



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

MÁSTER EN ASISTENCIA MÉDICA E INVESTIGACIÓN SANITARIA
ESPECIALIDAD EN: FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
CURSO ACADÉMICO 2015-2016

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**Implicación del factor de transcripción Nrf2 en
la expresión de mediadores inflamatorios
involucrados en el desarrollo de la artritis
reumatoide. Efecto de una dieta antioxidante.**

Jennifer Adriana Fernández Rodríguez

28 de julio de 2016



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**Implicación del factor de transcripción Nrf2
en la expresión de mediadores inflamatorios
involucrados en el desarrollo de la artritis
reumatoide. Efecto de una dieta antioxidante.**

Trabajo de Fin de Máster que presenta la alumna Jennifer Adriana Fernández Rodríguez bajo la dirección de la Dra. María José López Armada y la Dra. Maylin Almonte Becerril.

RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica de carácter autoinmune que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial. Su estrategia terapéutica se basa en fármacos dirigidos a reducir la inflamación de las articulaciones; sin embargo, debido al carácter crónico de esta enfermedad, estos tratamientos tienen importantes efectos adversos, además de un alto coste. Esto ha motivado un gran auge en el estudio del potencial terapéutico de antioxidantes naturales, como el resveratrol (RSV), como nuevas y complementarias oportunidades de tratamiento. Previamente, nuestro grupo ha demostrado que la suplementación oral de RSV podría reducir los principales signos de la patología de la AR, como son una reducción de la hiperplasia sinovial, del infiltrado inmune en la articulación y de la producción de mediadores inflamatorios, además del estrés y daño oxidativo típicos de una articulación artrítica, previniendo así la progresión de la enfermedad. Continuando con este estudio, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar en un modelo *in vivo* de artritis inducida por antígeno (AIA) si el RSV es capaz de modular la expresión del factor de transcripción Nrf2, que se ha erigido como el más importante mecanismo de transcripción implicado en el incremento de la expresión de genes antioxidantes y en el mantenimiento del equilibrio *redox*; así como los procesos de angiogénesis y autofagia, mecanismos claves en el control de la proliferación anormal que caracteriza el tejido sinovial AR. Asimismo, mediante análisis *in vitro* se realizó el silenciamiento del factor de transcripción Nrf2 en sinoviocitos para valorar su implicación en el control de la respuesta inflamatoria y si el RSV ejerce el efecto protector a través de la inducción de Nrf2. Los resultados demostraron que el RSV fue capaz de activar el factor de transcripción Nrf2, y modular la expresión de marcadores autofágicos y angiogénicos. Todo ello sugiere que el RSV es capaz de modular la hiperplasia sinovial incrementando la muerte celular por autofagia, y limitando el proceso angiogénico, y apoya el uso de RSV como una nueva estrategia terapéutica en el tratamiento de la AR.

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é una doenza inflamatoria e crónica de carácter autoimune que afecta aproximadamente ó 1% da poboación mundial. A súa estratexia terapéutica basase en fármacos dirixidos a reducir a inflamación das articulacións; sin embargo, debido ó carácter crónico desta doenza, ditos tratamentos teñen importantes efectos adversos, ademais dun custo elevado. Isto ha motivado un gran auxe no estudio do potencial terapéutico de antioxidantes naturais, como o resveratrol (RSV), como novas e complementarias oportunidades de tratamento. Previamente, noso grupo ha demostrado que a suplementación oral de RSV podería reducir os principais signos da patoloxía da AR, como son una redución da hiperplasia sinovial, do infiltrado inmune na articulación y da produción de mediadores inflamatorios, ademais do estrés e dano oxidativo típicos dunha articulación artrítica, previniendo así a progresión da enfermidade. Continuando con este estudo, o obxectivo deste traballo foi avaliar nun modelo *in vivo* de artrite inducida por antíxeno (AIA) se o RSV é capaz de modular a expresión do factor de transcripción Nrf2, que se ha erixido como o máis importante mecanismo de transcripción implicado no incremento da expresión de xenes antioxidantes e no mantemento do equilibrio *redox*; así coma os procesos de anxioxénese e autofaxia, mecanismos claves no control da proliferación anormal que caracteriza o tecido sinovial AR. Así mesmo, mediante análise *in vitro* realizouse o silenciamento do factor de transcripción Nrf2 en sinoviocitos para avaliar a súa implicación no control da resposta inflamatoria e si o RSV exerce o efecto protector a través da indución de Nrf2. Os resultados demostraron que o RSV foi capaz de activar o factor de transcripción Nrf2, e modular a expresión de marcadores autofáxicos e anxioxénicos. Todo isto suxire que o RSV é capaz de modular a hiperplasia sinovial incrementando a morte celular por autofaxia, e limitando o proceso anxioxénico, e apoia o uso de RSV como unha nova estratexia terapéutica no tratamento da AR.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory, chronic and autoimmune joint disease that affects approximately 1% of the population. Its therapeutic strategy is based on drugs aimed at reducing inflammation of the joints; however, due to the chronic nature of this disease, these treatments have significant side effects, and a high cost. This has motivated an increase in the study of the therapeutic potential of natural antioxidants such as resveratrol (RSV), as new and complementary treatment opportunities. Previously, our group has shown that oral supplementation of RSV could reduce the main signs of the pathology of RA, such as a reduction in synovial hyperplasia, immune infiltrate in the joint and the production of inflammatory mediators, in addition to the stress and oxidative damage typical of an arthritic joint, thus preventing disease progression. Carrying on with this study, the aim of this project was to evaluate in an *in vivo* antigen-induced arthritis model (AIA) if the RSV is able to modulate the expression of the Nrf2 transcription factor, which has emerged as the most important mechanism transcription involved in the increased expression of antioxidant genes and in maintaining the redox balance; as well as angiogenesis and autophagy processes, key mechanisms in controlling abnormal proliferation that characterizes RA synovium. Furthermore, *in vitro* analysis by silencing Nrf2 transcription factor in synoviocytes was performed to evaluate its involvement in controlling the inflammatory response and if the RSV exerts the protective effect by inducing Nrf2. The results showed that RSV was able to activate Nrf2 transcription factor, and modulate the expression of autophagic and angiogenic markers. This suggests that RSV is able to modulate synovial hyperplasia increasing autophagic cell death, and limiting the angiogenic process, and supports the use of RSV as a new therapeutic strategy in the treatment of RA.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. ARTRITIS REUMATOIDE.....	1
1.2. LA MEMBRANA SINOVIAL.....	2
1.3. PATOGÉNESIS DE LA AR.	2
1.3.1. Inflamación durante la AR.....	4
1.3.2. Angiogénesis.	5
1.3.3. Estrés oxidativo en la AR.	7
1.3.4. Autofagia.	8
1.4. EL RESVERATROL.	8
1.4.1. Factor de transcripción Nrf2.....	9
1.5. SILENCIAMIENTO GÉNICO.....	12
2. OBJETIVO GENERAL.....	12
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	13
3.1. MODELO ANIMAL.....	13
3.1.1. Animales.....	13
3.1.2. Inducción de la artritis y grupos de estudio.	14
3.1.3. Sacrificio de los animales y obtención de las muestras.....	15
3.1.4. Tinciones inmunohistoquímicas	15
3.2. OBTENCIÓN Y CULTIVO PRIMARIO DE SINOVIOCITOS.....	17
3.3. SILENCIAMIENTO DE NRF2.....	17
3.3.1. Estimulación celular.	18
3.4. PROCESAMIENTO DE LAS CÉLULAS PARA ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	19
3.4.1. Extracción de ARNm y tratamiento con ADNasa.....	19

3.4.2. Retrotranscripción de ARNm a ADNc.	20
3.4.3. PCR a tiempo real.	20
3.5. PROCESAMIENTO DE LAS CÉLULAS PARA ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.	21
3.5.1. Detección de proteínas mediante IF en células.	21
3.6. ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN ESTADÍSTICA.	22
4. RESULTADOS.	23
4.1. CAMBIOS HISTOLÓGICOS DE LA MEMBRANA SINOVAL DE UN MODELO AIA.	23
4.1.2. EFECTO DEL RSV EN LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Nrf2 DURANTE EL DESARROLLO DE AIA.	24
4.1.3. EFECTO DEL RSV EN LA EXPRESIÓN DE CATALASA DURANTE EL DESARROLLO DE AIA.	25
4.1.4. EFECTO DEL RSV EN LA EXPRESIÓN DE ANGIOPOYETINA-1 DURANTE EL DESARROLLO DE AIA.	27
4.1.5. EFECTO DEL RSV SOBRE LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA DURANTE EL DESARROLLO DE AIA.	28
4.2. ESTUDIO <i>in vitro</i> DEL EFECTO DEL RSV EN LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Nrf2.	29
4.2.1 ESTUDIO <i>in vitro</i> DEL EFECTO DEL RESVERATROL EN LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA ANTIOXIDANTE SUPERÓXIDO DISMUTASA- 1 EN SINOVIOCITOS DE RATA EN CULTIVO.	33
5. DISCUSIÓN.	35
6. CONCLUSIONES.	41
6.1. CONCLUSIONS.	42
7. AGRADECIMIENTOS.	43
8. BIBLIOGRAFÍA.	43

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.	Anatomía de la membrana sinovial de una rodilla de rata.....	3
Figura 2.	Evolución de la AR en la articulación de la rodilla.....	4
Figura 3.	Angiogénesis dirigida por citoquinas pro-inflamatorias liberadas por sinoviocitos AR del <i>lining</i>	6
Figura 4.	Estructura del factor de transcripción Nrf2.....	10
Figura 5.	Mecanismo de regulación y activación del factor de transcripción Nrf2.....	11
Figura 6.	Evaluación de los cambios histológicos a nivel de la membrana sinovial de la articulación de rodilla durante el proceso inflamatorio en un modelo AIA.....	24
Figura 7.	Efecto del resveratrol en la expresión del factor de transcripción Nrf2.....	25
Figura 8.	Efecto del resveratrol en la expresión de catalasa.....	26
Figura 9.	Efecto del resveratrol en la expresión de angiopoyetina-1.....	27
Figura 10.	Efecto del RSV sobre la expresión de vacuolas autofágicas.....	29
Figura 11.	Expresión del factor de transcripción Nrf2.....	30
Figura 12.	Expresión del ARNm del factor de transcripción Nrf2 bajo el efecto de distintos tratamientos.....	31
Figura 13.	Expresión proteica del factor de transcripción Nrf2 bajo el efecto de distintos tratamientos.....	32
Figura 14.	Expresión proteica de la enzima antioxidante superóxido dismutasa-1.....	34

ABREVIATURAS

ADNc: ADN complementario.

AIA: artritis inducida por antígeno.

Ang-1: angiopoyetina-1.

ANOVA: análisis de varianza (**analysis of variance**)

AR: artritis reumatoide.

ARE: elemento de respuesta antioxidante.

ARN: ácido ribonucleico.

CAT: catalasa.

EEM: media del error estándar.

HPRT: hipoxantina fosfo-ribosil transferasa 1.

H&E: hematoxilina y eosina.

IF: inmunofluorescencia.

IHQ: inmunohistoquímica.

IL-1 β : interleucina-1 *beta*.

mBSA: seroalbúmina bovina metilada.

MMPs: metaloproteasas de matriz.

PBST: PBS pH 7.6 con 0.2% de Tween[®] 20.

PFA: paraformaldehído.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

rpm: revoluciones por minuto.

RSV: resveratrol.

SBF: suero bovino fetal.

SC: siARN control.

siARN: ARN de silenciamiento.

SFs: sinoviocitos de tipo fibroblasto.

SOD: superóxido dismutasa.

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

TTS: tampón Tris salino (pH 7.5).

TTS-LT: leche descremada en polvo al 5% en tampón Tris salino y con Tween-20 al 0,1%.

vs.: *versus*.

WB: western-blot.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. ARTRITIS REUMATOIDE.

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica de mecanismo autoinmune. Actualmente, afecta aproximadamente al 1% de la población mundial (1, 2); mientras que en España afecta al 0,5 % de la población, lo que corresponde a 1 caso por cada 200 habitantes (2, 3). El inicio de la AR puede darse a cualquier edad; sin embargo, se observa una mayor incidencia en un rango de edades entre los 40 y 70 años. Asimismo, su frecuencia es mayor en mujeres que en hombres, mostrando un ratio de pacientes mujer-hombre de 2-3:1(3).

La etiología de la AR es compleja, por lo que hoy en día aún se desconoce la causa desencadenante del proceso autoinmune dentro de la propia articulación. Sin embargo, se considera que la compleja interacción de distintos factores genéticos, ambientales, y cambios somáticos que se producen con el tiempo en ciertas células (fibroblastos, macrófagos, células T y células B), juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (3-5). De este modo, a pesar de desencadenar un proceso de autoinmunidad sistémico, el desarrollo de la AR se localiza principalmente en las articulaciones diartrodiales o sinoviales y en las vainas tendinosas de la membrana sinovial; en la cual, se genera el proceso inflamatorio que conduce a la destrucción de los tejidos adyacentes (hueso, cartílago o tendones), la deformidad articular y finalmente, la pérdida funcional (1, 2).

Debido a que la AR es una enfermedad sumamente dolorosa e incapacitante, es de gran importancia diseñar nuevas estrategias de investigación para su estudio. Por este motivo, el uso de cultivos celulares y modelos experimentales, ha permitido conocer y estudiar *in vitro* e *in vivo*, los mecanismos iniciales y al mismo tiempo, seguir una cinética del proceso degenerativo de la AR, con el objetivo final de diseñar terapias

efectivas contra esta patología, que den lugar a un mejor control del paciente con AR.

1.2. LA MEMBRANA SINOVIAL.

La AR se caracteriza fundamentalmente por presentar una alteración en la morfología, función y composición de la membrana sinovial (4). La membrana sinovial normal es una estructura especializada que cubre la cara interna de las articulaciones diartrodiales y participa activamente en la regulación de numerosas funciones biológicas, entre ellas, la elaboración del líquido sinovial (que nutre y lubrica el cartílago) y la defensa inmunitaria. En cuanto a su anatomía, la membrana sinovial (Fig. 1) es un tejido relativamente acelular, constituido por dos capas celulares (1, 2, 6, 7):

- Capa subíntima (*sublining*): capa profunda y poco definida de tejido conjuntivo laxo, vascularizado e innervado. Se compone de pocas células, algunos vasos sanguíneos, adipocitos y fibroblastos (Fig.1).

- Capa íntima (*synovial lining*): capa superficial avascularizada que está en contacto directo con la cavidad intraarticular donde se encuentra el líquido sinovial. Presenta de 1 a 3 capas de células, formada fundamentalmente por sinoviocitos tipo A o macrófagos sinoviales (células con actividad fagocítica), y sinoviocitos tipo B o de tipo fibroblasto (SFs); los cuales constituyen aproximadamente dos tercios de todos los sinoviocitos que se encuentran en la membrana sinovial (Fig. 1).

1.3. PATOGÉNESIS DE LA AR.

En la patogénesis de la AR, participan todas las células responsables de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, tales como los linfocitos reclutados de la circulación, y las células residentes de la membrana sinovial (1). Entre estas últimas, destacan los SFs, los cuales

sufren una transformación hacia un fenotipo agresivo inflamatorio, que se mantiene activo durante todo el proceso patológico que conlleva la AR (4). Así, los sinoviocitos son considerados mediadores cruciales del daño tisular que se produce en la AR; esto es debido a que contribuyen activamente a la producción local de citoquinas, pequeñas moléculas mediadoras de la inflamación, y de enzimas proteolíticas involucradas en la degradación de la matriz extracelular (8)

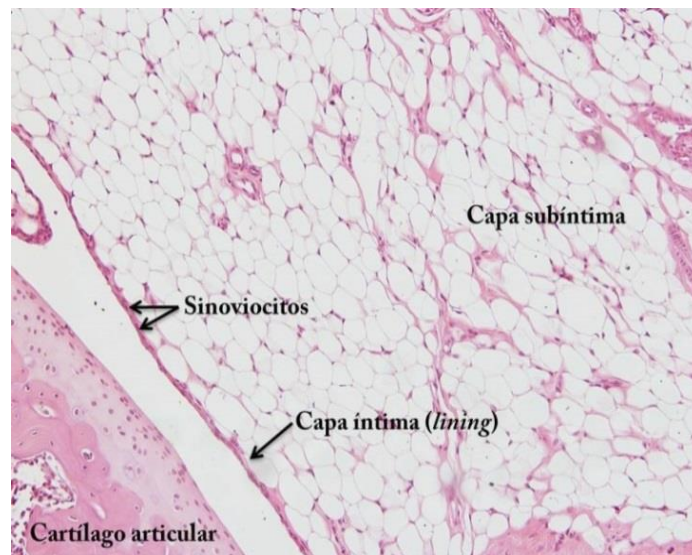


Figura 1. Anatomía de la membrana sinovial de una rodilla de rata. Imagen representativa de los componentes de la membrana sinovial. Tejido sinovial teñido con hematoxilina de Harris y eosina (H&E) a una magnificación de 10x.

Desde etapas iniciales de la enfermedad (Fig. 2), se observa una incipiente hiperplasia sinovial, con la consecuente proliferación e hipertrofia de los sinoviocitos; eventos que se intensifican durante el proceso degenerativo de la AR (4). Así, la membrana sinovial acaba por transformarse en una masa de tejido denominado *pannus*, cuyas características invasivas recuerdan a las de un tumor, y que tiene como consecuencia la invasión y degradación de la superficie del cartílago y el hueso, aumentando la severidad de la enfermedad. A todo ello, se suma la transformación y crecimiento de la microvasculatura (angiogénesis) que supone otro marcador histológico del tejido sinovial (1, 4, 9).

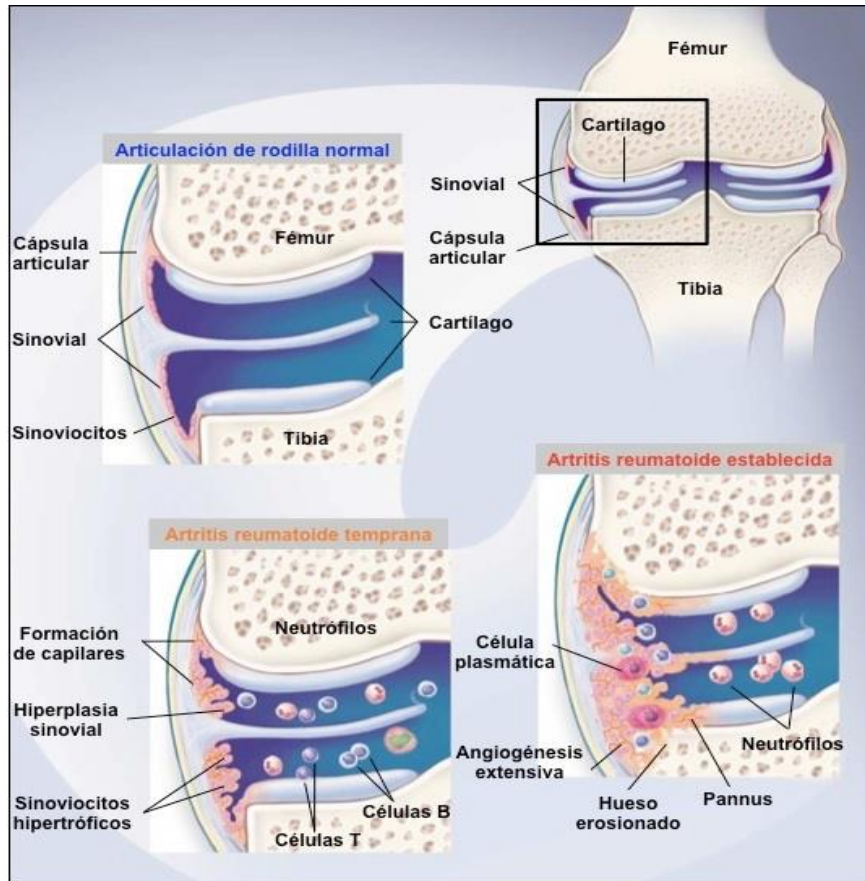


Figura 2. Evolución de la AR en la articulación de la rodilla. Muestra los cambios presentes en la articulación durante la patogénesis de la AR. Durante la AR temprana se observa hiperplasia e hipertrofia de la membrana sinovial; así como la formación de una nueva red de capilares sanguíneos. Esta situación se agrava con la enfermedad establecida, teniendo como consecuencia la formación del “*pannus*” que invade y destruye cartilago y hueso subcondral. Modificada de Choy, EH (10).

1.3.1. Inflamación durante la AR.

La inflamación es un mecanismo fundamental en la reparación tisular, que implica la integración de múltiples señales en distintas células y órganos (11).

Durante la AR, los linfocitos participan de forma activa en la inflamación de la membrana sinovial, induciendo la liberación de mediadores pro-inflamatorios solubles que incluyen, a citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-1 beta (IL-

1 β) hacia la membrana sinovial. Dichas moléculas, activan a células residentes en la membrana sinovial, favoreciendo la hiperplasia e hipertrofia de los SFs, lo que aumenta el dolor y la inflamación en la articulación (12, 13, 14).

Como resultado de lo anterior, se produce un evento temprano de formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), que supone la infiltración continuada de leucocitos; los cuales median la transformación de la membrana sinovial en el *pannus* que provoca la degradación progresiva de la articulación (15). De este modo y debido a que la arquitectura de dicha microvasculatura es muy variable, la eficiencia con la que se suministra oxígeno al tejido sinovial es pobre; así, se crea un microambiente hipóxico en la articulación, asociado con un incremento y perpetuación de la inflamación articular (15).

1.3.2. Angiogénesis.

La angiogénesis trata un conjunto de eventos (Fig. 3) que comienza con la proliferación y migración de células endoteliales, seguida por la formación de la membrana basal. Posteriormente, se crea la red de capilares y se estabiliza el flujo sanguíneo para entrar en un periodo prolongado de reorganización vascular. El producto final es un lecho microvascular que responde a cambios locales en los requerimientos metabólicos (16).

Durante el proceso degenerativo de la AR, el ambiente hipóxico generado como consecuencia de la hiperplasia sinovial, en conjunto con el proceso inflamatorio crónico generado en la membrana sinovial, inducen un incremento en la densidad de vasos sanguíneos, favoreciendo así la angiogénesis sinovial. Sin embargo, aunque la finalidad inicial es la reparación, el aporte de nutrientes y el aumento del oxígeno en el tejido, la presencia de una gran cantidad de vasos sanguíneos también aumenta

la susceptibilidad de las células endoteliales que rodean los vasos a la acción de citoquinas y metaloproteasas, generando un daño articular (17)

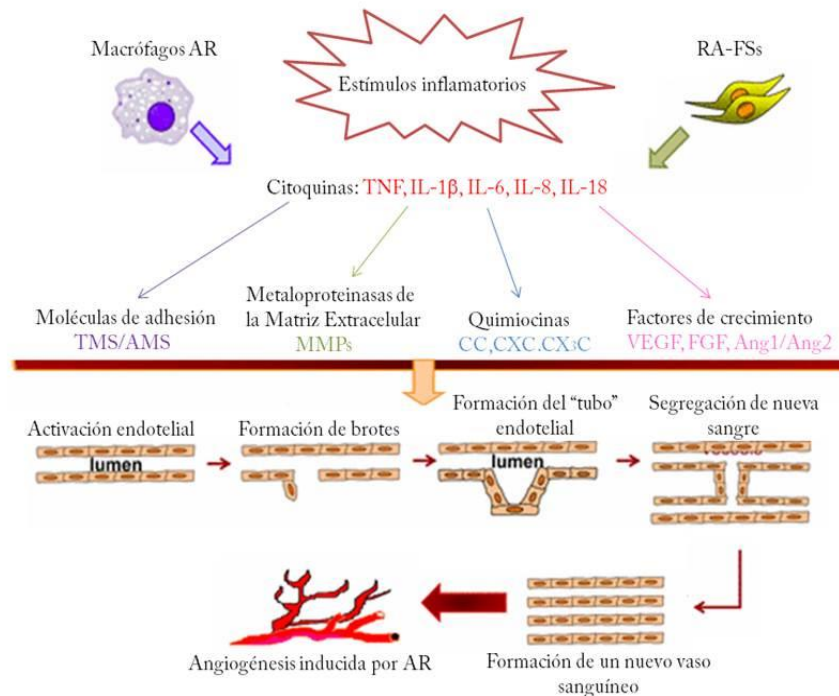


Figura 3. Angiogénesis dirigida por citoquinas pro-inflamatorias liberadas por sinoviocitos AR del lining. En respuesta a estímulos inflamatorios los macrófagos y sinoviocitos de la membrana sinovial producen citoquinas pro-inflamatorias que modulan la expresión de mediadores angiogénicos. Los numerosos eventos de la angiogénesis están relacionados con la migración y proliferación endotelial para la formación de nuevos túbulos vasculares, separación de los nuevos vasos sanguíneos ya maduros y su interconexión para formar la nueva red vascular. Modificada de Paleolog, EM (17).

Cada uno de los eventos que componen el proceso de angiogénesis en la AR está sujeto a la regulación por una amplia variedad de factores. Así, entre los moduladores de la angiogénesis destacan el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, acrónimo para el inglés *vascular endothelial growth factor*), angiopoyetina-1 (Ang-1) y metaloproteasa-9 (MMP-9), por ser claves en la proliferación, migración y maduración de los vasos sanguíneos (18).

1.3.3. Estrés oxidativo en la AR.

Se define como estrés oxidativo el desequilibrio entre agentes oxidantes, también conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS, acrónimo para el inglés *reactive oxygen species*) y antioxidantes, incapaces de llevar a cabo la detoxificación de las ROS en el organismo (3, 19). Las ROS (peróxido de hidrógeno, los radicales superóxido y los radicales hidroxilo) son generadas durante el metabolismo aeróbico normal de las células, y juegan un papel fisiológico importante ya que son necesarias tanto para las funciones celulares normales, tales como la proliferación celular, agregación, quimiotaxis y apoptosis; como también, para la regulación de vías de señalización intracelular y la actividad de diversos factores de transcripción (20).

En condiciones normales, la producción de ROS se encuentra regulada por el sistema de defensa antioxidante del organismo. Así, las enzimas antioxidantes hemoxygenasa-1 (HO-1), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y enzimas con actividad peroxidasa, se encargan de secuestrar las ROS y eliminarlas, manteniendo así un equilibrio *redox*. En contraste, cuando se producen más ROS que las que el sistema de defensa antioxidante es capaz de eliminar, se da un estado de desequilibrio *redox*, causando daños en numerosos componentes celulares (3, 20).

Durante el proceso inflamatorio de la AR, el estrés oxidativo ha sido descrito como un importante mecanismo que contribuye a la activación y perpetuación de la respuesta inmune e inflamatoria. Asimismo, se ha demostrado la presencia de neutrófilos activos en el líquido sinovial de pacientes con AR, hecho que incrementa el contenido de ROS y favorece el desequilibrio *redox* en la articulación (21). Por otro lado, se ha sugerido que el estrés oxidativo es capaz de regular el proceso adaptativo de autofagia (22).

1.3.4. Autofagia.

La autofagia es un mecanismo adaptativo en el cual partes del citoplasma y orgánulos celulares son secuestrados en vacuolas autofagicas denominadas autofagosomas (vesículas de doble membrana) y finalmente son degradadas en los lisosomas (23). Trabajos previos han mostrado que la autofagia puede ser una respuesta adaptativa ante el estrés oxidativo y que protege a diversas células tumorales de la muerte inducida por quimioterapia, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, inducción persistente de autofagia, también es responsable de inducir muerte celular (24, 25, 26). De este modo, la autofagia usualmente sirve como un adaptador entre la muerte celular y la supervivencia.

La proteína asociada al microtúbulo de la cadena ligera 3 (LC3) es el mayor constituyente de los autofagosomas. De este modo, en condiciones normales, LC3 se encuentra disperso en el citoplasma en su forma LC3I; sin embargo, durante la autofagia, LC3 se fragmenta y se une a los autofagosomas dando origen al LC3II (27).

1.4. EL RESVERATROL.

El resveratrol (trans-3,4',5-trihidroxistilbeno) es un polifenol natural aislado por primera vez de las raíces de la planta medicinal oriental *Polygonum cuspidatum*, y que se incluye dentro de una amplia variedad de antioxidantes de origen vegetal conocidos como fitoalexinas, ya que son sintetizados por las plantas en respuesta a condiciones de estrés, como la radiación UV, la infección por hongos, y otros daños de origen biológico o químico (28, 29, 30). El RSV está presente en numerosos productos que forman parte de la dieta normal como las moras, cacahuetes, arándanos, soja, y uvas negras y sus productos derivados, el zumo de uva o el vino tinto (29).

Se han descrito un gran número de actividades farmacológicas en relación con el RSV, como son las antiinflamatorias, antiangiogénicas, anti-tumorales, cardioprotectoras y neuroprotectoras. (30, 31). En concreto, se ha descrito que el RSV es capaz de inducir la diferenciación celular; la eliminación de ROS; la activación de vías antiinflamatorias; e inducir la muerte celular programada por apoptosis y/o autofagia; entre otras (3, 30).

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, en distintas enfermedades inflamatorias y de carácter autoinmune, utilizando el RSV como posible agente terapéutico. En cuanto a la AR, se ha visto como el RSV ejerce un efecto antiinflamatorio al atenuar la expresión de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 β , TNF- α y MMPs (3). Además, se ha descrito que el RSV actúa como un antioxidante natural secuestrando radicales libres de oxígeno y promoviendo la actividad de gran variedad de enzimas antioxidantes como SOD o CAT, entre otras (32). Asimismo, estudios desarrollados en nuestro laboratorio demuestran que el RSV es capaz de reducir las principales características patológicas de la AR, disminuyendo la severidad de la enfermedad en la fase aguda y reduciendo la respuesta inflamatoria tanto *in vivo* como *in vitro* (33, 28).

Por otro lado, estudios previos han demostrado que el RSV es capaz de inducir la expresión de algunos genes implicados en la respuesta antioxidante, entre los cuales destaca el gen que codifica para el factor de transcripción Nrf2.

1.4.1. Factor de transcripción Nrf2.

La producción incontrolada de ROS en respuesta a desequilibrios en el metabolismo interno o a la acción de determinados agentes externos, desencadena una situación de estrés oxidativo que desempeña un papel decisivo en la fisiopatología de múltiples enfermedades, al verse

deteriorada la función celular (34). Así, el contacto con agentes oxidantes provoca diversas respuestas adaptativas en las células, incluyendo la activación transcripcional de genes que codifican para proteínas de función antioxidante (35). El factor de transcripción Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2 - related factor 2*) es un regulador clave de la respuesta antioxidante, que contribuye a mantener la homeostasis *redox* intracelular mediante la inducción de la expresión de una compleja red que comprende cerca de 500 genes que codifican para enzimas detoxificantes de fase II, con diferentes funciones citoprotectivas y antioxidantes (36).

Nrf2 pertenece a una familia de factores de transcripción *Cap 'n' collar* que contiene una cremallera de leucina (bZip) en la región C-terminal; una región básica localizada corriente arriba de bZip (responsable de la unión al ADN), y una región ácida, la cual es requerida para la activación transcripcional (6). Como proteína, Nrf2 contiene 605 aminoácidos y presenta un peso aproximado de 64-68 KDa. Asimismo, está integrado por seis dominios funcionales que han sido altamente conservados a través de las especies, y se han denominado dominios Neh 1-6 (*Nrf2-ECH homology 1-6*) (6, 37) (Fig. 4).



Figura 4. Estructura del factor de transcripción Nrf2. Muestra los componentes que constituyen al gen que codifica al factor de transcripción Nrf2. Tomada de Ibáñez Torres, L (6).

Como sucede en muchos otros factores de transcripción, la señalización de Nrf2 se encuentra regulada por la segregación compartimental (38) (Fig. 5). En condiciones fisiológicas normales, Nrf2 se encuentra unido a la proteína asociada a actina Keap-1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), que lo retiene en el citoplasma por interacciones con el citoesqueleto. Keap-1 actúa como represor de Nrf2, promoviendo

su ubiquitinización y subsecuente degradación en el proteasoma. De esta forma, en condiciones normales, Nrf2 es degradado rápidamente, por lo que sus niveles basales se mantienen bajos (4, 38). El complejo Nrf2-Keap-1 actúa como un sensor de estrés oxidativo, de forma que, cuando se produce un aumento de los niveles de ROS, los residuos de cisteína de Keap-1 se oxidan, provocando modificaciones en la proteína que resultan en la liberación de Nrf2. Una vez liberado de su unión con Keap-1, la forma activa de Nrf2 es translocada al núcleo donde se une a una proteína Maf pequeña (sMaf), formando el heterodímero Nrf2-sMaf. Dicho heterodímero es capaz de unirse a las regiones ARE (*Antioxidant Response Elements*) presentes en los promotores de todos los genes que están relacionados con Nrf2, e iniciar la transcripción de los genes antioxidantes (4, 37, 38).

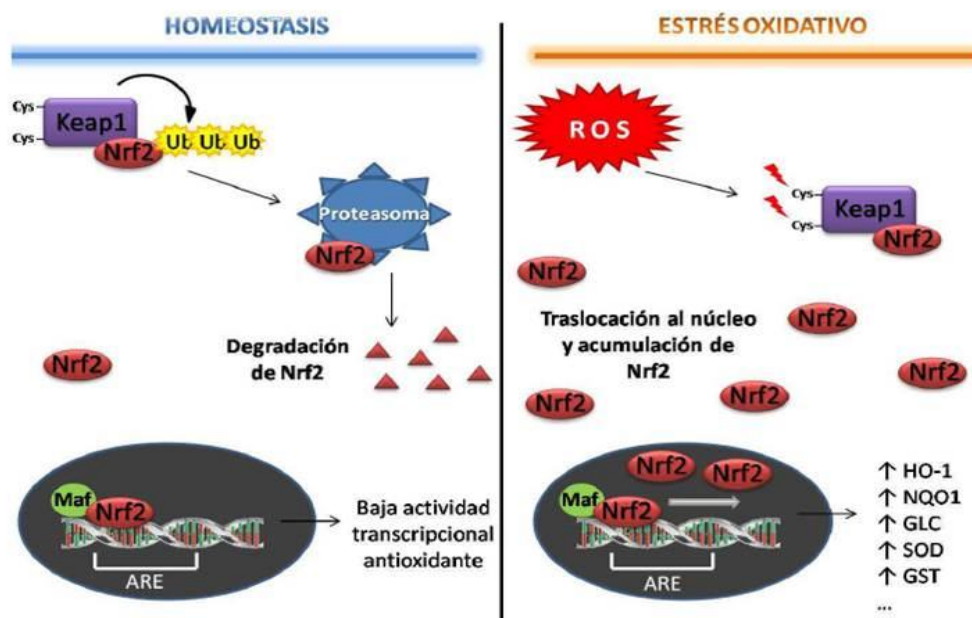


Figura 5. Mecanismo de regulación y activación del factor de transcripción Nrf2. En condiciones basales, Nrf2 se encuentra en el citoplasma unido a su represor Keap-1, el cual provoca su ubiquitinización y posterior degradación en el proteasoma. Mientras que bajo condiciones oxidativas, Nrf2 es liberado de Keap-1 y translocado al núcleo donde forma dímeros con la proteína Maf, y puede entonces unirse a las regiones ARE en la región promotora de los genes antioxidantes y comenzar su transcripción. Tomada de Valcárcel Ares, MN (4).

1.5. SILENCIAMIENTO GÉNICO.

Uno de los avances más importantes en Biología de las últimas décadas ha sido el descubrimiento de moléculas de ARN que regulan la expresión de genes. En especial, el silenciamiento de genes por el uso de ARN de interferencia; el cual consiste en la introducción artificial en las células de ARNs sintéticos de doble hebra conocidos como siARNs, de 21-29 pb, que interaccionan con el ARNm blanco complementario, de forma que se produce la inhibición del gen de interés (39, 40).

En los últimos años, se ha incrementado el uso de la técnica de silenciamiento génico en investigación; esto es debido a que permite asociar el producto fenotípico obtenido al gen sobre el cual se ha llevado a cabo la inhibición, y a su vez, permite indagar en el uso de nuevas modalidades terapéuticas (39, 40).

De este modo, el estudio de la expresión de Nrf2 en los sinoviocitos y su modulación por la presencia de RSV, permitirá entender su implicación en la activación de las enzimas antioxidantes y de los mediadores inflamatorios presentes durante la patogénesis de la AR.

2. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la implicación del factor de transcripción Nrf2 en la modulación de mediadores inflamatorios involucrados en el desarrollo de la AR y su regulación por RSV.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

A. Objetivos in vivo.

I. Evaluar los cambios histológicos que se producen mediante el tratamiento antioxidante con RSV en un modelo de artritis inducida por antígeno (AIA).

II. Evaluar la expresión del factor de transcripción Nrf2 en un modelo de artritis inducida por antígeno (AIA) y su modulación por el tratamiento antioxidante con RSV.

III. Evaluar la expresión del mediador pro-inflamatorio (Ang-1) y de la enzima antioxidante (CAT) en un modelo de artritis inducida por antígeno (AIA) y su modulación por el tratamiento antioxidante con RSV.

IV. Evaluar la expresión y localización del marcador de autofagia (LC3) en una modelo de artritis inducida por antígeno (AIA) y su modulación por el tratamiento antioxidante con RSV.

B. Objetivos *in vitro*.

V. Identificar el efecto del RSV sobre la expresión del factor de transcripción Nrf2 en sinoviocitos cultivados en condiciones de hipoxia y su modulación en presencia del estímulo pro-inflamatorio, IL-1 β .

VI. Identificar la presencia de la enzima antioxidante (SOD-1) en sinoviocitos cultivados en condiciones de hipoxia, así como su modulación con el uso de RSV.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MODELO ANIMAL.

3.1.1. Animales.

Se desarrolló un modelo experimental de artritis inducida por antígeno (AIA) en 18 ratas Lewis hembra. Antes de iniciar el modelo, los animales se aclimataron al animalario durante una semana. Los animales se mantuvieron durante todo el estudio en condiciones ambientales estándar (22 \pm 2 °C de temperatura, humedad relativa del 70-80%, ciclo de iluminación de 12 h diarias de luz y acceso libre a pienso y agua). Los

animales fueron obtenidos de las instalaciones de Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona). Todos los protocolos experimentales fueron supervisados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Animal de la Gerencia de Gestión Integrada de A Coruña.

3.1.2. Inducción de la artritis y grupos de estudio.

Los animales fueron divididos de forma aleatoria en tres grupos:

- Grupo CONTROL: 6 ratas a las que no se les indujo artritis y no recibieron ningún tratamiento.

- Grupo AIA: 6 ratas a las que se les indujo artritis y no recibieron ningún tratamiento.

- Grupo RSV: 6 ratas a las que se les indujo artritis y recibieron diariamente RSV (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) desde los dos meses anteriores a la inducción de la artritis y hasta el día del sacrificio.

El desarrollo de la AR consistió en una fase previa de inmunización subcutánea y una posterior inducción de la artritis. Todos los animales se inmunizaron con 1 ml de una solución que contenía como antígeno 500 μg de seroalbúmina bovina metilada (mBSA; Sigma-Aldrich) emulsionada con 500 μl de adyuvante de Freund (CFA; Sigma-Aldrich), en los días 21 y 14 previos a la inducción de la artritis.

Finalmente, 14 días después de la última inmunización se procedió a la inducción de la artritis inyectando en la cavidad intraarticular de ambas rodillas de los grupos AIA y RSV, 500 μg de mBSA disuelta en 50 μl de suero salino. Mientras que los animales del grupo CONTROL fueron inyectados con 50 μl de suero salino en ambas rodillas.

El RSV fue preparado diariamente antes de ser administrado mediante sondaje orogástrico (12.5 mg/kg, 100 μl de agua). A los grupos

CONTROL y AIA se les administró diariamente 100 μ l de agua, para que todos los animales fuesen sometidos a las mismas manipulaciones.

3.1.3. Sacrificio de los animales y obtención de las muestras.

Dos días después de la inducción de la artritis, y cuando los animales se encontraban en la fase aguda de la enfermedad, fueron sacrificados. Para ello, se anestesiaron con isoflurano y la eutanasia se realizó por exanguinación al practicar la extracción de sangre. Inmediatamente después, se recogieron muestras, de sangre, tejido sinovial (articulación derecha) y articulación de rodilla (articulación izquierda).

La pata izquierda se seccionó lo más próximo posible a la zona de la articulación y se extrajeron los tejidos de alrededor (músculos y tendones). Inmediatamente, las articulaciones se fijaron en formaldehído (4%, 24 h) y se descalcificaron (4 días) con una mezcla que contiene citrato de sodio 20% y ácido fórmico 5%. Posteriormente, las piezas se cortaron sagitalmente, obteniendo dos mitades que fueron incluidas en parafina.

3.1.4. Tinciones inmunohistoquímicas

Los bloques de parafina se cortaron con un micrótopo (Leica), en secciones de 4 μ m de grosor. Los cortes obtenidos se incubaron en una estufa a 60 °C (10 min). Posteriormente, se desparafinaron con xilol (2 cambios de 7 min) y se re-hidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100°, 96°, 80° y 70° durante 2 min en cada una) para finalmente, ser procesados para hematoxilina de Harris y eosina (H&E), inmunohistoquímica (IHQ) o inmunofluorescencia (IF).

3.1.4.1. Hematoxilina y eosina (H&E).

Para evaluar el proceso artrítico a nivel microscópico se realizó la tinción H&E. Para ello, las secciones se incubaron en hematoxilina de Harris (5 min), se aclararon en agua y se contratiñeron con eosina. Posteriormente, las secciones se lavaron, deshidrataron (en concentraciones crecientes de etanol), e incubaron en xilol, para finalmente montarlas con DePeX (Sigma-Aldrich).

3.1.4.2. Inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia (IF).

Tras realizar las incubaciones en etanol, se realizó un lavado con PBS 1X (10 min, MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, CA), y se permeabilizó con Proteinasa K (Dako) durante 6 min. A continuación, se realizó un nuevo lavado con PBST (10 min, PBS con 0.2% de Tween[®] 20). De forma adicional para la IHQ se inhibió la actividad peroxidasa endógena incubando con una solución comercial (10 min, Dako). Los lugares de unión inespecíficos se bloquearon 30 min con PBST suplementado con BSA al 0.2%. Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 4 °C durante toda la noche, con los siguientes anticuerpos primarios policlonales: anticuerpo de conejo anti-angiopoyetina-1 (dilución 1:500; Abcam, Cambridge, Reino Unido); anticuerpo de conejo anti-Nrf2 (dilución 1:700; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) y anticuerpo de cabra anti-catalasa (dilución 1:300; Santa Cruz) y anticuerpo de conejo anti-LC3 (dilución 1:300, Abcam) y el anticuerpo de ratón anti-laminina (dilución 1:60; Santa Cruz).

Pasado el tiempo de incubación, se realizaron lavados y las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario específico para cada caso: anticuerpo anti-conejo/ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP; acrónimo para el inglés *horseradish peroxidase*) (Dako REAL™, EnVision™, Glostrup, Dinamarca); y anticuerpo de conejo anti-cabra (dilución 1:200; Santa Cruz), durante 30 min y 1 h. Posteriormente,

se realizaron lavados de 10 min (PBST). Y las secciones se incubaron con diaminobencidina (DAB, Dako REAL™) (5 min). A continuación, las secciones se lavaron y contratiñeron con hematoxilina de Gill III (2 min). Por último, las secciones se lavaron, deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, se incubaron en xilol, y finalmente se montaron con DePeX.

En el caso de la IF, las secciones incubadas con LC3 y laminina, se incubaron con un anticuerpo secundario asociado a *Alexa Fluor 568* (dilución 1:400, para LC3) y FITC (dilución 1:200, para laminina) durante 1 h en oscuridad. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS (15 min), para finalmente, montar las secciones con glicergel.

3.2. OBTENCIÓN Y CULTIVO PRIMARIO DE SINOVIOCITOS.

Los sinoviocitos fueron aislados de biopsias de membrana sinovial, obtenidas de rodillas de rata. Los fragmentos de tejido sinovial fueron colocados en una placa de Petri de 8.8 cm² (NUNC™, Thermo Fisher Scientific) con medio de cultivo RPMI (Lonza, Basel, Suiza) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomicina (Gibco). Los sinoviocitos migraron del tejido a la placa de cultivo, y se reemplazó el medio cada dos días. Una vez que los sinoviocitos alcanzaron la confluencia aproximada del 80%, se tripsinizaron, sembraron y expandieron nuevamente en un frasco de cultivo de 162 cm², manteniéndose en todo momento en condiciones de hipoxia (5% de oxígeno).

3.3. SILENCIAMIENTO DE NRF2.

La transfección de los siARNs en los sinoviocitos se realizó mediante electroporación, utilizando el aparato *Amaya Nucleofector* (Amaya, Gaithersburg, MD) junto con el kit de transfección de la misma casa

comercial. La electroporación es el método físico basado en la apertura transitoria de poros en la membrana celular cuando se aplican pulsos eléctricos cortos de gran intensidad. Los poros que se forman en la membrana de las células permanecen abiertos durante milisegundos, permitiendo así, la entrada de las moléculas de ADN o ARN presentes en la solución.

Una vez alcanzada la confluencia requerida (80%), los sinoviocitos se tripsinizaron y se resuspendieron a razón de 1×10^6 por cada una de las condiciones a estudiar en 100 μ l solución de transfección, mezclándose en una cubeta de electroporación Amaxa con 100 nM de siARN de Nrf2 (siNrf2, combinación de tres ARN con secuencias específicas complementarias al ARN de Nrf2, Santa Cruz), con 100 nM de siARN control (SC, no complementario a ningún transcrito conocido; Santa Cruz) o en ausencia de éstos (condición basal; las células no son transfectadas). A continuación, se seleccionó el programa específico de Amaxa para sinoviocitos (U-023). Tras la electroporación, se transfirió el contenido de cada cubeta a tubos Eppendorf que contenían 1 ml de medio RPMI al 10% de SBF, atemperado. Finalmente, se colocaron 550 μ l de la solución de células a cada pocillo (500.000 células/pocillo) de una placa de cultivo de 6 pocillos.

3.3.1. Estimulación celular.

Las células se mantuvieron durante 36 h en medio RPMI 10% SBF inmediatamente después de la transfección. Antes de realizar cada experimento, las células se deplecionaron en medio RPMI 0.5% SBF (24 h), y a continuación, se estimularon también en RPMI al 0.5% SBF (durante 12 h), correspondientes a los tratamientos:

– CONTROL: las células no reciben ningún tratamiento después de haberse realizado la transfección.

– RSV: las células son estimuladas con RSV (25 μ M) que se preparó fresco antes de realizar cada experimento diluyéndolo en etanol 100%.

– Grupo IL-1 β : la interleucina-1 β (Sigma-Aldrich) se utilizó a una concentración de 5 ng/ml para inducir la respuesta inflamatoria.

– Grupo RSV+IL-1 β : las células fueron pre-tratadas con RSV durante una hora antes de ser estimuladas con IL-1 β para reforzar el efecto protector del compuesto.

3.4. PROCESAMIENTO DE LAS CÉLULAS PARA ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA.

3.4.1. Extracción de ARNm y tratamiento con ADNasa.

El ARN total se aisló a partir de 1×10^6 células utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se añadió cloroformo al lisado celular para provocar la separación de la fase acuosa, en la que se encuentra el ARN, de la fase orgánica. La fase acuosa se recuperó y se precipitó el ARN incubando con isopropanol. Se realizaron lavados del ARN con etanol (al 75%) y se dejó secar brevemente el precipitado a temperatura ambiente. Se disolvió en agua libre de ARNasas a 55 °C (10 min) y finalmente, se cuantificó con un espectrofotómetro *NanoDrop ND 1000* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) a 260 nm.

A continuación, 1 μ g de ARN fue procesada para la eliminación de restos de ADN incubando con desoxirribonucleasa I 1U/ μ l (*DNase I*; Invitrogen) durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, se detuvo la acción de la ADNasa añadiendo EDTA (25 mM pH 8.0), incubando durante 10 min a 65 °C.

3.4.2. Retrotranscripción de ARNm a ADNc.

Una vez purificado el ARN, la síntesis y amplificación a ADNc se realizó usando el *SuperScript® VILO™ cDNA synthesis kit* (Invitrogen). Se preparó la reacción añadiendo 5 µl de ARN (resultantes del tratamiento con ADNasa), 3 µl de agua libre de ARNasas y 2 µl de la transcriptasa reversa *SuperScript™ III*. El volumen total (10 µl) se sometió a las siguientes incubaciones: 30 min a 25 °C, 1 hora y 30 min a 40 °C, 5 min a 95 °C y finalmente 10 min a 4 °C. Las muestras de ADNc se guardaron a -20 °C hasta el momento de llevar a cabo la PCR a tiempo real (RT-PCR).

3.4.3. PCR a tiempo real.

En placas de PCR de 96 pocillos (LightCycler 480, Roche Diagnostics) se realizó la mezcla de 2 µl de ADNc con 5 µl de *SYBR Green (LightCycler® 480 SYBR Green I Master kit, Roche Diagnostics)*, 0.25 µl de cada cebador 20 µM (sentido y antisentido para Nrf2) y 2.5 µl de agua de PCR para completar hasta 10 µl totales. La PCR se llevó a cabo en el termociclador *LightCycler® 480 Instrument* (Roche Diagnostics). Cada condición de la PCR se hizo por duplicado.

Las condiciones fueron las siguientes: una primera etapa de incubación a 95 °C durante 10 min para la activación de la *hot start* Taq ADN polimerasa. A continuación, 40 ciclos de amplificación que consisten en una primera etapa de 10 segundos a 95 °C para la desnaturalización de las dobles cadenas de ADN, seguida de una bajada de temperatura de 10 segundos a 60 °C para permitir el anillamiento de los cebadores con la secuencia diana del ADN de cadena única, y una etapa de extensión de 10 segundos a 72 °C, en la que la ADN polimerasa realiza la síntesis de la nueva hebra de ADN. Mediante la herramienta de cuantificación de expresión relativa del software LightCycler 480, la intensidad de la señal de fluorescencia se cuantificó y se realizaron comparaciones entre el

grupo basal y los tratados teniendo en cuenta la eficiencia de la reacción y la normalización respecto al gen de referencia.

Para nuestro gen de interés, Nrf2, el gen de referencia utilizado fue la hipoxantina fosfo-ribosil transferasa 1 (HPRT). Dicho gen de referencia fue elegido de entre una batería de genes candidatos por la similitud de sus niveles de expresión con los del gen diana y por no verse modulado bajo ninguna de las condiciones estudiadas.

3.5. PROCESAMIENTO DE LAS CÉLULAS PARA ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.

3.5.1. Detección de proteínas mediante IF en células.

Adicionalmente al cultivo en placas de 6 de las células transfectadas, se tomó una alícuota de aproximadamente 15.000 células por tratamiento que fueron sembradas en chambers con las mismas condiciones a lo descrito anteriormente, con la finalidad de identificar por estudios de IF, la presencia y localización de las proteínas de interés.

Una vez finalizado el tiempo de cada tratamiento, las células presentes en chambers fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% (30 min, 4 °C). A continuación, las muestras se incubaron con PBS 1X (10 min, Dako), se permeabilizaron con PBST (10 min) y se bloquearon los lugares de unión inespecíficos con PBST suplementado con BSA al 0.2% (30 min, Sigma-Aldrich). Posteriormente, se realizó la incubación a 37 °C con los siguientes anticuerpos primarios (policlonales) diluidos en PBST: anticuerpo de conejo anti-Nrf2 (dilución 1:300; Santa Cruz); anticuerpo de conejo anti-superóxido dismutasa-1 (dilución 1:300; Santa Cruz). El control negativo se realizó omitiendo el anticuerpo primario. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se realizaron nuevamente lavados con PBST (3 de 5 min), y se incubó con el anticuerpo secundario de burro

anti-conejo asociado a *Alexa Fluor 568* (dilución 1:500; Life technologies, Carlsbad, California, USA) durante 1 h en oscuridad. Los núcleos fueron contrastados con DAPI (Sigma-Aldrich) (dilución 1:500) durante 1 minuto y se realizó el montaje empleando el medio Glicergel[®] (Dako). Finalmente, las muestras se visualizaron en un microscopio Olympus BX61 y se sacaron fotografías al conjunto celular, que posteriormente fueron procesadas con el programa de edición de imágenes Adobe[®] Photoshop[®] CS4 versión 11.0.2 (San José, CA, USA).

3.6. ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN ESTADÍSTICA.

Para el análisis de los datos obtenidos a partir de la técnica IHQ e IF, las muestras se visualizaron en un microscopio Olympus BX61; para ello, se tomó en cuenta la señal presente en el tejido sinovial de la articulación, por ser el principal tejido afectado durante el proceso inflamatorio en la AR. Una vez localizado el tejido sinovial, se sacaron fotografías a todo su conjunto, que posteriormente fueron procesadas empleando el programa de análisis de imágenes ImageJ versión 1.48 (NIH, USA), que cuantifica la señal positiva en un área concreta.

Todos los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico GraphPad PRISM versión 5 y los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM). Para comparaciones múltiples se realizó un ANOVA seguido del test Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P \leq 0.05$.

4. RESULTADOS.

4.1. CAMBIOS HISTOLÓGICOS DE LA MEMBRANA SINOVIAL DE UN MODELO AIA.

Con la finalidad de conocer los cambios microscopicos de la membrana sinovial de las articulaciones de rodilla pertenecientes a animales de los grupos CONTROL, AIA y RSV (Fig. 6), se realizó una tincion con H&E. Al analizar el tejido sinovial del grupo CONTROL, se comprobó que éstas poseían la estructura típica de una membrana sinovial normal, con una capa íntima muy fina compuesta por 1 o 2 capas de células sinoviales (flecha negra), y una capa subíntima conformada por adipocitos. Asimismo, se observó la presencia de una pequeña cantidad de infiltrado de células del sistema inmune en algunos animales. En contraste, la membrana sinovial procedente de animales del grupo AIA (Fig. 6) mostró cambios histológicos propios de una fase artrítica aguda, los cuales incluyen hiperplasia sinovial y la presencia de una gran cantidad de infiltrado celular, que da origen a la formación de cúmulos de células del sistema inmune, muy cercanos al *lining* (flecha roja). Por otro lado, las membranas sinoviales de las rodillas de ratas AIA a las que se les administró RSV (Fig.6) mostraron una disminución de la hiperplasia sinovial, una reducción en el *lining*, y una menor densidad de infiltrado celular inmune, siendo menos evidentes los signos que caracterizan a la fase aguda de la inflamacion en la AR (flecha negra).

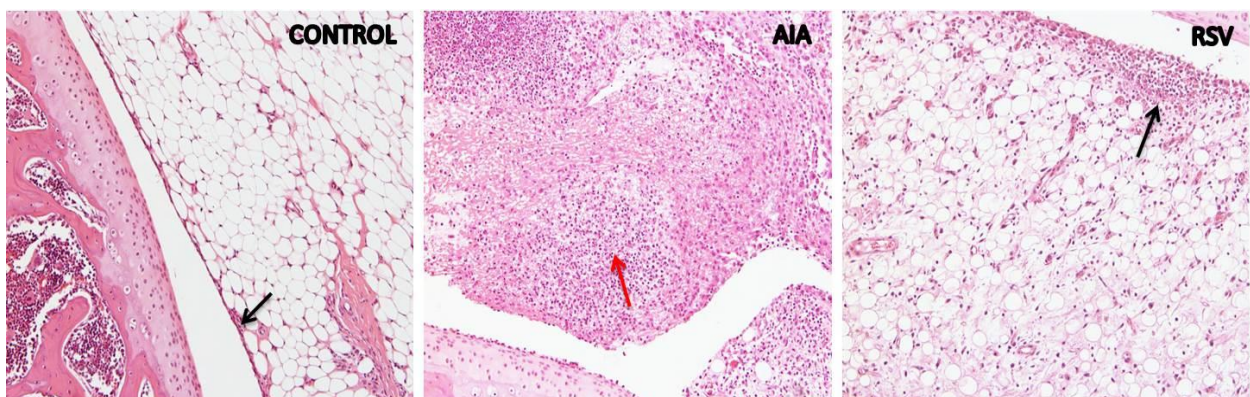


Figura 6. Evaluación de los cambios histológicos a nivel de la membrana sinovial de la articulación de rodilla durante el proceso inflamatorio en un modelo AIA.

Imágenes representativas de la membrana sinovial de los grupos CONTROL, AIA y RSV, teñidas empleando la técnica H&E (magnificación de 10x). Las flechas negras señalan el *lining* en los grupos CONTROL y RSV; la flecha roja señala los acúmulos de células del infiltrado celular en el tejido AIA.

4.1.2. EFECTO DEL RSV EN LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Nrf2 DURANTE EL DESARROLLO DE AIA.

Como se observa en la Figura 7, el tejido sinovial procedente de animales del grupo CONTROL mostró una expresión basal de Nrf2, ubicada principalmente en el citoplasma de las células del *lining* (Fig. 7 A). Asimismo, se observó que el escaso infiltrado que aparece en la capa subíntima también mostró una expresión basal de Nrf2, principalmente en aquellas zonas adyacentes a los vasos sanguíneos. En el tejido AIA (Fig. 7 A), se observó un aumento significativo de Nrf2 comparado con el grupo CONTROL ($P \leq 0.001$) (Fig. 7 B), localizado de igual modo en los núcleos y citoplasma de las células del infiltrado celular característico de la AR. En contraste, en la membrana sinovial del grupo RSV se observó una leve reducción de la señal de Nrf2 comparado con el grupo AIA; mostrando mayormente una localización nuclear, la cual representa la forma activa de la proteína (Fig. 7 A).

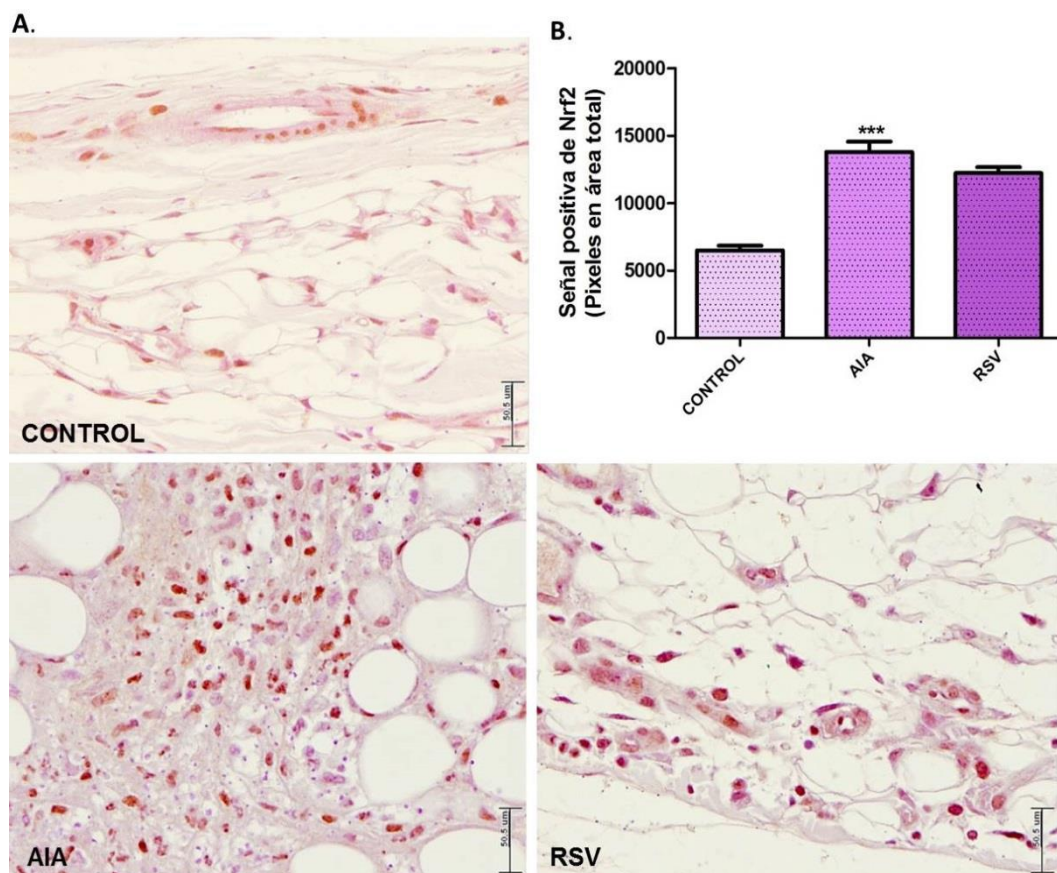


Figura 7. Efecto del resveratrol en la expresión del factor de transcripción Nrf2. **A.** Imagen representativa de la membrana sinovial del grupo CONTROL, AIA y RSV, donde se muestra la expresión de Nrf2 (magnificación de 40x). **B.** Gráfica que muestra la señal positiva para Nrf2 en los tres grupos de estudio, expresado en píxeles en área total. Los resultados se expresan como la media \pm EEM (CONTROL, n=3; AIA, n=3; RSV, n=3). *** $P \leq 0.001$ vs. CONTROL.

4.1.3. EFECTO DEL RSV EN LA EXPRESIÓN DE CATALASA DURANTE EL DESARROLLO DE AIA.

La Figura 8 muestra los cambios en la expresión de CAT en los grupos CONTROL, AIA y RSV. La membrana sinovial del grupo CONTROL mostró una expresión basal elevada, localizada principalmente en el citoplasma de las células del *lining* y en células aisladas de la capa subíntima (Fig. 8 A). En el grupo AIA, la expresión de CAT no mostró cambios significativos al ser comparada con el grupo CONTROL; sin embargo, su localización fue ubicada en pequeños grupos de células del

infiltrado celular, desapareciendo totalmente la expresión del mismo en la zona del *lining*, al contrario de lo que ocurre en el grupo CONTROL. Mientras que en la membrana sinovial de los animales del grupo RSV, se observó un aparente incremento de la señal de CAT con respecto al grupo AIA, que nuevamente apareció expresada en los citoplasmas de las células del infiltrado celular y en la zona del *lining*; sin embargo, no mostró cambios significativos en su expresión en comparación con los otros dos grupos (Fig. 8 B).

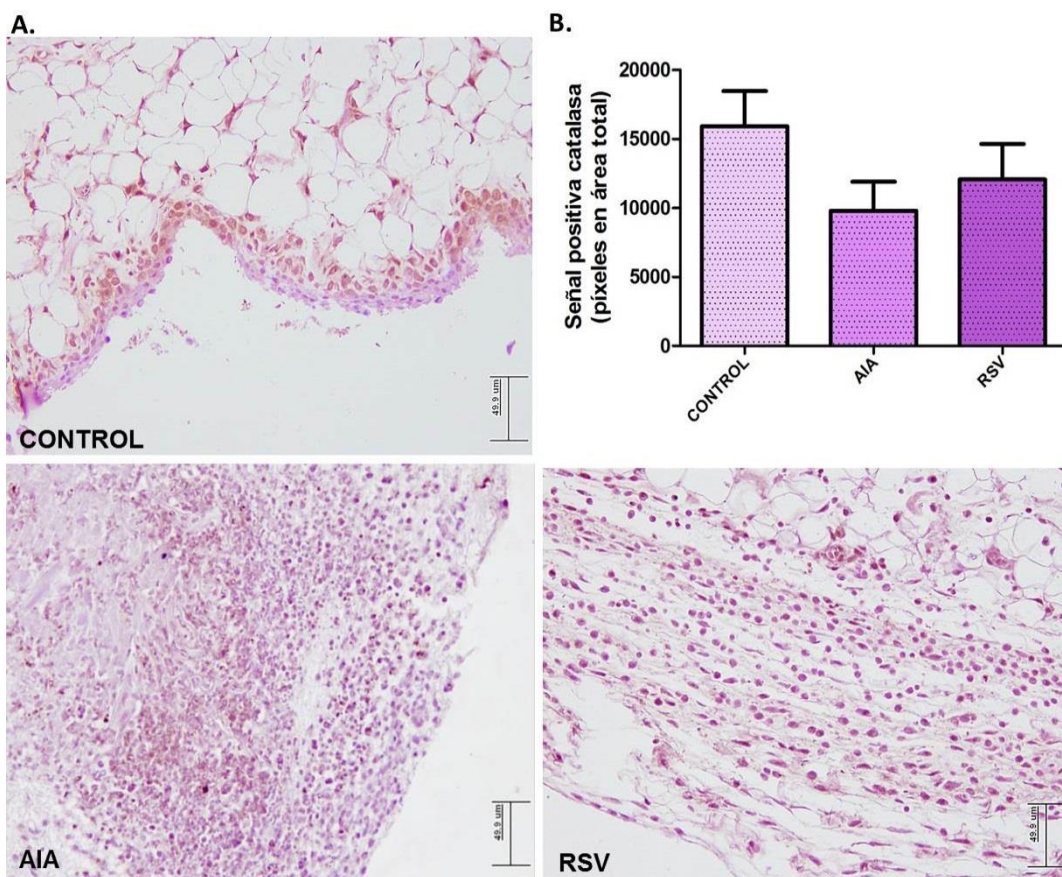


Figura 8. Efecto del resveratrol en la expresión de catalasa. A. Imagen representativa de la membrana sinovial del grupo CONTROL, AIA y RSV, donde se muestra la expresión de CAT (magnificación de 20x). **B.** Gráfica que muestra la señal positiva para CAT en los tres grupos de estudio, expresado en píxeles en área total. Los resultados se expresan como la media \pm EEM (CONTROL, n=3; AIA, n=3; RSV, n=3).

4.1.4. EFECTO DEL RSV EN LA EXPRESIÓN DE ANGIOPOYETINA-1 DURANTE EL DESARROLLO DE AIA.

Como se muestra en la Figura 9, el tejido sinovial procedente de los animales del grupo CONTROL (Fig. 9 A) mostró una expresión basal muy baja para Ang-1. En contraste, se observó que en el tejido sinovial perteneciente a animales AIA la expresión de Ang-1 se incrementó significativamente ($P \leq 0.001$) (Fig. 9 B); siendo su localización dispersa en toda la capa subíntima, tanto en el citoplasma celular como secretada al medio (Fig. 9 A). Por su parte, en el grupo RSV se observó una disminución significativa de Ang-1 ($P \leq 0.05$), en comparación con la obtenida en el grupo de animales AIA (Fig. 9 A y B), siendo su ubicación localizada en las células del *lining* principalmente.

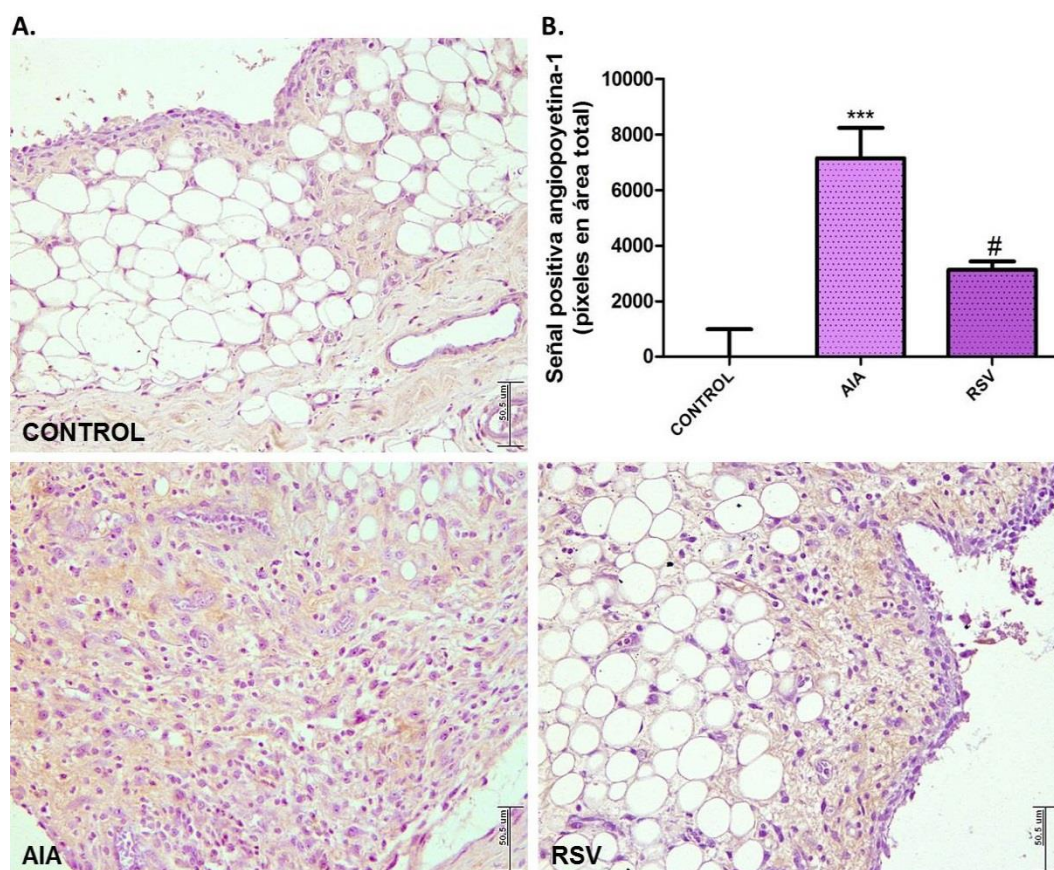


Figura 9. Efecto del resveratrol en la expresión de angiopoyetina-1. **A.** Imagen representativa de la membrana sinovial del grupo CONTROL, AIA y RSV, donde se muestra la expresión de Ang-1 (magnificación de 20x). **B.** Gráfica que muestra la señal positiva para Ang-1 en los tres grupos de estudio, expresado en píxeles en área total. Los resultados se expresan como la media \pm EEM (CONTROL, n=3; AIA, n=3; RSV, n=3). ***P \leq 0.001 vs. CONTROL; #P \leq 0.05 vs. AIA.

4.1.5. EFECTO DEL RSV SOBRE LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA DURANTE EL DESARROLLO DE AIA.

Con el objetivo de identificar la presencia de autofagia en muestras AIA y su modulación por el RSV, se determinó la presencia de vacuolas autofagicas (por el marcador LC3) en la membrana sinovial de muestras CONTROL, AIA y RSV. Los resultados mostraron una expresión basal baja de LC3 en la membrana sinovial del grupo CONTROL (Fig. 10). En el caso de las muestras AIA, la expresión de LC3 se incrementó significativamente en comparación con el grupo CONTROL (P \leq 0.001) (Fig. 10 B), mostrando una mayor localización en células del infiltrado (Fig 10 A). En contraste, el grupo RSV alcanzó una expresión mayor de LC3 comparada con el grupo AIA (P \leq 0.001), siendo la marca ubicada tanto en las células del infiltrado como en los sinoviocitos (Fig. 10).

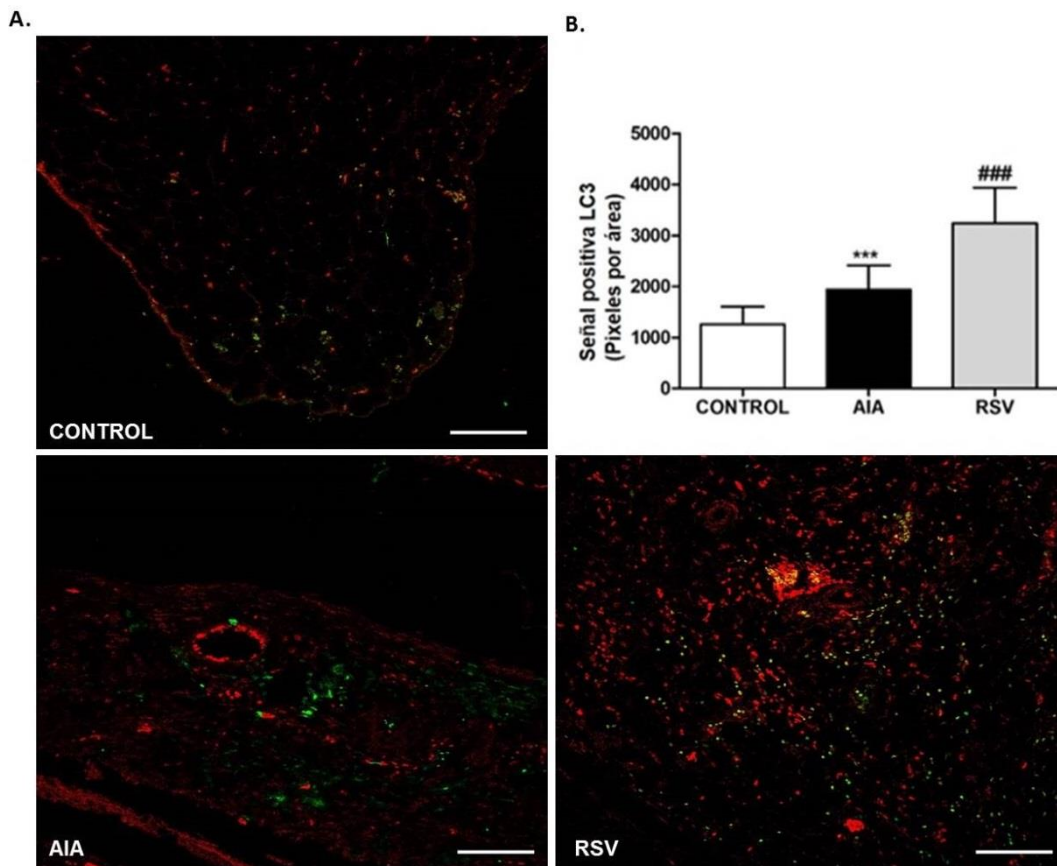


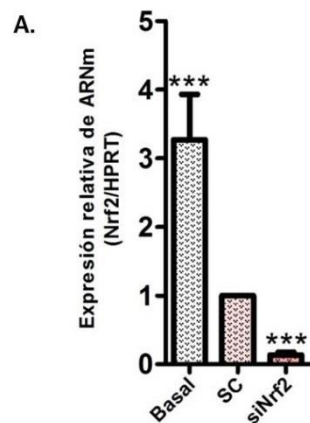
Figura 10. Efecto del RSV sobre la expresión de vacuolas autofagicas. **A.** Imagen representativa de la expresión de vacuolas autofagicas en membrana sinovial de los grupos CONTROL, AIA y RSV (magnificación de 20x). **B.** Grafica que muestra la señal positiva para LC3 en los tres grupos de estudios, expresada en píxeles por área. Los resultados se expresan como la media \pm EEM (CONTROL, n=3; AIA, n=3; RSV, n=3). *** $P \leq 0.001$ vs. CONTROL; ### $P \leq 0.001$ vs. AIA.

4.2. ESTUDIO *in vitro* DEL EFECTO DEL RSV EN LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Nrf2.

El primer paso fue comprobar que el silenciamiento se estaba produciendo de una manera efectiva. Para ello, se evaluó la expresión de ARNm de Nrf2 mediante PCR a tiempo real, transcurridas 72 h de la transfección. Como se observa en la Figura 11 A, la expresión del ARNm de Nrf2 en los sinoviocitos transfectados con ARN de silenciamiento frente a Nrf2 (siNrf2) disminuyó un 97% ($P \leq 0.001$), frente a aquellos transfectados con el ARN de silenciamiento control (SC), lo que

demuestra la eficiencia de la transfección. Por su parte, la expresión del mensajero en la condición basal alcanzó hasta 3 veces el valor de la condición SC ($P \leq 0.001$).

Asimismo, con la finalidad de corroborar la eficiencia de la transfección, se identificó la expresión proteica de Nrf2. Mediante IF (Fig. 11 B), se observó la localización de Nrf2 en sinoviocitos cultivados bajo las mismas condiciones. La mayoría de células pertenecientes a la condición SC mostraron una expresión de Nrf2 localizada principalmente en el citoplasma, no obstante, un bajo porcentaje de sinoviocitos mostraron una expresión de Nrf2 localizada en el núcleo (Fig. 11 B). En contraste, las células transfectadas con siNrf2 mostraron una reducción significativa en la expresión de la proteína, siendo ésta fundamentalmente citoplasmática (Fig. 11 B).



B.

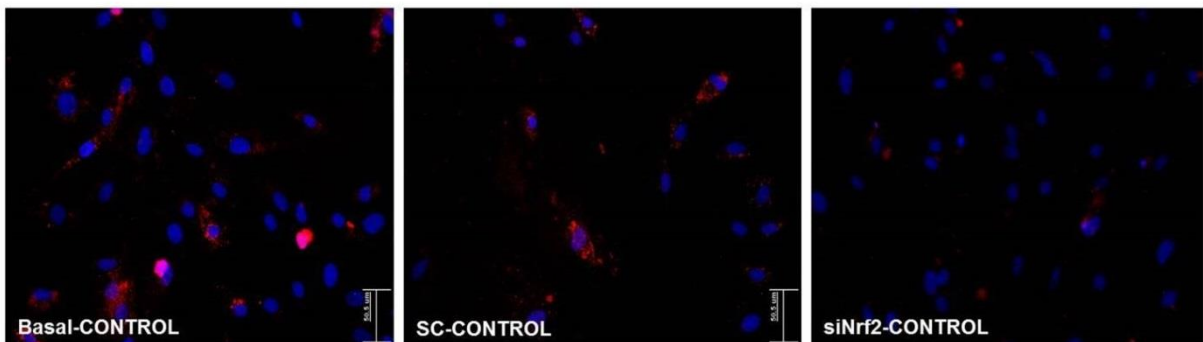


Figura 11. Expresión del factor de transcripción Nrf2. **A.** La gráfica muestra la concentración relativa del ARNm de Nrf2 normalizado con el gen de referencia HPRT. Se observa como en la condición con siNrf2 se disminuye la expresión de su ARNm con respecto a la condición SC. *** $P \leq 0.001$ vs. SC. **B.** Imágenes representativas de sinoviocitos de las condiciones SC y siNrf2, que muestran la expresión de Nrf2 (magnificación 20x). Se observa como en la condición siNrf2 la señal disminuye con respecto a la condición SC. Nrf2 fue asociado a *Alexa Fluor 568* (rojo); los núcleos fueron contrastados con DAPI (azul).

Posteriormente, se determinó la expresión de ARNm de Nrf2 presente en los diversos tratamientos (Fig. 12). Los resultados mostraron que la condición SC de los 3 grupos (RSV, IL-1 β y RSV+ IL-1 β) mantuvo una expresión basal de ARNm de Nrf2 sin cambios significativos cuando son comparados con la condición SC-CONTROL. En contraste, en la condición de siNrf2, el grupo IL-1 β mostró una reducción significativa ($P \leq 0.05$) de casi un 98% comparada con la condición SC-CONTROL; mientras que en la condición siNrf2 del grupo RSV+IL-1 β , la reducción del ARNm de Nrf2 fue solo de un 50% ($P \leq 0.05$).

Asimismo, la expresión del ARNm de Nrf2 de la condición siNrf2-RSV+IL-1 β , mostró una reducción de solo el 60% aproximadamente, comparada con su condición SC- RSV+IL-1 β ($P \leq 0.05$); patrón que se mantuvo sin cambios en el resto de los grupos.

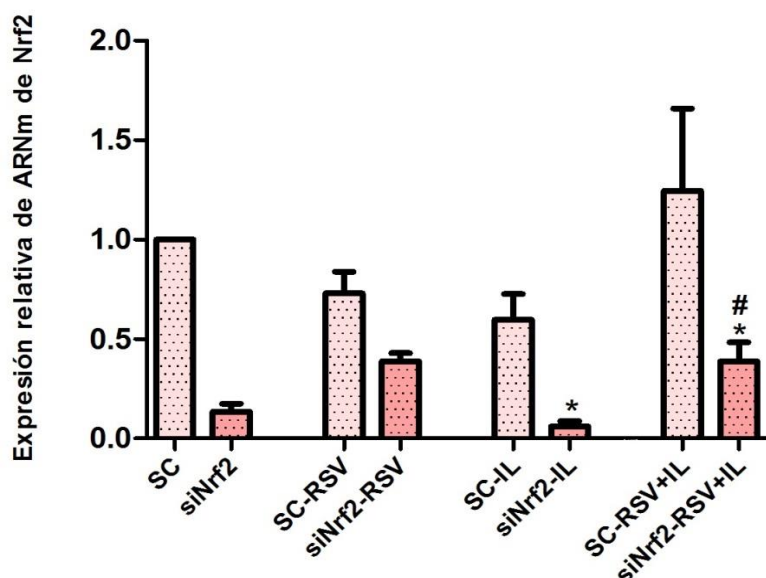


Figura 12. Expresión del ARNm del factor de transcripción Nrf2 bajo el efecto de distintos tratamientos. La figura muestra cual es el efecto de los tratamientos con RSV y el estímulo pro-inflamatorio IL-1 β sobre la concentración relativa del ARNm de Nrf2 al ser normalizado con el gen de referencia HPRT. Se observa como en la condición con siNrf2 se disminuye la expresión de su ARNm con respecto a la condición SC. *P \leq 0.05 vs.SC; #P \leq 0.05 vs.SC-RSV+IL-1 β .

En cuanto a la expresión proteica del factor de transcripción Nrf2 observada mediante IF (Fig. 13), los resultados mostraron un patrón similar en la expresión de Nrf2 entre las condiciones basal y SC de cada grupo. Por tal motivo, en adelante nos referiremos a la condición SC para englobar los cambios presentes en el grupo basal y SC en cada uno de los grupos.

En cuanto al uso de RSV, en la condición SC se observó que Nrf2 mostró una localización nuclear y citoplasmática, lo cual también se observó en la condición SC del grupo IL-1 β ; mientras que en la condición SC con el tratamiento RSV+IL-1 β su localización fue ubicada principalmente en el citoplasma. En contraste, las células sometidas a la transfección con siNrf2 de los tres grupos, mostraron una reducción significativa la expresión de Nrf2, localizada únicamente en el citoplasma.

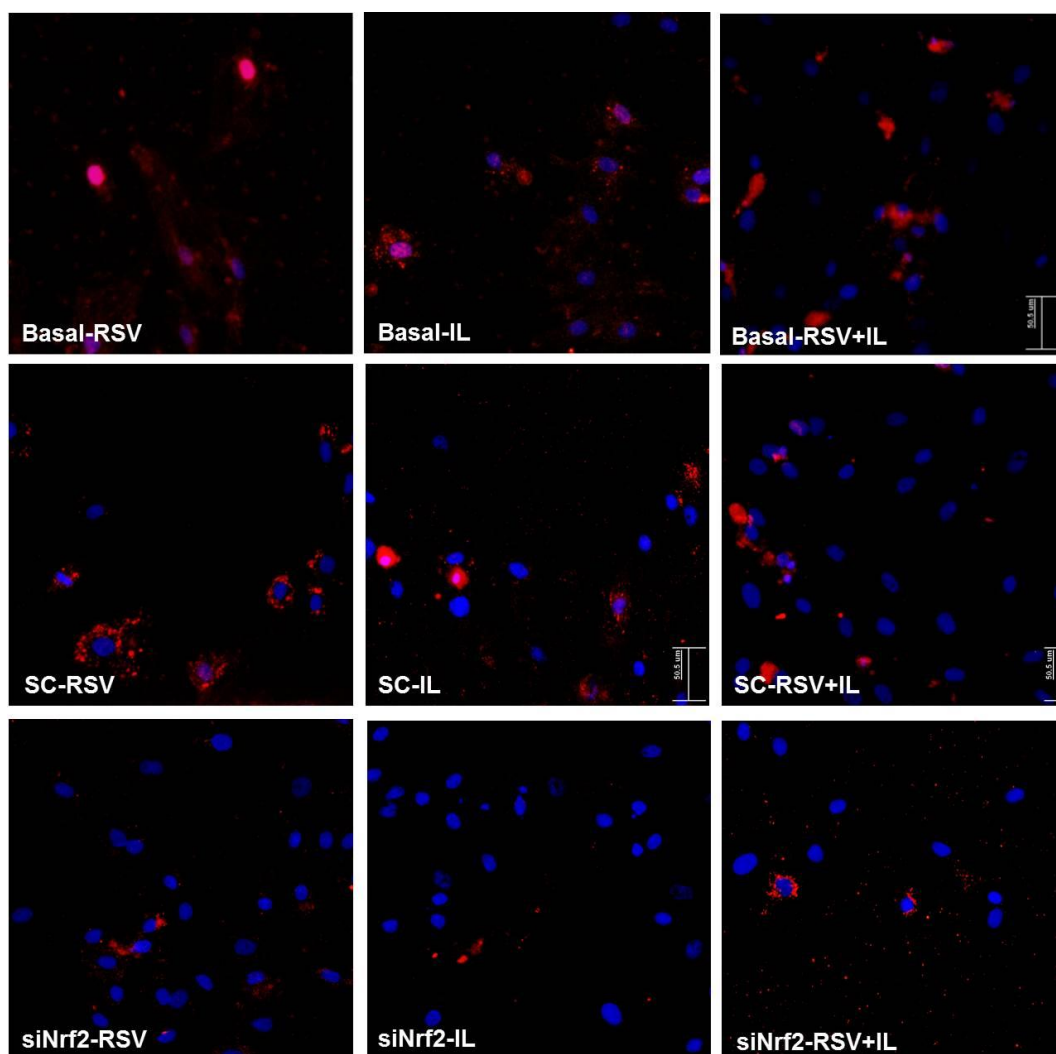


Figura 13. Expresión proteica del factor de transcripción Nrf2 bajo el efecto de distintos tratamientos. Las imágenes muestran la expresión proteica de Nrf2 cuando es analizado por IF (magnificación 20x). Se observa como en la condición siNrf2 la señal disminuye de forma evidente con respecto a la condición control interna de cada grupo. Nrf2 fue asociado a *Alexa Fluor 568* (rojo); los núcleos fueron contrastados con DAPI (azul).

4.2.1 ESTUDIO *in vitro* DEL EFECTO DEL RESVERATROL EN LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA ANTIOXIDANTE SUPERÓXIDO DISMUTASA- 1 EN SINOVIOCITOS DE RATA EN CULTIVO.

La IF para SOD-1 (Fig. 14) mostró nuevamente que no existen cambios en la expresión proteica entre las condiciones basal y SC. La

expresión y localización de SOD-1 en el grupo CONTROL fue homogénea en el citoplasma, mostrando una leve reducción en su expresión en las células transfectadas. LA expresión de SOD-1 mostró una ubicación nuclear en células de los grupos tratados con RSV, manteniendo una expresión punteada y perinuclear en células tratadas con IL-1 β y con RSV+IL-1 β . En contraste, las células sometidas a la transfección mostraron cambios en la expresión y localización de la SOD-1, donde se observó una disminución en la expresión de SOD en células transfectadas tratadas con RSV, mientras que en células tratadas con IL-1 β , la expresión de SOD-1 mostró un incremento significativo comparado con el resto de las condiciones, re-localizando a SOD-1 en el núcleo. Asimismo, en células tratadas con RSV+IL-1 β , la expresión de SOD mostro un patrón homogéneo en el citoplasma formando agregados con algunas células positivas en el núcleo.

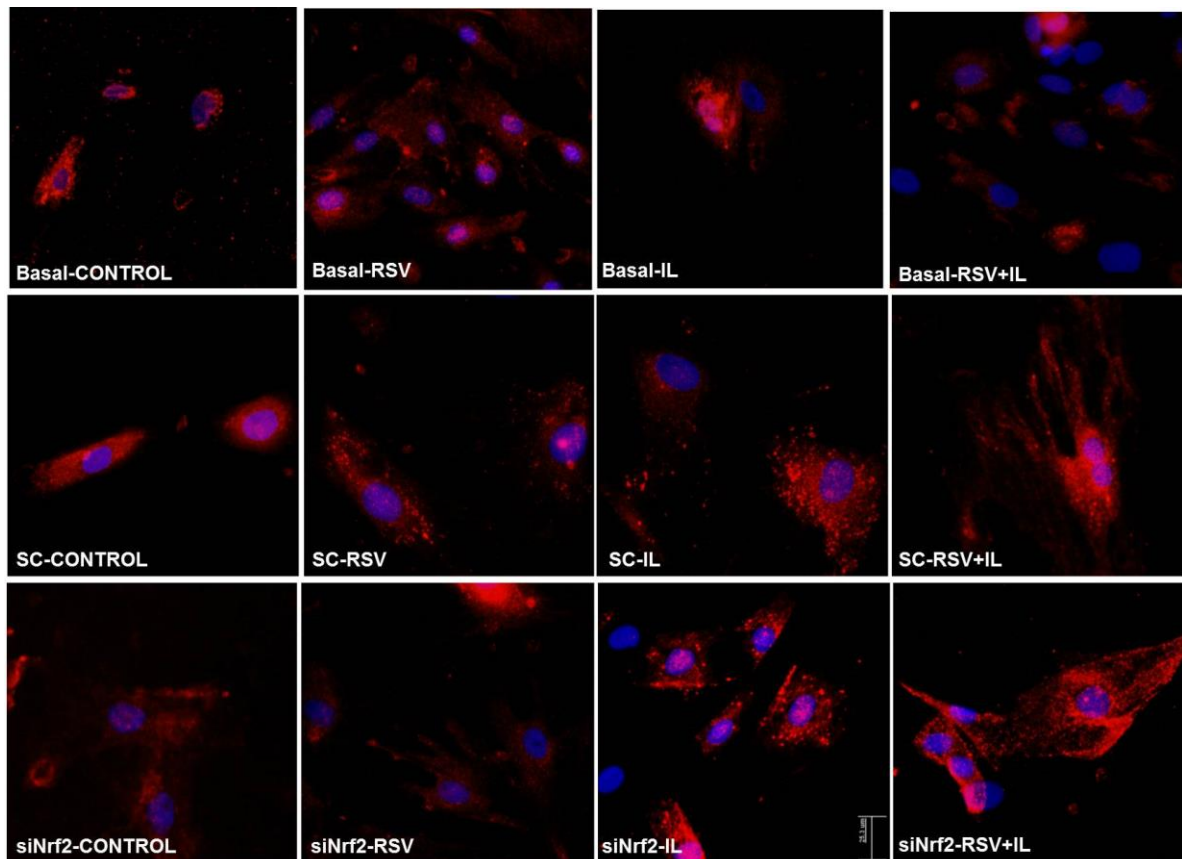


Figura 14. Expresión proteica de la enzima antioxidante superóxido dismutasa-1. Las imágenes muestran la expresión proteica de SOD-1 cuando es analizado por IF (magnificación 40x). Se observa como los distintos tratamientos con RSV e IL-1 β son capaces de modular la expresión de la enzima. SOD-1 fue asociada a *Alexa Fluor 594* (rojo); los núcleos fueron contrastados con DAPI (azul).

5. DISCUSIÓN.

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta a articulaciones, y se manifiesta mayoritariamente en los grupos de edad que son productivos económicamente. En la mayoría de los casos, el curso de la AR es progresivo y conduce al daño articular irreversible, lo que tiene como consecuencia la deformidad de las articulaciones, el deterioro funcional de los pacientes y la disminución de la calidad de vida (41). A pesar de que su etiología es aún desconocida, diferentes estudios apoyan la hipótesis de que los SFs desempeñan un papel central en el daño a la articulación y en la persistencia de la inflamación crónica (1, 42).

La AR no posee una cura, por lo tanto, las metas terapéuticas han sido enfocadas hacia la remisión de los síntomas (43); sin embargo, los tratamientos actuales no son del todo eficaces, ya que la mayoría generan a largo plazo efectos adversos en los pacientes, además de que el costo es muy elevado. Por este motivo, el diseño de nuevas estrategias terapéuticas con el uso de componentes naturales, tales como el RSV, es una alternativa viable para el tratamiento de enfermedades reumáticas (44).

Diversos trabajos han mostrado que el RSV puede actuar directamente contra los radicales libres, o indirectamente mediante el incremento de las defensas antioxidantes endógenas de las células; donde destaca el factor de transcripción Nrf2. Asimismo, trabajos previos han demostrado el efecto inmunomodulador y antiinflamatorio del RSV en

un modelo AIA (3, 45). Sin embargo, este es el primer trabajo que demuestra la presencia de Nrf2 en la membrana sinovial AIA y su posible modulación por el uso de RSV.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el tratamiento con RSV (12.5 mg/kg diarios) fue capaz de reducir los principales signos de la patología en fase aguda de la AR. Así, mediante una evaluación histopatológica en la que se emplearon tinciones con H&E se determinó a nivel microscópico en el modelo AIA como el RSV es capaz de inhibir la inflamación característica de la artritis establecida mediante la disminución de la hiperplasia sinovial, y un menor infiltrado de células del sistema inmune, tal y como se había descrito previamente en trabajos con modelos AIA (3, 46).

Diversos autores han mostrado que el RSV es capaz de inducir un efecto antioxidante a través de la activación de Nrf2 (47,48). Sin embargo, en relación con la AR son muy pocos los datos que existen sobre el papel que Nrf2 desempeña en esta patología. Se sabe que su deficiencia incrementa la severidad de la artritis en un modelo de AIA y que su actividad está incrementada en pacientes con AR (49, 50).

Se sabe que durante la AR los principales eventos que favorecen el daño articular son el estrés oxidativo, la angiogénesis y la inflamación, Asimismo, se ha sugerido que el efecto antioxidante del RSV puede darse a través de la activación de Nrf2, ya que su expresión está implicada en la producción de enzimas antioxidantes que generan citoprotección contra daños oxidativos que se puedan dar en el tejido en respuesta al gran ambiente hipóxico (51). De este modo, el objetivo de este trabajo fue determinar si la expresión de Nrf2 presenta una modulación por el uso de RSV en un modelo AIA. Nuestros resultados mostraron que durante la AIA se incrementa la expresión de Nrf2. Sin embargo, aunque la expresión total de Nrf2 no se vio modulada por el tratamiento con RSV con respecto al grupo AIA, este si fue capaz de modular su localización a su forma activa en el núcleo (52). Esto sugiere su participación en la

inducción del efecto antioxidante y/o antiinflamatorio que genera el uso del RSV en un modelo AIA.

Dichos resultados fueron corroborados por estudios *in vitro*, donde además se demostró que el RSV no es capaz de inducir la síntesis *de novo* del Nrf2, ya que al inducir el silenciamiento de Nrf2, la expresión de la proteína se mantuvo abatida aún en presencia del RSV. Asimismo, se observó que en presencia de citocinas proinflamatorias, los sinoviocitos son capaces de re-localizar al Nrf2 a su forma activa nuclear; sin embargo, el uso de siARN para Nrf2 mantiene abatida la expresión de Nrf2, aún en presencia de citocinas proinflamatorias. Lo anterior sugiere que el Nrf2, juega un papel importante en la respuesta temprana de los sinoviocitos al daño oxidativo que genera la IL-1 β , y que el RSV es capaz de inducir su activación.

Trabajos previos han demostrado que Nrf2 es un importante modulador de la inflamación, ya que su presencia modula la actividad de las citocinas pro-inflamatorias (53). Asimismo, se ha mostrado que Nrf2 es capaz de regular la actividad de enzimas antioxidantes como HO-1, SOD y CAT, entre otras (54, 55).

La enzima antioxidante CAT es producida por sinoviocitos y células inmunes, entre ellas los macrófagos, cuando se produce un aumento en los niveles de ROS durante el proceso inflamatorio, jugando un importante papel en la eliminación de ROS en las células; ésta puede encontrarse en pequeños cuerpos celulares como los peroxisomas y actúa catalizando la conversión de peróxido de hidrógeno a agua (56). Con la finalidad de conocer si la expresión de CAT es regulada por el uso de RSV, se determinó la presencia de CAT en el modelo AIA. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron la presencia de CAT en el *lining* de la membrana sinovial en condiciones normales; dicha expresión podría relacionarse con la inmunidad constitutiva de los macrófagos y sinoviocitos activos residentes en la membrana sinovial (57). Se sabe que dichas células actúan proporcionando una protección continua a la

articulación incluso cuando la concentración de peróxido de hidrógeno que rodea a las células es baja, tal y como describen en su trabajo con un modelo AIA en ratas Dai y colaboradores (58). Los resultados mostraron que no existe una regulación mediada por RSV, ya que su expresión fue similar a la encontrada en el tejido de los animales de los grupos CONTROL y AIA. Sin embargo, dado que estudios previos han mostrado que en modelos *in vivo*, el RSV es capaz de aumentar la actividad catalítica de CAT en respuesta al estrés oxidativo (59), son necesarios estudios posteriores para determinar si la actividad enzimática de CAT es regulada por el uso de RSV.

En este sentido, en estudios previos realizados por nuestro grupo se demostró como el RSV es capaz de inhibir la expresión de mediadores inflamatorios como la citocina pro-inflamatoria (IL-1 β), quimioquinas (MPC-1, CINC-1) y enzimas inducibles como COX-2 que juegan un papel clave en la patogénesis y progresión de la AR (3). Así, el estudio de la Ang-1 supone una novedad debido a que se trata de un importante mediador de la angiogénesis, un proceso fundamental en la artritis ya desde etapas tempranas de la enfermedad (60). Ang-1 es una glicoproteína perteneciente a la familia de los factores de crecimiento endotelial y que actúa principalmente en la vasculatura, controlando el desarrollo de los vasos sanguíneos y su estabilidad. Algunos estudios destacan la actuación complementaria de esta Ang-1 con VEGF, otro mediador crucial en el proceso angiogénico. De esta forma, mientras que VEGF actúa en la formación temprana de vasos, Ang-1 es esencial en un periodo más tardío de la formación vascular (61). Nuestros resultados mostraron que . Ang-1 incrementa su expresión durante la fase aguda de la artritis, en toda la membrana sinovial, posiblemente con el fin de promover la neovascularización y atenuar los daños causados por el ambiente hipóxico (62). En contraste, en presencia de RSV se observó una reducción significativa de Ang-1, manteniendo únicamente su expresión en células cercanas a los vasos sanguíneos. Esta disminución fue descrita previamente por El-Sayed y colaboradores (63) en un modelo

AIA, con otro antioxidante natural. Trabajos previos han mostrado que la Ang-1 es capaz de regular el mantenimiento de la quiescencia celular, además promover la angiogénesis. Asimismo, se ha observado que es capaz de inhibir la expresión de VEGF. (64). De este modo, los resultados sugieren que la Ang-1 juega un papel importante en la angiogénesis durante el desarrollo de la Artritis; sin embargo, el uso de una dieta antioxidante con RSV, es capaz de reducir su expresión en el tejido, favoreciendo la quiescencia celular y estabilizando los vasos sanguíneos.

En respuesta al ambiente oxidativo que se genera durante la artritis, las células activan diversos mecanismos con la finalidad de evitar la muerte celular. La autofagia es un proceso que se activa en situaciones de estrés con la finalidad de reparar y reciclar componentes dañados en la célula. Con la finalidad de conocer el efecto regulador del RSV en la inducción de autofagia en el modelo AIA, se demostró que el uso de una dieta antioxidante con RSV es capaz de incrementar la presencia de vacuolas autofagicas en la membrana sinovial de ratas AIA. Esto sugiere que la autofagia juega un papel importante en la regulación del efecto antioxidante del RSV, favoreciendo la eliminación de orgánulos dañados y reduciendo el estrés oxidativo.

Por otro lado, con la finalidad de demostrar el efecto del RSV sobre la expresión de Nrf2 bajo un estímulo proinflamatorio con IL-1 β , se realizaron estudios *in vitro*, donde se inhibió la expresión de Nrf2. Nuestros resultados mostraron que el pre-tratamiento con RSV e IL-1 β , no es capaz de inducir la activación del Nrf2. Sin embargo, dado que la vida media del Nrf2 es muy corta, estudios posteriores son necesarios para adecuar las condiciones en las que Nrf2 puede ser activado. Estos resultados están en concordancia con otros estudios en los que se ha visto que el RSV es capaz de aumentar la expresión de Nrf2, activándolo tanto *in vitro* (65), como *in vivo* mediante modelos animales *knock out* para Nrf2 (66, 67).

En nuestros estudios hemos querido comprobar si SOD-1 es dependiente de Nrf2, y como se produce la modulación de su expresión mediante el tratamiento con diferentes estímulos. SOD-1 es una enzima que contiene cobre y zinc (Cu/Zn-SOD1) y actúa en la AR principalmente desde el citosol de macrófagos activos, más concretamente en la mitocondria, donde es clave en la conversión de los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno (54). Nuestros resultados demuestran que cuando las células sinoviales no son tratadas, éstas presentan una expresión constitutiva de SOD-1 en el citoplasma, en todas las condiciones. Dicha expresión basal de SOD ha sido descrita *in vitro* anteriormente, asociándola también a CAT (57). Hemos podido observar cómo SOD-1 presenta una localización nuclear cuando las células son tratadas con los estímulos RSV y más notablemente con IL-1 β . Tsang CK y colaboradores (68) han descrito en su trabajo como SOD-1 puede actuar como un factor de transcripción entrando rápidamente en el núcleo cuando se produce un incremento en la concentración de peróxido de hidrógeno previniendo el daño en el material genético como consecuencia del estrés oxidativo. Así, nuestros resultados sugieren que la relocalización de SOD-1 al núcleo, es una respuesta temprana de los sinoviocitos a la presencia de citocinas pro-inflamatorias.

En cuanto a la regulación de SOD-1 por el uso de RSV, estudios previos *in vitro* (69) han demostrado que SOD-1 ve incrementada su actividad enzimática en diferentes líneas celulares; en contraste, nuestros resultados demuestran que SOD-1 no se encuentra más expresado en los grupos tratados con RSV. Por ello, sería necesario realizar estudios posteriores de actividad enzimática para determinar si SOD-1 se encuentra regulada por RSV. En nuestros resultados, también se ha podido observar que SOD-1 aparece formando agregados; son muy pocos los datos en relación a este fenómeno, estando la mayoría descritos en la patología de la Esclerosis Lateral Amiotrofica (ELA). Finalmente, los resultados presentados para SOD-1 en este trabajo mostraron que Nrf2 no participa en la modulación de la expresión de

SOD-1; trabajos previos tanto *in vivo* como *in vitro* ya habían concluido que SOD-1 no presenta una expresión dependiente de Nrf2 (70, 71).

En resumen, se puede concluir que el RSV es capaz de inducir la activación del Nrf2 tanto *in vivo* como *in vitro*; hecho que puede favorecer la respuesta antioxidante de las células y disminuir la respuesta antiinflamatoria. Asimismo, el RSV actúa disminuyendo la expresión del mediador pro-inflamatorio Ang-1. Por otro lado, la presencia de vacuolas autofágicas, puede ser una respuesta reparativa de las células al daño oxidativo, que se ve incrementado por el uso del RSV. Finalmente, la expresión de enzimas antioxidantes no parece tener una modulación directa por el uso RSV; sin embargo, estudios posteriores son necesarios para conocer la actividad enzimática de dichos componentes.

6. CONCLUSIONES.

I. El RSV, administrado oralmente, reduce los principales signos de la fase aguda de la artritis, disminuyendo la hiperplasia e hipertrofia sinovial, así como el infiltrado de células procedentes del sistema inmune en un modelo AIA.

II. El RSV no modula la expresión total del factor de transcripción Nrf2, pero es capaz de inducir su re-localización a la forma activa en el núcleo, en el tejido sinovial de un modelo AIA.

III. El RSV reduce la expresión del mediador angiogénico Ang-1; sin embargo, no moduló la expresión de la enzima antioxidante CAT, en un modelo AIA.

IV. El RSV es capaz de inducir la autofagia en sinoviocitos de la membrana sinovial en un modelo AIA.

V. La activación de Nrf2 es una respuesta temprana en sinoviocitos cultivados en condiciones de hipoxia en presencia de citocinas pro-

inflamatorias tales como la IL-1 β . Asimismo, el RSV es capaz de inducir la re-localización de Nrf2 en su forma activa.

VI. La expresión de SOD-1 en sinoviocitos cultivados en condiciones de hipoxia no se ve modulada en ausencia de Nrf2. Sin embargo, su estimulación con RSV e IL-1 β es capaz de re-localizar a SOD-1 en el núcleo, incluso en ausencia de Nrf2. Asimismo, dichos estímulos generan agregados de SOD-1 en el citoplasma.

6.1. CONCLUSIONS.

I. RSV, orally administered, reduces the main signs of the acute phase of arthritis, decreasing synovial hypertrophy and hyperplasia and infiltration of cells from the immune system.

II. RSV did not shown the ability to modulate the expression of Nrf2 transcription factor, but is able to induce its relocation to the active form in the nucleus, in the synovial tissue of an AIA model.

III. RSV reduces the expression of angiogenic mediator (Ang-1). However, RSV did not regulate the expression of the antioxidant enzyme CAT, in AIA model.

IV. RSV is able to induce autophagy in synoviocytes of synovium in AIA model.

V. Nrf2 activation is an early response in cultured synoviocytes under hypoxic conditions in the presence of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β . Also, RSV is able to induce the relocation of Nrf2 to the nucleus, in its active form.

VI. SOD-1 expression in cultured synoviocytes under hypoxic conditions was apparently not regulated in the absence of Nrf2. However, stimulation with RSV and IL-1 β is able to relocate SOD-1 in the nucleus,

even in the absence of Nrf2. Also, RSV and IL-1 β were able to cause aggregation of SOD-1 in the cytoplasm.

7. AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer a mis directoras, María y Maylin, por confiar en mí y enseñarme tantas cosas en tan poco tiempo, y a mis compañeras de grupo, Laura y Olalla, por ayudarme tanto en mis primeros pasos en el laboratorio.

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. Izquierdo E, Pablos JL. Fibroblastos sinoviales. *Semin Fund Esp Reumatol.* 2003; 14(4): 121-128.
2. Sweeney SE, Firestein GS. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 36(2004): 372-378.
3. Riveiro-Naveira RR. Resveratrol y Artritis Reumatoide: efecto protector en un modelo animal de artritis y estudio de sus propiedades antiinflamatorias en sinoviocitos artríticos humanos en cultivo. A Coruña: Universidad de A Coruña; 2015.
4. Ares-Valcárcel MN. Implicaciones patológicas del desequilibrio redox: estudio del papel de la mitocondria en el proceso inflamatorio del sinoviocito y estudio de la participación de Nrf2 en la capacidad angiogenica endotelial. A Coruña: Universidad de A Coruña; 2014.
5. Picerno V, Ferro F, Adinolfi A, Valentini E, Tani C, Alunno A. One year in review: the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2015; 33: 551-558.
6. Torres Ibáñez L. Implicación de las vías Nrf2/HO-1 y NADPH oxidasa en modelos experimentales de artritis y osteoporosis postmenopáusicas. Valencia: Universitat de valència; 2012.
7. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2010; 233(1): 233-55.
8. Ea HK, Bazille C, Lioté F. Histología y fisiología de la membrana sinovial. EMC. 2008; 41(4): 1-6.
9. Huber LC, Distler O, Tarnier I, Gay RE, Gay S, Pap T. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2006; 45: 669-675.
10. Choy EHS, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2001; 344(12): 907-916.

11. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006; 444(14): 860-867.
12. Sánchez-Ramón S, López-Longo FJ, Carreño L. Interleucinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide: más allá de las citocinas proinflamatorias. *Reumatol Clin*. 2011; 6(53): 520-524.
13. Lezama Asencio P. Rol de quimiocinas y sus receptores en la inflamación. *Rev Med Vallejana*. 2006; 3(2): 133-139.
14. Acón Ramírez D, Zapata Aguilar N, Méndez Rodríguez A. Artritis Reumatoide. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica*. 2012; 69(602): 299-307.
15. Binięcka M, Canavan M, McGarry T, Gao W, McComick J, Cregan S *et al*. Dysregulated bioenergetics: a key regulator of jointinflammation. *Ann Rheum Dis*. 2016; 0: 1-9.
16. Azizi G, Boghוזian R, Mirshafiey A. The potential role of angiogenic factors in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2014; 17: 369-383.
17. Paleolog EM. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2002; 4(3): 81-90.
18. Walsh DA. Angiogenesis and arthritis. *Rheumatology*. 1999; 38: 103-112.
19. Cacciapaglia F, Anelli MG, Rizzo D, Morelli E, Scioscia C, Mazzota D *et al*. Influence of TNF- α inhibition on oxidative stress of rheumatoid arthritis patients. *Reumatismo*. 2015; 67(3): 97-102.
20. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y *et al*. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; 2016: 1-18.
21. Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis *Clin Exp Immunol*. 2008; 152: 415-422.
22. Mei Y, Thompson MD, Cohen RA, Tong X. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1852(2): 243-251.
23. Hariharan N, Zhai P, Sadoshima J. Oxidative stress stimulates autophagic flux during ischemia/reperfusion. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 14(11): 2179-2190.
24. Xu K, Cai Y, Lu S, Li X, Liu L, Li Z *et al*. Autophagy induction contributes to the resistance to methotrexate treatment in rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cells through high mobility group box chromosomal protein 1. *Arthritis Res Ther*. 2015; 17: 374.
25. Shi C, Zhang S, Hong S, Pang J, Yesibulati Y, Yin P *et al*. The pro-apoptotic effects of TIPE2 on AA rat fibroblast-like synoviocytes via regulation of the DR5-caspase-NF- κ B pathway in vitro. *Onco Targets Ther*. 2016; 9: 339-1000.
26. Chimenti MS, Triggianese P, Conigliaro P, Candi E, Melino G, Perricone R. The interplay between inflammation and metabolism in rheumatoid arthritis. *Cell Death Dis*. 2015; 17: 1887.
27. Riveiro-Naveira RR, Valcárcel-Ares MN, Almonte-Becerril M, Vaamonde-García C, Loureiro J, Hermida-Carballo L *et al*. Resveratrol lowers synovial hyperplasia,

inflammatory markers and oxidative damage in an acute antigen-induced arthritis model. *Rheumatology*. 2016.

28. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean MEJ, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem*. 2002; 50: 3337-3340.

29. Li C, Xu X, Tao Z, Wang XJ, Pan Yuanjiang. Resveratrol dimers, nutritional components in grape wine, are selective ROS scavengers and weak Nrf2 activators. *Food Chem*. 2015; 173: 218-223.

30. Shazib P. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB*. 2003; 17: 1975-1985.

31. Matos MJ, Mura F, Vazquez-Rodríguez S, Borges F, Santana L, Uriarte E *et al*. Study of coumarin-resveratrol hybrids as potent antioxidant compounds. *Molecules*. 2015; 20: 3290-3308.

32. Alarcón de la Lastra C, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35(5): 1156-1160.

33. Ares-Valcárcel MN, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-García C, Loureiro J, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, López Armasa MJ. Mitochondrial dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes. *Rheumatology*. 2014; 53: 1332-1343.

34. Dreger H, Westphal K, Weller A, Baumann G, Stangl V, Meiners S *et al*. Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for proteasome inhibitor-mediated cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2009; 83: 354-361.

35. Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y *et al*. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *World J Biol Chem*. 2000; 275(21): 16023-16029.

36. Furfaro AL, Traverso N, Domenicotti C, Piras S, Moretta L, Marinari UM *et al*. The Nrf2/HO-1 axis in cancer cell growth and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; 2016:1-14.

37. Li W, Kong AN. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Molecular carcinogenesis*. 2009; 48: 91-104.

38. Nguyen T, Nioni P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem*. 2009; 284(20): 13291-13295.

39. Correa de Adjounian MF, Adjounian H, Adjounian SH. Silenciamiento de genes mediante RNA interferencia: consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores. *AVFT*. 2008; 27(1): 23-26.

40. Fakhr E, Zare F, Teimoori-Toolabi L. Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing. *Cancer Gene Ther*. 2016; 23: 73-82.

41. Tornero Molina J, Sanmartí Sala R, Rodríguez Valverde V, Martín Mola E, Malenco de la Fuente JL, González Álvaro I *et al*. Actualización del documento de consenso de la

Sociedad Española de Reumatología sobre el uso de terapias biológicas en la artritis reumatoide. *Reumatol Clin*. 2010; 6(1): 23-36.

42. McInnes I, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. 2011; 365: 2205-2219.

43. Acón Ramírez D, Zapata Aguilar N, Méndez Rodríguez A. Artritis reumatoide. *Revista médica de costa rica y centroamérica*. 2012; 59(602): 299-307.

44. Rosillo MA, Alarcón de la Lastra C, Sánchez-Hidalgo M. An update of dietary phenolic compounds in prevention and management of rheumatoid arthritis. *Food and function*. 2016; 1-53.

45. Cardozo LF, Pedruzzi LM, Stenvinkel P, Stockler-Pinto MB, Daleprane JB, Leite M *et al*. Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. *Biochimie*. 2013; 3: 1-13.

46. Chen X-Y, Wang Z-C, Li L, Liu X-L, Sun Y-H. Regulation of synoviocyte activity by resveratrol in rats with adjuvant arthritis. *Exp Ther Med*. 2013; 6(1): 172-176.

47. Hasko G, Pacher P. Endothelial Nrf2 activation: a new target for resveratrol? *American journal of physiology*. Jul;299(1):H10-2.

48. Soeur J, Eilstein J, Lereaux G, Jones C, Marrot L. Skin resistance to oxidative stress induced by resveratrol: from Nrf2 activation to GSH biosynthesis. *Free radical biology & medicine*. Jan;78:213-23.

49. Wruck CJ, Fragoulis A, Gurzynski A, Branderburg LO, Kan YW, Chan K *et al*. Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-Knockout mice. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70(5): 844-850.

50. Maicas N, Ferrándiz MN, Brines R, Ibáñez L, Cuadrado A, Koenders MI *et al*. Deficiency of Nrf2 accelerates the effector phase of rheumatoid arthritis and aggravates joint disease. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15(4): 889-901.

51. Jung KA, Kwak MK. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules*. 2010; 15: 7266-7291.

52. Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochemical pharmacology*. Mar 15; 85(6):705-17.

53. Itoh K, Mochizuki M, Ishii Y, Ishii T, Shibata T, Kawamoto Y, *et al*. Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin j(2). *Molecular and cellular biology*. 2004 Jan;24(1):36-45.

54. Bocci V, Valacchi G. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatment. *Front Chem*. 2015; 3(4): 1-6.

55. Dreger H, Westphal K, Weller A, Baumann G, Stangl V, Meiners S *et al*. Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for proteasome inhibitor-mediated cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2009; 83: 354-361.

56. Popovici I, Rezus E, Mancas G. Antioxidant enzyme levels in reactive arthritis and rheumatoid polyarthritis. *J Prev Med.* 2001; 9(2): 38-42.
57. Gierut A, Perlman H, Pope RM. Innate immunity and rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010; 36(2): 271-296.
58. Dai L, Claxson A, Marklind SL, Feakins R, Yousaf N, Chernajovsky Y *et al.* Amelioration of antigen-induced arthritis in rats by transfer of extracellular superoxide dismutase and catalase genes. *Gen Ther.* 2003; 10: 550-558.
59. Rege SD, Kumar S, Wilson DN, Tamura L, Geetha T, Mathews ST *et al.* Resveratrol protects the brain of obese mice from oxidative damage. *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013: 419092.
60. Fagiani E, Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Letters.* 2013; 328: 18-26.
61. Thurston G. Complementary action of VEGF and angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage. *J Anat.* 2002; 200: 575-580.
62. Linares PM, Chaparro M, Gisbert JP. Angiopoietins in inflammation and their implication in the development of inflammatory bowel disease. A review. *J Crohns Colitis.* 2014; 8: 183-190.
63. El-Sayed RM, Moustafa YM, El-Azab MF. Evening primrose oil and celecoxib inhibited pathological angiogenesis, inflammation, and oxidative stress in adjuvant-induced arthritis: novel role of angiopoietin-1. *Inflammopharmacol.* 2014; 22(5): 305-317.
64. Li L, Chong HC, Ng SY, Kwok KW, Teo Z, Tan EH *et al.* Angiopoietin-like 4 increases pulmonary tissue leakiness and damage during influenza pneumonia. *Cell Rep.* 2015; 1247(15).
65. Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *Eur J Pharmacol.* 2005; 591: 66-72.
66. Ungvari Z, Bagi Z, Feber A, Recchia F, Sonntag WE, Pearson K *et al.* Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013; 299(1): 18-24.
67. Haskó G, Pacher P. Endothelial Nrf2 activation: a new target for resveratrol?. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2010; 299: 10-12.
68. Tsang CK, Liu Y, Thomas J, Zhang Y, Zheng XFS. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nat Commun.* 2014; 5: 3446.
69. Kavas GO, Ayral PA, Elhan AH. The effects of resveratrol on oxidant/antioxidant systems and their cofactors in rats. *Adv Clin Exp Med.* 2013; 22(2): 151-155.
70. Dell'Orco M, Milani P, Arrigoni L, Pansarasa O, Sardone V, Maffioli E *et al.* Hydrogen peroxide-dependent oxidative stress induces SOD1 transcription gene is independent

from Nrf2 transcription factor in a cellular model of neurodegeneration. *BBA. Gene regulatory mechanisms*. 2015; 1859(2): 315-323.

71. Guo Y, Zhang Y, Wen D, Duan W, An T, Shi P *et al*. The modest impact of transcription factor Nrf2 on the course of disease in an ALS animal model. *Lab Invest*. 2013; 93: 825-833.