



**Papel de la adipoquina HMGB1 en la regulación de la
autofagia en células del cartílago articular**

**Role of HMGB1 adipokine in the regulation of
autophagy in articular cartilage cells**

Adriana Paz Otero

Julio, 2016



**Papel de la adipocina HMGB1 en la regulación de la autofagia en células
del cartílago articular**

**Role of HMGB1 adipokine in the regulation of autophagy in articular
cartilage cells**

Laboratorio NEIRID (NeuroEndocrine Interactions in Rheumatic and Inflammatory Diseases)

Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela

Dr. Oreste Gualillo en calidad de tutor del Trabajo de Fin de Máster “Papel de la adipocina HMGB1 en la regulación de la autofagia en células del cartílago articular” autoriza a Adriana Paz Otero su presentación ante el Tribunal Evaluador.

En Santiago, a 20 de Junio de 2016

VºBº Tutor externo

Fdo.: Dr. Oreste Gualillo

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi sincero agradecimiento al Dr. Oreste Gualillo y la Dra. María del Carmen Veiga Barbazán, por la tutoría de este trabajo.

De la misma forma, aprovecho para mencionar a Vane, Vero, Ruddy, Claudio, Eloi y Tamara, compañeros de laboratorio. Muchas gracias por compartir vuestros conocimientos conmigo, por vuestra ayuda y consejos, y sobre todo por la magnífica compañía.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
1. EL CARTÍLAGO ARTICULAR.....	3
1.1. Componentes del cartílago articular.....	3
1.1.1. La matriz extracelular (MEC).....	3
1.1.2. El condrocito.....	4
2. EL CARTÍLAGO ARTICULAR EN LAS ENFERMEDADES REUMÁTICAS: LA ARTROSIS	5
2.1. Las adipoquinas: mediadores de la degradación e inflamación del cartílago articular	5
3. EL MECANISMO DE AUTOFAGIA.....	7
3.1. Monitorización de los procesos de autofagia	9
3.2. Papel de las adipoquinas en el proceso de autofagia.....	11
3.2.1. La adipoquina HMGB1.....	11
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	13
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
1. CULTIVOS CELULARES	14
1.1. Línea celular humana T/C-28a2.....	14
1.2. Mantenimiento y subcultivo celular.....	14
1.3. Condiciones experimentales: tratamientos	15
2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	15
2.1. Extracción de ARNm	15
2.2. RT-PCR a tiempo real.....	16
3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA.....	17
3.1. Extracción de proteínas	17
3.2. Cuantificación de proteínas. Método Bradford	17
3.3. Western Blot.....	18
3.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	18
3.3.2. Transferencia a la membrana	18

3.3.3. <i>Inmunodetección</i>	19
3.3.4. <i>Densitometría</i>	20
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
RESULTADOS	22
1. RESPUESTA AUTOFÁGICA DE LOS CONDROCITOS HUMANOS ANTE FACTORES ADVERSOS	22
2. PAPEL DE LA ADIPOQUINA HMGB1 EN LA REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA EN CONDROCITOS HUMANOS	23
2.1. Conversión de la proteína LC3 y expresión de la proteína p62.....	23
2.2. Monitorización del flujo autofágico	24
2.3. Expresión génica de HMGB1.....	26
2.4. Fosforilación de la proteína mTOR.....	26
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFÍA	33

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	Seroalbúmina bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
COX2	Ciclooxigenasa 2
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco (<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FBS	Suero bovino fetal (<i>fetal bovine serum</i>)
GAG	Glucosaminoglicanos
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
GβL	Proteína similar a la subunidad beta de la proteína G (<i>G-protein beta subunit-like protein</i>)
HMGB1	<i>High-mobility group box 1</i>
IL1	Interleuquina 1
IL6	Interleuquina 6
LC3	<i>Microtubule-associated protein light chain 3</i>
LGI	Bajo grado de inflamación (<i>low grade inflammation</i>)
MEC	Matriz extracelular
mTOR	Diana en mamíferos de rapamicina (<i>mammalian target of rapamycin</i>)
mTORC1	Complejo 1 de la diana en mamíferos de rapamicina (<i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>)
mTORC2	Complejo 2 de la diana en mamíferos de rapamicina (<i>mammalian target of rapamycin complex 2</i>)

NOS2	Óxido nítrico sintasa 2 (<i>nitric oxide synthase 2</i>)
OA	Artrosis (<i>osteoarthritis</i>)
OARSI	<i>OA Research Society International</i>
PAS	Estructura pre-autofagosomal (<i>pre-autophagosomal structure</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Fosfatidiletanolamina (<i>phosphatidylethanolamine</i>)
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PVDF	Polifluoruro de vinilideno (<i>polyvinylidene fluoride</i>)
RAPTOR	Proteína reguladora asociada a mTOR (<i>regulatory associated protein of mTOR</i>)
RT	Retro-transcripción
SDS	Sodio dodecil sulfato (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEM	Error estándar de la media (<i>standard error of the mean</i>)
SNP	Nitroprusiato de sodio (<i>sodium nitroprusside</i>)
TAB	Tejido adiposo blanco
ULK1	<i>Unc51-like kinase 1</i>

INTRODUCCIÓN

1. EL CARTÍLAGO ARTICULAR

El cartílago hialino, también conocido como cartílago articular, se localiza fundamentalmente en las superficies de los huesos en articulaciones sinoviales, las más numerosas del cuerpo humano (ej. el codo, la rodilla, la cadera, el hombro) (De Toro, 2004). Se trata de un tejido conectivo especializado, avascular, alinfático y aneural, cuya función principal es impedir el daño articular secundario a la carga mecánica generada por el movimiento, gracias a que disminuye la fricción, es resistente a la tensión y a la compresión y se adapta a condiciones cambiantes (Kim *et al.*, 2008).

1.1. Componentes del cartílago articular

El cartílago articular está constituido por dos elementos, un componente extracelular, la matriz, que corresponde al 95% de la masa total del tejido, y el componente celular, los condrocitos, que solo ocupan el 5% restante (De Toro, 2004; Sánchez, 2008).

1.1.1. La matriz extracelular (MEC)

La matriz del cartílago articular está formada principalmente por agua, la cual constituye el 60-70% de su masa (Sánchez y López, 2011), y por un armazón sólido de macromoléculas que confieren al cartílago sus propiedades biomecánicas. El armazón de macromoléculas estructurales se compone de colágeno (50-70%), proteoglicanos (30-35%) y otras proteínas de matriz (15-20%) (Trujillo, 2004).

En el cartílago coexisten diferentes tipos de colágeno (II, VI, IX, XI, XII, XIV), pero el más abundante es de tipo II (Sánchez, 2008). Este tipo de colágeno forma fibras que se organizan tridimensionalmente a modo de malla, proporcionándole al cartílago articular su resistencia tan característica (Alexopoulos *et al.*, 2005).

Los proteoglicanos son macromoléculas complejas formadas por un esqueleto central proteico, al cual se unen monómeros de glucosaminoglicanos (GAG). Los GAG más abundantes son el condroitín-sulfato, el queratán-sulfato y el ácido hialurónico (Otsuki *et al.*,

2010). El agrecano es el proteoglicano más común en el cartílago articular, formado mayoritariamente por el GAG condroitín-sulfato. Los proteoglicanos presentan un elevado grado de sulfatación en las cadenas de GAG que les confiere cargas electronegativas, provocando que se repelen unas a otras y se atraiga agua al interior de la matriz (Sánchez, 2008), aumentando así la resistencia del cartílago a la compresión (Martel *et al.*, 2008).

1.1.2. El condrocito

El único tipo celular del cartílago articular es el condrocito, célula responsable de realizar la síntesis y degradación de los diferentes componentes de la matriz extracelular (Muir, 1995; Archer y Francis, 2003).

Los condrocitos derivan de una célula precursora de origen mesenquimal y pueden ser encontrados en el cartílago en diferentes estados de maduración (Lin *et al.*, 2006). Se agrupan en las denominadas lagunas y cada célula está completamente aislada dentro de la matriz pericelular, diferente al resto de la matriz del cartílago (Wilusz *et al.*, 2014). Debido a que el cartílago articular es un tejido avascular, el paso de oxígeno y nutrientes se lleva a cabo por difusión a través de la matriz (Wilkins *et al.*, 2000); esto provoca que los condrocitos estén expuestos a una baja presión parcial de oxígeno constante y se ven obligados a realizar un metabolismo en un ambiente prácticamente anóxico (Sánchez, 2008).

Estas células presentan un aparato de Golgi y retículo endoplásmico prominentes, así como un sistema de gránulos secretorios bien desarrollado que es indicador de su elevada actividad biosintética (Goldring, 2006). Además, poseen la capacidad de deformación adaptativa en respuesta a las diferentes fuerzas mecánicas a las que se ve sometido el cartílago articular (Guilak *et al.*, 1995).

Según la región del cartílago, los condrocitos varían en tamaño, morfología y número. En las capas más superficiales son de menor tamaño, tienden a ser más aplanados y se encuentran en mayor densidad que en las zonas más profundas del cartílago articular.

2. EL CARTÍLAGO ARTICULAR EN LAS ENFERMEDADES REUMÁTICAS: LA ARTROSIS

Uno de los trastornos reumáticos más comunes en la población es la artrosis (OA, *osteoarthritis*). Se trata de una enfermedad crónica y de etiología multifactorial, asociada con la destrucción gradual del cartílago articular (Peña y Fernández, 2007). Se define por la OARSI (*OA Research Society International*) como un trastorno que afecta a articulaciones móviles, caracterizado por estrés celular y degradación de la matriz extracelular iniciado por micro- y macro-lesiones que activan respuestas de reparación que incluyen vías pro-inflamatorias de la inmunidad innata (Kraus *et al.*, 2015). Los síntomas que acompañan a la artrosis son generalmente el dolor mecánico, la rigidez articular y pérdida de función de la articulación en fases más avanzadas (Peña y Fernández., 2007).

Estudios de prevalencia reflejaron que más del 70% de los mayores de 50 años tienen signos radiológicos de artrosis en alguna localización (Carmona, 2008); además, este trastorno es la causa más frecuente de incapacidad en personas de edad avanzada y la primera causa de cirugías de reemplazo articular (Moskowitz, 2001). En España, la artrosis afecta al 10% de la población general y representa una de las enfermedades con mayor coste para el sistema público de salud (Carmona, 2008; Conaghan *et al.*, 2014; Kingsbury *et al.*, 2014). Las articulaciones que más se ven afectadas son la cadera, las rodillas y las manos; según el estudio EPISER de la Sociedad Española de Reumatología, la artrosis sintomática de rodilla afecta al 10,2% de la población adulta y la artrosis de mano al 6,2% (Carmona, 2008).

Todavía hoy no se conocen, de forma definitiva, las causas que originan la artrosis. Se sabe que existe un número determinado de factores que incrementan el riesgo de padecer esta patología; de los más importantes son la edad, el traumatismo articular, la alteración biomecánica y la obesidad (Felson, 2006).

2.1. Las adipoquinas: mediadores de la degradación e inflamación del cartílago articular

Uno de los factores de riesgo más notables para el inicio y progresión de la artrosis es la obesidad, por su efecto mecánico sobre articulaciones que soportan peso, como las rodillas (Duarte y Miranda, 2014). Sin embargo, estudios recientes han descrito la asociación entre

obesidad y OA en articulaciones que no son de carga, tales como las articulaciones de las manos, las muñecas y los hombros (Cooper *et al.*, 1998; Blagojevic *et al.*, 2010); esto sugiere que factores metabólicos contribuyen a la alta prevalencia de artrosis en individuos obesos (Yusuf *et al.*, 2010).

El tejido adiposo blanco (TAB), considerado durante mucho tiempo como un depósito de energía, está reconocido actualmente como un órgano secretor activo que libera mediadores inflamatorios sistémicos conocidos como adipoquinas. El término adipoquina se aplica a las moléculas biológicamente activas producidas por los adipocitos del TAB, que comparten propiedades estructurales y funcionales con las citoquinas y participan en diferentes procesos fisiológicos y patológicos, incluidas la inmunidad y la inflamación (Lago *et al.*, 2011). Estas moléculas se encuentran aumentadas en la obesidad y contribuyen a un estado de bajo grado de inflamación (LGI, *low grade inflammation*) que presenta el individuo obeso (Duarte y Miranda, 2014); además promueven diversas complicaciones metabólicas y cardiovasculares que están implicadas en la obesidad (Lago *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2009). La presencia de este estado LGI en pacientes obesos se ha relacionado con una mayor incidencia y un peor pronóstico en la artrosis (Fantuzzi, 2005; Scotece *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que las adipoquinas están involucradas en la modulación de la respuesta inflamatoria en los condrocitos, regulando moléculas como la ciclooxigenasa 2 (COX2), la óxido nítrico sintasa inducible tipo 2 (NOS2), la síntesis de citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL-1) y también la producción de metaloproteasas que tienen un papel clave en la degradación y destrucción de la matriz extracelular del cartílago (Lago *et al.*, 2007; Conde *et al.*, 2011).

Las principales adipoquinas involucradas en la artrosis son: leptina, adiponectina, resistina, visfatina, lipocalina-2, vaspina, apelina, omentina, quemerina y amiloide sérico A3 (Gómez *et al.*, 2011; Scotece *et al.*, 2014) destacando entre estas: la leptina, la adiponectina y la resistina. Estas moléculas pueden ser consideradas como nexo de unión entre ambas enfermedades: la obesidad y la artrosis.

3. EL MECANISMO DE AUTOFAGIA

La palabra autofagia proviene del griego y significa literalmente “comer” (fagia) “uno mismo” (auto). Se trata de un mecanismo celular homeostático, que permite a la célula “limpiar” parte de su citoplasma y degradar sus componentes dañados (Klionsky y Emr, 2000). La autofagia es un proceso conservado evolutivamente en todos los organismos eucarióticos, desde levaduras a mamíferos (Yang y Klionsky, 2010).

Existen tres tipos de autofagia: la microautofagia, la autofagia mediada por chaperonas y la macroautofagia; siendo este último el más ampliamente estudiado (Mizushima *et al.*, 2010).

Durante la macroautofagia (a partir de ahora, referida como autofagia), orgánulos intactos, así como proteínas innecesarias o disfuncionales son secuestrados en autofagosomas para su posterior degradación y obtención de energía. Este proceso tiene lugar mediante una serie de pasos secuenciales (Fig. 1). En primer lugar, se produce la nucleación de una membrana inicial, denominada membrana de aislamiento o fagóforo y cuyo origen aún es desconocido, aunque parecen proceder del retículo endoplásmico, del aparato de Golgi, o bien sintetizadas de novo como pequeñas estructuras pro-membrana (Gozuacik y Kimchi, 2004). En levaduras, se sabe que se originan a partir de estructuras pre-autofagosomales (PAS, *pre-autophagosomal structure*) (Mizushima *et al.*, 2010), pero estas todavía no se han identificado en mamíferos. A continuación, la membrana inicial sufre una elongación y sus bordes se unen encerrando una porción de citoplasma, lo que resulta en la formación de una estructura de doble membrana, el autofagosoma. Finalmente, la membrana externa del autofagosoma maduro puede fusionarse con un lisosoma, dando lugar al autolisosoma; de esta manera, la membrana interna del autofagosoma y su contenido son degradados por la acción de las hidrolasas ácidas lisosomales. Antes de la fusión con los lisosomas, los autofagosomas también pueden fusionarse con endosomas, para formar un amfisoma (Stromhaug y Seglen, 1993). Los aminoácidos y otras pequeñas moléculas generados tras la degradación autofágica son devueltos de nuevo al citoplasma para su reutilización.

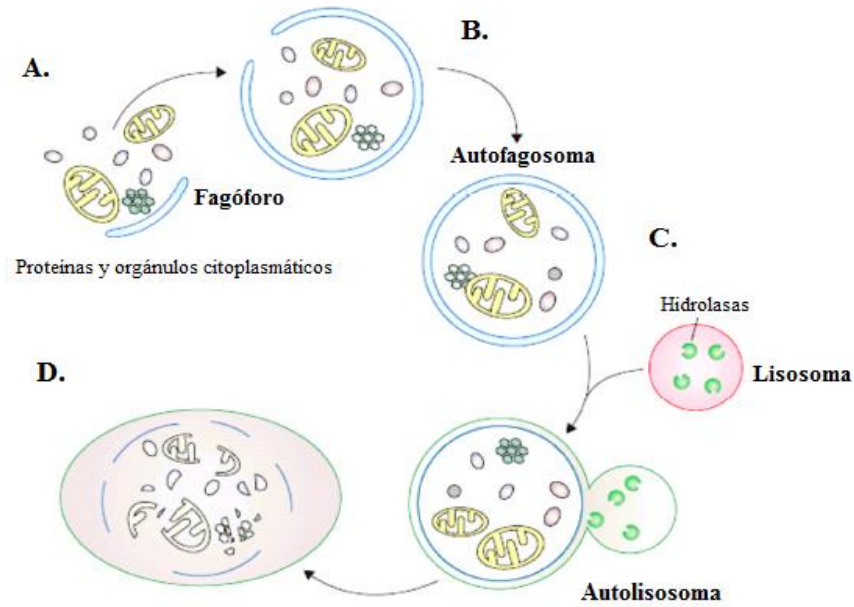


Figura 1. Descripción esquemática de la autofagia. Nucleación (A); Elongación (B); Fusión (C); Degradación (D). Imagen modificada de (Xie and Klionsky, 2007).

El sistema autofágico desempeña importantes roles en los procesos fisiológicos. En condiciones normales, la autofagia ocurre espontáneamente a niveles basales (Mizushima y Yamamoto, 2004). La autofagia basal favorece la homeostasis celular mediante el *turnover* de proteínas que tienen una vida larga y agregados de proteínas que se acumulan, así como la eliminación de orgánulos completos que están dañados; de esta forma, se mantiene el control de calidad de los componentes esenciales de la célula. Por otra banda, este proceso se sobreexpone rápidamente en situaciones de estrés como una respuesta citoprotectora para la supervivencia celular. Los niveles de autofagia se pueden ver drásticamente incrementados por factores adversos, tales como la falta de nutrientes, la hipoxia, el estrés oxidativo, infecciones por patógenos, altas temperaturas o la inflamación. Sin embargo, el aumento excesivo de autofagia o su desregulación puede conducir a la muerte celular (Yang y Klionsky, 2010).

Una autofagia defectuosa está implicada en la patogénesis de una gran variedad de enfermedades, como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardíacas o trastornos inflamatorios; asimismo, la disminución en la actividad autofágica es una característica común del envejecimiento (Yang y Klionsky, 2010; Ribeiro *et al.*, 2015).

El envejecimiento es un factor de riesgo en el desarrollo de la artrosis. En organismos modelo, una autofagia deficiente agrava los cambios asociados al envejecimiento, mientras que una activación de este proceso protege de enfermedades relacionadas con la edad e incrementa la vida útil (Rubinsztein, *et al.*, 2011). La reducción de la actividad autofágica se observó en las articulaciones envejecidas y la artrosis, tanto en ratones como en humanos, acompañada por un aumento en la apoptosis de los condrocitos (Caramés *et al.*, 2010). Además, la disminución en la expresión de proteínas autofágicas se ha asociado con lesiones mecánicas del cartílago (Caramés *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren que una autofagia comprometida podría contribuir a la progresión de la artrosis. Asimismo, los defectos en la maquinaria autofágica están relacionados con la disfunción de múltiples tejidos metabólicos, y están implicados en desórdenes como la obesidad (Rocchi y He, 2016), un trastorno muy vinculado con la artrosis.

3.1. Monitorización de los procesos de autofagia

La autofagia está controlada por un conjunto de genes, que se conocen como los genes Atg, requeridos para la inducción y nucleación de las vesículas autofágicas, además de su expansión y fusión con lisosomas, permitiendo así la degradación enzimática y el reciclaje (Meijer y Codogno, 2004; Thorburn, 2008). Entre estos genes, Atg1, Atg6 y Atg8 (ULK1, Beclin1 y LC3 en mamíferos, respectivamente) son los principales reguladores de la vía autofágica. ULK1 es un intermediario clave en la transducción de señales pro-autofágicas para la formación del autofagosoma (Chan *et al.*, 2007); Beclin1 forma un complejo con PI3 quinasa y Vps34 que permite la nucleación de la vesícula autofágica (Furuya *et al.*, 2005). Por último, para la formación y expansión de los autofagosomas, se requiere el sistema de proteínas similares a ubiquitina que incluye Atg12 y LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*) (Ohsumi y Mizushima, 2004).

La proteína LC3 está presente en dos formas: la forma citoplasmática LC3I y la forma LC3II que está ligada a la membrana externa e interna del autofagosoma. Durante la autofagia, la forma LC3I se conjuga con la fosfatidiletanolamina (PE, *phosphatidylethanolamine*) por una reacción similar a la ubiquitinación, formando así el complejo LC3II (LC3-PE) que se asocia a las vesículas autofágicas. Ambas formas proteicas poseen diferentes pesos moleculares y su conversión puede detectarse mediante técnicas de inmunodetección. Cuando

el autofagosoma se fusiona con el lisosoma, la enzima Atg4 escinde la proteína LC3 de la membrana externa y las enzimas lisosomales degradan la proteína LC3 de la membrana interna; esto resulta en un bajo contenido de esta proteína en los autolisosomas (Mizushima *et al.*, 2010).

El incremento de la cantidad de la proteína LC3II y de la ratio LC3II/LC3I, se correlaciona con el aumento en el número de autofagosomas y, por lo tanto, con un mayor grado de actividad autofágica (Wang *et al.*, 2009). Sin embargo, la acumulación de autofagosomas o la medición de LC3II y de la ratio LC3II/LC3I, no siempre es indicativo de la actividad autofágica y puede incluso representar una supresión de los pasos tardíos de esta vía. Por este motivo, existe un método que permite determinar la autofagia de forma más exacta; se trata de la monitorización del “flujo autofágico”, un término que se usa para denotar el proceso dinámico de la síntesis de autofagosomas, el envío de los substratos autofágicos a los lisosomas y su degradación (Mizushima *et al.*, 2010).

El principal sistema para medir el flujo autofágico es la monitorización del *turnover* de LC3, que se basa en la observación de que LC3II es degradada en los autolisosomas. La degradación de esta proteína se puede bloquear cuando las células son tratadas con reactivos inhibidores, tales como, el cloruro de amonio, la cloroquina o bafilomicina A, que impiden la fusión autofagosoma-lisosoma o inhiben la acidificación en los lisosomas, y los inhibidores de proteasas lisosomales como E64d y pepstatina A. Por consecuencia del bloqueo, se produce la acumulación de LC3II (Tanida *et al.*, 2005). Ante la presencia de tales inhibidores, la acumulación sería indicativa de un flujo autofágico eficiente, mientras que el fallo en la acumulación indicaría un defecto o demora en el proceso autofágico (Mizushima *et al.*, 2010). En base a esto, la diferencia en los niveles de LC3II entre muestras en presencia y ausencia de inhibidores, representa la cantidad de LC3 que va a ser degradada en los lisosomas (esto es, el flujo autofágico) (Mizushima y Yoshimori, 2007; Klionsky *et al.*, 2008; Rubinsztein *et al.*, 2009).

Además de LC3, existen otras moléculas implicadas en la autofagia que pueden usarse para monitorizar el flujo autofágico. Un ejemplo es p62 (también conocida como SQSTM1/sequestoma 1), involucrada en la degradación autofágica de proteínas ubiquitinadas que tienden a formar agregados. La proteína p62 se incorpora de forma selectiva a los autofagosomas mediante unión directa a LC3 y luego es degradada por autofagia (Børkøy *et*

al., 2005); de esta manera, los niveles de p62 se correlacionan inversamente con la actividad autofágica, degradándose rápidamente durante su sobreexpresión y acumulándose cuando este proceso resulta de alguna manera impedido (Mizushima y Yoshimori, 2007; Jiang y Mizushima, 2014).

3.2. Papel de las adipoquinas en el proceso de autofagia

Recientemente, diversos estudios han demostrado que las adipoquinas, cuya síntesis y secreción resultan profundamente alteradas en la obesidad, son capaces de desencadenar alteraciones de gran relevancia en los mecanismos de autofagia.

En el año 2011, Jin y sus colaboradores observaron que una deficiencia en la lipocalina 2 inhibía significativamente la proliferación celular y la autofagia en fibroblastos embrionarios de ratón (Jin *et al.*, 2011). Más tarde, otros grupos de investigación demostraron que la leptina podía modular el proceso autofágico en linfocitos T CD4+ y CD25- humanos (Cassano *et al.*, 2014), al igual que inducía la autofagia en células cancerosas de hígado y mama (Nepal *et al.*, 2015). Asimismo, se reportó un nuevo rol de la adiponectina, al descubrir que esta adipoquina es capaz de estimular directamente el flujo autofágico en células del músculo esquelético (Xu y Sweeney, 2015).

3.2.1. La adipoquina HMGB1

En los últimos años, se ha venido estudiando nuevas moléculas producidas por los adipocitos como posibles adipoquinas. Así, recientemente se ha identificado a la proteína HMGB1 (*high-mobility group box 1*) como potencial candidata (Nativel *et al.*, 2013). Esta adipoquina fue primeramente descrita como una proteína nuclear presente en todas las células nucleadas que puede unirse al ADN, ayudando a la organización de la arquitectura cromosómica y regulando la transcripción de genes (Nativel *et al.*, 2013). En condiciones patológicas o inflamatorias, HMGB1 puede translocarse al citoplasma y liberarse a nivel extracelular, donde actúa como una citoquina pro-inflamatoria que media la respuesta a la infección, lesión e inflamación (Abraham *et al.*, 2000; Lotze y Tracey, 2005; Tsung *et al.*, 2005; Mantell *et al.*, 2006). Fuera de la célula, esta proteína se une a receptores de membrana estimulando la producción de otras citoquinas pro-inflamatorias y amplificando el proceso inflamatorio. García y sus colaboradores descubrieron que, en la membrana sinovial y el

cartílago artrósicos, HMGB1 estaba sobreexpresada y mayoritariamente se presentaba en el citoplasma y de manera extracelular (García *et al.*, 2010). Se piensa que, en la artrosis, esta proteína podría conectar procesos degradativos, tales como el proceso de la necrosis condrocitaria, el proceso inflamatorio de membrana sinovial, y la perpetuación de los eventos inflamatorios que tienen lugar en distintas fases de la patología.

Por otra banda, publicaciones actuales han demostrado que la proteína HMGB1 puede contribuir a la regulación de la autofagia en diferentes células, como las tumorales o neuronas de la médula espinal (Tang *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2016). Estos descubrimientos, junto a los descritos en los estudios citados anteriormente, refuerzan la idea de que las adipoquinas poseen un papel crítico como reguladores clave en el proceso de autofagia, cobrando así mayor importancia la investigación de su implicación en este mecanismo celular.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A la vista de lo expuesto, teniendo en cuenta la estrecha relación existente entre la obesidad y la artrosis, siendo la autofagia un mecanismo implicado en ambos trastornos, y dado que, en la actualidad no existe ningún estudio en concreto que investigue si las adipoquinas pueden tener un papel regulador del proceso autofágico en células de las articulaciones, se decidió estudiar si HMGB1, una proteína considerada recientemente como adipoquina pro-inflamatoria, puede modular la respuesta autofágica en condrocitos humanos del cartílago articular.

Así, los objetivos principales de este trabajo fueron:

A- El estudio inicial de la respuesta autofágica en condrocitos humanos ante factores adversos, concretamente mediante el análisis de la conversión de la proteína autofágica LC3 (ratio LC3II/LC3I).

B- Evaluar el efecto de la adipoquina HMGB1 en el mecanismo autofágico de condrocitos humanos. Este punto se abordó de varias maneras:

1. Estudio de la conversión de la proteína autofágica LC3 y la expresión de la proteína autofágica p62.
2. Medición del flujo autofágico mediante monitorización del *turnover* de LC3 y de los niveles de la proteína autofágica p62.
3. Determinación de la expresión génica de HMGB1.
4. Análisis del cambio en los niveles de la fosforilación de la proteína reguladora mTOR.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. Línea celular humana T/C-28a2

En el presente estudio se utilizó la línea celular de condrocitos humanos T/C-28a2, cedida por la Dra. Mary B. Goldring (Laboratorio de Biología del Cartílago, *Hospital for Special Surgery*, Nueva York, EE.UU.). Esta línea celular ha sido aislada a partir de condrocitos juveniles de costilla e inmortalizados mediante transfección retroviral de condrocitos humanos con el antígeno T grande del virus Simian 40 (SV40-TAg, Simian virus 40 large T-antigen).

Las células T/C-28a2 fueron cultivadas en medio DMEM/Hams' F12 suplementado con suero bovino fetal (FBS, *fetal bovine serum*) al 10%, L-glutamina y antibióticos (50 U/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomicina).

1.2. Mantenimiento y subcultivo celular

El mantenimiento de los cultivos celulares se realizó en placas Petri de 10 mm de diámetro, reemplazando el medio de cultivo cada 2-3 días, en una estufa de cultivo celular (incubador de CO₂ NuAire, MN, EE.UU.) humidificada a 37°C con 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80% se procedió al subcultivo celular. Para ello se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS 1X y se despegaron usando un volumen de tripsina 500 mg/l – ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 200 mg/l (Lonza, Verviers, Belgium) por cada placa Petri. Las células se dejaron 5 minutos a 37°C en la estufa de cultivo celular, después se inactivó la acción de la tripsina con medio de cultivo. La suspensión celular se recogió en un tubo estéril de 50 ml, se homogenizó y se procedió al recuento celular mediante una cámara de Neubauer, donde las células vivas se distinguieron de las células muertas mediante el colorante azul tripán. Finalmente, las células se sembraron a una densidad de 3×10^5 por placa Petri.

1.3. Condiciones experimentales: tratamientos

En todas las experiencias de este trabajo, las células fueron sembradas en placas de 6 o 12 pocillos con 250000 y 180000 células por pocillo respectivamente en 1000-500 μ l de medio de cultivo. Una vez que las células estuvieron adheridas de forma estable (aproximadamente 6 horas después de ser sembradas) y alcanzaron una confluencia del 80-90%, se incubaron en condiciones basales o en presencia de los diferentes estímulos en medio con FBS al 10%.

Para los diferentes tratamientos se utilizaron los siguientes reactivos: HMGB1 recombinante humano, obtenido de RayBiotech Inc. (GA, USA), cloroquina, rapamicina y nitroprusiato de sodio (SNP, *sodium nitroprusside*), obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA).

2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

2.1. Extracción de ARNm

Para el análisis de la expresión génica, la extracción de ARN de los cultivos celulares se llevó a cabo utilizando el reactivo TRIzol® y el kit de extracción de ARN NucleoSpin®.

Una vez transcurrido el tiempo correspondiente de los tratamientos, se retiró el medio de cultivo y las células fueron lisadas utilizando el reactivo TRIzol®. El lisado obtenido se transfirió a tubos de microcentrífuga y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se añadió un volumen determinado de cloroformo a cada una de las muestras, se agitaron los tubos y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 12000xg durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa que contiene el ARN se recogió en tubos de 1,5 ml y se procesó con el kit de extracción de ARN NucleoSpin®, siguiendo las instrucciones del proveedor.

Primero, se procedió a la adición de un volumen igual de etanol al 70%, los tubos se agitaron y la mezcla resultante se introdujo en las minicolumnas del kit de extracción de NucleoSpin® que se centrifugaron a 11000xg durante 1 minuto a temperatura ambiente, consiguiendo de este modo que el ARN se adsorba en la membrana de sílica que contiene la columna. A continuación, para desalar las membranas, se añadió el tampón MDB y las minicolumnas se centrifugaron de nuevo. El ARN adsorbido en la columna se incubó con ADNasa que digirió cualquier posible resto de ADN genómico que pudiera quedar.

Posteriormente, se eliminaron los restos de ADNasa alternando la adición de solventes y centrifugaciones. Por último, se procedió a la elución del ARN en el volumen deseado de agua libre de ARNasas.

Para comprobar la calidad del ARN extraído y determinar su concentración se tomó un volumen determinado de la solución de ARN y se analizó con el espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000. Solo se consideraron válidos los ARNs que presentaron unas ratios de absorbancia a 260/280 y 260/230 superiores a 2 y 1,7 respectivamente.

2.2. RT-PCR a tiempo real

La retro-transcripción (RT) y la reacción de PCR a tiempo real, se llevaron a cabo en un solo paso empleando el kit One step MESA GREEN qRT-PCR MasterMix Plus for SYBR® assay sample.

Para ello, se tomaron entre 0,5 y 1 µg de ARN total y se realizó, previamente, una digestión del ADN genómico mediante incubación con una ADNasa a 37°C durante 10 minutos. El volumen final por cada reacción de PCR fue de 25 µl, de los cuales 0,125 µl corresponden a la mix Euroscript RT/RNase inhibidor, 12,5 µl de la MasterMix que contiene la enzima y componentes necesarios para la reacción de PCR, 10,375 µl de agua destilada, 1 µl de la mezcla de cebadores (Tabla 1) y 1 µl de la mezcla obtenida de la digestión. Todas las reacciones de PCR; las del gen de interés, las de gen normalizador, así como los controles negativos, se efectuaron por duplicado y con el mismo programa de PCR. El programa utilizado consistió en un paso de RT de 30 minutos a 48°C, un paso de activación de la enzima ADN polimerasa Meteor*Taq* e inactivación de la enzima retrotranscriptasa EuroScript de 5 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C más 1 minuto a 60°C y, por último, un paso de análisis de la curva de disociación.

Las amplificaciones fueron realizadas en el sistema de PCR en tiempo real Mx30005P® (Stratagene), el cual permite la realización de cuantificaciones relativas. En dicho análisis, se asignó al ADNc control el papel de calibrador (al cual se le asignó valor 1). Todos los resultados obtenidos en las distintas muestras se compararon con el control de forma que la cuantificación fuese relativa respecto al valor del calibrador. Por cada ADNc se realizaron 2 amplificaciones diferentes, una para el gen de interés y otra para el gen GAPDH utilizado como gen normalizador (no varía su expresión en función de los tratamientos y se emplea

como control de carga). El método usado por el software para la cuantificación relativa es conocido como el método $\Delta\Delta Ct$, donde Ct es el ciclo a partir del cual la amplificación empieza a ser estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo.

Catálogo	Descripción	Símbolo	Especie	RefSeq accession
HQP006940	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenasa</i>	GAPDH	Humano	NM_002046
HQP008883	<i>High-mobility group box 1</i>	HMGB1	Humano	NM_002128

Tabla 1. Lista de cebadores empleados.

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

3.1. Extracción de proteínas

Para el análisis de la expresión proteica, primero se llevó a cabo la extracción de las proteínas totales.

Una vez pasado el tiempo pertinente de los tratamientos, se procedió a la lisis de las células. Para ello, el medio de cultivo se retiró y las células se lavaron con PBS 1X a 4-8°C. A continuación, las células se despegaron raspando la superficie de la placa con tampón de lisis (Tris-HCl 50mM pH 7,5, NaCl 250mM, pirofosfato sódico 30mM, EDTA 0,5 M, Triton X-100 1%, Na₃VO₄ 1mM, NaF 1M, PMSF 100mM, coctel inhibidor de proteasas 1X). Los lisados se incubaron 20-25 minutos en hielo y se mezclaron cada 5 minutos para favorecer la lisis. Finalmente, se llevó a cabo una centrifugación a 20000xg durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante, que contiene el lisado celular total, se guardó a -20°C.

3.2. Cuantificación de proteínas. Método Bradford

La concentración total de proteína fue cuantificada con el método colorimétrico de Bradford, mediante el cual, enfrentado la absorbancia de una muestra cuya concentración

proteica es conocida con la absorbancia de una muestra desconocida, se puede extrapolar la cantidad de proteína de esta última.

Para la cuantificación, primero se realizó una recta estándar (1, 2,5, 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de BSA) partiendo de seroalbúmina bovina (BSA, *bovine serum albumin*) a una concentración de 1 mg/ml y reactivo Bradford 1X (obtenido de diluir el reactivo comercial BioRad *Protein Assay Kit*, 5X, con agua destilada). Seguidamente, a cada una de las muestras cuya concentración de proteína es desconocida, se añadió el reactivo Bradford 1X. Finalmente, se procedió a realizar las medidas de absorbancia de la recta y de las muestras en un espectrofotómetro Ultrospec 1100 pro UV/visible a 595 nm.

3.3. Western Blot

3.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

El primer paso del Western Blot fue la separación de las proteínas por electroforesis en función de sus pesos moleculares. Cantidades iguales de los extractos proteicos (50 μg) en tampón de carga 1X (SDS 10%, Tris-HCl 200 mM pH 6,8, Glicerol 50%, Azul de bromofenol 0,1% y β -mercaptoetanol 10%) se desnaturalizaron y se resolvieron en un gel al 15% de SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). El gel tuvo dos fases, una fase superior (gel concentrador), que facilitó la concentración de las proteínas antes de entrar en la fase inferior (gel separador), donde se llevó a cabo la separación.

La electroforesis se realizó a voltaje constante (70-110 V) durante 1-2 h, en una cubeta de electroforesis (BioRad) empleando un tampón de migración (Tris-Base 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1% pH 8,3, diluido en agua al 1X).

3.3.2. Transferencia a la membrana

Una vez separadas las proteínas, estas se transfirieron a una membrana de PVDF (Polivinilideno de difluorido, Immobion-P, Millipore®). Previamente se había hidratado la membrana usando metanol y posteriormente agua, reservándola hasta su uso en tampón de transferencia (tampón de migración 1X y metanol 20%). El gel de electroforesis también se mantuvo en este tampón durante al menos 5 minutos.

La transferencia se llevó a cabo empleando el aparato de transferencia semi-seca Trans-blot® Semi-Dry Transfer Cell (BioRad). En la base de dicho aparato se colocó papel Whatman hidratado en tampón de transferencia. A continuación, se colocó la membrana de PVDF previamente hidratada y encima se colocó el gel, al cual se le había retirado el concentrador (fase superior). Finalmente, se colocó otro papel Whatman hidratado y se procedió a la transferencia a un amperaje constante de 250 mA durante una hora.

3.3.3. Inmunodetección

Terminada la transferencia, la membrana fue bloqueada con tampón de bloqueo (5% de leche en tampón de lavado) en agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora. Una vez bloqueada, se incubó con el anticuerpo primario pertinente (Tabla 2) diluido en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C en agitación continua. Pasado el tiempo de incubación, la membrana se lavó con tampón de lavado (Tris-Base 20mM, NaCl 150mM y Tween-20 0,1% pH 7,6). Después de los lavados se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 2) diluido en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario, la membrana se lavó de nuevo y a continuación se reveló con Immobilion™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). Primero, se preparó la mezcla 1:1 de los reactivos con la que se incubó la membrana durante 5 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Terminada la incubación, la membrana se secó y se introdujo en el sistema de adquisición de imágenes *EC3* imaging system (UVP®), que está formado por una cámara oscura, una cámara CCD refrigerada y un software para analizar los resultados.

Una vez revelada, se utilizó un tampón de estriado (SDS 10%, Tris-HCl 2M pH 6,8, β-mercaptoetanol y agua destilada) para retirar los anticuerpos, liberando así las proteínas fijadas en la membrana para posteriores hibridaciones con el anticuerpo anti-GAPDH que se empleó como control de carga. De esta forma, confirmamos que las diferencias de expresión de la proteína de interés en función de los distintos tratamientos no se debieron a diferencias en la cantidad inicial de proteína cargada en el gel.

Anticuerpo 1°	Peso molecular (KDa)	Casa comercial	Dilución	Anticuerpo 2°	Casa comercial	Dilución
GAPDH	36	Sigma	1:30000	Anti-conejo	GE Healthcare	1:2000
LC3A/B	16-18	Cell Signaling	1:1000	Anti-conejo	GE Healthcare	1:2000
mTOR	289	Cell Signaling	1:1000	Anti-conejo	GE Healthcare	1:2000
Phospho-mTOR	289	Cell Signaling	1:1000	Anti-conejo	GE Healthcare	1:2000
SQSTM1/p62	65	Santa Cruz	1:200	Anti-conejo	GE Healthcare	1:5000

Tabla 2. Lista de anticuerpos empleados.

3.3.4. Densitometría

Para cuantificar la cantidad de proteína detectada mediante Western blot, se calculó la intensidad de la señal obtenida por cada banda mediante el programa informático ImageJ 1.45s (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU). Los valores obtenidos para cada banda de la proteína de interés se corrigieron dividiendo este dato por el adquirido para su control de carga en el mismo experimento. Finalmente, los resultados se expresaron como número de veces de la expresión proteica respecto del control designado como 1.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en este trabajo se expresaron como medias \pm el error estándar de la media (SEM, *standard error of the mean*) de al menos tres experimentos independientes. El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa de análisis estadístico GraphPad Prisma5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.), en el que se usó la prueba t-Student de dos colas o el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de comparación múltiple Student-Newman-Keuls. Un valor de p menor de 0,05 ($p < 0,05$) se consideró significativo.

RESULTADOS

1. RESPUESTA AUTOFÁGICA DE LOS CONDROCITOS HUMANOS ANTE FACTORES ADVERSOS

En primer lugar, se procedió a evaluar cómo los condrocitos regulan el proceso autofágico ante situaciones de estrés, tales como la falta de nutrientes o el estrés oxidativo. Para ello, las células de la línea humana T/C-28a2 se sometieron a una privación de nutrientes, mediante la serodeprivación (*starvation*), y también se trataron con nitroprusiato de sodio (SNP, *sodium nitroprusside*) 0,2 mM, un compuesto ampliamente utilizado como donante de óxido nítrico. Tras 24 horas de tratamiento, se procedió a la extracción de proteínas y se analizó la conversión de la proteína autofágica LC3 (ratio LC3II/LC3I).

Como se observa en la figura 2 (A), la ratio LC3II/LC3I aumenta significativamente respecto al control cuando las células se someten a la serodeprivación; mientras que el tratamiento con SNP no provoca variaciones significativas (B).

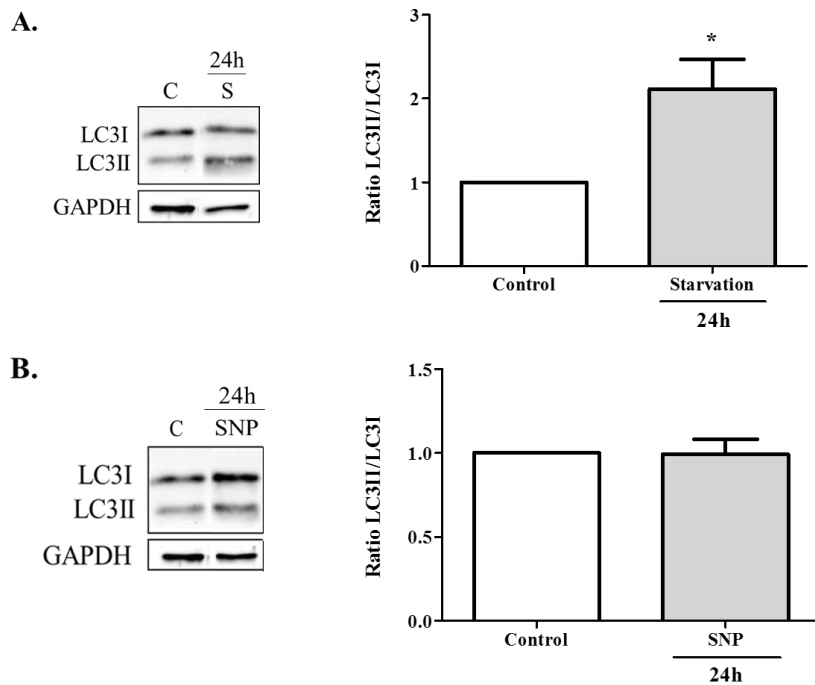


Figura 2. Análisis de la conversión de la proteína LC3 en condrocitos humanos T/C-28a2 sometidos a serodeprivación y tratados con SNP. Los condrocitos humanos T/C-28a2 fueron sometidos a

serodeprivación (S; *starvation*) (A) y tratados con SNP 0,2 mM (B), durante 24 horas. Los lisados celulares se analizaron mediante Western Blot empleando el anticuerpo para LC3I/II. GAPDH fue utilizado como control de carga. Las gráficas representan el análisis densitométrico de los Western Blot realizados. Los valores son las medias \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (* $p < 0,05$ vs. Control).

2. PAPEL DE LA ADIPOQUINA HMGB1 EN LA REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA EN CONDROCITOS HUMANOS

2.1. Conversión de la proteína LC3 y expresión de la proteína p62

Con la finalidad de analizar la conversión de la proteína autofágica LC3 y la expresión de la proteína p62 bajo el tratamiento con HMGB1, las células humanas T/C-28a2 se expusieron a determinadas concentraciones de esta adipoquina durante diferentes períodos de tiempo (30 minutos, 3, 8 y 24 horas). Las concentraciones ensayadas de HMGB1 fueron: 100 ng/ml, 250 ng/ml y 500 ng/ml. A las 24 horas se llevó a cabo la extracción de las proteínas y su análisis, tal como se describe en el apartado de Material y Métodos.

Como se muestra en la figura 3, la ratio LC3II/LC3I parece disminuir respecto al control, tras el tratamiento con HMGB1 a 250 ng/ml y 500 ng/ml durante 24 horas; sin embargo, el resultado observado no es estadísticamente significativo. En cuanto a la expresión de la proteína autofágica p62, tampoco existen cambios significativos según las dosis ensayadas.

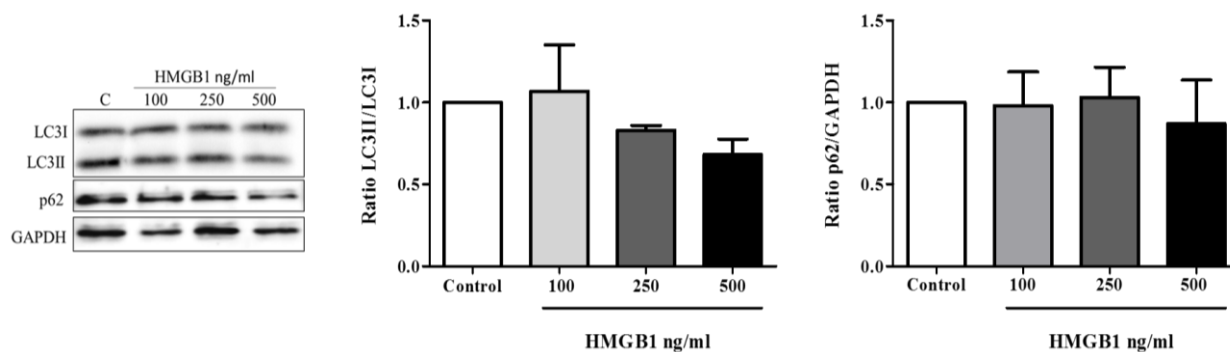


Figura 3. Análisis de la conversión de la proteína LC3 y la expresión de la proteína p62 en condrocitos humanos T/C-28a2 tratados con diferentes dosis de la adipoquina HMGB1. Los condrocitos humanos

T/C-28a2 fueron tratados con HMGB1 a una concentración de 100 ng/ml, 250 ng/ml y 500 ng/ml durante 24 horas. Los lisados celulares se analizaron mediante Western Blot empleando los anticuerpos para LC3I/II y p62. GAPDH fue utilizado como control de carga. Las gráficas representan el análisis densitométrico del Western Blot realizado. Los valores son las medias \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes.

Cuando las células se tratan con HMGB1 a una concentración de 250 ng/ml durante diferentes períodos de tiempo (Fig. 4), la ratio LC3II/LC3I disminuye respecto al control a las 3, 8 y 24 horas de tratamiento. Por el contrario, los niveles de la proteína p62 aumentan respecto al control hasta las 8 horas de tratamiento. No obstante, ninguna de las variaciones observadas es estadísticamente significativa.

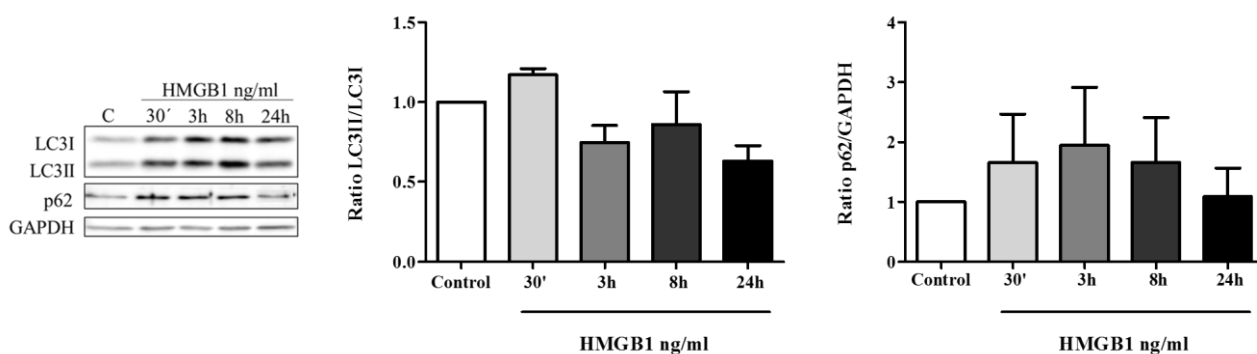


Figura 4. Análisis de la conversión de la proteína LC3 y la expresión de la proteína p62 en condrocitos humanos T/C-28a2 tratados con la adipoquina HMGB1 durante diferentes tiempos. Las células fueron tratadas con HMGB1 250 ng/ml durante 30 minutos, 3, 8 y 24 horas. Los lisados celulares se analizaron mediante Western Blot empleando los anticuerpos para LC3I/II y p62. GAPDH fue utilizado como control de carga. Las gráficas representan el análisis densitométrico del Western Blot realizado. Los valores son las medias \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes.

2.2. Monitorización del flujo autofágico

Con el propósito de lograr nuevas perspectivas sobre la falta de cambios significativos en la conversión de la proteína LC3 y la expresión de p62, observada tras el tratamiento con la adipoquina HMGB1, se llevó a cabo la cuantificación del flujo autofágico mediante la monitorización del *turnover* de LC3 y de los niveles de la proteína autofágica p62. Para ello, los condrocitos T/C-28a2 se trataron con HMGB1 250 ng/ml durante 3 y 24 horas, en ausencia o presencia del inhibidor lisosomal cloroquina 25 μ M. Tras el tratamiento, se procedió a la

extracción de las proteínas y su posterior análisis, tal como se describe en el apartado de Material y Métodos.

Como se muestra en la figura 5, bajo condiciones basales (sin tratamiento con HMGB1), existen diferencias significativas en los niveles de LC3II entre las muestras en ausencia y presencia de cloroquina. Sin embargo, cuando las células son tratadas con la adipoquina HMGB1 durante 3 horas, la cantidad de LC3II no es significativamente distinta, en presencia y ausencia del inhibidor (Fig. 5, A), lo que sugiere que el flujo autofágico basal se ve impedido por el tratamiento con HMGB1. Por otra banda, cuando las células se exponen 24 horas a la adipoquina, los niveles de LC3II entre las muestras en presencia y ausencia de cloroquina si presentan una diferencia significativa estadísticamente, si bien, esta no difiere de la observada bajo condiciones basales (Fig. 5, B), sugiriendo así la recuperación del flujo autofágico basal. Si medimos el flujo mediante los niveles de la proteína p62, se puede observar un efecto similar en ambos casos.

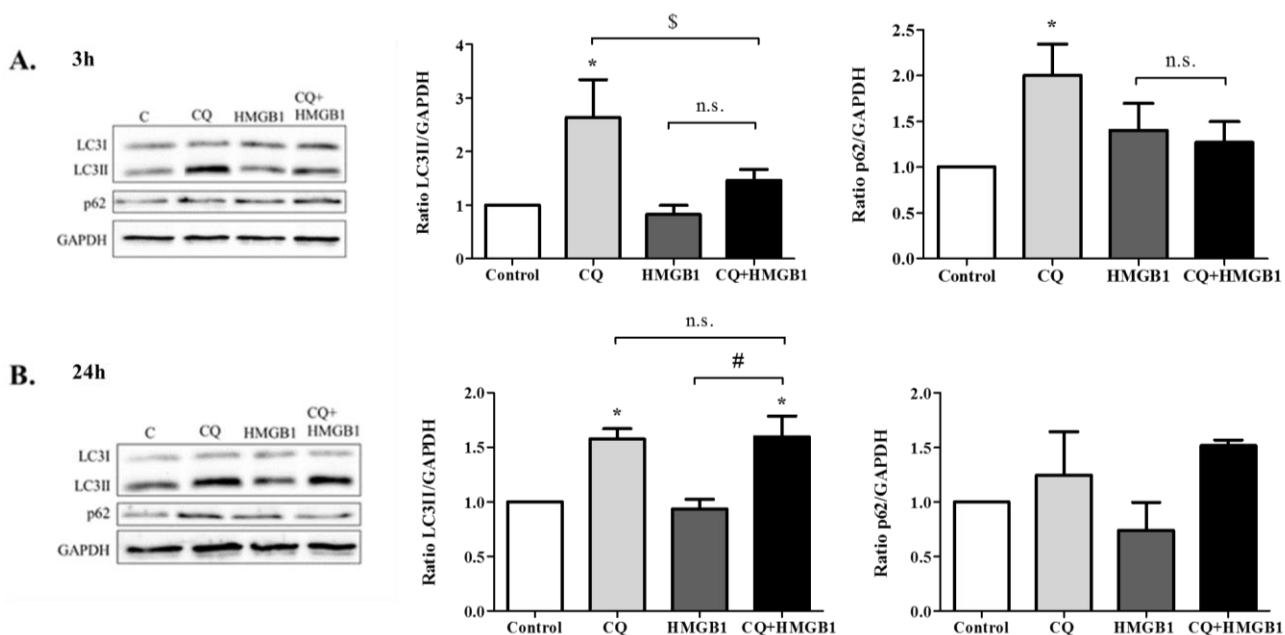


Figura 5. Análisis del flujo autofágico en condrocitos humanos T/C-28a2 tratados con HMGB1. Los condrocitos humanos T/C-28a2 fueron tratados con HMGB1 250 ng/ml, en ausencia o presencia de cloroquina (CQ; 25 μ M, 1 hora), durante 3 horas (A) y 24 horas (B). Los lisados celulares se analizaron mediante Western Blot empleando los anticuerpos para LC3I/II y p62. GAPDH fue utilizado como control de carga. Las gráficas representan el análisis densitométrico correspondiente de los Western Blot realizados. Los valores son las

medias \pm SEM de al menos 4 experimentos independientes. Significancia estadística: * $p < 0,05$ vs. Control; \$ $p < 0,05$ CQ vs. CQ+HMGB1; # $p < 0,05$ HMGB1 vs. CQ+HMGB1; n.s., no significativo.

2.3. Expresión génica de HMGB1

Para dilucidar el patrón de expresión génica de HMGB1 en condiciones de inhibición e inducción de autofagia, las células de la línea humana T/C-28a2 se trataron durante una hora con el inhibidor cloroquina 25 μ M y el inductor rapamicina 10 μ M. Además, las células también se sometieron durante 24 horas a un estímulo de estrés, como es la falta de nutrientes. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se procedió a la extracción del ARN y su análisis como se describe en el apartado de Material y Métodos.

Tal como se muestra en la figura 6, la expresión génica de HMGB1 no sufre cambios significativos respecto al control en ninguna de las condiciones ensayadas.

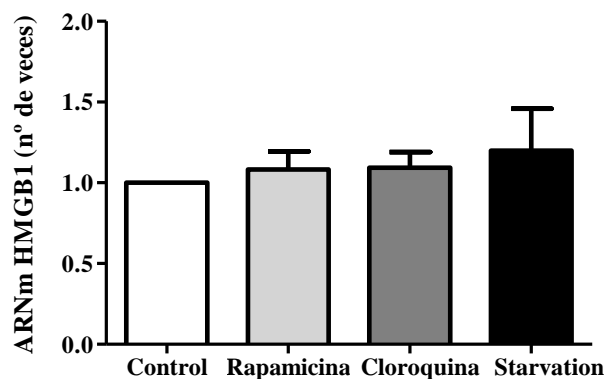


Figura 6. Análisis de la expresión génica de HMGB1 en condrocitos T/C-28a2 bajo condiciones de inhibición e inducción de autofagia. Las células fueron tratadas con cloroquina (25 μ M, 1 hora) y rapamicina (10 μ M, 1 hora); además se sometieron a serodeprivación durante 24 horas. Se determinó la expresión génica de HMGB1 mediante RT-PCR. GAPDH fue utilizado como control de carga. Los valores son las medias \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes.

2.4. Fosforilación de la proteína mTOR

Debido a que la proteína mTOR (*mammalian target of rapamycin*) se considera un regulador clave de la autofagia, se decidió determinar el cambio en los niveles de fosforilación de esta proteína por el tratamiento con la adipoquina estudiada. Para ello, los condrocitos de la

línea humana T/C-28a2, se trataron con HMGB1 250 ng/ml durante 30 minutos, 3, 8 y 24 horas. Transcurridas las 24 horas, se procedió a la extracción de las proteínas y a su análisis, tal como se describe en el apartado de Material y Métodos.

Como se contempla en la figura 7, los niveles de fosforilación de mTOR aumentan significativamente respecto al control a los 30 minutos, y a las 3 y 8 horas de tratamiento con HMGB1.

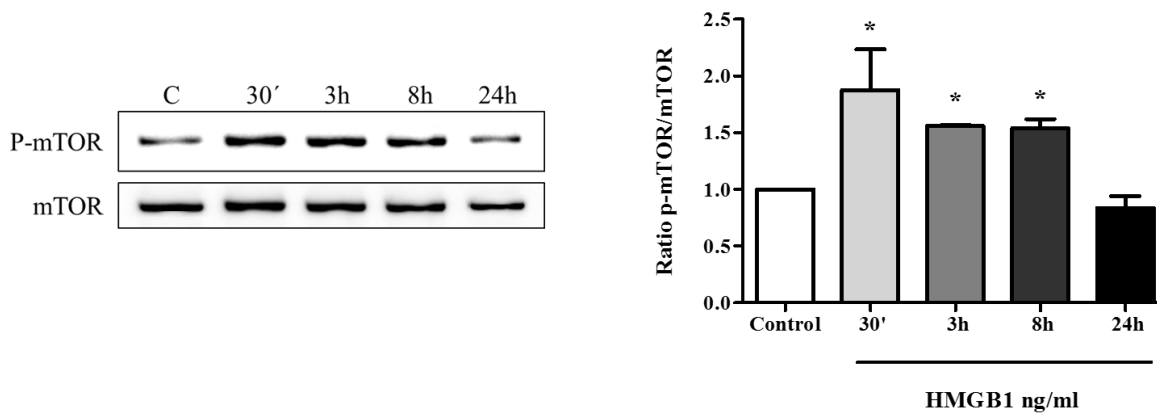


Figura 7. Análisis de la fosforilación de mTOR en condrocitos humanos T/C-28a2 tratados con HMGB1. Los condrocitos humanos T/C-28a2 fueron tratados con HMGB1 250 ng/ml durante 30 minutos, 3, 8 y 24 horas. Los lisados celulares se analizaron mediante Western Blot empleando el anticuerpo para mTOR fosforilado (p-mTOR). mTOR total fue utilizado como control de carga. La gráfica representa el análisis densitométrico del Western Blot realizado. Los valores son las medias \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (* $p < 0,05$ vs. Control).

DISCUSIÓN

Una de las características más importantes de la autofagia es su regulación dinámica; aunque en condiciones basales la actividad autofágica es baja, puede llegar a sobreregularse por numerosos estímulos adversos, considerándose un mecanismo esencial para la supervivencia celular bajo condiciones de estrés (Mizushima *et al.*, 2010). Cuando se produce una falta de nutrientes, las células degradan los componentes intracelulares innecesarios mediante la autofagia, previniendo así la pérdida de energía (Scott *et al.*, 2004). En el año 1993, se observó que levaduras con un mecanismo autofágico deficiente morían bajo serodeprivación (Tsukada y Ohsumi, 1993). Más tarde, Kuma y sus colaboradores publicaron que la autofagia se inducía rápidamente como respuesta a una privación temprana de nutrientes, concluyendo que este proceso celular es necesario para la supervivencia de ratones neonatos ante esa situación de estrés (Kuma *et al.*, 2004). Así pues, la serodeprivación es conocida como uno de los inductores fisiológicos más potentes de la autofagia, que ejerce sus efectos tanto *in vivo* como *in vitro* (Mizushima *et al.*, 2010). En el presente estudio se observó que, en los condrocitos humanos, la serodeprivación provoca un incremento significativo en la conversión de la proteína LC3I a LC3II (Fig. 2, A), que a su vez se correlaciona con un aumento en la formación de autofagosomas y, por lo tanto, de la actividad autofágica. Estos resultados concuerdan así con lo descrito en la literatura, e indican que la autofagia en condrocitos del cartílago articular es también inducida ante la falta de nutrientes.

Además de este factor adverso, la autofagia también puede ser activada por otros estímulos de estrés como, por ejemplo, el estrés oxidativo. El radical libre óxido nítrico, conocido como una especie reactiva del oxígeno, está involucrado en la inflamación, la función inmunológica, la apoptosis y la autofagia (Park *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015). En varios artículos se ha publicado que esta molécula puede inducir el proceso autofágico en diferentes células (He *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015). Sin embargo, en el presente estudio se ha observado que el tratamiento con SNP, un donador de óxido nítrico, no desencadena la respuesta autofágica en condrocitos humanos (Fig. 2, B). En varios trabajos se demostró que una exposición prolongada a SNP reduce notablemente la viabilidad celular (Park *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015; Lee y Kang, 2016); asimismo, diferentes estudios han reportado que el

óxido nítrico, generado a partir de este compuesto, conduce a la apoptosis en condrocitos (Kim *et al.*, 2002). Basándonos en las publicaciones anteriores y los resultados obtenidos, se podría sugerir que los tratamientos con SNP de 24 horas, realizados en el presente trabajo, no son adecuados para estudiar el mecanismo autofágico en condrocitos humanos, puesto que su efecto prolongado puede estar provocando la muerte celular.

La regulación de la autofagia es compleja y cada vez se descubren más proteínas y vías de señalización que de alguna manera participan en este proceso (Yang *et al.*, 2013). Aunque se ha reportado un nuevo rol de las adipoquinas como reguladoras de la autofagia, no existen estudios en la literatura que evalúen esta función en las células articulares. Bajo este contexto, en el presente trabajo se intentó determinar si HMGB1, una adipoquina pro-inflamatoria, puede regular la respuesta autofágica en condrocitos humanos.

Los resultados obtenidos mostraron que la conversión de la proteína LC3I a LC3II disminuye con el tratamiento de HMGB1 a diferentes dosis y durante diferentes períodos de tiempo (Fig. 3; Fig. 4), indicando una reducción de la actividad autofágica. Asimismo, se contempló la acumulación de los niveles de la proteína p62 durante las primeras ocho horas de tratamiento (Fig. 4), esto podría deberse a la detención de su degradación por un impedimento de la autofagia. En concordancia a lo observado, otros trabajos han descrito que un descenso de la conversión de LC3 o la acumulación de la proteína p62 es indicativo de un proceso autofágico deficiente (Mizushima *et al.*, 2010; Jiang y Mizushima, 2014). No obstante, los resultados no fueron significativos, por lo que, para confirmar la posible capacidad reguladora de la adipoquina HMGB1, se llevó a cabo la medición del flujo autofágico. De esta manera, se observó que HMGB1 impide el flujo autofágico basal en los condrocitos humanos (Fig. 5, A). Sin embargo, la actividad autofágica se restablece a las 24 horas de tratamiento (Fig. 5, B), sugiriendo que la adipoquina actúa de forma temprana perdiéndose su efecto inhibitor en tiempos de exposición prolongados.

También se analizó la expresión génica de HMGB1 tras la inducción e inhibición del proceso autofágico en los condrocitos humanos (Fig 6). En trabajos anteriores, donde se demostró el efecto regulador positivo en la autofagia de ciertas proteínas, se observó un incremento en su expresión génica coincidiendo con la estimulación de este proceso celular (García *et al.*, 2016). Al contrario, los resultados obtenidos no mostraron cambios en los niveles de ARNm de HMGB1 cuando la autofagia fue inducida por serodeprivación y

mediante un tratamiento con el inductor rapamicina. Así pues, cabría pensar que la adipoquina evaluada no participa en una regulación positiva de la autofagia. Cuando la degradación autofágica fue impedida por la cloroquina, tampoco se observaron cambios en la expresión génica; esto sugiere que, aunque HMGB1 sí parece inhibir el mecanismo autofágico, no ejerce su función cuando se produce el bloqueo de las etapas más tardías de este proceso.

Por otra banda, se estudió el papel de HMGB1 en la modulación de mTOR, la diana en mamíferos de rapamicina. Esta proteína existe en dos complejos distintos, mTORC1 y mTORC2; mTORC1 tiene una función primaria en la regulación de la autofagia y está conformado por la quinasa mTOR, la proteína reguladora asociada a mTOR (RAPTOR, *regulatory associated protein of mTOR*) y la proteína similar a la subunidad beta de la proteína G (G β L, *G-protein beta subunit-like protein*). En presencia de factores de crecimiento, altos niveles de aminoácidos y energía, mTORC1 puede ser fosforilado activándose e inhibiendo la autofagia. No obstante, por privación de nutrientes, estrés o falta de factores de crecimiento, mTOR es desactivado y se induce el proceso autofágico (Yang y Klionsky, 2010; Yang *et al.*, 2013). Este complejo también es sensible a la rapamicina, un compuesto que puede inhibirlo y estimular la autofagia (Yang y Klionsky, 2010). En el estudio realizado se observó un aumento significativo en los niveles de fosforilación de mTOR cuando los condrocitos se expusieron a HMGB1 durante las primeras ocho horas de tratamiento (Fig. 7), lo que sugiere que esta adipoquina puede inducir la activación de mTOR. En concordancia a estos resultados, existen evidencias de que ciertas adipoquinas, como la leptina, también pueden activar la vía mTOR (Galgani *et al.*, 2010; Procaccini *et al.*, 2012; Cassano *et al.*, 2014).

Además, recientemente se ha descubierto que la proteína p62 interactúa con la proteína RAPTOR activando el complejo mTORC1 (Duran *et al.*, 2011). Esto implica, que p62, que es degradada durante la autofagia, puede regular también este proceso, creando un sistema de retroalimentación que conduce a su acumulación por inhibición de la autofagia (Moscat y Díaz., 2012). Según los resultados, el aumento de los niveles de p62 coincide con el incremento en la fosforilación de mTOR inducida por HMGB1, indicando que cuando esto ocurre la actividad autofágica es suprimida en los condrocitos humanos acumulándose así la proteína p62 que, a su vez, puede seguir frenando este proceso.

En conjunto, el presente trabajo demuestra que HMGB1 induce la activación de mTOR, y paralelamente, provoca un impedimento del flujo autofágico basal. Teniendo en cuenta que

mTOR es un potente supresor de la actividad autofágica, los resultados obtenidos pueden sugerir que la adipoquina HMGB1 tiene la capacidad moduladora de inhibir la autofagia en condrocitos humanos vía mTOR. Apoyando esta hipótesis, Cassano y sus colaboradores demostraron que la leptina también inhibía el proceso autofágico en linfocitos T mediante la activación de mTOR (Cassano *et al.*, 2014).

Como ya sabemos, la autofagia cumple una función clave en la protección del cartílago y su deficiencia se asocia con el desarrollo de la artrosis. Hasta la actualidad no existe un medicamento capaz de frenar los procesos de degradación del cartílago articular y los tratamientos de esta enfermedad solo son paliativos, reduciendo el dolor y la inflamación. Por todo ello, este descubrimiento hace interesante ampliar el estudio de otras adipoquinas que también podrían tener una función moduladora en la autofagia de las células del cartílago, y por lo tanto en la progresión de la OA, permitiendo así el desarrollo de nuevas terapias eficaces tanto para la prevención como para el tratamiento de la enfermedad.

CONCLUSIONES

1. La conversión de LC3I a LC3II aumenta cuando los condrocitos humanos T/C-28a2 son sometidos a serodeprivación, indicando una posible inducción en la actividad autofágica ante esta situación de estrés.
2. El tratamiento con SNP, un donador de óxido nítrico, no provoca cambios en la conversión de LC3 en períodos de 24 horas, sugiriendo que este compuesto no induce la autofagia en condrocitos humanos durante tratamientos prolongados.
3. Cuando los condrocitos humanos T/C-28a2 son tratados con HMGB1, se produce una reducción de la conversión de LC3I a LC3II y un aumento de los niveles de la proteína p62, indicando una disminución de la actividad autofágica. También se observa el impedimento temprano del flujo autofágico basal y, paralelamente, la fosforilación de mTOR, un potente supresor de la autofagia. Todo ello sugiere que la adipoquina HMGB1 podría poseer la capacidad reguladora de inhibir el mecanismo autofágico en condrocitos humanos mediante la activación de la vía mTOR.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham, E., Arcaroli, J., Carmody, A., Wang, H., Tracey, K. J. (2000). HMGB-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol.* 165: 2950-2954.

Alexopoulos, L. G., Setton, L. A., Guilak, F. (2005). The biomechanical role of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage. *Acta Biomater.* 1(3): 317-325.

Andersson, U., Tracey, K. J. (2011). HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol.* 29: 139-162.

Archer, C. W., Francis, P. (2003). The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol*, 35(4): 401-404.

Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Øvervatn, A., Stenmark, H., Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* 171: 603-614.

Blagojevic, M., Jinks, C., Jeffery, A., Jordan, K. P. (2010). Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage.* 18 (1): 24-33.

Caramés, B., Taniguchi, N., Otsuki S., *et al.* (2010). Autophagy is a Protective Mechanism in Normal Cartilage and its Aging-related Loss is Linked with Cell Death and Osteoarthritis. *Arthritis and Rheum.* 62: 791-801.

Caramés, B., Taniguchi, N., Seino, D., Blanco, F. J., D'Lima, D., Lotz, M. (2012). Mechanical injury suppresses autophagy regulators and pharmacologic activation of autophagy results in chondroprotection. *Arthritis Rheum.* 64: 1182-92.

Carmona, L. (2008). Epidemiología de las enfermedades reumáticas. En: Battle-Gualda, E., Benito, P., Blanco, F.J., Martín, E., (Eds.). *Manual SER de las enfermedades reumáticas.* Madrid: Editorial Panamericana, pp. 6-10.

Cassano, S., Pucino, V., La Rocca, C., Procaccini, C., De Rosa, V., Marone, G., Matarese, G. (2014). Leptin modulates autophagy in human CD4+CD25- conventional T cells. *Metabolism.* 63(10): 1272-1279.

Chan, E. Y., Kir, S., Tooze, S. A. (2007). siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem.* 282: 25464-25474.

Conaghan, P. G., Kloppenburg, M., Schett, G., Bijlsma, J. W. (2014). Osteoarthritis research priorities: a report from a EULAR ad hoc expert committee. *Ann Rheum Dis.* 73(8): 1442-1445.

Conde, J., Gómez, R., Bianco, G., Scotece, M., Lear, P., Diéguez, C., Gómez, J., Lago, F., Gualillo, O. (2011). Expanding the adipokine network in cartilage: identification and regulation of novel factors in human and murine chondrocytes. *Ann Rheum Dis.* 70(3): 551-559.

Cooper, C., Inskip, H., Croft, P., Cambell, L., Smith, G., McLaren, M., Coggon, D. (1998). Individual risk factors for hip osteoarthritis: obesity, hip injury, and physical activity. *Am J Epidemiol.* 147(6): 516-522.

De Toro, F. J. (2004). Anatomía y fisiología articular. En: Battle-Gualda, E., Benito, P., Blanco, F. J., Martín, E., (Eds.). *Manual SER de las enfermedades reumáticas.* Madrid: Editorial Panamericana, pp. 17-19.

Duarte, C., Miranda, A. (2014). Osteoarthritis, obesidad e inflamación. *Mediagraphic.* 3(2): 53-60.

Duran, A., Amanchy, R., Linares, J. F., Joshi, J., Abu-Baker, S., Porollo, A., Hansen, M., Moscat, J., Díaz, M.T. (2011). p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Molecular Cell.* 44: 134-146.

- Errington, R. J., Fricker, M. D., Wood, J. L., Hall, A. C., White, N. S. (1997). Four-dimensional imaging of living chondrocytes in cartilage using confocal microscopy: a pragmatic approach. *Am J Physiol.* 272(3): C1040-C1051.
- Fantuzzi, G. (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 115(5): 911-919.
- Felson, D. T. (2006). Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N Engl Med.* 354(8): 841-848.
- Furuya, N., Yu, J., Byfield, M., Pattingre, S., Levine, B. (2005). The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy.* 1: 46-52.
- Galgani, M., Procaccini, C., De Rosa, V., Carbone, F., Chieffi, P., La Cava, A., *et al.* (2010). Leptin modulates the survival of autoreactive CD4+ T cells through the nutrient/energy-sensing mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Immunol.* 185: 7474-7479.
- García, I., Guillén, M. I., Gomar, F., Pelletier, J., Martel, J., Alcaraz, M. J. (2010). High mobility group box 1 potentiates the pro-inflammatory effects of interleukin-1 β in osteoarthritic synoviocytes. *Arthritis Res Ther.* 12(4): 1-12.
- García, V., Feijóo, S., Rodríguez, D., Mosquera, Abu, E., Bieiras, A., Seoane, L. M., Lear, P., *et al.* (2016). Endolysosomal two-pore channels regulate autophagy in cardiomyocytes. *J Physiol.* 594(11): 3061-3077.
- Goldring, M. B. (2006). Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 20(5): 1003-1025.
- Gómez, R., Lago, F., Gómez, J., Diéguez, C., Gualillo, O. (2009). Adipokines in the skeleton: influence on cartilage function and joint degenerative diseases. *J Mol Endocrinol.* 43(1): 11-8.
- Gómez, R., Conde, J., Scotece, M., Gómez, J. J., Lago, F., Gualillo, O. (2011). What's new in our understanding of the role of adipokines in rheumatic diseases? *Nat Rev Rheumatol.* 7: 528-536.
- Gozuacik, D., Kimchi, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene.* 23(16): 2891-2906.
- Guilak, F., Ratcliffe, A., Mow, V. C. (1995). Chondrocyte deformation and local tissue strain in articular cartilage: a confocal microscopy study. *J Orthop Res.* 13(3): 410-421.
- He, H., Feng, Y. S., Zang, L.H., Liu, W. W., Ding, L. Q., Chen, L. X., Kang, N., Hayashi, T., Tashiro, S., Onodera, S., Qiu, F., Ikejima, T. (2014). Nitric oxide induces apoptosis and autophagy; autophagy downregulates NO synthesis in physalin A-treated A375-S2 human melanoma cells. *Food Chem Toxic.* 71: 128-135.
- Jiang, P., Mizushima, N. (2014). LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. *Methods.* 75: 13-18.
- Jin, D., Zhang, Y., Chen, X. (2011). Lipocalin 2 deficiency inhibits cell proliferation, autophagy, and mitochondrial biogenesis in mouse embryonic cells. *Mol Cell Biochem.* 351: 165-172.
- Kim, S.J., Ju, J.W., Oh, C.D., Yoon, Y.M., Song, W.K., Kim, J.H., Yoo, Y.J., Bang, O.S., Kang, S.S., Chun, J.S. (2002). ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status. *J. Biol. Chem.* 277: 1332-1339.
- Kim, E., Guilak, F., Haider, M. A. (2008). The dynamic mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions under cyclic compressive loading. *J Biomech Eng.* 130(6): 1-22.

- Kingsbury, S. R., Gross, H. J., Isherwood, G., Conaghan, P. G. (2014). Osteoarthritis in Europe: impact on health status, work productivity and use of pharmacotherapies in five European countries. *Rheumatology*. 53(5): 937-947.
- Klionsky, D. J., Emr, D. S. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*. 290(5497): 1717-1721.
- Klionsky, D.J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., Baba, M., Baehrecke, E. H., Bahr, B. A., Ballabio, A. (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. 4: 151-175.
- Kraus, V. B., Blanco, F. J., Englund, M., Karsdal, M. A., Lohmander, L. S. (2015) Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthr Cartil*. 23(8): 1233-1241.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhsa, T., Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 432: 1032-103.
- Lago, F., Diéguez, C., Gómez, J., Gualillo, O. (2007). Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pr Rheum*. 3(12): 716-24.
- Lee, W. K., Kang, J. S. (2016). Modulation of Apoptosis and Differentiation by the Treatment of Sulfasalazine in Rabbit. *Articular Chondrocytes*. 32(2): 115–121.
- Lin, Z., Willers, C., Xu, J., Zheng, M. H. (2006). The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue Eng*. 12(7): 1971-1984.
- Lotze, M. T., Tracey, K. J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 5: 331-342.
- Mantell, L. L., Parrish, W. R., Ulloa, L. (2006). Hmgb-1 as a therapeutic target for infectious and inflammatory disorders. *Shock*. 25: 4-11.
- Martel, J., Boileau, C, Pelletier, J. P., Roughley, P. J. (2008). Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 22(2): 351-384.
- Meijer, A. J., Codogno, P. (2004). Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 36: 2445-2462.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., *et al.* (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell*. 15(3): 1101-1111.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*. 3: 542-545.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., Levine, B. (2010). *Primer Methods in Mammalian Autophagy Research*. Cell. 140: 313–326.
- Moscat, J., Díaz, M. T. (2012). Feedback on fat: p62-mTORC1-autophagy connections. *Cell*. 147(4): 724-727.
- Moskowitz, R. W., Howell, D. S., Goldberg, V. M., Mankin, H. J. (2001). *Osteoarthritis. Diagnosis and medical and surgical managment*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Muir, H. (1995). The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules*. *Bioessays*, 17(12): 1039-1048.

- Mow, V. C., Wang, C. C., Hung, C. T. (1999). The extracellular matrix, interstitial fluid and ions as a mechanical signal transducer in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 7(1): 41-58.
- Nativel, B., Marimoutou, M., Thon-hon, V. G., Gunasekaran, M. K., Andries, J., *et al.* (2013). Soluble HMGB1 Is a Novel Adipokine Stimulating IL-6 Secretion through RAGE Receptor in SW872 Preadipocyte Cell Line: Contribution to Chronic Inflammation in Fat Tissue. *PLoS One*. 8(9), 1–11.
- Nepal, S., Kim, M. J, Hong, J. T, Kim, S. H., Sohn D. H., Lee, S. H., Song, K., Choi, D. Y., Lee, E. S., Park, P. H. (2015). Autophagy induction by leptin contributes to suppression of apoptosis in cancer cells and xenograft model: Involvement of p53/FoxO3A axis. *Oncotarget*. 30(9): 7166-7189.
- Ohsumi, Y., Mizushima, N. (2004). Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy. *Semin Cell Dev Biol*. 15: 231-236.
- Otsuki, S., Hanson, S. R., Miyaki, S., Grogan, S. P., Kinoshita, M., Asahara, H., Wong, C. H., Lotz, M. K. (2010). Extracellular sulfatases support cartilage homeostasis by regulating BMP and FGF signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(22): 10202-10207.
- Park, M. Y., Jeong, Y. J., Kang, G. C., Kim, M., Kim, S. H., Chung, H. J., Jung, J. Y., Kim, W. J. (2014). Nitric Oxide-Induced Apoptosis of Human Dental Pulp Cells Is Mediated by the Mitochondria-Dependent Pathway. *Korean J Physiol Pharmacol*. 18(1): 25–32.
- Peña, A. H., Fernández, J. C. (2007). Prevalencia y factores de riesgo de la osteoartritis. *Reumatol Clin*. 3: 6-12.
- Procaccini, C., De Rosa, V., Galgani, M., Carbone, F., Cassano, S., Greco, D., *et al.* (2012). Leptin-induced mTOR activation defines a specific molecular and transcriptional signature controlling CD4+ effector T cell responses. *J Immunol*. 189: 2941-2953.
- Rubinsztein, D. C., Cuervo, A. M., Ravikumar, B., Sarkar, S., Korolchuk, V., Kaushik, S., Klionsky, D. J. (2009). In search of an “autophagometer”. *Autophagy*. 5: 585-589.
- Rubinsztein, D. C., Marino, G., Kroemer, G. (2011). Autophagy and aging. *Cell*. 146(5): 682-695.
- Ribeiro, M., López, P., Blanco, F. J., Mendes, A. F., Caramés, B. (2015). Insulin decreases autophagy and leads to cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage*. 24(4): 731-739.
- Rocchi, A., & He, C. (2016). Emerging roles of autophagy in metabolism and metabolic disorders. *Front Biol (Beijing)*. 10(2): 154–164.
- Sánchez, J. C. (2008). Fisiología del condrocito celular. *Rev Colomb Reumatol*. 25: 21-23.
- Sánchez, J. C., López, D. F. (2011). Fisiopatología celular de la osteoartritis: el condrocito articular como protagonista. *Iatreia*. 24(2): 167-178.
- Scotece, M., Conde, J., López, V., Lago, F., Pino, J., Gómez, J. J., Gualillo, O. (2014). Adiponectin and leptin: new targets in inflammation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 114(1): 97-102.
- Scott, R. C., Schuldiner, O., Neufeld, T. P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev Cell*. 7: 167-78.
- Stromhaug, P. E., Seglen, P. O. (1993). Evidence for acidity of prelysosomal autophagic/endocytic vacuoles (amphisomes). *Biochem J*. 291: 115-121.
- Tang, D., Kang, R., Cheh, C. W., Livesey, K. M., Liang, X., Schapiro, N. E., Benschop, R., Sparvero, L. J., Amoscato, A. A., Tracey, K. J., Zeh, H. J., Lotze, M. T. (2010). HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. *Oncogene*. 29: 5299-5310.

Tanida, I., Minematsu, N., Ueno, T., Kominami, E. (2005). Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*. 1: 84-91.

Thorburn, A. (2008). Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis*. 13: 1-9.

Trujillo, E. (2004). Composición y fisiología del tejido conjuntivo. El cartílago. En: Battle-Gualda, E., Benito, P., Blanco, F. J., Martín, E. (Eds). *Manual SER de las enfermedades reumáticas*. Madrid: Editorial Panamericana, pp. 13-6.

Tsukada, M., Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 333: 169-174.

Tsung, A., Sahai, R., Tanaka, H., Nakao, A., Fink, M. P., Lotze, M. T., Yang, H., Li, J., Tracey, K. J., Geller, D. A., Billiar, T. R. (2005). The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemiare perfusion. *J Exp Med*. 201: 1135-1143.

Wang, A. L., Boulton, M. E., Dunn, W. A., Rao, H. V., Cai, J., Lukas, T. J., Neufeld, A. H. (2009). Using LC3 to monitor autophagy flux in the retinal pigment epithelium. *Autophagy*. 5(8): 1190-1193.

Wilkins, R. J., Browning, J. A., Ellory, J. C. (2000). Surviving in a matrix: membrane transport in articular chondrocytes. *J Membr Biol*. 177(2): 95-108.

Wilusz, R. E., Sánchez, J., Guilak, F. (2014). The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biol*. 39: 25-32.

Xie, Z., D. J., Klionsky (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*. 9(10): 1102-9.

Xu, A., Sweeney, G. (2015). Emerging role of autophagy in mediating widespread actions of ADIPOQ/adiponectin. *Autophagy*. 11: 723-724.

Yang, Z., Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology*. 22(2): 24-131.

Yang, J., Carra, S., Zhu, W., Kampinga, H. H. (2013). The Regulation of the Autophagic Network and Its Implications for Human Disease. *Int J Biol Sci*. 9(10): 1121-1133.

Yang, J. Y., Park, M. Y., Park, S. Y., Yoo, H., Kim, M. S., Kim J. H., Kim, W. J., Jung, J. Y. (2015). Nitric Oxide-Induced Autophagy in MC3T3-E1 Cells is Associated with Cytoprotection via AMPK Activation. *Korean J Physiol Pharmacol*. 19: 507-514.

Yusuf, E., Nelissen, R. G., Ioan, A., Stojanovic, V., DeGroot, J., van Osch, G., Middeldorp, S., Huizinga, T. W., Kloppenburg, M. (2010). Association between weight or body mass index and hand osteoarthritis: a systematic review. *Ann Rheum Dis*. 69(4): 761-765.

Zhu, L., Huang, G., Sheng, J., Fu, Q., Chen, A. (2016). High-mobility group box 1 induces neuron autophagy in a rat spinal root avulsion model. *Neuroscience*. 315: 286-295.