando el TNF- α , así como también la caspasa-3. (Tylek K, et al. 2021) [36].

Tomando todos estos antecedentes destacamos el potencial inflamatorio de la Ang II y su capacidad para producir senescencia en variedad de células mediante

la activación de diversos receptores. También se destaca la importancia de la senescencia aguda como un mecanismo de respuesta frente a una injuria donde esta juega un rol de suma importancia en la curación de heridas, reparación de tejidos y protección contra tumorigenesis y así también que su mantención promueve un estado proinflamatorio que si no se controla conlleva al desarrollo de gran variedad de enfermedades asociadas a la edad como fibrosis cardiaca. Estos antecedentes nos permiten postular la siguiente hipótesis

2.- HIPÓTESIS

Resolvina D1 modula el SASP y disminuye el número de células senescentes inducidas por Ang II.

3.- OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la Resolvina D1 altera el SASP y disminuye el número de células senescentes inducidos por Ang II en fibroblastos cardiacos

4.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 4.1. Demostrar que la Ang II induce senescencia de fibroblastos cardiacos
- 4.2 Demostrar que Resolvina D1 disminuye el número de células senescentes inducidas por Ang II
- 4.3. Demostrar que la Resolvina D1 modula el SASP de fibroblastos cardiacos senescentes inducidos por Ang II.

5.- MATERIALES Y METODOS

5.1.- Reactivos

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

Anticuerpos primarios p53 mouse (cód. #2524), p-p38 rabbit (cód. #4511), p38 MAPK antibody (cód. #9212), p-Rb rabbit (cód. #8516), β -tubulin (cód. #2146), Histona, Anticuerpos secundarios Anti-mouse (cód. #7076) y Anti-rabbit (cód. #7074), y Kit de β -galactosidasa (#9860S) fueron adquiridos en Cell Signaling Technology Inc. (MA, EEUU). Anticuerpo primario p21 (#sc-6246) mouse fue adquirido en Santa Cruz Biotechnology Inc. (Texas, EEUU). Reactivo RvD1 (Resolvina D1) (cód. 10012554). Angiotensin II human (A9525-1MG), Doxorubicin (D1515) y Reactivo Bradford (B6916-500mL) adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Colagenasa tipo II (CAS No. 9001-12-1) y Trypan blue (15250-061) adquiridos en Life Technologies Corporation (CA, EEUU).

5.2.- Modelo animal

Ratas Sprague-Dawley machos adultos de 6-8 semanas de vida (200-300g), obtenidas desde el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. El manejo de dichos animales se llevará de acuerdo con el protocolo establecido por el comité de bioética de la facultad.

5.3.- Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardiacos

Las ratas macho adultas Sprague-Dawley fueron anestesiadas con una solución de ketamina-xilacina (2:1) en forma intraperitoneal para luego extraer el corazón bajo

condiciones de asepsia empleando una toracotomía bilateral. Los FC se aislaron desde los ventrículos izquierdos procesando el corazón por molienda mecánica y sometiendo el tejido resultante a dos procesos de digestión enzimática (colagenasa tipo II), el primero de 45 min, inactivando la solución de digestión, transcurrido ese tiempo y colocando una solución de digestión nueva para un segundo ciclo de digestión enzimática de otros 45 minutos. Las soluciones obtenidas fueron centrifugadas a 30 rcf por 2 min, se tomó el sobrenadante el cual se centrifugó a 120 rcf por 10 minutos del cual se extrajo el pellet celular. Este fue re-suspendido en medio DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, posteriormente, este medio se sembró en placas de cultivos de 100mm, manteniéndose en un ambiente con aire/CO₂ 95%/5% y 100% humedad a una temperatura de 37°C. Transcurridas 24 horas, las células se lavaron dos veces con PBS 1X estéril y se les adicionó FBS 10% fresco, además de eso se realizó un re-suspendido con el medio antiguo, luego este medio se tomó y centrifugó a 120 rcf por 10 minutos, el pellet obtenido se re-suspendió en medio FBS 10% fresco y se sembró en placas de 100mm. Por 7 días a las células se les realizaron cambios de medios de manera frecuente para asegurar su correcta proliferación, hasta llegar a un índice de confluencia cercana al 100% (6-7 días).

5.4.- Pasaje celular

Conseguida la confluencia necesaria, las células fueron lavadas 3 veces con 5mL de PBS estéril, posteriormente las células fueron tripsinizadas, con 1,5mL de tripsina 1X al 0.05% por 5 minutos para la obtención de los FC. Transcurrido ese tiempo, la tripsina se inactivó con un total de 4ml de FBS 10%. El conteo de células vivas totales se realizó en una cámara Neubauer con microscopio óptico, mediante la tinción por azul de tripán. Los FC se sembraron en placas de cultivo de 60 mm con un total de 250.000 células por placa para su posterior estimulación por los tiempos respectivos, después del cual se realizó la extracción con buffer de lisis y se efectuó la cuantificación proteica mediante la técnica de Bradford. Los FC también se sembraron FC en placas de 6 pocillos de 35mm cada uno con un total de 60.000 células por placa para el posterior análisis de su actividad β -galactosidasa asociada a senescencia.

5.5.- Western Blot

Las placas de 60mm que contenían la siembra de células, se sometieron a 3 ciclos de lavados con PBS no estéril 1X frío. Posteriormente se adicionaron 50uL de buffer de lisis y se raspó suavemente la placa con una espátula plástica limpia para la obtención del lisado celular, el cual se recolectó en tubos de Eppendorf de 1,5mL y luego se centrifugó a 15.000 rpm por 10 minutos con la centrifuga previamente preparada a 4°C. Se traspasa el lisado a otro tubo de Eppendorf descartando así el pellet y procediendo a realizar la cuantificación de la concentración proteica mediante el método de Bradford. Posteriormente al lisado celular se le adicionó buffer de carga 4X equivalente a 1/3 del volumen total del lisado celular y se calentó a 100°C por 5 minutos para desnaturalizar las proteínas.

Las proteínas se separaron por su masa mediante el uso de la electroforesis en geles de poliacrilamida preparados a partir de una solución de acrilamida/bisacrilamida. La concentración del gel varió según el peso molecular de las proteínas de interés, y las concentraciones del gel concentrador se mantuvieron constante al 5% mientras que para el gel resolutivo se utilizaron las concentraciones de 8% y 15% según necesidad. Se adicionaron volúmenes equivalentes a 30ug de proteína por carril, la electroforesis se realizó en un buffer de electroforesis (compuesto de Tris base, glicina, SDS, agua destilada, ajustada a un pH:8.3), a un voltaje constante de 80 voltios y un amperaje de 120 miliamperios por 3 horas aproximadamente (el tiempo es variable). Finalizada la electroforesis las proteínas separadas en el gel se transfieren una membrana de PVDF de 0.22uM de poro, esto se realiza en un buffer de transferencia (compuesto de Tris base, glicina y agua destilada) durante 960 minutos (16 horas) a un amperaje constante de 100 miliamperios y a un voltaje de 120 voltios.

Una vez las proteínas han finalizado su transferencia a la membrana, esta se tiñe con rojo ponceau para observar cualitativamente si la carga de proteínas es equivalente en cada uno de los carriles que se transfirieron correctamente a la membrana. Posteriormente la membrana se lava con TBS 1X/tween 20 para sacar el exceso de rojo ponceau y se procedió a realizar el bloqueo de la membrana con leche descremada al 5% (p53 y p21) y BSA 5% (p-p38 y pRb) durante 1 hora. Transcurrido el tiempo se incubaron los respectivos anticuerpos primarios (Host

Mouse: p53 1:1000; [Host Rabbit: p21 1:1.000; p-p38 1:1.000; pRb 1:2.000]) durante una noche completa a 4°C. Posteriormente se lavaron las membranas en 3 ciclos de 10 minutos con TBS 1X/Tween 20 y se incubaron durante 120 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-rabbit (1:5.000) y anti-mouse (1:5.000) en TBS 1X/Tween 20 dependiendo de la proteína de interés (Anti-Rabbit: pRb, p21 y p-p38; Anti-Mouse: p53).

1. Trascurrido el tiempo de incubación, las membranas son lavadas en 3 ciclos de 10 minutos, una vez finalizado los lavados se procede a realizar la inmunodetección de las proteínas, las membranas fueron incubadas en una solución de luminol del kit Clarity Max™ Western ECL Substrate y la detección se realizó a partir de un analizador de imagen (syngene G: BOX chemi XT\$; Reino Unido) y el software Image Studio Digits Ver 5.2. Los niveles de proteínas fueron cuantificados mediante este software y normalizados respecto a la β -Tubulina como control de carga, expresando los resultados como veces sobre el control.

5.6.- Ensayo de SA- β -Galactosidasa

Se procedió previamente a descongelar el kit de β -Galactosidasa y se prepararon las soluciones de fijado y tinción (pH:5.9-6.1). La solución de fijado se preparó mezclando, 100uL de solución Fixative 10X con 900uL de agua miliQ por pocillo a fijar, y la solución de tinción se preparó mezclando solución staining 93uL, solución X-gal 50uL, solución A 10uL, solución B 10uL y agua miliQ 837uL por pocillo.

A las placas a trabajar se les retiró el medio de cultivo y se lavó en 3 ciclos con 1mL de PBS 1X filtrado y frío. Se adicionó solución de fijado por pocillo durante 10 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo, las placas se lavaron con PBS 1X FF 3 veces y se adicionó solución de tinción y se dejó en incubación en ausencia de Co2 durante 24hrs. Transcurrido el tiempo se retiró la solución de tinción y se realizaron 3 ciclos de lavado con PBS 1X FF, se dejó con 2mL de esta última solución a cada pocillo y se procedió a su observación por microscopía para su cuantificación y obtención de área celular.

El conteo celular se realizó a partir del software Pixit Pro junto al microscopio, las células fueron fotografiadas para su posterior obtención de área y análisis mediante el software ImageJ. Se contaron un promedio de 600 células por placa y el criterio de positividad fue el de la coloración azul de su núcleo y que el área fuera 1.5 veces mayor al promedio. El resultado se expresó como células positivas sobre el total de células contadas

5.7.- Medición de SASP

Los FC senescentes provenientes de placas tratadas con/sin Ang II por 72 horas, fueron privados de suero, quedando en medio DMEM/F12 fresco. 1 h después se estimularon con PBS, RvD1, por 48 h y pasado este tiempo, los medios de cultivo de cada placa fueron recolectados en tubos eppendorf y centrifugados a 10.000 rpm durante 15 min. Los sobrenadantes se recuperaron y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

El perfil de citoquinas secretados por los FC fue medido mediante ensayo LUMINEX del medio de cultivo utilizando el kit multiplex (RECYTMAG-65K/MILLIPLEX MAP Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El kit fue diseñado para medir un perfil de citoquinas en las que se incluyen IL-1beta, IL-5, IL-6, IL-10, MCP-1 y TNF- α . Los niveles de citoquinas se midieron en el equipo Luminex 200 system, Multiplex Bio-Assay. La cuantificación se realizó basándose en curvas estándar para cada citoquina: IL-6: 73.2-300.000 pg/mL, IL-10: 7.3-30.000 pg/mL, MCP-1: 29.3-120.000 pg/mL y TNF- α : 2.4-10.000 pg/mL. Los valores se normalizaron respecto a la cantidad de proteína total y fueron expresados en pg/mg proteína.

5.8.- Análisis estadístico

Se utilizó t-test (2 grupos) o ANOVA (3 grupos) dependiendo de los grupos experimentales, en función de los resultados del test Shapiro Wilks, se procedió a realizar un test de Levene para evaluar la dispersión de las variantes, posteriormente se realizaron comparaciones múltiples para analizar la significancia entre grupos

experimentales utilizado el test de Tuckey o Dunn para datos paramétricos o no paramétricos respectivamente. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $p < 0.05$. Se utilizó el programa GraphPad Prism 9 para realizar el análisis estadístico completo de todos los resultados.

6.- RESULTADOS

6.1.- Efecto senescente de la Ang II

Actualmente, hay evidencia de que la Ang II puede inducir la senescencia en células, pero se desconoce la ruta de activación de la senescencia celular con exactitud sobre los FC. Para poder dilucidar un poco más esta incógnita se evaluó el efecto de la Ang II sobre FC de rata. Los FC previamente aislados fueron estimulados con 1 μM de Ang II durante 0 a 2 horas; y también por 72 horas, trascurrido ese tiempo se midió p-p38. Además, después de las 72 horas se midieron p53, p21, pRb y p16. Además de esto, se realizó un ensayo de actividad SA- β -galactosidasa a las 72 horas. Todos estos marcadores fueron evaluados con el fin de evaluar la senescencia de los FC y comprender ciertas características de este estado celular.

La figura 6A, muestra los resultados obtenidos a tiempos cortos, posteriores al estímulo con Ang II, se logra observar que el aumento temprano de la proteína p-p38 es a los 30 minutos de su estímulo decayendo su actividad significativamente a las 2 horas. Por otro lado, la figura 6B muestra los resultados obtenidos a las 72 horas de estímulo con Ang II; en ella se observa que no se presenta un aumento significativo en la proteína p-p38, es decir, no hay una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control contra las células tratadas con Ang II.

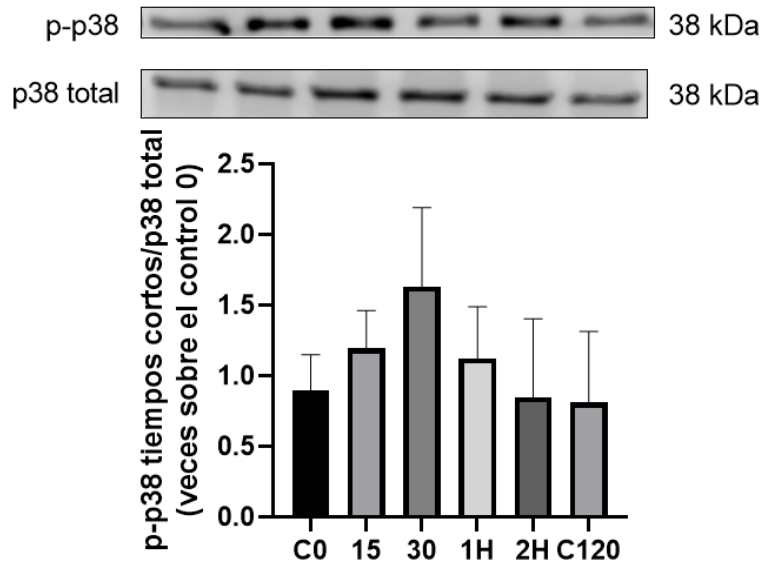


Figura 6A. Efecto de la Ang II sobre la expresión de p-p38. Efecto de Ang II 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 15 minutos, 30 minutos, 1 hora y 2 horas. Resultado expresado como veces sobre control 0, utilizando beta tubulina como control. Se muestra una figura representativa y el análisis gráfico respectivo (n=3)

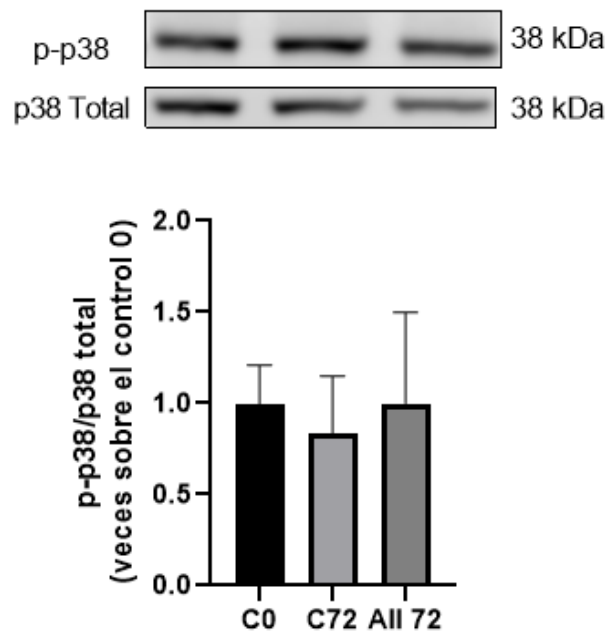


Figura 6B. Efecto de la Ang II sobre la expresión de p-p38. Efecto de Ang II 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 72 horas. Resultado expresado como veces sobre control 0, utilizando beta tubulina como control. Se muestra una figura representativa y el análisis gráfico respectivo. (n=5)

Con respecto a la proteína p53, en la figura 7, se muestran los resultados obtenidos a las 72 horas. En ella se puede observar que a este tiempo el tratamiento con Ang II no presentó un aumento significativo de la proteína p53, respecto del control 0 y 72 horas.

Con respecto a la proteína p21, en la figura 8 se muestran los resultados obtenidos a las 72 horas. En ella se puede observar que al tiempo de 72 horas no existe un cambio significativo entre los grupos experimentales para la proteína p21.

Con respecto a la proteína pRb, en la figura 9 se muestran los resultados obtenidos tras 72 horas de estímulo con Ang II. En ella se puede observar que la proteína pRb exhibe una clara disminución en la expresión de la proteína ya sea en la condición control de 72 horas; y en aquella tratada con Ang II. Sin embargo, no se observa diferencia entre los niveles de fosforilación entre Ang II y su control de 72 horas.

Finalmente, con respecto de la actividad SA- β -Gal en la figura 10 se muestran los resultados obtenidos en un ensayo de actividad SA- β -Gal donde se comparó un control a un tiempo de 72 horas contra un estímulo de Ang II por 72 horas. Los resultados muestran un claro aumento en la actividad SA- β -Gal por parte del estímulo con Ang II, en contraste con el control obteniendo una diferencia significativa en el aumento de la actividad SA- β -Gal.

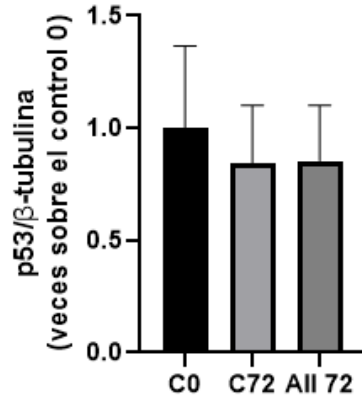


Figura 7. Efecto de la Ang II sobre la expresión de p53. Efecto de Ang II 1 µg/mL a 72 horas. Resultado expresado como veces sobre control 0, utilizando beta tubulina como control (n=5).

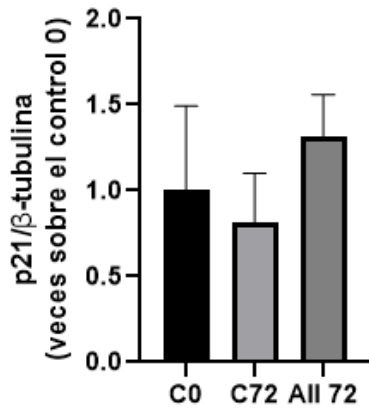
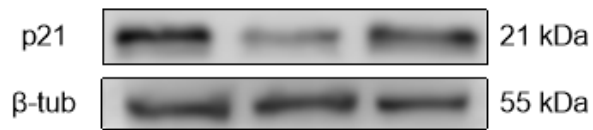


Figura 8. Efecto de la Ang II sobre la expresión de p21. Efecto de Ang II 1 µg/mL a 72 horas. Resultado expresado como veces sobre control 0, utilizando beta tubulina como control (n=3).

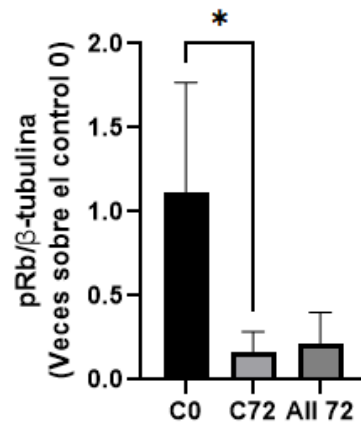
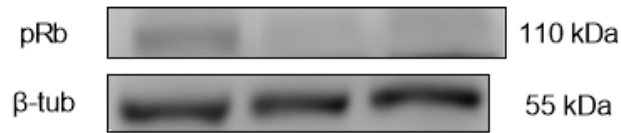


Figura 9. Efecto de la Ang II sobre la expresión de pRb. Efecto de Ang II 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 72 horas. Resultado expresado como veces sobre control 0, utilizando beta tubulina como control. * $p < 0,05$ (n=5)

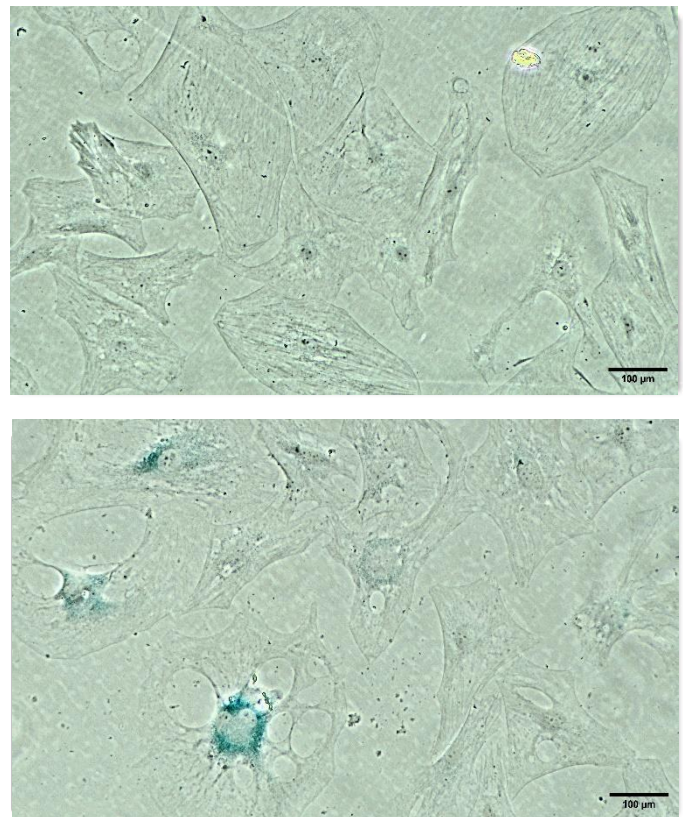
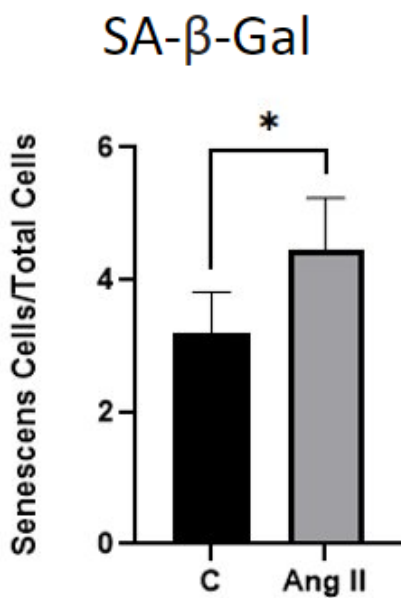


Figura 10. Efecto de la Ang II sobre la actividad SA-β-Gal. Efecto de Ang II 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 72 horas. Resultado expresado como células positivas sobre total de células * $p < 0,05$ (n=4) grado de aumento de las fotos x10 con microscopio Nikon eclipse Ts2R.

6.2.- Efecto de la Ang II sobre la inducción de un perfil SASP desde fibroblastos cardiacos senescentes

Para evaluar si la Ang II es capaz de inducir un secretoma proinflamatorio en las células, los FC fueron estimulados con Ang II por 72 horas. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo en el cual se encontraban las células fue extraído y centrifugado, para luego ser alicuotado y sometido a un ensayo multiplex luminex con la finalidad de detectar y cuantificar simultáneamente una amplia variedad de citoquinas y proteínas secretadas. En este caso se midieron las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-5 y TNF- α ; y la quimioquina MCP-1.

La figura 11, muestra los resultados obtenidos a partir del ensayo multiplex luminex de nuestro medio de cultivo celular. En ella se puede observar un aumento significativo en comparación al control en las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF- α . Todas estas interleuquinas son de carácter proinflamatorio cuyo aumento indica una clara inducción de un estado proinflamatorio en las células, en contraste a esto, la IL-5 y la quimioquina MCP-1 no tuvieron un aumento significativo en comparación al control.

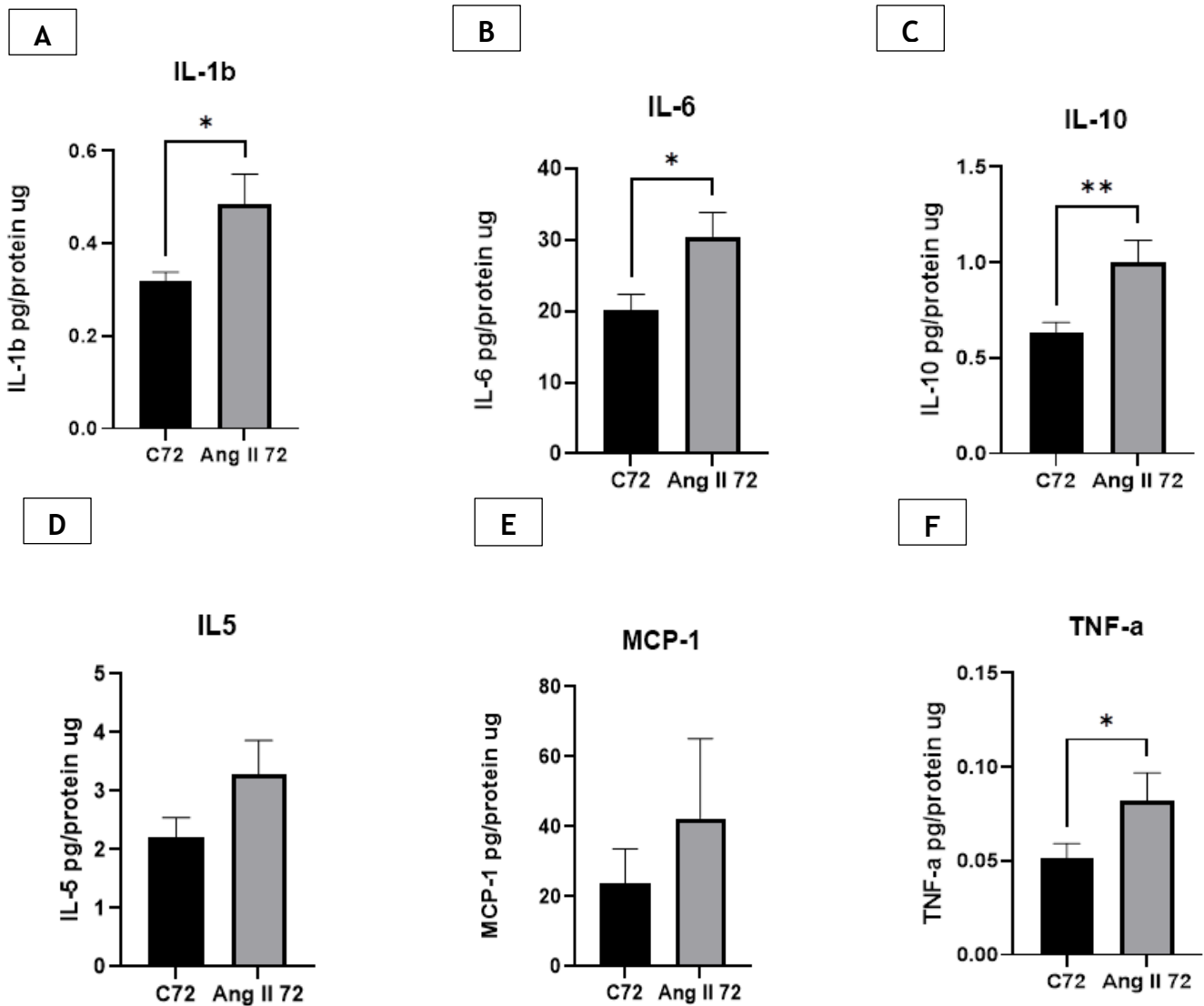


Figura 11. Efecto de la Ang II en la inducción de un SASP proinflamatorio. FC de rata adulta fueron estimulados con Ang II 100 nM por 72 horas. Los valores de IL-1B se obtuvieron en pg por μ g de proteína de cada muestra A, Los valores de IL-6 se obtuvieron en pg por μ g de proteína de cada muestra B, Los valores de IL-10 se obtuvieron en pg por μ g de proteína de cada muestra C, Los valores de IL-5 se obtuvieron en pg por μ g de proteína de cada muestra D, Los valores de MCP-1 se obtuvieron en pg por μ g de proteína de cada muestra E, Los valores de TNF- α se obtuvieron en pg por μ g de proteína de cada muestra F. Resultados expresados como pg sobre μ g de proteína. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ($n=3$).

6.3.- Efecto de Resolvina D1 sobre la senescencia inducida por Ang II

Para evaluar si la RvD1 es capaz de detener y/o eliminar la senescencia inducida por Ang II, se estimularon FC con Ang II por 72 horas. Transcurrido este tiempo se realizó un lavado y se estimuló con RvD1 1 μ g/mL por 48 horas dando un total de 120 horas experimentales. Estas células fueron sometidas a un ensayo de

actividad SA- β -Gal, y otro grupo fue sometido a la identificación de la proteína del p-Rb mediante western Blot.

La figura 12, muestra el efecto del estímulo de la Ang II sobre FC en la actividad SA- β -Gal donde se observa un claro aumento de esta actividad respecto de la condición control. Así mismo, en esta figura 12 se observa el efecto de la RvD1 sobre la actividad SA- β -Gal, mostrando que el tratamiento con RvD1 posterior a un estímulo de Ang II por 72 horas es capaz de detener el aumento de la actividad SA- β -Gal en FC de rata adulta.

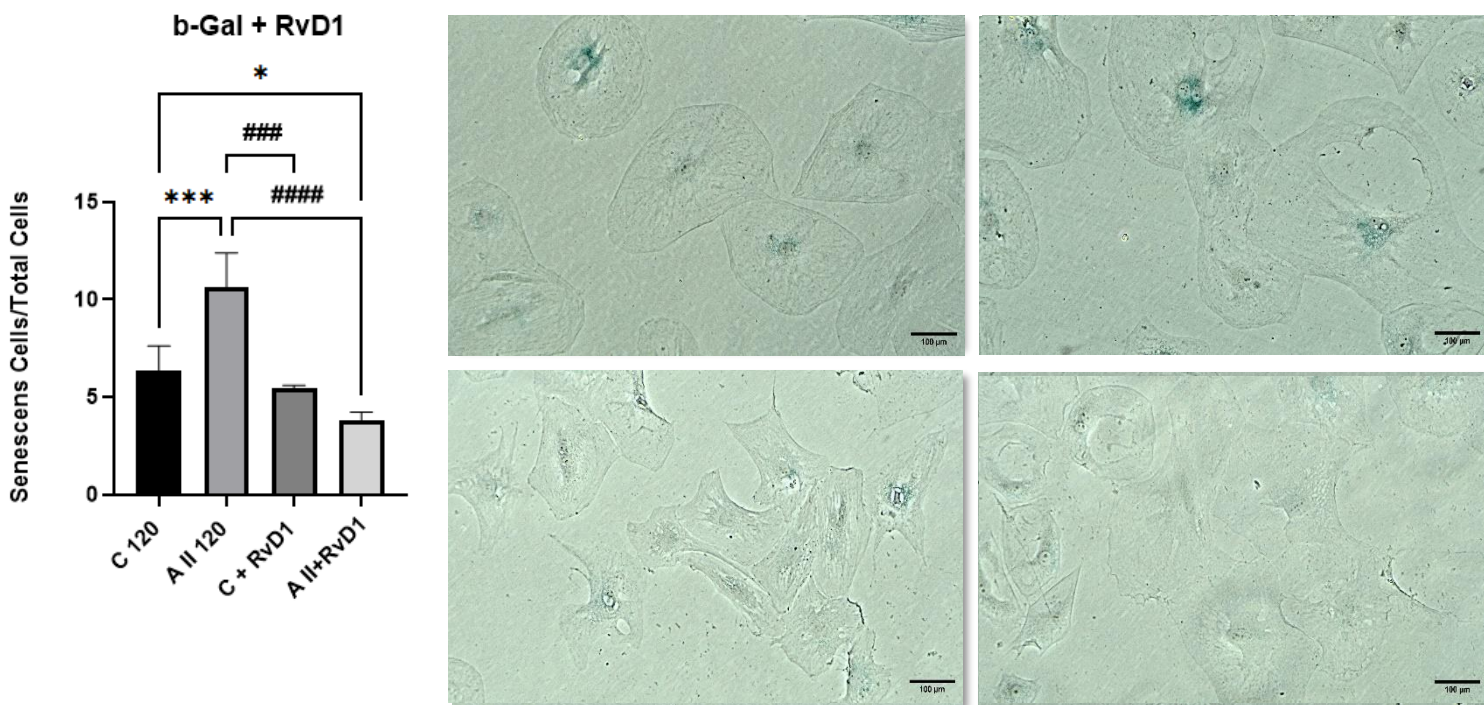


Figura 12. Efecto de la RvD1 sobre la actividad SA- β -Gal inducida por Ang II. Efecto de RvD1 1 μ g/mL posterior a 72 horas de estímulo con 1 μ g/mL de Ang II. Resultado expresado como células positivas sobre total de células *p < 0,05; ###p < 0,001; ####p < 0.0001 (n=4).

Con respecto a la proteína pRb, en la figura 13, se muestran los resultados obtenidos tras 72 horas de estímulo con Ang II y el posterior tratamiento con RvD1. En ella se puede observar que la proteína pRb no muestra diferencias respecto de la condición con Ang II y la condición con RvD1 respecto de la condición control.

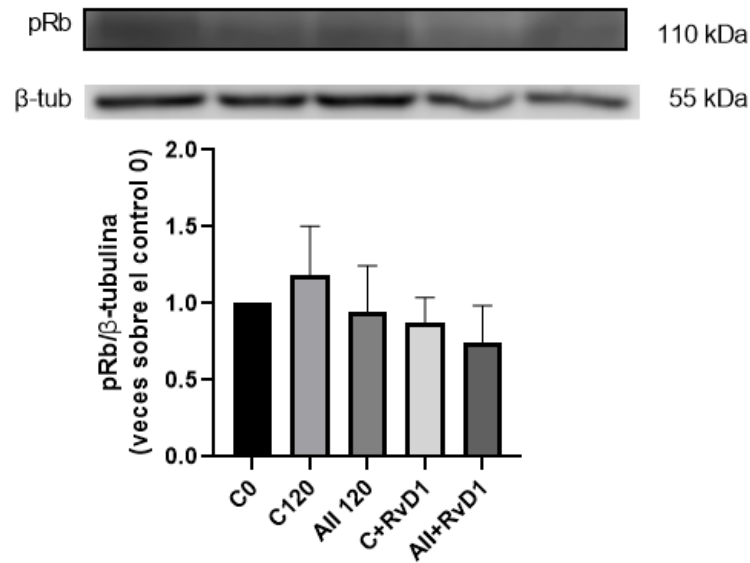


Figura 13. Efecto de la RvD1 sobre la expresión de pRb en FC senescentes inducidos por Ang II. Efecto de RvD1 1 µg/mL posterior a 72 horas de estímulo con 1 µg/mL de Ang II. Resultado expresado como veces sobre control 0, utilizando beta tubulina como control (n=3).

6.4.- Efecto de Resolvina D1 sobre la modulación del SASP

Para determinar si la RvD1 es capaz de modular el SASP, los FC fueron estimulados con Ang II por 72 horas, transcurrido este tiempo las células fueron estimuladas con RvD1 por 48 horas dando un tiempo experimental total de 120 horas. Posterior a este tiempo el medio de cultivo en el cual se encontraban las células fue extraído y centrifugado, para luego ser alicuotado y sometido a un ensayo multiplex luminex, donde se midieron las mismas citoquinas y proteínas que en el caso anterior.

La figura 14 muestra los resultados obtenidos a partir del ensayo multiplex luminex de nuestro medio, se puede observar que en el caso de la IL-1β, IL-6, IL-10 se logró una disminución significativa con respecto a la Ang II, mas no se ve una disminución en el caso de la MCP-1 y TNF-α. En ningún caso la RvD1 fue capaz de reducir los niveles de las citoquinas medidas por si sola.

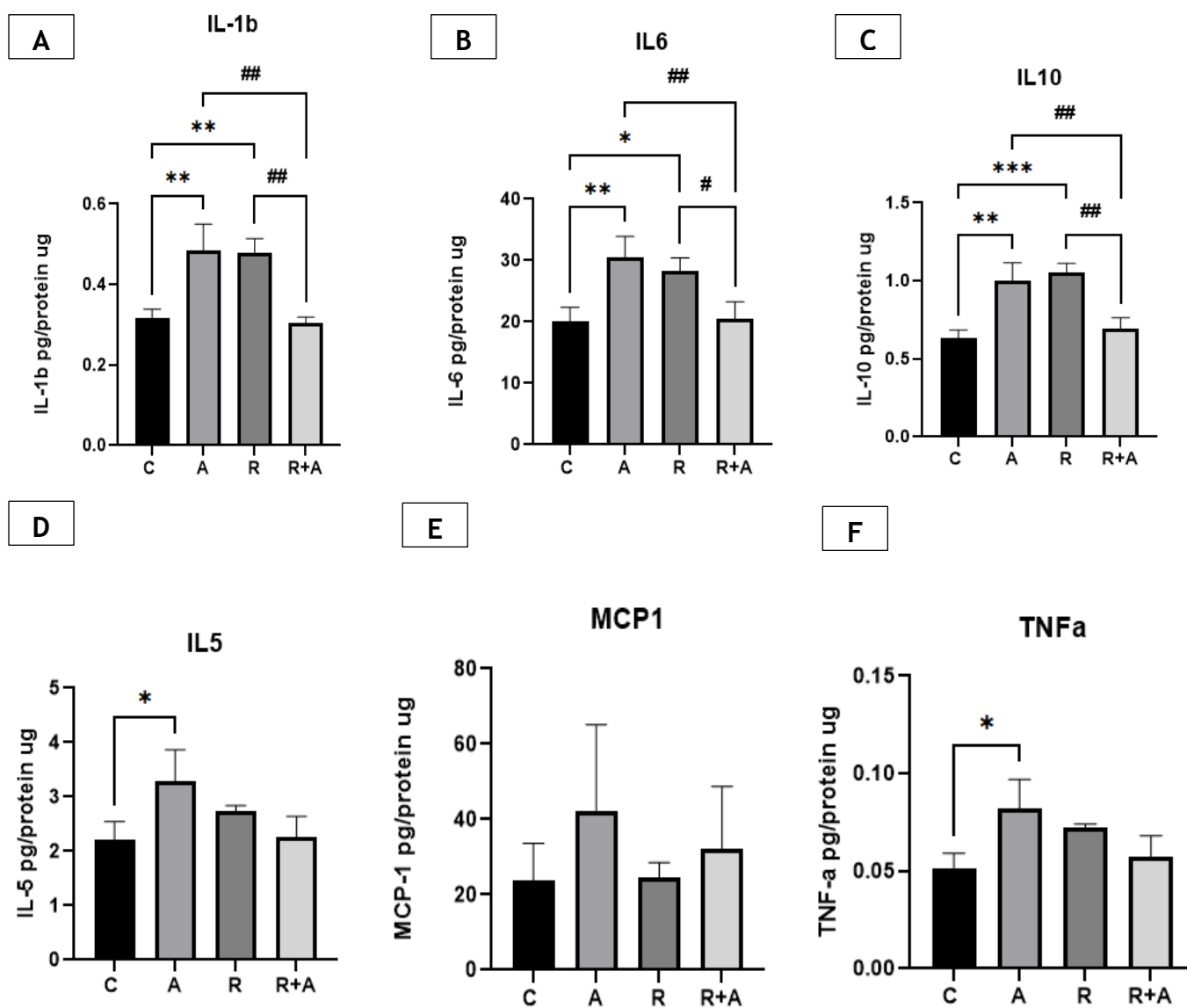


Figura 14. Efecto de la RvD1 sobre la secreción de citoquinas proinflamatorias de un SASP inducido por Ang II. FC de rata adulta fueron estimulados con Ang II 100 nM por 72 horas posteriormente fueron tratadas con RvD1 100 nM. Los valores de IL-1B se obtuvieron en pg por μ g de proteína de cada muestra A, Los valores de IL-6 se obtuvieron en pg por μ g de proteína de cada muestra B, Los valores de IL-10 se obtuvieron en pg por μ g de proteína de cada muestra C, Los valores de IL-5 se obtuvieron en pg por μ g de proteína de cada muestra D, Los valores de MCP-1 se obtuvieron en pg por μ g de proteína de cada muestra E, Los valores de TNF- α se obtuvieron en pg por μ g de proteína de cada muestra F. Resultados expresados como pg sobre μ g de proteína. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ (n=3).

7.- DISCUSIÓN

El proceso de senescencia celular como bien ha sido descrito es un arresto estable del ciclo celular, el cual puede ser programado en etapas tempranas, como, por ejemplo, para reparar alguna herida o bien puede ser de naturaleza no programada o inducida por estrés oxidativo o algún agente externo que influya en el desarrollo de esta condición.

En este trabajo se utilizó la Ang II como agente inductor de senescencia en FC de rata adulta. Como bien sabemos la senescencia celular está implicada a muchos procesos patológicos; y uno de los principales efectores de la senescencia es el SASP ya que este fenotipo está ligado a diversos factores inflamatorios que perpetúan el estado senescente en las células que circundan a las senescentes iniciales, aumentando el grado de daño al tejido de una manera crónica. En su conjunto, cuando consideramos todo esto podemos darnos cuenta de que las células senescentes son responsables de gran variedad de patologías asociadas al envejecimiento; y si bien es cierto, en este trabajo el enfoque de estudio fue el comprender el rol de la Ang II en la senescencia de FC, es bien conocido que estas células se asocian al desarrollo de patologías de carácter cardiovascular, y como bien se ha descrito, esta condición tienen una fuerte asociación a la fibrosis cardiaca, patología donde cuyo avance conduce al desarrollo de insuficiencia cardiaca y posteriormente a un aumento en la probabilidad de muerte [37], donde le FC juega un papel central.

El comprender como funciona la maquinaria interna para el desarrollo de la senescencia celular ha tomado relevancia en los últimos años. Esto se debe a que las patologías que están relacionadas con la senescencia tienen altos índices de mortalidad no solo a nivel nacional, sino que global; por esta razón, la senescencia celular se ha centralizado en estudios que buscan responder las incógnitas que lleven al desarrollo de tratamientos terapéuticos efectivos contra esta condición. Si bien actualmente hay una gran variedad de estudios y publicaciones que denotan resultados sobre la senescencia en FC, aún falta por comprender la gran gama de mecanismos y estímulos que gatillan la senescencia en los FC, más aún también se necesita el desarrollo de distintas técnicas y herramientas para la oportuna detección de esta.

En este trabajo se estudió y se demostró el efecto de la Ang II el cual es un estímulo capaz de producir senescencia en los FC, además de esto se presentó a la RvD1 como una posible opción para revertir y/o disminuir el proceso senescente gracias a su potencial antiinflamatorio que afectaría directamente al SASP.

Estos resultados demuestran que el estímulo con Ang II fue capaz de inducir la senescencia de los FC en un modelo in vitro. Esta senescencia se caracterizó principalmente por un aumento de la SA-B-Gal, el cual es la técnica Gold estándar para la detección de senescencia, además de esto, muchas proteínas que son conocidos marcadores de senescencia se vieron afectados como el pRb el cual sufrió una disminución en su fosforilación, lo cual nos indica una clara señal de detención del ciclo celular, un hecho característico en la senescencia celular. Otro punto importante por considerar es la temprana activación de la p-p38 y también la inactivación de la p53 a un tiempo de 72 horas. Se ha demostrado que muchas de estas proteínas se activan de manera temprana como un efecto gatillante de la senescencia. En este sentido se ha hipotetizado que la p53 se activa de manera parcial en las células senescentes, en un tiempo suficiente para poder activar genes de transcripción asociados a senescencia como por ejemplo la CDKN1 la cual codifica para la proteína p21 [38].

Estos resultados serán discutidos en comparación a lo encontrado en la literatura.

7.1.- Efecto de la Ang II sobre fibroblasto cardiacos de rata

Como bien se sabe el efecto de la Ang II ha sido estudiado ampliamente en nuestro laboratorio en lo que respecta a sus efectos sobre FC, pero aún quedan incógnitas sobre su comportamiento con relación a los FC y senescencia; sin embargo, en la actualidad hay diversos estudios que nos sirven de guía para comenzar a comprender que efecto tienen la Ang II sobre las células de FC y su relación con la senescencia.

En este trabajo la estimulación con Ang II durante 72 horas, efectivamente indujo la senescencia en los FC de rata adulta, esto se ve principalmente por el aumento de la SA-B-Gal y se corrobora con la disminución de la proteína p-Rb.

Adicionalmente, también se estudió la proteína p21 y los resultados mostraron que sus niveles de expresión no variaron con respecto a un control de 72 horas. Por otro lado, en una serie de estudios y modelos recopilados por Osorio et al, (2022), se explica y detalla que en un modelo de rata *in vivo*, el corazón de la rata fue infundido con Ang II; y los resultados arrojados indican un aumento de la proteína p53 y p21 a los 7 días [39]. Del mismo modo, en un trabajo *in vitro* realizado en el Laboratorio de Farmacología Molecular de la Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, se demostró un aumento significativo en la proteína p53 a un tiempo de 24 horas de estímulo con Ang II y de la proteína p21 al mismo tiempo de estímulo, dando a entender que la activación de dichas vías se dan a tiempos tempranos [12]. En otro modelo de insuficiencia cardiaca *in vivo*, el corazón de la rata fue estimulado con Ang II a través de una infusión por Mini bombas osmóticas durante 4 semanas. Las muestras de corazón presentaron un claro aumento de los niveles de expresión de p21 y p16; además de un aumento de la actividad SA-β-Gal. Este resultado se correlaciona con el aumento de citoquinas proinflamatorias del secretoma, ya que el SASP segrega todas estas sustancias con la finalidad de perpetuar el estado senescente. En este mismo trabajo se aislaron FC los cuales antes de los estímulos se les privó de suero por 24 horas en un medio de cultivo con 1% de suero, luego de esto los FC se trataron con solución salina o Ang II durante 48 horas, transcurrido este tiempo las células se estimularon con DMSO o navitoclax durante 72 horas. Los resultados, mostraron que Ang II aumentó la actividad SA-β-Gal y este efecto fue contrarrestado por navitoclax demostrando que la Ang II es un claro inductor de la senescencia en FC corroborando los resultados obtenidos en esta memoria [40].

Nuestros resultados difieren de los encontrados en la literatura con respecto al aumento de las proteínas, pero, aunque esto se puede deber a que la Ang II activa la senescencia celular a tiempos tempranos, lo suficiente para el reclutamiento de genes transcripcionales que son capaces de mantener este estado senescente. Sin embargo, nuestros resultados analizados en la figura 12 con respecto a la actividad SA-β-Gal se ven corroborados y fortalecidos respecto a la literatura, donde se ve una clara prevalencia de la SA-β-Gal en la estimulación con Ang II tanto a 72 como a 120 horas, y también en la figura 11 donde vemos un aumento claro de las IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, manteniendo el estado proinflamatorio en las células. A este

respecto, en nuestro laboratorio se demostró que los FC estimulados con Ang II evidenciaron un aumento de IL-6, MCP-1 tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína, y un aumento en TNF-alfa a nivel de mRNA. Aunque en estos experimentos no se evidenció si Ang II induce senescencia de los FC. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta memoria de título coinciden con los resultados previos del laboratorio en cuanto al aumento y secreción de citoquinas inducidas por Ang II [18]. En su conjunto, los resultados anteriores indican que la senescencia se mantiene en el tiempo, pero no necesariamente las proteínas marcadoras de senescencia, las cuales se vuelven a activar a tiempos más largos como muestran los resultados de los modelos *in vivo* descritos anteriormente. A este respecto Schwartz et al; han indicado que existen un subconjunto de genes inhibidores del crecimiento elevados al inicio de la senescencia y, por otro lado, una clase distinta de genes involucrados en el mantenimiento de la senescencia [41]. Estos resultados fortalecen el concepto de la activación temprana de p53/p21 y la activación tardía de p16 ya sea para el inicio o mantención de la senescencia.

7.2.- Efecto de resolvina D1 en fibroblastos cardiacos de rata senescente

Las resolvinas son agentes pro-resolutivos con una potente actividad antiinflamatoria derivados de los ácidos grasos DHA (RvD) y EPA (RvE) [42]. Un trabajo previo realizado en el nuestro laboratorio demostró que la RvD1 es capaz de reducir la inflamación en FC de rata [43]. Además de esto, la RvD1 puede disminuir la expresión y secreción de citoquinas en FC senescentes inducidos por Ang II [44]. La RvD1 es capaz de ejercer acciones antiinflamatorias a través de la activación del receptor FPR2/ALX, logrando una disminución de los niveles de TNF- α , IL-1 β , MCP-1. Esto ha tomado gran relevancia dentro de nuestro campo de estudio considerando que las células senescentes expresan un secretoma proinflamatorio denominado SASP, el cual secreta una gran variedad de citoquinas proinflamatorias y debido a la capacidad de la RvD1 como agente antiinflamatorio, este se ha vuelto un objetivo de estudio atractivo para su uso en contra del estado inflamatorio permanente que producen estas células senescentes. Se ha demostrado que la RvD1 reduce el reclutamiento de neutrófilos, evidenciado por una disminución en la secreción de la proteína quimioattractante MCP-1; y también una reducción en la adhesión mediada

por las proteínas ICAM-1 y VCAM-1. Además, la RvD1 es capaz de reducir el reclutamiento de monocitos no flogísticos, así como también incrementar la capacidad fagocítica y la diferenciación de macrófagos de M1 a M2 [45].

Por otro lado, Además, trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que le RvE1 previene la senescencia de FC de ratón inducida por doxorubicina y por IL-1beta, por un mecanismo mediado por la proteína NLRP3. Estos resultados fueron realizados en FC no senescentes, pero apoya el concepto de que la RvD1 puede atenuar la presencia de células senescentes. Por otro lado, en un reciente trabajo del laboratorio se demostró que el lipopolisacárido (LPS, como agonista específico del receptor TLR4), induce senescencia en FC; sin embargo, la RvD1 no fue capaz de reducir la senescencia inducida por LPS. Por otro lado, en este mismo trabajo se demostró que la autodiferenciación inducida por el efecto autocrino de TGF-beta 1, el cual es secretado por los mismos FC; lo que sumado al estrés mecánico dado por el soporte plástico rígido de la placa de cultivo inducen senescencia de los FC cultivado en placas rígidas. Sin embargo, el pretratamiento con RvD1 fue capaz de reducir la senescencia inducida por LPS, así como también la inducida por el estrés mecánico y autodiferenciación. En su conjunto, estos resultados y el nuestro fortalecen el concepto de que la RvD1 es una buena estrategia para reducir la senescencia de los FC.

En un modelo de isquemia reperfusión un trabajo demostró que la RvD1 es capaz de reducir la infiltración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en pulmones de ratones jóvenes [46]. Además de esto, disminuyó considerablemente la infiltración de PMN en pulmones de ratones viejos y redujo los niveles de PMN en ratones jóvenes sometidos a la isquemia reperfusión [47]. En este trabajo se demostró que la RvD1 es capaz de modular el SASP disminuyendo la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL1- β , IL6, IL10, TNF- α , y es capaz de reducir la SA- β -Gal en FC senescentes inducidos por Ang II. Si bien la RvD1 no tuvo ningún efecto sobre la expresión de la proteína pRb, esto puede deberse a que la acción de la RvD1 es incapaz de reactivar el ciclo celular una vez que este fue arrestado por la senescencia, lo cual nos da a entender que la RvD1 no elimina las células senescentes como tal, sino más bien detiene el proceso senescente en estas células, actuando como un senostático. Sin embargo, en un reciente trabajo se demostró que

la RvD1 reduce el número de fibroblastos dérmicos senescentes por un mecanismo asociado a la inducción de autofagia. Si este es el mecanismo por el cual la RvD1 disminuye el número de FC senescentes inducidos por Ang II debe ser evaluado en el futuro. Aunque, por otro lado, en el laboratorio se ha demostrado que los FC cultivados en ausencia de suero fetal o en presencia de suero menor al 5 % se induce autofagia. En este sentido, este trabajo se realizó en condiciones de cultivo de suero al 1%, por lo tanto, se está trabajando en condiciones de autofagia; aunque se ha evaluado que en estas condiciones de trabajo la senescencia inducida por falta de nutrientes es mayor que por la observada en condiciones de suero 10%.

En resumen, en trabajos anteriores en nuestro laboratorio se ha demostrado que la RvD1 tenía un mayor efecto como tratamiento preventivo de la senescencia, lo cual sugiere que la RvD1 puede ser usada como tratamiento profiláctico para la senescencia de los FC y la fibrosis cardiaca en ratas.

7.3.- Efecto de resolvina D1 sobre la regulación del SASP

Como bien se sabe la RvD1 posee una gran actividad antiinflamatoria lo cual la convierte en un potencial tratamiento para la regulación en un SASP proinflamatorio, si bien el efecto de la RvD1 sobre el secretoma proinflamatorio inducido por Ang II no se ha estudiado mucho, hay antecedentes que prueban el efecto positivo de la RvD1 sobre los mediadores de la secreción proinflamatoria. En un modelo de ratón con retinopatía diabética la RvD1 disminuyó la secreción de IL-1 β y TNF- α en el epitelio corneal [48], además en un modelo in vitro de cultivo de fibroblastos de pulmón humano la RvD1 fue capaz de reducir la secreción de IL-8, IL-6 y la MCP-1 inducida por extractos acuosos de humo de cigarrillo [49]. Otro modelo de ratones con insuficiencia renal inducida por hiperhomocisteinemia fue tratado con RvD1 y esta disminuyó la escisión de la pro-caspasa-1 y concomitantemente la secreción de IL-1 β [50]. En este trabajo se buscó analizar cuál es el efecto que tiene la RvD1 sobre FC senescentes inducidos por Ang II, la RvD1 fue capaz de reducir las citoquinas proinflamatorias medidas en este trabajo (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-5, MCP-1 y TNF- α), con respecto a la Ang II por si sola, por lo cual podemos considerar a la RvD1 como un agente pro-resolutivo antiinflamatorio que puede ser utilizado como tratamiento contra la fibrosis cardiaca, pero también es

necesario considerar que la RvD1 por si sola no redujo significativamente ninguna citoquina proinflamatoria medida en este trabajo, esto puede deberse a la naturaleza del receptor y mecanismo de la RvD1 en FC que se vuelven senescentes por otras vías distintas a la de la Ang II, así como también la diferenciación de los FC por acción del TGF- secretado por estas mismas y al estrés mecánico producto de la matriz rígida mencionado anteriormente, cabe considerar que esta discrepancia con respecto a los resultados obtenidos en los trabajos anteriormente mencionados puede deberse a diferencias en la concentración de RvD1 utilizada y también al tipo celular en el que se está estudiando, otro factor a considerar es el tiempo ya que en los modelos previamente mencionados, la RvD1 se utilizó como una forma de impedir la formación de un SASP proinflamatorio, en otras palabras la RvD1 y la Ang II fueron suministradas al mismo tiempo para medir la actividad antiinflamatoria de la RvD1, en cambio en este trabajo las condiciones fueron el uso de RvD1 en FC ya senescentes inducidos por Ang II, es decir como posible tratamiento a un estado celular inflamatorio ya establecido, en el cual, como indican los resultados la RvD1 no tuvo ningún efecto.

8.- CONCLUSIONES

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

1. Angiotensina II induce senescencia en fibroblastos cardiacos de rata dado por un aumento en la actividad SA- β -Gal y proteínas marcadoras de senescencia.
2. Angiotensina II induce un SASP proinflamatorio en FC de rata adulta.
3. RvD1 reduce la secreción de citoquinas proinflamatorias en un SASP inflamatorio inducido previamente con Ang II.
4. RvD1 detiene la senescencia de FC inducidos por Ang II dada la disminución de la actividad SA- β -Gal

9.- LIMITACIONES

Dentro de las limitaciones de este trabajo se encuentra el número insuficiente de experimentos que se alcanzaron a realizar dentro del plazo establecido, lo cual pudo haber determinado que algunos experimentos no dieran estadísticamente significativos. Además de una serie de infortunios que conllevo a la perdida de variedad de experimentos como contaminaciones y fallas de maquinaria del laboratorio, considerar también el estrés que sufrieron los FC al ser depositados en una matriz dura, lo cual favorecía su diferenciación a miofibroblasto. Finalmente, faltó la evaluación de proteínas involucradas en la apoptosis.

10.- PROYECCIONES

Dilucidar los mecanismos por los cuales actúa la RvD1 en FC senescentes inducidos por Ang II, los datos obtenidos de este trabajo fueron de un modelo in vitro, por lo tanto, es necesario evaluar la efectividad de la RvD1 en un modelo in vivo para determinar si la RvD1 es útil como tratamiento farmacológico contra la fibrosis cardiaca.

11.- BIBLIOGRAFIA

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION cardiovascular diseases 2023 [en línea] < https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1 > [consulta: 29 de octubre, 2023]
- [2] OPS chile, donde las medidas contra la hipertension salvan vidas 2021 [en línea] < <https://www.paho.org/es/noticias/25-8-2021-chile-donde-medidas-contra-hipertension-salvan-vidas> > [consulta: 29 de octubre, 2023]
- [3] INSTITUTO DE SALUD PUBLICA estudio inedito entrega datos sobre patologias responsables de mas del 50% de los chilenos que fallecen en un año 23 marzo,2023 [en línea] < <https://www.ispch.gob.cl/noticia/estudio-inedito-entrega-datos-sobre-patologias-responsables-de-mas-del-50-de-los-chilenos-que-fallecen-en-un-ano/> > [consulta: 29 de octubre, 2023]
- [4] Maggie S Chen, Richard T Lee, Jessica C Garbern. (2021) Senescence mechanisms and targets in the heart. *Cardiovascular Research*. cvab161, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab161>
- [5] Regulski M. J. (2017). Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds : a compendium of clinical research and practice*, 29(6), 168-174.
- [6] Mehdizadeh, M., Aguilar, M., Thorin, E., Ferbeyre, G., & Nattel, S. (2022). The role of cellular senescence in cardiac disease: basic biology and clinical relevance. *Nature reviews. Cardiology*, 19(4), 250-264. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00624-2>
- [7] Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., & Narita, M. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes & development*, 28(2), 99-114. <https://doi.org/10.1101/gad.235184.113>
- [8] Chapman, J., Fielder, E., & Passos, J. F. (2019). Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship. *FEBS letters*, 593(13), 1566-1579. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13498>
- [9] Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Müller, F. L., Guo, M., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A. J., Walkey, C., Maser, R. S., Tonon, G., Foerster, F., Xiong, R., Wang, Y. A., Shukla, S. A., Jaskelioff, M., Martin, E. S., Heffernan, T. P.,

Protopopov, A., ... DePinho, R. A. (2011). Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature*, 470(7334), 359-365. <https://doi.org/10.1038/nature09787>

[10] Birch, J., & Gil, J. (2020). Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes & development*, 34(23-24), 1565-1576. <https://doi.org/10.1101/gad.343129.120>

[11] Lopes-Paciencia, S., Saint-Germain, E., Rowell, M. C., Ruiz, A. F., Kalegari, P., & Ferbeyre, G. (2019). The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine*, 117, 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.01.013>

[12] Víctor Machuca. (2022) Efectos de Navitoclax y Resolvina D1 Sobre la Senescencia de Fibroblastos Cardiacos Inducida por Angiotensina II y LPS [Memoria para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico, universidad de chile]. Portafolio academico. <https://uchile.cl/portafolio-academico/portafolio-academico/academico/13518-Guillermo-Antonio-Díaz-Araya>

[13] Osorio, J. M., Espinoza-Pérez, C., Rimassa-Taré, C., Machuca, V., Bustos, J. O., Vallejos, M., Vargas, H., & Díaz-Araya, G. (2023). Senescent cardiac fibroblasts: A key role in cardiac fibrosis. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1869(4), 166642. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2023.166642>

[14] Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in cell biology*, 28(6), 436-453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>

[15] Jannone, G., Rozzi, M., Najimi, M., Decottignies, A., & Sokal, E. M. (2020). An Optimized Protocol for Histochemical Detection of Senescence-associated Beta-galactosidase Activity in Cryopreserved Liver Tissue. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 68(4), 269-278. <https://doi.org/10.1369/0022155420913534>

[16] Itahana, K., Campisi, J., & Dimri, G. P. (2007). Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay.

Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 371, 21-31.
https://doi.org/10.1007/978-1-59745-361-5_3

[17] Lujambio A. (2016). To clear, or not to clear (senescent cells)? That is the question. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 38 Suppl 1, S56-S64. <https://doi.org/10.1002/bies.201670910>

[18] Salas Hernández, A. (2020). Efectos de resolvina D1 sobre la respuesta inflamatoria inducida por angiotensina II y lipopolisacárido en fibroblastos cardiacos de rata adulta. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/178411>

[19] Tallquist, M. D., & Molkentin, J. D. (2017). Redefining the identity of cardiac fibroblasts. *Nature reviews. Cardiology*, 14(8), 484-491. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.57>

[20] Díaz-Araya, G., Vivar, R., Humeres, C., Boza, P., Bolivar, S., & Muñoz, C. (2015). Cardiac fibroblasts as sentinel cells in cardiac tissue: Receptors, signaling pathways and cellular functions. *Pharmacological research*, 101, 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.001>

[21] Turner, N. A., & Porter, K. E. (2013). Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. *Fibrogenesis & tissue repair*, 6(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-6-5>

[22] Burke, R. M., Burgos Villar, K. N., & Small, E. M. (2021). Fibroblast contributions to ischemic cardiac remodeling. *Cellular signalling*, 77, 109824. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109824>

[23] Jia, L., Zhang, W., Ma, Y., Chen, B., Liu, Y., Piao, C., Wang, Y., Yang, M., Liu, T., Zhang, J., Li, T., Nie, S., & Du, J. (2017). Haploinsufficiency of Ataxia Telangiectasia Mutated Accelerates Heart Failure After Myocardial Infarction. *Journal of the American Heart Association*, 6(7), e006349. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006349>

[24] Sweeney, M., Cook, S. A., & Gil, J. (2023). Therapeutic opportunities for senolysis in cardiovascular disease. *The FEBS journal*, 290(5), 1235-1255. <https://doi.org/10.1111/febs.16351>

- [25] Hernandez-Segura, A., Brandenburg, S., & Demaria, M. (2018). Induction and Validation of Cellular Senescence in Primary Human Cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (136), 57782. <https://doi.org/10.3791/57782>
- [26] Malavolta, M., Bracci, M., Santarelli, L., Sayeed, M. A., Pierpaoli, E., Giacconi, R., Costarelli, L., Piacenza, F., Basso, A., Cardelli, M., & Provinciali, M. (2018). Inducers of Senescence, Toxic Compounds, and Senolytics: The Multiple Faces of Nrf2-Activating Phytochemicals in Cancer Adjuvant Therapy. *Mediators of inflammation*, 2018, 4159013. <https://doi.org/10.1155/2018/4159013>
- [27] Kumar, R., & Boim, M. A. (2009). Diversity of pathways for intracellular angiotensin II synthesis. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 18(1), 33-39. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32831a9e20>
- [28] Kurdi, M., De Mello, W. C., & Booz, G. W. (2005). Working outside the system: an update on the unconventional behavior of the renin-angiotensin system components. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(7), 1357-1367. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.012>
- [29] M de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., & Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews*, 52(3), 415-472.
- [30] Biernacka, A., & Frangogiannis, N. G. (2011). Aging and Cardiac Fibrosis. *Aging and disease*, 2(2), 158-173.
- [31] Schmidt, B., & Schieffer, B. (2003). Angiotensin II AT1 receptor antagonists. Clinical implications of active metabolites. *Journal of medicinal chemistry*, 46(12), 2261-2270. <https://doi.org/10.1021/jm0204237>
- [32] Short, S., Fielder, E., Miwa, S., & von Zglinicki, T. (2019). Senolytics and senostatics as adjuvant tumor therapy. *EBioMedicine*, 41, 683-692. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.01.056>
- [33] Witham, M. D., Granic, A., Miwa, S., Passos, J. F., Richardson, G. D., & Sayer, A. A. (2023). New Horizons in cellular senescence for clinicians. *Age and ageing*, 52(7), afad127. <https://doi.org/10.1093/ageing/afad127>

- [31] Martin, N., Soriani, O., & Bernard, D. (2020). Cardiac Glycosides as Senolytic Compounds. *Trends in molecular medicine*, 26(3), 243-245. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.01.001>
- [35] Hsiao, H. M., Thatcher, T. H., Levy, E. P., Fulton, R. A., Owens, K. M., Phipps, R. P., & Sime, P. J. (2014). Resolvin D1 attenuates polyinosinic-polycytidylic acid-induced inflammatory signaling in human airway epithelial cells via TAK1. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(10), 4980-4987. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400313>
- [36] Tylek, K., Trojan, E., Regulska, M., Lacivita, E., Leopoldo, M., & Basta-Kaim, A. (2021). Formyl peptide receptor 2, as an important target for ligands triggering the inflammatory response regulation: a link to brain pathology. *Pharmacological reports : PR*, 73(4), 1004-1019. <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00271-x>
- [37] Biernacka A, Frangogiannis NG. Aging and Cardiac Fibrosis. *Aging Dis.* 2011 Apr;2(2):158-173. PMID: 21837283; PMCID: PMC3153299.
- [38] d'Adda di Fagagna F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature reviews. Cancer*, 8(7), 512-522. <https://doi.org/10.1038/nrc2440>
- [39] Zhu F, Li Y, Zhang J, Piao C, Liu T, Li H-H, et al. (2013) Senescent Cardiac Fibroblast Is Critical for Cardiac Fibrosis after Myocardial Infarction. *PLoS ONE* 8(9): e74535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074535>
- [40] Jia, K., Dai, Y., Liu, A., Li, X., Wu, L., Lu, L., Bao, Y., & Jin, Q. (2020). Senolytic Agent Navitoclax Inhibits Angiotensin II-Induced Heart Failure in Mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 76(4), 452-460. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000878>
- [41] Schwarze, S. R., Shi, Y., Fu, V. X., Watson, P. A., & Jarrard, D. F. (2001). Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in the growth arrest at senescence in human prostate epithelial and uroepithelial cells. *Oncogene*, 20(57), 8184-8192. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205049>
- [42] Dona, M., Fredman, G., Schwab, J. M., Chiang, N., Arita, M., Goodarzi, A., Cheng, G., von Andrian, U. H., & Serhan, C. N. (2008). Resolvin E1, an EPA-

derived mediator in whole blood, selectively counterregulates leukocytes and platelets. *Blood*, 112(3), 848-855. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-122598>

[43] Salas-Hernández, A., Espinoza-Pérez, C., Vivar, R., Espitia-Corredor, J., Lillo, J., Parra-Flores, P., Sánchez-Ferrer, C. F., Peiró, C., & Díaz-Araya, G. (2021). Resolvin D1 and E1 promote the 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>

[44] Salas-Hernández, A., Ruz-Cortés, F., Bruggendieck, F., Espinoza-Perez, C., Espitia-Corredor, J., 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>

[45] Olivares-Silva, F., De Gregorio, N., Espitia-Corredor, J., 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 the 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>

[46] Shinohara, M., Kibi, M., Riley, I. R., Chiang, N., Dalli, J., Kraft, B. D., Piantadosi, C. A., Choi, A. M., & Serhan, C. N. (2014). Cell-cell interactions and bronchoconstrictor eicosanoid reduction with inhaled carbon monoxide and resolvin D1. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 307(10), L746-L757. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00166.2014>

[47] Rymut, N., Heinz, J., Sadhu, S., Hosseini, Z., Riley, C. O., Marinello, M., Maloney, J., MacNamara, K. C., Spite, M., & Fredman, G. (2020). Resolvin D1 promotes efferocytosis in aging by limiting senescent cell-induced MerTK cleavage. *FASEB journal : official publication of the Federation of American*

Societies for Experimental Biology, 34(1), 597-609.
<https://doi.org/10.1096/fj.201902126R>

[48] Zhang, Z., Hu, X., Qi, X., Di, G., Zhang, Y., Wang, Q., & Zhou, Q. (2018). Resolvin D1 promotes corneal epithelial wound healing and restoration of mechanical sensation in diabetic mice. *Molecular vision*, 24, 274-285.

[49] Hsiao, H. M., Sapinoro, R. E., Thatcher, T. H., Croasdell, A., Levy, E. P., Fulton, R. A., Olsen, K. C., Pollock, S. J., Serhan, C. N., Phipps, R. P., & Sime, P. J. (2013). A novel anti-inflammatory and pro-resolving role for resolvin D1 in acute cigarette smoke-induced lung inflammation. *PloS one*, 8(3), e58258.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058258>

[50] Li, G., Chen, Z., Bhat, O. M., Zhang, Q., Abais-Battad, J. M., Conley, S. M., Ritter, J. K., & Li, P. L. (2017). NLRP3 inflammasome as a novel target for docosahexaenoic acid metabolites to abrogate glomerular injury. *Journal of lipid research*, 58(6), 1080-1090. <https://doi.org/10.1194/jlr.M072587>