



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

**RESOLVINA-D1 ATENÚA LA SENESCENCIA INDUCIDA
POR LPS EN FIBROBLASTOS CARDIACOS NO
AUTODIFERENCIADOS POR EFECTO AUTOCRINO DEL
TGF- β 1**

Director:

Prof. Guillermo Díaz Araya
Depto. de Química Farmacológica y
Toxicológica

Codirector:

Prof. José Miguel Osorio
Depto. de Química Farmacológica y
Toxicológica

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

MAURICIO IVAN ROMAN TORRES

Santiago, 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.

Esta memoria originó la siguiente presentación en congreso de la Sociedad Farmacológica de Chile (SOFARCHI) año 2023.

Effect of Resolvin D1 on LPS-Induced Senescence of Adult Rat Cardiac Fibroblasts.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mis padres y hermana por ser uno de los pilares fundamentales en este proceso; sin duda, este logro es de los cuatro y sin ustedes no habría sido capaz de llegar al final de todo esto. Agradezco su confianza infinita en mí, así como su esfuerzo constante para ayudarme y apoyarme estando lejos de casa. A todos mis familiares los cuales me apoyaron, guiaron y creyeron en mí, que si los nombrara uno por uno esta sección sería más grande que la tesis.

A continuación, quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que tuve el privilegio de conocer durante mi tiempo en la universidad. Quisiera extender mi gratitud a los estimados profesores, a mis queridos compañeros, agradezco sinceramente la camaradería, el apoyo mutuo y las experiencias compartidas, asimismo, quiero reconocer y agradecer al personal de colaboración de la universidad, en conjunto, cada persona que he tenido el honor de conocer ha dejado una huella única en mi viaje universitario. Estoy agradecido por las lecciones aprendidas, las amistades forjadas y el crecimiento personal y profesional que he experimentado.

Agradezco al profesor Guillermo por haberme dado la oportunidad de haber sido parte de su gran equipo de trabajo, por su constante apoyo, paciencia y enseñanzas. A mis compañeros del laboratorio les agradezco el tiempo compartido, los momentos de distensión, la ayuda con los experimentos y la generosidad de sus conocimientos, especialmente a mi guía **José Miguel** (Rulo), por el trabajo codo a codo y compartir alegrías, frustraciones, y momentos inolvidables. A los muchachos del Laboratorio de Farmacología Experimental, por la buena relación que tuve con cada uno de sus integrantes.

También quiero expresar mi sincero agradecimiento a los profesores Gustavo Castro, Pedro Aguirre, María Teresa Andonaegui, María Angélica Vega y Rosa Devés por su confianza en mí y por brindarme otra oportunidad de iniciar mi camino en la universidad. La confianza y el apoyo de estos distinguidos profesores fueron fundamentales en mi experiencia académica. Su dedicación a la enseñanza y su compromiso con el desarrollo de los estudiantes han dejado una impresión duradera en mi formación académica y personal.

En particular, deseo expresar mi gratitud a la **profesora Vega** por confiar en mí y seleccionarme entre muchos como uno de sus ayudantes. Agradezco sinceramente la oportunidad de aprender de su experiencia y conocimiento, así como por el respaldo brindado durante mi trayectoria universitaria. La confianza depositada en mí ha sido un estímulo valioso y me ha inspirado a esforzarme aún más en mi camino académico. Este reconocimiento va más allá de las aulas y se convierte en un testimonio de la importancia que tiene el respaldo de los profesores en el desarrollo de los estudiantes. Estoy agradecido por haber tenido el privilegio de contar con su guía y orientación a lo largo de mi carrera universitaria.

Finalmente, agradecer a mi grupo de amigos de la universidad y futuros colegas: **Kevin, Joselin, Rubén y Carol**, personas fundamentales en mi vida. Muchas gracias por su infinito apoyo, amor y, sobre todo, su paciencia hacia mí cuando las cosas se ponían complejas. Gracias por compartir conmigo su vida y por lo bien que me hacen. A cada uno de ustedes que creyó en mí, brindó su apoyo incondicional y compartió valiosas enseñanzas, les debo mi más sincero reconocimiento. Este logro no habría sido posible sin la colaboración y la confianza que depositaron en mí a lo largo de esta travesía.

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que, con su apoyo y enseñanzas, me acompañaron a lo largo de este extenso camino y contribuyeron significativamente a alcanzar la meta final.

Soy porque somos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

FINANCIAMIENTO.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
INDICE DE TABLAS.....	8
ABREVIATURAS	9
RESUMEN.....	11
SUMMARY	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. Generalidades	13
1.2. Estructura del tejido cardiaco.....	13
1.3. Fibroblastos cardiacos	14
1.4. Autodiferenciación de fibroblasto a miofibroblasto inducida por efecto autocrino del TGF- β	15
1.5. Senescencia celular.....	17
1.5.1 Marcadores de senescencia	19
1.5.2 Fenotipo secretor asociado a senescencia	20
1.6 La activación del TLR4 por LPS como inductor de senescencia	20
1.7 Fármacos senolíticos y senostáticos	22
1.8 Resolvina D1.....	22
2. HIPÓTESIS	23
3. OBJETIVO GENERAL.....	23
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5.1 Materiales.....	24
5.2 Animales.....	24
5.3 Aislación y cultivo de fibroblastos cardiacos.....	25
5.4 Tratamientos	26
5.5 Tinción β -galactosidasa asociada a senescencia.....	26
5.6 Tinción cristal violeta	27
5.7 Western blot.....	27

5.8	Perfil de citoquinas Luminex	28
5.9	Análisis estadístico	29
6.	RESULTADOS	30
6.1	Evaluar el efecto de la inhibición de ALK-5 con sobre la autodiferenciación de FC a MFC.	30
6.2	Objetivo específico 2: Evaluar sí LPS induce la senescencia de FC no autodiferenciados asociada a la activación de las vías (NF- κ B y/o p38MAPK)	32
6.2.1	Activación de la vía p38MAPK a tiempos cortos y largos posterior al tratamiento con LPS en FC.....	32
6.2.2	Activación de la vía NF-KB a tiempos cortos y largos posterior al tratamiento con LPS en FC.....	33
6.2.3	Determinación de la activación de la respuesta del daño al ADN (DDR)	34
6.2.4	Evaluación de proteínas relacionadas con el arresto del ciclo celular	35
6.2.5	Cambios morfológicos asociados a senescencia	37
6.2.6	Estimación del incremento de actividad SA- β -gal	39
	Resumen Objetivo 2.....	41
6.3.1	Activación del marcador asociado a la inflamación.....	42
6.3.2	Perfil de citoquinas del SASP	42
	Resumen Objetivo 3.....	44
6.4.1	Determinación de los niveles proteicos del receptor ALX/FPR2.....	45
6.4.2	Evaluación de proteína relacionadas con el arresto ciclo celular	45
6.4.3	Cambios morfológicos asociados a senescencia	46
6.4.4	Estimación del incremento de actividad SA- β -gal	47
	Resumen Objetivo 4.....	48
7.	DISCUSIÓN.....	48
7.3	Senescencia celular inducida por LPS en FC cultivados en presencia de SB-43154251	
7.4	Caracterización del SASP inducido con LPS en FC cultivados en presencia de SB-431542.....	55
7.5	Efecto de la RvD1 en la prevención de la senescencia celular inducida por LPS en FC cultivados en presencia de SB-431542.	57
8.	CONCLUSIONES.....	58
9.	LIMITACIONES.....	59
10.	PROYECCIONES.....	60
11.	ESQUEMA RESUMEN.....	61

12. BIBLIOGRAFÍA.....	62
-----------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funciones de los fibroblastos cardiacos.....	15
Figura 2. Vía canonica de señalizacion por TGF- β	16
Figura 3. Vías moleculares asociadas a la senescencia celular.....	19
Figura 4. Activación del receptor TLR4 por LPS.....	21
Figura 5. FC teñidos con cristal violeta.....	30
Figura 6. Inmunocitoquímica de FC para α -SMA en presencia y ausencia del inhibidor de ALK-5.....	31
Figura 7. LPS promueve la fosforilación temprana y tardía de p38MAPK	33
Figura 8. LPS promueve la fosforilación temprana y tardía de NF- κ B en FC	34
Figura 9. LPS no promueve la activación del DDR en FC.....	35
Figura 10. LPS induce cambios en los niveles proteicos de p53 y p21 en FC.....	36
Figura 11. LPS induce cambios en los niveles proteicos de p16 y alterar el grado de fosforilación de Rb	37
Figura 12. El tiempo de plaqueo y LPS inducen aumento del área promedio de FC.....	38
Figura 13. LPS y el tiempo de plaqueo aumentan la actividad SA- β -gal en FC.....	40
Figura 14. LPS promueve el aumento de la proteína de adhesión VCAM-1 en FC.....	42
Figura 15. LPS y el tiempo de plaqueo aumentan la secreción y magnitud de citoquinas de FC senescentes.....	43
Figura 16. Los niveles proteicos de ALX/FRP2 son constantes en los FC.....	45
Figura 17. RVD1 mantiene los niveles proteicos de pRB en FC tratados con LPS	46
Figura 18. RVD1 atenúa el aumento del área de FC tratados con LPS.....	47
Figura 19. RVD1 atenúa el aumento del porcentaje de células positivas para SA- β -gal de FC tratados con LPS.....	48

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sembrado de FC para cada condición de trabajo.....	26
Tabla 2. Resumen de los resultados de los marcadores de senescencia en FC luego del tratamiento con LPS a 3 y 7 días.....	41
Tabla 3. Resumen de los resultados de los marcadores de SASP en FC luego del tratamiento con LPS a 3 y 7 días.....	44
Tabla 4. Resumen de los resultados de RvD1 sobre los marcadores de senescencia en FC senescentes por 3 y 7 días.....	48

ABREVIATURAS

α -SMA : Alfa actina de músculo liso.

°C : Grados Celsius.

ADN : Ácido desoxirribonucleico.

BSA : Suero de albúmina bovino.

DMEM : Medio Eagle modificado de Dulbecco.

FC : Fibroblasto cardíaco.

g : Fuerza centrífuga.

HCl : Ácido clorhídrico.

IL : Interleuquina.

kDa : Kilo Dalton.

kg : Kilogramo.

LPS : Lipopolisacárido.

MAPK : Quinasa activada por mitógenos.

MeOH : Metanol.

MFC : Miofibroblasto cardíaco.

mg : Miligramo.

min : Minutos.

mL : Mililitro.

mm : Milímetro.

m/v : Masa/volumen.

NF- κ B : Factor nuclear kappa B.

nM : Nanomolar.

PBS : Tampón fosfato salino.

PFA : Paraformaldehído.

rpm : Revoluciones por minuto.

RvD1 : Resolvina D1.

SA- β -gal : Beta galactosidasa asociada a senescencia.

SDS : Dodecilsulfato sódico.

SFB : Suero fetal bovino.

T° : Temperatura.

TGF- β 1 : Factor de crecimiento transformante beta-1.

TLR : Receptor de tipo Toll.

μ g : Microgramo.

Pg : Picogramo

μ L : Microlitro.

μ M : Micromolar.

VCAM-1 : Molécula de adhesión vascular celular-1.

vs : Versus.

v/v : Volumen/volumen.

RESUMEN

RESOLVINA-D1 ATENÚA LA SENESCENCIA INDUCIDA POR LPS EN FIBROBLASTOS CARDIACOS NO AUTODIFERENCIADOS POR EFECTO AUTOCRINO DEL TGF- β 1

El fibroblasto cardiaco (FC) es regulador de la matriz extracelular del corazón, y el proceso de diferenciación de FC a miofibroblastos cardiacos (MFC), es clave en el desarrollo de fibrosis cardiaca. La diferenciación de FC a MFC es mediada principalmente por TGF- β . El estrés mecánico induce la secreción de TGF- β , quien de forma autocrina induce la autodiferenciación. La acumulación de FC y MFC senescentes está vinculada al desarrollo de fibrosis cardiaca. Las células senescentes entran en un arresto estable del ciclo celular, y poseen un complejo secretoma denominado SASP, que libera factores proinflamatorios, desempeñando un papel crucial en la fibrosis cardiaca. En FC se ha identificado el receptor TLR-4 el cual es activado por diversos estímulos asociados a daño y/o patógenos, desencadenando una fuerte respuesta inflamatoria. Sin embargo, en FC no se ha estudiado en profundidad, si la activación de este receptor por LPS induce la senescencia. Los fármacos senolíticos y senostáticos ejercen un control de las células senescentes llevando a su eliminación o a cambios en su secretoma. Resultados de nuestro laboratorio han mostrado que la Resolvina D1 (RvD1), posee un notable efecto antiinflamatorio en FC tratados con LPS.

En función a lo anterior, se propone la siguiente hipótesis: RvD1 atenúa la senescencia celular inducida por LPS en FC no autodiferenciados por el efecto autocrino de TGF- β 1. Los objetivos específicos fueron: 1) Evaluar el efecto de la inhibición de ALK-5 (SB-431542) sobre la autodiferenciación de FC a MFC, 2) Evaluar si LPS induce la senescencia de FC no autodiferenciados asociada a la activación de las vías (NF- κ B y/o p38MAPK), 3) Caracterizar el perfil de citoquinas del SASP en FC senescentes inducido por LPS, 4) Evaluar si RvD1 previene la senescencia inducida por LPS en FC.

El modelo experimental usó FC de rata, no autodiferenciados, tratados con LPS (1 μ g/mL), y se evaluó niveles proteicos, actividad SA- β -gal, tamaño celular y caracterización del SASP. Resultados: El inhibidor de ALK-5 (SB-431542), disminuyó la autodiferenciación de FC a MFC inducida por TGF- β ; LPS indujo senescencia a los 3 días (pRb, SA- β -gal) y 7 días (p16, pRb, tamaño y SA- β -gal). LPS aumentó el perfil de citoquinas SASP a 3 días, no observándose efecto a los a 7 días; finalmente, RvD1 previno el aumento de SA- β -gal inducido por LPS en FC tratados 3 y 7 días. Concluimos que LPS induce senescencia a 3 y 7 días en SFB 10%, evidenciando un SASP a 3 días, no apreciable a 7 días. RvD1 tiene efecto preventivo sobre la acción de LPS.

SUMMARY

RESOLVINA-D1 ATTENUATES LPS-INDUCED SENESENCE IN NON-AUTODIFFERENTIATED CARDIAC FIBROBLASTS THROUGH THE AUTOCRINE EFFECT OF TGF- β 1

The cardiac fibroblast (CF) regulates the extracellular matrix of the heart, and the differentiation process from CF to cardiac myofibroblasts (CMF) is key in the development of cardiac fibrosis. The differentiation of CF to CMF is primarily mediated by TGF- β . Mechanical stress induces the secretion of TGF- β , which, in an autocrine manner, induces autodifferentiation. The accumulation of senescent CF and CMF is linked to the development of cardiac fibrosis. Senescent cells enter a stable cell cycle arrest and possess a complex secretome called SASP, which releases proinflammatory factors, playing a crucial role in cardiac fibrosis. The TLR-4 receptor has been identified in CF, activated by various stimuli associated with damage and/or pathogens, triggering a strong inflammatory response. However, the activation of this receptor by LPS and its induction of senescence in CF have not been thoroughly studied. Senolytic and senostatic drugs exert control over senescent cells, leading to their elimination or changes in their secretome. Results from our laboratory have shown that Resolvin D1 (RvD1) has a notable anti-inflammatory effect on CF treated with LPS.

Based on the above, the following hypothesis is proposed: RvD1 attenuates LPS-induced cellular senescence in non-autodifferentiated CF through the autocrine effect of TGF- β 1. The specific objectives were: 1) Evaluate the effect of ALK-5 inhibition (SB-431542) on the autodifferentiation of CF to CMF, 2) Assess whether LPS induces senescence in non-autodifferentiated CF associated with the activation of pathways (NF- κ B and/or p38MAPK), 3) Characterize the cytokine profile of SASP in senescent CF induced by LPS, 4) Evaluate whether RvD1 prevents LPS-induced senescence in CF.

The experimental model used rat CF, non-autodifferentiated, treated with LPS (1 μ g/mL), and protein levels, SA- β -gal activity, cell size, and SASP characterization were evaluated. Results: The ALK-5 inhibitor (SB-431542) decreased the autodifferentiation of CF to CMF induced by TGF- β ; LPS induced senescence at 3 days (pRb, SA- β -gal) and 7 days (p16, pRb, size, and SA- β -gal). LPS increased the SASP cytokine profile at 3 days, with no observed effect at 7 days; finally, RvD1 prevented the increase in SA- β -gal induced by LPS in CF treated for 3 and 7 days. In conclusion, LPS induces senescence at 3 and 7 days in 10% serum, showing a SASP at 3 days, not noticeable at 7 days. RvD1 has a preventive effect on the action of LPS.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) engloban un conjunto de trastornos que afectan tanto al corazón como a los vasos sanguíneos, desempeñando un papel significativo en la carga global de enfermedades [1]. Representan una de las principales causas de defunciones y discapacidad en todo el mundo, siendo responsables de aproximadamente el 30% de todas las muertes anuales a nivel global [2]. A pesar de los notables avances en los campos científico, médico, tecnológico y farmacológico, las ECV persisten como la principal causa de muertes prematuras a nivel mundial. La prevalencia de estas enfermedades ha mostrado un aumento preocupante, revelando una carga aún mayor en el año 2019 en comparación con 1990 [1-4]. Este panorama subraya la necesidad imperante de desarrollar y aplicar estrategias preventivas y terapéuticas eficaces para abordar este desafío continuo en la salud pública. La investigación y la implementación de intervenciones innovadoras son esenciales para reducir la incidencia y las consecuencias asociadas a las ECV, mejorando así la calidad de vida de la población a nivel global.

1.2. Estructura del tejido cardíaco

El corazón, un órgano muscular vital, constituye la pieza central del sistema cardiovascular, desempeñando una función esencial al bombear sangre a todos los tejidos y células del organismo [5]. Para cumplir con eficacia esta función, el corazón debe coordinar su capacidad de relajarse para permitir el llenado y contraerse para provocar la eyección de la sangre. Este equilibrio dinámico se logra gracias a la altamente organizada estructura del tejido cardíaco, compuesto principalmente por cardiomiocitos, responsables de la fuerza contráctil; células endoteliales y células vasculares musculares lisas, unidades fundamentales de los vasos sanguíneos; y fibroblastos cardíacos FC, que desempeñan un papel crucial en la detección y respuesta al daño, así como en el mantenimiento de la homeostasis de la matriz extracelular (MEC) [6].

Desde una perspectiva celular, el corazón exhibe una diversidad de tipos celulares. Los cardiomiocitos representan aproximadamente el 25-35% del tejido cardíaco, mientras que las células no musculares constituyen el restante 65-75% del total [5-9]. Esta categoría incluye fibroblastos, mastocitos, células endoteliales, células de musculatura lisa, adipocitos, glóbulos blancos y otras células inmunológicamente activas. Aunque las proporciones específicas aún generan debate, la comprensión de sus funciones en la

integración estructural y funcional del corazón se ha convertido en un tema central de investigación cardíaca [7].

La interacción de estos diversos componentes celulares del corazón se lleva a cabo mediante mecanismos químicos, eléctricos y mecánicos, permitiéndole al órgano responder a estímulos de desarrollo, homeostáticos y patológicos. Durante la homeostasis, las células, especialmente los FC, desempeñan un papel crucial al mantener la forma y función del tejido cardíaco a través de interacciones directas célula-célula y la secreción de diversos factores de crecimiento [9]. Este intrincado sistema celular no solo contribuye a la salud cardiovascular, sino que también desempeña un papel esencial en las respuestas adaptativas del corazón a diferentes condiciones y desafíos.

1.3. Fibroblastos cardiacos

Los fibroblastos son células especializadas que desempeñan un papel fundamental en la formación y mantenimiento del tejido conectivo en organismos multicelulares. Se encuentran en diversos tejidos del cuerpo y tienen la responsabilidad de producir y mantener la matriz extracelular (MEC), una red tridimensional de proteínas y carbohidratos que proporciona soporte estructural y contribuye a la función tisular [8]. En el contexto cardíaco, los FC juegan un papel crucial en la remodelación del corazón. Estos regulan propiedades estructurales, bioquímicas, mecánicas y eléctricas, siendo los principales productores de proteínas de la MEC y, por ende, esenciales para mantener la integridad de la matriz cardíaca [10,11]. La matriz no solo ofrece soporte estructural y funcional para la comunicación e integración celular, facilitando una función contráctil coordinada, sino que también desempeña un papel crucial en la cicatrización de áreas dañadas [10].

Los FC, en su función de productores de tejido conectivo, generan una MEC densa y compleja, compuesta de colágenos, proteoglicanos y glicoproteínas. Además, secretan componentes como periostina, vimentina, fibronectina y varios tipos de colágeno [6]. Los FC poseen receptores importantes, incluyendo los β 2-adrenérgicos (β 2-AR), angiotensina II (AT1R), receptores de cinina B1 (B1R) y B2 (B2R), así como receptores vinculados a respuestas inflamatorias, como los receptores de tipo Toll (TLR4) [9,10].

Los FC también actúan como células centinela, respondiendo a diversos estímulos y adaptando su comportamiento. Su participación en el proceso de inflamación cardíaca, modulado por citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF e IL-8, destaca por su relevancia en la inducción de la senescencia celular. En la figura 1, se resumen las funciones celulares

claves de los FC, destacando que el FC responde a estímulos ambientales de diversas maneras, incluida la transformación hacia un fenotipo miofibroblasto, la proliferación, la migración, la secreción de citocinas y factores de crecimiento, y la modificación del recambio de la matriz extracelular mediante cambios en la síntesis de proteínas de la matriz y en la degradación de la matriz (ver figura 1) [10].

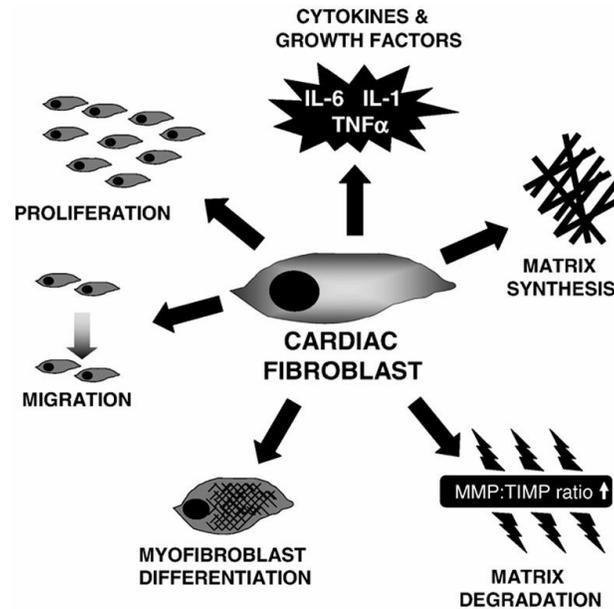


Figura 1. Funciones de los fibroblastos cardíacos. (De Porter K, Turner N. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology & Therapeutics*. 2009; 123: 255-278).

1.4. Autodiferenciación de fibroblasto a miofibroblasto inducida por efecto autocrino del TGF- β

El proceso de diferenciación de FC a miofibroblastos cardíacos (MFC) desempeña un papel crucial en la cicatrización tras el daño al tejido cardíaco, como el causado por un infarto al miocardio. Este fenómeno de diferenciación, es mediado principalmente por el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), y se caracteriza por la expresión y ensamblaje de α -actina del músculo liso (α -SMA del inglés α -smooth muscle actin), el cual ha sido objeto de estudio en nuestro laboratorio, revelando hallazgos significativos [12]. Se ha constatado que tanto los fibroblastos como los miofibroblastos tienen la capacidad de secretar las tres isoformas de TGF- β (1, 2 y 3) [13,14]. A este respecto, se ha evidenciado que el estrés mecánico derivado de la rigidez de la matriz extracelular, induce la secreción de TGF- β . En el contexto de cultivo celular, la secreción de TGF- β y su posterior efecto autocrino sobre

los mismos FC podría desencadenar un proceso de autodiferenciación llevándolos a transformarse en MFC [14,15].

La vía transduccional que conduce a la autodiferenciación se conoce como la vía canónica del TGF- β . La unión del TGF- β , al receptor de TGF- β tipo II, conduce al reclutamiento y fosforilación del receptor de TGF- β tipo I (TGF- β R1, también conocido como ALK-5). Posteriormente, el TGF- β R1 activado fosforila los residuos de serina en la región C-terminal de los Smad2 y Smad3; los que una vez fosforilados, se separan del receptor tipo I y forman un complejo heterotrimérico con el Smad4 (Co-Smad) en el endosoma temprano. Este complejo se transloca al núcleo celular. En el núcleo, los complejos de Smad interactúan con factores de transcripción, proteínas de unión a la cromatina, coactivadores y correpresores de la transcripción. La unión física a los genes objetivo conduce a la regulación transcripcional a nivel genómico, generando diversos efectos de la vía canónica del TGF- β en diferentes contextos, entre ellos la expresión de α -SMA. Adicionalmente, existe otro miembro de la familia de Smads conocido como Smad inhibidor (I-Smad), ejemplificado por el clásico Smad7. Este I-Smad regula negativamente la vía canónica al competir con Smad 2/3 por la unión al receptor tipo I. Esta interacción actúa como un mecanismo de retroalimentación negativa para atenuar la señalización del TGF- β /Smad, como se resume en la Figura 2.

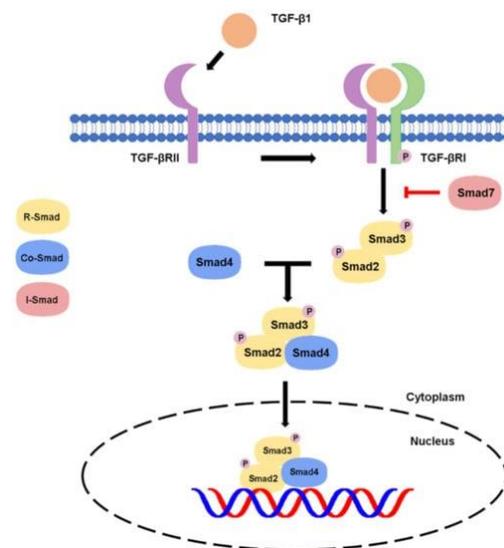


Figura 2. Vía canónica de señalización por TGF- β . La unión de TGF- β a su receptor TGF β RII conduce al reclutamiento de TGF- β R1 el cual es activado y conduce a la fosforilación de Smad2/3. Luego, el complejo Smad2/3 se une a Smad4 y se traslada al núcleo, donde induce la transcripción genética. La señalización puede inhibirse mediante una retroalimentación negativa de Smad7 sobre el TGF- β R1. Huang, F., Chen, YG. Regulation of TGF- β receptor activity. Cell Biosci 2, 9 (2012). <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-9>.

1.5. Senescencia celular

La senescencia celular es un proceso biológico que conlleva al envejecimiento y deterioro gradual de las células. Este fenómeno complejo se manifiesta de manera diversa en distintos niveles biológicos y describe el estado en el cual una célula cesa su capacidad de dividirse, experimentando simultáneamente cambios en su función y comportamiento. Este proceso está influenciado por factores genéticos, epigenéticos y ambientales, y se manifiesta en diversos tipos de células somáticas. Las células senescentes se caracterizan principalmente por entrar en un estado de arresto permanente en el ciclo celular, acompañado de cambios morfológicos y bioquímicos distintivos que facilitan su identificación. Entre estas características se incluye un aumento en el tamaño celular, una forma irregular, pérdida de laminina B1 que compromete la integridad nuclear, generación de fragmentos de cromatina citoplasmática (CCF) y un incremento en la actividad de la enzima β -galactosidasa [11,15].

Hasta la fecha, se han identificado dos tipos de senescencia: la senescencia replicativa (SR) y la senescencia prematura inducida por estrés (SPIS). La SR se origina por una disminución en el potencial de proliferación después de múltiples divisiones celulares, culminando en un arresto irreversible del ciclo celular debido al acortamiento de los telómeros. Por otro lado, la SPIS tiene un origen exógeno, resultado de exposiciones repetidas a estrés que eventualmente dañan el ADN celular. La senescencia se considera un marcador distintivo del envejecimiento, y su asociación con el envejecimiento patológico y enfermedades crónicas subraya la importancia de caracterizar marcadores de senescencia para la identificación de posibles objetivos terapéuticos [11,16].

A pesar de la naturaleza multifacética de la senescencia, la característica definitoria es la detención del ciclo celular donde las células experimentan un estado irreversible de detención del crecimiento y actividad celular. Este fenómeno puede ocurrir como respuesta a diversos factores, como daño en el ADN, estrés celular, o envejecimiento natural. Las vías de senescencia implican una serie de eventos moleculares y de señalización celular. Se describen dos vías: a) la vía p53/p21: cuando las células experimentan estrés celular o daño en el ADN, se activa p53 lo que induce la expresión del gen p21, que codifica la proteína p21. Esta proteína es un inhibidor de las cinasas dependientes de ciclina (CDK), lo que resulta en la detención del ciclo celular y, eventualmente, en la senescencia celular; b) la vía p16INK4a/pRb: la proteína p16INK4a es un inhibidor de las CDK. Su acumulación aumenta con el envejecimiento celular o en respuesta a señales de estrés. p16INK4a inhibe

específicamente la CDK4 y CDK6, lo que lleva a la inhibición de la fosforilación de la proteína pRb. La pRb no fosforilada se une a factores de transcripción, evitando la entrada de la célula en la fase S del ciclo celular y promoviendo la senescencia. Ambas vías convergen en la detención del ciclo celular y la entrada en el estado de senescencia (Figura 3).

Además de la detención del ciclo celular, las células senescentes exhiben un fenotipo relevante conocido como SASP (del inglés Senescence Associated Secretome Phenotype), que implica la secreción de una mezcla de factores, incluyendo citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, factores de crecimiento y proteasas. El SASP puede generar senescencia de manera autocrina y paracrina, afectar la remodelación del tejido y reclutar células del sistema inmune [15,16].

Otro proceso celular que desempeña un rol crucial en la homeostasis y la supervivencia celular es la autofagia, la que puede ser influenciada por diversas condiciones del entorno celular entre ellas la presencia de nutrientes en el medio de cultivo. La disponibilidad de suero proporciona nutrientes y factores de crecimiento esenciales, los que pueden modular la respuesta de las células al estrés y la necesidad de autodegradación. En estudios de cultivo celular con diferentes concentraciones de suero, se ha observado que la autofagia puede ser dependiente de dicha concentración. Por ejemplo, en condiciones de escasez de suero, las células pueden activar la autofagia como un mecanismo adaptativo para obtener recursos internos y mantener la viabilidad celular. Esta respuesta puede estar mediada por vías de señalización intracelular sensibles a la disponibilidad de nutrientes. Por otro lado, en condiciones de suero abundante, las células pueden experimentar una menor activación de la autofagia, ya que tienen acceso a nutrientes externos y no necesitan recurrir tanto a la autodegradación celular para sobrevivir.

En un trabajo previo llevado a cabo por Aránguiz et al., se exploraron las respuestas de los FC cultivados en medio DMEM-F12 suplementados con una concentración de suero fetal bovino (SFB) entre 1 y 10%. Este estudio reveló de manera concluyente que estas condiciones de cultivo entre 1 y 5%, inducen la autofagia, la cual se evidenció a través de la fragmentación de las proteínas LCIII y LCII [17,18]. Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan evidencia directa de la activación de este proceso autodegradativo en respuesta a la limitada disponibilidad de suero. Estos hallazgos refuerzan la comprensión de cómo las condiciones específicas de cultivo, en particular la concentración de suero,

pueden modular la respuesta celular en los FC puesto que se ha demostrado que la autofagia induce senescencia celular [19,20].

1.5.1 Marcadores de senescencia

Para determinar si una célula es senescente, tenemos que identificar diversos marcadores, que, en su conjunto, nos confirme la adquisición del fenotipo senescente [16]. Los marcadores corresponden al aumento de la expresión de las proteínas p53 (factor de transcripción de genes implicados en el control negativo de la proliferación celular), p21 (inhibidor de las CDKs regulada positivamente por p53), p16 INK4a (Inhibidor de CDK 4 y CDK 6 y por tanto evita la fosforilación de p-Rb) y p-Rb (controlador positivo del ciclo celular, pero su hipofosforilación modula negativamente mediante la inhibición del factor de transcripción E2F) (figura 3). Estos biomarcadores corresponden a proteínas que desencadenan el arresto del ciclo celular. Por otro lado, el marcador por excelencia es la determinación la actividad de la β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal), ya que como se mencionó anteriormente las células senescentes exhiben un mayor contenido lisosomal. Junto a este marcador también podemos identificar el aumento del tamaño, formación de vacuolas y presencia de entidades multinucleadas que son característica de las células senescentes. Además, se ha comprobado que estas células son capaces de amplificar el fenotipo senescente a otras células, a través de un mecanismo denominado senescencia inducida por senescencia. Este efecto se debe a la secreción de factores proinflamatorios, presentes en el SASP y, por lo tanto, también se ha descrito como marcador de senescencia [21,22].

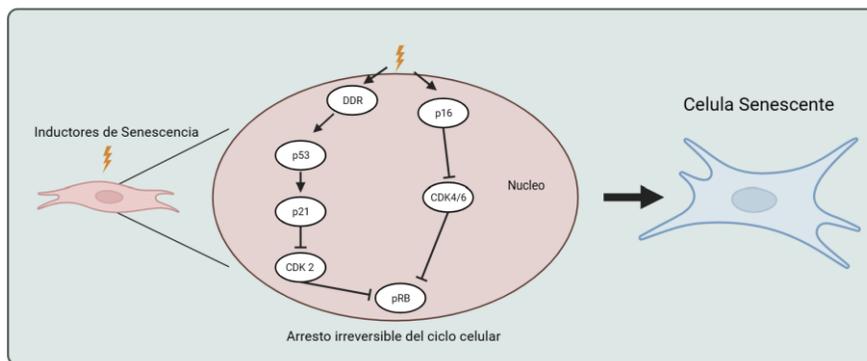


Figura 3. Vías moleculares asociadas a la senescencia celular. Dos vías supresoras de tumores, p53/p21 y p16/pRb, son responsables de implementar el arresto del ciclo celular. Inductores de senescencia causan daño al ADN, lo que activa cascadas de quinasas que resultan en la activación de p53 y la transcripción de p21. La activación de p16 conduce a la inhibición de las quinasas dependientes de ciclina y de la actividad de CDK4/6, resultando en la hipofosforilación de pRb y el arresto del ciclo celular.

1.5.2 Fenotipo secretor asociado a senescencia

El SASP, comprende un conjunto diverso de moléculas, incluyendo quimioquinas, citocinas, factores de crecimiento y metaloproteinasas. Entre los principales factores secretados por las células senescentes se destacan interleuquinas como IL-1 β , IL-6, IL-5, IL-10, la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y el Factor de necrosis tumoral (TNF- α) [10]. Estas citoquinas proinflamatorias son expresadas por los FC al activar la cascada de señalización de los receptores TLR-4 mediante ligandos como heparán sulfato y lipopolisacárido (LPS) [18]. A este respecto, en nuestro laboratorio hemos demostrado que los FC son capaces de secretar citoquinas y factores de crecimiento por estímulos diversos como LPS (como agonista específico de TLR4), Ang II, TGF- β , IL-1 β , y doxorrubicina. Del mismo modo, se ha demostrado que doxorrubicina induce senescencia de FC de ratón, acompañada de un perfil de citoquinas distinto al inducido por la activación del TLR4 como una respuesta inflamatoria; sin embargo, la activación del TLR4 por LPS, es hasta ahora un tema no descrito en FC.

A nivel molecular de vías de señalización, la activación persistente del factor transcripcional NF- κ B y la modulación positiva de p38MAPK son mecanismos asociados a la perpetuación de esta respuesta. Estudios confirman la participación de ambas vías en la secreción de citoquinas en células senescentes [12,13]. En términos de efectores, las mediciones más comunes incluyen citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α) y proteínas de adhesión que median el reclutamiento de células del sistema inmune como por ejemplo (VCAM-1) [13].

En los últimos años, el papel del SASP ha ganado relevancia debido a la conexión cada vez más sólida entre el envejecimiento, la inflamación y la prevalencia de enfermedades cardiovasculares [18]. De hecho, los efectos del SASP han sido evidenciados en diversas células que componen el corazón, siendo los FC claves en la mediación de estas respuestas debido a su función como células centinelas para mantener la homeostasis cardíaca [22,23].

1.6 La activación del TLR4 por LPS como inductor de senescencia

Durante los últimos 12 años, nuestro laboratorio ha emprendido investigaciones exhaustivas sobre la activación del receptor TLR4 en FC obtenidos de ratas neonatas y adultas. Hemos identificado que tanto LPS, un patrón molecular asociado a patógenos (PAMPs); como el heparán sulfato, que corresponde a los marcadores de daño celular

(patrones moleculares asociados a daño) (DAMPs), son inductores de la activación del TLR4 en los FC.

Esta activación del TLR4 se traduce en un perfil secretor proinflamatorio en los FC, caracterizado por la expresión de proteínas de adhesión, quimioquinas y citoquinas. De manera intrigante, nuestros estudios han revelado que la exposición de los MFC al LPS induce un fenómeno de desdiferenciación a FC. Esta transición se manifiesta mediante la desestructuración de las fibras de α -SMA, una característica distintiva de los MFC. Este hallazgo sugiere que la activación de los FC por el LPS no solo induce una respuesta proinflamatoria, sino que también conduce a la disminución de la población de MFC [24].

El LPS se destaca como uno de los componentes principales de la membrana de la bacteria gram-negativas, compuesta por una región lipídica y una glucosídica (ver figura 3). Este componente desempeña un papel esencial en la activación del sistema inmunológico al ser un antígeno superficial fundamental. Investigaciones previas en el laboratorio y literatura demostraron que el LPS actúa como un ligando específico para el receptor TLR-4 [24], por lo cual desempeña un papel crucial al promover la fosforilación y translocación al núcleo del factor transcripcional NF- κ B, así como la fosforilación y activación de p38MAPK [25], lo que desencadena la producción de citoquinas/quimioquinas pleiotrópicas, componentes del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) un marcador significativo en células senescentes (figura 4) [26].

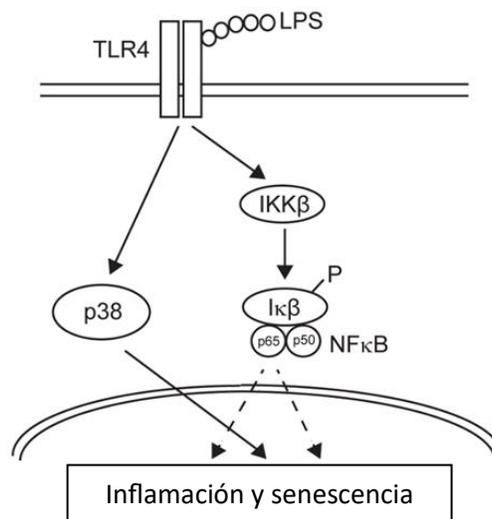


Figura 4. Activación del receptor TLR4 por LPS. La unión de LPS a TLR4 conduce a la activación de las vías de señalización p38MAPK e IKK/NF- κ B, que modulan la expresión de genes asociados a senescencia e inflamación (modificado de Lai T-Y, et al., PLOS ONE 8(9):e73153.doi: 10.1371/journal.pone.0073153).

1.7 Fármacos senolíticos y senostáticos

Los senolíticos son compuestos de pequeño tamaño diseñados para inducir la apoptosis de manera selectiva en las células senescentes, lo que permite retrasar o suprimir el proceso de senescencia. El empleo de senolíticos podría conducir a un curso más favorable mejorando la salud y la expectativa de vida al eliminar selectivamente las células senescentes que contribuyen a los procesos patológicos asociados al envejecimiento [26]. Por otro lado, los senomorfos o senostáticos son moléculas pequeñas que tienen la capacidad de modificar las características intrínsecas de las células senescentes, atenuando así el proceso de senescencia mediante la modulación del SASP. A diferencia de los senolíticos, los senostáticos no eliminan las células senescentes, por lo que este tipo de tratamiento farmacológico debe ser administrado continuamente para lograr eficacia [27,28].

Como se mencionó anteriormente, el SASP está compuesto por citoquinas proinflamatorias, y algunas investigaciones de nuestro laboratorio han demostrado que moléculas con propiedades antiinflamatorias, como la resolvina D1, modifican la secreción de las citoquinas y al mismo tiempo han demostrado no inducir la muerte de FC, por lo tanto, se podría sugerir que pueden actuar como senostáticos [26,27].

1.8 Resolvina D1

Las resolvinas son moléculas pequeñas y estereoespecíficas identificadas mediante análisis lipídomicos de exudados murinos generados durante inflamación aguda. Se producen a través de interacciones célula-célula entre células endoteliales/leucocitos y células endoteliales/neutrófilos durante la inflamación aguda, y se clasifican en series D y E. Un ejemplo es la resolvina D1 (RvD1), derivada del ácido docosahexaenoico (DHA) y considerada un producto de biosíntesis transcelular entre leucocitos y células endoteliales [27,28].

La RvD1 ha demostrado diversos efectos beneficiosos, como la inhibición del reclutamiento de neutrófilos, regulación de la producción de citoquinas, promoción de la remoción linfocítica de fagocitos, regulación de la migración de células T, inhibición de la inducción de NF- κ B y COX-2, reversión del aumento de TNF- α , IL-1 β e IL-8 en monocitos tratados con LPS. Además, la RvD1 actúa a través de la activación del receptor ALX/FPR2, el cual se ha asociado a la activación e inhibición de diversas vías transduccionales. Al

respecto, se ha demostrado la inhibición de p38 MAPK en células derivadas de médula ósea. Además, estudios recientes sugieren que RvD1 puede prevenir la inducción de la senescencia en fibroblastos de piel por H₂O₂, posiblemente a través de la autofagia [29].

Dada esta variedad de efectos positivos, es de gran importancia investigar si la RvD1 también puede modular la respuesta senescente inducida por LPS, de manera similar a su acción en la respuesta inflamatoria. Previamente en el laboratorio hemos demostrado que la RvE1 es capaz de prevenir la senescencia de FC de ratón inducida tanto por IL-1 β así como también por doxorubicina [30]. Sin embargo, en el laboratorio también hemos demostrado que la RvD1 tiene mejores respuestas antiinflamatorias en FC de ratas adultas respecto de la RvE1. Este planteamiento para RvD1, abre la puerta a la exploración de nuevas posibilidades terapéuticas en el ámbito de la senescencia celular y la inflamación, con el potencial de mejorar la comprensión de los mecanismos implicados y desarrollar estrategias más efectivas para contrarrestar estos procesos patológicos. [28-32].

Estos antecedentes en su conjunto nos permiten plantear a la siguiente hipótesis.

2. HIPÓTESIS

Resolvina D1 atenúa la senescencia celular inducida por LPS en fibroblastos cardiacos no autodiferenciados por el efecto autocrino de TGF- β 1.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar y caracterizar el efecto preventivo de RvD1 sobre la senescencia inducida por LPS en FC no autodiferenciados por efecto autocrino del TGF- β .

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.1** Evaluar el efecto de la inhibición de ALK-5 (SB-431542) sobre la autodiferenciación de FC a MFC
- 4.2** Evaluar sí LPS induce la senescencia de FC no autodiferenciados asociada a la activación de las vías (NF- κ B y/o p38MAPK)
- 4.3** Caracterizar el perfil de citoquinas del SASP en FC senescentes inducido por LPS
- 4.4** Evaluar sí RvD1 previene la senescencia inducida por LPS en FC.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

Azul de tripán 0,4%, Suero fetal bovino (SFB), Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM-F12), tripsina/EDTA, colagenasa tipo II en Gibco (Carlsbad, CA, EE. UU.). Estándar de peso molecular en Maestrogen (Hsinchu, Taiwán). Cristal violeta, paraformaldehído, compuestos orgánicos/inorgánicos/sales/ácidos/solventes en Merck (Darmstadt, Alemania). Reactivo quimioluminiscente (ECL), reactivo de Bradford en Bio-Rad (Hercules, CA, EE. UU.). Suero de albúmina bovino (BSA) en Rockland (Philadelphia, PA, EE. UU.). Material de plástico estéril, antibiótico (penicilina-estreptomicina-amfotericina B) en Corning Inc. (Nueva York, NY, EE. UU.). Anestésicos ketamina en Agrovvet (Quilicura, RM, Chile) y xilazina en Laboratorio Centrovvet (Cerrillos, RM, Chile). Kit para beta galactosidasa asociada a senescencia e inhibidor de fosfatasa/proteasa en Cell Signaling (Danvers, MA, EE. UU.). Resolvina D1 en Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, EE. UU.). Doxorrubicina, SB-431542, en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). LPS-EB Ultrapure (E. coli O111:B4) en Invivogen (San Diego, CA, EE. UU.).

Anticuerpos primarios anti p38 total, p-p38, NF-κB (p65) total, p-NF-κB (p65), p53, p-Rb, p-H2AX en Cell signaling (Danvers, MA, EE. UU.); anti VCAM-1, p21 en Abcam (Cambridge, Reino Unido); anti p16, FPR2 en Invitrogen (Eugene, OR, EE. UU.). Anticuerpos secundarios asociados a peroxidasa de rabanito anti-conejo y anti-ratón en Cell Signaling (Danvers, MA, EE. UU.).

5.2 Animales

Se utilizaron ratas macho adulto Sprague-Dawley de 6 a 8 semanas de vida y entre 250-350 gramos de peso, aproximadamente. Los animales se obtuvieron desde el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, en donde, fueron criados en jaulas (ciclos normales de 12 horas diurno/nocturno), con acceso a alimento y agua ad libitum hasta el momento de su sacrificio. Todos los estudios realizados siguieron la Guía de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio publicados por el Instituto Nacional de Salud de EE.UU (NIH Publication N°85-23, revisado 1996; cuyo certificado de ética es el N°21455-CQF-UCH, aprobado por el comité institucional de cuidado y uso de animales de la Universidad de Chile.

5.3 Aislación y cultivo de fibroblastos cardiacos

El procedimiento de aislación y cultivo de FC de rata adulta seguirá los lineamientos previamente descritos por Humeres [32], con diferentes modificaciones. Los animales especificados en el punto 5.2 fueron anestesiados con una mezcla de ketamina-xilazina (66 y 1,6 mg/kg respectivamente, vía intraperitoneal), y se verificó el efecto de los fármacos, a través de la exploración de reflejos en bigotes, patas y cola. Inmediatamente, se removió la tapa torácica mediante una toracotomía bilateral, para luego extraer el corazón, retirar las aurículas y conservar los ventrículos, los cuales se disgregaron en pequeños trozos (1-2 mm) para posterior digestión mecano-enzimática en 15 mL de solución de colagenasa tipo II (1 mg/mL) por 45 minutos a 37°C y 125 rpm. Posteriormente, se tomaron los 15 mL de la solución (sin restos de tejido), y se añadieron 15 mL de DMEM-F12 + SFB 10% con el objetivo de inactivar el efecto de la enzima. Al tejido restante, se le añadió otros 15 mL de solución de digestión y se repite el paso anterior. Terminados los 45 minutos, se extraen los 15 mL de solución y se inactivan con 15 mL de DMEM-F12 + SFB 10%. El producto resultante del proceso se sometió a una centrifugación a 30 g durante 2 minutos a temperatura ambiente con el fin de decantar y eliminar el tejido remanente. El sobrenadante obtenido fue posteriormente sometido a un segundo centrifugado de 10 minutos a 120 g, resultando en la formación de un pellet que fue resuspendido en 15 mL de DMEM-F12 + SFB 10% + SB-431542 1 µM. Este último se sembró en tres placas de cultivo de 100 mm y se incubó durante 24 horas en condiciones específicas: 5% de CO₂ y 37°C, con el objetivo de obtener un cultivo purificado de FC mediante adhesión diferencial.

Al día siguiente, los FC se lavaron suavemente dos veces con 5 mL de PBS 1X estéril para eliminar células no adheridas y restos celulares. Los FC fueron cultivados durante 6 días en DMEM-F12 + SFB 10%, y se añadió SB-431542 1 µM cada 48 horas con el propósito de prevenir la autodiferenciación celular, buscando alcanzar un 70-80% de confluencia. Posteriormente, se realizó un pasaje celular utilizando tripsina 0,1% en PBS 1X estéril, y el número de FC obtenidos por corazón se determinó mediante el método de exclusión de azul de tripán.

Las células se dispusieron en placas de cultivo con diversas densidades según el diseño experimental, empleando como medio DMEM-F12 + SFB 10%. Tras 24 horas, se renovó el medio en las placas con una solución fresca, aplicada una hora antes de la administración de los estímulos correspondientes. En todos los cambios de medio de cultivo, se añadió SB-431542 1 µM (ver tabla 1).

Tabla 1. Sembrado de FC para cada condición de trabajo. N° de fibroblastos cardiacos para cada experimento realizado, tipos de placas utilizadas P100 (100mm) p60 (60mm) p35 (35mm 6 pocillos) p22 (22 mm 12 pocillos) X no se realizó el experimento.

Tiempo del estímulo Experimento	Control 0	Tiempos cortos	3 días	7 días
Western blot	1000000 P100	200000 P60	350000 P100	200000 P100
Actividad SA-β-gal Cristal violeta	60000 P35	X	5000 P22	2500 P22
Milliplex	X	X	200000 P60	75000 P60

5.4 Tratamientos

LPS: Los FC fueron tratados con LPS ultrapuro (1 µg/mL) por 15, 30, 60 y 120 minutos para evaluar la activación de vías transduccionales; y por 3 y 7 días para evaluar su efecto senescente.

Resolvina D1 (RvD1): Para evaluar el efecto de este compuesto sobre la respuesta de LPS, los FC fueron tratados con RvD1 (100nM) 30 minutos antes del estímulo con LPS

Doxorrubicina: Los FC fueron tratados con Doxorrubicina como control positivo para la medición de la Actividad β-galactosidasa asociada a senescencia la dosis fue de 100 nM por 3 y 7 días.

5.5 Tinción β-galactosidasa asociada a senescencia

Los FC fueron sembrados en placas de cultivo de 12 pocillos con una densidad dependiente de las condiciones de trabajo antes mencionadas. La evaluación de la actividad SA-β-gal, se realizó mediante un ensayo de detección colorimétrica utilizando el Kit de Tinción para β-Galactosidasa asociada a Senescencia (#9860, Cell Signaling®), en donde, la preparación de las soluciones de fijado y tinción fue realizada según las instrucciones del fabricante. Las células de cada pocillo fueron lavadas con PBS 1X filtrado/frío y luego se fijaron con 500 µL de solución para este propósito durante 10 minutos a T° ambiente. Completado este tiempo se procedió a lavar nuevamente las células con PBS 1X filtrado/frío, para luego incubarlas con 500 µL de solución de tinción (pH = 6.00) por

24 horas en incubadora a 37°C sin CO₂. A continuación, los pocillos fueron divididos en cuatro campos, en los cuales se tomaron imágenes de forma aleatoria hasta completar al menos 500 células utilizando el microscopio invertido con contraste de fase Nikon Eclipse Ts2R acoplado a cámara Lanoptik MC4KW-G1 (software Pixit Pro). Debido al carácter subjetivo de la técnica la cuantificación fue realizada en ciego y se basó en dos parámetros, tamaño celular (área) y coloración azul. Una de las características de las células senescentes es el aumento de su tamaño celular, por lo tanto, la medición de este parámetro nos entrega información adicional para comprender de mejor forma el efecto de nuestro estímulo [33]. Además, este dato nos ayudará a determinar si las células positivas para coloración azul corresponden efectivamente a células senescentes y no producto de otras situaciones como se ha descrito en literatura (Zhou, Hallmarks techniques). Es por ello, que el área promedio de cada control de tiempo fue multiplicado por 1,5 veces y todas las células, tanto del propio control como del estímulo, con un tamaño mayor a ese valor se consideraron positivas para la actividad SA-β-gal si la coloración presente es azul. El resultado fue expresado como porcentaje de células positivas para SA-β-gal [34].

5.6 Tinción cristal violeta

Los FC fueron sembrados en iguales condiciones que la técnica (SA-β-gal). El ensayo se realizó lavando las células con PBS 1X filtrado y frío y se añadió 1 mL de cristal violeta (5 mg/ml con metanol (MeOH) al 10%), durante 10 minutos con agitación constante. Finalmente, los FC fueron lavados y secados a temperatura ambiente. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el microscopio invertido con contraste de fase Nikon Eclipse Ts2R acoplado a cámara Lanoptik MC4KW-G1 (software Pixit Pro).

5.7 Western blot

Una vez concluido el tiempo de tratamiento, los FC fueron lavados 3 veces con PBS 1X y se procedió a la extracción de proteínas mediante un lisado celular con tampón RIPA 1X (Tris-HCl 50mM pH 7,4; NaCl 150 mM; Tritón X-100 1% (v/v); desoxicolato de sodio 0,5% (m/v); SDS 0,1% (m/v); EDTA sal sódica 1mM), suplementado con mezcla de inhibidores de proteasa (aprotinina, bestatina, E64 y leupeptina) y fosfatasa (NaF, Na₄P₂O₇, Na₃VO₄ y β-glicerofosfato) (Cell Signaling). El homogenizado obtenido se sonicó durante 5 minutos y luego centrifugado a 21380 g por 10 minutos y 4°C. El sobrenadante se recuperó y se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Bio-Rad), para luego proceder a su desnaturalización utilizando tampón de carga 4X (Tris-HCl 250 mM pH 6,8; glicerol 32% (v/v); β-mercaptoetanol 20% (v/v), azul de bromofenol 0,02% (v/v); SDS

9,2% (m/v)) a una temperatura de 95°C por 5 minutos. Dichos extractos son almacenados a -20°C hasta su posterior utilización.

La separación y resolución de las proteínas, en base a su relación carga/masa, se realizó mediante una electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida con un porcentaje de concentración entre un 8 a 15% (v/v), dependiendo de la masa molecular de las proteínas a evaluar, y a un voltaje constante de 80 voltios (80 V). Inmediatamente después se realizó una electrotransferencia de las proteínas desde el gel de SDS-poliacrilamida a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (poro) durante 960 minutos a una corriente constante de 0,1 amperios (0,1 A). Terminado este paso, se procedió al bloqueo de las membranas de PVDF por 60 minutos con leche descremada en polvo o albúmina de suero bovino (BSA), ambos al 5% (m/v), dependiendo el caso, para luego ser incubadas con el respectivo anticuerpo primarios durante la noche a 4°C y con agitación constante.

Al siguiente día, y previo lavado con TBS 1X/Tween-20 0,1% por 3 veces durante 10 minutos cada uno, se realizó una incubación por 2 horas a T° ambiente y agitación constante con el respectivo anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o conejo conjugado a peroxidasa de rabanito. Finalmente, se realizaron 3 lavados por 10 minutos cada uno con TBS 1X/Tween-20 0,1%. La detección de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia utilizando el reactivo (ECL) y el escáner para membranas LICOR® c-Digit modelo 3600 (software Image Studio Digits ver 5.2). Las imágenes obtenidas fueron analizadas por densitometría utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.) y los niveles proteicos fueron estandarizados con relación a los niveles de β -tubulina o proteína total. Los anticuerpos primarios utilizados son: p53, p-Rb, γ -H2AX, p-p38, p38 total, β -tubulina (Cell Signaling), p16 (Invitrogen), p21, Vcam (Abcam), mientras que los anticuerpos secundarios son anti-conejo (Santa Cruz) y anti-ratón (Cell Signaling).

5.8 Perfil de citoquinas Luminex

Después de completar el periodo de tratamiento, se realizaron tres lavados con PBS 1X a los FC, seguidos por la adición de 1,5 ml de medio de cultivo DMEM-F12 durante 2 días. Este paso permitió a las células secretar las citoquinas objeto de medición. Posteriormente, se recolectaron los medios, los cuales fueron procesados y congelados. Posteriormente se continuó con el protocolo de western blot mencionado en la sección 5.7. El perfil de citoquinas secretadas por los FC se evaluó utilizando el ensayo Luminex en el medio de cultivo, empleando el kit multiplex (RECYTMAG-65K/MILLIPLEX MAP Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel) según las indicaciones del fabricante. Este kit

fue diseñado para medir citoquinas específicas, incluyendo IL-1B, IL-6, IL-10, IL-5, MCP-1 y TNF- α . La medición de los niveles de citoquinas se llevó a cabo en el equipo Luminex 200 system, Multiplex Bio-Assay. Los valores obtenidos se normalizaron en relación con la cantidad de proteína total. Las curvas estándar proporcionadas para cada citoquina (IL-1B, IL-6, IL-10, IL-5, MCP-1 y TNF- α) se utilizaron para la cuantificación, con rangos específicos de detección establecidos para cada una de ellas: IL-1B (2,4-10.000 pg/mL), IL-6 (73,2-300.000 pg/mL), IL-10 (7,3-30.000 pg/mL), IL-5 (4,8-20.000 pg/mL), MCP-1 (29,3-120.000 pg/mL) y TNF- α (2,4-10.000 pg/mL).

5.9 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como el promedio de los datos +/- error estándar de la desviación estándar (SD) y analizados por t-Test o ANOVA de una vía paramétricos para comparar entre las distintas condiciones experimentales y respectivos controles. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism9.

6. RESULTADOS

En esta sección, se presentan los principales resultados obtenidos a lo largo de la investigación.

6.1 Evaluar el efecto de la inhibición de ALK-5 con sobre la autodiferenciación de FC a MFC.

Nuestro primer objetivo fue establecer el modelo experimental, lo que significó inhibir la diferenciación de FC a MFC por medio del inhibidor de la proteína quinasa ALK-5 (SB-431542, 1 μ M), asociada al receptor TGF β R1. La figura 5, presenta diversas imágenes de los cultivos de FC teñidos con cristal violeta.

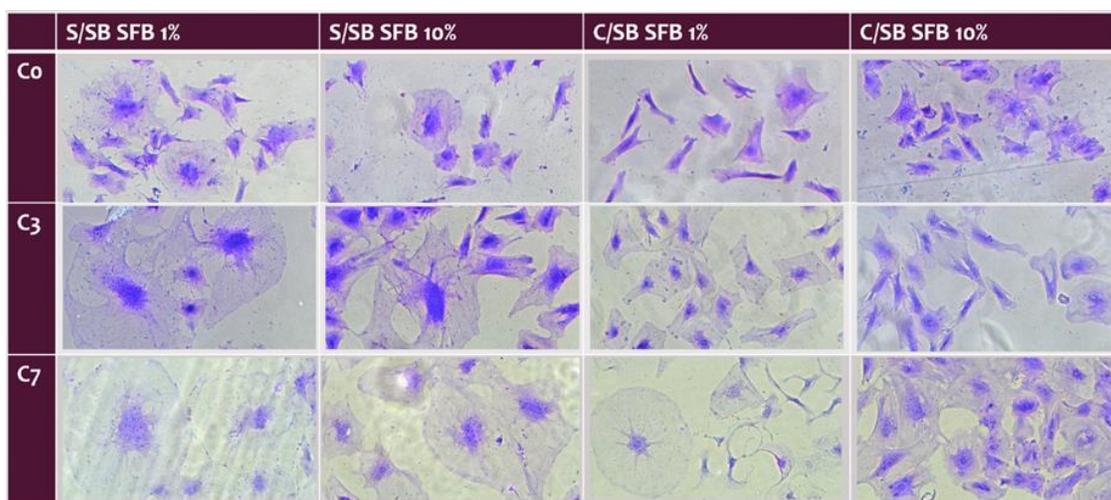


Figura 5. FC teñidos con Cristal violeta. Los FC fueron cultivados en tres distintas condiciones: a) presencia o ausencia del inhibidor de ALK-5 (S/SB, C/SB), b) concentración de suero con SFB 1% o SFB 10%; y c) tiempo de plaqueo por 0, 3 o 7 días (C₀, C₃ y C₇).

A través de estas imágenes, se puede apreciar de manera evidente la influencia que ejerce tanto el factor tiempo, la concentración de suero; y la presencia del inhibidor de ALK-5 (SB-431542), sobre la morfología y la densidad celular en los cultivos

El análisis temporal del cultivo, considerando cada condición de inhibidor y concentración de suero, se destaca que los fibroblastos cardiacos (FC) en el tiempo C₀ exhiben un tamaño inferior en comparación con C₃ y C₇. Además, se observa que los FC en C₃ presentan un tamaño menor en comparación con los de C₇. La tendencia al aumento progresivo del tamaño de los FC tanto en C₃ como en C₇ sugiere la posibilidad de un proceso de diferenciación inducido por el estrés mecánico acumulado a lo largo del tiempo en la placa de cultivo.

Al comparar las condiciones de cultivo con suero al 1% y suero al 10% en todas las condiciones de tiempo, se observa que los FC cultivados con suero al 1% muestran un tamaño significativamente mayor, siendo esta diferencia más evidente en la condición de 7 días. Es importante destacar que en la condición de 7 días y suero al 1% en presencia del inhibidor, se observa que los FC adoptan una morfología contraída (tipo neuritas), lo que sugiere un proceso de muerte celular debido a la falta de nutrientes.

Adicionalmente, al comparar las condiciones de cultivo con y sin el inhibidor, se aprecia que en presencia de SB se observa un mayor número de células por campo, acompañado de un tamaño celular reducido en comparación con los FC cultivados sin SB. Este resultado podría indicar una respuesta celular más activa y una posible implicación del inhibidor en la regulación de la proliferación y tamaño celular al inhibir la autodiferenciación por TGF- β autocrino.

Basándonos en estos resultados, se tomó la decisión de emplear la inhibición de la autodiferenciación como modelo experimental, manteniendo las células en condiciones de medio de suero al 10 % durante períodos de 3 y 7 días. La selección de los periodos de 3 y 7 días se basa en la intención de capturar momentos más tardíos, que es clave en el desarrollo de senescencia inducida por activación del receptor TLR4.

A este respecto, en la figura 6 se observa cualitativamente que la condición con SB presenta una menor expresión de α -SMA respecto del control sin la intervención farmacológica. Además, se puede apreciar que existe diferencia significativa al comparar la intensidad de fluorescencia por cada micrómetro cuadrado.

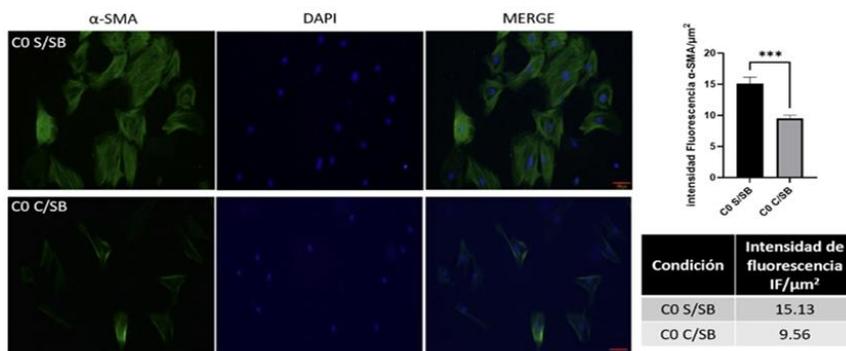


Figura 6. Inmunocitoquímica de FC para α -SMA en presencia y ausencia del inhibidor de ALK-5. Los FC fueron cultivados con y sin el SB-431542 se presenta los resultados obtenidos por ICQ correspondiente a la expresión y ensamblaje de α -SMA y su respectiva cuantificación a tiempo 0.

6.2 Objetivo específico 2: Evaluar si LPS induce la senescencia de FC no autodiferenciados asociada a la activación de las vías (NF- κ B y/o p38MAPK)

6.2.1 Activación de la vía p38MAPK a tiempos cortos y largos posterior al tratamiento con LPS en FC

Considerando el papel relevante de p38MAPK en la adquisición y mantenimiento del fenotipo senescente en diversos tipos celulares, se evaluó la respuesta de esta proteína frente al tratamiento con LPS en intervalos de tiempo cortos (0, 15, 30, 60 y 120 minutos). La cuantificación de la fosforilación de p38MAPK mediante Western blot reveló un aumento progresivo en cada instante hasta los 60 minutos, donde se observa el mayor incremento, seguido de una disminución significativa de la expresión a los 120 minutos. La modificación post-transduccional inducida por LPS alcanzó aproximadamente 2.0 veces el nivel de fosforilación respecto al control a los 60 minutos.

Con la activación inicial de p38MAPK confirmada, se procedió a evaluar su persistencia en etapas tardías del tratamiento, considerando que la activación crónica de p38MAPK se asocia con el mantenimiento del fenotipo senescente y del SASP. Sorprendentemente, no se observó un efecto en comparación con el control de tiempo a los 3 días, indicando una activación transitoria en la activación de la vía asociada a p38MAPK. En el análisis a los 7 días, se evidenció una disminución más pronunciada, sugiriendo que el tratamiento podría reducir la activación sostenida de la vía transduccional. (Figura 7)

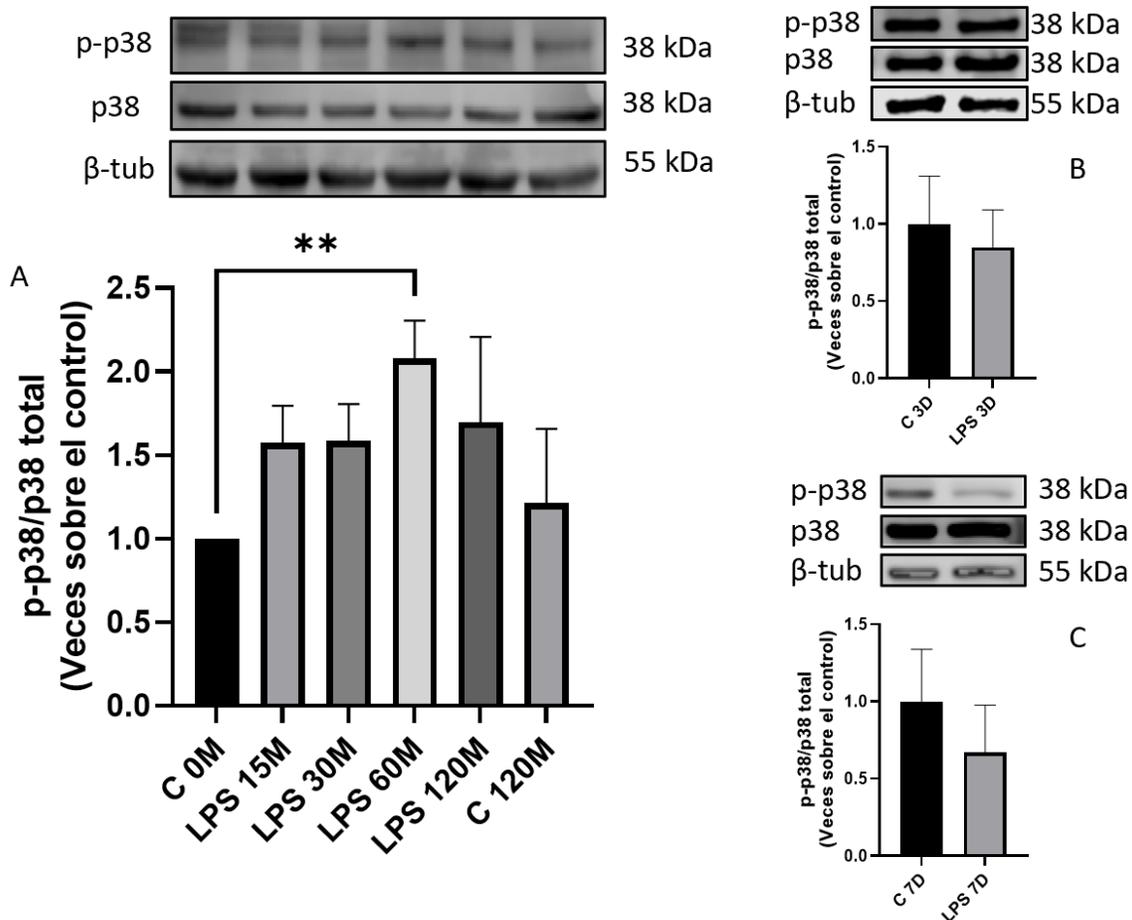


Figura 7. LPS promueve la fosforilación temprana y tardía de p38MAPK en FC. Los fueron tratados a tiempos cortos (0, 15, 30, 60 y 120 minutos) (A), por 3 días (B) y por 7 días (C) con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se determinó el grado de fosforilación de la proteína p38MAPK. Se muestra la imagen representativa y cuantificación por densitometría estandarizada con respecto a p38 total y considerando β -tubulina como referencia de una correcta cuantificación proteica. Los valores graficados en A corresponden al promedio \pm SD para $n=4$, en B y C para $n=6$, siendo analizados (A) por test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn con $**p<0.01$ vs C0*, (B y C) por test t-student con n.s. vs C72H.

6.2.2 Activación de la vía NF- κ B a tiempos cortos y largos posterior al tratamiento con LPS en FC

Al igual que en el caso anterior, se ha descrito la participación de NF- κ B como promotor del fenotipo senescente y la activación crónica del SASP. Luego del tratamiento con LPS, se evaluó el nivel de fosforilación del factor transcripcional mediante Western blot en intervalos de tiempo cortos (0, 15, 30, 60 y 120 minutos), revelando un aumento significativo de aproximadamente 1,4 veces en la modificación post-transduccional inducida por LPS a los 30 y 60 minutos. No obstante, en otros intervalos de tiempo, los niveles fueron comparables al control inicial y final, indicando que nuestro tratamiento promueve la activación temprana, como se ha descrito previamente. También se determinó la fosforilación de esta proteína a los 3 días luego del tratamiento con LPS. En los resultados

no se observa una mayor fosforilación de NF- κ B en comparación con el control a los 3 días y una disminución de la fosforilación a los 7 días, la cual es estadísticamente significativa. (Figura 8)

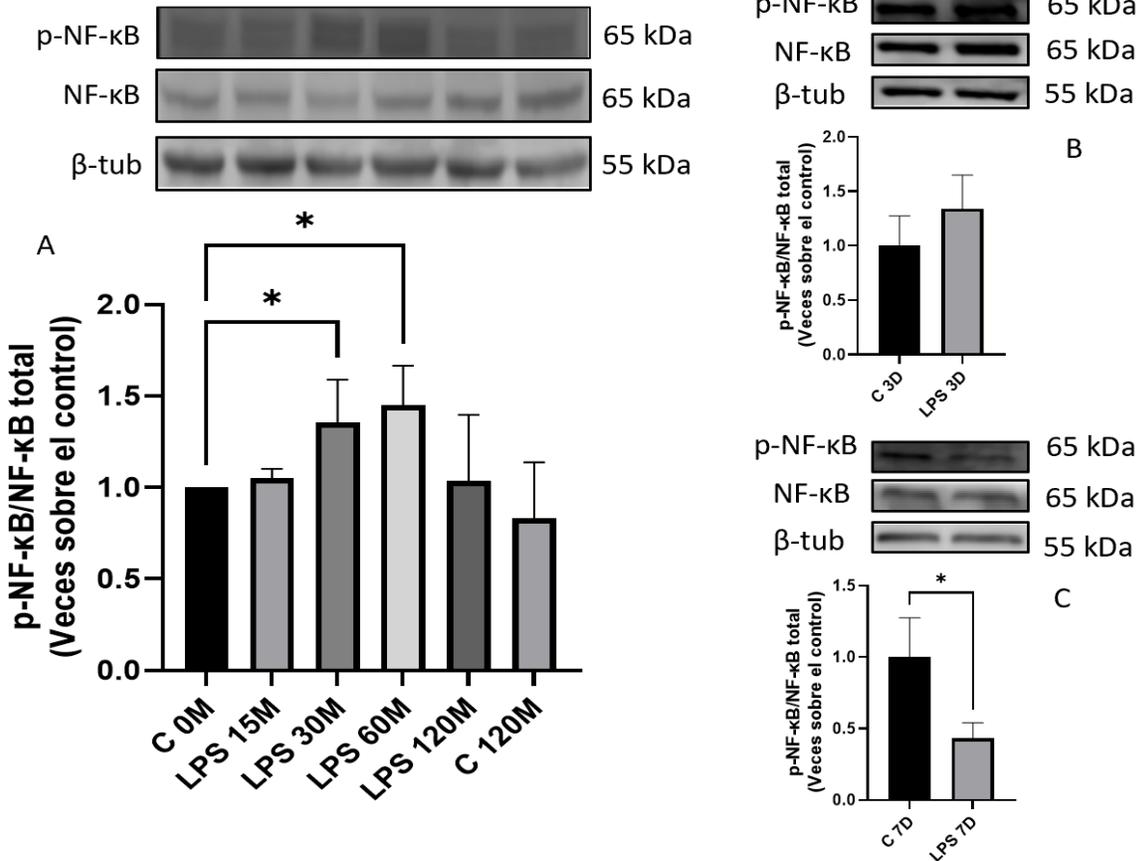


Figura 8. LPS promueve la fosforilación temprana y tardía de NF- κ B en FC. Los FC fueron tratados a tiempos cortos (0, 15, 30, 60 y 120 minutos) (A) y por 3 (B) y 7 días (C) con LPS (1 μ g/mL) y se determinó el grado de fosforilación de la proteína NF- κ B. Se muestra la imagen representativa y cuantificación por densitometría estandarizada con respecto a NF- κ B total y tomando β -tubulina como referencia de una correcta cuantificación proteica. Los valores graficados en A y C corresponden al promedio \pm SD para n=4, siendo analizados (A) por test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn con $*p < 0.05$ vs C0min y, (B) corresponden al promedio \pm SD para n=6, por test t-student con $*p < 0.05$ vs C72H.

6.2.3 Determinación de la activación de la respuesta del daño al ADN (DDR)

En este contexto, se evaluó el daño al ADN mediante la medición de los niveles de la proteína γ H2A.X a través de Western blot. Los resultados muestran que tanto a los 3 y 7 días, no se observaron cambios en la expresión de γ H2A.X, manteniéndose prácticamente igual que en el control. Lo anterior indica que, con esta técnica no se evidenció un daño significativo al ADN inducido por nuestro estímulo en comparación con el grupo de control (Figura 9).

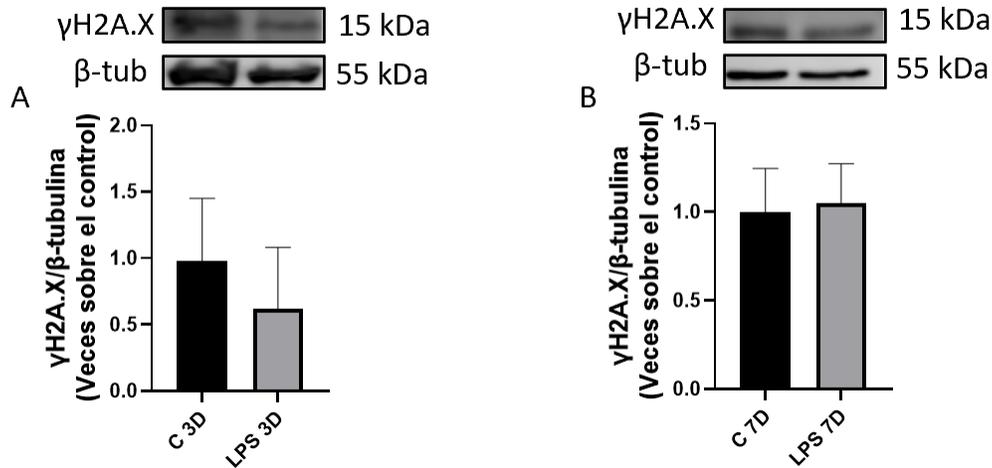


Figura 9. LPS no promueve la activación del DDR en FC. Se sembraron 350 mil (WB) FC de rata adulta, los cuales fueron tratados con LPS (1 µg/mL) y se determinó los niveles de la proteína γH2A.X mediante WB a los 3 y 7 días (A y B respectivamente). Se muestra la imagen representativa y cuantificación por densitometría estandarizada con respecto a β-tubulina. Los valores corresponden al promedio +/- SD para n=6 en el caso de A y n=4 para el caso de B, siendo los gráficos se analizaron por test t-student.

6.2.4 Evaluación de proteínas relacionadas con el arresto del ciclo celular

Para evaluar el impacto senescente del LPS en los FC, se llevó a cabo una evaluación inicial de las proteínas relacionadas con el arresto del ciclo celular, después del tratamiento con LPS (1 µg/mL) durante periodos de 3 y 7 días. En relación con la vía de señalización p53/p21, se evaluaron los niveles de estos marcadores empleando para ello la técnica de Western blot a los tiempos descritos anteriormente. Los resultados de la figura 10, muestran que LPS no indujo un aumento en la expresión de p53 respecto del control para ambas condiciones de tiempo. Del mismo modo, no se observaron cambios estadísticamente significativos en la expresión de p21 en respuesta al tratamiento con LPS en comparación con el control correspondiente.

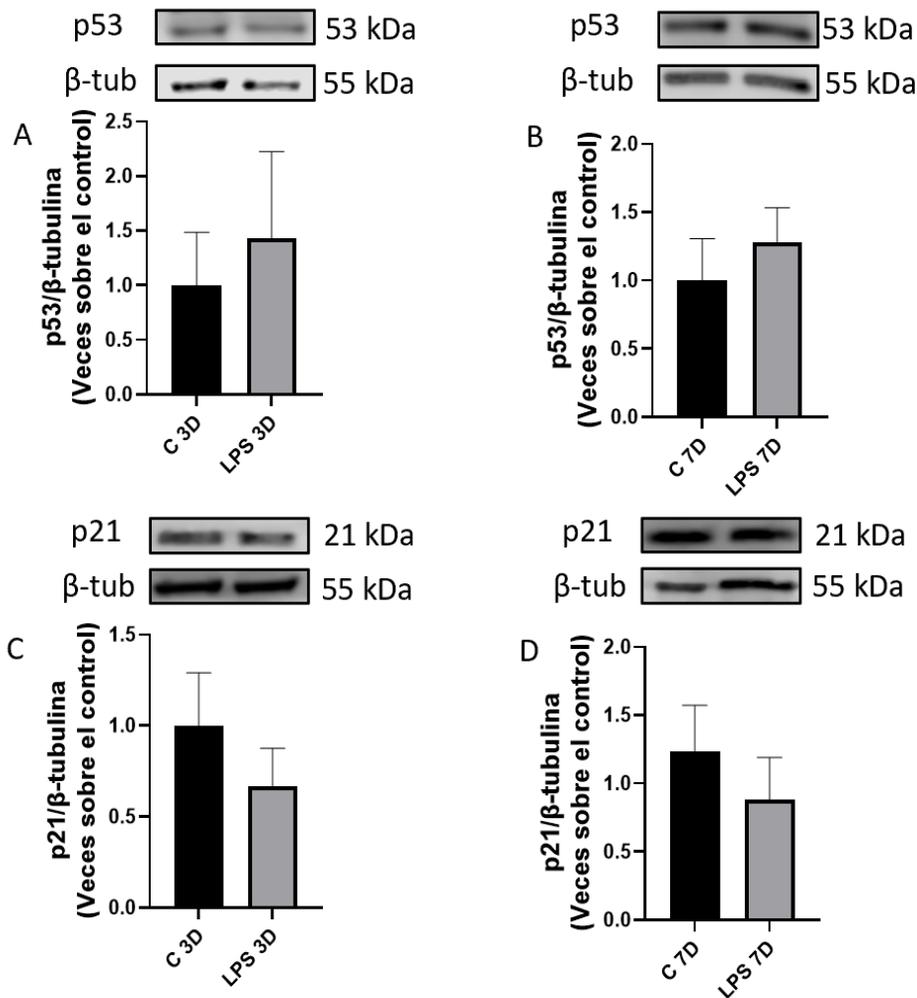


Figura 10. LPS induce cambios en los niveles proteicos de p53 y p21 en FC. Se sembraron 350 mil FC de rata adulta, los cuales fueron tratados con LPS (1 μ g/mL) y se determinaron los niveles proteicos de p53 y p21 por WB a los 3 (A y C) y 7 días (B y D). Se muestra la imagen representativa y cuantificación por densitometría estandarizada con respecto a β -tubulina. Los valores corresponden al promedio \pm SD para n=6 (H) y n=6 (72H). Los gráficos se analizaron por test t-student.

En la exploración de otra vía de transducción asociada con la detención del ciclo celular, donde p16 y Rb desempeñan roles fundamentales, se observaron distintos patrones de expresión. Los resultados muestran que, en la condición de 3 días, la expresión de p16 se mantuvo constante, sin cambios significativos en comparación con el control. Sin embargo, en la condición de 7 días, se evidenció un aumento significativo en la expresión de p16, alcanzando un incremento de 1,7 veces respecto al control.

La hipofosforilación de Rb, es un marcador crucial de la detención del ciclo celular. Los resultados muestran que LPS alcanzó a ejercer diferencias significativas a los 3 días

en comparación con el control. Sin embargo, en la condición de 7 días, se destacó una disminución altamente significativa, indicando una reducción pronunciada de la fosforilación de Rb en 0,4 veces en relación con el control. (Figura 11)

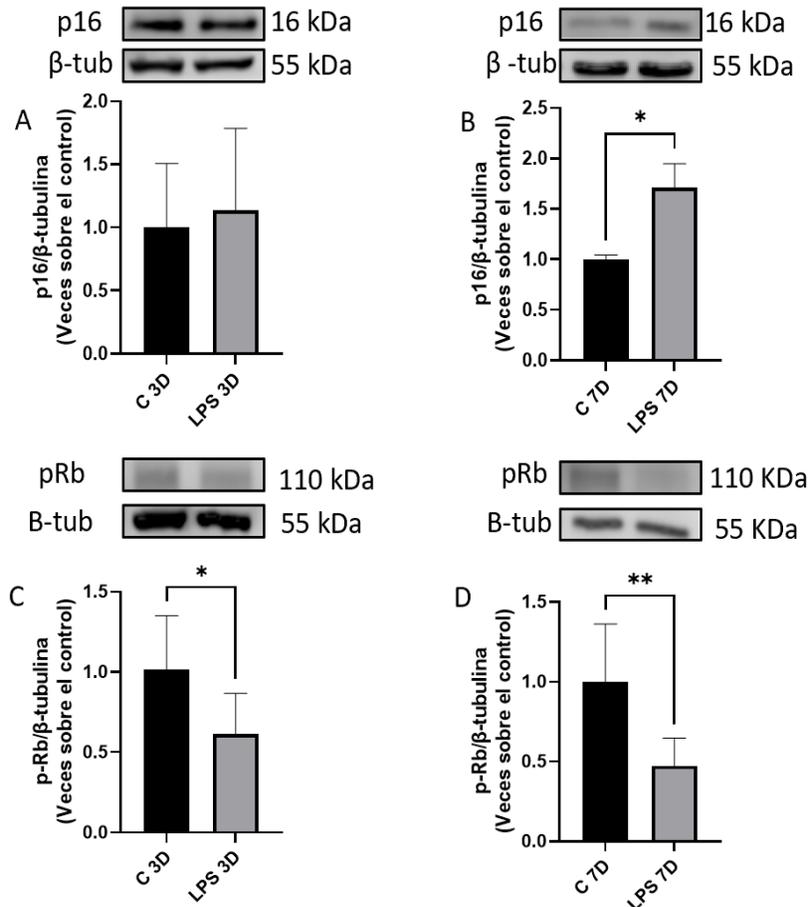


Figura 11. LPS induce cambios en los niveles proteicos de p16 y alterar el grado de fosforilación de Rb
 Se sembraron 350 mil FC de rata adulta, los cuales fueron tratados con LPS (1 µg/mL) y se determinó, mediante WB, los niveles de la proteína p16 a los 3 y 7 días (A y B), al igual que los niveles de los niveles de pRb (C y D). Se muestra la imagen representativa y cuantificación por densitometría estandarizada con respecto a β-tubulina. Los valores corresponden al promedio +/- SD para p16 n=6 (3 D) y n=6 (7 D); p-Rb n=6 (7D) p-Rb n=6 (7 D). Los gráficos se analizaron por test t-student, siendo *p<0.05 vs C3 y C7 **p<0.01 vs C7

6.2.5 Cambios morfológicos asociados a senescencia

Los cambios morfológicos asociados a la senescencia son una característica típica presente en cultivos celulares. En general, las células senescentes tienden a exhibir un mayor tamaño en comparación con células que no presentan el fenotipo senescente.

Los resultados de la figura 12, muestra el área de los FC cultivados a distinto tiempo, en ella se observa que los FC, basalmente, son células de gran tamaño, como se evidencia

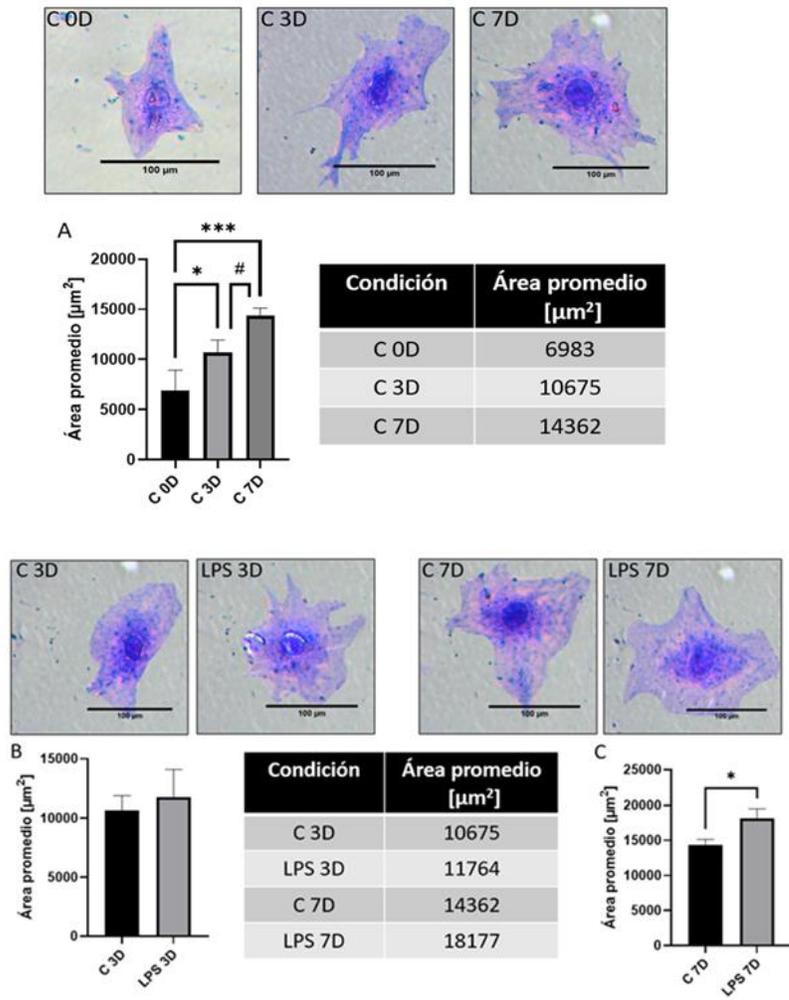


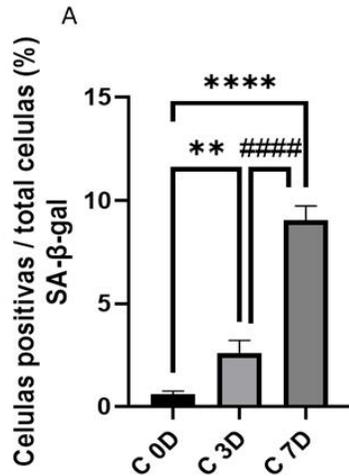
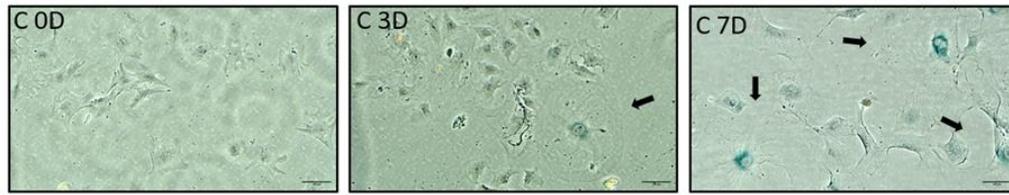
Figura 12. El tiempo de plaqueo y LPS inducen aumento del área promedio de FC. En el proceso de evaluación se midió el área promedio (μm^2) a 0, 3 y 7 días de los FC de rata adulta. En A, se observa el gráfico correspondiente al área promedio obtenida en los controles de tiempo. En B, gráfico al comparar el área promedio luego del tratamiento con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 3 días junto a las imágenes de FC representativas para condición trabajada. En C, gráfico al comparar el área promedio luego del tratamiento con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 7 días junto a las imágenes de FC representativas para condición trabajada. se observan tablas resumen del tamaño de los FC en todas las condiciones trabajadas. en A, B y C corresponden al promedio \pm SD para $n=4$. El gráfico A se analizó por test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn; los gráficos en B y C se analizaron por test t-student. *** $p<0.001$ vs C7 * $p<0.05$ vs C3 # $p<0.05$ C3 vs C7.

por el tamaño celular inicial de $6983 \mu\text{m}^2$ para el control a tiempo 0; y el tamaño aumenta de manera significativa y dependiente del tiempo, como se evidencia en los resultados para los grupos de control a 3 y 7 días. donde se observa un aumento significativo en el tamaño celular. Se adjuntan imágenes representativas de cada condición, con tamaño similar al área promedio calculada para facilitar la visualización de dicho aumento. El tratamiento con LPS en la condición de 3 días no mostró una diferencia significativa (C3: $10675 \mu\text{m}^2$, LPS3:

11764 μm^2), a diferencia de la condición de 7 días donde se produjo un aumento significativo en comparación con su control de tiempo (C7: 14362 μm^2 , LPS7: 18177 μm^2).

6.2.6 Estimación del incremento de actividad SA- β -gal

La actividad SA- β -gal, es una característica distintiva de las células senescentes. Esta, se evaluó midiendo la positividad para este marcador, considerando células con un tamaño 1,5 veces mayor al área promedio. Basalmente, nuestros FC exhibieron aproximadamente un 0,5% de positividad. Este valor aumentó de manera dependiente del tiempo en los controles de 3 días, alcanzando alrededor del 2,6%, y en los de 7 días, evidenciando un valor cercano al 9% (Figura 12). En relación con el tratamiento de LPS durante 3 días, se observó que las células alcanzaron una positividad cercana al 4,8%, lo que representa un aumento estadísticamente significativo en comparación con el control de tiempo, que tenía una magnitud del 2,6%, como se mencionó previamente. Siguiendo la misma tendencia, el tratamiento con nuestro estímulo a los 7 días promovió un aumento en el número de células positivas para SA- β -gal (C7: 9% vs. LPS: 15%) (Figura 13).



Condición	Porcentaje de células positivas SA-β-gal
C 0D	0.6
C 3D	2.6
C 7D	9.1

Condición	Porcentaje de células positivas SA-β-gal
C 3D	2.6
LPS 3D	4.8
C 7D	9.1
LPS 7D	15.1

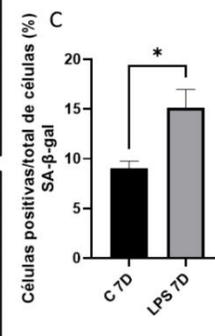
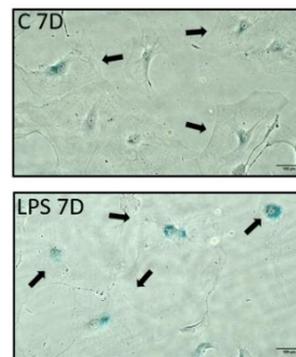
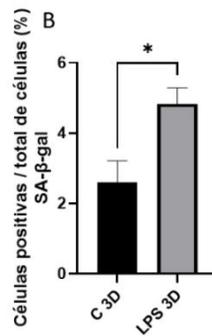
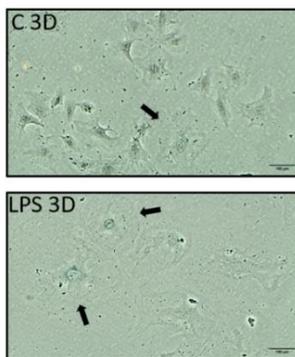


Figura 13. LPS y el tiempo de plaqueo aumentan la actividad SA-β-gal en FC. Se sembraron 10 mil FC de rata adulta y se les determinó el porcentaje de células positivas/total células para SA-β-gal a 0, 3 Y 7 días. El conteo fue realizado en forma manual tomando como base aquellas células que fueron 1,5 veces mayor en tamaño a su respectivo control de tiempo. En A, se observa el gráfico correspondiente al porcentaje de células positivas obtenidas en los controles de tiempo. En B y C, se aprecia el gráfico al comparar el porcentaje de células positivas luego del tratamiento con LPS (1 µg/mL) a 3 y 7 días respectivamente días. Junto a los gráficos se muestran las imágenes representativas para condición trabajada (C 0H, C3, LPS3, C7 y LPS7) Los valores de los gráficos en A y B corresponden al promedio +/- SD para n=4. El gráfico A se analizó por test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn los gráficos B y C se analizaron por test t-student. *p<0.05 vs C3 y C7, **p<0.01 vs C3, ****p<0.0001 vs C7, #####p<0.0001 C3 vs C7.

Resumen Objetivo 2

1. LPS activa las vías de NF-KB y p38MAPK a tiempos cortos pero las vías no se mantienen activas a tiempos más tardíos
2. LPS no genera daño al ADN en las condiciones de tiempo estudiadas.
3. LPS no afecta la expresión de las proteínas p53/p21 en ninguna de las condiciones de tiempo.
4. LPS no aumenta la expresión de p16 a los 3 días; aunque sí lo hace a los 7 días.
5. LPS disminuye la fosforilación de la proteína del retinoblastoma a los 3 y 7 días.
6. LPS no aumenta el tamaño celular de los fibroblastos a 3 días; pero si a los 7 días.
7. LPS aumenta la actividad SA-β-gal a los 3 y 7 días, de manera estadísticamente significativa.

Tabla 2. Resumen de los resultados de los marcadores de senescencia en FC luego del tratamiento con LPS a 3 y 7 días

Marcador	Tratamiento con LPS 3 días	Tratamiento con LPS 7 días
p53	Sin cambios	Sin cambios
P21	Sin cambios	Sin cambios
p16	Sin cambios	Disminuye
p-Rb	Disminuye	Disminuye
γH2A.X	Sin cambios	Sin cambios
p-p38	Sin cambios	Sin cambios
p-NF-κB	Sin cambios	Disminuye
área	Sin cambios	Aumenta
SA-β-gal	Aumenta	Aumenta

6.3 Objetivo específico 3: Caracterizar el perfil de citoquinas del SASP en FC senescentes inducido por LPS

6.3.1 Activación del marcador asociado a la inflamación

En este escenario, se observó (figura 14) que el tratamiento con LPS resultó en un incremento significativo de los niveles de VCAM-1, tanto a los 3 como a los 7 días. No obstante, es notable que el aumento de VCAM-1 en la condición de 3 días fue considerablemente mayor, alcanzando hasta 8 veces en comparación con el grupo de control. En contraste, a los 7 días, el incremento fue más moderado, siendo de aproximadamente 1,5 veces respecto al grupo de control. Estos hallazgos sugieren una respuesta temporal diferencial de VCAM ante la exposición a LPS.

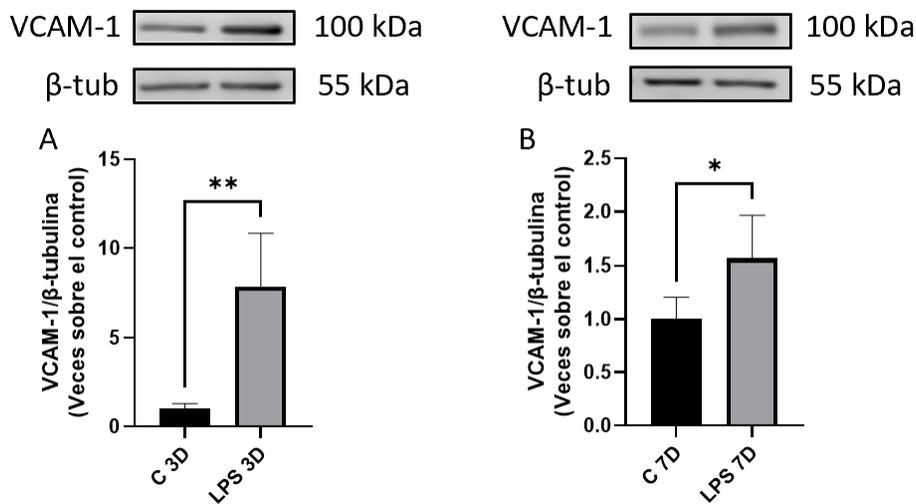


Figura 14. LPS promueve el aumento de la proteína de adhesión VCAM-1 en FC. Se sembraron 350 mil FC de rata adulta, los cuales fueron tratados por 3 y 7 días con LPS (1 μ g/mL) y se determinó los niveles de la proteína VCAM-1. En la figura se muestra la imagen representativa y cuantificación por densitometría estandarizada con respecto a β -tubulina. Los valores corresponden al promedio \pm SD para n=5, siendo analizados por test t-student. * p <0.05 vs C7 **0.001 vs C3.

6.3.2 Perfil de citoquinas del SASP

Como se evidencia en la figura 15, la mayoría de las citoquinas, tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, exhiben un incremento significativo en su secreción para 5D al comparar la condición de control con LPS, con la excepción de la interleucina 5 que si bien tiende a aumentar no alcanza a ser una diferencia significativa. No obstante, al analizar los fibroblastos cultivados durante un período prolongado 9D, no se observan diferencias notables entre el grupo de control y el grupo tratado con LPS.

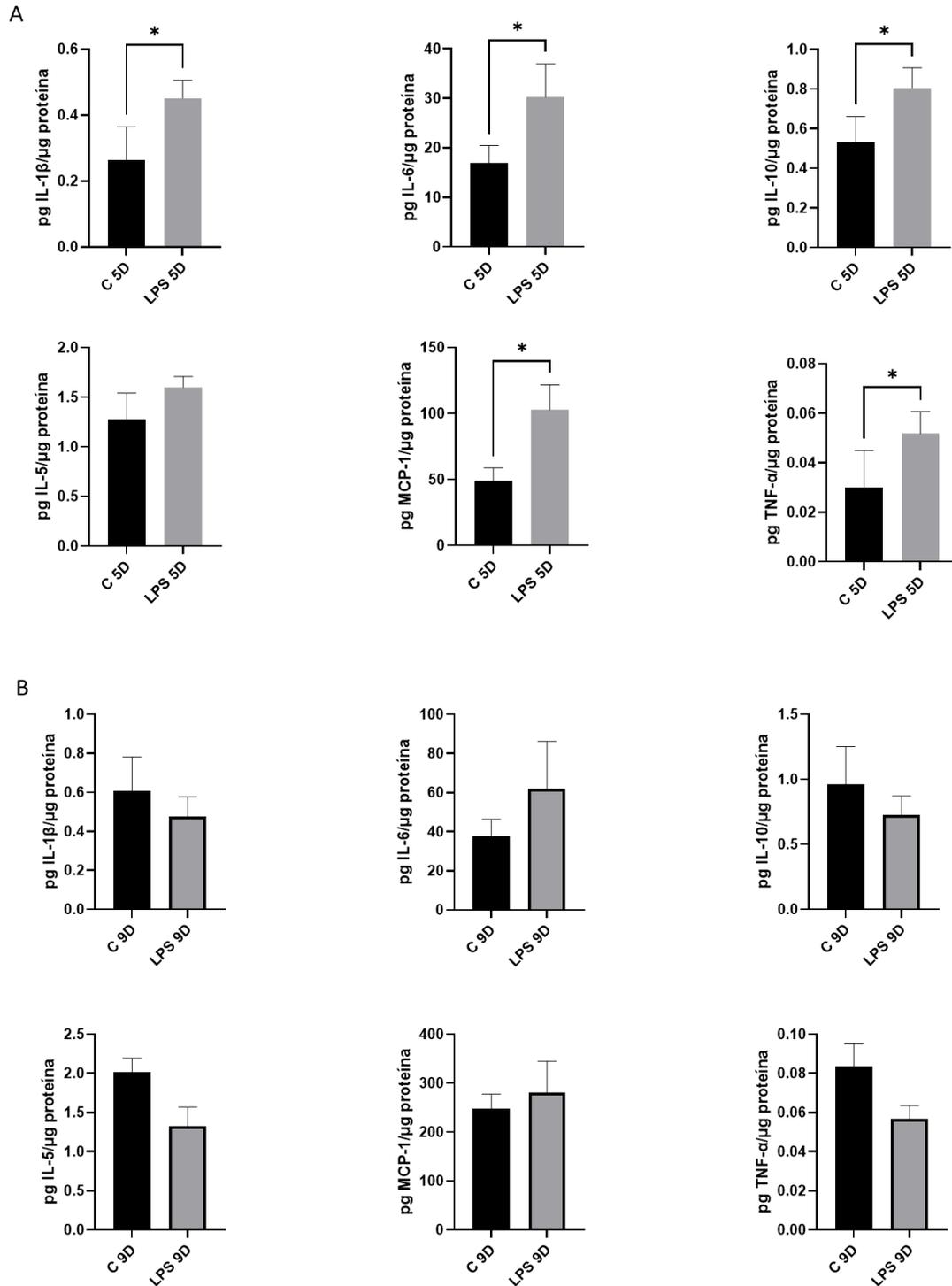


Figura 15. LPS y el tiempo de plaqueo aumentan la secreción y magnitud de citoquinas de FC senescentes. Se sembraron 150 mil (A) y 75 mil (B) FC de rata adulta los cuales fueron tratados con LPS (1 μg/mL) a tiempos de 3 y 7 días respectivamente posterior a tiempo de estímulo se procedió a lavar la placa con PBS 3 veces y cambiar el medio por DMEM-F12 por un tiempo de dos días (5D y 9D), el perfil de citoquinas fue cuantificados por Luminex el valor representado en picogramo de citoquina secretada se encuentra normalizado por μg de proteína que se encontraba en la placa. Los valores corresponden al promedio +/- SD para n=5. Todos los gráficos se analizaron por test t-student. *p<0.05. vs C3.

Resumen Objetivo 3

1. LPS aumenta la expresión de VCAM-1 a los 3 y 7 días de estímulo.
2. LPS aumenta la secreción de citoquinas a los 3 días de estímulo respecto del control.
3. LPS no aumenta la secreción de citoquinas a los 7 días de estímulo respecto del control.
4. EL tiempo de plaqueo aumenta la magnitud en la secreción de citoquinas.

Tabla 3. Resumen de los resultados de los marcadores de SASP en FC luego del tratamiento con LPS a 3 y 7 días.

Marcador	Tratamiento con LPS 3 días + 2 días de secreción	Tratamiento con LPS 7 días + 2 de secreción
VCAM	Aumenta	Aumenta
IL-1B	Aumenta	Sin cambios
IL-6	Aumenta	Sin cambios
TNF-a	Aumenta	Sin cambios
IL-10	Aumenta	Sin cambios
IL-5	Tendencia a aumentar	Sin cambios
MCP-1	Aumenta	Sin cambios

6.4 Objetivo específico 3: Evaluar si RvD1 previene la senescencia inducida por LPS en FC

6.4.1 Determinación de los niveles proteicos del receptor ALX/FPR2.

Se realizaron evaluaciones de los niveles proteicos del receptor ALX/FRP2 con el objetivo de saber si hay cambios en los niveles de expresión en los FC, y discernir posibles estrategias para el uso de RvD1 (Resolvina D1), en caso de que este fuese mayor o menor como consecuencia del tratamiento con LPS. En este trabajo se consideró como estrategia de tratamiento, el uso de RvD1 de manera preventiva. Los resultados mostraron que entre los fibroblastos tratados con LPS y los controles no hubo cambios en los niveles de expresión. Lo anterior indica una relativa estabilidad en los niveles del receptor ALX/FRP2 en ambos grupos. Tras medir los niveles proteicos, no se observaron diferencias significativas entre los fibroblastos cultivados tratados con LPS y sus respectivos controles de tiempo (figura 16).

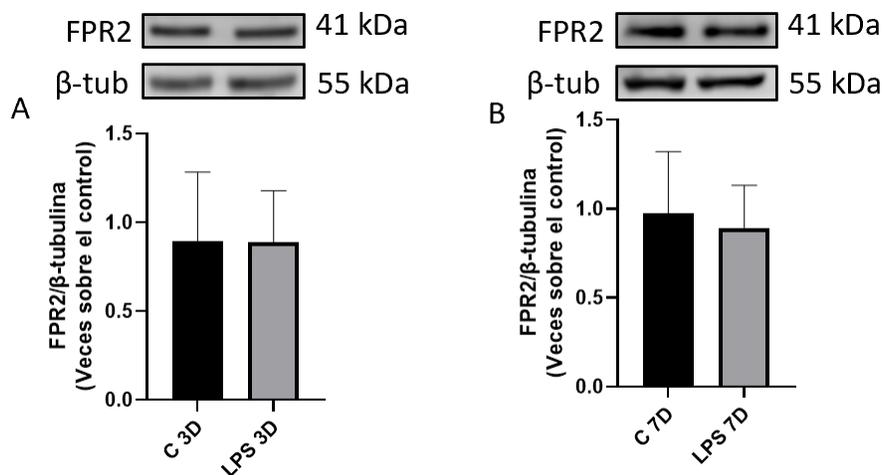


Figura 16. Los niveles proteicos de ALX/FRP2 son constantes en los FC. Se sembraron 350 mil (A) y 200 mil (B) FC de rata adulta, respectivamente. Las células fueron tratadas con LPS (1 μ g/mL) y se determinó, mediante WB, los niveles proteicos de FPR2 a 3 y 7 días. Se muestra la imagen representativa y cuantificación por densitometría estandarizada con respecto a β -tubulina. Los valores corresponden al promedio \pm SD para n=6 (A) y n=4 (B). los gráficos fueron analizados test t-student.

6.4.2 Evaluación de proteína relacionadas con el arresto ciclo celular

Una vez verificado el impacto de LPS en la proteína pRB de los FC, se procedió a evaluar el efecto preventivo de RvD1 sobre los cambios inducidos por LPS. Se observó que tanto los FC del grupo de control temporal como los tratados con LPS mostraron una tendencia similar a lo observado previamente en la sección 6.2.4 para la condición de 5

días. Sin embargo, para la condición de 9 días, no se observaron cambios significativos entre el control y el grupo tratado con LPS. (Figura 17)

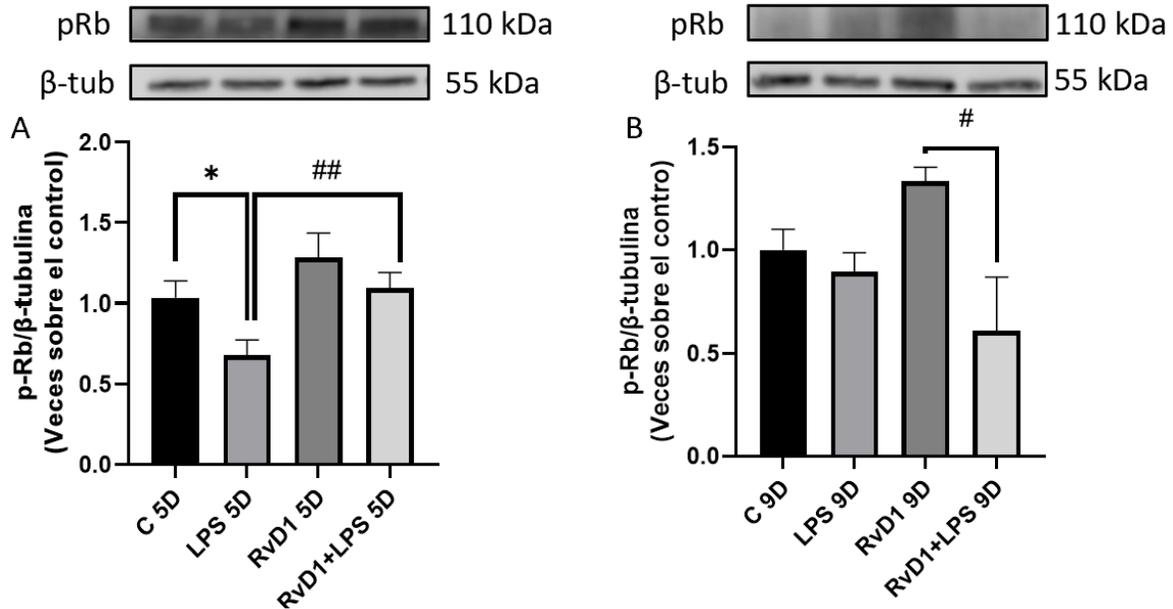


Figura 17. RVD1 mantiene los niveles proteicos de pRB en FC tratados con LPS. Se sembraron 350 mil (A) y 200 mil (B) FC de rata adulta, respectivamente. Las células fueron tratadas con LPS (1 µg/mL) y se determinó, mediante WB, los niveles proteicos de pRB a 5 y 9 días. Se muestra la imagen representativa y cuantificación por densitometría estandarizada con respecto a β-tubulina. Los valores corresponden al promedio +/- SD para n=3 (A) y n=3 (B). los gráficos fueron analizados test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn, *p<0.05, #p<0.05 y ##p<0.001

6.4.3 Cambios morfológicos asociados a senescencia

Al igual que en el objetivo 1, el tratamiento con LPS en la condición de 3 días no mostró una diferencia significativa, pero sí una tendencia al aumento (C3: 11020 µm², LPS3: 12669 µm²), a diferencia de la condición de 7 días, donde nuevamente se produjo un aumento significativo en comparación con su control de tiempo (C7: 14028 µm², LPS7: 18234 µm²), como se muestra en la figura 18. Al examinar el efecto de la Resolvina de manera preventiva antes del tratamiento con LPS, se observa que en ambos casos hay una disminución del tamaño en comparación con el grupo tratado solo con LPS. Sin embargo, solo a los 7 días se logra apreciar una significancia estadística. Esto sugiere que la RvD1 es capaz de revertir la senescencia inducida por LPS, especialmente en la condición de 7 días.

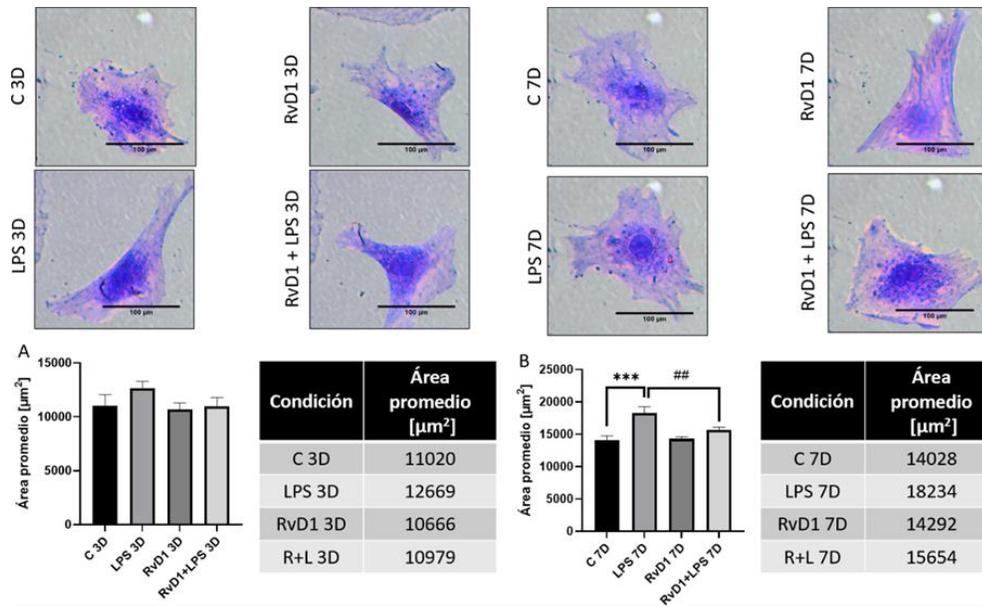


Figura 18. RVD1 atenúa el aumento del área de FC tratados con LPS. Se sembraron 10 mil (A) y 5 mil (B) FC de rata adulta en placas de 12 pocillos (22mm), respectivamente. Las células fueron pretratadas con RvD1 (100 nM) y después de media hora tratadas con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 3 y 7 días posterior a esto se tiñeron y se les determinó el área de forma manual. En A área de condición a 3 días con su respectiva tabla resumen. En B área en la condición a 7 días con su respectiva tabla resumen. Los valores del gráfico A y B corresponden al promedio \pm SD para $n=3$, siendo analizados por test de ANOVA y post test de Dunn, $***p<0.0001$ $##p<0.001$.

6.4.4 Estimación del incremento de actividad SA- β -gal

Una vez comprobado el efecto de LPS sobre la actividad SA- β -gal de los FC, se procedió a evaluar el efecto preventivo de la Resolvina D1 (RvD1) sobre este tratamiento. En este contexto, se observó que tanto los FC del grupo de control de tiempo como los tratados con LPS presentaron la misma tendencia que se observó en el objetivo 1. Como se anticipaba, el uso de RvD1 antes del tratamiento con LPS resultó en una disminución parcial de la actividad SA- β -gal inducida por LPS, y este efecto se observó en ambas condiciones de tiempo estudiadas (figura 19).

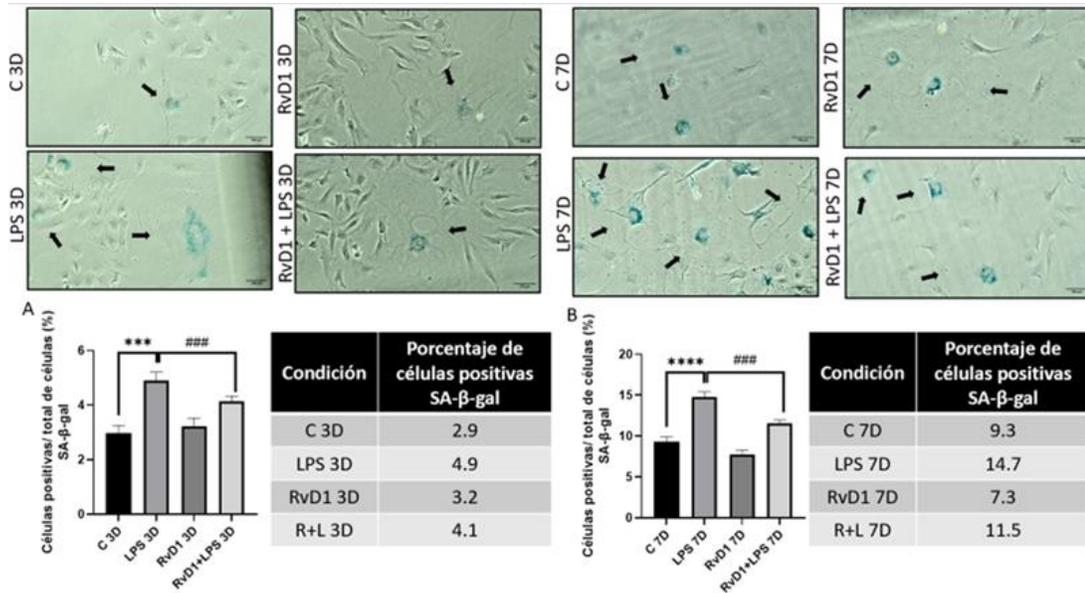


Figura 19. RVD1 atenúa el aumento del porcentaje de células positivas para SA-β-gal de FC tratados con LPS. Se sembraron 10 mil (A) y 5 mil (B) FC de rata adulta en placas de 12 pocillos (22mm), respectivamente. Las células fueron prepretratadas con RvD1 (100 nM) y después de media hora tratadas con LPS (1 μg/mL) por 3 y 7 días posterior a esto se tiñeron y se les determinó el porcentaje de células positivas/total células para SA-β-gal. El conteo fue realizado en forma manual tomando como base aquellas células que fueron 1,5 veces mayor en tamaño que su respectivo control de tiempo y presentaran coloración. En A y B corresponden al porcentaje de células positivas para SA-β-gal para cada condición de tiempo con su respectiva tabla resumen e imágenes representativas. Los valores del gráfico A y B corresponden al promedio +/- SD para n=3, siendo analizados por test de ANOVA y post test de Dunn, ***p<0.001 C3 vs LPS3 ****p<0.0001 C7 vs LPS7 ###p<0.001.

Resumen Objetivo 4

1. Resolvina inhibe la hipofosforilación de RB en la condición de 3 días.
2. Resolvina atenúa el aumento de área a los 7 días inducida por LPS.
3. Resolvina frena el aumento de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia inducida por LPS en ambas condiciones de tiempo.

Tabla 4. Resumen de los resultados de RvD1 sobre los marcadores de senescencia en FC senescentes por 3 y 7 días

Marcador	Tratamiento con RvD1 +LPS 3	Tratamiento con RvD1 +LPS 7
pRB	Aumenta	Disminuye
Área	Sin cambios	Disminuye
SA-β-gal	Disminuye	Disminuye

7. DISCUSIÓN

En esta sección, se discuten los principales resultados obtenidos a lo largo de la investigación. que arrojan luz sobre las interrogantes planteadas al inicio de este estudio. Los datos y hallazgos que se describen a continuación representan el fruto de, metodologías rigurosas y una dedicación constante para abordar los objetivos de la tesis. Cada resultado se considera una pieza fundamental para avanzar en la comprensión de la senescencia celular en los FC, ofreciendo nuevas perspectivas, validando hipótesis y, en última instancia, contribuyendo al cuerpo de conocimientos en este campo. Estos resultados no solo proporcionan respuestas a las incógnitas planteadas, sino que también abren la puerta a nuevas preguntas y posibles direcciones para futuras investigaciones en este emocionante y dinámico campo de investigación.

En la presente sección, se discute sobre el potencial senescente de LPS en el contexto de un modelo in vitro de FC. Los resultados revelaron que LPS indujo la senescencia en los FC, evidenciada por el aumento en la actividad de SA- β -Gal y otros marcadores asociados al proceso senescente (pRb, SASP, p16). La respuesta se caracterizó por tener diferente temporalidad en los cambios de expresión de los distintos marcadores moleculares. Particularmente interesante fue el resultado de que RvD1, un mediador pro-resolutivo de la inflamación, disminuyó la actividad de SA- β -Gal, sugiriendo un potencial terapéutico para abordar la senescencia del FC. Estos hallazgos abren nuevas perspectivas para desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas a mitigar la fibrosis cardiaca y, por ende, mejorar el tratamiento de enfermedades cardiovasculares asociadas a la senescencia del FC.

7.1 Efecto de la concentración de SFB sobre la morfología y viabilidad de FC

La elección estratégica de trabajar en presencia de suero 10% (SFB10%) durante 7 días, se alinea de manera precisa con el objetivo central de la presente investigación, que consiste en, tratar de emular en condiciones de cultivo celular primario, una respuesta más prolongada (tratando de simular una condición de cronicidad en condiciones óptimas de cultivo). Este efecto se midió a través de la actividad SA- β -Gal y SASP inducido por LPS en períodos de tiempo más prolongados.

Los resultados obtenidos en estas mismas condiciones de trabajo, pero a tiempos cortos (3 días), mostraron ser similares a los resultados obtenidos en FC cultivados en SFB1%, en cuanto a la presencia actividad SA- β -Gal [35]. Sin embargo, es fundamental destacar que cuando los FC son cultivados durante periodos prolongados, superiores a tres días, enfrentan dificultades para sobrevivir en condiciones de escasez de nutrientes. En consecuencia, la necesidad de trabajar a tiempos más prolongados exige la presencia de

un suero enriquecido (SFB10%), lo que lo convierte en un elemento esencial para mantener la viabilidad celular en estas circunstancias experimentales.

Es destacable que el SFB 10% aumenta la actividad mitogénica y paralelo a ello mantiene el fenotipo celular menos heterogéneo. Pero también otro efecto asociado al SFB 10% que resulta relevante considerar en el contexto de nuestro modelo experimental es que dicho suero puede incidir en el aumento de la diferenciación de FC hacia MFC [30]. Este fenómeno adquiere importancia en la comprensión global de los resultados obtenidos, ya que la diferenciación celular puede influir en la interpretación de los efectos observados en la senescencia de los FC. Sin embargo, este aspecto específico de la diferenciación FC a MFC se abordará en la siguiente sección de nuestro estudio. Esto se hace con el fin de proporcionar una atención detallada y exhaustiva a este punto particular, considerando su impacto potencial en los resultados generales.

En suma, la decisión metodológica utilizada (SFB 10% por 7 días), se justifica con la necesidad de emular la senescencia en un entorno que simule la cronicidad o de inflamación sostenida y en un medio de cultivo óptimo. Lo anterior proporciona un modelo experimental sólido y replicable para explorar los efectos de la estimulación de la senescencia por periodos prolongados de tiempo.

7.2 Efecto de la inhibición de ALK-5 sobre la morfología y la expresión de α -SMA en cultivo de FC

En el contexto tisular, el proceso de diferenciación de FC a MFC se desencadena como respuesta a estímulos nocivos para el tejido, resultando en una notable acumulación de MFC. Por otro lado, la revisión bibliográfica, destaca que los FC en cultivo, tienden a experimentar autodiferenciación hacia protomiofibroblastos o miofibroblastos cardiacos [36]. Es ampliamente conocido que varios estímulos y entre ellos, la Angiotensina II, inducen la secreción de TGF- β [37], y también es conocido que el estrés mecánico o la rigidez de la matriz extracelular (y en nuestro caso, la placa de cultivo sobre la cual se siembran los FC), también inducen la secreción de TGF- β [38,39]. En consecuencia, es esperable que en nuestra condición de cultivo celular el efecto autocrino del TGF beta secretado por el FC induzca un proceso de autodiferenciación celular, y en este caso pasar de FC a MFC. Un efecto adicional a considerar es el tiempo de cultivo, debido a que a tiempos prolongados de cultivo celular se ha demostrado un mayor estiramiento celular (cellular stretch), lo que lleva a una mayor área superficial. A este respecto, se ha demostrado que el estiramiento

también induce la secreción de TGF- β 1, lo que en cierta forma explica el aumento del área de los FC en función del tiempo, conduciendo a la diferenciación de MFC.

Dada la complejidad y la variabilidad en las respuestas de FC y MFC; y cómo la exposición a nuestro estímulo de interés, el LPS, podría generar efectos distintos en ambos tipos celulares es que se consideró como segunda medida en este trabajo experimental la inhibición de la vía del TGF- β 1, y con ello disminuir al máximo la diferenciación de FC a MFC mediada por el efecto autocrino de este factor de crecimiento. Para llevar a cabo esta tarea, se optó por el uso del inhibidor SB-431542, que como se demostró en los resultados fue capaz de reducir la expresión de α -SMA lo que resulta en una disminución en la autodiferenciación de los FC, lo que sugiere que el uso del inhibidor de ALK-5 no solo disminuyó la activación de los FC por TGF- β , sino que también previno la adquisición del fenotipo característico de los MFC. Este éxito en la estrategia utilizada es particularmente relevante, ya que se espera que el tratamiento con LPS concentre su efecto pro-senescente en FC no autodiferenciados. En relación al efecto de LPS sobre MFC, Bolivar et al., demostraron que el LPS produce la desdiferenciación de MFC a FC [40]. Además, el uso de este inhibidor permitió trabajar con una población celular más homogénea; y en este sentido, se ha descrito que los FC son una población celular bastante heterogénea, por lo tanto, la inhibición de esta transformación, principalmente regulada por TGF- β 1 es un punto central en esta tesis. Al prevenir la adquisición del fenotipo de MFC, el modelo creado con la intervención de SB-431542 permite estudiar de manera más precisa y específica las interacciones moleculares y las señalizaciones involucradas en la senescencia sobre los FC inducida por LPS.

Considerando los aspectos previamente discutidos, la selección del tratamiento farmacológico con el inhibidor de ALK-5, en combinación con el SFB 10%, surge como una elección estratégica para nuestro modelo experimental. Esta decisión se fundamenta en la necesidad de abordar los desafíos relacionados con: a) la supervivencia prolongada de los FC en condiciones de escasez de nutrientes, b) al mismo tiempo, controlar el efecto potencial del SFB 10% en la diferenciación celular, c) obtener un cultivo celular más homogéneo para evaluar el impacto de la senescencia en los FC a lo largo de periodos de 7 días.

7.3 Senescencia celular inducida por LPS en FC cultivados en presencia de SB-431542

Es relevante tener en cuenta que, para este estudio, los FC fueron cultivados en condiciones prometogénicas óptimas. En este contexto, se subraya aún más la importancia del efecto pro-senecente logrado por el LPS, puesto que la detención del ciclo celular (característica esencial de la senescencia celular), se resalta en presencia de condiciones propicias para la proliferación celular [14].

Este estudio ha logrado demostrar de manera concluyente que el LPS induce la activación temprana de las vías de señalización celular, particularmente NF- κ B y p38MAPK. La temporalidad en la activación de NF- κ B y p-p38 sugiere una activación transitoria de estas vías en respuesta al estímulo de LPS, seguida de una disminución en la señalización a medida que progresa el tiempo de exposición a este. En la literatura se ha descrito que estas vías se activan inicialmente por estímulos prosenescentes y, una vez iniciada la senescencia, se desactivan, siendo las proteínas p53, p21 y otras las encargadas de mantener el fenotipo senescente [14] Ahora bien, la fosforilación de NF- κ B induce su translocación nuclear y, posteriormente, la expresión y secreción de diversas citoquinas proinflamatorias que están asociadas al SASP, y que son capaces de mantener la activación de NF- κ B de forma crónica, induciendo la liberación de citoquinas y manteniendo el fenotipo senescente o induciendo senescencia a las células vecinas [41-43].

Recientemente, en nuestro laboratorio, se demostró que en FC cultivados en presencia SFB 1%, LPS induce daño al ADN, evidenciado por los focos positivos de γ H2AX en el núcleo determinado por histoquímica, así como la activación de p53 y p21. Estos efectos fueron evidentes solo a las 24 horas de estímulo, sugiriendo que LPS induce tempranamente el efecto senescente; sin embargo, el breve efecto podría deberse a que los FC pueden tener un mecanismo eficiente de reparación del ADN, el cual podría verse fortalecido y favorecido por los componentes adicionales presentes en el suero. [35]

La diferencia entre este trabajo y otros previos radica en el porcentaje de suero, siendo conocido que este posee elementos que favorecen la proliferación y la reparación celular. Es plausible que los FC, en el control de tiempo, activen algún mecanismo de retroalimentación positiva sobre la vía transduccional, lo que podría explicar la disminución observada en los niveles de p38MAPK en el grupo tratado.

En relación con la condición de 3 días, los resultados obtenidos revelan un patrón distintivo en la respuesta de los FC a la exposición al LPS, enfocándose en dos aspectos claves asociados con la senescencia celular. En primer lugar, se observa un aumento

significativo en la actividad de la SA- β -gal en los FC expuestos a LPS. En segundo lugar, se ha observado una disminución en la fosforilación de la retinoblastoma (pRb) en los FC expuestos a LPS. La fosforilación de pRb es un evento crucial en la regulación del ciclo celular, y su disminución indica un arresto en el ciclo celular de los FC. Este fenómeno es coherente con el proceso de senescencia.

En función de los resultados obtenidos para la condición de 7 días, al igual que para la condición de 3 días, se evidencia un aumento en la actividad SA- β -gal a mayor tiempo, lo que es consecuente con la senescencia inducida por estiramiento mecánico, pero, además, destaca un aumento en el tamaño celular de los FC expuestos a LPS. Este fenómeno podría indicar un proceso de senescencia, ya que las células senescentes a menudo exhiben un aumento en el tamaño y un fenotipo más aplanado, como consecuencia de un estado metabólico estable en el que no hay proliferación, y en la que la actividad metabólica lleva al aumento del área celular [44].

Adicionalmente, se observa una reducción en los niveles de p16. Se ha demostrado que la p16 regula la fosforilación Rb, actuando como un factor clave en la modulación de este proceso celular. La proteína p16, al inhibir la actividad de las quinasas dependientes de ciclina asociadas a Rb, desempeña un papel crucial en la regulación negativa de la fosforilación de Rb. Este hallazgo sugiere que p16, al actuar río arriba en la cascada de señalización, ejerce un control significativo sobre la actividad del retinoblastoma, lo que puede tener implicaciones importantes en el contexto de la senescencia celular. En este mismo sentido, se ha demostrado que la activación tardía de p16 es suficiente para mantener la senescencia [40]. Estos resultados respaldan la interpretación de que la exposición a LPS induce senescencia, la que está asociada a la activación de las vías p38MAPK y NF- κ B. A este respecto, recientemente en nuestro laboratorio se demostró que los FC cultivados en presencia de SFB1% y estimulados con LPS inducen senescencia a través de estas vías transducciones, puesto que se demostró que la inhibición de ambas vías impide la senescencia inducida por LPS [45]. Las diferencias entre ambos trabajos corresponden a) al tiempo de estímulo 3 y 7 días y b) el medio de SFB1% vs SFB10% + SB431542.

Con respecto a pRb, es crucial acentuar que las células se encuentran en un medio altamente mitogénico, lo que hace aún más destacable la disminución de la fosforilación del retinoblastoma. A pesar de estar expuestas a un entorno propicio para la proliferación celular debido a su naturaleza mitogénica, **los resultados revelan que los FC**

experimentan un claro arresto en el ciclo celular, característica distintiva de la senescencia celular, proporciona una valiosa perspectiva sobre el impacto del tratamiento LPS en los FC. La asociación positiva entre el aumento en los niveles de p53/p21 y p16 y la posible inducción de la senescencia refleja una respuesta celular específica ante el estímulo, indicando la activación de mecanismos de detención del ciclo celular en concordancia con el estado senescente [42-43].

El incremento en el tamaño celular detectado en nuestras observaciones puede interpretarse como un fenómeno progresivo, sugiriendo una conexión entre la diferenciación de FC a MFC y la senescencia de los FC, ambos desencadenados por el estrés mecánico bajo las condiciones experimentales [46-48]. Es importante destacar que investigaciones previas de nuestro laboratorio revelaron la capacidad del LPS para desdiferenciar y revertir la diferenciación de los MFC hacia el fenotipo de FC, aportando así una explicación plausible para la disminución en el área promedio observada en esta condición específica [36].

Es importante resaltar estos hallazgos puesto que la complejidad de la respuesta celular ante el tratamiento con LPS, donde la dualidad entre la inducción de senescencia y la diferenciación de MFC a FC, podrían estar interrelacionados, y el aumento en el tamaño celular podría estar vinculado tanto a la progresión de la diferenciación como a la senescencia inducida por el estrés mecánico [37,39]. La capacidad del LPS para modular la desdiferenciación celular agrega una capa adicional de complejidad a la interpretación de los resultados y destaca la necesidad de considerar los procesos diferenciales en conjunto con los eventos senescentes.

Asimismo, la observación de que el aumento en la tinción de SA- β -gal está influenciado no solo por el estímulo aplicado, sino también por el tiempo de permanencia de los fibroblastos en placa, subraya la importancia de tener en cuenta la temporalidad en la interpretación de los resultados. Este fenómeno sugiere que, aunque el LPS tiene un efecto discernible en este marcador, los controles de tiempo podrían estar experimentando procesos capaces de enmascarar parcialmente dicho efecto, lo cual podría extenderse a otros marcadores analizados [35,37,44]. Este aspecto temporal agrega una capa de complejidad a la interpretación de los resultados y destaca la necesidad de considerar la evolución de las respuestas celulares a lo largo del tiempo en estudios de este tipo.

En relación con la senescencia inducida por la rigidez de la placa de cultivo, se ha corroborado que la matriz rígida puede desencadenar la senescencia celular [39]. Este hallazgo sugiere que las superficies convencionales de cultivo celular no están óptimamente diseñadas para la generación de células altamente secretoras y no senescentes. Un estudio abordó esta problemática mediante el uso de sustratos de hidrogel de poli(etilenglicol) con propiedades mecánicas y bioquímicas ajustables. En este estudio, se emplearon sustratos de hidrogel que exhiben una rigidez de 30 kPa independientemente de su funcionalización bioquímica, para evaluar su impacto en la secreción de factores inmunomoduladores y regenerativos en células mesenquimales. Los resultados demostraron que las células cultivadas en hidrogeles de 30 kPa mejoraron significativamente la secreción de estos factores en comparación con las superficies plásticas más rígidas de 100 kPa o las utilizadas en cultivos de tejidos. Sin embargo, estas superficies de 30 kPa no respaldaron una proliferación robusta.

En contraste, el cultivo en superficies de hidrogel de 100 kPa promovió la proliferación a niveles similares a las superficies plásticas estándar de cultivo de tejidos, sin alterar sustancialmente la cantidad de factores secretados. Además, el cultivo en serie en superficies de hidrogel RGD de 100 kPa redujo significativamente la senescencia en las células madre mesenquimales (MSC) en comparación con el plástico de cultivo de tejidos. Aunque se observó una disminución en la senescencia, estas células mantuvieron la capacidad de mejorar su perfil secretor en respuesta a las superficies de 30 kPa. En consecuencia, estos sustratos de hidrogel, con una rigidez de órdenes de magnitud menor que las superficies convencionales de plástico de cultivo de células, se presentan como promisorios para la reducción de la senescencia inducida por estrés mecánico [48,49]. Este resultado se alinea con las observaciones realizadas en nuestras condiciones de cultivo, donde hemos notado un incremento en el número de células positivas para SA- β -gal en las células de control (sin estímulos) a medida que se prolonga el tiempo de cultivo. Este fenómeno se atribuye principalmente a la rigidez constante de la placa de cultivo y al estrés mecánico.

7.4 Caracterización del SASP inducido con LPS en FC cultivados en presencia de SB-431542

La caracterización del SASP emerge como una herramienta esencial para corroborar la adopción de un fenotipo senescente en una población celular específica. Este

proceso implica típicamente la medición y evaluación de diversas moléculas secretadas por células senescentes, abarcando citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y metaloproteinasas (MMPs).

VCAM-1, también conocida como molécula de adhesión celular vascular-1, es expresada en la superficie de los FC, y es activada en respuesta a señales inflamatorias. Por esta razón, se evaluaron los niveles proteicos de VCAM-1, ya como parte de la respuesta inflamatoria, característica del SASP [50,51]. Los resultados obtenidos para la expresión de VCAM-1 para ambas condiciones de tiempo de tratamiento con LPS fueron significativa respecto al control, lo cual podría ser indicativo de que se está gestando una amplia respuesta inflamatoria. Pero es importante resaltar que en la condición de 7 días no se observa una expresión tan marcada como en los 3 días, lo que podría indicar que a tiempo prolongado el estrés por mecanotransducción aumenta la secreción basal, lo que podría enmascarar lo secretado bajo el estímulo del LPS.

En función a las citoquinas llama la atención lo sucedido en la condición de 9 días, ya que, como se evidenció no existe una diferencia entre el grupo control y el LPS. A este respecto, existen evidencias de que la respuesta celular, al menos en términos de secreción de citoquinas, es más enérgica a tiempos tempranos, pudiendo estabilizarse o atenuarse con el paso del tiempo; en consecuencia, lo observado a tiempos largos (9 días), es el reflejo de una secreción basal aumentada como consecuencia de la senescencia basal inducida por estiramiento mecánico, lo que enmascara lo secretado bajo el estímulo del LPS. También es posible que frente a una exposición más prolongada al LPS se atenúe la secreción de las citoquinas. Sin embargo, es importante resaltar que, aunque no se observaron diferencias en la condición de 9 días entre los grupos de control y LPS, existe un aumento general en la magnitud de la secreción de todas las citoquinas en comparación con los datos obtenidos de la condición de 5 días. Estos hallazgos apuntan a la complejidad de la respuesta celular a lo largo del tiempo y sugieren que la duración del tratamiento puede modular la magnitud de la respuesta observada. Además, resaltan la importancia de considerar la posible influencia del estrés mecánico en la secreción basal, lo que podría tener implicaciones significativas al interpretar los resultados y diseñar enfoques terapéuticos potenciales.

Los resultados obtenidos a los 5 días en nuestro estudio, presenta concordancia con investigaciones previas, específicamente con los resultados obtenidos por Espinoza y

Espitia (26,46), en los que se observó secreción de citoquinas inducida por LPS, la que fue mayormente secretada a tiempos tempranos. Con respecto a lo sucedido a los 5 y 9 días es crucial señalar las particularidades de nuestro protocolo, las cuales distinguen nuestro enfoque de los estudios previos.

En contraste con los protocolos previos, nuestra investigación se extendió en el tiempo para evaluar de manera más completa las respuestas de los FC. Este enfoque temporal nos llevó a emplear suero como medio de cultivo para evitar que los FC entraran en autofagia debido a la posible falta de nutrientes. La inclusión de suero prolongó la estadía de los FC en placa, ya que fue necesario realizar lavados PBS en los días 3 y 7 eliminando el suero y con ello todo lo secretado desde el inicio del experimento. Posteriormente, se adicionó DMEM-F12 y se dejaron durante dos días adicionales para permitir la secreción de citoquinas. Por lo tanto, los resultados obtenidos reflejan lo secretado en estos dos días, considerando que inicialmente es donde existe una mayor secreción de las citoquinas y estas fueron eliminadas. Por lo tanto, es importante destacar que la secreción corresponde en su mayoría a lo secretado por las células senescentes por lo que este resultado es importante como caracterización del perfil de citoquinas o SASP; aunque esta secreción puede estar enmascarada por la secreción debida al estrés mecánico otorgada por las condiciones de cultivo celular (rigidez de la placa de cultivo). Esta modificación en el protocolo se diseñó para capturar de manera más precisa las respuestas celulares y las secreciones de citoquinas en un contexto temporal extendido. Aunque introduce variaciones con respecto a estudios anteriores, proporciona una perspectiva más completa de la dinámica de los FC senescentes. Es esencial considerar estas particularidades al interpretar y comparar los resultados, reconociendo que la variabilidad temporal puede influir en las respuestas observadas.

Este fenómeno añade complejidad a la dinámica de la respuesta celular, sugiriendo que la influencia del LPS en la secreción de citoquinas no solo depende de su presencia, sino también del tiempo que los fibroblastos permanecen en la placa. Este aspecto temporal puede tener implicaciones significativas en la interpretación de los resultados y en la comprensión más profunda de los mecanismos subyacentes a la respuesta.

7.5 Efecto de la RvD1 en la prevención de la senescencia celular inducida por LPS en FC cultivados en presencia de SB-431542.

El presente estudio se suma a investigaciones anteriores llevadas a cabo en nuestro laboratorio, que han evidenciado la presencia del receptor ALX/FPR2 en los FC [52]. Los resultados obtenidos en relación con los niveles de este receptor corroboran lo que se había descrito previamente en la literatura científica. Este hallazgo es crucial, ya que proporciona una base sólida para comprender la respuesta de los FC a ciertos compuestos, como las resolvinas.

En cuanto a los efectos de la RvD1, los resultados de nuestro estudio revelan un impacto significativo en la disminución de la senescencia en FC senescentes. Esta disminución se evidencia tanto por la reducción de la actividad SA- β -gal como por la disminución del tamaño celular, además de un aumento en la fosforilación del retinoblastoma. Estos hallazgos respaldan y amplían investigaciones previas que destacaron el efecto preventivo de RvD1 en la senescencia celular, particularmente en fibroblastos de diferentes tipos [53-55].

Si bien la literatura científica ya había informado sobre el efecto preventivo de RvD1 en la senescencia inducida por H₂O₂ y otros estímulos en diferentes tipos celulares, este estudio presenta una novedad al demostrar que RvD1 puede prevenir eficazmente la senescencia inducida por LPS en FC, especialmente en tiempos prolongados. Este hallazgo amplía la comprensión de los posibles beneficios terapéuticos de las resolvinas en condiciones inflamatorias y en el contexto de enfermedades cardíacas.

En consonancia con otros estudios, donde se demostró el efecto preventivo de análogos de resolvinas (como RvE1), en la inducción de senescencia en diferentes células, nuestros resultados subrayan la capacidad de RvD1 para prevenir la senescencia en FC. Además, se destaca la relación entre las resolvinas y la resolución de la inflamación, respaldando la idea de que estos lípidos especializados poseen una potente actividad antiinflamatoria.

Adicionalmente, los resultados de Zeng et al. (2022) [56] en un modelo de fibrosis intestinal sugieren un efecto antifibrótico de la RvD1. Estos hallazgos refuerzan la idea de que las resolvinas podrían ser agentes terapéuticos prometedores en el tratamiento de condiciones asociadas a la inflamación y la fibrosis, abriendo nuevas perspectivas para futuras investigaciones y aplicaciones clínicas.

8. CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas de esta investigación son las siguientes:

- La inhibición de la ALK-5 con el compuesto SB-431542 demostró un efecto inhibitorio directo sobre la diferenciación de FC a MFC, contribuyendo así a mantener la forma característica de los FC.
- LPS activa las vías NF- κ B y/o p38MAPK.
- La exposición a LPS por 3 días induce senescencia celular, evidenciada por el aumento de la actividad SA- β -gal y un arresto del ciclo celular evidenciado por la hipofosforilación del retinoblastoma.
- La exposición a LPS por 7 días induce senescencia celular, evidenciada por el aumento de la actividad SA- β -gal y aumento en el tamaño celular, además de un arresto del ciclo celular evidenciado por la hipofosforilación del retinoblastoma y el aumento de p16.
- Los resultados obtenidos revelan de manera inequívoca que los FC, al experimentar senescencia inducida por LPS, exhiben un perfil distintivo de citoquinas asociado al SASP.
- La resolvina D1 previene el aumento de la actividad SA- β -gal inducido por LPS en FC cultivados en presencia de SB-431542, sugiriendo un potencial efecto protector contra la senescencia inducida por LPS.

9. LIMITACIONES

1. Aunque los modelos de cultivo celular son útiles para estudiar procesos celulares, su traslación a eventos in vivo es compleja. Las limitaciones para su traslación al modelo in vivo incluyen: a) un entorno simplificado que no refleja la complejidad tridimensional in vivo, b) la ausencia del microambiente fisiológico, c) la falta de diversidad celular en comparación con tejidos in vivo, d) la brevedad de

muchos experimentos en cultivos celulares frente a procesos biológicos más prolongados, y e) respuestas celulares diferentes debido a que la matriz de cultivo celular (poliestireno) muestra una rigidez suprafisiológica respecto de la rigidez del tejido cardíaco. las células en cultivo la matriz extracelular.

2. Otras limitaciones son no haber realizado otros experimentos para complementar los hallazgos, entre ellos, proliferación (que complementaría la detención irreversible del ciclo celular, el utilizar fármacos senolíticos para inducir apoptosis de las células senescentes, el haber determinado el mecanismo por el cual la RvD1 disminuye el número de FC senescentes.

3. Otra limitación importante está relacionada con el número insuficiente de experimentos realizados. La cantidad limitada de ensayos puede haber influido en la falta de significancia estadística en algunos resultados, especialmente en aquellos donde se evaluó el efecto de la RvD1. Un mayor número de repeticiones podría haber contribuido a obtener resultados más robustos y confiables.

Es crucial reconocer estas limitaciones al interpretar los hallazgos de la investigación, ya que afectan la generalización de los resultados y la solidez de las conclusiones. Futuros estudios con un diseño experimental más extenso y considerando diferentes condiciones de cultivo podrían abordar estas limitaciones y proporcionar una comprensión más completa del proceso de senescencia en los FC.

10. PROYECCIONES

Estudio en Modelos de Hidrogeles: Una proyección clave es replicar este estudio utilizando modelos de hidrogeles los que se caracterizan por presentar baja rigidez y acercarse a una rigidez tisular fisiológica. Esto permitiría disminuir la mecano-transducción inherente al cultivo en 2D, proporcionando un ambiente más fisiológico para evaluar la respuesta de los FC. Este enfoque podría revelar patrones de comportamiento distintos y más representativos de las condiciones in vivo.

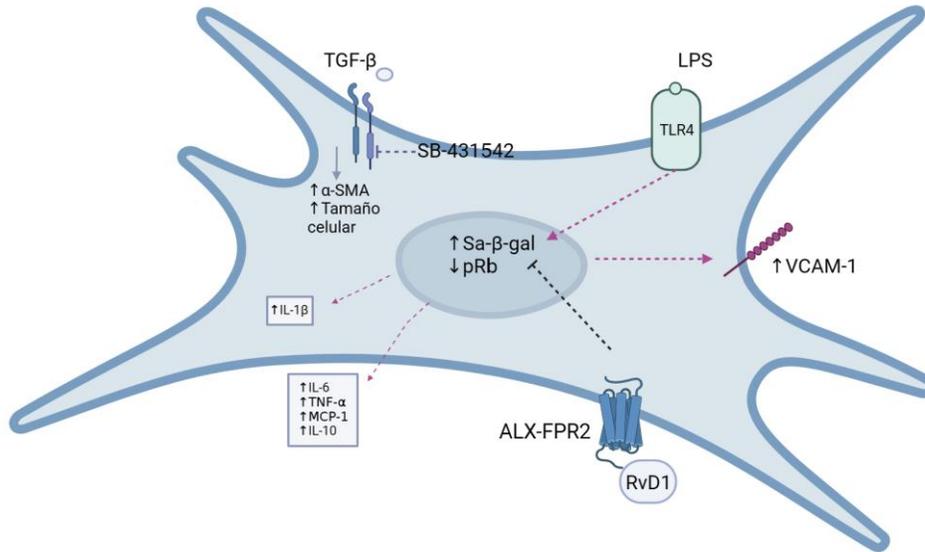
Estudios In Vivo: Para obtener una comprensión más integral y aplicable a condiciones fisiológicas, se sugiere llevar a cabo estudios in vivo. Este enfoque permitiría evaluar la efectividad del tratamiento RvD1 en un contexto más complejo y relevante para las condiciones reales del organismo, minimizando la interferencia de las condiciones de cultivo in vitro.

Clarificación de Receptores y Mecanismos: A pesar de los resultados prometedores de RvD1, se destaca la necesidad de esclarecer con precisión los mecanismos moleculares

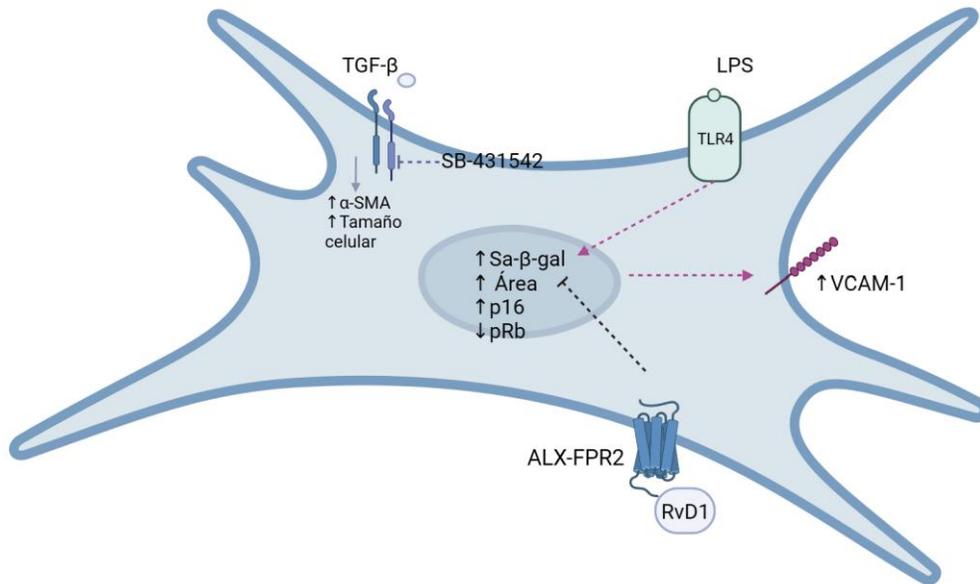
involucrados en estos efectos. Esta clarificación es crucial para comprender completamente cómo estos tratamientos revierten la senescencia de los FC y para diseñar estrategias terapéuticas más específicas.

En resumen, estas proyecciones apuntan a ampliar y mejorar la comprensión de los procesos estudiados, optimizando las condiciones experimentales y avanzando hacia aplicaciones más clínicas y relevantes.

11. ESQUEMA RESUMEN



Modelo propuesto en FC no autodiferenciados por inhibición de ALK5 (TGF-βRI). La activación del receptor TLR4 por su ligando (LPS) estimulado por un tiempo de 3 días exhibe una disminución de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma, un aumento de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia, además de aumentar la expresión de VCAM y manifestar un SASP proinflamatorio. El efecto de la activación del receptor ALX-FPR2 por Resolvina previo al estímulo con LPS atenuó la hipofosforilación del pRb y el aumento de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia.



Modelo propuesto en FC no autodiferenciados por inhibición de ALK5 (TGF-βRI). La activación del receptor TLR4 por su ligando (LPS) estimulado por un tiempo de 7 días exhibe una disminución de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma, un aumento del área celular y la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia, además de aumentar la expresión de VCAM y p16. El efecto de la activación del receptor ALX-FPR2 por Resolvina previo al estímulo con LPS atenuó el aumento del área celular y la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Mensah, G A et al. "The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors: 2020 and Beyond." *Journal of the American College of Cardiology* vol. 74,20 (2019): 2529-2532. doi:10.1016/j.jacc.2019.10.009.
2. Mandviwala, T et al. "Obesity and Cardiovascular Disease: a Risk Factor or a Risk Marker?." *Current atherosclerosis reports* vol. 18,5 (2016): 21. doi:10.1007/s11883-016-0575-4.
3. Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther.* 2009 Aug;123(2):255-78. doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.05.002. Epub 2009 May 19. PMID: 19460403.
4. Hu, C et al. "Cellular Senescence in Cardiovascular Diseases: A Systematic Review." *Aging and disease* vol. 13,1 103-128. 1 Feb. 2022, doi:10.14336/AD.2021.0927.
5. North, B, Sinclair, D. "The intersection between aging and cardiovascular disease." *Circulation research* vol. 110,8 (2012): 1097-108. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.246876
6. Sarah, C et al. "Ageing, metabolism and cardiovascular disease." *The Journal of physiology* vol. 594,8 (2016): 2061-73. doi:10.1113/JP270538.
7. López-Otín, C et al. "Hallmarks of aging: An expanding universe." *Cell* vol. 186,2 (2023): 243-278. doi:10.1016/j.cell.2022.11.001.
8. Osorio, J, Espinoza-Pérez, C; et al. Senescent cardiac fibroblasts: A key role in cardiac fibrosis, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, (2023) 166642. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2023.166642>.

9. Paneni, F et al. "The Aging Cardiovascular System: Understanding It at the Cellular and Clinical Levels." *Journal of the American College of Cardiology* vol. 69,15 (2017): 1952-1967. doi:10.1016/j.jacc.2017.01.064.
10. 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.
11. Hernandez-Segura, A., Nehme, J., Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence *Trends in Cell Biology*, 28, 436-453.
12. Vivar, R, et al. "FoxO1 mediates TGF-beta1-dependent cardiac myofibroblast differentiation." *Biochimica et biophysica acta* vol. 1863,1 (2016): 128-38. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.10.019.
13. Cho, S, Seong-Hwang, E. "Status of mTOR activity may phenotypically differentiate senescence and quiescence." *Molecules and cells* vol. 33,6 (2012): 597-604. doi:10.1007/s10059-012-0042-1.
14. Liao, J et al. "Dexmedetomidine Promotes Lipopolysaccharide-Induced Differentiation of Cardiac Fibroblasts and Collagen I/III Synthesis through α 2A Adrenoreceptor-Mediated Activation of the PKC-p38-Smad2/3 Signaling Pathway in Mice." *International journal of molecular sciences* vol. 22,23 12749. 25 Nov. 2021, doi:10.3390/ijms222312749.
15. Chen, M.S., Lee, R.T., Garbern, J.C. (2021). Senescence mechanisms and targets in the heart. *European Society of Cardiology*, 0, 1–15.
16. Pardo-Andreu, G., Delgado-Hernández, R. (2003) Senescencia celular y envejecimiento. Universidad Camagüey. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 1561-3011.

17. Aránguiz-Urroz P, Canales J, Copaja M, Troncoso R, Vicencio JM, Carrillo C, Lara H, Lavandero S, Díaz-Araya G. Beta(2)-adrenergic receptor regulates cardiac fibroblast.
18. Landry N, Rattan S, Dixon I, An improved method of maintaining primary murine cardiac fibroblasts in two-dimensional cell culture, *Sci Rep.* 9(1) (2019) 12889. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49285-9>.
19. Aranguiz-Ulloa, P; et al. autophagy and collagen degradation. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Jan;1812(1):23-31. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.07.003. Epub 2010 Jul 15. PMID: 20637865.
20. Rajendran P, Alzahrani AM, Hanieh HN, Kumar SA, Ben Ammar R, Rengarajan T, Alhoot MA. Autophagy and senescence: A new insight in selected human diseases. *J Cell Physiol.* 2019 Dec;234(12):21485-21492. doi: 10.1002/jcp.28895. Epub 2019 May 29. PMID: 31144309.
21. Campo-Trapero, J., Cano-Sánchez, J., López-Durán, M., Palacios-Sánchez, B., Sánchez-Gutierrez, J., Bascones-Martínez, A. (2007) Marcadores de senescencia celular en cáncer y precáncer oral. *AVANCES EN ODONTOESTOMATOLOGÍA*, 69-80.
22. Kumari, R; Parmjit J. "Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype." *Frontiers in cell and developmental biology* vol. 9 645593. 29 Mar. 2021, doi:10.3389/fcell.2021.645593.
23. Maciel-Barón, L., Pérez, V., Torres, C., González-Puertos, V., Konigsberg, M., López-Diazguerrero, N. (2017). La senescencia celular como denominador

común de enfermedades asociadas a la edad. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Ciudad de México, 55, 490-497.

24. Salas-Hernández, A. V. (2020). Efectos de resolvina D1 sobre la respuesta inflamatoria inducida por angiotensina II y lipopolisacárido en fibroblastos cardiacos de rata adulta.
25. Salminen, A., Kauppinen, A., Kaarniranta, K. (2012). Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cellular Signalling*, 4, 835-845.
26. Debacq-Chainiaux, F., Boilan, E., Dedessus, J., Moutier, L., Weemaels, G., Toussaint, O. (2010). p38MAPK in the Senescence of Human and Murine Fibroblasts. *Protein Metabolism and Homeostasis in Aging*, 10, 126–137.
27. Lagoumtzi, S. M., & Chondrogianni, N. (2021). Senolytics and senomorphics: Natural and synthetic therapeutics in the treatment of aging and chronic diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 171, 169-190.
28. Gu, Z., Lamont, G.J., Lamont, R.J., Uriarte, S.M., Wang, H., Scott, D.A., (2016) Resolvin D1, resolvin D2 and maresin 1 activate the GSK3 β anti-inflammatory axis in TLR4-engaged human monocytes, *Innate Immun.* 22(3) 186-195.
29. Espinoza, C. Efecto de resolvinas D1 y E1 sobre la expresión de factores proinflamatorios en fibroblastos cardiacos. Memoria de título (Título Químico farmacéutico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2019.
30. 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 resolution of inflammation in rat cardiac fibroblast in vitro, Mol Biol Rep. 48(1) 57-66.

31. Muñoz-Rodríguez, C, et al. "Expression and function of TLR4- induced B1R bradykinin receptor on cardiac fibroblasts." Toxicology and applied pharmacology vol. 351 (2018): 46-56. doi:10.1016/j.taap.2018.05.011.

32. 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." Journal of molecular and cellular cardiology, S0022-2828(16)30392-3. 27 Oct. 2016, doi:10.1016/j.yjmcc.2016.10.014.

33. Hernandez-Segura, A; et al. "Hallmarks of Cellular Senescence." Trends in cell biology vol. 28,6 (2018): 436-453. doi:10.1016/j.tcb.2018.02.001.

34. Koji, I; et al. "Colorimetric detection of senescence-associated β galactosidase." Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) vol. 965 (2013): 143-56. doi:10.1007/978-1-62703-239-1_8.

35. Osorio, J. Senescencia de fibroblastos cardiacos de rata adulta inducida por LPS: Efecto de Resolvina D1 y el desafío de la autodiferenciación. Tesis (Doctorado en farmacología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2023.

36. Tomasek, James & Gabbiani, Giulio & Hinz, Boris & Chaponnier, Christine & Brown, Robert. (2002). Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RAMyofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. Nat

Rev Mol Cell Biol 3:349-363. Nature reviews. Molecular cell biology. 3. 349-63. 10.1038/nrm809.

37.A. Angelini, J.A. Trial, J. Ortiz-Urbina, K.A. Cieslik, Mechanosensing dysregulation in the fibroblast: A hallmark of the aging heart, Ageing Res Rev. 63 (2020) 101150. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101150>.

38.Somayeh, S; et al. "Pivotal Role of TGF- β /Smad Signaling in Cardiac Fibrosis: Non-coding RNAs as Effectual Players." Frontiers in cardiovascular medicine vol. 7 588347. 25 Jan. 2021, doi:10.3389/fcvm.2020.588347.

39.Gilles, G; et al. "Maintaining resting cardiac fibroblasts in vitro by disrupting mechanotransduction." PloS one vol. 15,10 e0241390. 26 Oct. 2020, doi:10.1371/journal.pone.0241390.

40.Bolívar, S. Santana R, Ayala, P. Landaeta, R. Boza, P. Humeres, C et al, Lipopolysaccharide activates toll-Like receptor 4 and prevents cardiac fibroblast-to-myofibroblast differentiation, Cardiovasc Toxicol. 17(4) (2017) 458–470. <https://doi.org/10.1007/s12012-017-9404-4>.

41.Shibamoto, M; et al. "Activation of DNA Damage Response and Cellular Senescence in Cardiac Fibroblasts Limit Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction." International heart journal vol. 60,4 (2019): 944-957. doi:10.1536/ihj.18-701.

42.Feng, G; et al. "Repeated stimulation by LPS promotes the senescence of DPSCs via TLR4/MyD88-NF- κ B-p53/p21 signaling." Cytotechnology vol. 70,3 (2018): 1023-1035. doi:10.1007/s10616-017-0180-6.

43.Shi, J; et al. "P16ink4a overexpression ameliorates cardiac remodeling of mouse following myocardial infarction via CDK4/pRb pathway." Biochemical and

biophysical research communications vol. 595 (2022): 62-68.
doi:10.1016/j.bbrc.2022.01.077.

44. Tominaga, Tadasuke et al. "Senescence-associated- β -galactosidase staining following traumatic brain injury in the mouse cerebrum." PloS one vol. 14,3 e0213673. 11 Mar. 2019, <http://doi:10.1371/journal.pone.0213673>
45. Vallejos, M. LPS induce senescencia en fibroblastos cardiacos de rata a través de la vía de p38 y NF-kB. Memoria de título (Título Químico Farmacéutico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2023.
46. S. Ferrari, M. Pesce, Stiffness and aging in cardiovascular diseases: The dangerous relationship between force and senescence, Int J Mol Sci. 22(7) (2021) 3404. <https://doi.org/10.3390/ijms22073404>.
47. Q. Yin, N. Xu, D. Xu, M. Dong, X. Shi, Y. Wang, et al, Comparison of senescence-related changes between three- and two-dimensional cultured adipose-derived mesenchymal stem cells, Stem Cell Res Ther. 11(1) (2020) 226. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01744-1>.
48. Felisbino, M. et al. Substrate stiffness modulates cardiac fibroblast activation, senescence and proinflammatory secretory phenotype (2023) <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00483.2023>
49. Ogle M, Doron G, Levy M, Temenoff J. Hydrogel Culture Surface Stiffness Modulates Mesenchymal Stromal Cell Secretome and Alters Senescence. Tissue Eng Part A. 26(23-24) (2020) 1259–1271. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2020.0030>.

50. A.V. Borodkina, P.I. Deryabin, A.A. Giukova, N.N. Nikolsky, "Social life of senescent cells: What is SASP and why study it? *Acta Naturae*. 10(1) (2018) 4-14. PMID: 29716514.
51. S. Yasuda, M. Horinaka, Y. Iizumi, W. Goi, M. Sukeno, T. Sakai, Oridonin inhibits SASP by blocking p38 and NF- κ B pathways in senescent cells, *Biochem Biophys Res Commun*. 590 (2022) 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.12.098>.
52. Espitia-Corredor, Jenaro A et al. "Resolvin E1 attenuates doxorubicin-induced cardiac fibroblast senescence: A key role for IL-1 β ." *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* vol. 1868,11 (2022): 166525. doi:10.1016/j.bbadis.2022.166525
53. Li, J; et al. "Resolvin D1 mitigates non-alcoholic steatohepatitis by suppressing the TLR4-MyD88-mediated NF- κ B and MAPK pathways and activating the Nrf2 pathway in mice." *International immunopharmacology* vol. 88 (2020): 106961. doi:10.1016/j.intimp.2020.106961.
54. Kang, J., Lee, S. Resolvin D1 protects the liver from ischemia/reperfusion injury by enhancing M2 macrophage polarization and efferocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1861: 1025-1035. 2016.
55. Yin, Y., et al. Resolvin D1 inhibits inflammatory response in STZ-induced diabetic Retinopathy rats: Possible involvement of NLRP3 inflammasome and NF- κ B signaling pathway. *Molecular Vision*. 23: 242-250. 2017
56. Zeng C, Liu X, Xiong D, Zou K, Bai T. Resolvin D1 Prevents Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Reduces Collagen Deposition by Stimulating Autophagy in Intestinal Fibrosis. *Dig Dis Sci*. 2022 Oct;67(10):4749-4759. doi: 10.1007/s10620-021-07356-w. Epub 2022 Jan 10. PMID: 35013877.